

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

**ANALÝZA ČOKOLÁDY – STANOVENÍ MASTNÝCH  
KYSELIN PLYNOVOU CHROMATOGRÁFIÍ**

Bakalářská práce

V Olomouci 2012

Kateřina Pruknerová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální chemie



Analýza čokolády - stanovení mastných kyselin plynovou  
chromatografií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Kateřina Pruknerová

Studijní obor: Management v chemii

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2012

Čestně prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....  
vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu práce panu Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za obětovaný čas, odborné vedení a vstřícný přístup při vedení mé bakalářské práce.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Kateřina Pruknerová

Název práce: Analýza čokolády - stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií

Typ práce: bakalářská

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt: Tato bakalářská práce se věnuje problematice obsahu mastných kyselin v různých typech čokolád. Bylo testováno 14 druhů čokoládových výrobků s cílem zjistit poměrné zastoupení mastných kyselin. Analýza byla provedena pomocí metody GC/MS s pracovní technikou vnitřní normalizace. Bylo identifikováno a kvantifikováno celkem 26 mastných kyselin, z toho 17 nasycených, 7 nenasyčených a 2 rozvětvené.

Klíčová slova: čokoláda, plynová chromatografie, mastné kyseliny

Počet stran: 46

Počet příloh: 4

Jazyk: čeština

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Kateřina Pruknerová

Title: Analysis of chocolate - determination of fatty acids by gas chromatography

Type of thesis: bachelor

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract: This thesis is focused on the problem of fatty acid content in different types of chocolate. 14 kinds of chocolate products were tested in order to determine proportional representation of fatty acids. The analysis was performed by GC/MS method with internal standardization as technique of working. Total 26 fatty acids (17 saturated, 7 unsaturated and 2 branched) were identified and quantified.

Keywords: chocolate, gas chromatography, fatty acids

Number of pages: 46

Number of appendices: 4

Language: Czech

## OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1 Čokoláda .....	10
2.1.1 Technologie výroby .....	10
2.1.2 Klasifikace .....	11
2.1.3 Kakaové máslo.....	12
2.1.3.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti kakaového másla .....	12
2.1.3.2 Náhražky kakaového másla .....	13
2.1.4 Posuzování kvality .....	15
2.1.5 Čokoláda a zdraví .....	16
2.1.5.1 Francouzský paradox .....	17
2.2 Lipidy .....	18
2.2.1 Rozdělení lipidů.....	18
2.2.2 Mastné kyseliny .....	19
2.2.2.1 Zastoupení tuků a mastných kyselin ve výživě .....	19
2.2.2.2 Nasycené mastné kyseliny .....	20
2.2.2.3 Nenasycené mastné kyseliny .....	20
2.2.2.4 Zdroje tuků ve stravě .....	21
2.2.3 Analýza mastných kyselin .....	22
2.2.3.1 Plynová chromatografie .....	22
2.2.3.2 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií.....	23
2.2.3.3 McLaffertyho ion .....	23
3. CÍLE PRÁCE .....	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
4.1 Použité chemikálie .....	25
4.2 Použité přístroje a pomůcky .....	25
4.3 Původ vzorků .....	26
4.4 Příprava vzorků .....	26
4.5 Měření .....	27
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
5.1 Metoda vnitřní normalizace .....	29
5.2 Využitelnost vzorků v navazující studii.....	29

5.3	Statistické vyhodnocení naměřených dat .....	29
5.3.1	Aritmetický průměr .....	30
5.3.2	Směrodatná odchylka .....	30
5.3.3	Relativní směrodatná odchylka (RSD) .....	30
5.3.4	Opakovatelnost .....	30
5.4	Interpretace výsledků .....	31
6.	ZÁVĚR .....	36
7.	SUMMARY .....	37
8.	SEZNAM ZKRATEK .....	38
9.	POUŽITÉ ZDROJE A LITERATURA .....	39
10.	PŘÍLOHY .....	41



# 1. ÚVOD

Čokoláda je jedna z neznámějších a nejoblíbenějších laskomin na světě. Mezi základní složky čokolády patří kakaové máslo, které se svým složením řadí mezi tuky. Díky vysokému podílu tuků není čokoláda zpravidla vnímána jako zdravá potravina.

Důležitou složkou tuků jsou mastné kyseliny, které se podle typu výrazně liší svými účinky na zdraví. Následující bakalářská práce je zaměřena na obsah mastných kyselin v několika běžných druzích čokolád.

Kakaové máslo má své specifické složení a fyzikálně - chemické vlastnosti, které se uplatňují při výrobě kvalitních čokolád. Na výrobu méně kvalitních produktů jsou používány náhražky kakaového másla. Cílem práce je zjistit zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve zkoumaných vzorcích a pokusit se určit, zda bylo na výrobu použito skutečného kakaového másla nebo pouze jeho náhrad. Souvisejícím cílem je ze zkoumaných vzorků určit čokoládu obsahující nejnižší podíl zdravotně rizikových mastných kyselin.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Čokoláda

Čokoláda, pěstovaná převážně v západní Africe, má za sebou dlouhodobý vývoj a bohatou historii.<sup>[1]</sup> Základem čokolády jsou kakaové boby, které se objevují již před třemi tisíci lety. V té době byly velice ceněné, nejen že se využívaly jako platidlo, ale také měly množství symbolik a používaly se při různých rituálech. Postupně se z kakaových bobů začíná zpracovávat čokoláda. Na počátku převládaly kakaové nápoje, které byly typické spíše u bohatší vrstvy obyvatelstva a šlechty. Přibližně v 17. století se otevírají první obchody s horkou čokoládou, které si rychle získaly na oblibě a v 18. století už jsou tyto čokoládovny velmi rozšířené.<sup>[2,3,4]</sup>

Kakaové boby jsou vráscité plody, tykvovitého až okurkovitého tvaru, které obsahují okolo dvaceti, až sedmdesáti semen a rostou na tropické rostlině zvané *Theobroma cacao* (Kakaovník pravý). Právě název „theobroma“ vypovídá o postavení kakaa a čokolády v naší kultuře, doslova totiž znamená „potrava bohů“.<sup>[1,2]</sup>

Z hlediska světového trhu rozlišujeme tři základní skupiny kakaovníku – *Criollo*, *Forastero* a *Trinitario*.<sup>[5]</sup> Semena, používající se k výrobě těch nejvyšších čokolád, poskytují právě varianty *Criollo*.<sup>[3]</sup> Kakaovníky druhu *Forastero* poskytující semena trpká až nakyslá a zahrnují 90 % celosvětové produkce. Třetí zmíněná varianta *Trinitario* se objevuje až v poslední době a je křížencem kakaovníků typu *Criollo* a *Forastero*.<sup>[5]</sup>

#### 2.1.1 Technologie výroby

Po utrnutí kakaových bobů z kakaovníku je třeba provést jejich fermentaci, tím se odstraní ochranná vrstva a bob je připraven ke zpracování. Počáteční fází celého procesu výroby čokolády je třídění a čištění zfermentovaných kakaových bobů, tento proces probíhá v čistících strojích na vibračních sítích, kde se odstraňují nevyhovující kakaové boby a pomocí ventilátoru se odstraňuje prach a další nečistoty.

Následuje předpražení kakaových bobů v kontinuálním pražiči a následné pražení kakaové drti. Při těchto procesech dochází k chemickým a fyzikálním pochodům, spojeným se změnami barvy, vůně a chuti kakaových bobů. Při pražení dochází k sušení a tedy ke snížení množství vody v bobech, nepražené boby obsahují 6 až 8 % vody a po

upražení je to asi 2 až 3 % vody, přičemž obsah vody okolo 2 % v upražených bobech je považován za optimální. Proces sušení velmi napomáhá v celkovém zpracování bobů – jsou křehčí, lépe se drtí a snáze se zbavují slupek.

Dalším krokem výroby je mletí a následný vznik kakaové hmoty. Kakaová drť, zbavená slupek, se mele a zahříváním vzniká polotekutá hmota. Tato hmota, která již začíná vonět jako čokoláda, se lisuje, dochází tak k vydělení kakaového másla a zbytek tvoří jakýsi kakaový koláč.

Nyní se proces může ubírat dvěma směry – do kakaové hmoty se přidává kakaové máslo a vzniká tak kvalitní čokoláda nebo se kakaový koláč rozemele na prášek, přidávají se k němu rostlinné tuky a další přísady a vzniká tak velice nekvalitní a levná čokoláda.

Dále se přidávají ostatní suroviny, které tvoří čokoládu, jako například cukr, vanilka, emulgátory (lecitin) nebo mléko. Řádným mícháním surovin vzniká hladká hmota. Nyní se dostáváme k procesu konšování, který výrazně ovlivňuje chuť výsledného výrobku. Vzniklá hmota se dává do stroje, který ji hřeje a zjemňuje až po dobu tří dnů při teplotě 60 -75 °C (teplota je specifická pro každého výrobce), výsledkem tohoto procesu je zlepšení konzistence hmoty a odstranění kyselosti.

Temperování čokolády je podstatným krokem a následuje po procesu konšování. Při procesu temperování dochází ke snížení teploty přibližně na 40 °C, aby došlo ke správné krystalizaci kakaového másla. Z výrobní linky nyní vytéká rozehřátá čokoláda, která se lije do forem, a po zchlazení v chladícím tunelu se čokoláda vyklopí a zabalí.<sup>[3,5,6]</sup>

### **2.1.2 Klasifikace**

Složky, jež by měla obsahovat pravá hořká čokoláda, jsou kakaové máslo, kakaová hmota a cukr. Podle jednotných pravidel EU by měl být obsah celkové kakaové sušiny minimálně 32 % a obsah tukuprosté kakaové sušiny minimálně 14 %. Za kvalitní výrobek se považuje čokoláda s obsahem nejméně 50 % kakaových přísad.<sup>[4]</sup>

Asi nejrozšířenější variantou je čokoláda mléčná, která by měla obsahovat kakaovou hmotu, kakaové máslo, cukr a kondenzované nebo sušené mléko. Celkové kakaové sušiny musí obsahovat minimálně 25 % a nejméně 2,5 % tukuprosté kakaové sušiny. Mléčná čokoláda může být považována za kvalitní, pokud obsahuje alespoň 3,5 % mléčného tuku a minimálně 14 % mléčné sušiny.<sup>[3]</sup>

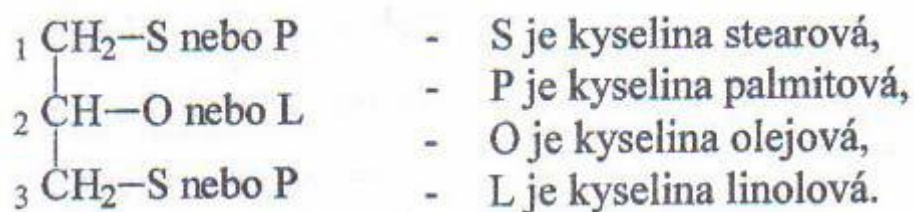
Obecně za „nečokoládu“ se považuje čokoláda bílá. Jedná se o ztuhlou pastu z tuku, cukru a mléčné sušiny, obsahující minimálně 20 % kakaového másla (bez pevných kakaových přísad), se stejnými procentuálními hodnotami mléčného tuku a mléčné sušiny jako čokoláda mléčná.<sup>[1]</sup>

Dalším druhem je čokoláda s dodatky, která kromě samotné čokolády obsahuje také kousky něčeho dalšího (sušené ovoce, oříšky, želé, apod.). Tyto složky však mohou zabírat nejvýše 40 % celkové hmotnosti výrobku.<sup>[4]</sup>

Náhražkovou čokoládou neboli čokoládovou pochoutkou je produkt, který neobsahuje kakaové máslo a kakaový prášek se zde vyskytuje pouze v malém množství (1 -10 %), dále obsahuje rostlinný tuk, cukr, sušené nebo kondenzované mléko, lecitin, ethylvanilin a nesmí se prodávat pod názvem „čokoláda“.<sup>[1]</sup>

### 2.1.3 Kakaové máslo

Z hlediska tuků má v čokoládě význam hlavně kakaové máslo, díky svému triacylglycerolovému složení se vyznačuje vynikajícími vlastnostmi. I když se podle původu kakaového másla může lišit procentuální zastoupení jednotlivých acylglycerolů, existuje určitá pravidelnost v jeho struktuře. Pro kakaové máslo je charakteristické, že poloha dva v triacylglycerolu je většinou obsazena nenasycenými mastnými kyselinami a v poloze první a třetí se nacházejí nasycené mastné kyseliny.



Obr. 1: Složení triacylglycerolu kakaového másla<sup>[3]</sup>

Právě kyseliny stearová, palmitová, olejová a linolová tvoří přibližně 97 % všech kyselin v kakaovém másle.<sup>[3]</sup>

#### 2.1.3.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti kakaového másla

Vlastnosti kakaového másla souvisí s původem kakaových bobů. Kakaové máslo nemá ostrý bod tání a přechod do kapalného stavu je závislý na podmínkách, kdy došlo

k jeho tuhnutí, nicméně se udává bod tání mezi 20 až 33 °C. Dále je charakterizován bod tuhnutí 30 až 32 °C, bod jihnutí 33 až 35 °C a bod vyjasnění 32 až 36 °C.<sup>[5,6]</sup>

Polymorfické vlastnosti kakaového másla jsou dány různými možnostmi stočení a podélného uskupení řetězců mastných kyselin. Existuje šest krystalických forem kakaového másla, které se nejčastěji označují řeckými písmeny. Bod tání klesá s klesající stabilitou jednotlivých forem. Při procesu temperace čokoládových hmot se postupně snižuje teplota a mění se tak i vlastnosti kakaového másla. Správně vedená temperace, tedy nukleace a krystalizace kakaového másla v čokoládové hmotě, zaručí vznik hladkého a lesklého povrchu vzniklé čokolády.<sup>[3]</sup>

Nejméně stabilní je  $\gamma$  modifikace, která poměrně rychle přechází v  $\alpha$  modifikaci. Stabilní formou kakaového másla je  $\beta$  modifikace, která je důležitá při procesu vyjmutí čokolády z nádoby, jelikož při zchlazení dochází u  $\beta$  modifikace k největší kontrakci.<sup>[6]</sup>

### 2.1.3.2 Náhražky kakaového másla

Téměř třicet let se spekulovalo o tom, zda při výrobě čokolády mohou být použity náhražky kakaového másla. Nakonec byl v březnu roku 2000 Evropskou unií povolen přídavek rostlinných tuků do čokolád ve výši 5 %.<sup>[4]</sup>

Obecně můžeme náhrady kakaového másla rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou tuky, které se svými fyzikálně - chemickými vlastnostmi velmi blíží kakaovému máslu, jsou označovány jako CBE (*cocoa butter equivalents*), popřípadě CBI (*cocoa butter improvers*). Při tuhnutí poskytují stejné krystalické struktury jako kakaové máslo díky podobnému složení triacylglycerolů a mastných kyselin a mohou se tak s kakaovým máslem mísit neomezeně. Tyto rostlinné náhrady se vyrábí frakcionací tuků z tropických plodin, jako jsou ořechy Shea, Illipe nebo z některých frakcí palmového oleje.<sup>[7]</sup> V tabulce 1 je uvedeno zastoupení vybraných druhů mastných kyselin v másle shea a illipé.

mastná kyselina	shea	illipé
laurová	0,4	0,2
myristová	0,3	0,3
palmitová	4 – 8	23
linolová	4 – 8	14

olejová	45 - 50	34
stearová	36 - 41	23

Tab. 1: Zastoupení jednotlivých mastných kyselin rostlinných másel (%).<sup>[8]</sup>

Druhou skupinou jsou tuky označované jako CBR (*cocoa butter replacers*) a CBS (*cocoa butter substitutes*). Tyto skupiny tuků se liší svými fyzikálně – chemickými vlastnostmi od vlastností kakaového másla, při jejich vzájemném mísení ztrácí kakaové máslo své polymorfní vlastnosti, jsou s ním tedy mísitelné částečně až nemísitelné. Mají také jiné chemické složení, rozdílná UV spektra, odlišné body tání a tuhnutí a krystalizační vlastnosti, což je třeba brát v potaz při technologii výroby produktů s použitím těchto náhrad. CBR a CBS se používají především do čokoládových polev, které se vyrábějí z průmyslového kakaového prášku, který obsahuje 10 až 12 % kakaového másla, což je hodnota, kdy ještě nedochází k technologickým potížím při výrobě a kdy se dané náhrady bez problémů mísí s kakaovým máslem.<sup>[9]</sup>

CBR se vyrábí hydrogenací, transesterifikací a frakcionací různých typů olejů, například sójového, palmového, bavlníkového nebo řepkového. Zastoupení vybraných mastných kyselin těchto druhů olejů je uvedeno v tabulce 2. Produkty vyrobené s použitím těchto náhrad mají dobrý lesk i lom, ale díky pomalejšímu tání vyvolávají voskovou chuť v ústech.

mastná kyselina	sójový	palmový	bavlníkový	řepkový
laurová	0 – 0,1	0 – 0,4	0 – 0,2	0,1
myristová	0 – 0,2	0,5 – 2	0,6 – 1	0,2
palmitová	8 – 13,3	40 – 47	21,4 – 26,4	1,5 - 6
linolová	49,8 – 57,1	6,5 – 12	46,7 – 58,2	11 – 23
olejová	17,7 – 25,1	36 – 44	14,7 – 21,7	8 - 60
stearová	2,4 – 5,4	3,5 – 6	2,1 – 3,3	0,5 – 3,1

Tab. 2: Zastoupení jednotlivých mastných kyselin rostlinných olejů (%).<sup>[8]</sup>

CBS se vyrábí hydrogenací a frakcionací kokosového nebo palmojádrového oleje a na rozdíl od CBR kyselinu laurovou obsahují ve vysokém množství. Výhodou užití náhrad tohoto typu, je velmi dobrá technologie při výrobě tuků.<sup>[7]</sup> Zastoupení vybraných mastných kyselin olejů používaných k výrobě náhrad skupin CBS je uvedeno v tabulce 3.

mastná kyselina	kokosový	palmojádrový
laurová	43 - 51	41 – 55
myristová	16 - 21	14 – 18
palmitová	7,5 - 10	6,5 – 10
linolová	1 – 2,5	1 – 3,5
olejová	5,4 – 8,1	12 – 19
stearová	2 - 4	1,3 – 3

*Tab. 3: Zastoupení jednotlivých mastných kyselin rostlinných olejů (%).<sup>[8]</sup>*

#### **2.1.4 Posuzování kvality**

Mimo posuzování kvality čokolád z pohledu obsahu jednotlivých tuků nebo technologického postupu při výrobě, existují na světě i specialisté v oboru degustace. V čokoládě dokáží rozpoznat nejzajímavější tóny, které by si laik s čokoládou asi nespojil. Dobrá čokoláda obsahuje například chuť hub, různých bobulí, lékořice nebo chuť kůže. V kvalitní čokoládě by mělo převládat několik různých tónů chutí, které se rozvíjejí postupně, některé trvají krátce a jiné přetrvávají i dlouho po ochutnání, měl by být rozpoznán začátek, střed a konec chuti.

Při degustaci neboli ochutnávání čokolády, je nutno zapojit všech pět smyslů. Nejprve je třeba zapojit zrak, podívat se na hodnocený kousek čokolády a zhodnotit jeho konzistenci. Hladký a lesklý povrch dokazuje, že čokoláda byla správně temperována. Barvu čokolády ovlivňuje mnoho faktorů, jako je obsah mléka, doba pražení nebo typ kakaových bobů.<sup>[6]</sup>

Zadruhé je třeba použít hmat, zjistit, zdali je čokoláda měkká nebo tvrdá. Čím jemnější budou částice čokolády, tím lepší bude mít čokoláda aroma.

Zatřetí je třeba čokoládu zlomit, poslechnout si, jak se láme a využít tak sluchu. Pokud se zlomila snadno a úhledně, znamená to, že poměr mezi máslem a kakaem je správný. Díky obsahu sušeného mléka se mléčná čokoláda láme hůře než hořká čokoláda.

Dalším krokem je k čokoládě přičichnout, jelikož až devadesát procent chuti tvoří vůně. Vůně dobrého kaka v čokoládě by měla připomínat různé přírodní produkty, jako například ovoce, dřevo, květiny nebo koření.

Poslední fází degustace je čokoládu ochutnat, vložit pouze malý kousek do úst a nechat rozvinout všechny chutě.<sup>[3]</sup>

### 2.1.5 Čokoláda a zdraví

S nadsázkou můžeme říct, že čokoláda roste na stromě, obsahuje tedy mnoho zdraví prospěšných látek, podobně jako ovoce nebo zelenina. Pro určení antioxidačního potenciálu dané potraviny existuje hodnota ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), která nám udává schopnost odstraňovat volné radikály. Na základě této hodnoty můžeme čokoládu řadit do stejné skupiny zdravých potravin, jakými jsou například brokolice, borůvky nebo jahody.<sup>[10]</sup>

potravina	hodnota ORAC [ $\mu$ M TE/g]
čistá kakaová hmota	26 000
bobule acai	18 000
hořká čokoláda	13 120
sušené švestky	5 770
borůvky	2 400
jahody	1 540
brokolice	890

Tab. 4: Potraviny se silnými antioxidačními účinky.<sup>[11]</sup>

Čokoláda obsahuje spousty látek příznivě působících na náš organismus. Mezi nejčastěji zmiňované patří anandamid, který se také nazývá jako „vnitřní štěstí“, dále kofein, který stimuluje centrální nervový systém (100 g hořké čokolády obsahuje přibližně 55 mg kofeinu), kanabinoidy, o kterých se předpokládá, že v mozku stimulují tvorbu přirozených látek proti bolesti, endorfiny, které se do těla vylučují také během cvičení, navozují příjemné pocity a tlumí fyzickou bolest, fenylethylamin, nazývaný „čokoládový amfetamin“, který zvyšuje pocity bdělosti a vzrušení, dále serotonin (100 g čokolády obsahuje 3 mg), zlepšující myšlení a paměť a navozující pocity štěstí, teobromin, který se svými účinky podobá kofeinu (100 g hořké čokolády obsahuje přibližně 1600 mg teobrominu), anebo tryptofan, esenciální aminokyselina, která se svými účinky podobá serotoninu.<sup>[11]</sup>



Čokoláda je také bohatým zdrojem flavonoidů - široké skupiny látek rostlinného původu s antioxidačními efekty.<sup>[12]</sup> Především díky obsahu flavonoidů působí čokoláda příznivě na naše zdraví - pomáhá snižovat riziko vzniku srdečních chorob, cukrovky, také snižuje krevní tlak, množství špatného LDL cholesterolu v krvi a zachovává stálou hladinu dobrého HDL cholesterolu, dokonce předchází vzniku některých druhů nádorových onemocnění.<sup>[13]</sup>

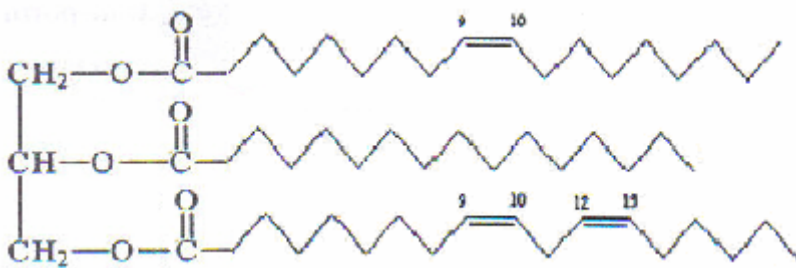
### **2.1.5.1 Francouzský paradox**

Francouzi trpí až o 40 % nižším výskytem kardiovaskulárních chorob než obyvatelé jiných zemí a to i přesto, že konzumují velmi tučná jídla, pijí hodně vína a příliš nehledí na pravidelnou fyzickou aktivitu. Malý počet srdečních problémů se připisuje právě pravidelné konzumaci vína. A to díky výskytu polyfenolů a flavonoidů. Nicméně je důležité podotknout, že tyto pozitivní vlivy na zdraví přináší konzumace kvalitního vína. Z mnohých vědeckých výzkumů vyplývá, že především vína červeného - díky vyššímu výskytu antioxidantů.<sup>[14]</sup>

O francouzském paradoxu můžeme hovořit i v souvislosti s čokoládou. Nejen, že obsahuje stejné zdraví prospěšné látky, jaké nacházíme ve víně, ale také je obecně považována za nezdravou pochoutku. Ale stejně jako u vína, kladné efekty na zdraví přináší konzumace vybraného druhu čokolády – kvalitní hořké čokolády.<sup>[10]</sup>

## 2.2 Lipidy

Studium lipidů je velice rozsáhlé odvětví. Obecně si pod pojem lipidy můžeme zařadit tuky a oleje, které jsou nejčastěji definovány jako estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Za zakladatele chemie tuků je považován francouzský chemik E. Chevreul, který také izoloval nejvýznamnější mastné kyseliny.<sup>[15]</sup>



Obr. 2: Struktura esteru vyšších mastných kyselin a glycerolu<sup>[5]</sup>

### 2.2.1 Rozdělení lipidů

Hlavním kritériem pro zařazení látek do skupiny lipidů, je jejich hydrofobnost, ne chemické složení, proto nepředstavují lipidy jednotně definovanou skupinu. Dle chemického složení bychom mohli lipidy rozdělit na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy. Sloučeniny mastných kyselin a alkoholů jsou považovány za homolipidy a dále se dělí dle struktury vázaného alkoholu. Lipidy, které mají navíc kromě mastných kyselin a alkoholu ještě další sloučeniny, vázané kovalentně, nazýváme heterolipidy. Skupiny homolipidů i heterolipidů, které mají některé složky vázány i jinou než kovalentní vazbou, nazýváme komplexní lipidy.<sup>[8]</sup>

V potravinářském průmyslu se běžně nepoužívá označení lipidy, ale rozeznávají se tuky, oleje, mastné kyseliny, vosky a lecitin, protože právě tyto složky mají průmyslový význam.<sup>[15]</sup>

V praxi se setkáváme také s doprovodnými látkami lipidů, chemickou strukturu mají odlišnou a ne vždy obsahují vázané mastné kyseliny, ale obvykle se řadí mezi lipidy. Patří sem mimo jiné lipofilní vitaminy (tj. vitaminy rozpustné v tucích – A, D, E, K), kterými se zabývala navazující studie.<sup>[16]</sup>

## 2.2.2 Mastné kyseliny

Nejdůležitější složku lipidů představují mastné kyseliny, které jsou také nejvýznamnější z hlediska výživy. Z pohledu stupně nasycení rozlišujeme mastné kyseliny nasycené a nenasycené. U nenasycených mastných kyselin navíc určujeme prostorovou konfiguraci, zda se jedná o cis- nebo trans-izomery.<sup>[17]</sup>

Mastné kyseliny dále charakterizuje počet atomů uhlíku v molekule, mluvíme o mastných kyselinách s krátkým, středním nebo dlouhým řetězcem. Rozlišujeme také mastné kyseliny rozvětvené nebo mastné kyseliny s OH skupinami.

Mastné kyseliny jsou v literatuře často zkráceně označovány jako MK, popřípadě je užito zkratky FA z anglického výrazu *fatty acids*. Existuje i zkrácený zápis MK podle vzorce CN:M, kdy CN charakterizuje počet uhlíků a M udává počet dvojných vazeb.<sup>[18]</sup>

### 2.2.2.1 Zastoupení tuků a mastných kyselin ve výživě

Tuky patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka hrají důležitou roli. Představují jedny ze základních živin (jakými jsou i bílkoviny a sacharidy), potřebných pro správný vývoj organismu. Zajišťují vydatný zdroj energie – 1 g tuku poskytuje přibližně 38 kJ, což je až dvojnásobek toho, co tělu dodávají bílkoviny nebo sacharidy.<sup>[19]</sup>

Základní složkou všech buněk v organismu jsou tuky, zajišťují jeho tepelnou a mechanickou ochranu. Díky tukům dokážeme vstřebávat vitamíny (A, D, E, K) ze stravy, dále jsou potřebné při srážení krve, ovlivňují nervové tkáně a podílejí se na tvorbě hormonů.

Tuky by měly zajišťovat 28-30 % celkového energetického denního příjmu člověka a jejich konzumace by se měla pohybovat mezi 60 – 100 g denně v závislosti na pohlaví, věku a fyzické aktivitě.<sup>[20,21]</sup>

Z hlediska výživy je nejpodstatnější, jaké typy mastných kyselin dané tuky obsahují - nasycené, nenasycené s jednou nebo více dvojnými vazbami v cis konfiguraci (kyseliny typu n-3 a n-6) a trans-nenasycené mastné kyseliny.<sup>[17,20]</sup>

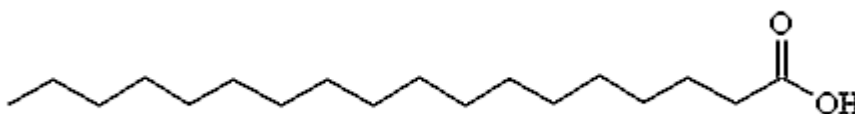
Ačkoliv se názory na jednotlivé typy tuků (dle zastoupení mastných kyselin) mnohdy liší, nejčastějším postojem je, že nejvíce zdraví škodlivé jsou tzv. trans tuky, tedy tuky obsahující nenasycené mastné kyseliny v trans konfiguraci. Zjednodušeně řečeno

mezi méně škodlivé, pak patří nasycené mastné kyseliny, ale je třeba brát zřetel na fakt, že různé typy nasycených mastných kyselin se v lidském organismu chovají různě v závislosti na počtu uhlíků v molekule. Nejvíce žádoucí jsou naopak nenasycené mastné kyseliny v cis konfiguraci. Zejména pak skupina tuků typu omega-3 a omega-6, které jsou též nazývány esenciálními mastnými kyselinami.<sup>[21,22]</sup>

### 2.2.2.2 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené MK je skupina mastných kyselin, které neobsahují žádnou dvojnou vazbu. Tato skupina MK je označována zkratkou SFA (*saturated fatty acid*).

Mezi hlavní zástupce skupiny SFA patří kyselina máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová a stearová. Větší přísun nasycených mastných kyselin je obecně považován za nezdravý. Zvyšují riziko srdečních chorob, nemocí cév a nádorových onemocnění, protože dochází ke zvýšenému ukládání tuku a tvorbě cholesterolu v těle. Výjimkou může být kyselina stearová (viz obr. 3), která se v těle přeměňuje na kyselinu olejovou.<sup>[8,17]</sup>



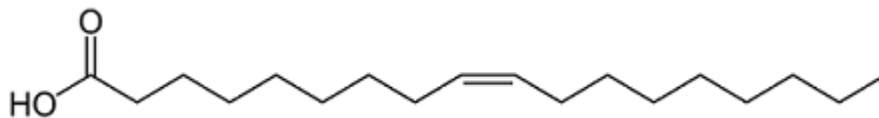
Obr. 3: Strukturální vzorec kyseliny stearové

### 2.2.2.3 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny jsou podstatně rozsáhlou skupinou, u které je důležitá nejen délka řetězce, počet dvojných vazeb, ale především prostorová konfigurace.<sup>[8,17]</sup>

Nenasycené MK mohou obsahovat jednu dvojnou vazbu, kdy se jedná o mononenasyčené MK, v literatuře často používaná zkratka MUFA (*monounsaturated fatty acids*). Mezi významné zástupce skupiny MUFA patří kyselina olejová (viz obr. 4) a kyselina palmitolejová. Dále rozlišujeme polyenové MK, které obsahují více dvojných vazeb a jsou označovány jako PUFA (*polyunsaturated fatty acids*). Do PUFA skupiny řadíme kyseliny typu n-3 a n-6 (dle polohy dvojných vazeb), které jsou velmi významnou

skupinou z pohledu výživy. Hovořili jsme o nenasycených MK v cis konfiguraci, která je obvyklejší.



Obr. 4: Strukturální vzorec kyseliny olejové

Skupina nenasycených MK, které mají jednu nebo více dvojných vazeb v trans konfiguraci se zkráceně nazývá jako TFA (*trans fatty acid*) nebo také trans-izomery mastných kyselin. Jedná se o nezdravou formu nenasycených mastných kyselin, které se některými vlastnostmi podobají nasyceným mastným kyselinám.<sup>[20]</sup>

Lidské tělo si dokáže nasycené a nenasycené monoenové mastné kyseliny vyrobit samo, polyenové mastné kyseliny, zejména pak kyselina linolenová ze skupiny n-3 a kyselina linolová ze skupiny n-6, jsou označovány jako esenciální a musí být přijímány ve stravě.<sup>[22]</sup>

Doporučený poměr mezi nasycenými MK, monoenovými MK a polyenovými MK je 3:5:2.<sup>[23]</sup>

#### 2.2.2.4 Zdroje tuků ve stravě

V jednotlivých potravinách máme tuky živočišného a rostlinného původu, ale vzhledem k tomu, že tuky přítomné ve stravě obsahují rozsáhlejší spektrum mastných kyselin, nelze jednoznačně tvrdit, že tuk nasycený je živočišným tukem a tuk nenasycený rostlinným tukem.<sup>[17]</sup>

Nasycené mastné kyseliny se vyskytují především v živočišných potravinách, jakými jsou například máslo (až 80 %), tučné maso a uzeniny (20 - 60 %) nebo mléko a mléčné výrobky. Ale také se nasycené tuky vyskytují v potravinách rostlinného původu – palmový, palmojádrový a kokosový olej.

Nenasycené mastné kyseliny se zase vyskytují především v rostlinných produktech, ale také v rybách. Mononenasycené mastné kyseliny můžeme najít zejména v řepkovém a olivovém oleji nebo také v ořechích a avokádu. Mezi zdroje polynenasycených mastných kyselin patří většina rostlinných olejů a především pak rybí tuk a ryby.<sup>[24]</sup>

Trans mastné kyseliny vznikají převážně průmyslovou výrobou – procesem hydrogenace, kterým se předchází žluknutí tuků, jedná se o ztužené rostlinné tuky. Tyto tuky se také vyskytují přirozeně a to v tuku a mléce přežvýkavců.<sup>[17,20]</sup>

### **2.2.3 Analýza mastných kyselin**

V oblasti analýzy potravin a biochemie patří stanovení mastných kyselin k rozšířeným technikám. Jednou z nejpoužívanějších metod analýzy mastných kyselin je v dnešní době metoda plynové chromatografie (GC). Další používanou a moderní metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která se mimo analýzy uplatňuje i v preparativní separaci mastných kyselin. Pro pre-separaci mastných kyselin se užívá metoda chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Navíc kombinací těchto metod můžeme zjistit i strukturní vlastnosti lipidů.<sup>[25]</sup>

K analýze mastných kyselin je třeba užití derivátů, kterých existuje velké množství. V plynové chromatografii patří mezi nejdůležitější z nich methylesterové deriváty, které se užívají pro zjištění profilu mastných kyselin. Mastné kyseliny se tedy musí před vlastním stanovením převést na těkavé methylestery (FAME).<sup>[26]</sup>

Principem metody je reakce, při které dochází ke zmýdelnění glyceridů a následné esterifikaci volných mastných kyselin v alkalickém prostředí methanolem. Methylestery mastných kyselin se pak po extrakci do vhodně zvoleného rozpouštědla stanoví plynovou chromatografií.<sup>[27]</sup>

#### **2.2.3.1 Plynová chromatografie**

Jedná se o chromatografickou metodu, která má obrovský význam v mnoha oblastech vědy. Principem této fyzikálně-chemické metody je dělení plynů a par na základě rozdělení složky mezi dvě nestejnorodé fáze – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Mobilní fází je právě plyn. Pomocí plynové chromatografie se separují nejen plyny, ale i veškeré další látky, které se mohou nacházet v plynné fázi, tedy všechny těkavé látky bez ohledu na to, zdali jsou za normální teploty pevnými látkami nebo kapalinami.<sup>[28]</sup>

Jednou z nejdůležitějších částí plynového chromatografu je detektor, který slouží k vyhodnocení analýzy a vytvoření chromatogramu – odezvy detektoru v závislosti na čase. Detektorů, používaných v GC, máme několik druhů. K nejvyužívanějším patří

především tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově – ionizační detektor (FID), který se nejtradičněji využívá k analýze lipidů, anebo hmotnostní detektor.<sup>[29,30]</sup>

### **2.2.3.2 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií**

Hmotnostní spektrometrie (MS) patří stejně jako plynová chromatografie mezi fyzikálně – chemické metody, je založena na separaci iontů v magnetickém nebo elektrickém poli a s využitím hmotnostního spektra látek umožňuje jejich identifikaci. K analýze lipidů se využívá MS s přímým nástřikem.<sup>[27]</sup>

Spojení MS s plynovou chromatografií (GC/MS) umožňuje identifikaci složitých směsí, výrazné zlepšení selektivity a jedná se o relativně rychlou metodu.

Ve spojení GC/MS zastává hmotnostní spektrometr funkci detektoru, kde na základě generace iontů dochází k jejich separaci podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ).<sup>[31]</sup>

### **2.2.3.3 McLaffertyho ion**

Při analýze mastných kyselin na GC/MS dochází k tzv. McLaffertyho přesmyku, kdy z methylesteru dané kyseliny vzniká poměrně stabilní částice s molekulovou hmotností rovnou 74  $m/z$ . Jedná se o McLaffertyho iont, který obsahují spektra všech methylesterů, díky čemuž jsme schopni mastnou kyselinu identifikovat.<sup>[32]</sup>

### 3. CÍLE PRÁCE

Mezi hlavní a dílčí cíle této bakalářské práce patří:

- Zavedení metody pro stanovení poměrného zastoupení mastných kyselin v čokoládě
  - Příprava vzorků pro GC/MS
  - Posouzení využitelnosti mastných kyselin pro hodnocení kvality čokolád
  - Určení zdraví nejprospěšnější čokolády ze zkoumaných vzorků



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použité chemikálie

- Standard methylesteru kyseliny olejové -  $C_{19}H_{36}O_2$   
FLUKA, Buchs, Švýcarsko
- Heptan, p.a. –  $C_7H_{16}$   
LACHEMA, o.p. Brno, závod Neratovice
- Hexan, p.a. –  $C_6H_{14}$   
LACHEMA, o.p. Brno, závod Neratovice
- Methanol, p.a. –  $CH_3OH$   
PENTA, Praha 6
- Chloroform, p.a. –  $CHCl_3$   
LACHEMA, o.p. Brno, závod Neratovice
- Toluén, p.a. -  $C_7H_8$   
LACHEMA, o.p. Brno, závod Neratovice
- Hydroxid draselný, p.a. - 0,2 M methanolický roztok
- Kyselina octová, p.a -  $CH_3COOH$  (99%)
- Destilovaná voda

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Mettler Toledo, NewClassic MS205S, Švýcarsko
- Ultrazvuková lázeň, Merci, ČR
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Plynový chromatograf Agilent 7890A, Agilent Technologies, USA
- Hmotnostní spektrometr Agilent 5975C, Agilent Technologies, USA
- Křemenná kapilární kolona HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m)
- Nosný plyn (mobilní fáze): Helium (čistoty: He 5.5), dodavatel SIAD, Bergamo, Itálie
- Běžné laboratorní nádobí

### 4.3 Původ vzorků

Pro analýzu byly použity čokoládové výrobky z oblasti Olomouckého kraje a kraje Vysočina. Vzorky byly zakoupeny v běžné obchodní síti, kde byly vybrány náhodně, nejedná se tedy o kompletní soubor dostupných čokoládových produktů.

Následující seznam uvádí zkoumané produkty, dle názvu a výrobce:

1. 81 % exkluzivní hořká čokoláda Arriba superieur, J. D. Gross Německo
2. 75 % extra hořká čokoláda Trinidad, J. D. Gross Německo
3. 74 % hořká čokoláda deluxe, Bellarom Německo
4. 70 % jakostní hořká čokoláda s malinami 6 % Ecuador, J. D. Gross Německo
5. 70 % jemná hořká čokoláda, Alnatura Německo
6. 56 % extra hořká čokoláda Venezuela, J. D. Gross Německo
7. Hořká čokoláda s celými mandlemi Orion, Nestlé ČR
8. Čokoláda na vaření Figaro, Kraft Foods ČR
9. Čokoláda Animal Kingdom pro děti, Kraš Chorvatsko
10. Oříšková čokoláda Milka, Kraft Foods ČR
11. Bílá čokoláda, Albert Quality Německo
12. Kakaová pochoutka s karamellem, Sweet Rumunsko
13. Mléčná kakaová pochoutka, ZWC Millano Polsko
14. Nusco chocolate, Brinkers Food Holandsko

### 4.4 Příprava vzorků

Z různých míst u každého výrobku byla odebrána část, která byla zvážena na analytických vahách - dvakrát po 1 g. Takto připravené vzorky byly vloženy do plastových centrifugačních zkumavek. Do jedné z nich bylo přidáno 20  $\mu$ l standardního roztoku  $\alpha$ -okoferolu a  $\alpha$ -tokoferol acetátu pro kvantitativní stanovení vitamínu E v rámci navazující studie.<sup>[16]</sup>

Vzorky byly protřepávány s 5 ml heptanu po dobu 10 minut při teplotě přibližně 45 °C, nejprve ručně a poté pomocí ultrazvukové lázně. Došlo tak k vyextrahování tuků. Zkumavky byly vloženy do centrifugy, kdy za 10 min při 4400 rpm došlo k oddělení pevné a kapalně fáze. Kapalná fáze, přelitá do čisté zkumavky, byla reextrahována

3 ml methanolu a pevný podíl 5 ml methanolu. Methanolicke fáze byly spojeny a využity k analýze vitaminu E v navazující studii.<sup>[16]</sup> Z přečištěné heptanové fáze bylo odebráno 100  $\mu$ l do skleněných víalek a přes noc se nechal tento podíl odpařit. Druhý den bylo přidáno 1 ml směsi toluen - methanol (1:1), 1 ml methanolickeho hydroxidu draselneho a směs byla inkubována 15 min při 37 °C. Poté byla směs neutralizována 200  $\mu$ l 1M kyseliny octové, bylo přidáno 2,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 3 ml destilované vody a směs byla protřepávána 5 minut. Ze směsi byla odebrána horní (hexanová) fáze, která byla posléze analyzována plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC/MS).

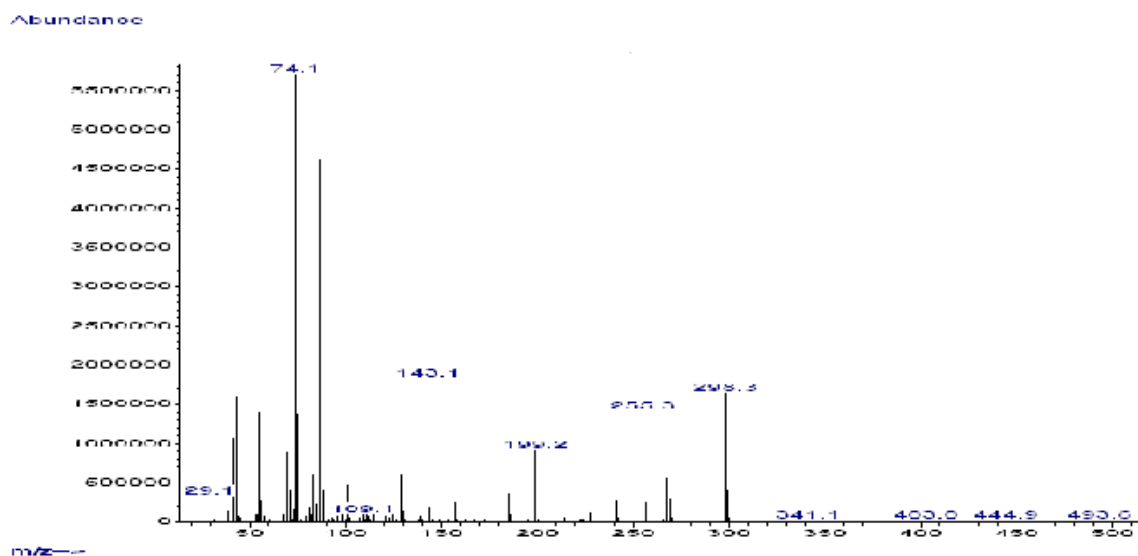
#### **4.5 Měření**

Všechna měření byla prováděna na plynovém chromatografu Agilent 7890A, za použití hmotnostního spektrometru Agilent 5975C jako detektoru. Vzorek byl dávkován po 1  $\mu$ l pomocí pulzního dávkování bez děliče toku (140 kPa, 24 s) a teplota nástřiku byla 280°C. Helium s průtokem 0,9 ml/min bylo použito jako nosný plyn. Separace byla provedena na kapilární koloně HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) s teplotním programem 50°C – 2 min – 10°C/min – 300°C – 15 min. Hmotnostní spektrometr využíval pozitivní ionizaci elektronem (70eV) a hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu 29- 520 m/z. Procentické zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo zjištěno metodou vnitřní normalizace.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

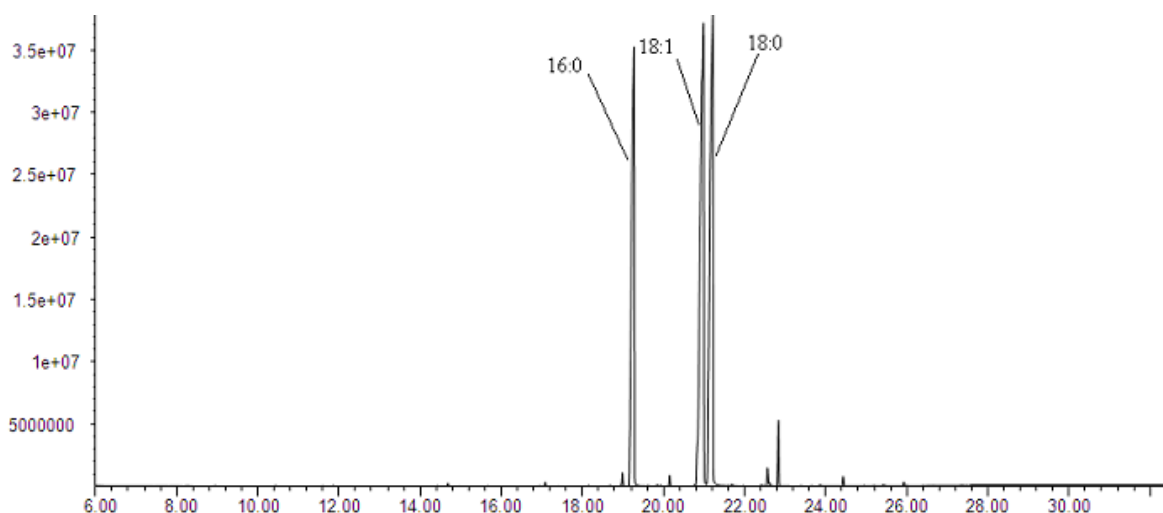
Jedním z hlavních cílů experimentální části této práce bylo zavedení metody pro stanovení poměrného zastoupení mastných kyselin v čokoládě, kdy byla použita metoda GC/MS s pracovní technikou vnitřní normalizace.

Pro určení mastných kyselin na GC/MS bylo využito McLaffertyho iontu 74 m/z.



Obr. 5: Hmotnostní spektrum kyseliny stearové s dobře patrným McLaffertyho iontem 74 m/z

Stanovení mastných kyselin bylo provedeno integrací jednotlivých píků chromatogramu v softwaru MSD ChemStation E.01.00 (Agilent, USA). Byly stanoveny mastné kyseliny s délkou řetězce C8 až C26. Pomocí standardu methylesteru kyseliny olejové bylo určeno, o jaké mastné kyseliny se nejpravděpodobněji jedná. Seznam veškerých stanovených kyselin je uveden v příloze 1. Ukázka chromatogramu vzorku č.1 (81 % exkluzivní hořká čokoláda Arriba superieur, J. D. Gross Německo) s dobře patrnými píky majoritních kyselin je na obrázku 6.



Obr. 6: Chromatogram pro vzorek č.1 - kyselina palmitová (16:0), olejová (18:1) a stearová (18:0)

### 5.1. Metoda vnitřní normalizace

Samotnou pracovní technikou, na které byl experiment založen, byla metoda vnitřní normalizace, která spočívá v měření ploch jednotlivých píků  $A_i$  ( $i = 1, 2, \dots, j$ ), vydělení těchto ploch celkovou plochou a následném stanovení procentového složení směsi.<sup>[31]</sup>

$$x_i = \frac{A_i}{\sum_j A_j} \cdot 100 [\%]$$

### 5.2. Využitelnost vzorků v navazující studii

Dílčím cílem práce byla příprava vzorků pro GC/MS tak, aby za použití vhodného extrakčního systému došlo k rozdělení izolovaných látek na dvě frakce podle polaritý převažujících složek. Heptanová fáze, obsahující převážně nepolární sloučeniny (lipidy), byla využita pro stanovení mastných kyselin. Methanolická frakce, obsahující polárnější sloučeniny, byla využita při stanovení vitamínu E, které by bez odstranění nadbytečných lipidů bylo obtížné.<sup>[16]</sup>

### 5.3 Statistické vyhodnocení naměřených dat

Pro naměřená data bylo v rámci statistického vyhodnocení použito následujících statistických parametrů: aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

### 5.3.1 Aritmetický průměr

Značení aritmetického průměru je obvykle vodorovný pruh nad danou proměnnou, uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena měřená veličina. Je definován vztahem:<sup>[33]</sup>

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

### 5.3.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka udává rozptýlení jednotlivých hodnot  $x_i$  kolem aritmetického průměru a je charakterizována jako míra přesnosti série paralelních výsledků, uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena veličina  $x$  a je definována vztahem:<sup>[33]</sup>

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

### 5.3.3 Relativní směrodatná odchylka (RSD)

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru a je definována vztahem:<sup>[33]</sup>

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%]$$

### 5.3.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.<sup>[34]</sup>

Pro posouzení opakovatelnosti měření bylo provedeno pět paralelních stanovení téhož vzorku a bylo určeno průměrné zastoupení jednotlivých mastných kyselin, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka naměřených hodnot. Získané hodnoty jsou pro vybrané makro- a mikrokomponenty shrnuty v tabulce 2.

měření	kyselina [%]			
	palmitová	linolová	olejová	stearová
1.	25,7	0,09	34,83	35,03
2.	25,37	0,1	35,43	34,56
3.	25,23	0,09	35,31	34,85
4.	25,78	0,1	34,68	34,97
5.	25,63	0,08	34,90	34,96
<b>průměr</b>	25,54	0,09	35,03	34,87
<b>směrodatná odchylna</b>	0,23	0,01	0,32	0,19
<b>RSD</b>	0,91	9,09	0,92	0,54

Tab. 5: Opakovatelnost vzorku č.3 (74 % hořká čokoláda deluxe, 100 g, Bellarom Německo).

Z tabulky je patrné, že relativní směrodatná odchylna v případě minoritních komponent nepřesáhla hodnotu 10 %, u majoritních složek se chyba měření pohybuje okolo 1 %.

Zastoupení mastných kyselin u všech ostatních vzorků jsou uvedena jako aritmetický průměr ze dvou měření.

#### 5.4 Interpretace výsledků

Analýza mastných kyselin v čokoládách ve srovnání s mastnými kyselinami, obsaženými v kakaovém másle, byla dalším dílčím cílem této práce. Většinový podíl MK kakaového másla představuje kyselina palmitová, linolová, olejová a stearová. Zastoupení těchto mastných kyselin ve zkoumaných vzorcích je uvedeno v tabulce 3.

n	označení	kyselina [%]			
		palmitová	linolová	olejová	stearová
1.	81%	27,85	0,012	35,60	34,09
2.	75%	29,12	0,023	34,84	34,04
3.	74%	25,70	0,090	34,83	35,03
4.	70% s malinami	29,34	0,026	35,34	33,71
5.	70%	30,24	0,068	33,18	33,07
6.	56%	26,83	1,116	35,82	34,11
7.	hořká	26,20	0,010	36,75	33,41

8.	na vaření	27,75	1,514	33,34	32,72
9.	dětská	26,71	0,018	34,66	31,88
10.	oříšková	26,19	0,102	38,85	29,81
11.	bílá	27,32	0,039	34,27	31,03
12.	kakaová pochoutka 1	14,28	0,041	9,087	12,49
13.	kakaová pochoutka 2	17,27	0,128	79,23	0,293
14.	nutela	12,59	0,013	75,93	7,220

*Tab. 6: Zastoupení mastných kyselin z pohledu kakaového másla v jednotlivých čokoládách.*

Toto porovnání by mohlo být určujícím kritériem pro posouzení kvality jednotlivých druhů čokolád. Hlavní komponentou kvalitní čokolády je kakaové máslo, které na základě složení můžeme považovat za zdroj především nasycených mastných kyselin, na rozdíl od jiných rostlinných tuků, které obsahují hlavně nenasycené mastné kyseliny. Převažující mastné kyseliny by měly být v kakaovém másle v přibližném procentuálním zastoupení: 30 - 36 % kyselina stearová, 33 - 36 % kyselina olejová, 23 - 30 % kyselina palmitová, 1 až 4 % kyselina linolová.<sup>[8]</sup> Z tabulky vyplývá, že vzorky č. 1 až 11 se poměrem těchto kyselin liší jen mírně, zásadní odlišnost ovšem nacházíme u vzorku č.12, 13 a 14, kdy se jedná o dvě náhražkové čokolády a čokoládovou pomazánku. Při výrobě těchto produktů bylo pravděpodobně použito jiných rostlinných tuků, než kakaového másla – náhrad skupin CBR nebo CBS.

Jedním z ukazatelů použitého tuku při výrobě čokolády je výskyt kyseliny laurové. Zastoupení dané kyseliny ve zkoumaných vzorcích je uvedeno v tabulce 4.

n	označení	kyselina laurová [%]
1.	81%	0,003
2.	75%	0,010
3.	74%	0,013
4.	70% s malinami	0,004
5.	70%	0,018
6.	56%	0,010



7.	hořká	0,234
8.	na vaření	0,395
9.	dětská	0,510
10.	oříšková	0,405
11.	bílá	1,162
12.	kakaová pochoutka 1	39,60
13.	kakaová pochoutka 2	0,125
14.	nutela	0,074

Tab. 7: Množství kyseliny laurové ve zkoumaných čokoládových výrobcích.

Nejlépe prokazatelná náhrada je u vzorku č. 12 (Kakaová pochoutka s karamellem, Sweet Rumunsko), kde byla analyzována kyselina laurová ve velmi vysokém množství – 39,60 %. Ve srovnání s ostatními vzorky, kdy se obsah kyseliny laurové průměrně pohyboval okolo 0,23 %, je to markantní rozdíl.

Z uvedených hodnot můžeme dospět k názoru, že ve vzorku č. 1 až 6 bylo pravděpodobně na výrobu použito kakaového másla, které by sice kyselinu laurovou nemělo obsahovat vůbec, ale množství této kyseliny je zde jen v minimálním množství, které může být zapříčiněno možností výskytu stop ořechů (jak uvádí výrobce na obalu), které mohou kyselinu laurovou obsahovat (viz tab. 5). Ostatní vzorky byly vyrobeny za použití jiných náhrad kakaového másla.

Určení druhu použitého tuku souvisí také s vlivem čokolády na zdraví. Z hlediska nasycených mastných kyselin, je kyselina stearová, převažující v kakaovém máslu, zdraví mnohem méně škodlivá než kyselina laurová či myristová, které převažují u náhražkových tuků. Pro možnost srovnání a jako zdroj zdraví velice prospěšných mastných kyselin byla doplňkově analyzována semínka a oříšky (viz tab. 5)

vzorek	kyselina [%]					
	palmitová	linolová	olejová	stearová	laurová	myristová
vlašský ořech	8,152	0,436	88,21	2,427	0,009	0,006
lněné semínko	9,732	0,039	75,66	10,99	0,148	0,156
lískový ořech	8,630	1,971	83,78	4,621	0,024	0,146

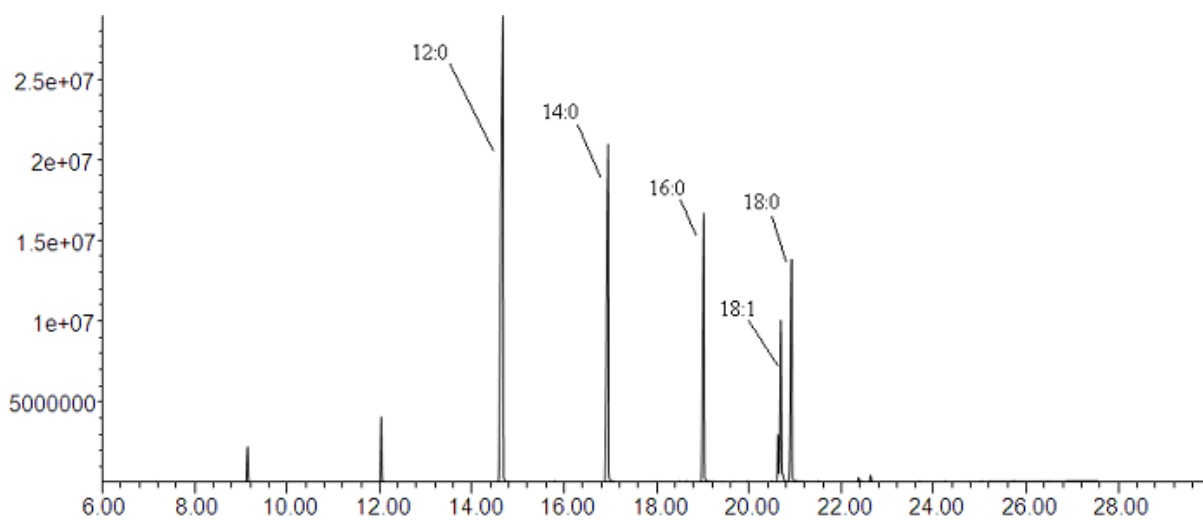
Tab. 8: Doplňující analýza mastných kyselin.

Z tabulky vyplývá, že semínka a oříšky jsou dobrým zdrojem nenasycené mastné kyseliny olejové, která zde zabírá majoritní podíl. Naopak podíl zdravotně rizikových kyselin – myristové a laurové je zde minoritní.

n	označení	kyselina myristová [%]
1.	81%	0,003
2.	75%	0,004
3.	74%	0,162
4.	70% s malinami	0,003
5.	70%	0,199
6.	56%	0,004
7.	hořká	0,427
8.	na vaření	0,116
9.	dětská	2,195
10.	oříšková	1,635
11.	bílá	2,560
12.	kakaová pochoutka 1	20,03
13.	kakaová pochoutka 2	0,369
14.	nutela	0,273

*Tab. 9: Množství kyseliny myristové ve zkoumaných čokoládových výrobcích.*

Z tabulky 6 vyplývá, že obsah kyseliny myristové 20,03 % ve vzorku č. 12 je mnohem vyšší než obsahu této kyseliny v ostatních vzorcích. Chromatogram pro vzorek č. 12 je uveden na obrázku 7. Za relativně vysoký můžeme považovat podíl kyseliny myristové také u vzorku č. 9, 10 a 11.



Obr. 7: Chromatogram pro vzorek č.12 (Kakaová pochoutka s karamellem, Sweet Rumunsko) s nejlépe patrnými píky kyseliny laurové (12:0), myristové (14:0), palmitové (16:0), olejové (18:1) a stearové (18:0)

## 6. ZÁVĚR

Byla provedena analýza mastných kyselin ve čtrnácti druzích čokolád, včetně doplňující analýzy mastných kyselin ve třech druzích ořechů. Na základě zjištěných výsledků můžeme konstatovat, že hlavní cíl práce, za který jsme si určili zavedení metody pro stanovení poměrného zastoupení mastných kyselin v čokoládě, jsme splnili. Zvolenou metodou byla plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s pracovní technikou vnitřní normalizace, která je považována za ideální pro členy homologické řady s malými rozdíly hodnot bodů varu, navíc se jedná se o rychlou a jednoduchou metodu.

Dílčí cíl přípravy vzorků pro GC/MS tak, aby bylo vzorků využito v navazující studii byl taktéž splněn. Jako vhodné rozpouštědlo byl pro tyto účely zvolen heptan, protože dobře rozpouští lipidy a je omezeně mísitelný s methanolem, takže dovoluje oddělit tuky a nízkomolekulární polárnější látky, které byly stanovovány v navazující studii.

Byl zjištěn majoritní podíl kyseliny palmitové, olejové a stearové v jedenácti vzorcích ze všech zkoumaných čokolád, výjimkou byla Kakaová pochoutka s karamellem, výrobce Sweet Rumunsko (označení jako kakaová pochoutka 1), Mléčná kakaová pochoutka, výrobce ZWC Millano Polsko (označení jako kakaová pochoutka 2) a Nusco chocolate, výrobce Brinkers Food Holandsko (označení jako nutela). Kakaová pochoutka 1 byla patrně vyrobena za použití náhrad ze skupiny CBS díky vysokému podílu kyseliny laurové. Tato čokoláda je považována za nejméně kvalitní ze všech zkoumaných vzorků. Kakaová pochoutka 2 a nutela jsou z pohledu jakosti hodnoceny jako nekvalitní. Byly vyrobeny za použití některé ze skupin náhrad kakaového másla vzhledem k nevyváženému poměru jednotlivých mastných kyselin. Tímto zhodnocením došlo k naplnění dílčího cíle posouzení využitelnosti mastných kyselin pro hodnocení kvality čokolád.

Za zdraví nejprospěšnější čokoládu byla zvolena 81 % exkluzivní hořká čokoláda Arriba superieur, výrobce J. D. Gross Německo (označená jako 81 %), která obsahovala jen stopové množství kyseliny laurové a myristové. Určením nejzdravější čokolády byl splněn poslední stanovený dílčí cíl práce.

## **7. SUMMARY**

Chocolate is one of the most favorite sweets in the world. Many people like to treat themselves by this divinely good piece of candy. In fact chocolate is derived from a tree whose name means food of the gods.

The main goal of this work was to analyze chocolate by GC/MS method and determine fatty acids by internal standardization as technique of working. It has been identified 26 kinds of fatty acids. Palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1) and linoleic acid (18:2) were evaluated in terms of assess the quality of the product.

Lauric acid (12:0) and myristic acid (14:0) were assessed from the perspective of health. Chocolate is perceived as unhealthy product. The aim of this work was to show that quality chocolate can be considered as healthy food. Not only that quality chocolate is full of flavanols and vitamins but also it's source of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

- CBE.....cocoa butter equivalents
- CBI.....cocoa butter improvers
- CBR.....cocoa butter replacers
- CBS.....cocoa butter substitutes
- FA.....mastné kyseliny (fatty acids)
- FAME.....methylestery mastných kyselin (fatty acid methyl ester)
- FID.....plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
- GC.....plynová chromatografie (gas chromatography)
- HPLC.....vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography)
- MS.....hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
- MUFA.....mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
- PUFA.....polynenasyčené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
- SFA.....nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
- TCD.....tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)
- TFA.....trans mastné kyseliny (trans fatty acids)
- TLC.....chromatografie na tenké vrstvě (thin-layer chromatography)

## 9. POUŽITÉ ZDROJE A LITERATURA

1. C. Orey: Zázračná síla čokolády, Ikar, Praha 2011
2. <http://www.worldcocoaoundation.org/learn-about-cocoa/tree-to-table/growing.asp>, staženo 16.4.2012
3. Ch. Doutre – Roussel: Čokoláda pro znalce, opravdová chuť i vášně, Slovart, Praha 2006
4. <http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=60037&cat=2190&ts=6ec12>, staženo 19.4.2012
5. J. Čopíková: Technologie čokolády a cukrovinek, VŠCHT, Praha 1999
6. J. Hrabě, O. Rop, I. Hoza: Technologie výroby potravin rostlinného původu, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín 2006
7. J. Čopíková, H. Nováková, J. Tůma, A. Sinica: Chem. Listy 2001, 95:288-294
8. J. Velíšek, J. Hajšlová: Chemie potravin 1, Osis, Tábor 2009
9. J. Čopíková: Chem. Listy 1999, 93:3-14
10. S. J. Crozier, A. G. Preston, J. W. Hurst, M. J. Payne, J. Mann, L. Hainly, D. L. Miller: Chem. Cent. J. 2011, 5:5
11. [www.chocolate.org](http://www.chocolate.org), staženo 15.4.2012
12. J. Velíšek, J. Hajšlová: Chemie potravin 2, Osis, Tábor 2009
13. G. Lippi, M. Franchini, M. Montagnana, E. J. Favaloro, G. C. Guidi, G. Targher: J. Thromb. Thrombolysis 2009, 28:482–488
14. <http://www.fitlife.cz/francouzsky-paradox>, staženo 28.3.2012
15. J. Pokorný, L. Dubská: Technologie tuků, SNTL, Praha 1986
16. J. Kujínková: Analýza čokolády - stanovení vitamínu E plynovou chromatografií, Olomouc 2012
17. <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/tuky-ve-vyzive-323593>, staženo 13.4.2012
18. P. C. Champe, R. A. Harvey: Biochemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1994
19. J. Pánek, J. Pokorný, J. Dostálová, P. Kohout: Základy výživy, Svoboda Servis, Praha 2002
20. [http://www.viscojis.cz/documents/Vyukova\\_osnova\\_pro\\_pedagogy.pdf](http://www.viscojis.cz/documents/Vyukova_osnova_pro_pedagogy.pdf), staženo 15.4.12

21. <http://www.zupu.cz/index.php?pid=178>, staženo 14.4.2012
22. C. Felix: Vše o tucích typu omega-3, Pragma, Praha 2002
23. <http://www.vyzivaspol.cz/clanky-casopis/nasycene-mastne-kyseliny-v-tucich.html>,  
staženo 8.5. 2012
24. A. McWhirter, L. Clasenová: Foods that harm, foods that heal, Reader's Digest Association Limited, London 1996
25. J. Hálková, M. Rumíšková, J. Rieglová: Analýza potravin, Ivan Straka, Újezd u Brna 2001
26. R. M. Suzuki, P. F. Montanher, J. V. Visentainer, N. E. Souza: Ciênc. Tecnol. Aliment. 2011, 31:541-546
27. J. Cvrková: Stanovení lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene, Brno 2010
28. M. Popl, J. Kubát: Separace látek, SNTL, Praha 1986
29. J. M. Miller: Separation methods in chemical analysis, John Wiley & Sons, Inc., USA 1975
30. J. Churáček a kol.: Plynová a kapalinová chromatografie, Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, Pardubice 1991
31. E. Smolková, L. Feltl, V. Pacáková: Plynová chromatografie III. Kvalitativní a kvantitativní analýza, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1976
32. H. J. Hübschmann: Handbook of GC/MS, Wiley – VCH, Germany 2009
33. J. Hendl: Přehled statistických metod zpracování dat, Portál, Praha 2004
34. J. Barek a kol.: Chem. Listy 2000, 94:439-444



## 10. PŘÍLOHY

Příloha 1 *Relativní zastoupení sledovaných mastných kyselin (%) v jednotlivých vzorcích.*

Příloha 2 *Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C*

Příloha 3 *Ukázka analyzovaných čokolád*

Příloha 4 *Kakaovník pravý s kakaovými boby*

**Příloha 1** *Relativní zastoupení sledovaných mastných kyselin (%) v jednotlivých vzorcích.*

1. 81 % exkluzivní hořká čokoláda Arriba superieur, J. D. Gross Německo
2. 75 % extra hořká čokoláda Trinidad, J. D. Gross Německo
3. 74 % hořká čokoláda deluxe, Bellarom Německo
4. 70 % jakostní hořká čokoláda s malinami 6 % Ecuador, J. D. Gross Německo
5. 70 % jemná hořká čokoláda, Alnatura Německo
6. 56 % extra hořká čokoláda Venezuela, J. D. Gross Německo
7. Hořká čokoláda s celými mandlemi Orion, Nestlé ČR
8. Čokoláda na vaření Figaro, Kraft Foods ČR
9. Čokoláda Animal Kingdom pro děti, Kraš Chorvatsko
10. Oříšková čokoláda Milka, Kraft Foods ČR
11. Bílá čokoláda, Albert Quality Německo
12. Kakaová pochoutka s karamellem, Sweet Rumunsko
13. Mléčná kakaová pochoutka, ZWC Millano Polsko
14. Nusco chocolate, Brinkers Food Holandsko

kyselina	zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
oktanová (kaprylová)	8:0	N/A	0,002	0,004	N/A	0,005	0,002	0,016	0,066	0,094	0,107	0,168	1,316	0,009	0,003
decenová	10:1	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	N/A	0,002	0,010	0,023	0,031	N/A	0,002	0,001
dekanová (kaprinová)	10:0	0,012	0,012	0,015	0,010	0,023	0,020	0,041	0,192	0,310	0,323	0,504	2,331	0,037	0,019
dodekanová (laurová)	12:0	0,003	0,010	0,013	0,004	0,018	0,010	0,234	0,395	0,510	0,405	1,162	39,60	0,125	0,074
tridekanová (tridecylová)	13:0	0,001	N/A	0,001	0,001	0,001	N/A	N/A	0,006	0,008	0,008	0,011	0,061	0,002	N/A
tetradecenová (izomer I)	14:1	0,004	0,001	N/A	0,001	N/A	0,001	0,001	0,010	0,015	0,012	0,017	0,002	0,003	0,001
tetradecenová (izomer II)	14:1	0,025	0,026	0,018	0,096	0,002	0,119	0,012	0,105	0,165	0,121	0,182	0,014	0,039	0,011
tetradekanová (myristová)	14:0	0,003	0,004	0,162	0,003	0,199	0,004	0,427	0,116	2,195	1,635	2,560	20,03	0,369	0,273
13-methyltetradekanová	Iso15:0	0,013	0,018	0,020	0,018	0,021	0,016	0,013	0,061	0,093	0,076	0,094	0,011	0,024	0,016
pentadekanová	15:0	0,025	0,030	0,044	0,023	0,041	0,028	0,049	0,115	0,274	0,170	0,234	0,021	0,035	0,037
14-methylpentadekanová	Iso16:0	0,001	0,015	N/A	0,001	0,037	0,037	0,004	0,019	0,048	0,034	0,043	0,063	0,002	0,004
hexadecenová (palmitolejová)	16:1	0,312	0,247	0,366	0,014	0,416	0,262	0,310	0,396	0,605	0,386	0,489	0,029	0,180	0,432
hexadekanová (palmitová)	16:0	27,85	29,12	25,70	29,34	30,24	26,83	26,20	27,75	26,71	26,19	27,32	14,28	17,27	12,59
heptadekanová	17:0	0,240	0,190	0,364	0,177	0,354	0,224	0,279	0,309	0,365	0,229	0,290	0,035	0,092	0,105
oktadekadienová (linolová)	18:2	0,012	0,023	0,090	0,026	0,068	1,116	0,010	1,514	0,018	0,102	0,039	0,041	0,128	0,013
oktadecenová (olejová)	18:1	35,60	34,84	34,83	35,34	33,18	35,82	36,75	33,34	34,66	38,85	34,27	9,087	79,23	75,93
oktadekanová (stearová)	18:0	34,09	34,04	35,03	33,71	33,07	34,11	33,41	32,72	31,88	29,81	31,03	12,49	0,293	7,220
nonadekanová	19:0	0,013	0,014	0,033	0,012	0,018	0,011	0,022	0,030	0,030	0,020	0,029	0,005	0,014	0,011
eikosenová	20:1	0,049	0,058	0,644	0,034	0,294	0,044	0,375	0,083	0,422	0,429	0,251	0,216	0,918	1,782
eikosanová (arachová)	20:0	1,360	1,073	1,980	0,914	1,535	1,039	1,424	1,360	1,253	0,807	0,989	0,250	0,745	0,803
heneikosanová	21:0	0,017	0,012	0,033	0,011	0,014	0,012	0,016	0,019	0,018	0,012	0,015	0,004	0,015	0,024
dokosanová	22:0	0,229	0,165	0,372	0,157	0,263	0,182	0,250	0,216	0,197	0,138	0,152	0,042	0,293	0,436
trikosanová	23:0	0,025	0,009	0,037	0,013	0,018	0,013	0,018	0,021	0,016	0,016	0,017	0,010	0,019	0,026
tetrakosanová	24:0	0,102	0,071	0,210	0,072	0,131	0,082	0,116	0,114	0,092	0,073	0,078	0,048	0,125	0,152
pentakosanová	25:0	0,004	0,011	0,023	0,009	0,023	0,003	0,014	0,018	0,004	0,020	0,016	0,018	0,014	0,019
hexakosanová	26:0	0,014	0,008	0,028	0,009	0,016	0,011	0,009	0,017	0,013	0,010	0,008	0,005	0,010	0,012

**Příloha 2** *Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C*



**Příloha 3** Ukázka analyzovaných čokolád



**Příloha 4** *Kakaovník pravý s kakaovými boby*

