



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM AUTENTICITY ČOKOLÁD S RŮZNÝM  
OBSAHEM KAKAOVÉ SUŠINY**

STUDY OF THE AUTHENTICITY OF CHOCOLATE WITH DIFFERENT CONTENT OF COCOA SOLIDS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Petra Vanduchová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

**BRNO 2018**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1250/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Petra Vanduchová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Studium autenticity čokolád s různým obsahem kakaové sušiny

### Zadání diplomové práce:

1. vypracování literární rešerše k tématu práce
2. optimalizace HPLC metody pro stanovení kofeinu a theobrominu
3. analýza vybraných vzorků čokolád pomocí HPLC
4. stanovení celkového tuku ve vzorcích čokolád
5. zpracování naměřených výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Petra Vanduchová  
student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá autenticitou čokolád s různým obsahem kakaové sušiny. Teoretická část popisuje výrobu čokoládových produktů a problematiku autenticity potravin. Experimentální část této práce spočívala ve stanovení obsahu celkové kakaové sušiny ve vybraných vzorcích. Čokolády s obsahem 50–90 % kakaava byly bez předchozí chemické úpravy strouháním rozmělněny na jemné částice, které byly podrobeny extrakcím. Metodou HPLC byly detekovány methylxantiny theobromin a kofein, z jejichž obsahu byla vypočtena tukuprostá kakaová sušina. Hodnoty tukuprosté kakaové sušiny byly stanoveny v rozmezí 19,7–43,1 g/100 g sušiny a gravimetrickým stanovením byl stanoven celkový obsah tuků ve vzorcích v rozmezí 30,9–55,4 g/100 g výrobku. Hodnoty celkové kakaové sušiny byly stanoveny v rozmezí 52,4–96,1 g/100 g výrobku. Výsledky této práce dokazují, že výrobci vybraných vzorků čokolád splňují legislativní požadavky pro hořkou čokoládu a stanovené hodnoty správně deklarují na obalech výrobků.

## **ABSTRACT**

This master's thesis deals with authenticity of chocolate with different content of cocoa solids. The theoretical part describes the production of chocolate products and the issue of food authenticity. Experimental part of this thesis is focused on the determination of total cocoa solids in the selected samples. Different samples of chocolate containing 50–90 % of cocoa were grated to fine particles, that were subjected to extraction without previous chemical treatment. The methylxanthines theobromine and caffeine were detected by HPLC to determine the content of fat-free cocoa solids. Fat-free cocoa solids content were found in the range 19,7–43,1 g/100 g of dry matter and the content of total fat was determined by the gravimetric method and was found in the range 30,9–55,4 g/100 g. The results of this thesis prove that, the producers meet the legislative requirements and the declared values are correctly declared on the wrappers of the product.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Čokoláda, TKS, CKS, autenticita, HPLC, methylxantiny,

## **KEY WORDS**

Chocolate, TKS, CKS, authenticity, HPLC, methylxanthines

VANDUCHOVÁ, P. *Studium autenticity čokolád s různým obsahem kakaové sušiny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 53 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady při vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.



# OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Historie čokolády .....	8
2.2	Složení kakaa.....	9
2.2.1	Kakaové boby.....	9
2.2.2	Kakaové máslo .....	10
2.3	Zpracování kakaových bobů .....	11
2.3.1	Fermentace a sušení .....	11
2.3.2	Přejímka a třídění kakaových bobů .....	12
2.3.3	Pražení .....	12
2.3.3.1	NARS .....	13
2.3.4	Mletí kakaové drti .....	14
2.3.5	Výroba kakaového prášku .....	14
2.3.6	Výroba čokoládové hmoty .....	15
2.3.7	Konšování.....	15
2.3.8	Temperování.....	17
2.3.9	Formování a balení .....	17
2.4	Bioaktivní látky kakaa a čokolády .....	18
2.4.1	Polyfenoly .....	18
2.4.2	Methylxantiny .....	19
2.4.2.1	Theobromin .....	20
2.4.2.2	Kofein.....	20
2.5	Autenticita potravin.....	21
2.5.1	Legislativa .....	21
2.5.1.1	Legislativa kakaových a čokoládových cukrovinek.....	22
2.5.2	Způsoby falšování .....	23
2.5.2.1	Falšování kakaa a čokolády.....	24
2.5.3	Dozorové orgány pro kontrolu autenticity potravin.....	25
2.5.4	Metody pro kontrolu autenticity potravin .....	25
2.5.4.1	Spektrometrické metody .....	26
2.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	26
2.6.1	Chromatografické systémy.....	27
2.6.2	Instrumentace v HPLC .....	27
2.6.3	Čerpadla .....	28
2.6.4	Dávkování vzorku .....	28
2.6.5	Chromatografické kolony.....	29
2.6.6	Detektory .....	29
2.6.6.1	Spektrofotometrické detektory .....	29
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31

3.1	Laboratorní vybavení .....	31
3.1.1	Pomůcky a přístroje.....	31
3.1.2	Chemikálie .....	31
3.2	Charakteristika materiálu .....	32
3.3	Příprava standardů pro stanovení teobrominu a kofeinu.....	33
3.4	Příprava vzorků pro stanovení theobrominu a kofeinu metodou HPLC .....	33
3.4.1	Příprava vzorků pro gravimetrické stanovení celkového obsahu tuku .....	34
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	35
4.1	Optimalizace HPLC metody .....	35
4.2	Stanovení celkové kakaové sušiny ve vzorcích .....	37
4.2.1	Stanovení tukuprosté kakaové sušiny .....	37
4.2.2	Stanovení celkového obsahu tuku .....	42
4.2.3	Stanovení celkové kakaové sušiny .....	43
4.2.4	Statistické vyhodnocení.....	45
5.	ZÁVĚR .....	48
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	49
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	53

# 1. ÚVOD

Čokoláda je směs kakaové sušiny, kakaového másla a dalších přísad. Je vyráběna z fermentovaných a pražených kakaových bobů pěstovaných zejména v Africe a Jižní Americe. Kakaové boby jsou využívány k výrobě čokolády, kaka, kosmetických a farmaceutických přípravků. Výroba čokoládových produktů je náročná a představuje několik následných kroků a každý z nich výrazně ovlivňuje výslednou kvalitu produktu. Čokoláda obsahuje velké množství bioaktivních látek, zejména polyfenoly, methylxantiny, minerální látky a vitamíny, z nichž většina vykazuje antioxidační účinky a působí příznivě na kardiovaskulární systém. Methylxantiny, z nichž největší zastoupení v čokoládě mají theobromin a kofein, stimulují centrální nervovou soustavu.

Produkce kakaových bobů má rostoucí trend především v souvislosti se zvyšující se spotřebou výrobků z kaka. Tento trend úzce souvisí i s vysokou cenou kaka na trhu, která je hlavní příčinou falšování kaka a čokolády. Falšování je celosvětovým problémem, který postihuje již stovky let prakticky všechny obory lidské činnosti včetně potravinářství.

Mezi způsoby falšování kaka a čokolády patří snížení obsahu tukuprosté kakaové sušiny. Dalším způsobem falšování je přidavek náhražek kakaového másla. Tyto ekvivalenty kakaového másla a jejich množství jsou spolu s obsahem kakaové sušiny v jednotlivých čokoládových produktech přesně definovány a stanoveny evropskou i českou legislativou. Problémem je, že stanovené obsahy tukuprosté kakaové sušiny a kakaového másla nejsou vždy dodržovány, nebo může dojít k falšování nahrazením těchto surovin jinými nepovolenými látkami.

Ke kontrole kvality a průkazu falšování potravin slouží celá řada metod od těch nejjednodušších, jako jsou senzorické metody zahrnující posouzení vzhledu, chutě, vůně, barvy nebo konzistence. Dále pak chemické a fyzikální metody zahrnující stanovení hmotnosti, sušiny, bílkovin, vlákniny a podobně až po složité instrumentální metody vyžadující komplikovanější úpravy vzorků, moderní přístroje a kvalifikované pracovníky. Z těchto technik jsou v případě testování autenticity čokoládových výrobků používány zejména spektrometrické a chromatografické metody, jako HPLC pro stanovení methylxantinů a infračervená spektrometrie ke stanovení autenticity kakaového másla. Kontrolou autenticity a detekcí falšování se zabývají příslušné státní dozorové orgány, jako je Státní zemědělská a potravinářská inspekce nebo Státní veterinární správa.

Vývoj nových, rychlejších a levnějších metod pro hodnocení autenticity potravin a detekci falšování je trvalý boj s nepoctivými výrobci, kteří velmi rychle zdokonalují postupy falšování tak, aby nebyly stávajícími metodami zjištělné.

Tato práce se zabývá autenticitou vybraných čokoládových produktů stanovením celkové kakaové sušiny. Analýza byla provedena v souladu s platnou českou normou ČSN 56 0578. Metoda byla aplikována na dvanáct vybraných vzorků tabulkových čokolád s různým obsahem celkové kakaové sušiny.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historie čokolády

První zmínky o pěstování kakaovníku pocházejí již z období 1500 let př. n. l., kdy jej jako první pěstovali Olmékové na území dnešního Mexika. Rod Olméků postupně nahradili Mayové, kteří se asi od 4. století n. l. jako první naučili využívat a zušlechťovat kakaové boby. Nejprve využívali pouze nasládlou dužninu, ale později i fermentovaná a opražená jádra. Byli to právě Mayové, kteří jako první připravili z bobů hořkou tekutinu. Jak Mayové tak i později ve 14. stol. n. l. Aztékové věřili, že kakaové boby jsou darem od bohů, a proto je měli ve velké úctě. Produktům z nich, zvláště pak hořkým nápojům, připisovali až mytické účinky. Zkvašené sladké nápoje z upravených bobů popíjeli především vybraní muži a válečníci. Existuje několik dochovaných památek, ze kterých je patrné, že kakaové boby sloužily rovněž jako cenné platidlo. [1]

Do Evropy přivezl kakao jako první Kryštof Kolumbus. Avšak hořký nápoj si tehdy na španělském dvoře oblibu nezískal. Tu navodil až Cortés, když upravil hořký nápoj cukrem, vanilkou a dalšími přísadami dle představy španělského krále Karla V. a představil jej u dvora. Cortés vytušil perspektivu kakaa v Evropě, a proto začal zakládat kakaové plantáže od Mexika až po Haiti. Později, když připlul do Afriky, objevil, že tamní klimatické podmínky jsou stejně dobré pro pěstování kakaovníku jako v Americe a začal zakládat plantáže i tam. Zakládání plantáží, rostoucí obliba čokolády a přesun královského dvora z Madridu do Vídně roku 1711 vedli k postupnému rozšíření čokolády do celé Evropy.

Prudký nárůst výroby čokolády byl pozorován v 18. stol. a další vlna přišla s průmyslovou výrobou cukru a vynálezy, které vylepšovaly výrobu čokolády. Mezi ty nejdůležitější patří Van Houtenův lis na kakao, který odděloval kakaový tuk (kakaové máslo) od zbytků kakaové hmoty, které jsou základem pro výrobu kakaových prášků. Dále pak následovalo vylepšení procesu tzv. konšování. To vynalezl roku 1880 Švýcar Rodolph Lindt.

V 19. století začaly na mnoha místech Evropy vznikat továrny na výrobu čokolády a cukrovinek. Mezi ty nejznámější v tehdejším Československu byly podniky Orion v Praze, který vznikl roku 1896 a v roce 1898 Zora v Olomouci. Před první světovou válkou byl pro Rakousko a Československo obrat z vývozu čokolády velmi malý. Důvodem byla vysoká cena surovin a velká konkurence z jiných zemí. V průběhu první světové války byla dodávka surovin zastavena. Po vyčerpání zbylých zásob se přešlo na výrobu fondánových a ovocných cukrovinek, avšak i jejich produkce byla značně omezena, neboť každým rokem se snižovaly příděly cukru. V období mezi válkami došlo k obnovení zásobování kakaových bobů a surovin. Protože poptávka byla v tomto období velmi silná, vyvíjely se modernější technologie a vzniklo více než 60 nových továren na výrobu čokolády a cukrovinek. Během druhé světové války přišlo Československo asi o dvě třetiny továren. Rovněž byl znovu omezen přísun kakaových bobů a dalších surovin. Jelikož nebylo možné renovovat stroje, provoz rychle zastarával. Přesto však výroba v malém množství pokračovala až do roku 1944, kdy byla produkce cukrovinek zastavena. Po druhé světové válce byl znovu obnoven provoz továren, avšak k potřebnému oživení tohoto odvětví došlo až po roce 1953, kdy skončil systém přidělového zboží, a od roku 1958 probíhaly v Československém cukrovinkářském průmyslu velké změny. Jednou z nich bylo sdružení malých továren pod velké národní

podniky, jako byly České čokoládovny n. p., Moravské čokoládovny n. p. a Figaro na Slovensku. Výrazná modernizace čokoládového průmyslu proběhla v sedmdesátých a osmdesátých letech, kdy se podařilo nakoupit nové stroje a modernizovat výrobu. Zlepšilo se také vybavení skladů, laboratoří a výpočetní techniky. Československé čokoládové výrobky si získaly svou oblibu jak v Sovětském svazu, tak i v západní Evropě a zámoří. [2] [3]

## 2.2 Složení kakaa

### 2.2.1 Kakaové boby

Kakaové boby jsou semena Kakaovníku pravého, řadí se do čeledi Sterculiaceae, latinským názvem *Theobroma cacao*. Existuje několik druhů rodu *Theobroma*, avšak pro pěstování kakaa je nejhodněji používán *Theobroma cacao*. Kakaovník pochází ze Střední a severní části Jižní Ameriky, ale postupem času bylo jeho pěstování rozšířeno do dalších oblastí, jako je západní Afrika a jihovýchodní Asie. Největšími producenty kakaových bobů jsou země Ghana, Nigérie, Indonésie, Ekvádor a Malajsie. Tento stálezelený strom dorůstá výšky 5–8 metrů a jeho listy jsou kopinaté, 10–40 cm dlouhé a 5–20 cm široké. Plod je až 30 cm dlouhý elipsoidního tvaru s hladkým nebo bradavčítým povrchem a může vážit až 0,5 kg. Jeho barva může být žlutá, žlutooranžová, hnědočervená až červená (Obr. 2.1.). Uvnitř plodu se nachází dužnina se 20–70 semeny kakaových bobů. Semena jsou asi 2 cm dlouhá sladké až natrpklé chuti. Ta jsou obalena nasládlou dužninou. Dobrou produkci bobů dávají stromy pěstované na plantážích až od čtvrtého roku. Největší sklizně pak bývají na jaře a na podzim. Po očištění jsou plody podélně rozřezány a z nich jsou semena kakaovníku vyjmuty i s dužninou. Čerstvě sklizená semena jsou složena z 8,5 % bílkovinami, 30 % tuku, 10 % sacharidů, 2,4 % theobrominu a 0,8 % kofeinu [4]. Kakaovník se dělí na tři hlavní skupiny.



Obrázek 2.1: Kakaové boby [5]

**Criollo** – tato odrůda pochází ze Střední Ameriky a Jižního Mexika a produkuje semena nejvyšší kvality. Vyznačuje se chuťovou pestrostí a jeho doba fermentace je velmi krátká. Jejich pěstování je velmi náročné na podmínky. Proto je také nejdražší v porovnání s ostatními druhy bobů a přidává se pouze do těch nejlepších čokolád.

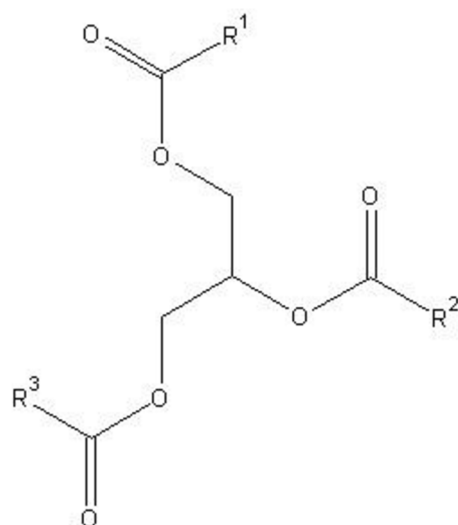
**Forastero** – je nejrozšířenějším druhem a představuje více než 80 % světové produkce kaka. U této odrůdy převládá výrazná čokoládová hořkost doplněná zemitými chuťovými tóny.

**Trinitario** – tato odrůda vznikla křížením druhů Criollo a Forastero. Plody se vyznačují značnou variabilitou tvarů, zbarvení a kvality semen. Zkřížením těchto dvou druhů vznikla odrůda s chuťovou pestrostí a bohatostí z druhu Criollo a odolností spolu s většími výnosy z druhu Forastero. Odrůda Trinitario dnes představuje asi 10 % světové produkce bobů. [6]

### 2.2.2 Kakaové máslo

Kakaové máslo patří mezi nejkvalitnější tuky, a to nejen po senzorycké stránce ale i z hlediska jeho fyzikálně-chemických vlastností, trvanlivosti a využití v různých oblastech jako je farmacie nebo potravinářství. V hořkých a zcela čistých čokoládách je kakaové máslo jediným zdrojem tuku. Avšak vzhledem k tomu, že kakaové máslo je až osmkrát dražší než jiné tuky, bývá velmi často nahrazováno jinými rostlinnými tuky.

Podle chemického složení se kakaové máslo řadí mezi triacylglyceroly (TAG), neboli estery vyšších mastných kyselin a glycerolu (Obr. 2.2). Z hlediska zastoupení mastných kyselin má kakaové máslo velmi jednoduché složení. Nejvíce zastoupenými jsou kyselina olejová (O), palmitová (P), stearová (S) a v mnohem menší míře linoleová. Tyto kyseliny utváří jednotlivé TAG, které jsou v kakaovém másle zastoupeny v různém poměru (Tabulka 2.1). Složení kakaového másla závisí také na druhu a původu kakaových bobů. Teplota tání se pohybuje okolo 32–35 °C, což do jisté míry ovlivňuje technologické zpracování čokolády. Struktura kakaového másla ve finálních produktech závisí na celkovém zpracování kakaových bobů a procesu výroby čokolády. Máslo může krystalovat v různých modifikacích, avšak ne všechny vytváří stabilní krystaly. V případě špatného technologického postupu se vytvoří nestabilní krystaly, které pak mohou vést k tukovým výkvětům na čokoládě a zhoršení organoleptických vlastností.



Obrázek 2.2: Triacylglycerol

Vzhledem k dostupnosti a ceně kakaového másla povoluje legislativa přídavky jeho náhražek, které tvoří rostlinné tuky z jiných zdrojů. Tyto náhražky jsou označovány jako CBE, jejich přídavek nesmí být větší jak 5 % a nesmí být na úkor kakaového másla. Tyto náhražky jsou evropskou legislativou přesně definovány, neboť právě tyto zvolené rostlinné tuky mají velmi podobné chemické složení a fyzikálně-chemické vlastnosti. Rovněž všechny tyto náhražky jsou bohaté na stejné zastoupení TAG jako u kakaového másla. Jako náhražky jsou povoleny palmový olej, olej z jader manga, salu, bamacký tuk a kokum gurgi. [7] [8]

**Tabulka 2.1:** Zastoupení hlavních TAG v kakaovém másle [8]

Značka TAG	Zastoupení v másle [%]
POS	39,3
SOS	27,4
POP	14,1
SOO	8,9
POO	6,4
OOO	0,7

## 2.3 Zpracování kakaových bobů

### 2.3.1 Fermentace a sušení

Fermentace je první proces, ve kterém dochází k podstatným změnám v kakaových bobech, které mají vliv na kvalitu suroviny. Jejím účelem je odstranění dužniny a zamezení klíčení bobů. Dále díky přítomným enzymům dochází k chemickým reakcím, které mají za následek zmírnění trpké chuti bobů a změnu jejich barvy na tmavě červenou. Provádí se v koších nebo perforovaných bednách přikrytými banánovými listy po dobu 5–12 dní v závislosti na druhu bobů. Tento proces probíhá díky dužnině, jejíž složení je dobrým živným médiem pro pomnožení mikroorganismů. Dužnina je složena z vody 82–87 %, 10–15 % sacharidů, 2–3 % pentosanů, 1–3 % kyseliny citrónové a 1–1,5 % pektinu. První fáze fermentace probíhá anaerobně. Díky kyselému pH (pH 3,6) a nízké koncentraci kyslíku, dochází k nárůstu kvasinek, které přeměňují zkvasitelné cukry na ethanol a oxid uhličitý. Z jednotlivých studií vyplývá, že na počátku fermentace převažují kvasinky rodu *Kluyveromyces* a některé druhy rodu *Candida*. Později převažují hlavně kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které mají vyšší toleranci k etanolu, než jiné rody. Zároveň s etanolovým kvašením probíhá destrukce buněk plodové dužniny a to díky pektolytickým enzymům. Uvolňuje se fermentační šťáva, která volně odtéká z beden a vznikajícím etanolem se zabráni klíčení. Vlivem odtoku šťávy začíná docházet k provzdušňování a nastává aerobní fáze. Na počátku aerobní fáze působí bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus subspecies* a později bakterie *Lactococcus spp.* Nastává tak produkce kyseliny mléčné. Vlivem postupného stoupání teploty až na 45 °C se

převládající kulturou stávají bakterie octového kvašení rodu *Acetobakter*, které produkují kyselinu citrónovou. Kyselina citrónová rychle proniká slupkou a tím se slupka stává křehčí. Dále pak zvyšuje trvanlivost jader, zabraňuje máselnému kvašení a napomáhá vzniku aromatických látek. Až takto fermentovaná semena kakaovníku jsou označována jako kakaové boby. [9]

Fermentované boby obsahují až 35 % vody, kterou je nutné kvůli nežádoucímu působení mikroorganismů odstranit. Sušení probíhá obvykle na slunci po dobu jednoho týdne. Kakaové boby jsou rozprostřeny na rohožích a pravidelně převraceny, aby se zajistilo rovnoměrné sušení. Během sušení se obsah vody sníží až na 6 %, přičemž boby ztratí asi 50 % své hmotnosti. Kakaové boby se mohou sušit též uměle v bubnových sušičkách, nebo jiných typech sušáren. Umělé sušení trvá asi 36 hodin za regulace teploty, ale jeho nevýhodou je finanční náročnost. Výsledkem těchto dvou procesů je změna barvy kakaových bobů v hnědou až hnědočervenou. Zároveň dochází ke zjemnění trpké a stahující chuti, pravděpodobně změnou složení tříslovin kakaových jader.

### **2.3.2 Přejímka a třídění kakaových bobů**

Kakaové boby jsou do továren na zpracování čokolády přiváženy v pytlích různými dopravními prostředky a mnohdy cestují i několik dní. Proto je přejímka kakaových bobů podstatnou součástí celého zpracování. Při přejímce se kontroluje zejména kvalita fermentace a přítomnost plísní, nebo kakaových molů. Kromě těchto vad mohou mít kakaová jádra ještě další vady jako znečištění cizími příměskami, zvlhnutí, nebo nepříjemný pach. Je-li v zásilce zjištěna přítomnost kakaového mola, nesmí být tato zásilka uskladněna společně s ostatními zásobami kakaových bobů a nesmí se dále zpracovávat. Jsou-li jádra nedostatečně fermentovaná, pak se nejčastěji namáčí do teplé vody a následně vysuší při teplotě 50 °C. Sklady pro uskladnění bobů nesmí přesáhnout 70 % relativní vlhkosti a musí být prostorná a snadno větratelná.

K čištění kakaových jader od příměsí se využívá čistících a třídících strojů. Tyto stroje jsou vybaveny různými kartáči a válcovými, hranolovými, nebo plochými síty. Z násypky putují kakaová jádra do kartáčovacího zařízení, kde se zbavují prachu, hlíny a dalších nečistot. Po projití kartáči jádra padají do malé šachty s nakloněnými přepážkami. Těmi proudí silný proud vzduchu odsávaný ventilátorem a strhuje prach a příměsi do prašné komory. V komoře se nečistoty usadí a jsou odvedeny šnekovým dopravníkem ze stroje.

Z přepážek putují kakaová jádra na síta o různých průměrech. Na nich se jádra rozdělí podle svých velikostí. Pro dobré pražení je nutné najednou pražit jádra přibližně stejných velikostí. Dále putují nad magnety, které strhávají případné kovové příměsi. Nakonec následuje kontrolní a přebírací pás, kde jednotliví pracovníci vybírají příměsi, které nebyly strojem odděleny. Velká jádra bývají zároveň i kvalitnější a proto bývají zpracovány na výrobu lepších druhů čokolád. Z těch menších se pak vyrábí běžné druhy čokolád a čokoládové polevy. [10]

### **2.3.3 Pražení**

Procesy zpracování kakaových semen (sklizeň, fermentace a sušení) jsou důležitými kroky pro zajištění vysoké kvality kakaových bobů. Nepražené kakaové boby mají kyselou, hořkou až trpkou chuť. Pražením jsou odstraněny těkavé látky a některé třísloviny, které v bobech



tvorí nepříjemný pach a chuť, např. kyselina citrónová. V nepražené kakaové drti kolísá obsah tříslovin od 3 do 4 %. Pražením se jejich obsah snižuje na 2–3 % (v sušině). Dalšími důležitými změnami jsou snížení vlhkosti, změna barvy a konzistence. Slupka kakaových jader se stává křehkou a lépe se pak odděluje od jádra. Taktéž kakaové jádro se stává křehkým. Vlhkost nepražených kakaových jader je v rozmezí 6–8 %, ale pražením se snižuje až na 2 %.

Požadované vlastnosti čokolády, jsou vytvářeny během pražení a to z prekurzorů vzniklých během fermentace. Mezi skupiny látek tvořící celkové aroma čokolády patří aldehydy a pyraziny. Tyto látky vznikají za vyšších teplot Maillardovou reakcí a Streckerovou degradací aminokyselin. Dalšími látkami jsou pak ethery, tiazoly, fenoly, ketony, alkoholy a estery.

Pražení probíhá v kontinuálních pražicích strojích. Kakaová jádra jsou přiváděna do násypky a odtamtud padají do pražicí nádoby, ve které jsou umístěna dvě protilehlá ramena. Ta promíchávají zrna, aby docházelo k rovnoměrnému pražení. Doba pražení se pohybuje v rozmezí 15–70 minut a teplota od 80 do 130 °C. Tyto parametry závisí na tom, jestli jsou pražená zrna použita k výrobě čokolády, nebo kakaového prášku. [10]

Pražení je možno provádět dvojím způsobem. Prvním a zároveň starším způsobem bylo, že se usušené kakaové boby pražily za daných podmínek vcelku a až po upražení a ochlazení byly drceny a jádra oddělena od kakaových slupek. Dnes je mnohem více využíván modernější způsob tzv. NARS z angl. překladu Nibs, Alcalising, Roasting and Sterilising. [11]

### 2.3.3.1 NARS

Tento proces pražení byl vynalezen v Německu společností G. W. Barth. Na počátku dochází k předpražení. Kakaové boby vstupují do mikronizéru, kde jsou po krátký čas zahřívány infračerveným zářením. V mikronizéru, jsou boby zbaveny nečistot a dojde k uvolnění slupky od jader. Během klasické fermentace, dochází ke značným ztrátám kakaového másla, které vlivem vysoké teploty pražení taje a přechází do kakaových slupek. Ty jsou po pražení odděleny. V procesu NARS dochází vlivem nižších teplot k částečnému oddělení slupek od jader. Kakaové máslo tak z velké části zůstane v jádrech kakaových bobů a jeho ztráty nejsou oproti klasickému způsobu pražení tak velké.

V dalším kroku jsou boby promíchány s roztokem uhličitanu draselného, který napomáhá utvářet zbarvení pražených bobů a další sensorické vlastnosti. Někteří výrobci čokolád preferují nealkalizované boby, neboť jsou toho názoru, že přidávání alkálie zhoršuje celkový vjem bobů. Avšak jiní výrobci jsou zcela opačného názoru. V procesu NARS je alkálie přidávána v době, kdy boby vstupují do pece. Směs je poté zahřívána, ale ne výše než na 100 °C a to po dobu deseti minut, během kterých dochází k absorpci alkálií a vytěkání některých nežádoucích látek. V této době je rovněž snižována vlhkost v kakaových bobech o 2–3 %. Odpaření vody z bobů napomáhá při jejich odslupkování. Následně jsou boby rozdrceny na tzv. nibsy, roztrženy na sítěch a odděleny od slupek pomocí proudu vzduchu. Rozdrcené a odslupkované kakaové boby jsou poté převedeny do pražicích strojů, kde jsou praženy po určitou dobu v rozmezí teplot 100–130 °C. Tyto podmínky jsou dané jednak druhem kakaových bobů a danou recepturou. [11]

### 2.3.4 Mletí kakaové drti

Kakaová drť je po upražení rozemleta na kakaovou hmotu. Značný vliv na jemnost mletí má vlhkost kakaové drti. Ta by neměla přesahovat 2 %. Čím nižší je obsah vlhkosti v kakaové drti, tím je drť křehčí, lépe se drolí při mletí, a dochází k jemnějšímu rozmělnění. Mletí probíhá v kakaových mlýnech, složených z několika válců, mezi kterými je drť postupně rozemílána. Při mletí dochází díky tření k ohřevu válců i kakaové drti. Proto jsou tyto válce uvnitř duté, aby jimi mohla proudit studená voda, která kakaovou drť ochlazuje. Drť je rozemílána, aby došlo k rozrušení buněčné tkáně a uvolnění celkového obsahu buněk včetně kakaového másla. Vzniklá kakaová hmota dosahuje teploty okolo 33 °C, při které taje kakaové máslo a díky tomu se kakaová hmota stává polotekutou. Polotekutá hmota stéká z válců do nádrže, na jejímž dně je umístěna hřídel s lopatkami, která promíchává kakaovou hmotu, aby nedošlo k usazování tuhé fáze.

Kakaová hmota je dále zpracovávána dvěma způsoby. První z nich je lisování kakaové hmoty, za účelem získání kakaového másla a kakaových pokrutin, které se dále zpracovávají na kakaový prášek. Druhým způsobem je mísení kakaové hmoty s dalšími příměsemi a následným zpracováním na finální čokoládové výrobky. [10]

### 2.3.5 Výroba kakaového prášku

Kakaový prášek se vyrábí lisováním kakaové hmoty. Kakaová hmota obsahuje až 55 % kakaového másla, které je třeba oddělit. Celý proces je naprogramován tak, aby získané kakaové pokrutiny obsahovaly stanovený obsah tuku. V továrnách se vyrábí dva typy kakaových prášků. Odtučněný, obsahující 10–12 % tuku a méně odtučněný s 20–22 % tuku. Lisování probíhá na hydraulických lisech pod tlakem 25–35 MPa. Aby došlo k uvolnění másla od pokrutin, zahřívá se kakaová hmota na vysokou teplotu. Čím vyšší je teplota kakaové hmoty, tím dochází k účinnějšímu lisování. Rozmezí teplot je od 70 do 90 °C. Při vyšších teplotách by bylo mletí rovněž účinné, ale takto vysoká teplota by již zhoršovala organoleptické vlastnosti kakaového prášku.

Kakaové pokrutiny jsou slisovány do tzv. kakaového koláče (Obr. 2.3). Ten je poté rozemílán na kakaový prášek a ochlazován proudem studeného vzduchu. Mnohdy kakaový prášek obsahuje ještě stopy kakaového másla, které musí být před balením prášku odstraněny. Separace těchto zbytků je prováděna v cyklónech.

Kakaový prášek je velice často obohacován dalšími přísadami, pro vytvoření požadovaných produktů. Nejčastějšími produkty jsou směsi pro přípravu horké čokolády. Tyto směsi jsou složeny z kakaového prášku, cukru, dalších dochucovadel a lecitinu. Lecitin funguje jako emulzifikátor, který vytváří vazby mezi tukem, kakaem a vodou při přípravě nápoje. Aby došlo k dobrému propojení vazeb, je lecitin do směsi přidáván již při drcení kakaového koláče. Tím tvoří nápoj celistvější a lahodnější. Čistý kakaový prášek je převážně používán jako surovina pro výrobu čokoládových cukrovinek. [12]



*Obrázek 2.3: Kakaový koláč [13]*

### **2.3.6 Výroba čokoládové hmoty**

Čokoládová hmota vzniká smísením tekuté kakaové hmoty spolu s ostatními přísadami dle patřičných receptur. Velké množství čokoládoven se nezabývá zpracováním a výrobou kakaové hmoty, ale kupuje ji již hotovou a tu pak zpracují na čokoládovou hmotu, která má pastovitou konzistenci. Pro mnohé výrobce je to jednak levnější a při velkovýrobě také jednodušší na zpracování.

Nejčastějšími přísadami hmoty jsou lecitin, cukr, kakaové máslo případně jeho náhražky, vanilka a sušené mléko. Váhové poměry jednotlivých příměsí závisí na druhu čokolády a konkrétní receptuře. Z fyzikálního hlediska je čokoládová hmota suspenzí kakaového másla, v níž jsou dispergovány hrubé částice. Pro jemnou a zcela homogenní čokoládu je důležité, aby velikost částic byla co nejmenší, v průměru 20 až 30  $\mu\text{m}$ . Proto po dokonalém promísení následují kroky, vedoucí ke zjemnění čokolády a její homogenizaci. Prvním z nich je válcování na válcovacích stolicích. Nejčastěji jsou využívány pětiválcové stolice ve vertikálním uspořádání. Válce o délce až 2,5 m a průměru 40 cm jsou vyrobeny z nerezové oceli. Třením mezi válci a hmotou dochází k postupnému ohřevu hmoty, a proto je hmota chlazená studenou vodou, protékající skrz duté válce. Teplotu hmoty je třeba udržovat v rozmezí 32–35 °C. Díky úzkým rozmezím mezi jednotlivými válci a chlazení hmoty, dochází k postupnému zjemňování hmoty. Díky tomu částice zvětšují svůj měrný povrch natolik, že jej množství kakaového másla nestačí pokrýt. Pevné částice k sobě již tak nepřilínají a hmota se tak přemění ve velmi jemný prášek. [10] [12]

### **2.3.7 Konšování**

Konšování je dalším krokem vedoucím ke zjemnění čokolády. Tento proces vynalezl roku 1878 Rudolph Lindt ze Švýcarska. Konšování výrazně ovlivňuje strukturu a organoleptické vlastnosti čokolády. Nejčastějším typem jsou takzvané rotační konše. Ty mají válcový tvar s dvojitými stěnami, kterými proudí teplá voda a jemně ohřívá čokoládovou hmotu. Uvnitř konše jsou vybaveny velkými lopatkami, které po několik hodin čokoládu řádně promíchávají. Celý proces probíhá ve třech fázích. První je suché konšování, kdy je sypká

hmota dokonale promíchávána a zahřívána. Hmota se tak stává tekutou a díky dobrému provzdušňování se zároveň snižuje vlhkost. Druhou fází je tekuté konšování, ve které se přidává cukr a kakaové máslo. V této fázi se nejvíce vyvíjí sensorické vlastnosti čokolády. Třetí fází je homogenizace, ve které se stává čokoláda jednotvárnou, lesklou a má ideální tekutost pro další zpracování. Teplota během konšování je dána konkrétním druhem čokolády. Při výrobě hořké čokolády se teplota pohybuje v rozmezí od 65 do 90 °C, kdežto u mléčné čokolády to je jen 40 až 60 °C, protože vyšší teploty by u mléčné čokolády mohly nepříznivě ovlivnit strukturu a pevnost tabulkové čokolády. Doba konšování trvá v závislosti na předchozím zpracování několik hodin až dní. [10] [12]

Těmito postupy popsanými v předchozích kapitolách vyrábí čokolády většina závodů. Avšak v dnešní době se rozrůstají menší čokoládovny, jako je například čokoládovna Jordis, s.r.o. v Hradci Králové, které vyrábí čokoládu trochu odlišnějšími kroky. Tyto menší podniky si nenechávají dovážet již upražené a nadrcené kakaové boby nebo kakaovou hmotu, ale připravují si vše sami. Nechají si dovážet pouze fermentované boby, které si sami opraží, zbaví slupek a nadrtí. Další kroky zpracování čokolády pak již probíhají v jediném stroji zvaném melanžér. Tato zařízení byla dříve využívána ve většině podniků, ale s rostoucí poptávkou se od nich odstupovalo a byly nahrazeny různými typy lisů a míchacích zařízení, které dokázaly pojmout větší množství surovin. Melanžér je složen z otáčivé mísy, upevněné na svislém hřídeli a dvěma masivními válcovými běhouny upevněnými nad mísou. Běhouny se mohou najednou nejen otáčet ale i pohybovat nahoru a dolů. Neustálým třením pak dochází k velmi jemnému rozdrčení bobů a postupně přeměně na čokoládovou hmotu (Obr. 2.4). Dle daného receptu se postupně upravuje teplota směsi a jsou přidány další příměsi. Asi po třech dnech je proces u konce a vzniká homogenní čokoládová hmota, připravená k dalšímu zpracování (Obr. 2.5). [10] [14]



*Obrázek 2.4: Melanžér [15]*



*Obrázek 2.5: Melanžér– konec procesu [16]*

### **2.3.8 Temperování**

Kvalitně zpracovaná čokoláda má ve finální podobě jemnou rozplývavou chuť, tvrdou konzistenci, lasturovitý lom a lesklý povrch. Nesprávná temperace a chlazení mohou vést k nežádoucím tukovým výkvětům a jiným sensorickým vadám. Během temperace dochází k postupnému vzniku stabilních zárodků krystalů kakaového másla. Na začátku je čokoláda přivedena z konše do temperovacího zařízení a zahřána na teplotu 45–50 °C. Při takovéto teplotě dojde k dokonalému rozpuštění všech krystalů čokoládové hmoty včetně kakaového másla. V dalším kroku dochází k ochlazení na teplotu okolo 26 °C, kdy vykristalují stabilní i nestabilní formy kakaového másla. Posledním krokem temperace je opětovné zahřátí na teplotu 30–32 °C, čímž dojde k odstranění nestabilních forem krystalů kakaového másla. Aby docházelo k rovnoměrnému ohřívání i chlazení čokolády v celém objemu, je směs po celou dobu promíchávána. Počet vytvořených krystalů v čokoládě musí být přiměřený. Příliš malý podíl má za následek špatný lesk a prodlužuje dobu tuhnutí čokolády při konečném chlazení. Naopak příliš velký počet krystalických zárodků zvyšuje viskozitu hmoty a zhoršuje její skladovatelnost.

Výše popsany způsob temperace není zdaleka jediným způsobem, jak správně temperovat čokoládu. Opět jako u jiných procesů i zde závisí na typu a složení čokolády. Někteří výrobci například temperují čokoládu až po jejím nalití do forem. [10]

### **2.3.9 Formování a balení**

Po temperaci je čokoláda naplněna do příslušných forem s hladkým povrchem, aby se dosáhlo hladkého povrchu a snazšího vyklepávání. Tyto formy se před plněním předehřívají na stejnou teplotu, jakou má hotová čokoláda, aby se zabránilo předčasné krystalizaci a tuhnutí. Naplněné formy pak putují po vibračních pásech, díky čemuž se čokoláda rozprostře rovnoměrně do všech částí formy a díky vibracím se vypudí vzduchové bublinky. Nejčastěji používanou formou jsou tabulky. Nejsou výhodou jen z hlediska snadného skladování a



přepravy, ale také při konečné fázi výroby. Díky svému typickému tvaru umožní rychlé a rovnoměrné tuhnutí čokolády v celé tabulce.

Jakmile je čokoláda naformována, putuje do chladících skříní. Na správném chlazení závisí konzistence čokolády i její odolnost vůči cukerným a tukovým výkvětům. Na počátku se teplota chlazení pohybuje okolo 16 °C. Dochází k postupnému ochlazování a tvorbě dalších krystalů. V další fázi se teplota snižuje na 3–10 °C, při které krystaluje zbytek kakaového másla. V konečné fázi se teplota chlazení o trochu zvýší, aby bylo možné čokoládu snadno vyklepnout z formy. Snadné vyklepávání z forem umožňuje také samotné kakaové máslo, neboť při jeho krystalizaci zmenšuje svůj objem. Na závěr se hotová čokoláda už jen balí a expeduje. [12]

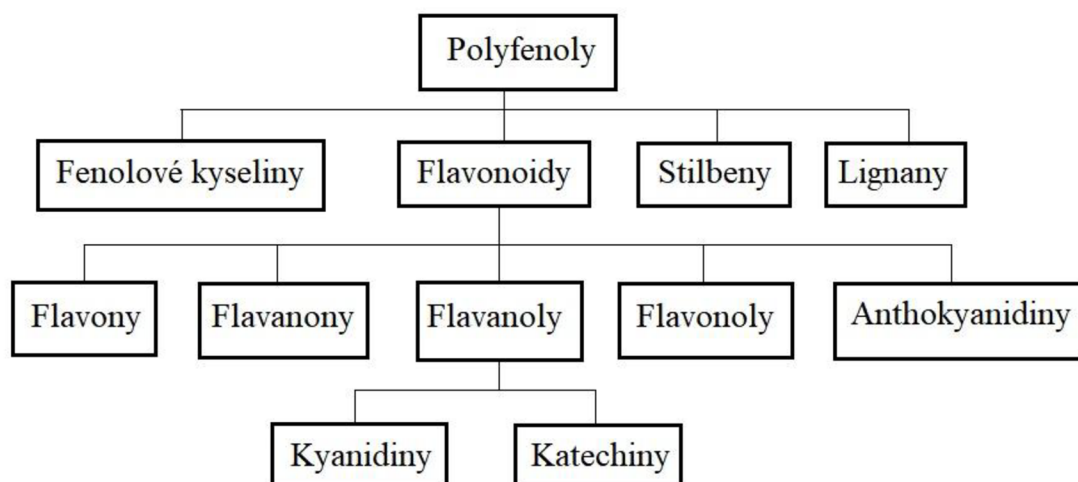
## **2.4 Bioaktivní látky kakaa a čokolády**

Bioaktivní látky jsou sloučeniny přirozeně se vyskytující v potravinách. Jsou obsaženy v ovoci, zelenině, některých druzích koření, cereáliích a kakaových bobech. Tyto látky dokážou díky vysokému účinku stimulovat lidský metabolismus natolik, aby byl lidský organismus schopen předcházet různým nemocem, jako například rakovina, nebo jiným nežádoucím vlivům na lidské zdraví. Existuje nejméně 14 druhů těchto látek, které preventivně působí proti rakovině. Mnoho dalších z nich má protizánětlivé a antioxidační účinky, nebo poskytují ochranu před kardiovaskulárními chorobami. Mezi bioaktivní látky patří karotenoidy, polyfenoly, glukosinoláty, monoterpeny a některé sulfidy.

### **2.4.1 Polyfenoly**

Polyfenolické sloučeniny se dělí na skupiny zejména podle struktury na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany a jejich podskupiny (Obr. 2.6). Tyto sloučeniny jsou produkovány rostlinami jako sekundární metabolity sloužící k ochraně rostlin před vnějšími vlivy, jako je ultrafialové záření, k získání živin, nebo jako obrana před napadením cizími škůdci, zejména patogenními mikroorganismy.

Kakao je velmi bohatým zdrojem polyfenolických sloučenin a jejich obsah se může pohybovat okolo 10–12 % v sušině. Nejvíce zastoupenou skupinou v kakau jsou flavonoidy, z nichž převažují zejména monomery epikatechinu, katechinu. V nefermentovaných bobech převažují katechiny a antokyany, které dávají kakau jeho charakteristickou barvu. Antokyany jsou během fermentace přeměněny na chinoidní sloučeniny, které utváří po pražení hnědé zbarvení. Další skupinou látek zastoupených v kakau jsou prokyanidiny. Tyto sloučeniny vznikají po fermentaci kondenzačními reakcemi flavanolů. [17]



**Obrázek 2.6:** Rozdělení polyfenolů (upraveno dle [17])

Některé polyfenolické sloučeniny jsou zastoupeny v kakau pouze minoritně, ale podílí se značným způsobem na utváření organoleptických vlastností kakaa a čokolády. Kromě tohoto aspektu mají polyfenoly obsažené v kakau ještě další využití a to zejména ve výživě, zdraví a kosmetice. Je vědecky prokázáno, že každodenní příjem polyfenolů podporuje činnost lidského organismu a předchází vzniku různých onemocnění. Velmi důležitou vlastností polyfenolů jsou jejich antioxidační účinky. Díky jejich schopnosti pozastavit oxidační reakce v potravinářských produktech prodlužují dobu jejich trvanlivosti. Nadměrná produkce volných radikálů v lidském organismu vyvolává oxidační stres, který je spojen s řadou kardiovaskulárních onemocnění jako je hypertenze a vysoká hladina LDL cholesterolu. Polyfenoly s antioxidačními účinky napomáhají vychytat tyto volné radikály a snížit hladinu LDL cholesterolu. Flavanoly se vyskytují jak v kakau, tak v kakaovém másle. Mají příznivý vliv na cévní systém, snižují riziko kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění a při pravidelném příjmu poskytuje ochranu proti UV-záření. Dále působí příznivě na lidskou pokožku. Zlepšuje její prokrvení a také strukturu. [17] [18]

## 2.4.2 Methylxantiny

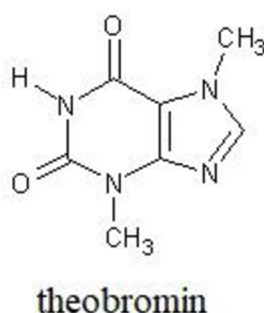
Methylxantiny jsou purinové alkaloidy odvozené od purinu, respektive od produktu jeho oxidace xantinu. Jsou nejrozšířenějšími alkaloidy v potravinách a ve vyšších koncentracích se nachází v čaji, kávě a čokoládě. Nejznámějšími jsou kofein, theobromin a theofylin. Nejvíce kofeinu lze najít právě v kávě, naopak v čokoládě se vyskytuje ve velmi malém množství. Theobromin dominuje v čokoládě a theofylin v čaji. Do jisté míry mají methylxantiny stimulační účinky, ale ve vysokých dávkách mohou u některých jedinců zvýšit srdeční frekvenci a sekreci žaludečních kyselin. Methylxantiny jsou s výjimkou fermentací čajů a kakaových bobů stabilní sloučeniny. Theofylin je využíván při některých respiračních nemocech, jako je zánětlivé onemocnění průdušek. [19]

### 2.4.2.1 Theobromin

Theobromin, chemickým názvem, 3,7-dimethylxanthin (Obr. 2.7), je hořký alkaloid kakaovníku, a jeho název je odvozen od slova *Theobroma* (kakaovník). Je to krystalický prášek, bílé barvy a je nerozpustný ve vodě a rozpustný v tucích. Dříve byl podáván při cévních chorobách nebo ateroskleróze. Dnes se využívá v medicíně jako diuretikum a k rozšíření cév. Theobromin způsobuje mírnou akutní toxicitu u řady živočichů (Tab. 2.2). [20]

**Tabulka 2.2:** Fyzikálně-chemické vlastnosti teobrominu [21]

Název	3,7-dimethylxanthin
CAS	86-67-0
Teplota tání	352 °C
Hustota (20 °C)	1,5 g/cm <sup>3</sup>
Rozpustnost (20 °C)	0,5 g/l
LD50	1265 mg/kg



**Obrázek 2.7:** Strukturální vzorec teobrominu [22]

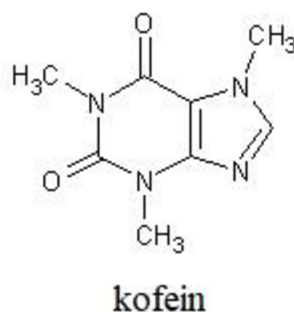
### 2.4.2.2 Kofein

Kofein je nejrozšířenější purinový alkaloid s chemickým vzorcem 1,3,7-trimethylxanthin (Obr. 2.8). Nachází se zejména v kávových zrnech, čaji a kakaových bobech. Při pražení kávy se obsah kofeinu téměř nemění. Průměrný obsah kofeinu v šálku kávy je asi 80 mg a v čokoládových nápojích se pohybuje v rozmezí 260–440 mg·dm<sup>-3</sup>. Obsah kofeinu v čokoládách je většinou menší než 0,5 %. Je to krystalický bílý prášek s dobrou rozpustností ve vodě (Tab. 2.3). Kofein je často doprovázen ostatními methylxantiny, díky čemuž se z kávy vstřebává rychleji, nežli z čaje. Zato jeho účinek trvá kratší dobu oproti účinku v čaji. Rovněž jako teobromin i kofein stimuluje centrální nervový systém a odvodňuje organismus. [20] [22]



**Tabulka 2.3:** Fyzikálně--chemické vlastnosti kofeinu [23]

Název	1,3,7-trimethylxanthin
CAS	58-08-2
Teplota tání	235–239 °C
Hustota (20 °C)	1,23 g/cm <sup>3</sup>
Rozpustnost (20 °C)	20 g/l
LD50	261 mg/kg



**Obrázek 2.8:** Strukturní vzorec kofeinu [22]

## 2.5 Autenticita potravin

Pod pojmem autenticita potravin se rozumí pravost, hodnověrnost nebo původnost. Jednotlivé úřady pro kontrolu potravin svádí neustálý boj s nepoctivými výrobci, kteří dokážou brzy po zavedení výrobních postupů přijít na takový způsob falšování, který není stávajícími metodami zjistitelný. Je to boj ve zdokonalování a vyvíjení nových metod pro hodnocení autenticity s novými nebo stálými způsoby falšování. Potravinářský průmysl není jediné odvětví, které se v dnešní době setkává s těmito problémy. K falsifikaci dochází i u dalších produktů lidské činnosti, a to zejména šperky, umělecká díla, listiny nebo peníze.

S falšováním potravin se lidstvo setkává od doby, kdy začaly být vyráběny za účelem prodeje. S postupy falšování se začínaly postupně vyvíjet i metody pro jejich detekci. Za zakladatele postupů detekce nekvalitních potravin je považován německý chemik Fridrich Accum. V roce 1820 publikoval pojednání o falšování potravin a kulinářských otravách. Jeho dílo se rozšířilo po celé Evropě a o několik let později na něj navázal britský lékař a chemik Arthur Hill Hassal, který se proslavil v oblasti bezpečnosti potravin a veřejného zdraví. [24]

### 2.5.1 Legislativa

Potravinová legislativa označuje široké spektrum právních předpisů pojednávajících o potravinách ze všech možných hledisek. Patří sem předpisy regulující kvalitu potravin, ochranu zdraví lidí, do níž patří veškeré hygienické předpisy nebo prostředky na ochranu

rostlin. Dále zde spadají předpisy na ochranu životního prostředí a hospodářské a finanční záležitosti. [25]

Legislativní požadavky a obecné faktory ovlivňující autenticitu potravin stanovuje zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., dále jen zákon o potravinách a evropský předpis potravinového práva – nařízení č. 178/2002 ES. Účelem zákonu o potravinách je stanovit povinnosti podnikatelů při výrobě potravin a tabákových výrobků, jejich uvádění do oběhu a upravit státní dozor nad dodržováním povinností vyplývajících z tohoto zákona. Ačkoli tyto dokumenty nedefinují pojem „falšování“ nebo „falšovaná potravina“, zakazují uvádět do oběhu potraviny klamavě označené nebo uvádějící spotřebitele v omyl. Požadavky na složení potravin jsou definovány ve vyhláškách náležících k zákonu o potravinách.

Specifickým případem klamání spotřebitele je nedodržování požadavků týkajících se označování zdůrazněných složek, které jsou označovány jako QUID pravidla. Tyto požadavky zahrnuje směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, která je v české legislativě implementována prostřednictvím vyhlášky č. 113/2005 Sb. Tato vyhláška stanovuje, že množství složky v objemových nebo hmotnostních procentech (popř. v g/100 g nebo v ml/100 ml potraviny) musí být uvedeno na obalu v blízkosti názvu nebo u příslušné složky. [26] [27]

#### **2.5.1.1 Legislativa kakaových a čokoládových cukrovinek**

V rámci Evropské unie platí pro kakao, čokolády a čokoládové cukrovinky směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/36/ES o kakaových a čokoládových výrobcích určených k lidské spotřebě. V České republice tuto legislativu představuje vyhláška ministerstva zemědělství č. 76/2003 Sb, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Oba tyto předpisy definují veškeré členění a rovněž se zabývají označováním na obalech a požadavky na jakost (Tab. 2.4). Tato vyhláška definuje čokoládu, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem. [28]

- *„Čokoláda (hořká čokoláda) – potravina vyrobená z kakaových součástí, přírodních sladidel, sladidel nebo jejich kombinací (dále jen "sladidel"), přídatných látek nebo látek určených k aromatizaci, popřípadě z dalších složek.*
- *Mléčná čokoláda – potravina vyrobená z kakaových součástí, sladidel, mléka nebo mléčných výrobků, popřípadě z dalších složek.*
- *Bílá čokoláda – potravina vyrobená z kakaového másla, mléka nebo mléčných výrobků, sladidel, popřípadě z dalších složek.*
- *Family mléčná čokoláda – potravina vyrobená z nižšího podílu kakaových součástí, sladidel a vyššího podílu mléka nebo mléčných výrobků, a která vyhovuje stanoveným požadavkům.*
- *Kakaovými boby – fermentovaná a sušená semena kakaovníku (Theobroma cacao L.).*
- *Kakaovým tukem – tuk získaný z kakaových bobů nebo jejich částí nevyhovující požadavkům stanoveným pro kakaové máslo.*
- *Kakaovým máslem – tuk získaný z kakaových bobů nebo jejich částí odpovídající požadavkům,*

- **Kakaovým práškem (kakaem)** – potravina získaná z pražených kakaových bobů zbavených slupek, upravených do formy prášku, obsahující nejméně 20 % kakaového másla v sušině a nejvýše 9 % vody,
- **Směsí kaka a s cukrem** – potravina získaná mechanickým smísením nebo instantizací kaka a s cukrem v určitém poměru,
- **Čokoládou v prášku** – potravina vyrobená ze směsi kaka a cukrů obsahující nejméně 32 % kaka a,
- **Čokoládou k přípravě nápoje, slazeným kakaem, slazeným kakaovým práškem** – potraviny vyrobené ze směsi kaka a cukrů obsahující nejméně 25 % kaka a“. [28]

**Tabulka 2.4:** Minimální hodnoty požadavků na jakost čokolád (% hm. vztažených na sušinu) [28]

Druh	Obsah kakaového másla	Obsah tukuprosté kakaové sušiny	Obsah celkové kakaové sušiny	Obsah mléčného tuku	Obsah celkového tuku *)	Obsah mléčné sušiny
<b>Hořká čokoláda</b>	18	14	35	-	-	-
<b>Mléčná čokoláda</b>	-	2,5	25	3,5	25	14
<b>Bílá čokoláda</b>	20	-	-	3,5	-	14
<b>Family mléčná čokoláda</b>	-	2,5	20	5	25	20

\*) Obsah celkového tuku – součet obsahu kakaového másla a mléčného tuku

### 2.5.2 Způsoby falšování

Falšování potravin je motivováno zejména ekonomikou. Mnohé případy falšování vycházejí ze změn legislativy, růstu cen a obtížné dostupnosti surovin. Proto jsou nejčastěji falšovanými komoditami drahé potraviny jako např. lihoviny, med a koření. Další skupinou jsou potraviny, které jsou produkovány ve velkých objemech, kdy se výrobci snaží dosáhnout co největšího zisku za nejmenší možné náklady. Jedná se zejména o oleje a tuky, maso, mléčné výrobky a ovocné šťávy a pomazánky. Způsobů jak falzifikovat potraviny je mnoho. Může se jednat o záměnu potraviny levnější surovinou, nastavování potravin levnějšími složkami, nesprávně deklarované údaje o výrobku nebo použití jiné než deklarované technologie. Například v případě olejů se může jednat o lisování za studena oproti rafinaci. Dalšími způsoby jsou nesprávné uvádění obsahů složek, nastavování potravin ke zlepšení jejich organoleptických vlastností a mnoho dalších (Tab. 2.5).

Ve většině případů falšování se jedná zejména o šizení zákazníka, kdy spotřebitel nedostane za své peníze produkt požadované kvality a vlastností, avšak přímo nijak neohrožuje zdraví zákazníka. Bohužel i tyto případy, kdy došlo k vážnému poškození zdraví u lidí, byly v minulých letech objeveny a prokázány. Jednalo se například o přítomnost rozemletých cihel v paprice, nebo snížení obsahu mléka v mléčných kojeneckých výživách. Dalšími vážnými případy byla kauza s rakouským vínem, kdy byl ve víně zjištěn přídavek

toxického diethylenglykolu a také velmi známá methanolová kauza z roku 2012, při níž byl jasně prokázán značný přídavek methanolu do lihovin. Tento případ si vyžádal několik osob s doživotními zdravotními následky a bohužel i několik zesnulých. [24] [26]

**Tabulka 2.5:** Hlavní způsoby falšování potravin [24]

Kategorie	Příklady
Záměna potraviny za jinou levnější	Vydávání jiných rostlinných olejů za olivový
Nastavování potraviny levnější složkou	Snížení obsahu kakaového másla v čokoládě přídavkem jiných olejů
	Ředění mléka vodou
Přítomnost nedeklarovaných složek	Nedeklarované použití vnitřností v masných výrobcích
Falšování potravin ke zlepšení jejich vlastností	Nedovolená aromatizace vín
Nedodržení deklarovaného technologického postupu	Deklarování rozpékaného pečiva jako čerstvého
Uvádění nepravdivého obsahu složky	Etikety neodpovídají skutečnému složení

### 2.5.2.1 Falšování kaka a čokolády

Kakaové boby nejsou pěstovány jen pro výrobu kaka a čokolády, ale také pro kosmetické a farmaceutické účely. Jednou z hlavních příčin falšování kaka je jeho vysoká cena, což způsobuje zvyšování cen u výrobků, pro něž je kakao hlavní surovinou. Jedním ze způsobů falšování čokoládových výrobků je snižování tukuprosté kakaové sušiny (TKS). Kakaová sušina je obsah kakaových částí bez veškerého tuku a vlhkosti. Množství TKS je odvozeno od celkového množství methylxantinů, theobrominu a kofeinu, v použitých surovinách. Obsahy těchto látek v kakaových bobech jsou ovlivněny různými faktory. Jedním z nich je původ kakaovníku. Je známo, že kakaové boby z Jižní Ameriky obsahují více kofeinu a méně theobrominu než kakaové boby pěstované v Africe. Dalším rozdílem je zralost bobů, neboť v každém plodu je jiná koncentrace uvnitř semen a v obalových částech.

Dalším způsobem falšování v případě čokolád je přídavek náhražek kakaového másla (CBE). Ty jsou sice legislativně povoleny, ale jsou přesně definovány a povolený přídavek těchto náhražek činí maximálně 5 %. Zároveň však nesmí být sníženy podíly kakaového másla v čokoládě a celkové kakaové sušiny. O falšování se jedná tehdy, je-li přídavek těchto náhražek větší než 5%, při nedeklarování CBE na obalech výrobků, nebo při využití jiných rostlinných tuků, než je v legislativě uvedeno.

Nejen čokolády ale také kakao bývá předmětem falšování a to zejména přídavkem nežádoucích složek jako cukr, skořápky lískových ořechů, škrob a v neposlední řadě nahrazování kakaové sušiny slupkami kakaových bobů. Ty mohou být přidány jednak cíleně, avšak jejich přítomnost může značit také špatný technologický postup při zpracování kakaových bobů. [26]

Detekce falšování kakaových a čokoládových výrobků není vůbec snadná. Vyžaduje znalosti o surovinách, složení a zpracování výrobku. Pro posouzení kakaa a čokolád byla vyvinuta řada postupů a metod. Uplatnění zde nachází především moderní instrumentální techniky jako plynová a kapalinová chromatografie a infračervená spektroskopie. Detekce TKS se nejčastěji provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovením obsahu teobrominu a kofeinu. Pro stanovení celkové kakaové sušiny je nutné znát nejen množství TKS, ale také množství kakaového másla v daném výrobku. Kakaové máslo se stanovuje poměrně obtížně, avšak u výrobků obsahujících jako jediný významný zdroj tuku kakao, lze namísto obsahu kakaového másla použít pro výpočet celkové kakaové sušiny celkový obsah tuku. Toto stanovení je prováděno extrakční metodou. Stanovení TKS nebo celkové kakaové sušiny je v české legislativě popsáno v české technické normě (ČSN 56 0578). V této normě je popsáno celkové provedení a vyhodnocení celé analýzy. [29]

### **2.5.3 Dozorové orgány pro kontrolu autenticity potravin**

Aby bylo možné předcházet proniknutí nekvalitních potravin do oběhu nebo co nejdříve odhalit jakýmkoli způsobem falšované potraviny, je třeba provádět kontroly potravin od jejich výroby až po prodej spotřebiteli. Tyto úřední kontroly jsou prováděny příslušnými orgány spadající pod Ministerstvo zemědělství a Ministerstvo zdravotnictví. Cílem těchto orgánů je ověření, zda jsou dodržována pravidla, jejichž cílem je předcházení rizik, která by mohla jakkoli ohrozit člověka nebo zvířata a zaručit poctivé jednání v obchodu s potravinami a chránit zájmy spotřebitelů. Mezi tyto orgány patří Státní veterinární správa (SVS), Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ), Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) a krajské hygienické stanice (KHS). [30]

Státní zemědělská potravinářská inspekce kontroluje v rámci svých pravomocí potraviny, zemědělské výroby a tabákové výrobky. Převážně vychází ze zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, nebo zákona 146/2002 Sb., o SZPI. Kontroly SZPI se zaměřují na komodity nebo místa, kde je předpoklad největších nedostatků, nebo kde lze očekávat největší efekt kontroly. Cílem kontroly je ochrana konzumentů před nebezpečnými potravinami, nesprávně označenými nebo neznámého původu. Při kontrolách odebírají inspektoři SZPI vzorky z jednotlivých šarží výrobků. Následně jsou pak provedeny mikrobiologické zkoušky, testy na obsah cizorodých látek, senzorické a analytické rozbory.

Státní veterinární správa provádí dozor při zpracování, přepravě, vývozu nebo dovozu surovin a potravin živočišného původu. Provádí jejich kontroly zejména při prodeji na tržištích, v prodejnách potravin a při dovozu potravin z jiných států Evropské unie. SVS se řídí zákonem č. 166/199 Sb., který popisuje činnost úřadu SVS. Státní veterinární správa získává a vyhodnocuje poznatky o podezření z výskytu a výskytu nálezů a nemocí, která mohou být přenosná ze zvířat na člověka a přijímá patřičná opatření ke zdoání těchto nálezů a nemocí. [31] [32]

### **2.5.4 Metody pro kontrolu autenticity potravin**

Kontroly autenticity potravin jsou prováděny různými metodami. Jejich výběr závisí na dostupnosti analýzy, časové a finanční náročnosti a také na konkrétní potravine a jejich vlastnostech. V dnešní době je rychlý vývoj metod pro autenticitu a falšování velice důležitý,

neboť s navyšujícím se množstvím potravinářských produktů a růstu konkurence na trhu se rozvíjí i způsoby falšování potravin. K detekci falšování se využívají zejména spektrometrické, chromatografické (HPLC), imunochemické, elektrochemické metody, metody založené na analýze DNA, elektrochemické (PCR) a izotopová analýza. [24]

Kromě bezpečnosti a nezávadnosti potravin se sleduje také jejich senzoričká hodnota. Senzoričkou analýzu provádí panel vyškolených senzoričkých hodnotitelů, kteří nezávisle na sobě posuzují vzhled, aroma, chuť a texturu daného produktu. [33]

Analýza stabilních izotopů je metoda umožňující identifikaci vzorku na základě geografického původu daných surovin pomocí analýzy poměrů izotopů jednotlivých prvků (H, O, N a C). Poměr izotopů uhlíku je závislý na metabolickém procesu rostlin a jejich způsobu využívání vzdušného oxidu uhličitého. Další z používaných metod je analýza restriččních fragmentů, která je provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Výsledkem je namnožení určitého úseku DNA, jehož fragmenty jsou následně separovány gelovou elektroforézou a porovnávají se k velikostním standardům o známém složení. [34]

#### **2.5.4.1 Spektrometrické metody**

Spektrometrické metody poskytují rychlou analýzu, nevyžadují náročnou úpravu vzorku, vysoké náklady a v rámci jediné analýzy dokážou poskytnout mnoho informací o dané potravine. Jsou to rychlé metody nedestruktivního i destruktivního typu a šetrné k životnímu prostředí. Mezi spektrometrické metody používané pro kontrolu autenticity potravin se řadí UV-Vis spektrofotometrie, fluorescenční spektrometrie, infračervená spektrometrie (IR), nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). [35]

Infračervená spektrometrie poskytuje spektra v rozsahu vlnových délek od 700 nm do 1 mm. Tato technika nachází uplatnění zejména při analýze mléčných a obilných výrobků, dále pak masných výrobků a olivových olejů, dokáže určit zralost ovoce a zeleniny a také je využívána ke kontrole autenticity čokoládových výrobků.

Nukleární magnetická rezonance je analytická metoda, která na základě interakcí atomových jader s magnetickým polem poskytuje informace o struktuře a složení dané látky. Tato metoda se kromě potravinářství využívá také v medicíne, chemii, biologii a fyzice.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda založená na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. Hmotnostní spektrometrií lze identifikovat jednotlivé struktury v závislosti na typu ionizace. Jako iontový zdroj je velmi často využíváno indukčně vázané plazma (ICP). Rozvoj hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů (IR-MS) a místně specifické frakcionace přirozených izotopů (SNIF-NMR) umožnily autentizaci vín, odhalení jejich ředění vodou, autentizaci medu, rozlišení kvasného a syntetického lihu a rozlišení kvasného a syntetického octa. [36] [37]

## **2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Chromatografie patří mezi separační metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci separovaných látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. V kapalinové chromatografii, je mobilní fází kapalina a stacionární fází je tuhá látka. Jedním z nejčastějších uspořádání kapalinové chromatografie je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého

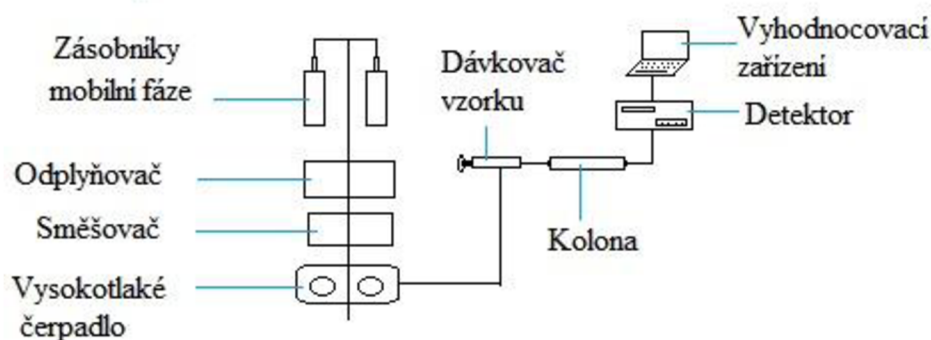
tlaku. Mobilní fáze protéká spolu s analytem skrz kolonu s ukotvenou stacionární fází a distribuci mezi fázemi umožňuje fázové rozhraní. Při analýze dochází k opakovanému ustalování rovnováhy separovaných látek mezi fázemi. Distribuci složek mezi fázemi popisuje distribuční konstanta, což je podíl koncentrací složek ve stacionární a mobilní fázi. Čím je hodnota distribuční konstanty vyšší, tím déle pak analyty setrvávají ve stacionární fázi a prodlužuje se jejich retence. Separace a eluce analytů je ovlivněna povahou obou fází. Při izokratické eluci má mobilní fáze stejné složení po celou dobu analýzy. U gradientové eluce je složení mobilní fáze programově měněno ve prospěch silnější eluční složky. Gradientová eluce nachází uplatnění, mají-li složky ve směsi výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány při průchodu detektorem a signál je převeden do výsledného záznamu zvaný chromatogram. [38]

### 2.6.1 Chromatografické systémy

Při analýze pomocí HPLC máme na výběr ze dvou chromatografických systémů. Prvním z nich je separace na normálních fázích (NP-HPLC) a druhým z nich je systém na reverzních fázích (RP-HPLC). V systému NP-HPLC má stacionární fáze polární charakter. Nejčastěji se jedná o silikagel s navázanými polárními skupinami. Mobilní fáze je nepolární, nebo musí mít oproti stacionární fázi mnohem nižší polaritu. Jako mobilní fáze se v tomto případě používají rozpouštědla hexan, dichlormethan nebo tetrahydrofuran. V RP-HPLC systému se jako mobilní fáze používají dlouhé alkylové řetězce (C18-C30), C18 oktadecylsilikagel je nejčastější. Mobilními fázemi jsou polární rozpouštědla, jako acetonitril a methanol, která se v určitých poměrech mísí s vodou. [39]

### 2.6.2 Instrumentace v HPLC

Při gradientové eluci je mobilní fáze přiváděna přes odplyňovač do směšovače, kde je smíchána s vodou v předem nastavených koncentracích. Mobilní fáze musí být řádně odplyněna, aby při změně tlaku nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů. Odplyněním se eliminují i některé další problémy jako například neopakovatelnost retenčních časů, nebo nestabilita provozu čerpadel. Dále je mobilní fáze vedena přes dávkovač vzorku a spolu s analytem prochází skrz kolonu a nakonec do detektoru (Obr. 2.9). [38]



Obrázek 2.9: Schéma instrumentace HPLC [38]



### 2.6.3 Čerpadla

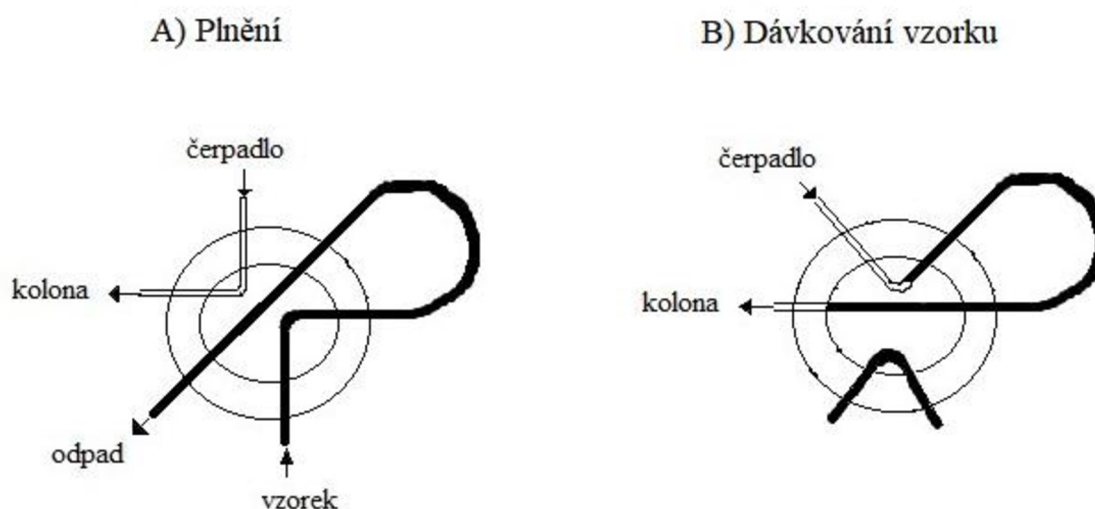
V HPLC se používají různá vysokotlaká čerpadla, na která jsou kladeny vysoké požadavky. Pro jejich konstrukci se využívají antikoroziční materiály jako titan, nerezová ocel nebo keramika. Důležitými požadavky jsou široká rozmezí výstupních tlaků (1–100 MPa), malý vnitřní objem čerpadel, aby byla umožněna rychlá výměna mobilní fáze a změna stabilního průtoku mobilní fáze (0,1–10 ml/min)

Čerpadla pracují na principu vytlačování mobilní fáze ze zásobníku pístem nebo membránou a mohou se dělit do dvou skupin. První skupinou jsou čerpadla pracující při konstantním tlaku. Ty využívají k pohybu pístu čerpadla tlak plynu nebo hydraulické kapaliny. Druhou skupinou jsou čerpadla s konstantním objemovým průtokem. Ta využívají k pohybu pístu mechanický pohon.

### 2.6.4 Dávkování vzorku

Pro dávkování vzorku se v kapalinové chromatografii používají manuální smyčkové dávkovače nebo automatické dávkovače tzv. autosamplery. Vzorky pro analýzu jsou umístěny v mikronádobkách (vialky). Ty jsou zhotoveny z čirého nebo tmavého skla a jsou uzavřeny perforovanou zátkou z polypropylenu nebo pryžovým septem. Na dávkování je do určité míry závislá i účinnost chromatografického procesu. V důsledku nesprávného dávkování může docházet k rozmývání zón píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. Objemy dávkovacích smyček se pohybují v rozmezí 0,2 až 2000  $\mu$ l. Schéma dávkovacího ventilu je zobrazeno na obrázku 2.10. Situace A) zobrazuje nástřik vzorku do smyčky při zavřeném ventilu a situace B) ukazuje otevřený ventil a vzorek proudící do kolony za pomoci čerpadla.

U autosamplerů existují tři druhy konstrukčního spojení injekční stříkačky a dávkovače. Zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky, injekční stříkačka je fixní a pohybuje se pouze zásobník, nebo zásobník i injekční stříkačka jsou fixní. V třetím případě je vialka dopravena pod injekční stříkačku roboticky. [38]



Obrázek 2.10: Schéma dávkovádávkovacího zařízení (upraveno dle [38])



### 2.6.5 Chromatografické kolony

Jedním z několika kroků potřebných pro úspěšnou analýzu látek je správný výběr chromatografické kolony. V dnešní době existuje velké množství kolon s různými náplněmi, a proto je třeba při jejich výběru k analýze znát vlastnosti separovaných látek. Je to jedna z hlavních komponent v celém chromatografickém systému. Pro analýzy se používají kolony z nerezové oceli s vnitřním průměrem 2,1 až 5 mm, délce 1 až 30 cm. Stacionární fáze obsahuje částice o velikosti 1 až 10  $\mu\text{m}$ . Chromatografické kolony musí odolávat vysokým tlakům a chemickému působení mobilní fáze.

### 2.6.6 Detektory

Detekce u HPLC je založena na vyhodnocení specifických fyzikálně-chemických vlastností analytu. Tyto vlastnosti jsou detektorem převedeny na elektrický signál, který je zobrazen v chromatogramu. Detektory musí vykazovat vysokou citlivost. Ta závisí na mnoha faktorech, jako jsou vlastnosti analytu a mobilní fáze a matrice vzorku. V HPLC vyjadřují citlivost metody limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). V dnešní době existuje celá řada detektorů, které se dělí podle několika kritérií. Jedním z nich je specifita, která dělí detektory podle toho, jestli jsou univerzální pro všechny látky, nebo specifické pro konkrétní skupinu látek. Dalším kritériem je chemická změna analytu. Podle toho rozlišujeme detektory nedestruktivní (spektrofotometrické) a destruktivní (hmotnostní spektrometr). Mezi další známé detekční systémy patří fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické detektory a ELSD (Evaporative Light Scattering Detector). [39]

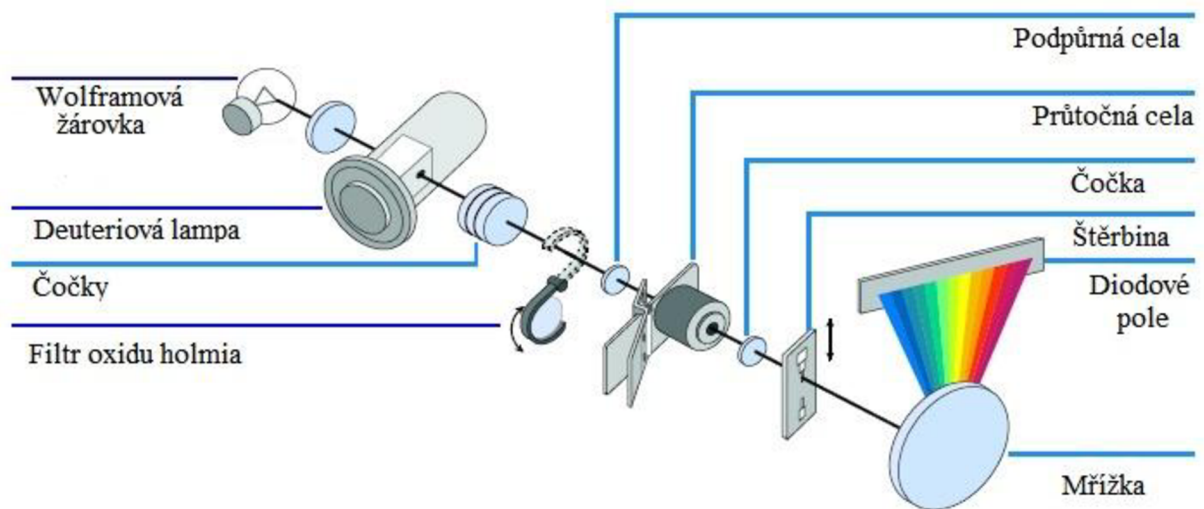
#### 2.6.6.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, popsaným v rovnici (2.1),

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2.1)$$

kde  $A$  vyjadřuje absorbanci,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient,  $l$  tloušťku absorbující vrstvy a  $c$  koncentraci. Podle konstrukčního uspořádání mohou být spektrofotometrické detektory rozděleny na čtyři typy. Detektory s fixní vlnovou délkou ( $\lambda = 253,7 \text{ nm}$ ), kde je jako zdroj záření použita rtuťová výbojka. Detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou délkou nastavitelnou v určité oblasti a detektory s diodovým polem (DAD), které snímají celé spektrum bez přerušení analýzy (Obr. 2.11).

Zdrojem záření u DAD je wolframová a deuteriová lampa, které emitují polychromatický paprsek procházející průtočnou celou detektorem. Poté je paprsek spektrálně rozložen holografickou mřížkou tak, že na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. [39]



*Obrázek 2.11: Schéma DAD detektoru [40]*

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Laboratorní vybavení

##### 3.1.1 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní sklo
- Struhadlo
- Topná deska ETA 2107
- Ultrazvuk: Ultrasonic Compact cleaner PS03000A, objem 2,5 l
- Jednotka pro přípravu ultračisté neionizované vody ELGA, PURELAB<sup>®</sup> Classic
- Filtrační papír MUNKTELL
- Mikrofiltry LUT Syringe, porozita 0,45 μm
- Injekční stříkačka
- Šroubovací vialky Agilent
- Předvážky COMPACT
- Mikropipety
- Analytické váhy BOECO, Germany
- Sušárna Memmert UFE 550
- Exsikátor
- Extrakční patrony
- Gerhardt Soxtherm, SOX 412
- Destilační aparatura
- Kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 (Agilent technologies, USA) (Tab. 4.1)

##### 3.1.2 Chemikálie

*Tabulka 3.1: Charakteristika používaných chemikálií*

Chemikálie	Mr [g/mol]	Čistota [%]	Výrobce	Země původu	CAS
Acetonitril	41,05	min 99,95 %	Sigma Aldrich	Francie	75-05-8
Caffeine	194,19	–	Sigma Aldrich	Čína	58-08-2
Petrolether <sup>*)</sup>	82,2	–	PENTA s.r.o.	Česká republika	64742-49-0
Theobromin	180,16	≥ 98,0 %	Sigma Aldrich	Německo	83-67-0

*\*)rozmezí teplot varu petroletheru 40–65 °C*

### 3.2 Charakteristika materiálu

Jako materiál ke stanovení celkové kakaové sušiny bylo vybráno dvanáct vzorků hořkých čokolád s různým obsahem kakaové sušiny (Obr. 3.1). Tyto vzorky jsou zastoupeny jak čokoládami vyrobenými v České republice, tak čokolády pocházející z jiných zemí Evropy. Také zde byly zahrnuty pro srovnání čokolády od velkoobchodních a od maloobchodních výrobců (Tab. 3.2).

*Tabulka 3.2: Charakteristika vybraných vzorků čokolád*

Číslo vzorku	Název	Výrobce	CKS [%]	Obsah tuků [%]
1	Orion hořká čokoláda	Nestlé Česko s.r.o. Závod Zora Olomouc	52	31,6
2	Ritter SPORT	Alfred Ritter GmbH&Co. Německo	50	33
3	Ryelands Chocolates	Vyrobeno v Polsku pro TESCO	50	29,5
4	ECUADOR	Neckarsulm, Německo	70	40,3
5	Lindt Excellence	Lindt&Sprüngli Sas, Francie	70	41
6	Single Origin	Ajala s.r.o. Brno	70	45
7	Origin	T-Severka spol. s.r.o., Rudolfov, ČR	80	47,8
8	Delicia Dore	ZWC Milano Krzysztof Kotas, Polsko	80	43
9	Lindt Excellence	Lindt&Sprüngli Sas, Francie	85	46
10	Belgian Chocolate	The Belgian Chocolate Group nv Belgie	85	49,9
11	Lindt Excellence	Lindt&Sprüngli Gmb, Německo	90	55
12	Tmavá čokoláda	Jordi's s.r.o., Hradec Králové	90	45



*Obrázek 3.1: Vybrané vzorky k analýze*

### 3.3 Příprava standardů pro stanovení theobrominu a kofeinu

Pro kalibraci přístroje HPLC-DAD byl před analýzou vzorků připraven směsný zásobní roztok theobrominu o koncentraci  $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a kofeinu o koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do 100 ml odměrné baňky. Výpočty bylo zjištěno, že pro přípravu 100 ml zásobního roztoku je třeba navážít 20 mg theobrominu a 10 mg kofeinu. Skutečná navážka činila 20,3 mg theobrominu a 10,5 mg kofeinu. Navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky a doplněny deionizovanou vodou po rysku. V připraveném zásobním roztoku byla výsledná koncentrace theobrominu  $203 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kofeinu. Ze zásobního roztoku byly pak ředěním připraveny roztoky o koncentracích  $101,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $20,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  theobrominu a  $52,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kofeinu. Tyto standardy byly následně analyzovány dle optimalizovaných parametrů pro HPLC viz tabulka 4.1 .

### 3.4 Příprava vzorků pro stanovení theobrominu a kofeinu metodou HPLC

Vzorky čokolád byly k usnadnění extrakce nejemno nastrouhány a na analytických vahách bylo naváženo 0,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Poté byly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk, do kterých bylo přidáno 70 ml horké deionizované vody. Za občasného promíchání byly vzorky extrahovány po dobu 45 minut. Poté byly baňky se vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a doplněny deionizovanou vodou po rysku. Vzorky byly následně zfiltrány přes filtrační papír a poté přes mikrofiltry nadávkovány do vialek pro HPLC analýzu. Následně byla provedena analýza theobrominu a kofeinu dle nastavených parametrů (Tab. 4.1).

### 3.4.1 Příprava vzorků pro gravimetrické stanovení celkového obsahu tuku

Vzorky čokolád byly na jemno nastrohány a na analytických vahách bylo naváženo do extrakčních patron 10 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Následně byly extrakční patry utěsněny vatou a podrobeny extrakci na auto extraktoru Soxtherm. První část extrakce byla provedena horkým petroletherem (Tab. 3.3). Po skončení extrakce byl zbylý petrolether oddestilován a vzorky byly sušeny v sušárně při 105 °C po dobu 30 minut. Po vysušení byly vyextrahované tuky ochlazeny na laboratorní teplotu v exsikátoru a zváženy s přesností na 0,0001 g.

*Tabulka 3.3: Parametry pro gravimetrické stanovení celkového obsahu tuku*

Celková doba extrakce	2,2 h
Extrakce horkým rozpouštědlem	0,5 h
Teplota	150 °C
Rozpouštědlo	Petrolether

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

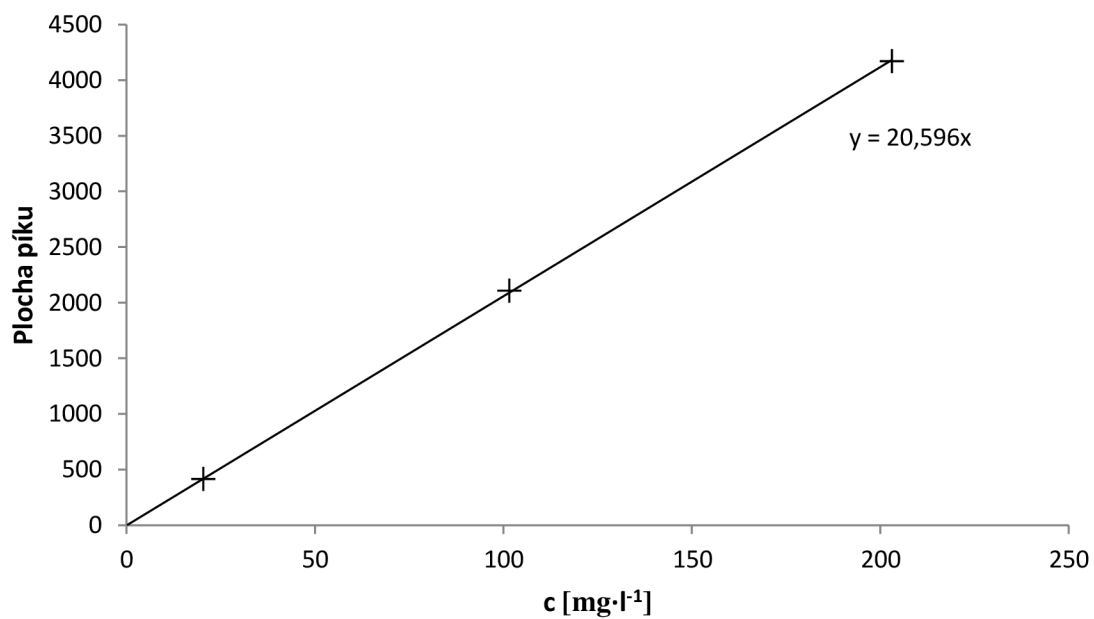
### 4.1 Optimalizace HPLC metody

Pro analýzu theobrominu a kofeinu byl použit přístroj Agilent Infinity 1260 s kolonou Kinetex EVO C18 (150×3,0 mm; 2,5 μm) s reverzní fází. Jako první byly v rámci optimalizace analyzovány samostatné standardy, kvůli určení retenčních časů a následné identifikaci těchto látek ve vzorcích. Následně byl připraven vzorek čokolády č. 7, podle postupu v kapitole 3.4, který je v souladu s ČSN normou 56 0578. [29] Podle tohoto výsledku byla následně optimalizována mobilní fáze acetonitril:voda a průtok mobilní fáze tak, aby separace obou látek byla co nejdokonalejší. Zprvu byla použita izokratická eluce, avšak zjištěním že ve velmi pozdních minutách jsou z kolony eluovány další látky, došlo k nasazení gradientu, který umožnil zkrácení doby analýzy, a zároveň došlo k důkladnému promytí kolony, díky čemuž nebyly další analýzy ovlivněny interferencí látek zadržovaných v koloně. Konečné parametry pro analýzu jsou popsány v tabulce 4.1. Po optimalizaci byly proměřeny standardy theobrominu a kofeinu a byly vyhodnoceny jejich kalibrační závislosti (graf 4.1, graf 4.2 a obrázek 4.1).

**Tabulka 4.1:** Optimalizované parametry pro HPLC

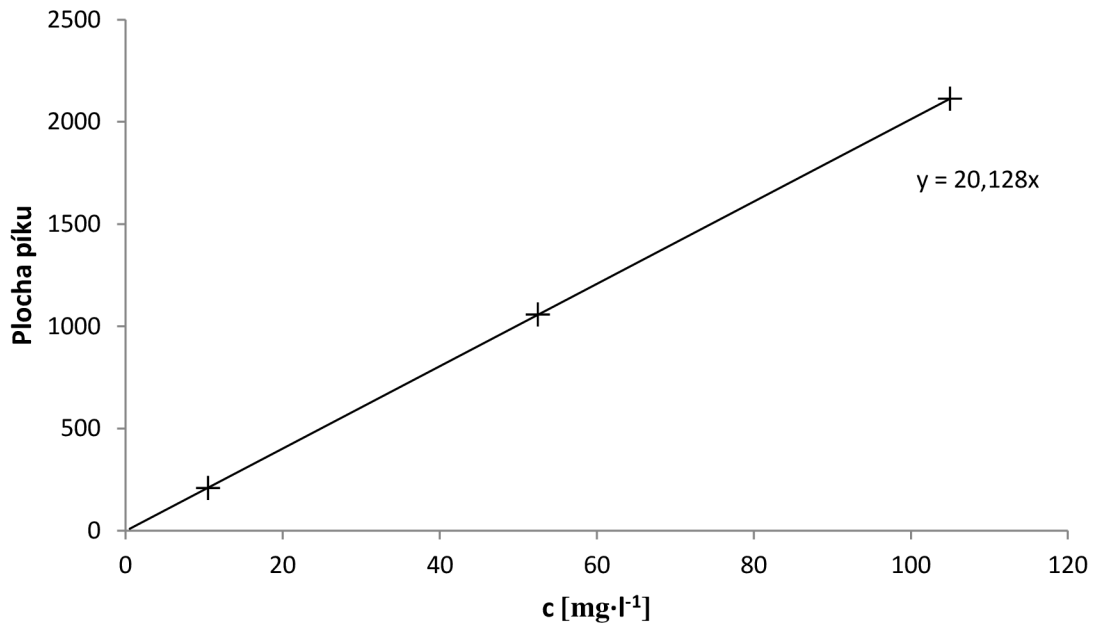
Přístroj	HPLC Agilent Infinity 1260
Kolona	EVO C18 Polar, 150×3,0 mm, zrnitost 2,5 μm
Mobilní fáze	10 %–40 % acetonitril
Objem nástřiku	5 μl
Průtok	0,6 ml/min
Teplota	30 °C
Detekce	280 nm

## Theobromin



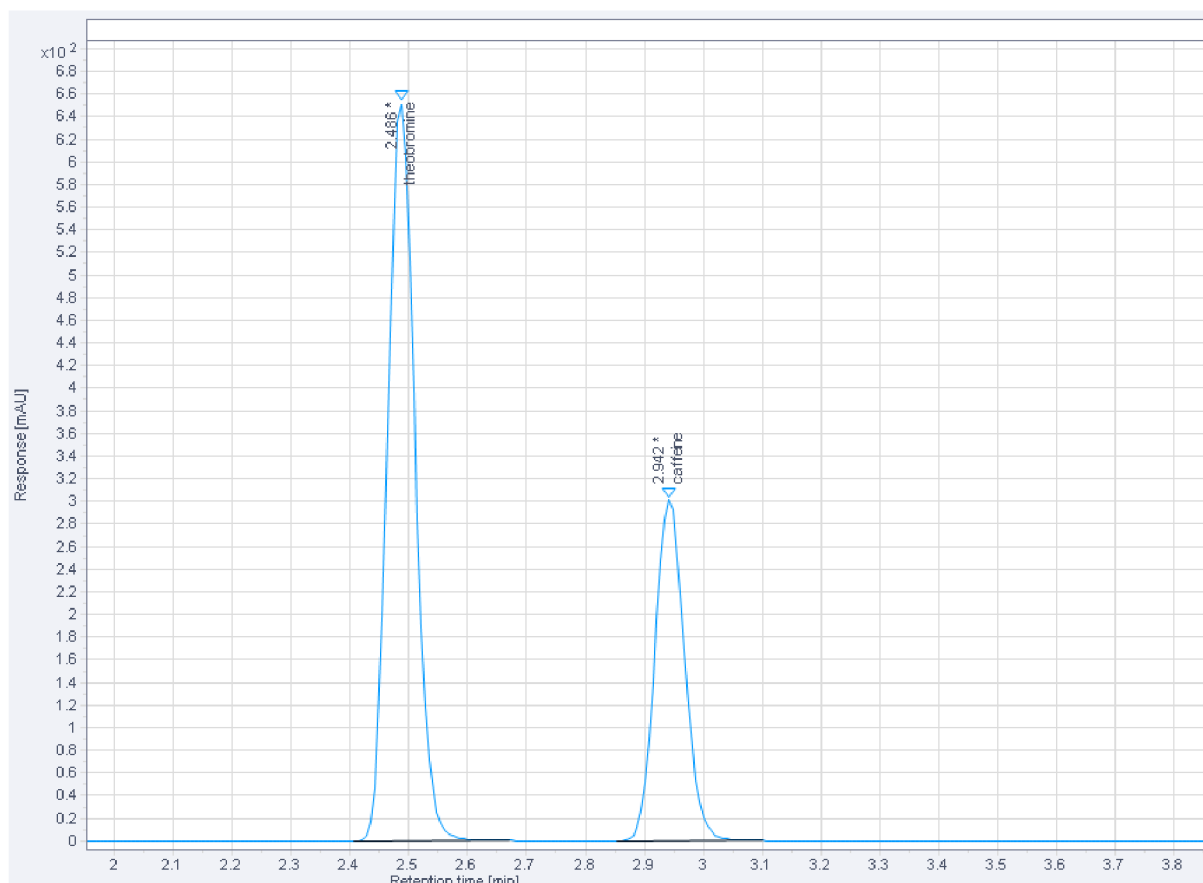
*Graf 4.1: Kalibrační křivka teobrominu*

## Kofein



*Graf 4.2: Kalibrační křivka kofeinu*





**Obrázek 4.1:** Ukázkový chromatogram standardů theobrominu a kofeinu

## 4.2 Stanovení celkové kakaové sušiny ve vzorcích

### 4.2.1 Stanovení tukuprosté kakaové sušiny

Vzorky čokolád byly připraveny, podle postupu v kapitole 3.4. Detekované píky teobrominu a kofeinu byly identifikovány porovnáním s retenčními časy standardů a jejich proložením. Integrací byly vyhodnoceny plochy píků a z rovnic kalibrační závislosti pro theobromin (4.1) a kofein (4.2) byly vypočteny hmotnostní koncentrace těchto látek. Tukuprostá kakaová sušina (TKS) se získá výpočtem z obsahů theobrominu a kofeinu v g/100 g a vynásobením faktorem 36,1, který je odvozen z průměrného obsahu kofeinu a theobrominu v TKS. [29]

Aby mohla být prokázána opakovatelnost metody, byla celá sada vzorků proměřena dvakrát stejným způsobem a s třítydenním odstupem. Výsledky pro obě analýzy jsou vyhodnoceny v tabulkách 4.2 a 4.3. Na obrázku 4.2 je chromatogram vzorku č. 1 z prvního měření.

$$y = 20,569 \cdot x \quad (4.1)$$

$$y = 20,128 \cdot x \quad (4.2)$$

*Tabulka 4.2: Naměřené hodnoty pro theobromin*

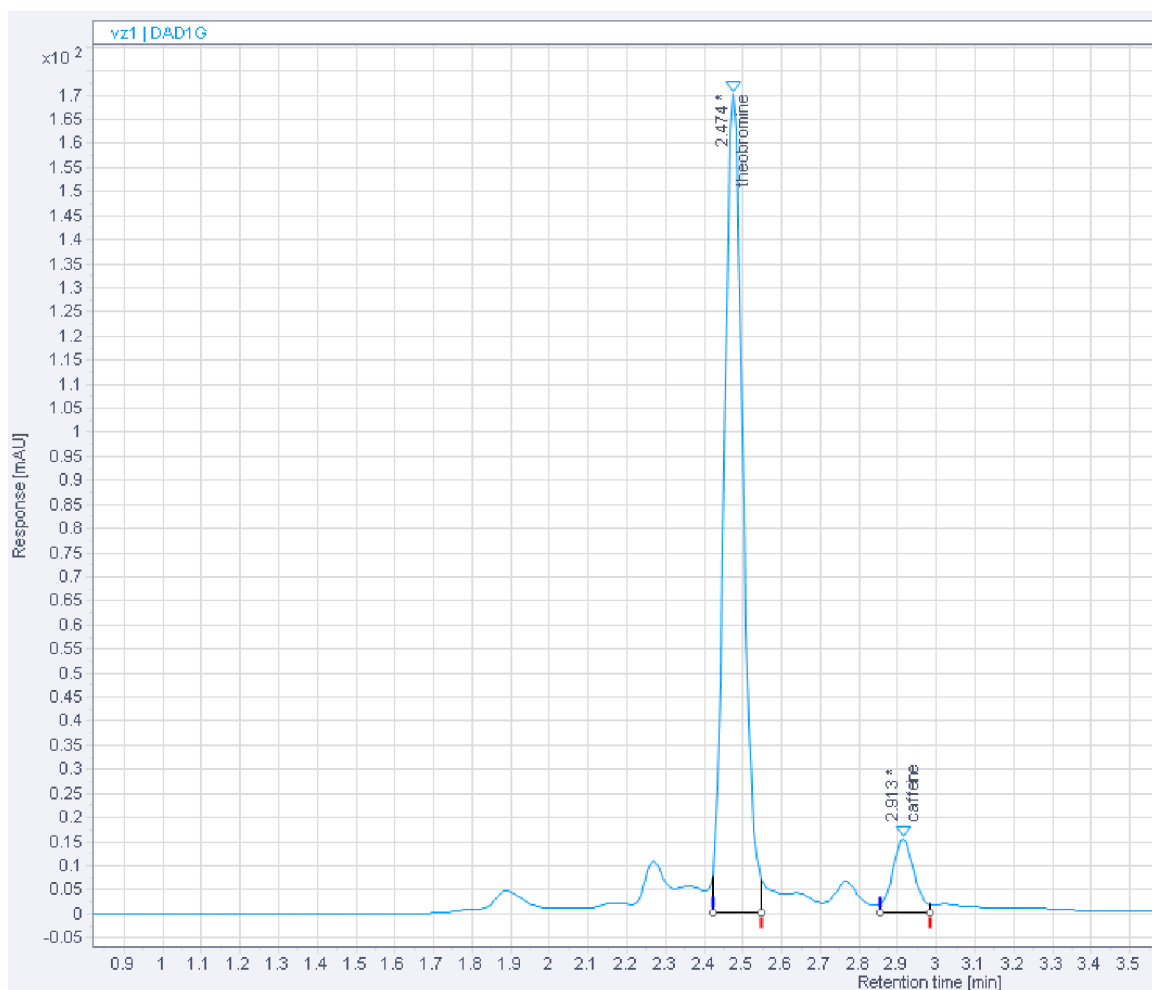
1. měření					2. měření			
č.	$t_r$ [min]	Plocha	m [g]	$c$ [mg·l <sup>-1</sup> ]	$t_r$ [min]	Plocha	m [g]	$c$ [mg·l <sup>-1</sup> ]
1	2,474	568,312	0,5006	27,593	2,326	567,892	0,5084	27,573
2	2,473	512,19	0,503	24,868	2,367	513,406	0,5151	24,927
3	2,470	563,754	0,5028	27,372	2,397	573,311	0,5149	27,836
4	2,461	854,133	0,5037	41,471	2,412	838,798	0,5155	40,726
5	2,458	905,108	0,5076	43,946	2,416	885,594	0,5147	42,998
6	2,455	886,383	0,5029	43,037	2,409	915,581	0,5112	44,454
7	2,452	1020,098	0,5015	49,529	2,398	1068,632	0,5144	51,885
8	2,452	896,089	0,5009	43,508	2,386	901,945	0,5193	43,792
9	2,451	1061,426	0,5025	51,536	2,374	1052,09	0,5136	51,082
10	2,441	1085,737	0,5012	52,716	2,373	1136,734	0,5115	55,192
11	2,434	1023,629	0,5034	49,700	2,371	1086,393	0,5177	52,748
12	2,426	985,747	0,5058	47,861	2,369	980,312	0,5141	47,597

*Tabulka 4.3: Naměřené hodnoty pro kofein*

1. měření					2. měření			
č.	$t_r$ [min]	Plocha	m [g]	$c$ [mg·l <sup>-1</sup> ]	$t_r$ [min]	Plocha	m [g]	$c$ [mg·l <sup>-1</sup> ]
1	2,913	59,193	0,5084	2,941	2,543	55,968	0,5084	2,781
2	2,905	66,36	0,5151	3,297	2,633	64,175	0,5151	3,188
3	2,900	57,915	0,5149	2,877	2,704	58,654	0,5149	2,914
4	2,876	104,713	0,5155	5,202	2,741	105,313	0,5155	5,232
5	2,863	95,709	0,5147	4,755	2,752	90,861	0,5147	4,514

Tabulka 4.3: Pokračování

1. měření					2. měření			
č.	tr [min]	Plocha	m [g]	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	tr [min]	Plocha	m [g]	c [mg·l <sup>-1</sup> ]
6	2,852	145,732	0,5112	7,240	2,738	141,958	0,5112	7,053
7	2,842	125,679	0,5144	6,244	2,71	114,044	0,5144	5,666
8	2,849	88,311	0,5193	4,387	2,685	89,323	0,5193	4,438
9	2,837	118,322	0,5136	5,878	2,651	106,368	0,5136	5,285
10	2,815	128,756	0,5115	6,397	2,648	118,154	0,5115	5,870
11	2,79	122,838	0,5177	6,103	2,642	113,425	0,5177	5,635
12	2,764	196,138	0,5141	9,745	2,64	170,498	0,5141	8,471



Obrázek 4.2: Chromatogram vz. č. 1. z prvního měření

Pro přepočítání množství theobrominu a kofeinu v g/100 g byl použit vztah (4.3). Dosazením těchto výsledků do vztahu (4.4), kde  $c_t$  je koncentrace theobrominu v g/100 g a  $c_k$  koncentrace kofeinu v g/100 g, získáme obsah tukuprosté kakaové sušiny. Všechny výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 4.4 a 4.5.

$$\frac{c \cdot V}{m} \quad (4.3)$$

$$TKS = (c_t + c_k) \cdot 36,1 \quad (4.4)$$

**Tabulka 4.4:** Vyhodnocení TKS z prvního měření

č.	$c_t$ [g/100 g]	$c_k$ [g/100 g]	TKS [g/100 g]
1	0,551	0,058	21,99
2	0,494	0,064	20,16
3	0,544	0,056	21,67
4	0,823	0,101	33,37
5	0,866	0,092	34,59
6	0,856	0,142	36,01
7	0,988	0,121	40,03
8	0,869	0,084	34,41
9	1,026	0,114	41,16
10	1,052	0,125	42,48
11	0,987	0,118	39,90
12	0,946	0,190	41,00

*Tabulka 4.5: Stanovení TKS pro druhé měření*

č.	$c_t$ [g/100 g]	$c_k$ [g/100 g]	TKS [g/100 g]
1	0,542	0,055	21,553
2	0,484	0,062	19,705
3	0,541	0,057	21,559
4	0,790	0,101	32,184
5	0,835	0,088	33,324
6	0,870	0,138	36,373
7	1,009	0,110	40,389
8	0,843	0,085	33,528
9	0,995	0,103	39,619
10	1,079	0,115	43,096
11	1,019	0,109	40,711
12	0,926	0,165	39,371

V této práci byly proměřeny vzorky čokolád s obsahem kakaové sušiny od 50-90 %. Z porovnání obou měření lze vyčíst, že obsah theobrominu v čokoládách byl v průměru až desetkrát větší nežli obsah kofeinu. Obsah tukuprosté kakaové sušiny se pohyboval od 19,7 g do 43 g/100 g. Hodnoty TKS měly u vzorků vzrůstající trend v souladu se zvyšujícím se celkovým obsahem kaka. Ne pro všechny vzorky byl tento trend stejný. Například vzorek 12 s deklarovaným obsahem CKS 90 % vykazoval nižší hodnotu TKS než vzorek č. 7, který obsahoval 80 % CKS.

Tyto vzorky byly připraveny ultrazvukovou extrakcí v deionizované vodě. Ve srovnání se studií [41], kde byla pro přípravu vzorku použita extrakce kyselinou chlorovodíkovou s vyčiřením pomocí Carrezových činidel, byly obsahy theobrominu a kofeinu srovnatelné. V porovnání se studií [42] jsou výsledky stanovení kofeinu srovnatelné s hodnotami v této práci, avšak hodnoty pro theobromin byly oproti této práci vyšší. Rozdílné výsledky mezi studiemi jsou ovlivněny mnoha příčinami. Jednou z příčin je celkový obsah kaka. Ve studiích není popsáno, kolikaprocentní čokolády byly analyzovány. Dalšími odchylkami ve srovnání jsou také určité chyby způsobené při přípravě vzorků a jejich vyhodnocování.

#### 4.2.2 Stanovení celkového obsahu tuku

Pro stanovení celkového obsahu tuku byla použita Soxhletova extrakce na auto extraktoru Soxtherm od firmy Gerhardt (Obr. 4.3). Vzorky byly připraveny podle kapitoly 3.4.1 a celkový obsah tuků byl vypočten dle rovnice (4.5),

$$m = \frac{m_t}{m_{vz}} \cdot 100 \quad (4.5)$$

kde  $m_t$  je hmotnost tuků po extrakci a  $m_{vz}$  je navážka vzorku. Vzhledem k časové náročnosti byla celá série vzorků proměřena pouze jednou. Naměřené výsledky jsou zobrazeny v tabulce 4.6.

*Tabulka 4.6: Stanovení obsahu tuku*

č.	$m_{vz}$ [g] <sup>*)</sup>	$m_t$ [g] <sup>*)</sup>	$m$ [g/100 g] <sup>*)</sup>	$m_{dekl.}$ [g/100 g]	$\Delta m$ [g/100 g]
1	10,066	3,48	34,7	31,6	3,1
2	10,019	3,59	35,8	33,0	2,8
3	10,045	3,2	30,9	29,5	1,4
4	10,0565	4,38	43,1	40,3	2,8
5	10,04441	4,27	42,5	41,0	1,5
6	10,05441	3,75	37,3	45,0	7,7
7	10,0821	4,23	42,0	47,8	5,8
8	10,0215	5,05	50,4	43,0	7,4
9	10,0573	4,61	45,8	46,0	0,2
10	10,0565	4,81	47,8	49,9	2,1
11	10,0401	5,56	55,4	55,0	0,4
12	10,0374	4,95	49,3	45,0	4,3

<sup>\*)</sup>  $m_{vz}$  – navážka čokolád,  $m_t$  – hmotnost tuků po vysušení,  $m$  – celkový obsah tuku,  $m_{dekl.}$  – deklarovaná hodnota tuku a  $\Delta m$  – rozdíl stanovené a deklarované hodnoty tuků

Některé výsledky stanovení celkového obsahu tuků ve vzorcích čokolád jsou odlišné oproti deklarovaným hodnotám uvedených na obalech. Jedná-li se o výrobek obsahující jako jediný zdroj tuku kakao lze namísto obsahu kakaového másla použít celkový obsah tuku. Obsahuje-li čokoláda i jiné tuky než je kakaové máslo, musí se provést kromě stanovení kakaového másla i obsah vlhkosti pocházející z kakaa a obsah jiných přítomných tuků. Jelikož byly v této práci zastoupeny čokolády s vysokým deklarovaným obsahem CKS, vycházelo se z předpokladu,

že u všech vzorků bylo při výrobě použito kakaového másla jako jediného významného zdroje tuku. Z výsledků je patrné, že tento předpoklad je oprávněný a to zejména u vzorků 3; 5; 9; 10 a 11. V jiných studiích se autenticita kakaového másla kontroluje stanovením zastoupených triacylglycerolů, nebo testováním teplot tání a tvarem krystalů kakaového másla, protože čisté kakaové máslo má tyto hodnoty zcela specifické. Testování autenticity kakaového másla je možné také pomocí metody infračervené spektrometrie. [43]

Další odlišnosti v rozdílech byly zcela jistě dány parametry metody, neboť Soxhletova extrakce je zdlouhavý proces, trvající mnohdy i několik hodin. Proto nemusela být stanovená doba extrakce pro mnohé vzorky dostačující. Další vliv na výsledky mělo zcela jistě sušení vyextrahovaných vzorků. Stanovená doba 30 minut nemusela být pro všechny vzorky dostačující na to, aby byly vysušeny do konstantní hmotnosti.



*Obrázek 4.3: Gerhardt Soxtherm, SOX 412*

#### **4.2.3 Stanovení celkové kakaové sušiny**

Celkový obsah kakaové sušiny se vypočítal součtem TKS a celkového obsahu tuku dle rovnice (4.6). Výsledky byly zaznamenány v tabulce 4.7. Porovnání výsledků celkové kakaové sušiny s deklarovánými hodnotami je zobrazeno v grafech 4.3 a 4.4.

$$CKS = TKS + m \quad (4.6)$$

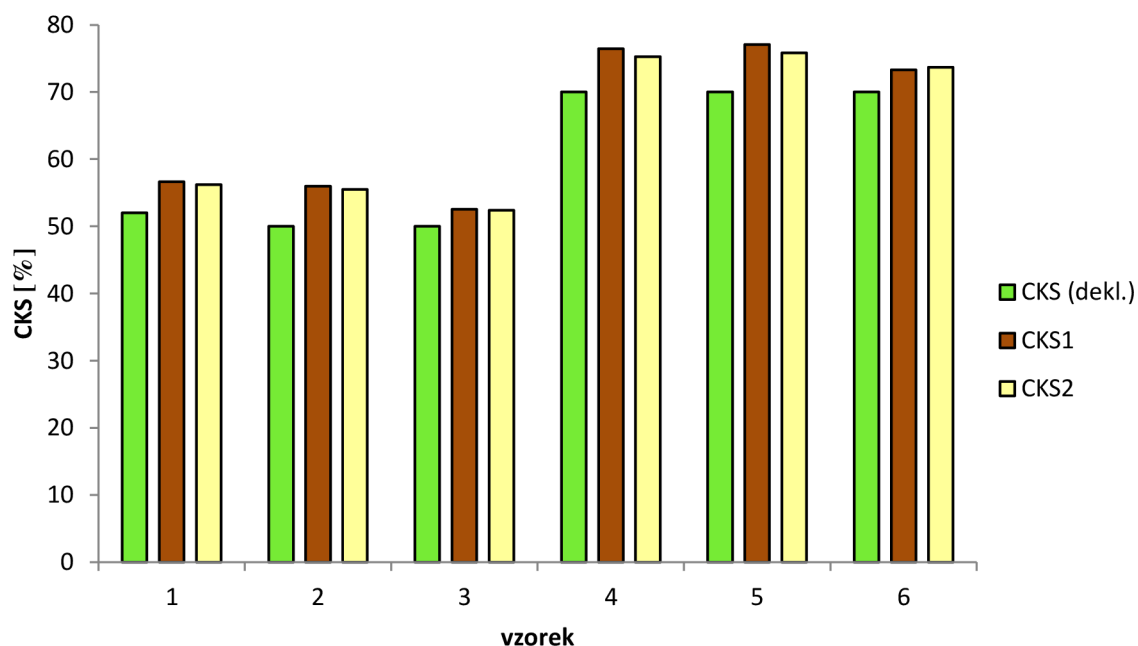
**Tabulka 4.7: Stanovení CKS**

č.	CKS <sub>1</sub> <sup>*)</sup> [g/100 g]	CKS <sub>2</sub> <sup>*)</sup> [g/100 g]	CKS <sub>dekl.</sub> <sup>*)</sup> [g/100 g].	ØCKS <sup>*)</sup> [g/100 g]	ΔTKS <sup>*)</sup> [g/100 g]
1	56,6	56,2	52	56,4	4,4
2	56,0	55,5	50	55,7	5,7
3	52,5	52,4	50	52,5	2,5
4	76,5	75,3	70	75,9	5,9
5	77,1	75,8	70	76,5	6,5
6	73,3	73,7	70	73,5	3,5
7	82,0	82,4	80	82,2	2,2
8	84,8	83,9	80	84,4	4,4
9	87,0	85,5	85	86,2	1,2
10	90,3	90,9	85	90,6	5,6
11	95,3	96,1	90	95,7	5,7
12	90,3	88,7	90	89,5	0,5

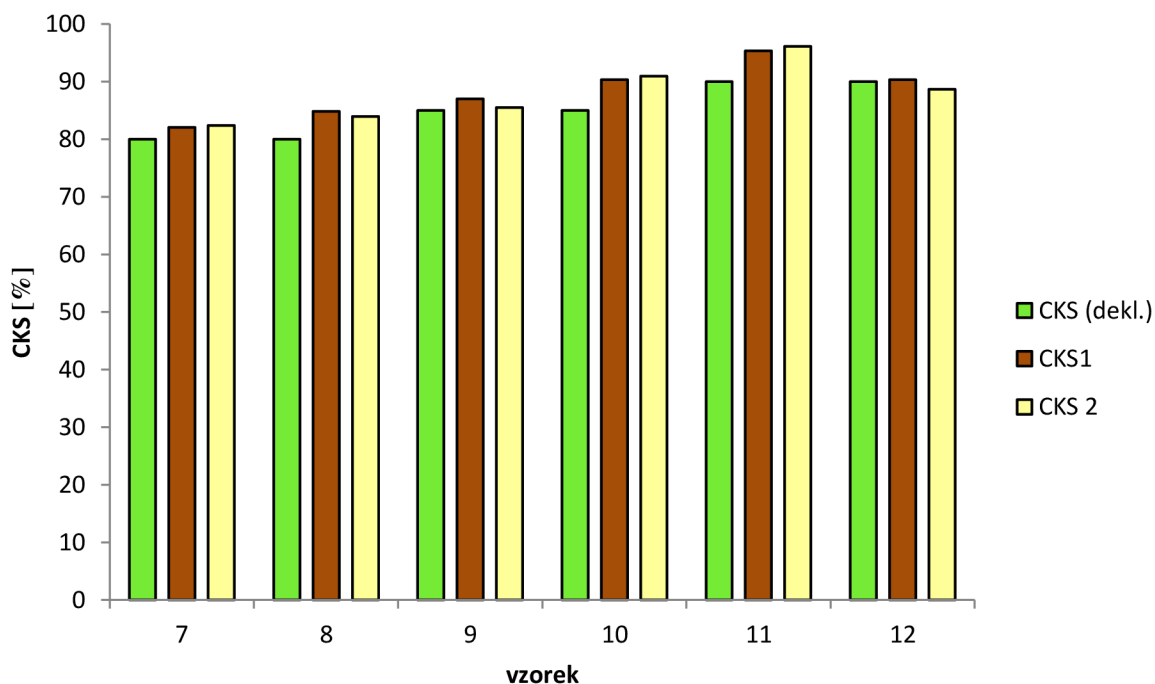
*\*) CKS<sub>1</sub> a CKS<sub>2</sub> – hodnoty opakovaných měření, CKS<sub>dekl.</sub> – hodnoty deklarované výrobcí, ØCKS – průměrné hodnoty CKS<sub>1</sub> a CKS<sub>2</sub>, ΔCKS – absolutní hodnota rozdílu ØCKS a CKS<sub>dekl.</sub>*

Obsah CKS závisí na celkovém obsahu tuků a obsahu TKS. Obsah tukurosté kakaové sušiny i obsah kakaového másla závisí nejen na způsobu výroby čokolád, ale také na druhu a původu kakaových bobů. Existují tři hlavní odrůdy bobů a každá má jiné zastoupení methylxantinů a kakaového másla. Jejich obsah rovněž závisí na zralosti a době sběru bobů. Pokud jsou kakaové boby při zpracování předpraženy při mírnějších teplotách, nedochází k takovým ztrátám kakaového másla a methylxantinů, protože se slupka kakaových bobů jemně oddělí od jádra.





*Graf 4.3: Porovnání stanovených a deklarovaných hodnot CKS, vz. 1-6*



*Graf 4.4: Porovnání stanovených a deklarovaných hodnot CKS, vz. 7-12*

#### 4.2.4 Statistické vyhodnocení

V rámci jednotlivých procentuálních obsahů kakaové sušiny byl proveden Lordův test správnosti, viz rovnice (4.7). Výsledky byly porovnány s tabelovanou kritickou hodnotou Lordova testu. Pro dvě měření je kritická hodnota Lordova testu s 95 % pravděpodobností  $u_{krit.}=6,353$ . Pro tři měření je hodnota  $u_{krit.}=1,304$ . Jak je vidět v tabulce 4.8, až na vzorky č. 4-6 jsou výsledky porovnáním hodnot správné.

Pro prokázání opakovatelnosti metody byl stanoven v rámci procentuálních obsahů kakaové sušiny Lordův test shodnosti. Jeho výsledky včetně kritických hodnot jsou zobrazeny v tabulce 4.9. Stanovené veličiny mají nižší hodnotu, nežli je kritická hodnota, tudíž metody jsou shodné, ačkoli jak bylo zmíněno hodnoty pro vzorky 4-6 nejsou správné ani v jednom případě. U těchto vzorků patrně došlo k chybě při měření a vyhodnocení.

$$u_n = \frac{\bar{x} - u}{R} \quad (4.7)$$

**Tabulka 4.8:** Lordův test správnosti

č.	CKS <sub>dekl.</sub>	1. měření		2. měření	
		CKS	$u_n$	CKS	$u_n$
1	52	56,6	-	56,2	-
2	50	56,0	1,238	55,5	1,284
3	50	52,5		52,4	
4	70	76,5	1,486	75,3	2,291
5	70	77,1		75,8	
6	70	73,3		73,7	
7	80	82,0	1,237	82,4	2,062
8	80	84,8		83,9	
9	85	87,0	1,101	85,5	0,584
10	85	90,3		90,9	
11	90	95,3	0,560	96,1	0,321
12	90	90,3		88,7	

**Tabulka 4.9: Lordův test shodnosti**

<b>č.</b>	<b>CKS<sub>1</sub></b>	<b>CKS<sub>2</sub></b>	<b>u</b>	<b>u<sub>krit</sub></b>
<b>1</b>	56,6	56,2	-	-
<b>2</b>	56,0	55,5	0,043	0,636
<b>3</b>	52,5	52,4		
<b>4</b>	76,5	75,3	0,117	1,714
<b>5</b>	77,1	75,8		
<b>6</b>	73,3	73,7		
<b>7</b>	82,0	82,4	0,061	0,636
<b>8</b>	84,8	83,9		
<b>9</b>	87,0	85,5	0,053	
<b>10</b>	90,3	90,9		
<b>11</b>	95,3	96,1	0,033	
<b>12</b>	90,3	88,7		

## 5. ZÁVĚR

V této diplomové práci je diskutována autenticita hořkých čokolád s různým obsahem kakaové sušiny. Čokoláda je vyráběna z kakaových bobů, které obsahují mnoho bioaktivních látek prospěšných lidskému zdraví. V dnešní době je kladen velký důraz na dodržování kvality výrobků a legislativních požadavků. Tato kritéria jsou kontrolována příslušnými dozorovými orgány různými analytickými metodami. Kontrola autenticity čokolád je prováděna stanovením celkové a tukuprosté kakaové sušiny.

Experimentální část práce byla zaměřena na stanovení theobrominu a kofeinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie a na gravimetrickém stanovení celkového obsahu tuku extrakcí podle Soxhleta. Pro analýzu bylo vybráno dvanáct vzorků čokolád s obsahy kakaové sušiny 50–90 %. Vzorky zahrnovaly čokolády vyrobené nejen v České republice ale i v zahraničí. Také zde byly pro porovnání zahrnuty čokolády od velkovýrobce jakým je např. Nestlé, Česko s.r.o. a od malovýrobce, např. Jordi's s.r.o.

Na základě experimentu bylo prokázáno, že čokolády splňují požadavky legislativy, která stanovuje minimální obsah TKS v hořké čokoládě na 14 g/100g sušiny a obsah CKS na 35 g/100 g výrobku. Výsledné hodnoty tukuprosté kakaové sušiny ve vzorcích čokolády byly stanoveny v rozmezí 19,7-43,1 g/100g sušiny. Hodnoty TKS měly rostoucí trend v souladu s rostoucím obsahem kakaového sušiny ve vzorcích. Celkový obsah tuků se pohyboval v rozmezí 30,9-55,4 g/100g výrobku. Obsah celkové kakaové sušiny byl stanoven v rozmezí 52,4-96,1 g/100g výrobku.

Výsledky této práce potvrzují, že nedošlo k falšování čokolády nedodržením minimálního obsahu TKS nebo nadměrným přidáním náhražek kakaového másla. Použitá metoda pro stanovení celkové kakaové sušiny se ukázala být vhodná pro analýzu tabulkových čokolád.

V dalších pracích by bylo dobré se zaměřit na optimalizaci stanovení celkového obsahu tuku v čokoládách, neboť obsahy celkových tuků stanovených extrakcí podle Soxhleta byly v jednotkách % rozdílné od deklarovaných hodnot uvedených na obalech. Dalším zlepšením by mohla být optimalizace postupu přípravy vzorků pro stanovení methylxantinů metodou HPLC. Po extrakci následovala filtrace přes skládaný filtr, která však byla kvůli značnému podílu pevných částic zdlouhavá. Pro urychlení přípravy by mohla být provedena filtrace za sníženého tlaku.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ARCIMOVIČOVÁ, Jana a Pavel VALÍČEK. *Čokoláda pokrm bohů*. Benešov: Start, 1999. ISBN 80-862-3107-0.
- [2] KRÁMSKÝ, Stanislav a Josef FEITL, Dagmar BRONCOVÁ, ed. *Kniha o čokoládě: historie výroby čokolády a cukrovinek v českých zemích*. Vyd. 1. Praha: Milpo media, 2008. Z historie průmyslu. ISBN 978-80-87040-13-3.
- [3] DOUTRE-ROUSSEL, Chloé. *Čokoláda pro znalce: opravdová chuť i vášeň*. Praha: Slovart, 2006. ISBN 80-720-9825-X.
- [4] VALÍČEK, Pavel. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.
- [5] THEOBROMA CACAO Aubl. – kakaovník pravý. *BOTANY.CZ* [online]. Grulich, c2007-2017 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/theobroma-cacao/>
- [6] The three grand cocoa varieties: Theobroma cacao, the food of the gods. *Barry Callebaut* [online]. Zurich: Callebaut, 2018 [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: <https://www.barry-callebaut.com/about-us/media/press-kit/history-chocolate/theobroma-cacao-food-gods>
- [7] GARTI, Nissim a Neil R. WIDLAK. *Cocoa butter and related compounds*. Urbana, IL: AOCS Press, 2012. ISBN 978-0-9830791-2-5.
- [8] SKOUPIL, Jan. *Suroviny a polotovary pro cukrářskou výrobu*. Brno: Společenstvo cukrářů České republiky, 2005. ISBN 80-239-6061-X.
- [9] SCHWAN, Rosane F. a Alan E. WHEALS. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, **44**(4), 205-221. DOI: 10.1080/10408690490464104. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490464104>
- [10] RAPOPORT, Abram Lazar'jevič a Abram Leont'jevič SOKOLOVSKIJ. *Technologie cukrovinkářské výroby: Výroba čokolády a kaka*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1954. Řada potravinářské literatury.
- [11] DAND, Robin. *The international cocoa trade*. 3rd ed. Cambridge, UK: Woodhead Pub, 2011. ISBN 08-570-9125-5.
- [12] BECKETT, Stephen T. *The science of chocolate*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 08-540-4600-3.
- [13] Chocolate Glossary: Chocolate Definitions. *THE NIBBLE: Great Food Finds* [online]. Lifestyle Direct, c2000-2018 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.thenibble.com/reviews/main/chocolate/glossaryc.asp>
- [14] Výroba čokolády. *Jordi's* [online]. Třebechovice pod Orebem, 2018 [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <https://www.jordis.cz/cs/vyroba-cokolady.html>
- [15] CONCHING AND REFINING. *CHOCOLATE ALCHEMY* [online]. Eugen, 2016 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://chocolatealchemy.com/conching-and-refining/>
- [16] LOIZA CHOCOLATE FACTORY. *LOIZA DARK* [online]. San Juan: Loiza Dark, 2016 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://loizadark.com/loizadarkchocolatefactory.html>

- [17] PENO-MAZZARINO, Laurent. Cocoa Polyphenols. *Cocoa butter and related compounds* [online]. Urbana, IL: AOCS Press, 2012, s. 63-71 [cit. 2018-04-16]. ISBN 9780983079125.
- [18] KIM, Jiyoung, Ki Won LEE a Hyong Joo LEE. Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health-Chapter 42. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. 2011, s. 351-360. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10042-8. ISBN 978-0-12-375688-6.
- [19] WATSON, Ronald R. *Nutrition and functional foods for healthy aging*. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2017. ISBN 978-012-8053-768.
- [20] *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/>
- [21] Bezpečnostní list. *Fagron Pharmaceutical compounding* [online]. Rotterdam: Fagron, c2013-2016 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: [https://fagron.com/sites/default/files/document/msds\\_coa/83-67-0\\_%28CZ%29.pdf](https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/83-67-0_%28CZ%29.pdf)
- [22] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-808-6659-169.
- [23] Bezpečnostní list. *PENTA - Výrobce a dodavatel čistých, laboratorních, speciálních, farmaceutických a technických chemikálií* [online]. Praha: Švec, 2014 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: [https://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/c/bezplist\\_662.pdf](https://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/c/bezplist_662.pdf)
- [24] ČÍŽKOVÁ, Helena, "et al". Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy*. 2012, **106**(10), 903-910.
- [25] Legislativa. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/legislativa.aspx>
- [26] ČÍŽKOVÁ, Helena, ed. *Metody a kriteria [sic] pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2011. ISBN 978-807-4181-245.
- [27] ČESKÁ REPUBLIKA. *Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů*. In: . 1997, částka 38, číslo 110. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110/zneni-20180101>
- [28] *Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaového prášku s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony*. In: . 2004, částka 32. Dostupné také z: [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_vyhlaska-2003-76-potraviny.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-76-potraviny.html)
- [29] ČSN 56 0578. *A Čokoláda a čokoládové cukrovinky - Stanovení obsahu tukuprosté kakaové sušiny*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017.
- [30] Dozorové orgány. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/dozorove-organy.aspx>

- [31] Státní veterinární správa. *Portál eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, c2009-2018 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100050495.html>
- [32] Kontrolní činnost SZPI. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, c2009-2018 [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002118&docType=ART&nid=11314>
- [33] DANEZIS, Georgios P., Aristidis S. TSAGKARIS, Federica CAMIN, Vladimir BRUSIC a Constantinos A. GEORGIU. Food authentication. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **85**, 123-132 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.026. ISSN 01659936. Dostupné z: Elsevier
- [34] PRIMROSE, S., M. WOOLFE a S. ROLLINSON. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2010, **21**(12), 582-590 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.09.006. ISSN 09242244. Dostupné z: Elsevier
- [35] Food Authenticity and Fraud. *Chemical analysis of food: techniques and applications* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2012, s. 499-517 [cit. 2018-04-17]. ISBN 978-0-12-384862-8.
- [36] KELLY, Simon, Karl HEATON a Jurian HOOGEWERFF. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2005, **16**(12), 555-567 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.08.008. ISSN 09242244. Dostupné z: Elsevier
- [37] GEANA, Irina, Andreea IORDACHE, Roxana IONETE, Adrian MARINESCU, Aurora RANCA a Monica CULEA. Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis. *Food Chemistry* [online]. 2013, **138**(2-3), 1125-1134 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.104. ISSN 03088146. Dostupné z: Elsevier
- [38] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3.
- [39] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-012-3850-133.
- [40] The DAD and MWD principle. *Introduction to HPLC on Agilent systems* [online]. Sofia: T.E.A.M. Ltd. – Analytical Department, 2011 [cit. 2018-02-09]. Dostupné z: [http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc\\_bas\\_at/detectors/dadPrinciple.html](http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html)
- [41] DÓKA, O., E. PRÁGAI, D. BICANIC, R. KULCSÁR a Z. AJTONY. Colorimetry and photoacoustic spectroscopy as a suitable tool for determination of fat-free cocoa solids in dark chocolates. *European Food Research and Technology* [online]. 2013, **236**(6), 963-968 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1007/s00217-013-1954-5. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-013-1954-5>

- [42] RICHARDS, Alan a Brian WAILES. Estimation of Fat-Free Cocoa Solids in Chocolate and Cocoa Products – Global Survey of Typical Concentrations of Theobromine and Caffeine Determined by HPLC. *Journal of the Association of Public Analysts* [online]. 2012, (40) [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: [http://www.apajournal.org.uk/2012\\_0001-0012.pdf](http://www.apajournal.org.uk/2012_0001-0012.pdf)
- [43] VESELÁ, Anežka, António S. BARROS, Andriy SYNYTSYA, Ivonne DELGADILLO, Jana ČOPÍKOVÁ a Manuel A. COIMBRA. Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **601**(1), 77-86 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.08.039. ISSN 00032670. Dostupné z: Elsevier



## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CAS	Registrační číslo ( <i>Chemical Abstracts Service</i> )
CBE	Ekvivalenty kakaového másla ( <i>Cocoa Butter Equivalents</i> )
DAD	Detektor s diodovým polem ( <i>Diode Array Detector</i> )
DNA	Deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
ELSD	Detektor rozptylu světla ( <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> )
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
IR	Infračervená spektrometrie ( <i>Infrared Spectroscopy</i> )
IR-MS	( <i>Isotope-Ratio Mass Spectrometry</i> )
KHS	Krajská hygienická stanice
LD <sub>50</sub>	Smrtelná dávka ( <i>Lethal Dose</i> )
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LOD	Limit detekce ( <i>Limit of Detection</i> )
LOG	Limit kvantifikace ( <i>Limit of Quantification</i> )
MS	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass Spectrometry</i> )
NARS	Nibsy, alkalizace, pražení, sterilizace ( <i>Nibs, Alcalising, Roasting, Sterilising</i> )
NMR	Nukleární magnetická rezonance ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NP-HPLC	HPLC na normálních fázích ( <i>Normal Phase HPLC</i> )
PCR	Polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymeric Chain Reaction</i> )
QUID	Obsah deklarovaných složek ( <i>Quantitative ingredient declaration</i> )
RP-HPLC	HPLC na reverzních fázích ( <i>Reversed Phase HPLC</i> )
SNIF-NMR	Místně specifická frakcionace přirozených izotopů ( <i>Site-specific Natural Isotope Fractionation</i> )
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TAG	triacylglycerol
TKS	Tukuprostá kakaová sušina
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ÚSKVBL	Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv