Využití spektrofluorimetrie pro detekci padělání rostlinných olejů

Bc. Martin Tomášek

Diplomová práce
2021

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky
Ústav elektroniky a měření

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Martin Tomášek**
Osobní číslo:	**A19707**
Studijní program:	**N3902 Inženýrská informatika**
Studijní obor:	**Bezpečnostní technologie, systémy a management**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Využití spektrofluorimetrie pro detekci padělání rostlinných olejů**
Téma práce anglicky:	**The Use of Spectrofluorometry for the Detection of Vegetable Oil Adulteration**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma fluorescenční spektroskopie a padělání rostlinných olejů.
2. Seznamte se se spektrofluorimetrem Shimadzu RF-6000.
3. Připravte vzorky vybraných olejů a jejich směsí.
4. Pomocí fluorescenční spektroskopie analyzujte jednotlivé vzorky.
5. Stanovte hranici, od které je možno pomocí spektrofluorimetrie identifikovat padělaný olej.
6. Navrhněte úlohu do předmětu Forenzní vědy.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. PELANT, Ivan a Jan VALENTA. Luminiscence doma, v přírodě a v laboratoři. Praha: Academia, 2014. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-2394-0.
2. LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1.
3. KONGBONGA, Yvon Gilbert Mbesse et al. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. Food and Nutrition Sciences [online]. 2011, 02(07), 692-699. DOI: 10.4236/fns.2011.27095. ISSN 2157-944X.
4. SAYAGO, A., M. T. MORALES a R. APARICIO. Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by a spectrofluorimetric method. European Food Research and Technology [online]. 2004, 218(5), 480-483. ISSN 1438-2377.
5. GE, Feng, Chaoyin CHEN, Diqiu LIU a Shenglan ZHAO. Rapid Quantitative Determination of Walnut Oil Adulteration with Sunflower Oil Using Fluorescence Spectroscopy. Food Analytical Methods [online]. 2014, 7(1), 146-150. ISSN 1936-9751.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Michaela Mikuličová**
Ústav elektroniky a měření

Datum zadání diplomové práce: **15. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **17. května 2021**

doc. Mgr. Milan Adámek, Ph.D. v.r.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta aplikované informatiky
DĚKAN
L.S.

Ing. Milan Navrátil, Ph.D. v.r.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 15. ledna 2021

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen připouští-li tak licenční smlouva uzavřená mezi mnou a Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně s tím, že vyrovnání případného přiměřeného příspěvku na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše) bude rovněž předmětem této licenční smlouvy;
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis diplomanta

ABSTRAKT

Cílem této práce je analyzovat vybrané vzorky rostlinných olejů s použitím spektrofluorimetru. Z jednotlivých olejů budou připraveny směsi a na základě analýzy bude zkoumáno, jaký procentuální podíl příměsi se ve směsi nachází a bude možno určit, zda jsou oleje čisté, nebo jsou ředěny jiným olejem. Poté bude na základě měření určena minimální hranice pro detekci padělání. Na závěr bude vytvořena laboratorní úloha do předmětu Forenzní vědy.

Klíčová slova: Spektrofluorimetr, olej, směs, padělání, detekce

ABSTRACT

The aim of this thesis is to analyze selected samples of vegetable oils using a spectrofluorimeter. Mixtures will be prepared from the individual oils and, based on the analysis, the percentage of the impurity in the mixture will be examined and it will be possible to determine whether the oils are pure or diluted with another oil. Then, the measurement will determine the minimum limit for detecting counterfeiting. Finally, a laboratory task will be created for the Forensic Science class.

Keywords: Spectrofluorimeter, oil, mixture, counterfeiting, detection

Rád bych poděkoval své rodině a přátelům za podporu při studiu a tvorbě diplomové práce. Speciálně bych chtěl poděkovat vedoucí práce Ing. Michaele Mikuličové za odborné vedení a cenné rady.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

„Lidé se obávají neznáma. Jest pravda, že každé opuštění starého znamená nejistotu – skok do tmy. Avšak kdo chce pomoci sobě a jiným, musí opustit dobré, aby mohl vybojovat lepší. Nesmí držeti pevně vrabce v hrsti jen proto, že je lepší než holub na střeše. Bez odvahy ke změně není zlepšení, a tak není ani blahobytu!“

Tomáš Baťa

OBSAH

ÚVOD **9**
I TEORETICKÁ ČÁST **10**
1 LUMINISCENCE **11**
1.1 DĚLENÍ LUMINISCENCE DLE ZPŮSOBU EXCITACE 12
1.2 LUMINISCENCE DLE DOBY TRVÁNÍ PO SKONČENÍ EXCITACE 13
1.2.1 Fluorescence 13
1.2.2 Fosforescence 14
1.3 STOKESŮV ZÁKON 15
1.3.1 Jablonského diagram 16
1.4 VAVILŮV ZÁKON 17
2 LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE **18**
2.1 EMISNÍ SPEKTRUM 18
2.2 EXCITAČNÍ SPEKTRUM 18
2.2.1 Excitované stavy 19
2.3 VYUŽITÍ SPEKTROSKOPIE V PRAXI 19
3 OLEJE A JEJICH PADĚLÁNÍ **20**
3.1 OLEJE 20
3.1.1 Rostlinné oleje 20
3.1.2 Živočišný tuk 21
3.1.3 Motorové oleje 21
3.2 PADĚLÁNÍ OLEJŮ 22
II PRAKTICKÁ ČÁST **25**
4 SPEKTROFLUORIMETR SHIMADZU RF-6000 ..... **26**
4.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE O SPEKTROFLUORIMETRU 26
4.2 ZPŮSOB MĚŘENÍ POMOCÍ SPEKTROFLUORIMETRU 27
5 PŘÍPRAVA A ANALÝZA VZORKŮ **30**
5.1 POPIS A ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ 30
5.1.1 Olivový olej č. 1 30
5.1.2 Olivový olej č. 2 31
5.1.3 Olivový olej č. 3 31
5.1.4 Olivový olej č. 4 32
5.1.5 Olivový olej č. 5 32
5.1.6 Spektrum olivových olejů 33
5.1.7 Řepkový olej 35
5.1.8 Hroznový olej 36
5.1.9 Slunečnicový olej č. 1 36
5.1.10 Slunečnicový olej „domácí“, konopný a mandlový 37

5.1.11 Slunečnicový olej č. 2 37
5.1.12 Souhrn spekter olejů použitých do směsí 38
5.1.13 Souhrn olejů použitých do směsí 39
5.1.14 Nejistota měření 39
5.2 POPIS A ANALÝZA SMĚSÍ 41
5.2.1 Směs olivového olej č. 5 a slunečnicového oleje č. 3 42
5.2.2 Olivový olej č. 5 + Řepkový olej 44
5.3 STANOVENÍ HRANICE PRO DETEKCI PADĚLÁNÍ SLUNEČNICOVÉHO OLEJE 48
5.4 STANOVENÍ HRANICE PRO DETEKCI PADĚLÁNÍ ŘEPKOVÉHO OLEJE 51
6 NÁVRH LABORATORNÍ ÚLOHY 53
ZÁVĚR 54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 55
SEZNAM OBRÁZKŮ 58
SEZNAM TABULEK 60
SEZNAM PŘÍLOH 61

ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřena na fotoluminiscenční analýzu rostlinných olejů, za účelem zjištění možných hranic pro detekci padělání. V první části práce bude provedena rešerše na téma fluorescenční spektroskopie, aby bylo zřejmé, jakým způsobem bude měření probíhat, jaká je aktuální situace s paděláním olejů, jaké výzkumy byly provedeny a jaké výsledky z hlediska padělání byly objeveny. Jelikož je extra panenský olivový olej nákladnější než většina běžných olejů, bude se práce věnovat převážně těmto olivovým olejům a jejich padělání. Poté bude popsán spektrofluorimetr použitý k získání spekter olejů a jejich směsí. Pro tato měření bylo vybráno množství olejů (mandlový, kokosový, řepkový, slunečnicový, …), které budou měřeny jednotlivě, bez jakékoli úpravy, a to z důvodu potencionální aplikace – odhalování padělků přímo „v terénu“. Řepkový či slunečnicový olej byl vybrán, jelikož je snadno dostupný a pohybuje se v nižší cenové hladině než extra panenské olivové oleje. Dále budou z těchto vzorků vytvořeny směsi, které budou měřeny v mnoha různých koncentracích, aby bylo zcela viditelné, jak se intenzita luminiscence měřeného vzorku zvyšuje či snižuje v závislosti na poměru olivového a jiného oleje. Ze získaných výsledků bude na základě analýzy jednotlivých vzorků možné zjistit, zda se jedná o směs, nebo o jeden čistý druh oleje. Poté bude analyzována řada směsí o různé koncentraci, aby bylo možné vidět, jak se emisní spektra mění dle snižujícího se množství olivového oleje. Na základě analýzy dat, jež bude provedena pomocí několika dalších měření, bude stanovena hranice, při které bude možné zjistit minimální koncentraci příměsi, jíž je možné zachytit spektrofluorimetrem. Při této hranici bude možné zjistit padělání olivového oleje. Poslední částí diplomové práce bude vytvoření laboratorní úlohy pro studenty fakulty Aplikované informatiky univerzity Tomáše Bati ve Zlíně do předmětu Forenzní vědy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LUMINISCENCE

„*Luminiscencí pevných látek rozumíme přebytek elektromagnetického (světelného) záření, které látka vysílá nad zářením rovnovážným popsaným Planckovým vyzařovacím zákonem*.“ [1] Zdroje elektromagnetického záření vyzařují energii po kvantech. Planck právě na základě kvantové teorie a v souladu se zákony pravděpodobnosti odvodil svůj vyzařovací zákon, který konstatuje:

$$E_{o\lambda} = \frac{dE_o}{d\lambda} = f(\lambda, T) = c^2 h \frac{2\pi\lambda^{-5}}{e^{ch/k\lambda T} - 1} \quad (1)$$

Kde

E_o značí hustotu zářivého toku dokonale černého tělesa

T značí termodynamickou teplotu zářiče

λ značí vlnovou délku záření

h značí Planckovu konstantu která má hodnotu $h = (6{,}6256 \pm 0{,}0005).10^{-34}$ J.s.

c značí rychlost světla ve vakuu

k značí Boltzmannovu konstantu která má hodnotu $k = (1{,}38054 \pm 0{,}00018).10^{-23}$ J.K^{-1}. [2]

Samotná luminiscence se dá tedy chápat jako spontánní záření látek v dané spektrální oblasti. Toto záření má určitou dobu doznívání, čímž je myšleno, že trvá i po skončení působení budícího účinku. To znamená, že světelné záření není spojeno pouze s teplotou látky, podle Wienova posunovacího zákona, ale i s jiným dějem, luminiscencí. Luminiscenční záření má větší vlnovou délku, tedy nižší frekvenci, než budící (excitační) záření a dělí se dle způsobu excitace a dle doby trvání luminiscence po skončení excitace.[3] Toto dělení je popsáno v následujících podkapitolách.

1.1 Dělení luminiscence dle způsobu excitace

První dělení luminiscence je podle způsobu excitace luminiscenčního záření, tedy tím, jak luminiscenční záření vzniká, či jak je buzeno.

Fotoluminiscence

Energie ve formě fotonu je pohlcena (absorbována) látkou, což vede k excitaci elektronu do některého z vyšších energetických stavů. Při návratu elektronu do základního stavu se nadbytečná energie vyzáří opět ve formě fotonu. Emisní záření má větší vlnovou délku než záření excitační. Základní podmínkou pro vznik fotoluminiscence je schopnost molekul absorbovat ultrafialové nebo viditelné záření. Čím větší je schopnost absorpce, tím je fotoluminiscence intenzivnější. [4]

Elektroluminiscence

K excitaci dochází při průchodu elektrického proudu látkou. [3]

Chemiluminiscence

Jedná se o emisi elektromagnetického záření, vznikajícího v průběhu chemických reakcí. Takové záření, ať už ultrafialové, viditelné či infračervené, je nejčastěji generováno oxidací a připisuje se přenosu oxidační energie na molekulu. Molekula sama však oxidaci nepodléhá a poté ztrácí excitační energií tím, že emituje světlo specifické vlnové délky. [5]

Bioluminiscence

Podobným způsobem jako u chemiluminiscence doprovází jisté fyziologické biochemické reakce. Bioluminiscence vzniká chemickou reakcí v živých organismech. Celý proces je výsledkem oxidace luciferinu za přítomnosti enzymu luciferázy. Jedná se o speciální případ chemiluminiscence. [6]

Katodoluminiscence

Vzniká při dopadu vysokoenergetického elektronového svazku na stínítko. [3]

Mechanoluminiscence

Při mechanoluminiscenci dochází k excitaci v důsledku mechanického působení na pevnou látku. Mechanoluminescence, jež je někdy označována jako triboluminiscence, je občas chápána špatně. Ve skutečnosti je to z důvodů, že se může jednat o řadu různých mechanických napětí, tření, aplikovaný tlak, náraz. Také je ale mechanoluminiscence citlivá na čistotu a morfologii vzorku, což znamená, že je třeba znát přesné složení vzorku. [7]

Termoluminiscence

Těleso je zchlazeno na nízkou teplotu, poté ozářeno krátkovlnným elektromagnetickým zářením a poté pozvolně zahříváno, čímž dochází k emisi luminiscenčního záření. [3]

Rentegonoluminiscence

Jedná se druh luminiscenčního záření, excitovaného pomocí rentgenového záření. [3]

Sonoluminiscence

Velmi silná ultrazvuková pole vytváří v kapalině mraky chaotických blikajících bublin, kterým se říká "multi-bublinová sonoluminiscence". Sonoluminiscence je tedy buzena akustickými nebo ultraakustickými kmity. [8]

1.2 Luminiscence dle doby trvání po skončení excitace

Luminiscence se dělí podle doby trvání na fluorescenci a fosforescenci.

1.2.1 Fluorescence

Návrat elektronu z excitovaného do základního stavu je spinově povolený a emise fotonu probíhá rychle (cca 10 ns). Životnost fluoroforu je dána průměrnou dobou mezi návratem do základního stavu a excitací. Jelikož se fluorescence projevuje ve velmi krátkém časovém horizontu, je nutno ji sledovat pomocí optiky a elektroniky. Většinou se fluorescence vyskytuje v aromatických molekulách. Nejčastějším fluoroforem je chinin (obsažen v nápoji tonic). [9]

Hlavní charakteristiky fluorescence:

- Intenzita – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času.
- Spektrální složení – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí.
- Polarizace – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny.
- Doba dohasínání – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi.
- Koherenční vlastnosti – vztahy mezi fázemi světelných vln. [10]

Podle [11], v ideálním systému pro měření fluorescence by mělo být splněno několik podmínek:

1) Aby byla koncentrace fluoroforů přibližně lineárně závislá na intenzitě fluorescence, musí být dostatečně nízká.

2) Všechny signály z fluorescenčních složek musí být navzájem nezávislé.

3) Příspěvek signálu od interferujících druhů musí být ve srovnání s cílovým signálem fluoroforu nevýznamný.

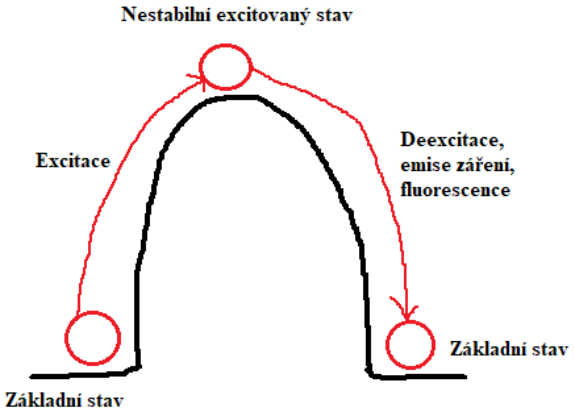
Většina z podmínek je však v neporušených vzorcích potravin běžně porušována. [11]

1.2.1.1 Fluorescenční anizotropie

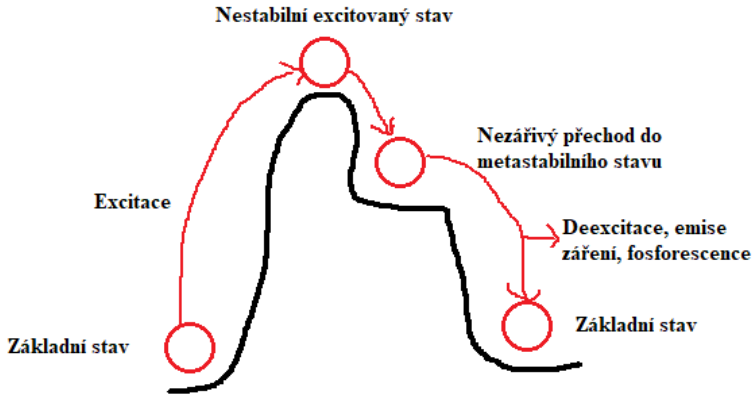
Fluorescenční anizotropie či polarizace měří, jak snadno se může fluorofor otáčet. Jedná se o důsledek mnoha faktorů. Fluorescenční anizotropie závisí na velikosti fluoroforu nebo na hydrodynamickém objemu. [12]

1.2.2 Fosforescence

Jedná se o příbuzný jev ku fluorescenci. Hlavním parametrem fosforescence je délka vyzařování. Zatímco u fluorescence dochází k okamžitému vyzáření energie ve formě světla bezprostředně po excitaci, u fosforescence přechází molekula do níže energeticky položeného metastabilního stavu, kde setrvává po delší dobu v řádu sekund až hodin. Zářivých přechodem do základního stavu se uvolňuje zbytková energie ve formě světla. Porovnání fluorescence a fosforescence se dá jednoduše přirovnat k vymrštění předmětu, jak je znázorněno na následujících obrázcích 10 a 11. [13] Návrat elektronu z excitovaného do základního stavu je spinově zakázaný, a proto je emise fotonu pomalá.



Obrázek 1 Schématické vyobrazení fluorescence [13]

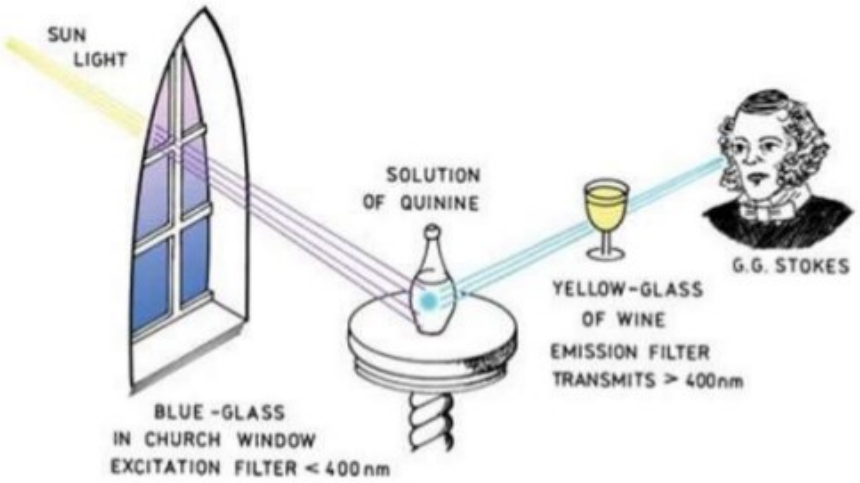


Obrázek 2 Schématické vyobrazení fosforescence [13]

1.3 Stokesův zákon

Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního záření.

Dle Jablonského diagramu (obrázek 4) je energie absorpce obvykle větší než energie emise. Sluneční záření poskytující ultrafialové záření svítící skrze modrý filtr (okno) na nádobu s chininem. Pozorovatel sledující nádobu s chininem skrze žlutý filtr (vinná sklenice) tak může vidět světélkování v oblasti nádoby (obrázek 3). [14]

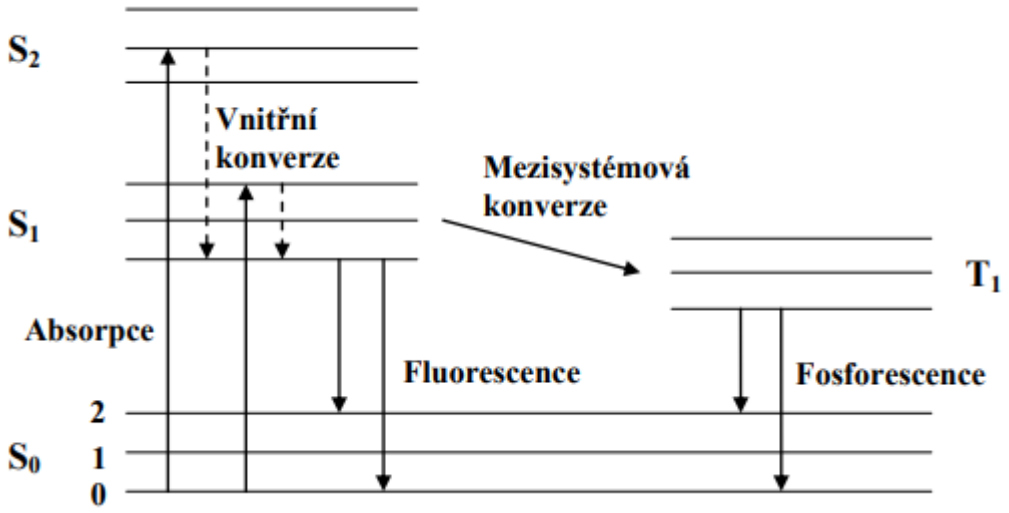


Obrázek 3 Experimentální schéma pro detekci Stokesova posunu [9]

George Stokes pozoroval tento posun poprvé v roce 1852 a právě od té doby se mu říká Stokesův posun. Když absorpční či emisní spektra fluoroforu mají dvě nebo více pásem pak se Stokesův posun rovná rozdílu, jenž odděluje nejintenzivnější pásma těchto dvou spekter. [15]

1.3.1 Jablonského diagram

Jablonského diagram znázorňuje procesy, které se vyskytují mezi absorpcí a emisí světla (viz obrázek 4). Je často používán jako výchozí bod pro diskusi o absorpci a emisi světla.[9] Slouží pro lepší pochopení procesů, jež probíhají od absorpce světla až po jeho emisi. Do těchto procesů spadá absorpce fotonů, fluorescence, vnitřní konverze, mezisystémový přechod, fosforescence a také zpožděná fluorescence. Jablonského diagram (viz obrázek 4) se skládá z jednotlivých singletových stavů, jež jsou znázorněny pomocí symbolů S0, S1, S2. Po absorpci záření je fluorofor obvykle excitován do vyšší vibrační hladiny stavu S1 nebo S2. Tomuto přechodu se říká vnitřní konverze a nastává během 10^{-12} s. Fluorescence nastává nejčastěji z nejnižší energetické vibrační hladiny stavu S1. Návrat do základního stavu poté nastává na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu S0, který během 10^{-12} s přechází na rovnovážný stav. Díky spinové konverzi se mohou excitované molekuly ve stavu S1 dostat i do prvního tripletního stavu T1 (mezisystémová konverze). Emise ze stavu T1 se označuje jako fosforescence. Přechod ze stavu T1 do rovnovážného stavu je zakázaný, a proto je o několik řádů pomalejší než fluorescence. [16]



Obrázek 4 Jablonského diagram znázorňující energetické hladiny a energetické přechody molekuly [16]

1.4 Vavilův zákon

Dle Vavilova zákona kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence, že emisní spektra jsou na vlnové délce excitace nezávislá. [17]

2 LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscenční spektroskopie je věda založená na vzájemném působení elektromagnetického záření a zkoumané látky, při kterém dochází k výměně energie, zabývající se vznikem a vlastnostmi spekter. Zkoumaná látka záření nejen pohlcuje, ale také vyzařuje, přičemž vyzářená energie ve formě (nejčastěji) fotonu se svou frekvencí liší od pohlceného elektromagnetického záření. Spektroskopie je často využívána v analytické, či fyzikální chemii k identifikaci substancí. Spektroskopii lze rozdělit mnoha způsoby. Jedním může například být typ interakce vzorku se zařízením, jiným například použitý typ záření a vlnová délka. [18]

2.1 Emisní spektrum

Emisním spektrem je myšlen výstup měření ve tvaru grafické závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce luminiscenčního záření. K tomuto spektru dochází, když excitační zdroj budí energii do vzorku a následovné emitované luminiscenční záření je rozloženo ve spektrálním přístroji (spektrofluorimetr). Pomocí detektoru se optický signál převede na elektrický a ten se díky specifickému softwaru a elektronickému obvodu dále zpracovává, dle aktuálního požadavku. [19]

2.2 Excitační spektrum

Excitačním spektrem je myšlena závislost intenzity na excitační vlnové délce, jež se měří při konstantní emisní vlnové délce. Excitační spektra se užívají v případě, že se vzorek nachází v nižší intenzitě luminiscenčního záření. Důvod, proč měřit excitační spektra je právě proto, že udává nejvhodnější vlnovou délku, respektive energii excitačního fotonu, při níž emisní spektrum vykazuje maximum. [19]

Excitační spektrum se dá také popsat jako představitel změny intenzity fluorescence jako funkce excitační vlnové délky. [20]

2.2.1 Excitované stavy

Jedná se o energetický stav molekuly. Ve chvíli, kdy molekula v základním stavu absorbuje foton, dojde k vybuzení tak zvaného valenčního elektronu (excitace elektronu). Existují dva typy excitovaných stavů:

Singletový stav je typický pro fluorescenci. V tomto stavu jsou všechny spiny spárovány.

Tripletový stav je typický pro fosforescenci. Vyznačuje se dvěma nepárovými elektrony, kde jsou spiny rovnoběžné [21]

2.3 Využití spektroskopie v praxi

Největší využití luminiscenční spektroskopie je v potravinářství, jež je velice rozsáhlé. Nejčastěji se v kombinaci s vícerozměrnými statistickými metodami užívá k hodnocení kvality potravin. Metoda luminiscence se používá například u hodnocení kvality mléka, nebo mléčných výrobků, jelikož obsahují aromatické aminokyseliny a nukleové kyseliny. Taktéž se může využít právě pro měření olejů a detekci jejich padělání. Měření se zaměřují především na olivové oleje (konkrétně extra panenské), kde jsou emisní spektra spojena se složením samotného oleje a jeho stabilitou. Jedním z dalších možností využití je měření oxidace lipidů v masných výrobcích, nebo polynenasycených mastných kyselin v mořských rybách. Může se používat také u alkoholických nápojů jako je pivo, víno, kde se sledují změny složení během skladování, nebo u ovoce v oblasti dozrávání a moučnatosti (například u jablek). [19]

3 OLEJE A JEJICH PADĚLÁNÍ

Následující kapitola pojednává o olejích. Obsahuje základní dělení olejů a jejich členění na základě oblastí, kde se užívají. Jelikož se olej stal nedílnou součástí života a vyrábí se široká škála všelijakých druhů, počínaje od běžných olejů (v potravinářství například slunečnicový) až po speciální oleje (opunciový), začaly se oleje padělat a ředit.

3.1 Oleje

Olej je nepolární chemická látka, jež je viskózní kapalinou při pokojové teplotě (18°C – 25°C). Oleje jsou hydrofobní (nemísitelné ve vodě), či lipofilní (mísitelné s jiným tukem). Oleje obsahují vysoké množství vodíku a uhlíku, což způsobuje hořlavost a povrchovou aktivitu. Většina olejů se při pokojové teplotě nachází v kapalném skupenství.

Oleje mohou být původu živočišného, rostlinného nebo petrochemického a dále se dělí na těkavé a netěkavé. Jejich využití je rozsáhlé. Užívají se v potravinářství (např. řepkový olej), lékařství (různé minerální oleje), jako palivo (topné oleje), technice (mazání – motorový olej), a také jako surovina pro výrobu materiálů (plasty). [22]

3.1.1 Rostlinné oleje

Oleje a tuky rostlinného původu se mohou dělit podle několika kritérií, jako je například konzistence. Většina olejů se nachází v tekuté podobě (viz obrázek 5), jak již bylo zmíněno (například slunečnicový olej). Některé oleje se však nachází v pevné podobě, do doby zahřátí (kokosový tuk). Toto dělení je velmi hrubé, jelikož záleží na teplotě. Většina tuků se rozpouští při teplotě 20°C. Rostlinné oleje se převážně užívají v potravinářství, k přípravě pokrmů. (slunečnicový, řepkový, olivový, mandlový, …). „Rostlinné oleje jsou hlavním zdrojem mastných kyselin, kterými jsou převážně triglyceridy (95 % - 98 %), zbývající složky (5 % - 2 %) sestávají z komplexních směsí vedlejších sloučenin v široké škále chemických tříd.“ [23]

Rostlinné oleje jsou složité směsi nefluorescenčních a fluorescenčních sloučenin. Lze očekávat molekulární interakce mezi složkami (přenos energie, samovolné kalení). Tyto interakce mohou způsobit narušení charakteristické fluorescence jednotlivých složek. [24]

Obrázek 5 Rostlinný olej [25]

3.1.2 Živočišný tuk

V dnešní době se používají většinou pouze dva zástupci živočišných tuků. Jedná se o máslo a vepřové sádlo (obrázek 6). Další tuky jako například hovězí loje se již používat přestaly. Zatímco rostlinné oleje se získávají lisováním semen rostlin, živočišný olej je výsledkem škvaření hřbetního a plstního sádla, anebo v případě másla stloukáním.

Obrázek 6 Živočišný tuk [26]

3.1.3 Motorové oleje

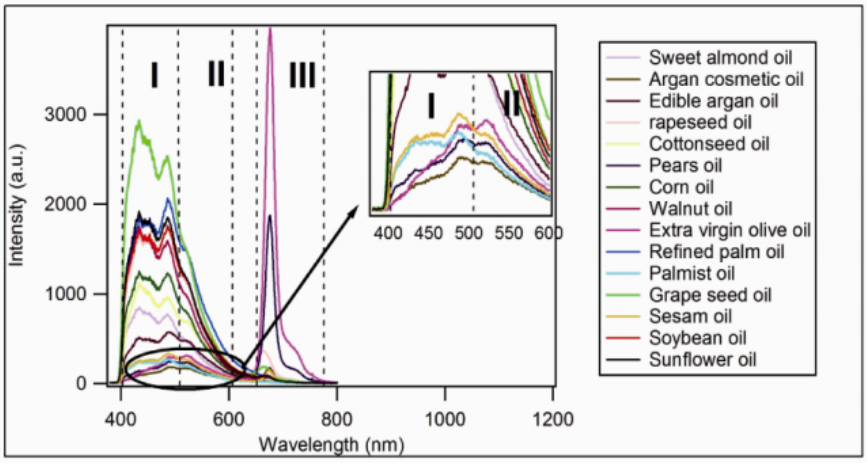
Motorový olej je látka, která se skládá ze základových olejů, jež jsou obohaceny o různé přísady jako jsou například dispergační činidla, či čistící prostředky. Mísí se za použití základových olejů složených z ropných uhlovodíků, polyalfaolefinů, nebo jejich směsí. Motorové oleje se používají jako mazadla pro snížení tření a opotřebení pohyblivých částí motoru.

3.2 Padělání olejů

„Oficiální metody k posuzování autenticity falšování rostlinných olejů jsou uvedeny v obchodních standardech Mezinárodní rady pro olivový olej (IOOC – International Olive Oil Council), ve standardech Codex Alimentarius a v nařízení Komise (EHS) č. 2568/91 o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy, ve znění pozdějších nařízení.“ [27]

Všeobecně lze hovořit o padělání (falšování) všech druhů olejů. Tato práce se však zabývá výhradně paděláním rostlinných olejů. Rostlinné oleje jsou často předmětem falšování. Druhy rostlinných olejů se řadí z mnoha hledisek, jako je cena (závisle na kvalitě), použití, původ a podmínky zpracování. Kupříkladu olivový olej je považován jako vysoce ceněný, a proto bylo pozorováno mnoho případů, kde byl olivový olej padělán jiným rostlinným olejem nižší kvality za extra třídu. Podle zprávy Evropského parlamentu z roku 2013 patří olivový olej mezi 10 nejvíc rizikových potravin z hlediska padělání, upravování, nahrazování. [17]

Padělání olejů však závisí na více faktorech, jako je složení, hustota, barva a jiné. Kupříkladu kokosový olej je značně dražší než palmojádrový olej. Oba tyto oleje však obsahují okolo 47% laurové kyseliny, a proto se kokosový olej často padělá menší částí palmovým olejem. [27]

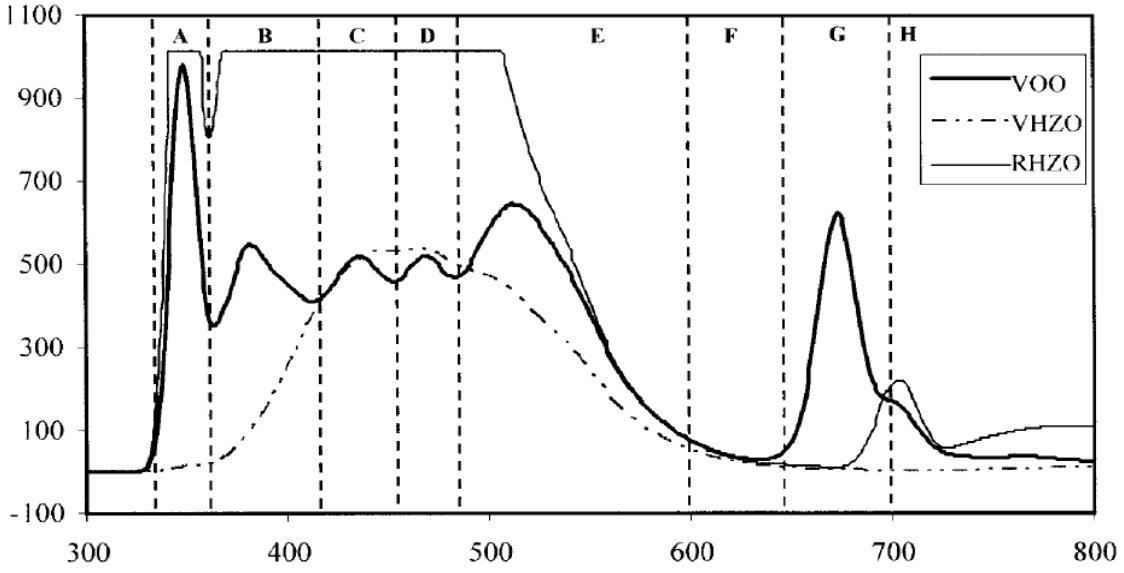


Obrázek 7 Emisní spektra vybraných rostlinných olejů [23]

Na obrázku 7 se nachází emisní spektra rostlinných olejů. V první oblasti jsou vyobrazeny produkty oxidace. V oblasti 2, jež se nachází přibližně na vlnové délce 525 nm je možné vidět vitamin E. Třetí oblast je zaměřena na obsažený chlorofyl.

Pro uvedení příkladu je vybrán výzkum padělání ořechového oleje. Je to z důvodu, že je ořechový olej finančně velmi nákladný a podobný slunečnicovému oleji, jež je proti ořechovému oleji značně levnější. K detekci ořechového oleje se používají různé analytické metody, avšak většina metod zabývajících se ořechovým olejem, je založena na plynové chromatografii a vysoce účinné kapalinové chromatografii. [28] Z toho důvodu se práce zabývá výhradně paděláním olivového oleje. Komplexní kontrola kvality panenského olivového oleje vyžaduje analytické nástroje s určitou složitostí. Jedná se o jednoduché analytické procesy jako je stanovení UV absorbance až po složité procesy jako stanovení různých sloučenin (steroly, alifatické alkoholy, ...). Spektroskopické techniky jsou pro tyto účely ideální. Je to z důvodu jednoduchosti, nákladové efektivnosti a nedestruktivní metody měření. [29]

Právě paděláním extra panenského olivového oleje se zabýval A. Sayago ve svém výzkumu [30], kde se pokoušel padělat olivový olej pomocí oleje z lískových ořechů. Obrázek 8 ukazuje intenzitu luminiscence na vybraných vlnových délkách emisního spektra. Výsledky výzkumu vykazují významné rozdíly v oblastech A, C, D, E a G, jelikož spektra skutečných vzorků byla dostatečně odlišná.



Obrázek 8 Olivový a lískový olej [30]

VOO – Panenský olivový olej

VHZO – Panenský lískový olej

RHZO – Rafinovaný lískový olej

Ve výzkumu [31] detekce a kvantifikace olivových olejů metodou LIF se ukázalo, že při excitaci laserem s vlnovou délkou 473 nm je dosaženo predikce rozsahu koncentrace falšování od 2,5 do 50 % s chybovostí menší než 2 %. Bylo prokázáno, že padělání extra panenského olivového oleje arašídovým či řepkovým olejem metodou LIF lze úspěšně detekovat při excitace laserem s vlnovou délkou 473 nm vícerozměrnou analýzou. Vzhledem k faktu, že pro měření není nutná žádná úprava vzorku, lze použít tuto metodu pro kvantifikaci a detekci padělání olejů pomocí přenosných spektrofluorimetrů *in-situ*. [31]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 SPEKTROFLUORIMETR SHIMADZU RF-6000

Pro měření olejů v této práci bude použit spektrofluorimetr Shimadzu RF-6000, jež je součástí inventáře FAI UTB.

Obrázek 9 Spektrofluorimetr Shimadzu RF-6000

4.1 Základní informace o spektrofluorimetru

Spektrofluorimetr Shimadzu RF-6000 je přístroj pro měření fluorescenčního záření. Používá se hlavně na kvalitativní spektrální analýzu látek.

Hlavní využití:

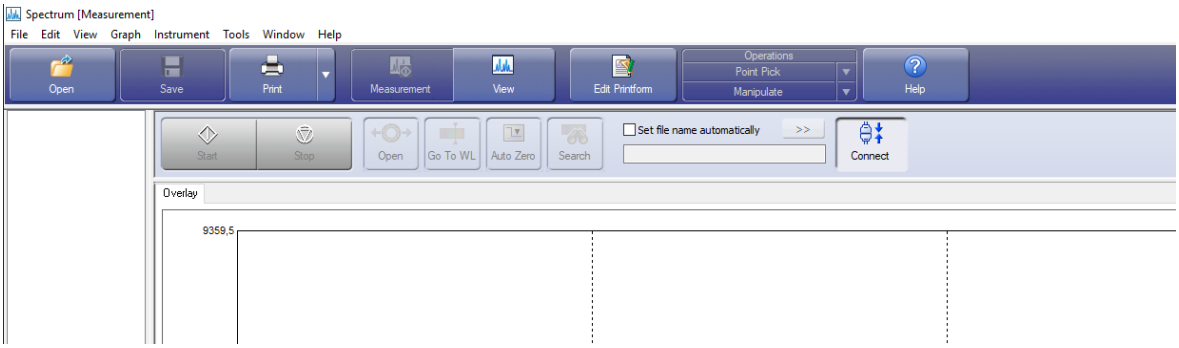
- Farmaceutika – Analýza složek ve sloučeninách, kontrola kvality farmaceutických ingrediencí či léčivých přípravků.
- Humanitní vědy – Měření spektrálních vlastností fluorescenčních sond.
- Životní prostředí – Hodnocení nízkoaktivních kontaminantů v řekách a půdách.
- Chemie – Identifikace mechanismů umělé fotosyntézy, analýza kumarinu v lehké naftě.
- Potravinářství – kvantitativní analýza přísad a obalů, potravin (oleje, mléka, …).
- Elektronika a elektrotechnika – Spektrální vlastnosti fluorescenčních materiálů. Měření kvantové účinnosti a kvantového výtěžku, analýza LED, solárních článků a organických elektro materiálů. [32]

4.2 Způsob měření pomocí spektrofluorimetru

Práce se spektrofluorimetrem probíhá pomoci softwaru LabSolutions RF. Pro správné výsledky se před začátkem měření provede konfigurace parametrů. Prvním krokem pro měření je zapnutí spektrofluorimetru a vybrání správného programu pro měření. Pro účely měření této práce, bude použita základní analýza – Spectrum.

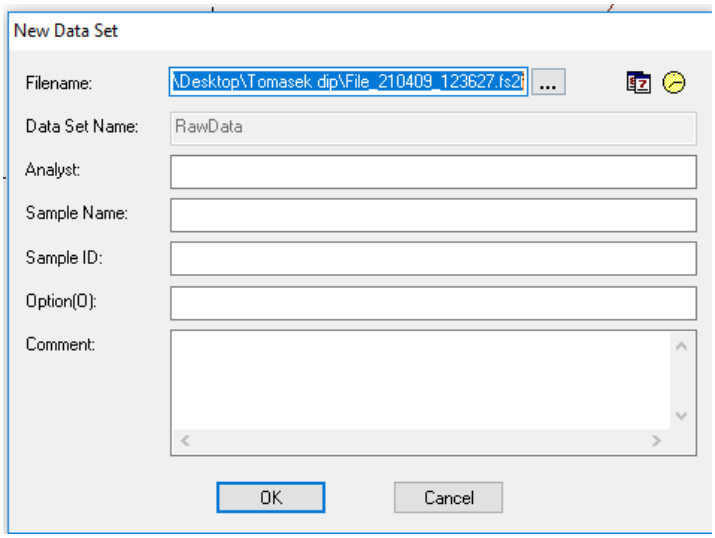
Obrázek 10 Spuštění spektrofluorimetru

Dalším krokem je připojení spektrofluorimetru k měřícímu programu pomocí kliknutí na ikonku Connect.



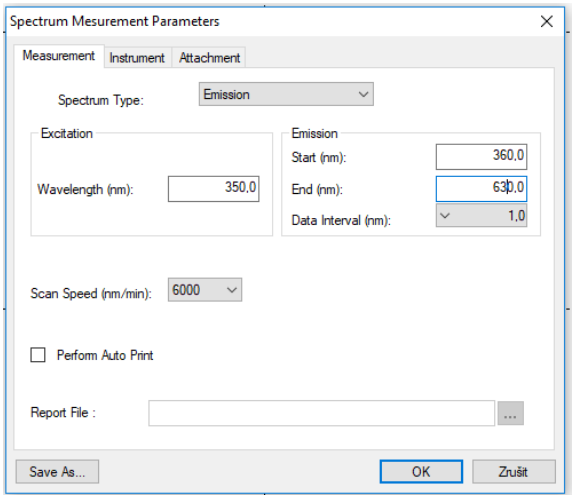
Obrázek 11 Připojení spektrofluorimetru k softwaru

Jakmile je spektrofluorimetr zapnutý a připojený, je připraven k práci. Aby bylo možné začít s měřením, je nutností zvolit cestu pro uložení výsledků měření.



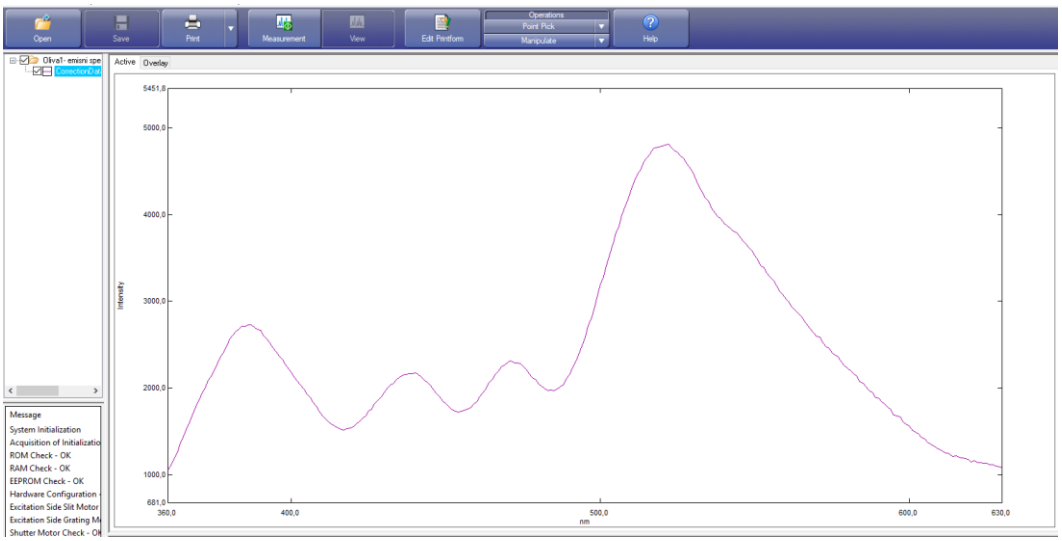
Obrázek 12 Volba cesty pro uložení dat

Po zvolení cesty uložení dat, zbývá poslední krok. To je nastavení parametrů pro měření.



Obrázek 13 Nastavení parametrů pro měření

Po správném nakonfigurování přístroje a uvedení cesty pro uložení výsledků měření se spustí samotné měření, jehož výsledkem jsou závislosti intenzity na emisní vlnové délce – emisní spektra. Na následujícím obrázku 14, je možné vidět výsledek měření pro rozsah emisních vlnových délek 360 – 630 nm.



Obrázek 14 Výsledek měření na vlnové délce 360–630 nm

5 PŘÍPRAVA A ANALÝZA VZORKŮ

Pro účel měření byla vybrána řada olejů, jež byly měřeny nejprve jednotlivě, a poté z nich byly vytvořeny směsi o různých koncentracích. Olivových olejů bylo vybráno 5, které se budou následně mísit se sedmi dalšími oleji.

Emisní spektra byla měřena při excitační vlnové délce 350 nm a pro rozsah emisních vlnových délek 360–690 nm. V oblasti kolem emisní vlnové délky 680 nm se nachází pík chlorofylu, který je v extra panenském olivovém oleji přítomen díky lisování za studena. Intenzita luminiscence chlorofylu je velmi vysoká a způsobuje tak zkreslení zbytku spektra. Proto byla naměřená data rozdělena do dvou spekter – první spektrum pro oblast emisních vlnových délek 360–630 nm, druhé spektrum (spektrum chlorofylu) pro oblast emisních vlnových délek 630–690 nm.

5.1 Popis a analýza jednotlivých vzorků

Pro měření bylo vybráno několik olejů, z nichž pět olejů je olivových, jako hlavní oleje pro padělání. Dále bylo vybráno 6 olejů, z nichž 3 jsou k dostání běžně v supermarketech a 3 byly lisovány za studena domácí výrobou. Všechny oleje (kromě kupovaného slunečnicového, jež je v plastové lahvi) byly skladovány ve skleněné nádobě, za pokojové teploty. Tato kapitola se věnuje speciálně analýze samotných olejů, aby bylo později možné rozlišit „čistý“ olej a směs.

5.1.1 Olivový olej č. 1

Prvním olejem je extra panenský olivový olej La Española, původem ze Španělska. Olej byl skladován v originální zabarvené lahvi.

Obrázek 15 Olivový olej č. 1

5.1.2 Olivový olej č. 2

Druhý olej je též původem ze Španělska. Jedná se o extra panenský olivový olej Ondoliva.

Podobně jako první olivový olej je skladován v originální zabarvené lahvi.

Složení: Extra panenský olivový olej: Výběrová jakost olivového oleje získaného přímo z oliv pouze mechanickými postupy.

Obrázek 16 Olivový olej č. 2

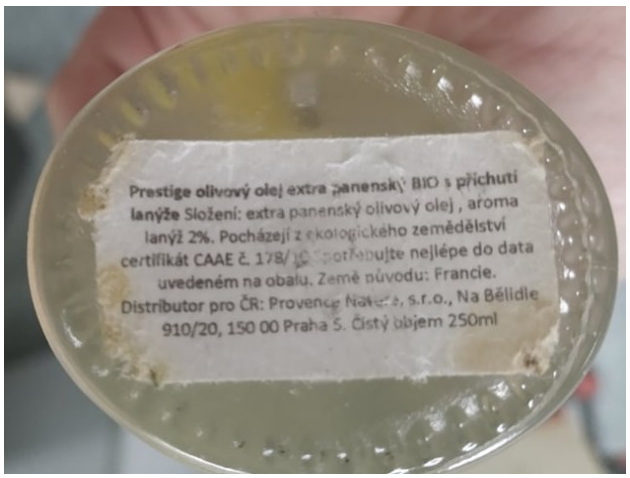
5.1.3 Olivový olej č. 3

Třetí olivový olej je původem z Řecka. Jedná se o extra panenský olivový olej terra creta estate. Stejně jako u olivového oleje 2 se uvádí, že byl olej získán přímo z výběrové jakosti oliv, za použití pouze mechanických postupů.

Obrázek 17 Olivový olej č. 3

5.1.4 Olivový olej č. 4

Čtvrtý olivový olej je od předešlých olivových olejů zcela odlišný. Jedná se o certifikovaný extra panenský olivový olej huile d'olive původem z Francie. Významným rozdílem je zde lanýžové aroma, jehož se v oleji nachází 2 %.



Obrázek 18 Olivový olej č. 4

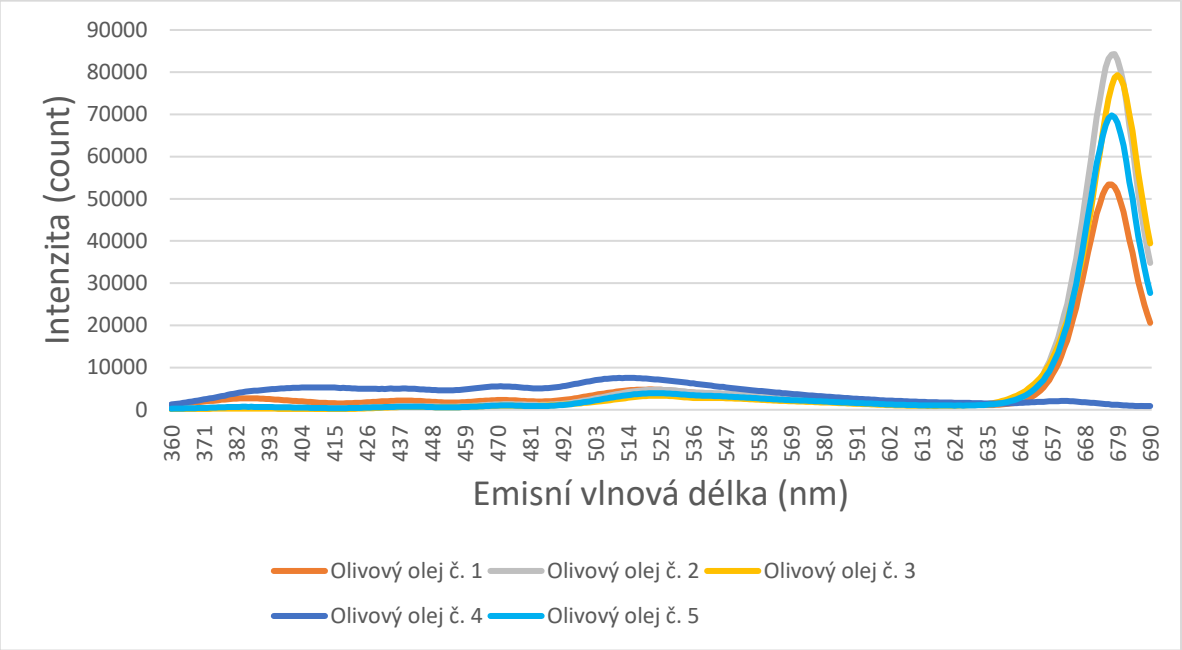
5.1.5 Olivový olej č. 5

Pátým olivovým olejem je extra panenský olivový olej Primadonna Delicato. Olej je opět vyroben pouze mechanický způsobem. Jedná se o směs olivových olejů pocházejících ze zemí Evropské unie.

Obrázek 19 Olivový olej č. 5

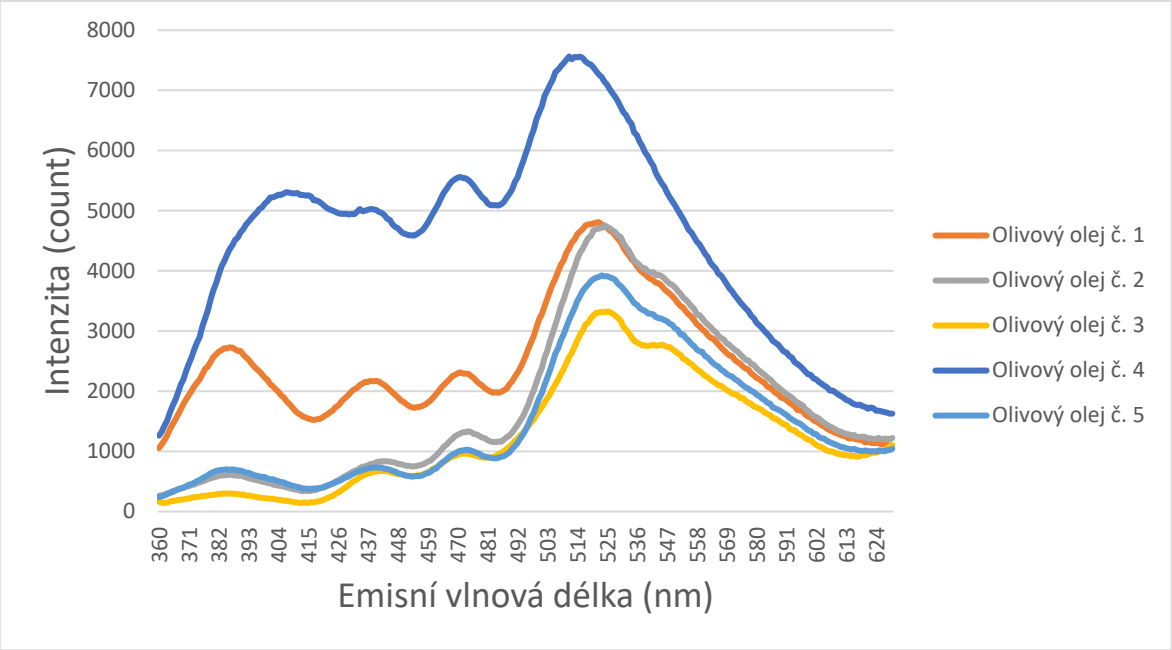
5.1.6 Spektrum olivových olejů

Emisní spektra všech olivových olejů, jež se nachází na obrázku 20, udávají množství informací o složkách, které jsou v olejích obsaženy. Bohužel však nelze vidět jednotlivé píky, a proto budou všechna měření rozdělena do 2 částí. První část bude měřena v rozsahu emisních vlnových délek 360–630 nm pro zisk emisního spektra jednotlivých složek oleje a druhá část bude měřena při rozsahu emisních vlnových délek 630–690 nm pro spektrum chlorofylu.



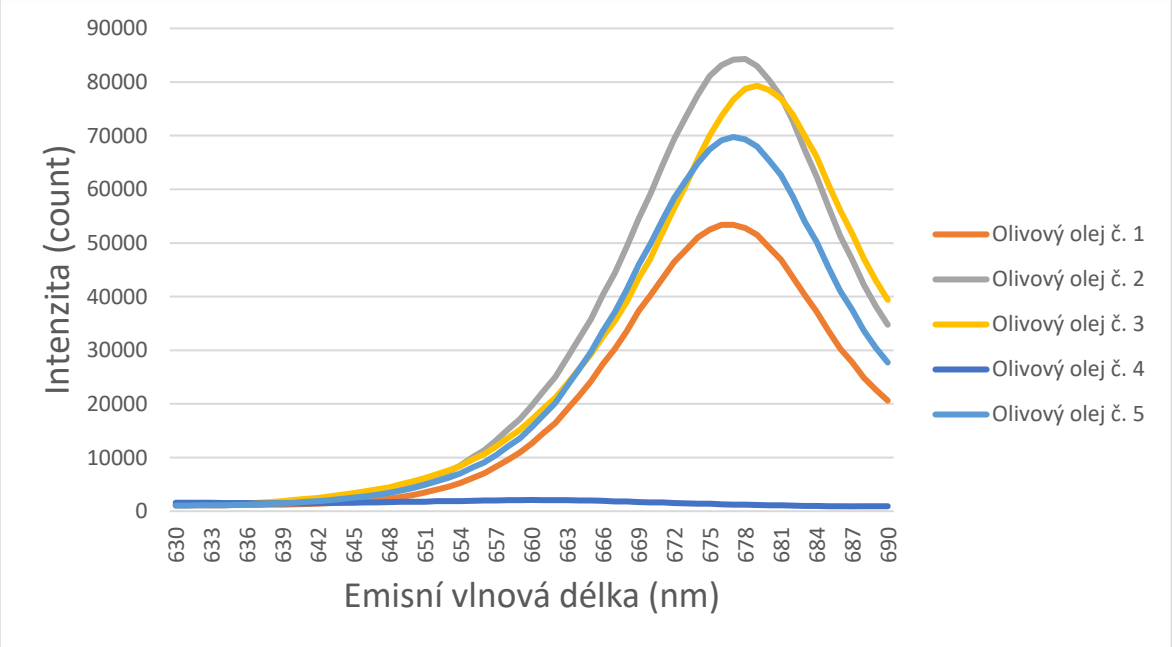
Obrázek 20 Celé spektrum vybraných olivových olejů

V první části emisního spektra na obrázku 21 je možné vidět produkty oxidace jimž odpovídají nejvyšší píky, jež jsou v oblasti vlnových délek přibližně 380–480 nm. Jak je možné vidět, olivový olej č. 4 se velmi liší od ostatních olejů a jeho píky jsou oproti ostatním olejům poněkud rozdílné. Je to pravděpodobně dáno právě přidanou lanýžovou esencí, jež se v oleji vyskytuje. I přes tuto skutečnost lze vidět velkou podobnost s ostatními oleji v oblasti emisních vlnových délek přibližně 490–550 nm, kde se na 525 nm nachází pík odpovídající vitamínu E. [24]



Obrázek 21 Spektrum olivových olejů

Na obrázku 22 se nachází spektrum chlorofylu olivových olejů. Jak je možné vidět, olivový olej číslo 4 se znatelně liší od ostatních olejů, což je dáno pravděpodobně právě přebytečnou složkou (lanýžové aroma), jak bylo zmíněno u předešlého spektra (obrázek 21).



Obrázek 22 Spektrum chlorofylu olivových olejů

V následující tabulce 1 se nachází shrnutí všech olivových olejů užitých v průběhu měření, z důvodu lepší přehlednosti.

Tabulka 1 Souhrn olivových olejů

Označení	**Značka oleje**	**Země původu**
Olivový olej č. 1	La Española	Španělsko
Olivový olej č. 2	Ondoliva	Španělsko
Olivový olej č. 3	Terra creta	Řecko
Olivový olej č. 4	Huile d'olive	Francie
Olivový olej č. 5	Primadonna Delicato	Země Evropské unie

5.1.7 Řepkový olej

Řepkový olej je Brandle vita původem z Německa. Byl skladován při pokojové teplotě v originální zabarvené lahvi.

Obrázek 23 Řepkový olej

5.1.8 Hroznový olej

Hroznový olej Brandle Vita původem z Německa byl stejně jako řepkový olej skladován v zabarvené lahvi, při pokojové teplotě. Olej se získává ze sušených hroznových semínek.

Obrázek 24 Hroznový olej

5.1.9 Slunečnicový olej č. 1

Slunečnicový olej K-Classic je původem z Maďarka. Byl skladován při pokojové teplotě v originální plastové lahvi.

Obrázek 25 Slunečnicový olej

5.1.10 Slunečnicový olej „domácí“, konopný a mandlový

Slunečnicový olej domácí výroby byl zařazen do výzkumu pro zjištění, zdali se domácí olej výrazně liší od běžného oleje ze supermarketu.

Obrázek 26 Slunečnicový „domácí“,
konopný a mandlový olej

Všechny tyto tři oleje byly vyrobeny v domácím prostředí. Byly lisovány za studena, pouze mechanickou formou. Bezprostředně po výrobě byly oleje uloženy do zabarvené lahve, kde byly skladovány až do měření. Po celou dobu byly uloženy při pokojové teplotě, mimo dosah slunečního světla.

5.1.11 Slunečnicový olej č. 2

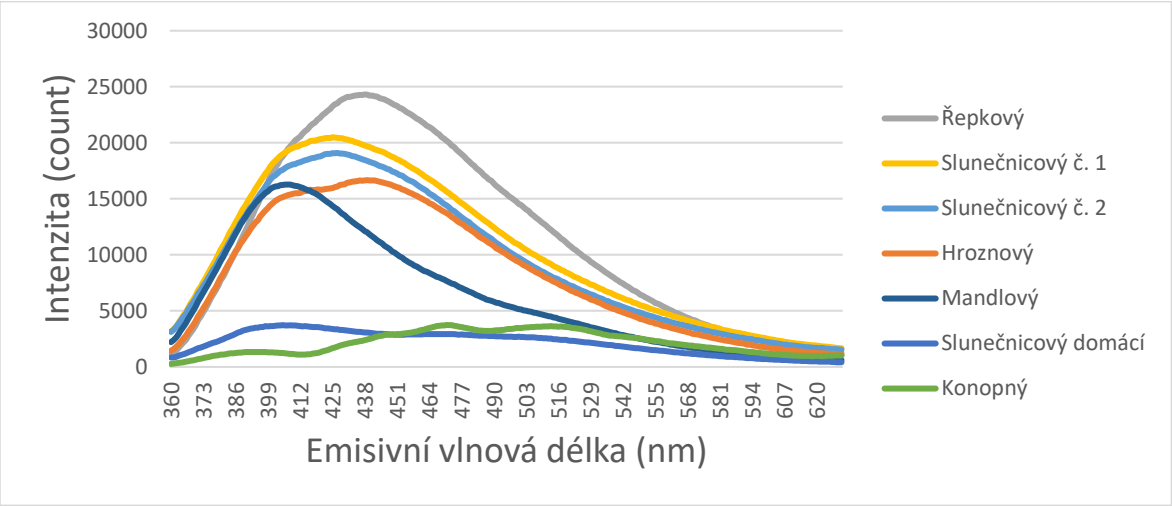
Pro více výsledků měření byl vybrán druhý slunečnicový olej, a to právě z důvodu jeho ceny. Slunečnicový olej se řadí mezi levnější, a proto by mohlo být výhodnější jej užít jako prostředek k padělání. Druhým slunečnicovým olejem byl zakoupen, je VitaDor slunečnicový olej původem z Maďarska.

Obrázek 27 Slunečnicový olej č. 2

5.1.12 Souhrn spekter olejů použitých do směsí

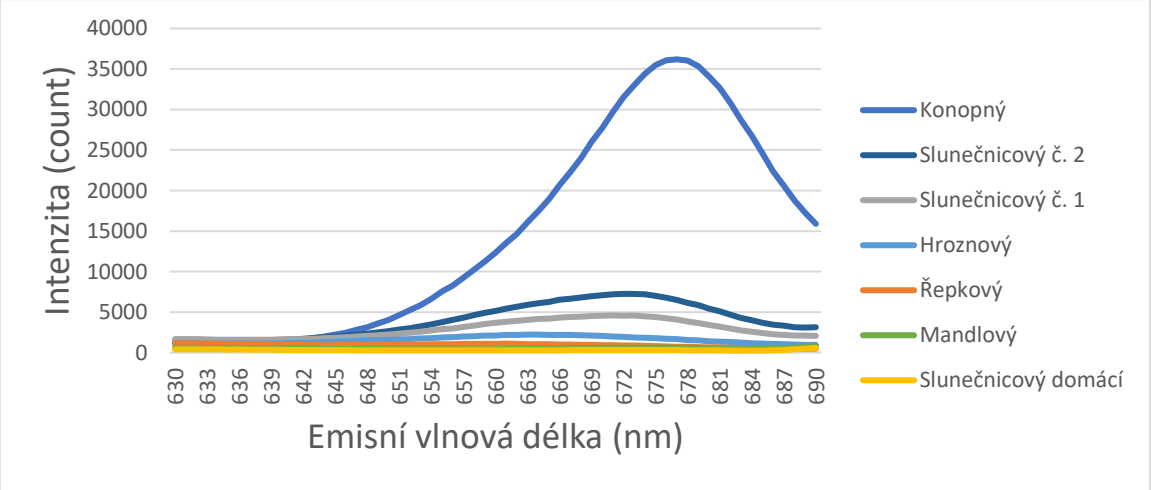
Výsledky měření:

Po srovnání všech olejů je možné vidět, že se od sebe spektra olejů značně liší. Největší podobnosti však dosahují především oleje jako jsou slunečnicový, řepkový, případně konopný. Také hroznový olej je na tom velmi podobně.



Obrázek 28 Spektrum olejů použitých do směsí

Co se týče spektra chlorofylu jednotlivých olejů, je vidět obrovský rozdíl mezi konopným olejem a ostatními oleji. Je to právě z toho důvodu, že v konopí, jakožto v zelené rostlině, je obsaženo velké množství chlorofylu, na rozdíl od mandlí a hroznů, kde se k výrobě oleje používají plody nebo semena.



Obrázek 29 Spektrum chlorofylu olejů použitých do směsí

5.1.13 Souhrn olejů použitých do směsí

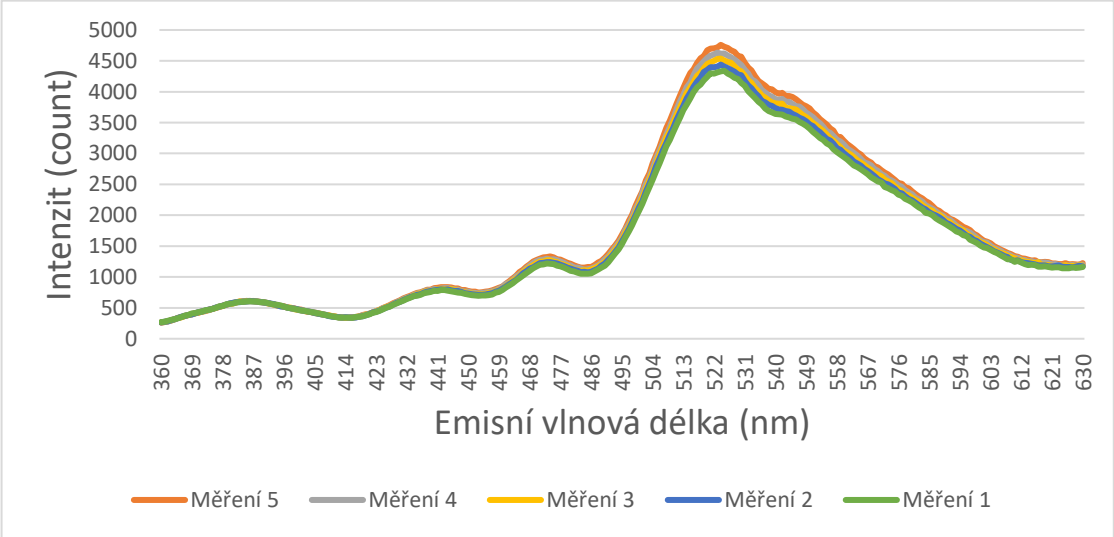
V následující tabulce 2 se nachází souhrn všech olejů, jež byly použity pro měření.

Tabulka 2 Souhrn olejů použitých do směsí

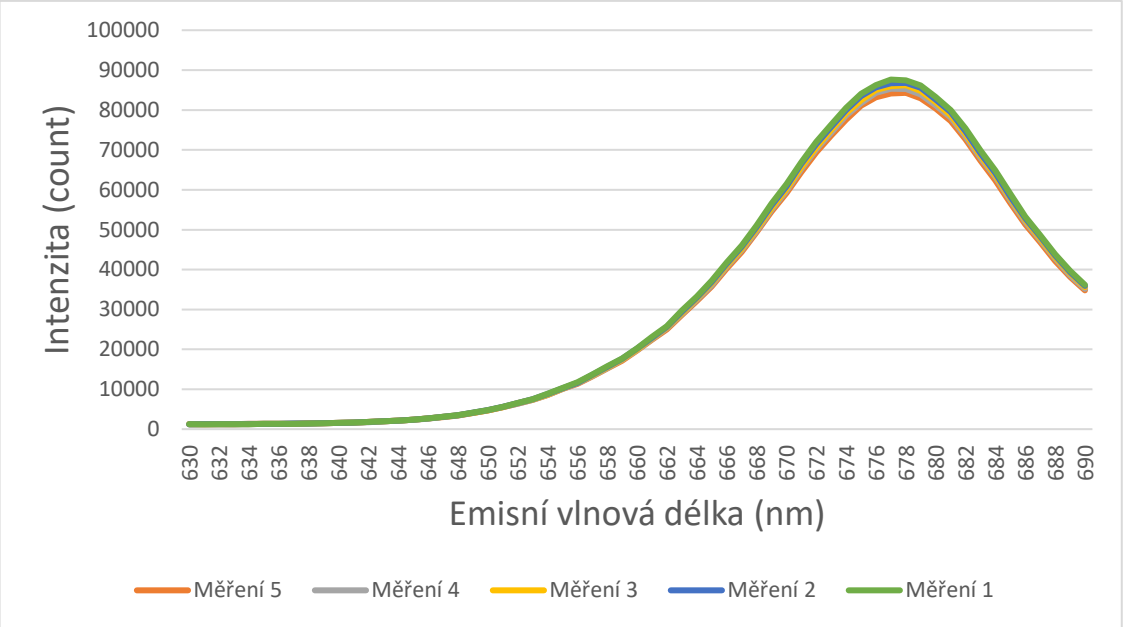
Označení	Značka oleje	Země původu
Slunečnicový olej „domácí“	Domácí	Česká republika
Slunečnicový olej č. 1	K-Classic	Maďarsko
Slunečnicový olej č. 2	VitaDor	Maďarsko
Hroznový olej	Brandle Vita	Německo
Řepkový olej	Brandle Vita	Německo
Mandlový olej	Domácí	Česká republika
Konopný olej	Domácí	Česká republika

5.1.14 Nejistota měření

Pro stanovení nejistoty měření byly všechny analyzované oleje a jejich směsi změřeny 5x. Pro ukázku byl vybrán olivový olej č. 2 jehož spektra lze vidět na obrázcích 30 a 31.



Obrázek 30 Emisní spektrum olivového oleje č.2 – 5 měření



Obrázek 31 Emisní spektrum chlorofylu olivového oleje č. 5 – 5 měření

Na spektrech vyobrazených na obrázcích 30 a 31 je vidět olivový olej, jež byl změřený 5x, aby bylo možné vidět odchylky mezi jednotlivými měřeními. První část se téměř shoduje. Ve druhé části (kolem 523 nm) je možné vidět malou odchylku. Odchylka u chlorofylu (kolem 677 nm) je největší. Obdobné výsledky byly získány také u dalších olejů a jejich směsí. Z naměřených dat byla pro jednotlivé body spektra vypočtena nejistota měření, která se pohybovala v rozmezí 3–5 %, a to pro všechny analyzované vzorky. Pro další zpracování spekter byla zvolena vyšší hodnota nejistoty měření, tedy 5 %.

5.2 Popis a analýza směsí

Vzhledem k rozsáhlosti a výsledkům měření jednotlivých olejů, byly do směsí vybrány pouze dva oleje, a to slunečnicový olej č. 3 a řepkový olej. Je to také z toho důvodu, že jsou tyto oleje snadno dostupné a také cenově levnější než ostatní analyzované oleje. Všechny směsi se měřily v hmotnostním procentu, což je hmotnostní zlomek vyjádřený v procentech. Hmotnostní zlomek je dán podílem hmotnosti oleje použitého jako příměs a hmotnosti celé směsi (olivového oleje a příměsi). Tento podíl lze vyjádřit rovnicí:

$$w = \frac{m_A}{m_S} \tag{2}$$

w = hmotnostní zlomek látky

m_A = hmotnost oleje užitého pro ředění (slunečnicový, řepkový)

m_S = hmotnost celé směsi [33]

Vzorový výpočet po dosazení hodnot do rovnice:

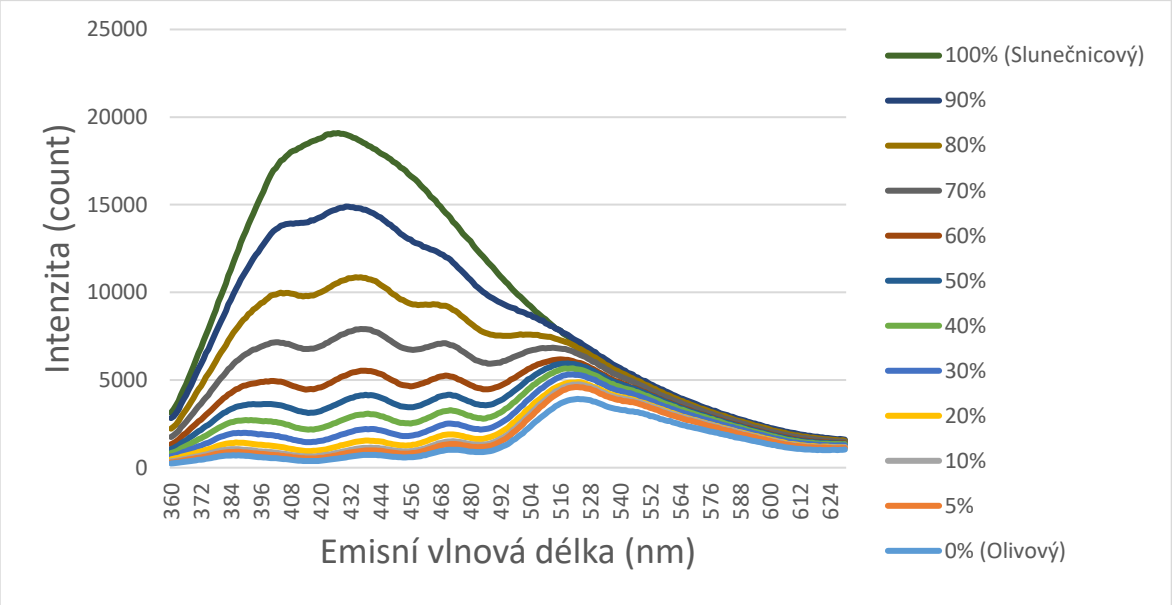
$$w = \frac{9{,}5}{10} = 0{,}95$$

Hmotnostní procento je hmotnostní zlomek vyjádřený procentem, například:

$$w = 0{,}95 * 100 = 95\ \%$$

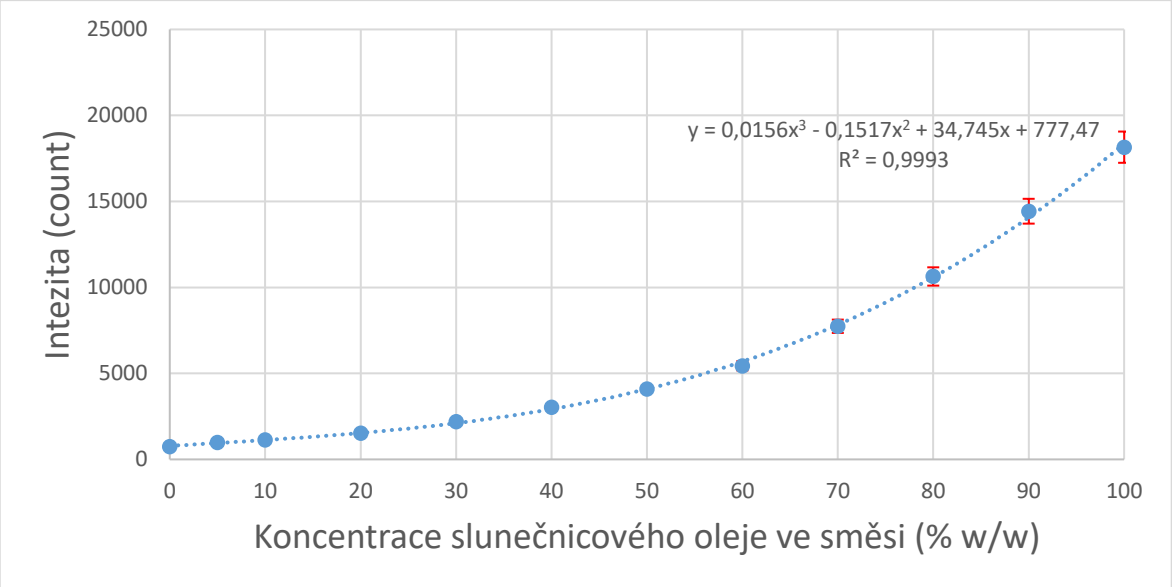
Jednotlivé směsi byly měřeny při w = 0 %, w = 5 %, w = 10 %, w = 20 %, w = 30 %, w = 40 %, w = 50 %, w = 60 %, w =70 %, w = 80 %, w = 90 %, w = 100 %.

5.2.1 Směs olivového olej č. 5 a slunečnicového oleje č. 3

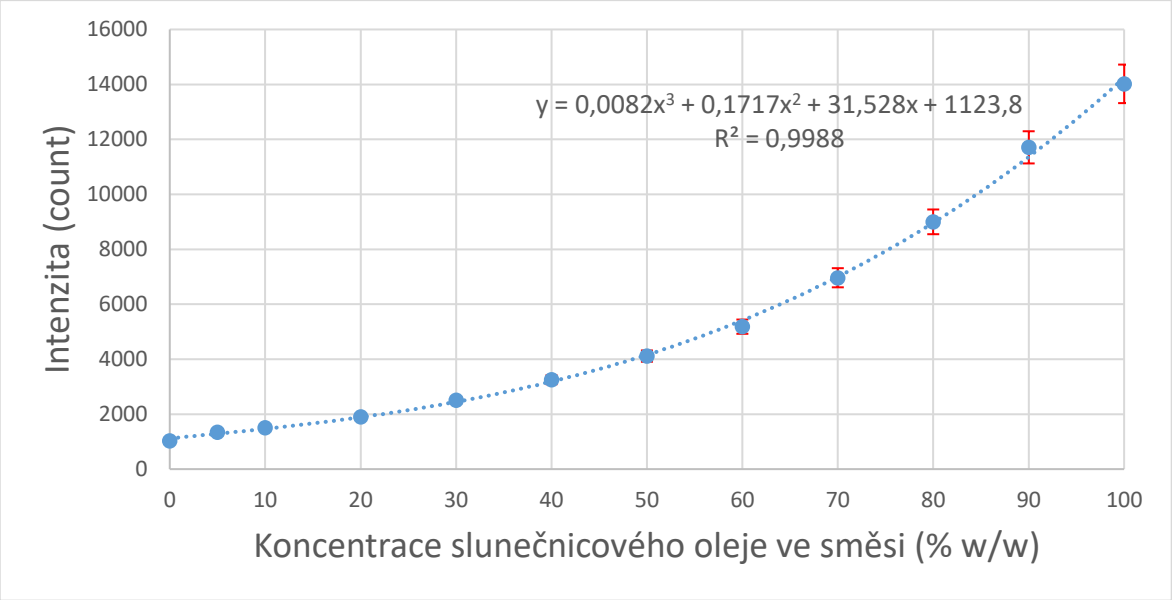


Obrázek 32 Emisní spektrum směsi č.1

Na obrázku 32 je možné vidět výsledná spektra měření směsi pátého olivového oleje a třetího slunečnicového oleje. Na první pohled je možné vidět pravidelný odstup jednotlivých spekter, jež ukazují zvyšující se koncentraci. Čím větší množství slunečnicového oleje se naředilo, tím větší rozestup vzniká. Ačkoliv nejistota měření vyšla v rozsahu cca 3-5 %, v grafech závislosti intenzity na koncentraci byla použita nejistota 5 % z důvodů viditelnosti chybových úseček.

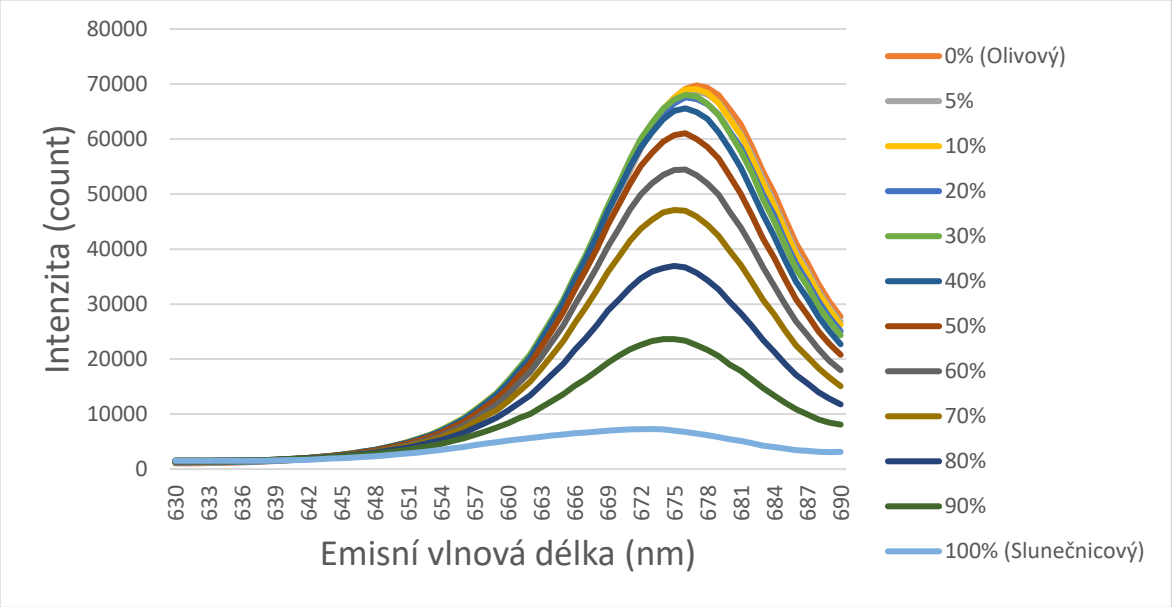


Obrázek 33 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro první směs



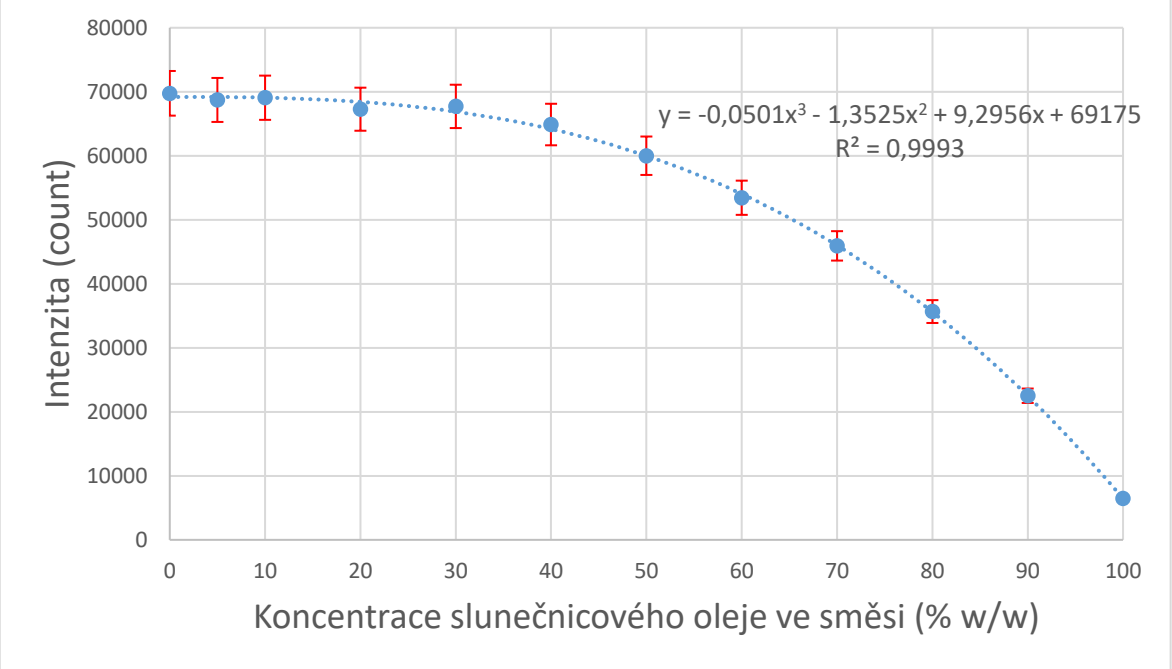
Obrázek 34 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro první směs 2

Na obrázcích 33 a 34 je závislost intenzity luminiscence jednotlivých směsí odpovídající emisní vlnové délce 442nm a 473nm. Jedná se o graf, který znázorňuje postupnou změnu intenzity v závislosti na změně koncentrace olejů. Se zvyšující se koncentrací slunečnicového oleje, jak je možné vidět na obrázku 32, roste intenzita.



Obrázek 35 Spektrum chlorofylu směsi č. 1

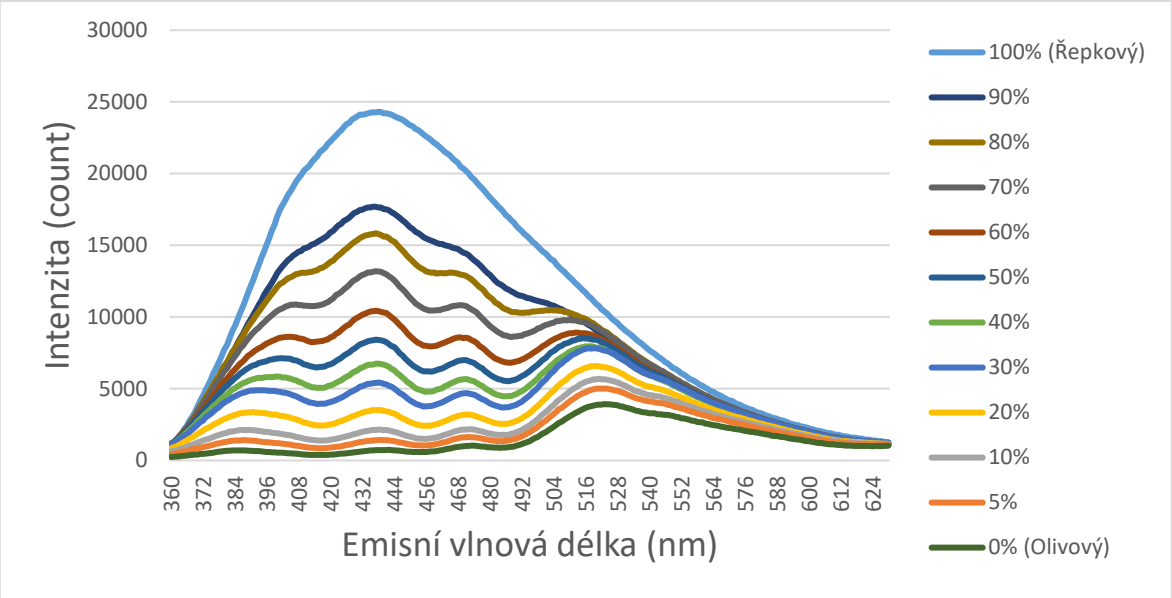
Stejně jak lze pozorovat postupné navyšování intenzity u prvního spektra, lze pozorovat podobné změny u obrázku 35 spektra chlorofylu, ale s opačnou tendencí. Je to dáno pávě zvyšující se koncentrací slunečnicového oleje, jež nemá tak vysokou intenzitu chlorofylu jako olivové oleje. Právě z toho důvodu klesá intenzita při snižující se koncentraci olivového oleje. Na následujícím obrázku 36 je možné opět pozorovat závislost intenzity luminiscence odpovídající emisní vlnové délce 677nm z předchozího spektra, na kterém je vidět snižující se intenzita chlorofylu na základě zvyšující se koncentrace slunečnicového oleje.



Obrázek 36 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro chlorofyl první směsi

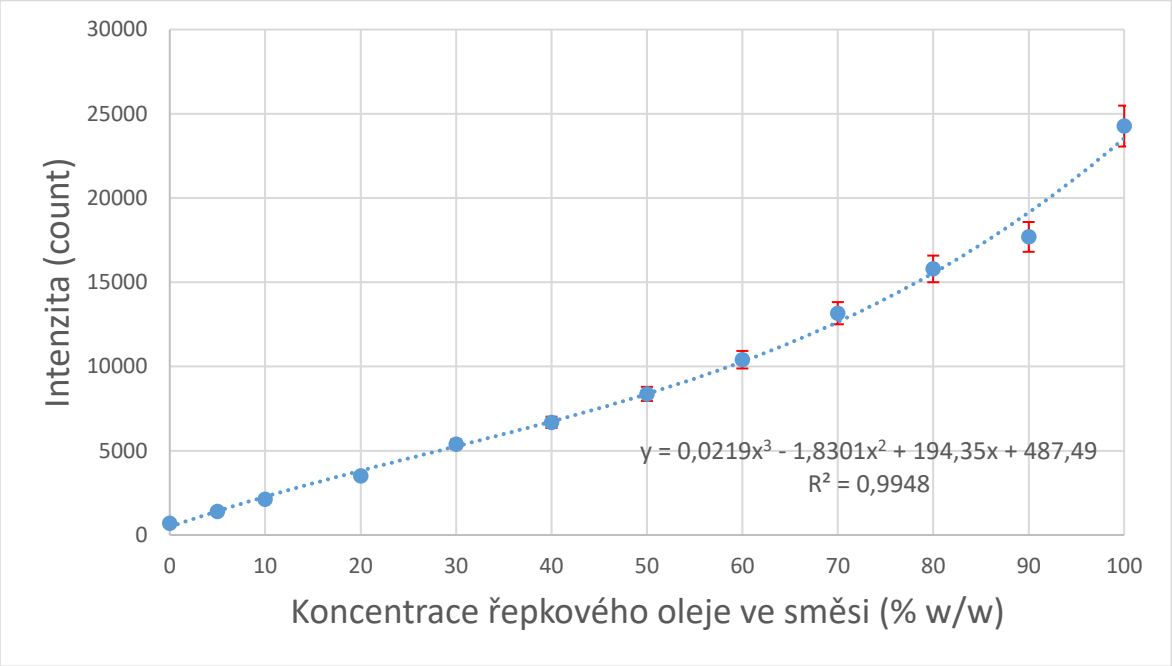
5.2.2 Olivový olej č. 5 + Řepkový olej

Na následujícím obrázku 37 se nachází spektrum všech koncentrací olivového oleje 5 s řepkovým olejem. Jednotlivé poměry jsou totožné jako při první směsi. Na první pohled je opět možné vidět rozdíly intenzity vzniklé důsledkem změny koncentrace olejů. Intenzita řepkového oleje je stejně jako u slunečnicového znatelně vyšší, a proto lze jednotlivé koncentrace rozpoznat.

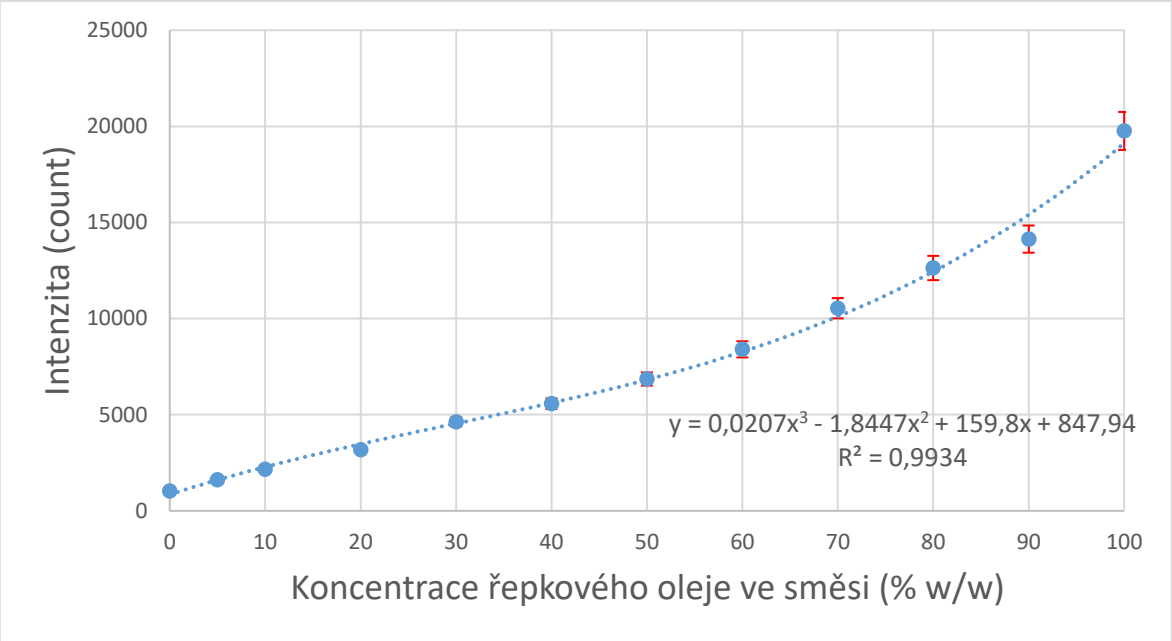


Obrázek 37 Spektrum směsi č. 2

Na následujících obrázcích 38 a 39 je závislost intenzity luminiscence odpovídající emisní vlnové délce 436nm a 473nm z předešlého spektra. Opět je velmi dobře vidět, že intenzita stoupá, což značí zvyšující se koncentraci řepkového oleje.

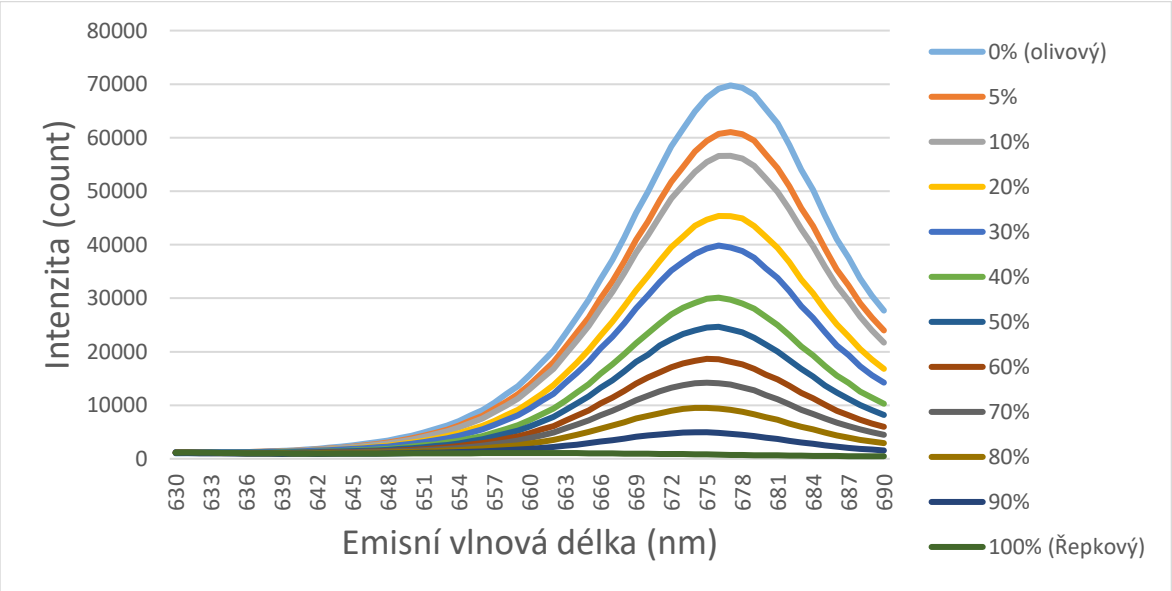


Obrázek 38 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro druhou směs



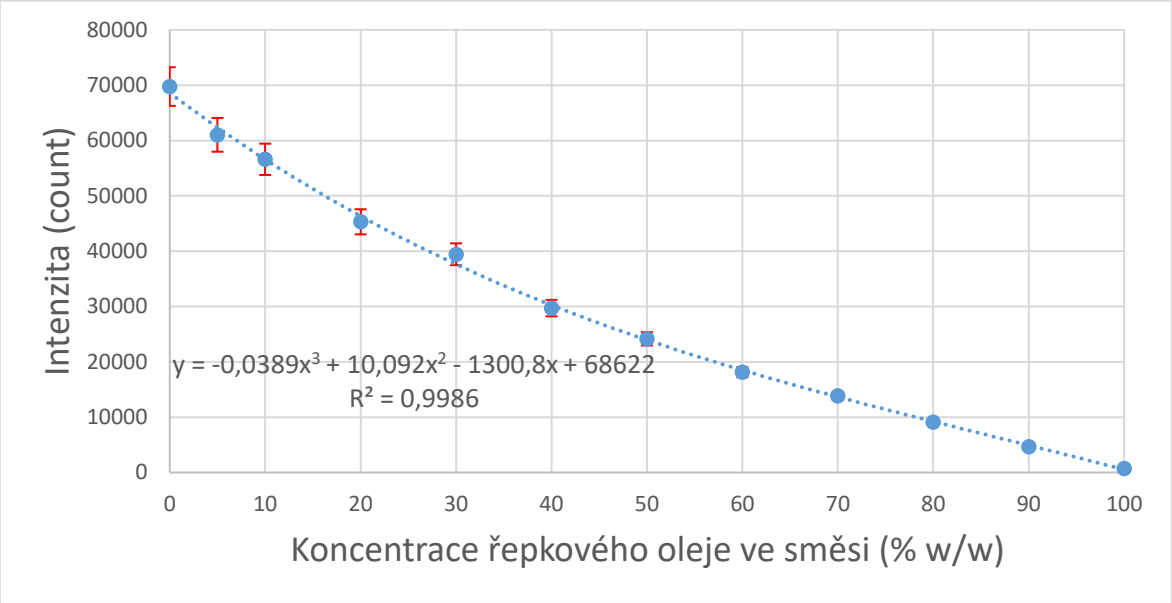
Obrázek 39 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro druhou směs 2

Na obrázku 40 je opět spektrum chlorofylu, kde je možné vidět snižující se intenzitu chlorofylu na základě zvyšující se koncentrace řepkového oleje, jež obsahuje chlorofylu znatelně méně, než obsahuje olej olivový.



Obrázek 40 Spektrum chlorofylu směsi č. 2

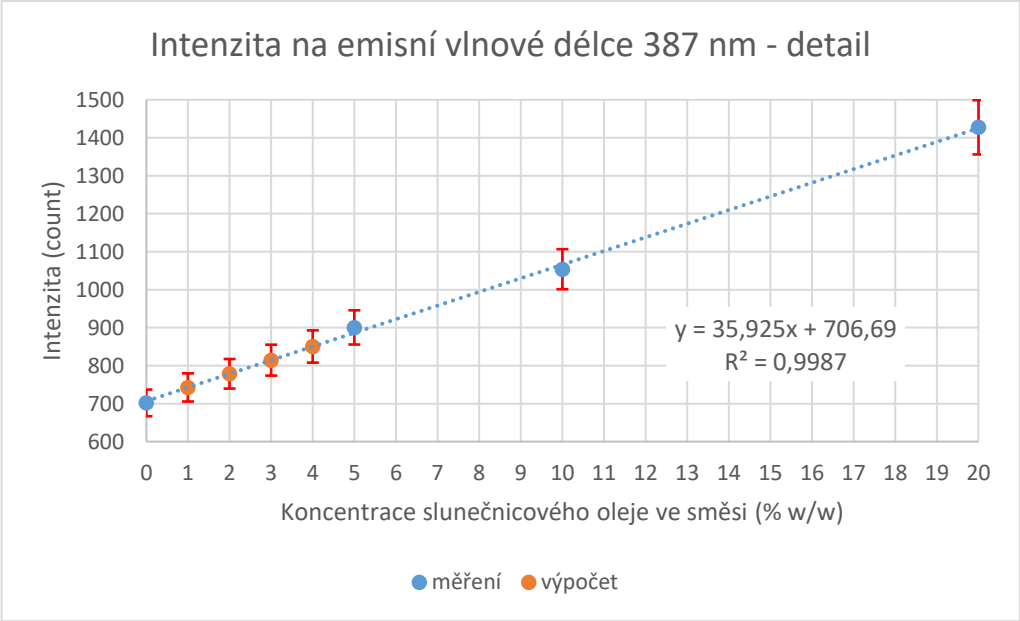
Posledním obrázkem u směsi olivového a řepkového oleje je opět závislost intenzity luminiscence odpovídající emisní vlnové délce 677nm ze spektra chlorofylu (obrázek 40). Jak je možné vidět, klesající intenzita jasně ukazuje zvyšující se množství řepkového oleje.



Obrázek 41 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro chlorofyl druhé směsi

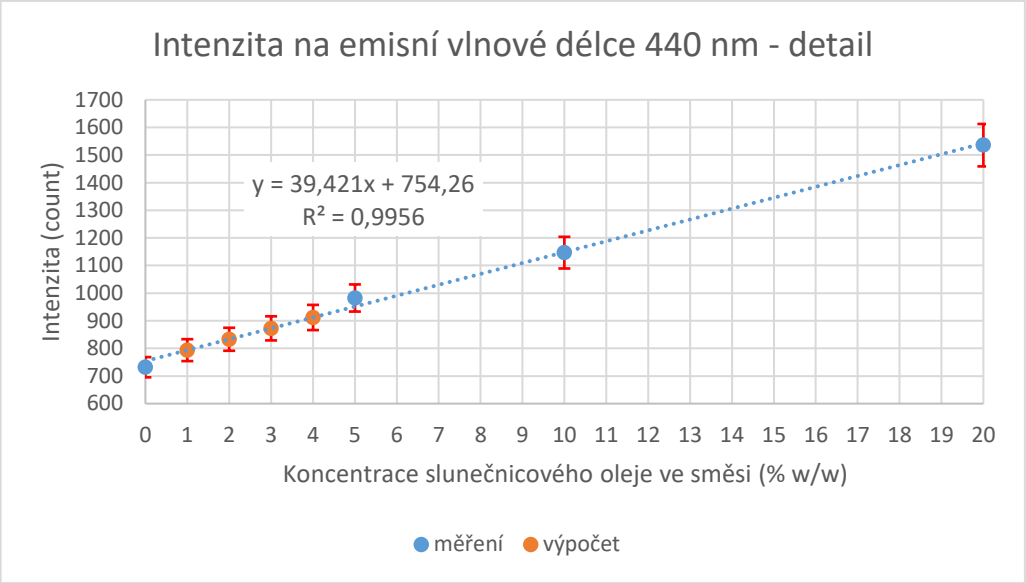
5.3 Stanovení hranice pro detekci padělání slunečnicového oleje

Pro stanovení hranice pro detekci padělání byla provedena měření řady směsí o různých koncentracích. Pro názornou ukázku byla vybrána směs pátého olivového oleje se třetím slunečnicovým olejem. Na následujících obrázcích (40–45) je možné vidět grafy závislosti intenzity na koncentraci pro vybrané vlnové délky. Pro zjednodušení byla data proložena přímkou. Pomocí rovnice přímky v grafu byly dopočítány hodnoty koncentrace 1, 2, 3, 4 %. Byla vypočítána minimální koncentrace, kdy lze určit, že se jedná o směs a ne o „čistý“ olej, a to 2 %.



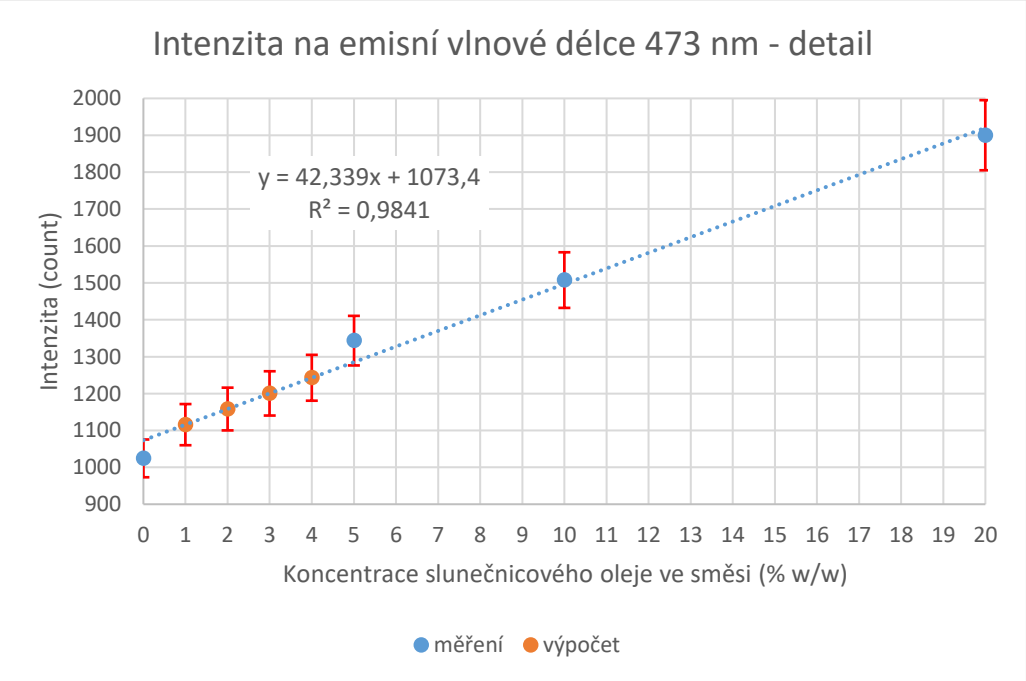
Obrázek 42 Intenzita na emisní vlnové délce 387 nm pro směs se slunečnicovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

Na obrázku 42 se nachází intenzita na emisní vlnové délce 387 nm, jež je vrcholkem prvního píku znázorňujícího produkty oxidace obsažené v olejích. Na obrázcích 41 a 42 se nachází závislosti intenzit na koncentraci dalších píků znázorňujících produkty oxidace.



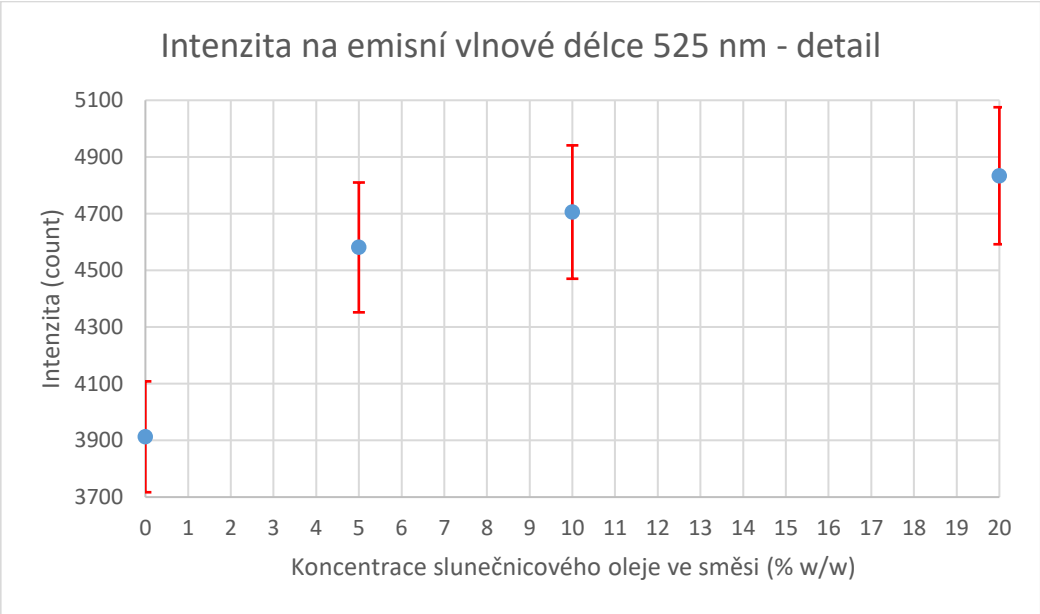
Obrázek 43 Intenzita na emisní vlnové délce 440 nm pro směs se slunečnicovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

Následující spektrum intenzity na vlnové délce 473 nm představuje poslední pík produktů oxidace.



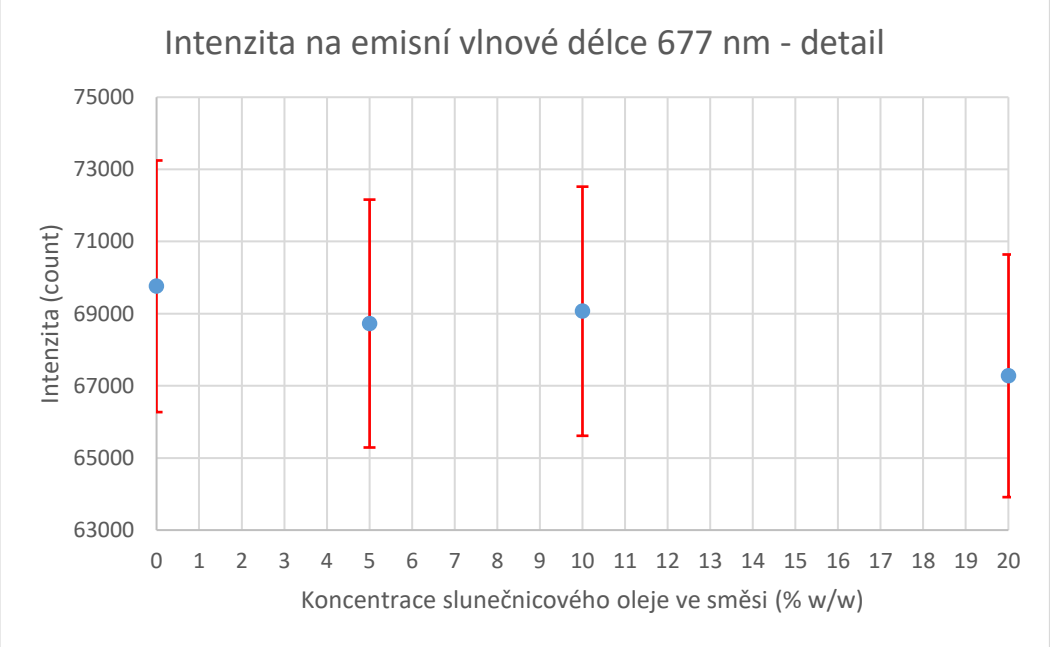
Obrázek 44 Intenzita na emisní vlnové délce 473 nm pro směs se slunečnicovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

Následující spektrum intenzity na vlnové délce 525 nm (obrázek 45) je vrchol píku znázorňující obsažný vitamín E



Obrázek 45 Intenzita na emisní vlnové délce 525 nm pro směs se slunečnicovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

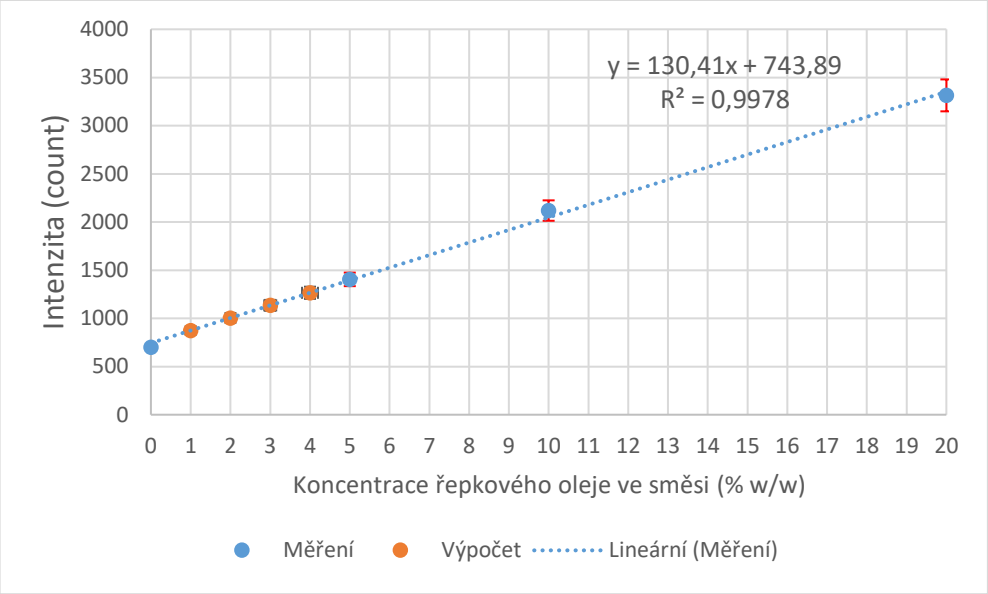
Následující spektrum intenzity na vlnové délce 677 nm (obrázek 46) je vrchol píku znázorňující obsažný chlorofyl.



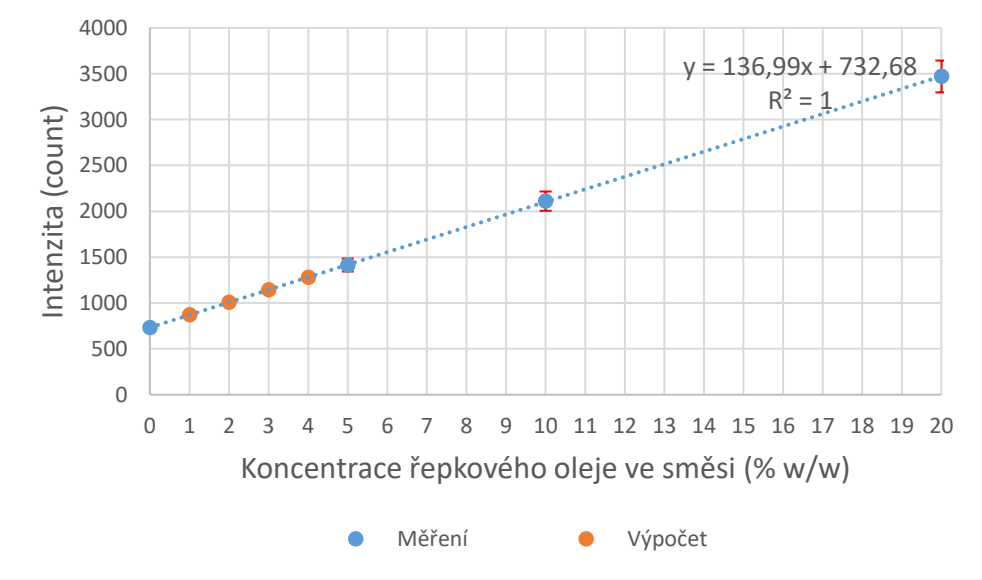
Obrázek 46 Intenzita na emisní vlnové délce 677 nm pro směs se slunečnicovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

5.4 Stanovení hranice pro detekci padělání řepkového oleje

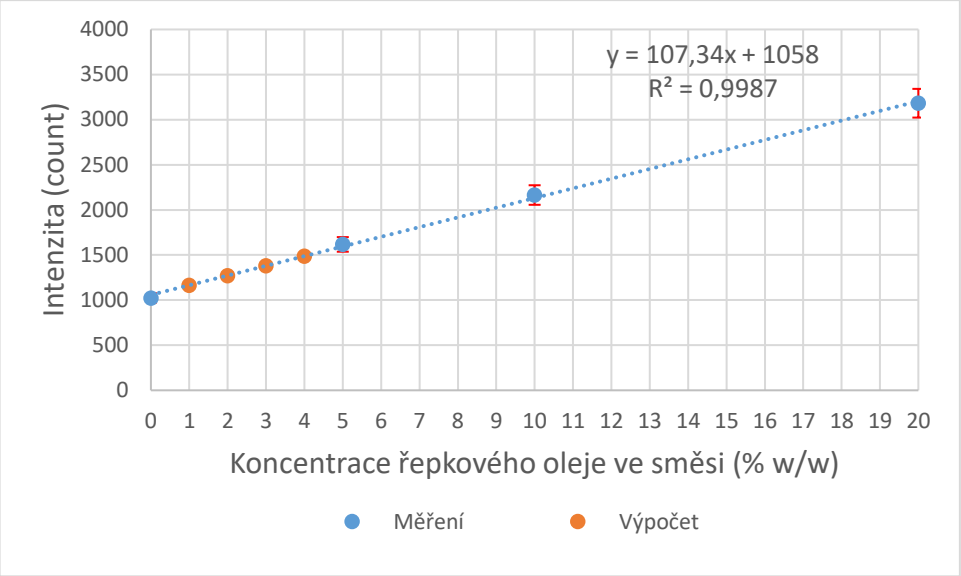
Stanovení hranice pro řepkový olej proběhlo stejně jako u slunečnicového oleje. Byla provedena řada měření a výpočtů, což je možné vidět na obrázcích 47–49. Opět zde byla pro zjednodušení data proložena přímkou.



Obrázek 47 Intenzita na emisní vlnové délce 387 nm pro směs s řepkovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci



Obrázek 48 Intenzita na emisní vlnové délce 440 nm pro směs s řepkovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci



Obrázek 49 Intenzita na emisní vlnové délce 473 nm pro směs s řepkovým olejem vynesená v závislosti na koncentraci

Bylo zjištěno, že pro zjištění detekce padělání extra panenského olivového oleje, je nejvhodnější sledovat píky při vlnových délkách 387nm, 440nm a 473nm. Na základě měření a výpočtů (obrázky 42–49), byla hranice pro úspěšnou detekci padělání stanovena na 2 %. Intenzita na emisních vlnových délkách vyobrazující vitamin E (525nm) a chlorofyl (677nm) byla vynechána, jelikož odchylky měření byly příliš velké (viz obrázky 45–46) a padělaný olej by tak bylo možné s jistotou detekovat až při vyšších koncentracích.

6 NÁVRH LABORATORNÍ ÚLOHY

Obsahem následující kapitoly je návrh laboratorní úlohy do Forenzních věd pro studenty Fakulty aplikované informatiky. Laboratorní úloha má více úkolů, které na sebe vzájemně navazují a student tak získá základní přehled v oblasti luminiscence.

Jako první krok se student seznámí se spektrofluorimetrem, aby získal základní znalosti o přístroji a uměl jej dále používat pro zisk emisních spekter z měření.

Ve druhé části si student vybere libovolný vzorek oleje, který změří několikrát po sobě (minimálně pětkrát) a na základě naměřených spekter stanoví nejistotu měření.

Třetí úkol je volba olejů pro analýzu. Bude připravena řada olivových olejů a dalších olejů, které se budou později mísit. Vzhledem k tomu, že má student limitovaný čas pro zvládnutí úlohy, vybere si pouze 1 olivový olej a 3 další oleje. Po změření všech olejů, si zvolí jeden, se kterým bude olivový olej mísit.

Na základě naměřených dat student v dalším kroku zjistí, jakou nejmenší koncentraci příměsi je schopen spektrofluorimetr naměřit. Množství pokusů, které student využije pro zjištění hranice, bude moci dále využít v poslední části, kde mu bude přidělena náhodná koncentrace směsi.

Body zadání laboratorní úlohy budou vypadat následovně:

1. Seznámení se spektrofluorimetrem
2. Stanovení nejistoty měření
3. Výběr a analýza rostlinných olejů
4. Zjištění hranice pro detekci padělání

Podrobné zadání laboratorní úlohy viz Příloha P I

ZÁVĚR

Jako téma bylo vybráno padělání olivových olejů za pomoci ředění jinými, levnějšími oleji. V teoretické části diplomové práce byl objasněn pojem luminiscence. Bylo vysvětleno základní dělení a dále byly objasněny pojmy jako jsou fluorescence, fosforescence a další dělení. Poté byly popsány oleje jako takové – jak se dělí, z čeho se skládají a jaké oleje se nejčastěji padělají. Na základě těchto informací byla provedena rešerše na téma padělání rostlinných olejů. Bylo zjištěno, že nejčastěji padělaným olejem je olivový olej, a právě proto byl olivový olej a jeho směsi měřeny v praktické části diplomové práce. V praktické části bylo nutné v prvním kroku seznámení se se spektrofluorimetrem Shimadzu RF-6000, jež byl použit pro změření všech vzorků. Bylo vysvětleno a ukázáno, jakým způsobem se spektrofluorimetr nastavuje, a jak se měří emisní spektra vzorků. K měření byla vybrána řada olivových olejů, jež se změřily samostatně. Pro stanovení nejistoty měření byly olivové oleje několikrát změřeny. Bylo zjištěno, že nejistota měření je 5 %. Poté byly změřeny další rostlinné oleje (řepkový, slunečnicový, hroznový a domácí oleje jako je konopný, mandlový a slunečnicový). Pro padělání olivového oleje byl vybrán slunečnicový a řepkový olej z důvodu jejich dostupnosti a nízké ceny. Pro stanovení hranice pro detekci padělání, byla provedena řada měření v různých koncentracích. Bylo zjištěno, že nejmenší koncentrace, při které lze rozlišit směs od „čistého“ olivového oleje je 2 %. Na závěr byla vytvořena laboratorní úloha pro předmět forenzní vědy, který je vyučován v rámci oboru BTSM na Fakultě aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. Luminiscenční spektroskopie. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.

[2] PLANCKŮV VYZAŘOVACÍ ZÁKON [online]. Odbor termomechaniky a techniky prostředí, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně [cit. 2021-5-25]. Dostupné z: https://eu.fme.vutbr.cz/file/vomm/0202.htm

[3] KONEČNÝ, Martin. Luminiscence [online]. Katedra didaktiky fyziky, Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy v Praze [cit. 2021-5-14]. Dostupné z: https://vnuf.cz/sbornik/prispevky/pdf/13-14-Konecny_M.pdf

[4] ILČÍK, Petr. Použití luminiscenční spektrofluorimetrie pro stanovení riboflavinu. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati - Fakulta technologická.

[5] Chemiluminiscence [online]. Britanica [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/chemiluminescence

[6] Bioluminiscence [online]. National geographics [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/bioluminescence/

[7] Mechanoluminiscence [online]. Journal of Rare Earths, 2018 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002072117301072

[8] Sonoluminiscence [online]. ScienceDirect, 2014 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/sonoluminescence

[9] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN978-0-387-31278-1.

[10] Luminiscence: Fluorescence [online]. [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/principy.htm#:~:text=Stokes%C5%AFv%20z%C3%A1kon%3A,lem%20%C2%B3%20lex)

[11] SIKORSKA, Ewa, Igor KHMELINSKII a Marek SIKORSKI. Analysis of Olive Oils by Fluorescence Spectroscopy: Methods and Applications. Faculty of Commodity Science, 2012. ISBN 978-953-307-921-9.

[12] GEDDES, Chris D., ed. Reviews in Fluorescence 2016 [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2021-5-18]. Reviews in Fluorescence. ISBN 978-3-319-48259-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-48260-6

[13] Fosforescence [online]. Chemie a světlo, 2018 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.chemieasvetlo.cz/teorie/fosforescence/

[14] Stokesův zákon. Physics.mff [online]. [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz_fyziky_pro_DS/display.php/kontinuum/4_6

[15] ALBANI, Jihad René. Principles and applications of fluorescence spectroscopy: Principles and Applications. c2007. Dostupné z: doi:978-1-4051-3891-8

[16] HANSL, Tomáš. Syntéza výchozích látek pro organické chromofory s multi fotonovou absorpcí pro fluorescenční mikroskopii. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. UNIVERZITA PARDUBICE FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ.

[17] LIPPAY, Josef. VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍCH TECHNIK VE STUDIU DEPOZICE AEROSOLŮ. Brno, 2013. Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ.

[18] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, et al. Medicínská biofyzika. 1. vydání. Praha : Grada, 2005. 524 s. ISBN 80-247-1152-4.

[19] JANÁČOVÁ, Jana. Stanovení tepelné degradace vybraných jedlých olejů pomocí luminiscenční spektroskopie. Zlín, 2017. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

[20] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2002. Dostupné z: doi:3-527-29919-X

[21] HÁJKOVÁ, Bronislava. Sledování změn luminiscenčního spektra mléka a mléčného tuku během záhřevu. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

[22] ČÍŽKOVÁ, Helena. Falšování jedlých tuků a olejů [online]. 7.4.2020 [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: https://www.potravinyinfo.cz/33/falsovani-jedlych-tuku-a-oleju-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLi3LvUl2jZF133HykukZUzLWmsA/

[23] KONGBONGA, Yvon Gilbert Mbesse, Hassen GHALILA, Marthe Boyomo ONANA, Youssef MAJDI, Zohra Ben LAKHDAR, Houda MEZLINI a Sylvie SEVESTRE-GHALILA. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. Food and Nutrition Sciences. 2011, 02(07), 692-699. ISSN 2157-944X. Dostupné z: doi:10.4236/fns.2011.27095

[24] SIKORSKA, E., A. ROMANIUK, I. V. KHMELINSKII, R. HERANCE, J. L. BOURDELANDE, M. SIKORSKI a J. KOZIOŁ. Characterization of Edible Oils Using Total Luminescence Spectroscopy. Journal of Fluorescence [online]. 2004, 14(1), 25-35 [cit. 2021-5-24]. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1023/B:JOFL.0000014656.75245.62

[25] Rostlinný olej [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: http://www.ajv.lt//Rostlinn-883.html

[26] HORÁKOVÁ, Hana. Živočišný tuk [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: https://www.ulekare.cz/clanek/sadlo-je-opet-zdrave-21577

[27] BRÁT, Jiří. Tuky a oleje. Praha: Sdružení českých spotřebitelů pro Českou technologickou platformu pro potraviny, 2014. Jak poznáme kvalitu? ISBN ISBN978-80-87719-17-6.

[28] GE, Feng, Chaoyin CHEN, Diqiu LIU a Shenglan ZHAO. Rapid Quantitative Determination of Walnut Oil Adulteration with Sunflower Oil Using Fluorescence Spectroscopy. Food Analytical Methods [online]. 2014, 7(1), 146-150 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-013-9610-z

[29] GUZMÁN, Elena, Vincent BEATEN, Juan Antonio FERNANDÉZ PIERNA a José A. GARCÍA-MESA. Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescencespectroscopy. Food chemistry. 2014, (173).

[30] SAYAGO, A., M. T. MORALES a R. APARICIO. Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by a spectrofluorimetric method. European Food Research and Technology [online]. 2004, 218(5), 480-483 [cit. 2021-5-8]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-004-0874-9

[31] MU, Taotao, Siying CHEN, Yinchao ZHANG, He CHEN, Pan GUO a Fandong MENG. Portable Detection and Quantification of Olive Oil Adulteration by 473-nm Laser-Induced Fluorescence. Food Analytical Methods. 2016, 9(1), 275-279. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-015-0199-2

[32] Spektrofluorimetr Shimadzu-6000. Shimadzu [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: https://www.shimadzu.eu/rf-6000

[33] KAJZAR, Aleš. Hmotnostní zlomek. Chemicke-vypocty [online]. [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: https://chemicke-vypocty.cz/Hmotnostni-zlomek.html

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schématické vyobrazení fluorescence [13] 15
Obrázek 2 Schématické vyobrazení fosforescence [13] 15
Obrázek 3 Experimentální schéma pro detekci Stokesova posunu [9] 16
Obrázek 4 Jablonského diagram znázorňující energetické hladiny a energetické přechody molekuly [16] 17
Obrázek 5 Rostlinný olej [25] 21
Obrázek 6 Živočišný tuk [26] 21
Obrázek 7 Emisní spektra vybraných rostlinných olejů [23] 22
Obrázek 8 Olivový a lískový olej [30] 23
Obrázek 9 Spektrofluorimetr Shimadzu RF-6000 26
Obrázek 10 Spuštění spektrofluorimetru 27
Obrázek 11 Připojení spektrofluorimetru k softwaru 27
Obrázek 12 Volba cesty pro uložení dat 28
Obrázek 13 Nastavení parametrů pro měření 28
Obrázek 14 Výsledek měření na vlnové délce 360–630 nm 29
Obrázek 15 Olivový olej č. 1 30
Obrázek 16 Olivový olej č. 2 31
Obrázek 17 Olivový olej č. 3 31
Obrázek 18 Olivový olej č. 4 32
Obrázek 19 Olivový olej č. 5 32
Obrázek 20 Celé spektrum vybraných olivových olejů 33
Obrázek 21 Spektrum olivových olejů 34
Obrázek 22 Spektrum chlorofylu olivových olejů 34
Obrázek 23 Řepkový olej 35
Obrázek 24 Hroznový olej 36
Obrázek 25 Slunečnicový olej 36
Obrázek 26 Slunečnicový „domácí“, ... 37
Obrázek 27 Slunečnicový olej č. 2 37
Obrázek 28 Spektrum olejů použitých do směsí 38
Obrázek 29 Spektrum chlorofylu olejů použitých do směsí 38
Obrázek 30 Emisní spektrum olivového oleje č.2 – 5 měření 39
Obrázek 31 Emisní spektrum chlorofylu olivového oleje č. 5 – 5 měření 40
Obrázek 32 Emisní spektrum směsi č.1 42
Obrázek 33 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro první směs 42

Obrázek 34 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro první směs 2 43
Obrázek 35 Spektrum chlorofylu směsi č. 1 43
Obrázek 36 Závislost intenzity luminiscence na hmotnostním procentu pro chlorofyl první směsi 44
Obrázek 37 Spektrum směsi č. 2 45
Obrázek 38 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro druhou směs 45
Obrázek 39 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro druhou směs 2 46
Obrázek 40 Spektrum chlorofylu směsi č. 2 46
Obrázek 41 Závislost intenzity na hmotnostním procentu pro chlorofyl druhé směsi 47
Obrázek 42 Intenzita na emisní vlnové délce 387 nm pro směs se slunečnicovým 48
Obrázek 43 Intenzita na emisní vlnové délce 440 nm pro směs se slunečnicovým 49
Obrázek 44 Intenzita na emisní vlnové délce 473 nm pro směs se slunečnicovým 49
Obrázek 45 Intenzita na emisní vlnové délce 525 nm pro směs se slunečnicovým 50
Obrázek 46 Intenzita na emisní vlnové délce 677 nm pro směs se slunečnicovým 50
Obrázek 47 Intenzita na emisní vlnové délce 387 nm pro směs s řepkovým 51
Obrázek 48 Intenzita na emisní vlnové délce 440 nm pro směs s řepkovým 51
Obrázek 49 Intenzita na emisní vlnové délce 473 nm pro směs s řepkovým 52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Souhrn olivových olejů 35
Tabulka 2 Souhrn olejů použitých do směsí 39

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Návrh laboratorní úlohy do předmětu forenzní vědy

Příloha P II: Emisní spektrum olejů do směsi

Příloha P III: Emisní spektrum chlorofylu olejů do směsi

Příloha P IV: Emisní spektrum olivových olejů

Příloha P V: Emisní spektrum chlorofylu olivových olejů

Příloha P VI: Spektrum směsi č. 1

Příloha P VII: Spektrum chlorofylu směsi č. 1

Příloha P VIII: Spektrum směsi č. 2

Příloha P IX: Spektrum chlorofylu směsi č. 2

PŘÍLOHA P I: NÁVRH LABORATORNÍ ÚLOHY DO PŘEDMĚTU FORENZNÍ VĚDY

Příjmení:	Jméno:	Skupina:
Detekce padělání rostlinných olejů		Datum:
Zvolené rostlinné oleje:		

Zadání laboratorní úlohy pro detekci padělání rostlinných olejů:

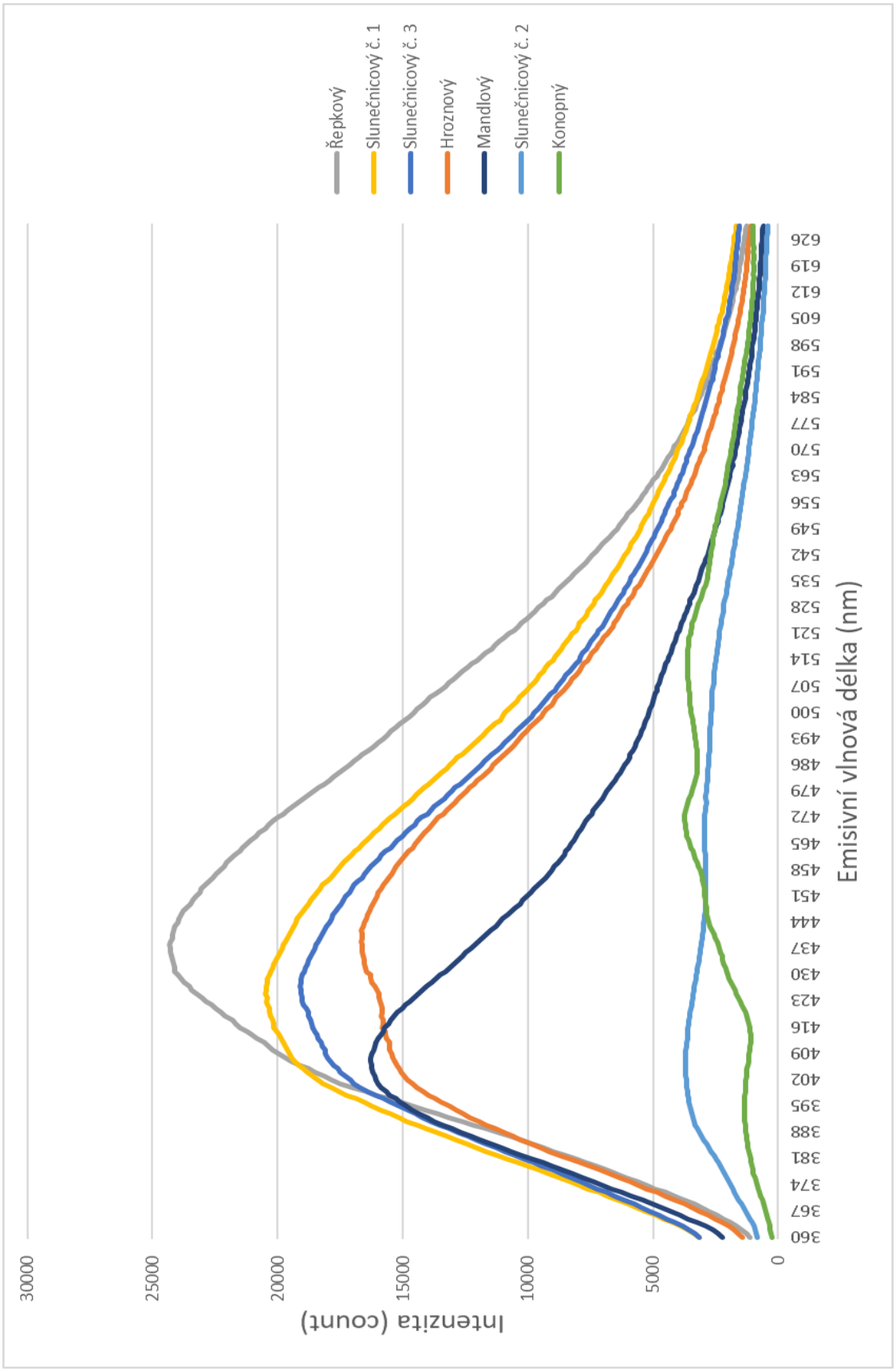
1. Seznámení se spektrofluorimetrem
    a. Zapněte a nastavte spektrofluorimetr
        i. měřte při vlnové délce 360–630 nm
        ii. měřte při vlnové délce 630–690 nm

2. Nejistota měření
    a. Minimálně 5x změřte vzorky
    b. Stanovte nejistotu měření

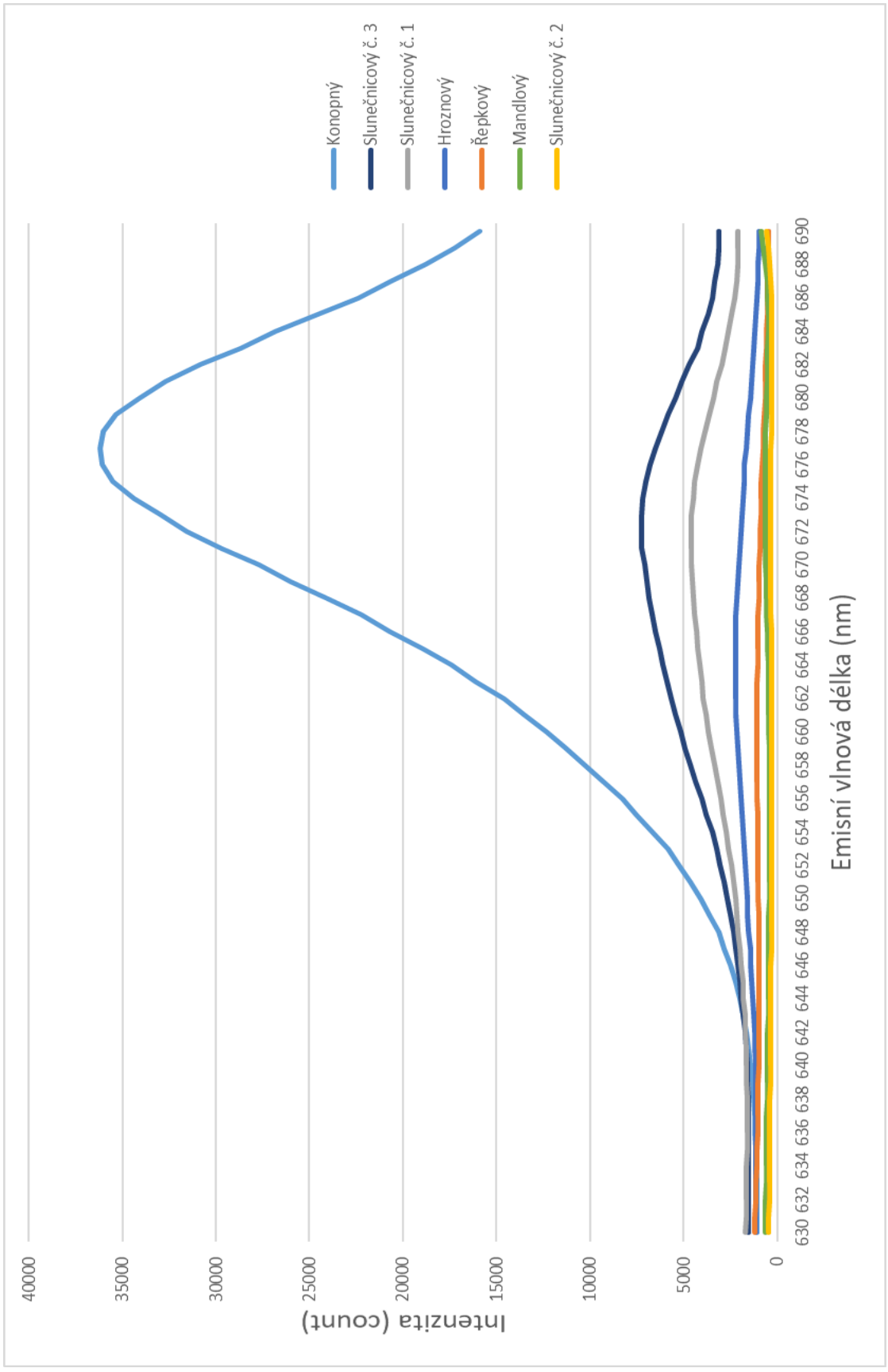
3. Volba a analýza rostlinných olejů
    a. Vytvořte emisní spektra vybraných olejů (1 olivový, 3 různé)
    b. Připravte směsi o různých koncentracích
    c. Vytvořte emisní spektra připravených směsí
    d. Vyberte spektrum nejpodobnější olivovému oleji

4. Zjistěte, jakou nejmenší koncentraci cizího oleje lze detekovat

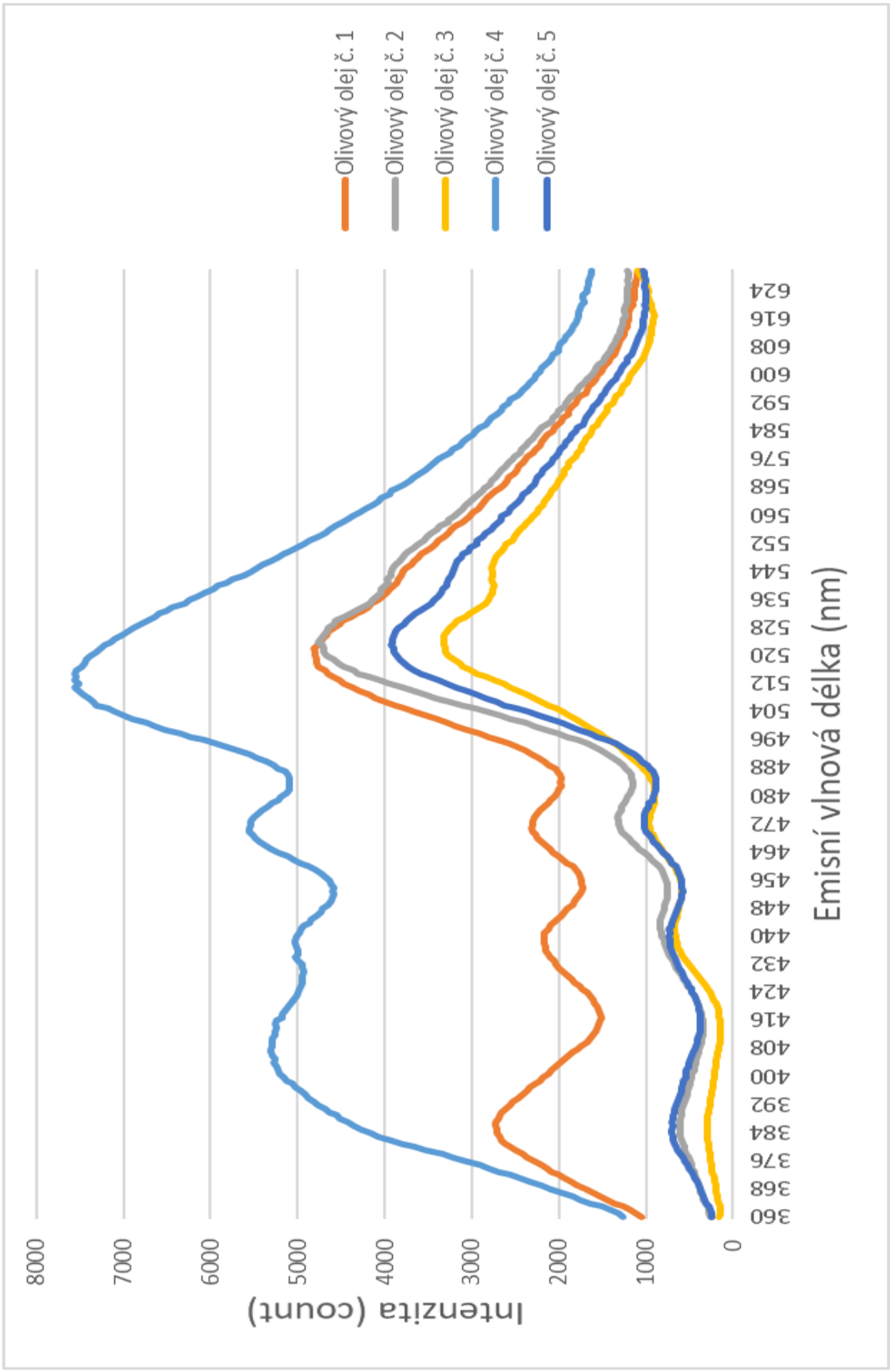
PŘÍLOHA P II: EMISNÍ SPEKTRUM OLEJŮ DO SMĚSÍ



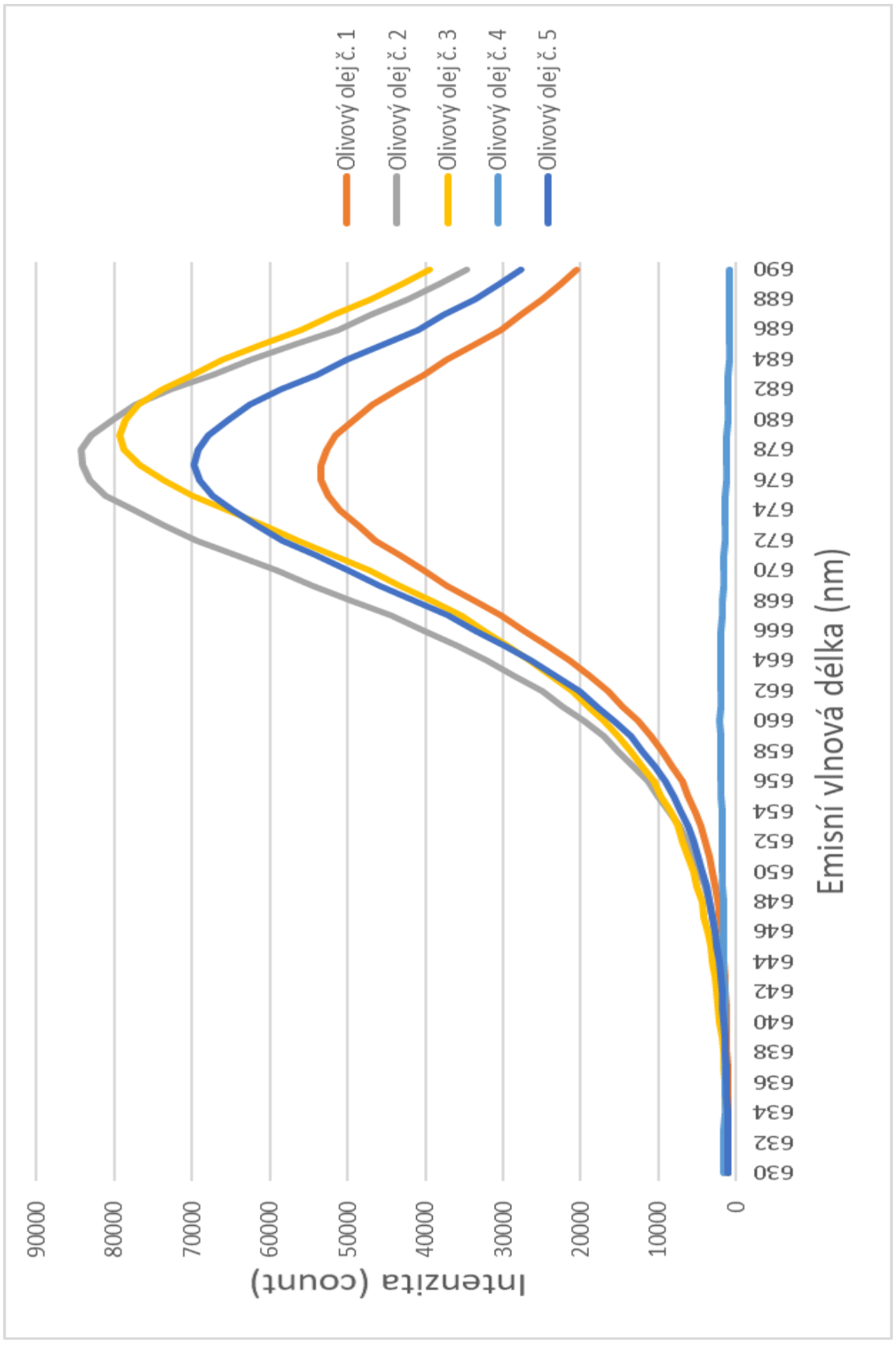
PŘÍLOHA P III: EMISNÍ SPEKTRUM CHLOROFYLU OLEJŮ DO SMĚSÍ



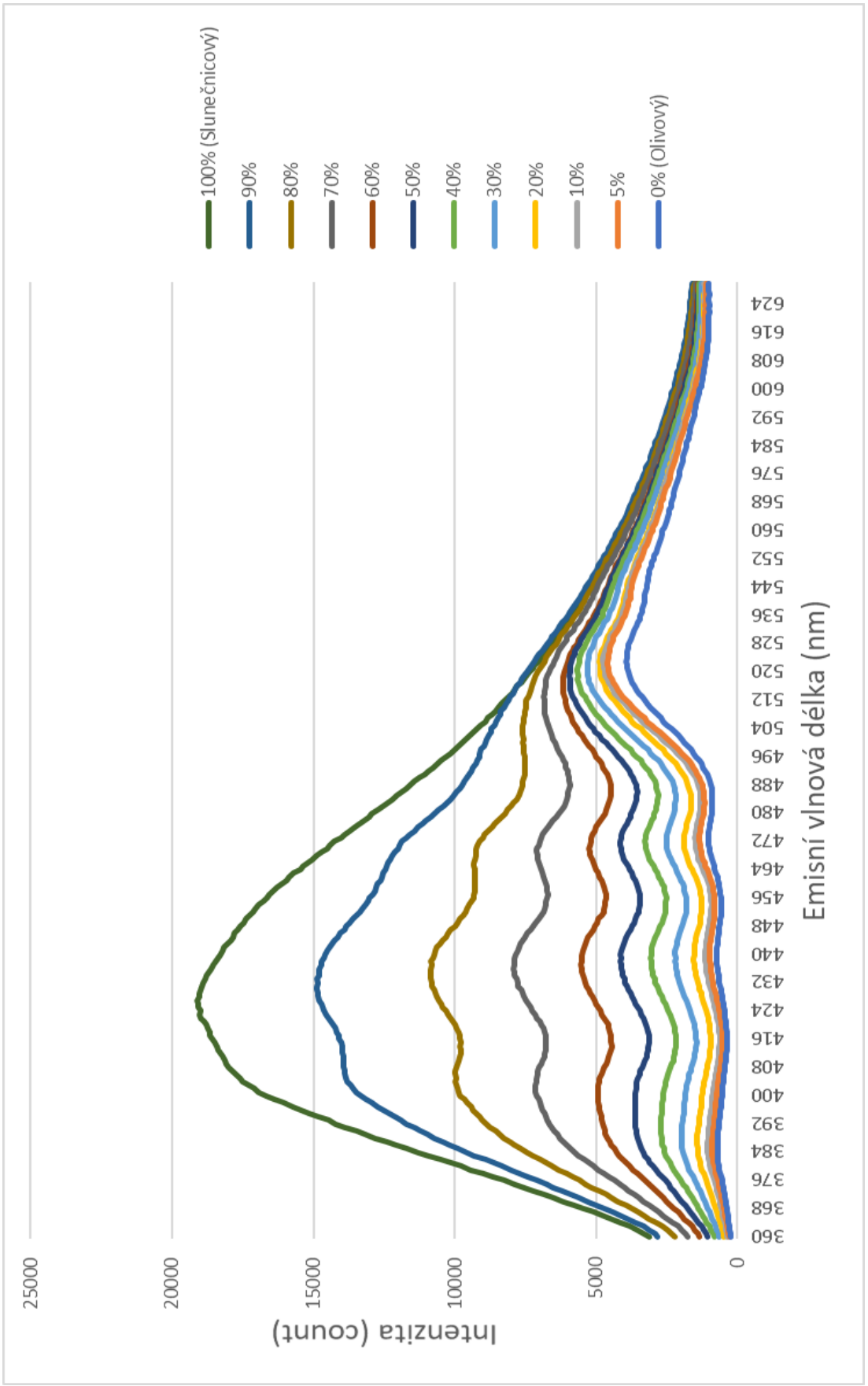
PŘÍLOHA P IV: EMISNÍ SPEKTRUM OLIVOVÝCH OLEJŮ



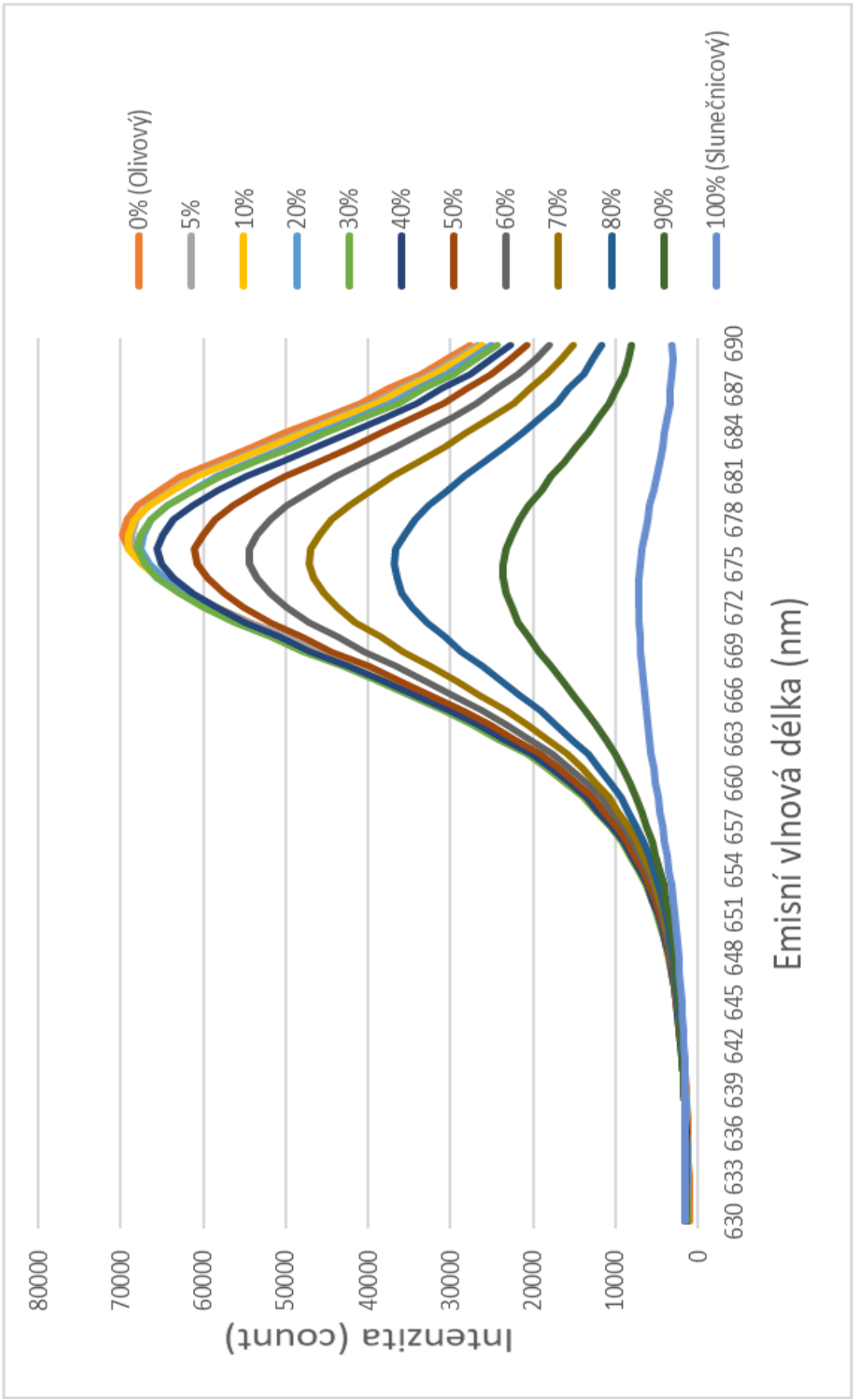
PŘÍLOHA P V: EMISNÍ SPEKTRUM CHLOROFYLU OLIVOVÝCH OLEJŮ



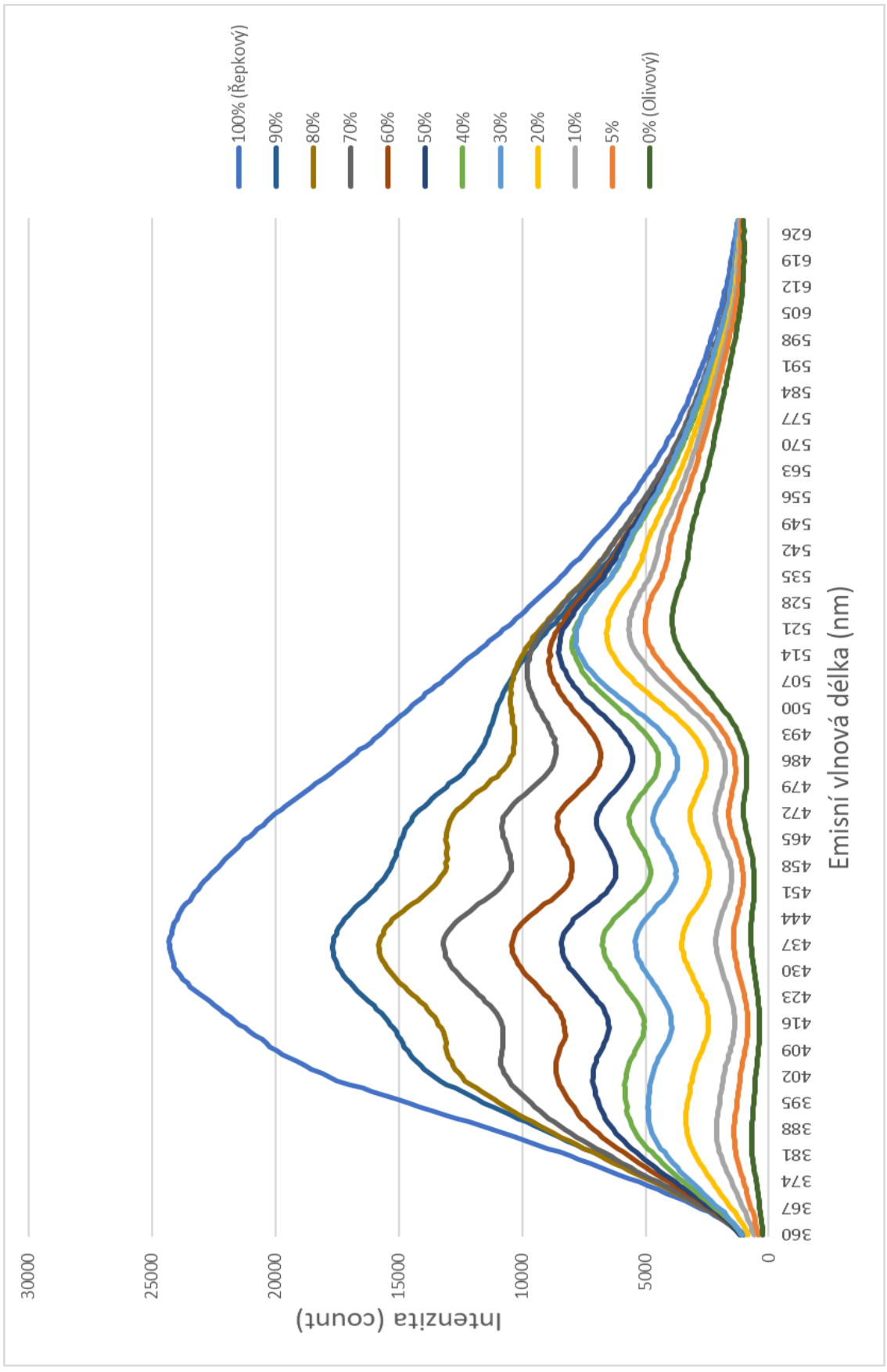
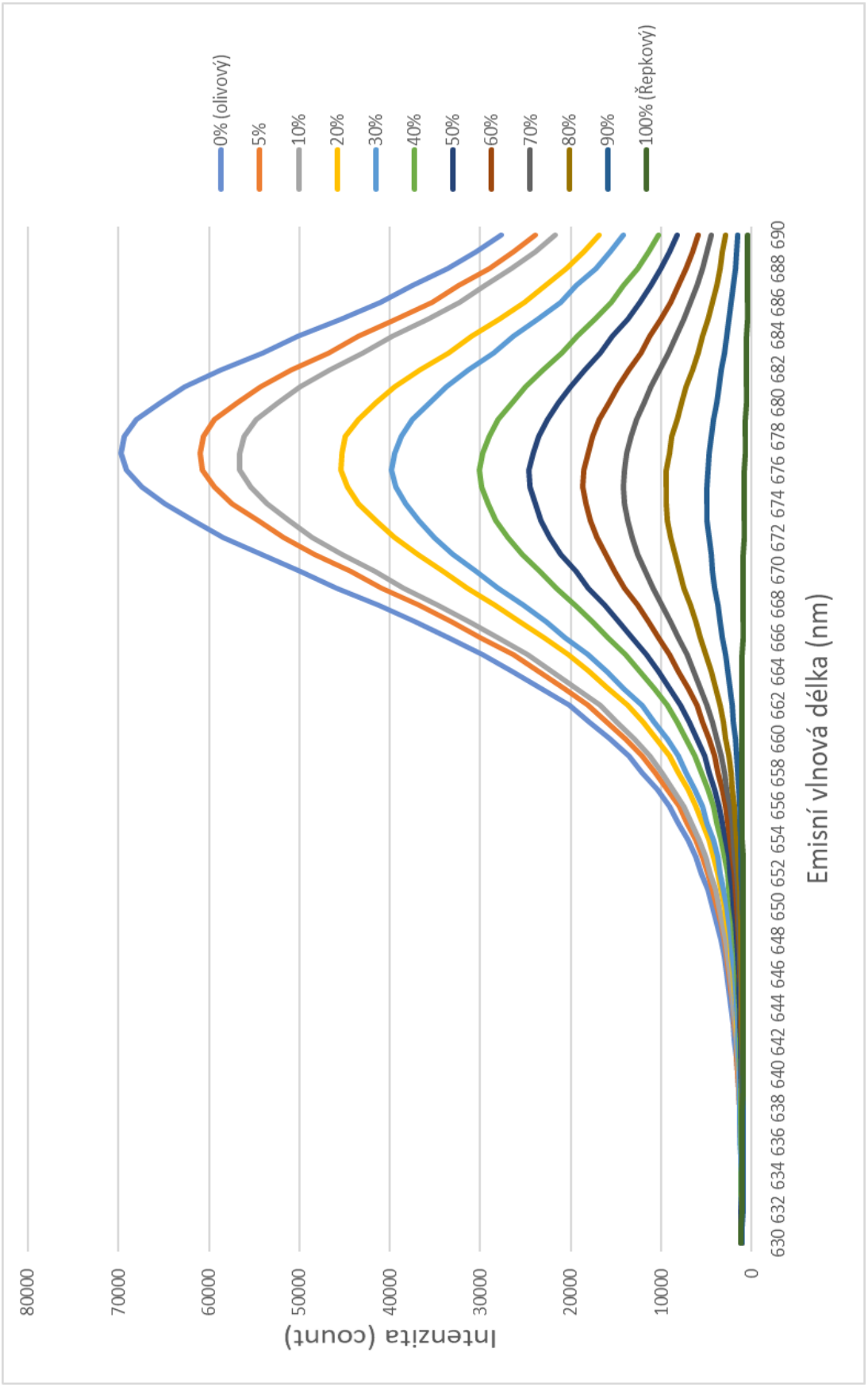
PŘÍLOHA P VI: SPEKTRUM SMĚSI Č. 1



PŘÍLOHA P VII: SPEKTRUM CHLOROFYLU SMĚSI Č. 1



PŘÍLOHA P VIII: SPEKTRUM SMĚSI Č. 2



PŘÍLOHA P IX: SPEKTRUM CHLOROFYLU SMĚSI Č. 2