

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Tuk a mastné kyseliny v čokoládě
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Simona Pešková**
Osobní číslo: **C18100**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Tuk a mastné kyseliny v čokoládě**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši:

1. V první části bakalářské práce popište složení čokolády se zaměřením na tuky. Dále definujte metody, kterými lze stanovit jak celkový obsah tuků v čokoládě, tak jeho vlastnosti a zastoupení mastných kyselin v tuku.
2. Vhodnou metodou stanovte obsah tuků ve vzorcích čokolády. Získaný tuk dále charakterizujte z pohledu mastných kyselin pomocí metody GC/MS.
3. Získané poznatky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Tuk a mastné kyseliny v čokoládě jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 7. 2021

Simona Pešková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále děkuji mé rodině a blízkým za podporu během studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na tuky a mastné kyseliny v čokoládě. Teoretická část je věnována charakterizaci tuků, mastných kyselin a jejich rozdělení. Také je zde popsána historie, výroba a chemické složení čokolády. V poslední kapitole této části jsou zmíněny metody stanovení tuku a mastných kyselin. Experimentální část obsahuje stanovení tuků ve vzorcích čokolád metodou dle Soxhleeta a následné stanovení zastoupení mastných kyselin pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tuky, mastné kyseliny, Soxhletova extrakce, čokoláda

TITLE

Fat and fatty acids in chocolate

ANNOTATION

Bachelor thesis focuses on fats and fatty acids in chocolate. The definition of fats, fatty acids and their division into groups are described in the theoretical part of this thesis. Moreover, the history, production and composition of chocolate are mentioned. The last chapter of this section focuses on methods for the determination of fat and fatty acids. The experimental part consists of the Soxhlet determination of fats and the subsequent determination of fatty acids using the gas chromatography - mass spectrometry method.

KEYWORDS

Fats, fatty acids, Soxhlet extraction, chocolate

OBSAH

Úvod.....	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Čokoláda	12
1.1.1 Historie čokolády	12
1.1.2 Rozdělení kakaovníků.....	13
1.1.3 Výroba čokolády.....	14
1.1.3.1 Fermentace a sušení kakaových bobů	14
1.1.3.2 Čištění a třídění kakaových bobů	14
1.1.3.3 Pražení a drcení kakaových bobů	14
1.1.3.4 Mletí kakaové drti.....	15
1.1.3.5 Lisování kakaové hmoty.....	16
1.1.3.6 Válcování a konšování	16
1.1.3.7 Temperování a tvarování	17
1.1.4 Složení čokolády	18
1.1.5 Kakaové máslo a jeho náhražky	19
1.1.6 Druhy čokolád.....	20
1.2 Tuky	21
1.2.1 Jednoduché lipidy	22
1.2.2 Složené lipidy	23
1.2.3 Izoprenoidy	23
1.3 Mastné kyseliny	23
1.3.1 Nasycené mastné kyseliny	23
1.3.2 Mononenasycené mastné kyseliny.....	24
1.3.3 Polynenasycené mastné kyseliny.....	24
1.3.4 Mastné kyseliny v čokoládě.....	24
1.4 Metody pro stanovení celkového tuku v potravinách	26
1.4.1 Metoda podle Soxhleta	26
1.4.2 Metoda podle Grossfelda	27
1.4.3 Metoda podle Folche	27
1.4.4 Metoda podle Röse-Gottlieba	27
1.4.5 Metoda podle Schmid-Bondzynski-Ratzlaff	28
1.4.6 Metoda podle Gerbera	28

1.4.7	Denzitometrická metoda	28
1.4.8	Metody pro stanovení celkového tuku v čokoládě	28
1.5	Stanovení tukových čísel.....	29
1.5.1	Stanovení čísla kyselosti	29
1.5.2	Stanovení čísla zmýdelnění	29
1.5.3	Stanovení hydroxylového čísla	30
1.5.4	Stanovení esterového čísla.....	30
1.5.5	Stanovení jodového čísla	30
1.5.6	Stanovení peroxidového čísla	31
1.6	Stanovení mastných kyselin	31
1.6.1	Použitelné metody.....	31
1.6.1.1	Plynová chromatografie.....	31
1.6.1.2	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	32
1.7	Úprava mastných kyselin pro stanovení	32
2	Experimentální část	34
2.1	Stanovení celkového tuku podle Soxhleta	34
2.1.1	Přístroje a zařízení	34
2.1.2	Chemikálie	34
2.1.3	Vzorky	34
2.1.4	Pracovní postup.....	35
2.2	Stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorku.....	35
2.2.1	Přístroje a zařízení	35
2.2.2	Chemikálie	35
2.2.3	Vzorky	35
2.2.4	Pracovní postup.....	36
3	Výsledky a diskuze.....	37
3.1	Stanovení celkového tuku	37
3.2	Stanovení obsahu mastných kyselin.....	38
4	Závěr.....	42
5	Seznam použité literatury	43
6	Přílohy	47

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Kakaovník pravý [2]	12
Obrázek 2 - Varianty kakaovníku [7]	13
Obrázek 3 - Skladování kakaových bobů [3].....	14
Obrázek 4 - Pražené kakaové boby [3].....	15
Obrázek 5 - Kakaová drť [3].....	15
Obrázek 6 - Nožový mlýn [3]	16
Obrázek 7 - Konšování [3].....	17
Obrázek 8 - Válcování [3]	17
Obrázek 9 - Temperování [3].....	17
Obrázek 10 - Tvarování [3]	18
Obrázek 11 - Schéma vzniku tuku [13]	21
Obrázek 12 - Klasifikace lipidů [16]	22
Obrázek 13 - Reakce vzniku vosku [19].....	22
Obrázek 14 - Soxhletův extraktor [31]	27
Obrázek 15 - Plynový chromatograf [37]	32
Obrázek 16 - GC/MS separace methylesterů mastných kyselin získaných ze vzorku 1	38
Obrázek 17 - Grafické znázornění obsahu mastných kyselin ve vzorcích	41
Obrázek 18 - Grafické znázornění obsahu majoritních mastných kyselin ve vzorcích.....	41
Tabulka 1 - Typické nutriční hodnoty a složení hořké, mléčné a bílé čokolády [8]	19
Tabulka 2 - Složení mastných kyselin v kakaovém másle (vyjádřeno v procentech) [25]	25
Tabulka 3 - Charakteristika použitých vzorků.....	34
Tabulka 4 - Chromatografické podmínky.....	36
Tabulka 5 - Obsah celkového tuku ve vzorcích.....	37
Tabulka 6 - Charakteristika methylesterů mastných kyselin [40]	39
Tabulka 7 - Průměrné zastoupení mastných kyselin s odezvo­vým faktorem.....	40
Tabulka 8 - Výsledky měření pro vzorek 1	49
Tabulka 9 - Výsledky měření pro vzorek 2	50
Tabulka 10 - Výsledky měření pro vzorek 3	51
Tabulka 11 - Výsledky měření pro vzorek 4	52
Tabulka 12 - Výsledky měření pro vzorek 5	53
Tabulka 13 - Výsledky měření pro vzorek 6	54

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- CBE..... ekvivalenty kakaového másla (cocoa butter equivalents)
- CBR náhražky kakaového másla (cocoa butter replacers)
- CBS náhražky kakaového másla (cocoa butter substitutes)
- HDL lipoprotein s vysokou hustotou (high density lipoprotein)
- KOH..... hydroxid draselný
- LDL..... lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
- MUFA mononenasycené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
- PUFA polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
- SFA nasycené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
- WHO Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Úvod

Čokoláda patří mezi jednu z nejoblíbenějších sladkostí po celém světě, ať už se jedná o čokoládu bílou, mléčnou, hořkou či s příchutěmi. Výroba samotné čokolády začíná pěstováním kakaovníků a jejich sklizní. K získání výsledné tabulky čokolády předchází několik dalších kroků, které budou uvedeny v této bakalářské práci. Čokoláda je zdrojem především sacharidů a tuků, přičemž tuky pocházejí u kvalitních čokolád z kakaového másla. Při výrobě méně kvalitních druhů čokolád jsou často používány náhražky kakaového másla. První část se dále věnuje tukům, mastným kyselinám a jejich rozdělení.

Cílem práce je stanovit obsah celkového tuku u vzorků čokolád a ze získaného tuku zjistit procentuální zastoupení mastných kyselin v jednotlivých druzích čokolád pomocí metody GC/MS. Výsledkem experimentální části bude zhodnocení vybraných vzorků čokolád, především jejich kvalita na základě obsahu kakaového másla či jeho náhražek.

1 Teoretická část

1.1 Čokoláda

V dnešní době je čokoláda velmi oblíbenou pochoutkou po celém světě. Avšak než se člověk do této cukrovinky s chutí zakousne, předchází tomu velmi zdlouhavý proces. Je všeobecně známo, že se čokoláda získává z kakaových bobů, které rostou na kakaovníku. Tento strom může dosahovat výšky až 12 metrů a jeho plody jsou tzv. lusky, přičemž jeden lusk může vyprodukovat až 40 kakaových bobů viz Obrázek 1 [1].



Obrázek 1 - Kakaovník pravý [2]

1.1.1 Historie čokolády

Historie kakaovníku sahá až do roku 400 našeho letopočtu, kdy žili Mayové. Byli první, kteří začali kakaovník pěstovat, avšak neznali, že se z kakaových bobů dá vyrobit čokoláda, a tak začali velmi jednoduše. Kakaové boby rozdrtili na prášek, který zalili vodou a přidávali různé ingredience pro lepší chuť jako například pepř. Tento nápoj nazvali chocoatl a popíjeli ho kvůli jeho povzbuzujícím účinkům. Kolem roku 900 našeho letopočtu nastoupila Aztécká civilizace, která používala kakaové boby jako platidlo, pro představu za 10 bobů si mohli koupit králíka. Roku 1502 Kryštof Kolumbus cestoval na ostrov Guajana, kde dostal jako dárek kakaové boby, které později představil ve Španělsku. Ve Španělsku si tento nápoj kvůli hořké chuti moc neoblíbili. O oblibu tohoto nápoje se zasloužil až Hernán Cortéz, který do nápoje

přidal vanilku a cukr. Až kolem roku 1660 se nápoj rozšířil po celé Evropě a velmi rychle si získal spoustu příznivců. V té době si pití horké čokolády mohla dovolit pouze šlechta a věřili, že nápoj má léčivé účinky. Dostupnost čokolády nejen pro šlechtu podpořili tři důležité vynálezy. Prvním vynálezem byl lis, který oddělil kakaové máslo z kakaové hmoty. Pomocí lisu byla čokoláda méně tučná, což bylo moderní společností velmi oceněno. Díky van Houtenově lisu se tedy může od roku 1828 vyrábět čokoláda v pevné formě. Dalším velice zásadním pokrokem bylo přidání sušeného mléka do čokolády za vzniku čokolády mléčné, kterou vytvořil v roce 1875 Švýcar Daniel Peter. Roku 1879 další Švýcar Rodolphe Lindt vyrobil pomocí přístroje tzv. konše čokoládu, která se v ústech rozpouští. K největšímu rozšíření a spotřebě čokolády dochází po druhé světové válce. V dnešní době je čokoláda a výrobky z ní v podstatě součástí každodenního života většiny z nás [1][3][4].

1.1.2 Rozdělení kakaovníků

Kakaovník se pěstuje v tropických oblastech a mezi jeho nejznámější a zároveň nejpěstovanější druhy se řadí tyto tři varianty kakaovníku (Obrázek 2):

- Forastero – jedná se o nejvíce používaný druh kakaovníku (cca 90 % světové produkce) z důvodu jeho nenáročných podmínek k pěstování. Jeho semena mají nahnědlou barvu, tvrdou slupku a typickou trpkou chuť. Spolu s druhem criollo se používá k výrobě čokolády.
- Criollo – tento druh je méně používaný z důvodu vysoké kvality semen a s tím související jeho vysoká cena. Kakaové boby z kakaovníku Criollo se používají v těch nejluxusnějších čokoládách na světě. Od varianty Forastero se liší tenkou slupkou semen, jejich červenou barvou a hořkou chutí [5].
- Trinitario – třetí varianta kakaovníku na světovém trhu, která vznikla křížením varianty Criollo a Forastero. Pěstuje se především v Malajsii [6].



Obrázek 2 - Varianty kakaovníku [7]

1.1.3 Výroba čokolády

Výroba čokolády spočívá v několika krocích, z nichž každý hraje nepostradatelnou roli k dosažení výsledné chuti, barvy a vzhledu výrobku. Ať už se použije jakákoliv varianta kakaovníku, proces výroby čokolády se nemění.

1.1.3.1 Fermentace a sušení kakaových bobů

Proces, který slouží k odstranění všech nečistot z povrchu bobů a zabránění jejich klíčení se nazývá fermentace. Při fermentaci se uvolní enzymy, díky nimž dojde ke změně barvy i chuti. Tato metoda je založena na skladování kakaových bobů v koších, bednách nebo na hromadách a následném přikrytí banánovými slupkami. Po fermentaci přijde na řadu sušení na přímém slunci [5].

1.1.3.2 Čištění a třídění kakaových bobů

Kakaové boby se při přepravě mohou poškodit nebo znečistit, proto se čistí buď na vibračních sítích nebo v pračkách. Odstraňují se hlavně nečistoty, kovové předměty nebo poničené a nevyhovující boby [5]. Nemusí se ihned zpracovávat, mohou se v silech skladovat klidně až 1 rok v pytlích, jak je vidět na Obrázku 3 [3].



Obrázek 3 - Skladování kakaových bobů [3]

1.1.3.3 Pražení a drcení kakaových bobů

Tento krok je velice důležitý k dosažení výsledné chuti, barvy a vůně čokolády. K těmto změnám dopomáhají látky zvané trísloviny, které se ve vodě oxidují na nerozpustné flobafeny. Dojde ke snížení obsahu tríslovin, což má za následek zmírnění trpké chuti. Za změnu barvy

jsou zodpovědné melanoidy a tzv. karamelové látky. Další změnou, která při pražení probíhá je snížení obsahu vody v kakaových bobech. Procentuálně to je z původních 6–8 % na 2–3 %. Vhodná teplota pro pražení je 125–130 °C. Pražené kakaové boby a vzniklá kakaová drť je uvedena na Obrázku 4 a 5 [5]. Takto upražené kakaové boby se rozdrťí, čímž se zbaví zbytků slupek a drť se ještě jednou důkladně pročistí [3].



Obrázek 4 - Pražené kakaové boby [3]



Obrázek 5 - Kakaová drť [3]

1.1.3.4 Mletí kakaové drti

Vzniklá kakaová drť je přepravována do tzv. mlýnů, kde dochází k jejímu mletí. Během několikaletého vylepšování výroby bylo zjištěno, že nejlepší variantou je vícestupňové mletí. Mletí ve více stupních zajišťuje především správnou jemnost a kvalitu kakaové hmoty. V každém stupni mletí hraje důležitou roli jiný mlýn, například mlýn nožový, kladivový, kulový nebo žernovový. Nožový mlýn je uveden na Obrázku 6.

Při tomto procesu dochází k uvolnění kakaového másla z buněk rozdrcených bobů. Během mletí dochází k tření těchto bobů a vlivem vznikajícího tepla kakaové máslo taje a vzniká výše zmiňovaná kakaová hmota [5].



Obrázek 6 - Nožový mlýn [3]

1.1.3.5 Lisování kakaové hmoty

Hmota se vloží do zařízení zvaný hydraulický lis, kde se zahřeje na teplotu 80–90 °C a po zpracování se rozdělí na dvě části. První částí je kakaové máslo, které se následně využívá pro výrobu čokolád a cukrovinek z ní, dále najde využití v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. Druhou oddělenou složkou je kakaový koláč, který slouží k výrobě kakaového prášku. V tomto kroku už záleží na tom, který druh čokolády chceme vyrobit. Podle druhu se ke kakaové hmotě přidávají různé složky (cukr, mléko, vanilka, kakaové máslo) [5].

Některé čokoládovny nahrazují kakaové máslo ve svých výrobcích za mléčný tuk, máslo nebo za ztužené oleje a ve výsledku jsou výrobky sice levnější, ale méně kvalitní [8].

1.1.3.6 Válcování a konšování

Válcování čokoládové hmoty probíhá na strojích zvaných válcovací stolice (Obrázek 7). Tato čokoládová hmota již obsahuje výše uvedené přísady, které ovlivňují její chuť. Lidské chuťové buňky jsou schopné rozpoznat jen částice o velikosti 20–25 μm , tato skutečnost ovlivňuje fakt, zda je čokoláda chuťově jemná. Její jemnost závisí i na množství kakaového másla. Tento krok je velice důležitý nejen pro zjemnění čokoládové hmoty, ale i kvůli oxidačním procesům, které mají vliv na chuť a aroma. Konečným produktem při válcování je sypká směs, která se musí dále upravovat a proběhne tzv. zušlechťování čokoládové hmoty v konších. Cílem zušlechťování je zlepšit chuť, aroma a zjemnit strukturu čokoládové hmoty.

Konšování je proces, během kterého se čokoládová hmota důkladně promíchává (Obrázek 8). Časově tento děj zabere průměrně 24–48 hodin a slouží zároveň i k odstranění těkavých látek

(především kyselina octová) vzniklých během fermentace i dalších kroků výroby. Konše jako takové vynalezl Rodolphe Lindt, jak je již uvedeno v kapitole 1.1.1 [5].

Konšování má tři fáze:

- Suché konšování – tato fáze slouží k nakypření sypké hmoty, k odstranění vlhkosti a již zmíněných těkavých látek
- Tekuté konšování – nastává po 6–12 h suchého konšování a přidává se kakaové máslo
- Homogenizace – v poslední fázi se přidávají emulgační prostředky, jako je například lecitin, čímž se snižuje hustota čokoládové hmoty [5][9]



Obrázek 8 - Válcování [3]



Obrázek 7 - Konšování [3]

1.1.3.7 Temperování a tvarování

Temperování probíhá v tzv. temperovacích strojích, kde se v prvním kroku teplota zvýší na 50 °C a čokoládová hmota se rozpustí jako na Obrázku 9.



Obrázek 9 - Temperování [3]

Ve druhém kroku se zchladí na 26 °C a v kakaovém másle začnou krystalizovat stabilní i nestabilní modifikace. Krystalizace, jiným slovem polymorfismus je děj, při kterém dochází k přeměně jedné modifikace v druhou. Rozlišujeme polymorfii reverzibilní neboli vratnou a irreverzibilní, tedy nevratnou. U krystalizace mastných kyselin, které se vyskytují v kakaovém másle, se jedná o irreverzibilní polymorfii. Třetí krok je další změna teploty a to na 31–32 °C, přičemž v hmotě zůstávají jen stabilní modifikace kakaového másla a ty nestabilní roztají. Mezi stabilní modifikace patří β modifikace a mezi nestabilní řadíme β' , β'' , α modifikace [5][9].

Takto upravená čokoládová hmota se nalévá do forem a různě se tvaruje jako na Obrázku 10, následně probíhá chlazení, balení, skladování a expedice [9].



Obrázek 10 - Tvarování [3]

1.1.4 Složení čokolády

Čokoláda obsahuje všechny tři základní makroživiny a to sacharidy, bílkoviny i tuky. Čokoláda obsahuje velké množství kalorií. Pro představu, pokud sníme za den 100 gramů mléčné čokolády, pokryje nám to 63 % sacharidů, 43 % tuků a 16 % bílkovin (vztaženo na doporučený denní příjem kalorií). Tuky, které se nachází v čokoládě, jsou především z kakaového másla. Čokoláda obsahuje nejvíce sacharidů, hlavně disacharidy a polysacharidy. Disacharidy (sacharosa, laktosa) jsou z mléka, které se přidává k mléčné a bílé čokoládě. Polysacharidy jsou z vlákniny kakaá. Bílkoviny, které jsou v kakau, se během výroby čokolády částečně odstraní, a proto se do čokolád přidávají mléčné bílkoviny. Každý druh čokolády obsahuje jiné množství tuku, bílkovin i sacharidů, jak je uvedeno v Tabulce 1 [8].

Tabulka 1 - Typické nutriční hodnoty a složení hořké, mléčné a bílé čokolády [8]

Parametr	Druh čokolády		
	Hořká	Mléčná	Bílá
Energetická hodnota (kJ/100 g)	2 180	2 238	2 255
Kakaová sušina (%)	66,0	25,0	0,0
Tukuprostá kakaová sušina (%)	28,0	2,5	0,2
Celkové bílkoviny (g/100 g)	8,1	7,6	6,0
Cukry (g/100 g)	37,4	51,5	59,0
Vláknina (g/100 g)	10,5	3,4	0,2
Celkové tuky (g/100 g)	37,7	29,7	32,0
Celkové vitaminy (mg/100 g)	2,75	1,42	2,62

1.1.5 Kakaové máslo a jeho náhražky

Kakaové máslo se řadí mezi nejdražší rostlinný tuk, který při teplotách menších jak 25 °C je tuhý, křehký a při teplotě více jak 37 °C taje. Kakaové máslo je klíčovou ingrediencí, jejíž následkem je křehká struktura, barva i lesk výsledného produktu. Vysoký podíl kakaového másla ve výrobku zajišťuje prevenci proti tukovému výkvětu, který vzniká při dlouhodobém skladování. Tukový výkvět je šedobílý povlak na povrchu čokolády nebo čokoládové cukrovinky.

Jak je uvedeno v předchozím odstavci, mezi nevýhody kakaového másla patří nejen jeho vysoká cena, ale i nedostatek kakaového másla pro trh celého světa. Proto se výrobci snažili najít něco, co bude vlastnostmi velmi podobné kakaovému máslu a zároveň o dost levnější [10].

V čokoládovém a cukrářském průmyslu se používají ekvivalenty kakaového másla pod zkratkou CBE (cocoa butter equivalents), kam se řadí palmový olej, máslo shea a illipé. Dále se používají náhražky kakaového másla pod zkratkami CBR (cocoa butter replacers) a CBS (cocoa butter substitutes). CBR jsou například oleje jako je palmový, sójový nebo bavlníkový a mezi CBS řadíme laurové tuky a ty slouží především k polévání čokoládových výrobků. Pro

obsah těchto náhražek je stanoven maximální obsah podle legislativy Evropské unie, která tento obsah stanovila na 5 % [8].

1.1.6 Druhy čokolád

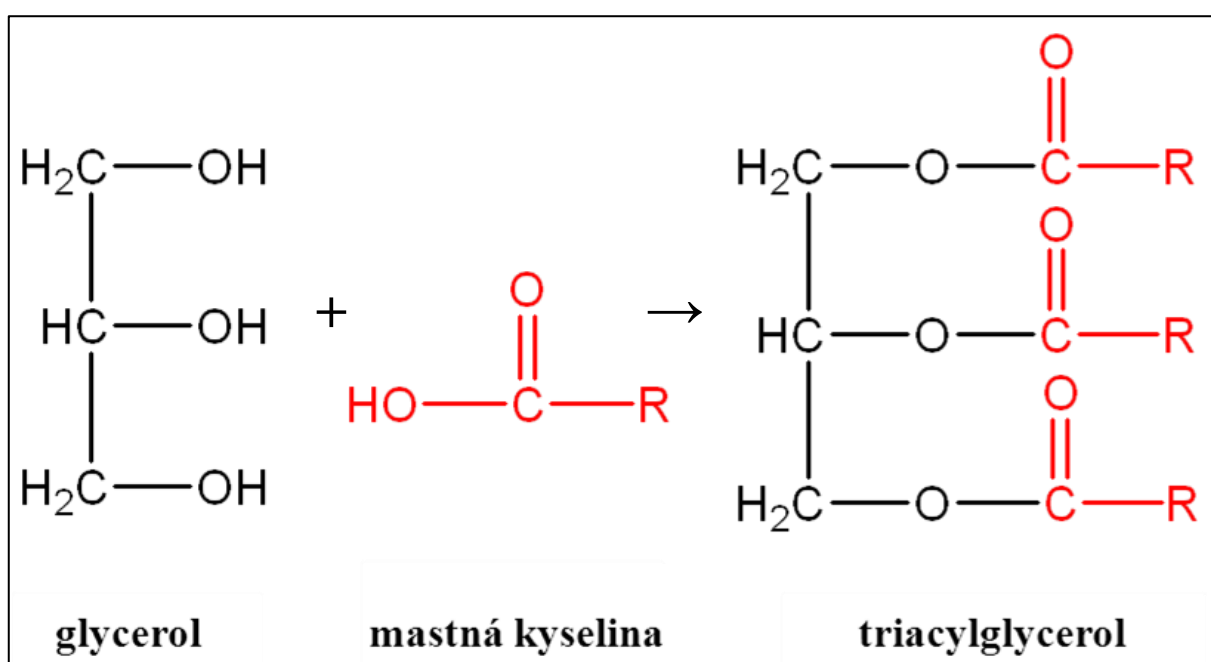
Český trh nabízí nespočet čokolád s různými příchutěmi a náplněmi. Rozdělují se podle procentuálního zastoupení dvou základních složek. První složkou je celková kakaová sušina, která zahrnuje veškeré kakaové části včetně kakaového másla. Druhou složkou je tukuprostá kakaová sušina, ta obsahuje kakaové složky, jejichž součástí není tuk.

Čokolády na českém trhu:

- **Hořká čokoláda** – musí obsahovat minimálně 35 % celkové kakaové sušiny z toho alespoň 18 % kakaového másla a 14 % tukuprosté kakaové sušiny
- **Mléčná čokoláda** – obsahuje nejméně 25 % celkové kakaové sušiny, 2,5 % tukuprosté kakaové sušiny a další nepostradatelnou složkou je mléčná sušina získaná například z plnotučného nebo polotučného mléka, ze smetany nebo másla
- **Oříšková čokoláda** – zde je obsah celkové kakaové sušiny minimálně 32 % a tukuprostá kakaová sušina v obsahu 8 % a více, už podle názvu vyplývá, že důležitou složkou jsou lískové ořechy, které zde musí být v rozmezí 20–40 %
- **Bílá čokoláda** – musí splňovat minimální obsah kakaového másla 20 %, dále v tomto druhu najdeme mléčnou sušinu, která by měla být 14 a více procent, čokoláda obsahuje i cukr
- **Chocolate a la taza** – je to čokoládový nápoj, který obsahuje nejméně 30 % celkové kakaové sušiny, 12 % tukuprosté kakaové sušiny a nejvíce 18 % mouky nebo škrobu
- **Chocolate familiar a la taza** – musí splňovat úplně stejná kritéria jako předchozí výrobek až na obsah celkové kakaové sušiny, která zde musí být minimálně 35 %
- **Čokolády vyšší jakosti** – v případě hořké čokolády musí být celková kakaová sušina alespoň 43 % a z toho 26 % kakaového másla, pokud jde o mléčnou čokoládu ta musí splňovat 30 a více procent celkové kakaové sušiny a 18 % mléčné sušiny, tyto výrobky poznáme podle označení na obalu slovy „extra“, „vysoká jakost“
- **Čokoládové cukrovinky** – typickým příkladem je například bonboniéra, kde vnitřek bonbonu tvoří tuková nebo cukrová hmota a povrch tvoří kakaové složky, čokoláda z celkové hmotnosti musí být alespoň 25 %
- **Čokoládová poleva** – požadavky na čokoládovou polevu jsou minimálně 35 % celkové kakaové sušiny a 2,5 % tukuprosté kakaové sušiny [11]

1.2 Tuky

Tuky řadíme do skupiny lipidů, jejichž nejdůležitější vlastností je odpuzování vody. Tuky patří mezi tři základní makroživiny společně s bílkovinami a sacharidy. Tuky ve své struktuře obsahují glycerol a na něm navázané mastné kyseliny. Tuky jsou důležitým zdrojem energie. Tělo přijmutím 1 gramu tuku získá 9 kilokalorií (kcal), což je v porovnání se sacharidy a bílkovinami více než dvojnásobná hodnota. Z tuků tělo přijímá vitamíny, které jsou v nich rozpustné – A, D, E a K. Tuky také slouží jako ochrana některých důležitých orgánů. Z hlediska chemického složení jsou tuky estery vyšších mastných kyselin a alkoholu. Jak vzniká tuk ukazuje následující Obrázek 11 [12].



Obrázek 11 - Schéma vzniku tuku [13]

Tuky se dělí podle původu na rostlinné a živočišné. Při dlouhodobém vysokém příjmu tuku (nad 35 % z celkového denního energetického příjmu) může docházet k výskytu různých onemocnění srdce, cév, obezita a další. Tuky dodávají potravinám příjemnou a jemnou chuť. Je důležité si vybírat potraviny s nižším obsahem nasycených mastných kyselin jako prevence řady onemocnění [14].

Tuky jsou nerozpustné ve vodě a rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (benzín nebo sirouhlík). Dalším často používaným dělením tuků je jejich schopnost zmýdelnění. Jednoduché a složené lipidy při styku se zásadou vytvářejí soli mastných kyselin, které se poté používají jako mýdla. Další skupinou podle Obrázku 12 jsou izoprenoidy, které jsou nezmýdelnitelné, tedy nejsou schopny vytvářet s vodou mýdla [15].

1.2.2 Složené lipidy

Složené lipidy obsahují zbytek vyšší mastné kyseliny, alkohol a další složku, podle které se rozdělují na fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny. Fosfolipidy navíc obsahují kyselinu fosforečnou, glykolipidy obsahují navíc sacharid a lipoproteiny jsou komplexy lipidů a proteinů [15].

1.2.3 Izoprenoidy

Izoprenoidy se dělí na terpeny a steroidy. Terpeny jsou látky, které obsahují ve své struktuře izopren (2-methylbuta-1,3-dien). Terpeny jsou součástí silic, pryskyřic a balzámů. Mezi známé silice patří citronová, levandulová či mátová. Steroidy obsahují strukturální jednotku steraan. Steroidy se dělí na steroly, žlučové kyseliny a hormony. Steroly se dále dělí podle toho, kde se vyskytují. Pokud u rostlin, nazývají se fytosteroly a u živočichů zoosteroly. Mezi fytosteroly patří ergosterol, který je v houbách a v pekařském droždí. Do skupiny zoosterolů řadíme cholesterol, který je obsažen v každé živočišné buňce a je součástí lipoproteinů. Funkce lipoproteinů je transport lipidů v krvi. Existuje více typů lipoproteinů a je důležité rozeznávat tzv. „hodný“ HDL (lipoprotein s vysokou hustotou), který má pozitivní účinky na zdraví a odvádí přebytečné množství cholesterolu do jater. Druhým typem je tzv. „zlý“ LDL (lipoprotein s nízkou hustotou), který má negativní účinky na zdraví a ukládá se v cévách a může dojít k onemocnění srdce [15][17][18].

1.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny tvoří hlavní část lipidů. Jsou složeny ze sudého počtu atomů uhlíku a na konci řetězce se nachází karboxylová skupina (-COOH). Mastné kyseliny se dělí podle toho, jaké vazby se ve struktuře mezi atomem uhlík-uhlík vyskytují. Pokud jsou v řetězci všechny vazby jednoduché, označujeme je jako nasycené mastné kyseliny. V případě, že se v řetězci vyskytuje jedna dvojná vazba, nazývají se mononenasycené mastné kyseliny a pokud jsou v řetězci dvě nebo více dvojných vazeb jsou to polynenasycené mastné kyseliny [15].

1.3.1 Nasycené mastné kyseliny

Podle délky řetězce se dělí na nasycené mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C2–C4), se středně dlouhým řetězcem (C8–C12) a s dlouhým řetězcem (C14–C18). Mezi nasycené mastné kyseliny SFA (saturated fatty acids) patří například kyselina máselná, laurová, myristová, palmitová, stearová. Tuky, které převážně obsahují nasycené mastné kyseliny při pokojové

teplotě tuhnou. Vyskytují se v potravinách, jako jsou například paštiky, máslo, sádlo, oleje (kokosový, palmový). Při vysokém příjmu SFA ve stravě se zvyšuje riziko onemocnění srdce, cév a hrozící cukrovka 2. typu. Hladinu cholesterolu v krvi zvyšuje hlavně kyselina laurová, myristová a palmitová. Podle doporučení WHO (World Health Organization) by tuky neměly přesahovat více než 30 % z našeho denního příjmu, optimálním rozmezím je stanoveno 15–30 %, z toho SFA méně než 10 % [20][21][22].

1.3.2 Mononenasyčené mastné kyseliny

MUFA (monounsaturated fatty acids) obsahují jednu dvojnou vazbu a nachází se především v olejích (olivový, řepkový, sezamový). Nahrazením nasycených mastných kyselin za mononenasyčené můžeme předejít onemocněním kardiovaskulárního systému. Mezi mononenasyčené mastné kyseliny patří například palmitoolejová, olejová, eruková [21].

1.3.3 Polynenasycené mastné kyseliny

PUFA (polyunsaturated fatty acids) obsahují více než jednu dvojnou vazbu. Rozdělují se podle polohy poslední dvojně vazby na omega-3 a omega-6 polynenasycené mastné kyseliny. Nacházejí se ve slunečnicovém oleji, rybím tuku, tofu nebo například v mořských rybách. Snižují hladinu cholesterolu a riziko onemocnění srdce [20][21].

Mezi nejznámější třídy PUFA řadíme omega-3 a omega-6 mastné kyseliny, které jsou esenciální a je nutné je přijímat ve stravě. Omega-6 polynenasycené mastné kyseliny jsou sice esenciální, ale v dnešní době trpíme nadbytkem z důvodu konzumace velkého množství zpracovaných potravin. Najdeme je ve slunečnicovém oleji a ve spoustě průmyslově zpracovaných potravin. Omega-3 mají protizánětlivé účinky a zdrojem jsou mořské ryby. Je to například kyselina eikosapentaenová nebo dokosahexaenová. Vědci se domnívají, že poměr omega-6 a omega-3 ve stravě byl počátkem života na naší planetě cca 1:1 z důvodu jejich stravování. Jejich strava se skládala převážně z toho, co ulovili nebo sebrali. V současné době se tento poměr kvůli našim špatným stravovacím návykům, především konzumací zpracovaných potravin, zhoršil na 16:1. Vyšší množství omega-6 je příčinou různých civilizačních onemocnění [23].

1.3.4 Mastné kyseliny v čokoládě

Čokoláda obsahuje spoustu přísad a mezi nejdražší se řadí kakaové máslo, které je zároveň nositelem mastných kyselin. Obsah vázaných mastných kyselin závisí na podmínkách, ve

kterých se kakaové boby pěstují. Celkový obsah vázaných mastných kyselin má vliv na vlastnosti konečného produktu, především na chuť, strukturu, hustotu i tání [24].

V kakaovém másle se mastné kyseliny vyskytují jako součást triacylglycerolů. Mastných kyselin existuje celá řada, avšak v kakaovém másle se vyskytují nejvíce kyselina stearová, palmitová, olejová a v menší míře kyselina linolová a další, jak je uvedeno v Tabulce 2 [9].

Tabulka 2 - Složení mastných kyselin v kakaovém másle (vyjádřeno v procentech) [25]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku a dvojných vazeb	Kakaové máslo
Laurová	12	–
Myristová	14	0,1
Palmitová	16	23–30
Palmitoolejová	16:1 Δ^9	0,1–0,4
Stearová	18	30–36
Olejová	18:1 Δ^9	33–36
Linolová	18:2 $\Delta^{9,12}$	1–4
Linolenová	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0–0,5
Arachidová	20	0,2–1,0

Obecný zápis mastných kyselin:

$N:M \Delta^{A,B,C}$

N..... počet uhlíků

M..... počet dvojných vazeb

A,B,C polohy dvojných vazeb

Mastné kyseliny se vyskytují ve struktuře triacylglycerolů, což znamená, že na molekulu glycerolu jsou navázány tři mastné kyseliny. V kakaovém másle se v triacylglycerolech nacházejí na poloze číslo 2 (uprostřed) nenasycené mastné kyseliny (olejová, linolová kyselina). V poloze 1 a 3 jsou navázány nasycené mastné kyseliny (stearová, palmitová kyselina) [5].

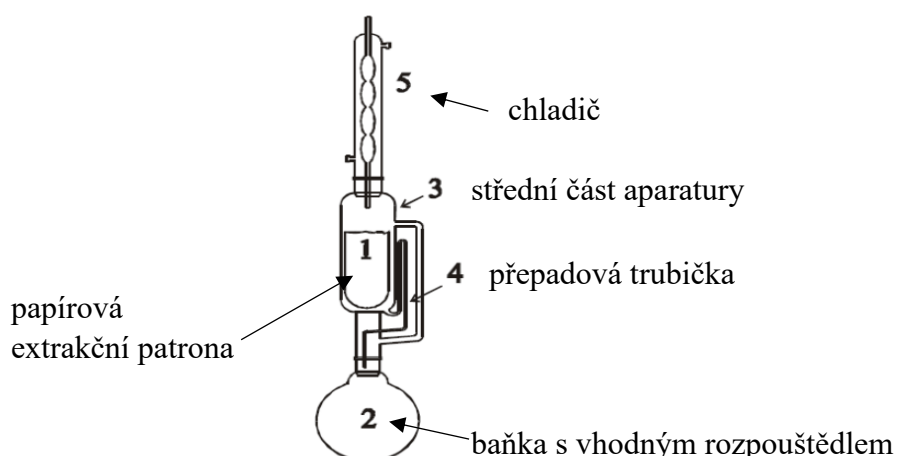
- POS – 1(3) palmitoyl-3(1) stearoyl-2-oleoglycerol
- SOS – 1(3)-distearoyl-2-oleoylglycerol
- POP – 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol [26]

1.4 Metody pro stanovení celkového tuku v potravinách

Analýza potravin je nezbytnou součástí všech potravinářských podniků, která slouží ke kontrole výrobků, jejich celkovému složení a zároveň kontroluje přítomnost nežádoucích látek. Pro každý druh potravin a pro každý element v dané potravine existuje podle norem přesně určená metoda stanovení. Existují dvě metody, kterými lze dokázat, zda se tuk ve vzorku vyskytuje či nikoliv. První z nich je za pomoci obyčejného papíru, který se přiloží nad předem zahřátý vzorek. Pokud se na papíře objeví mastná skvrna, která přetrvává po zahřátí nad plamenem i v případě styku s vodou, je důkazem obsahu tuku ve vzorku. Druhou metodou je zahřátí vzorku na vysokou teplotu, přesněji na 200 °C a pokud je cítit štiplavý zápach, jedná se o tuk [27].

1.4.1 Metoda podle Soxhleta

Principem metody je odpařování rozpouštědla při jeho teplotě varu a v kondenzátoru se mění na kapalinu, která stéká do extraktoru. V extraktoru se nachází patrona se vzorkem a ve chvíli, kdy rozpouštědlo vyplní prostor, přepadává do baňky a nese s sebou vyextrahované lipidy. Tato metoda je vhodná pro izolaci tuku z většiny potravin, podmínkou je vyšší procento tuku (nad cca 10 %) a nízký obsah vody. Vzorek je nutné nejdříve rozdrtit nebo rozemlít a poté ho s přesností na miligramy navázat do extrakční patrony v přesném množství 10 gramů. Patrona se vzorkem se utěsní vatou a vloží do extraktoru, po připojení baňky se zábrusem a chladičem vznikne laboratorní aparatura, v tomto případě nese název Soxhletův extraktor (viz Obrázek 14). Do extraktoru se nalije 150 ml rozpouštědla, nejčastěji se používá n-hexan, petrolether nebo diethylether. Extrakce probíhá přibližně 4 hodiny za předpokladu, že rozpouštědlo mírně vře. V případě potřeby se extrakce přerušuje, vzorek se roztře s mořským pískem a provedeme další extrakci. Ke konci extrakce se rozpouštědlo oddestiluje, baňka se vloží do sušárny a po ochlazení se zvažuje. Výhodou této metody je získání čistého vyextrahovaného tuku bez nutnosti filtrace. Nevýhodou je velká spotřeba rozpouštědla, následné možné znečištění životního prostředí extrakčním odpadem a časová náročnost. Soxhletova metoda patří mezi nejpoužívanější extrakční metody pro stanovení tuku, a proto byly sestrojeny automatizované extraktory [28][29][30].



Obrázek 14 - Soxhletův extraktor [31]

1.4.2 Metoda podle Grossfelda

Principem této metody je smíchání vzorku s kyselinou chlorovodíkovou, která slouží k hydrolyze vzorku a následuje smíchání s vodou. Tato směs se zahřeje, přidá se kongočerveň, dokud směs nezmodrá a přebytek kyseliny chlorovodíkové se neutralizuje hydroxidem sodným. Roztok se zfiltruje, promyje vodou a filtr se suší až 8 hodin v sušárně. Po usušení se vzorek vloží do patrony a dále se postupuje jako u metody podle Soxhleta [30].

1.4.3 Metoda podle Folche

Metoda je založena na extrakci směsí chloroformu a methanolu. Na rozdíl od metody podle Soxhleta je tato metoda vhodná pro vzorky s vysokým obsahem vody, jako je například maso a masné výrobky. K vhodně upravenému vzorku se přidá směs rozpouštědel chloroformu a methanolu v poměru 2:1, vše se zfiltruje a promývá se toutéž směsí. K získanému filtrátu se přidá destilovaná voda a roztok se důkladně protřepe. Vložením roztoku do centrifugy se oddělí horní a dolní fáze. V dalších krocích se používá pouze spodní fáze, která se promyje směsí chloroformu, methanolu a vody. Závěrečným krokem je oddestilování rozpouštědla ve vakuové rotační odparce a následně se baňka vloží do sušárny. Výsledný vzorek je připraven ke zvážení [27].

1.4.4 Metoda podle Röse-Gottlieba

Metoda je vhodná především pro mléčné výrobky jako například syrovátka, neslazené kondenzované mléko nebo třeba podmáslí. Princip spočívá v rozpuštění bílkovin v amoniaku, následném vyextrahování tuku rozpouštědlem a zvážení [30].

1.4.5 Metoda podle Schmid-Bondzynski-Ratzlaff

Na rozdíl od předchozí metody se pro hydrolyzu používá kyselina chlorovodíková, jinak princip je v podstatě stejný. Dalším rozdílem je její použití, v tomto případě je tato metoda použitelná pro živočišné materiály a sýry [30].

1.4.6 Metoda podle Gerbera

K tomuto stanovení tuku je zapotřebí butyrometr. Metoda se používá hlavně pro stanovení tuku v mléce, ale může se využít i pro smetanu nebo sýry. Do butyrometru se pomocí pipety přidá kyselina sírová, mléko a amylalkohol. Butyrometr se uzavře zátkou a několikrát se protřepe do úplného rozpuštění bílkovin. Obsah butyrometru se dobře promíchá a vloží do odstředivky při 1100 ± 100 otáček/min., butyrometr je ještě po odstředění zahříván na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odečtení dílků stupnice na butyrometru se získají hmotnostní procenta tuku. Pro přesnější výsledky je vhodné použít i metodu podle Röseho a Gottlieba [27].

1.4.7 Denzitometrická metoda

Metoda se používá pro semena olejnin, které se rozdrtí spolu s rozpouštědlem, v tomto případě 1,2-dichlorbenzen. Mísení probíhá v oleometru a následně se směs zfiltruje a filtrát se zváží. Je nutné vytvoření kalibrační křivky, ze které se provádí odečtení obsahu tuku, avšak pro každou olejinu je nutno vytvořit jinou kalibrační křivku [27].

1.4.8 Metody pro stanovení celkového tuku v čokoládě

Podle normy ČSN 56 0576 lze použít pro stanovení celkového tuku ve vzorcích čokolád metodu několikanásobné extrakce za studena petroletherem či metodu podle Röse-Gottlieba, avšak teplota při odpařování rozpouštědla nesmí překročit hranici $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ [32].

Mezi další použitelné metody patří extrakce podle Soxhleta. Mezi metody, které jsou šetrnější k životnímu prostředí a časově méně náročné patří metoda mikrovlnné extrakce a extrakce superkritickou tekutinou. Metody byly vyvinuty pro laboratoře, které stanovují obsah tuku v čokoládách na každodenní bázi [33]. V experimentální části byla použita Soxhletova metoda z důvodu předchozí zkušenosti z laboratoří v rámci studia.

1.5 Stanovení tukových čísel

Tuková čísla slouží ke zjištění obsahu funkčních skupin v tucích a olejích, tedy k charakterizaci jejich vlastností. V dnešní době jsou méně využívána z důvodu dokonalejších a přesnějších metod, mezi nejpoužívanější patří chromatografie [27].

1.5.1 Stanovení čísla kyselosti

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin v tuku a zároveň slouží k určení kvality přísad, které se používají při výrobě jedlých tuků. Například při použití nahnílených oliv bude číslo kyselosti olivového oleje vyšší než při použití kvalitních zralých oliv. Také platí, že čím vyšší číslo kyselosti, tím je tuk starší. Tato metoda je vhodná především pro tuky a oleje [27]. Přípustné hodnoty čísla kyselosti jsou přesně dány, a to například pro sádlo max. 1,3, pro olivový olej panenský max. 6,6 a pro rostlinné oleje rafinované max. 0,6 [34]. Postup spočívá v navážení vzorku do baňky, dále se rozpustí v nepolárním rozpouštědle (ethanol a diethylether) a následně se ztitruje hydroxidem draselným v přítomnosti vhodného indikátoru (fenolftalein nebo thymolftalein). Obsah volných mastných kyselin se rovná množství spotřebovaného hydroxidu sodného, který byl použit na neutralizaci 1 gramu vzorku [27]. Číslo kyselosti se vypočítá vynásobením molární hmotnosti hydroxidu draselného (56,11 g/mol), jeho látkovou koncentrací a objemem vyděleno hmotností vzorku, viz rovnice (1) [34].

$$\text{číslo kyselosti} = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot c_{\text{KOH}} \cdot V_{\text{KOH}}}{m_{\text{vz}}} \text{ [mg/g]} \quad (1)$$

1.5.2 Stanovení čísla zmýdelnění

Toto stanovení poskytuje obsah všech mastných kyselin ve vzorku, a to jak vázaných, tak i volných mastných kyselin [27]. Princip spočívá ve vaření vzorku pod zpětným chladičem za přítomnosti hydroxidu draselného. Přebytek hydroxidu draselného se titruje kyselinou chlorovodíkovou (V_2). Současně se provede slepý pokus stejným postupem bez přítomnosti vzorku (V_1) [35]. Jako u předchozího čísla kyselosti se výsledek vyjádří jako množství hydroxidu draselného spotřebovaného na neutralizaci 1 gramu vzorku [27]. Pod textem je uvedena rovnice (2) pro výpočet čísla zmýdelnění, kde za M_{KOH} dosadíme molární hmotnost hydroxidu draselného 56,11 g/mol, c_{HCl} je látková koncentrace použité kyseliny chlorovodíkové, m_{vz} je hmotnost vzorku, V_1 je spotřebovaný objem kyseliny chlorovodíkové při titraci slepého pokusu a V_2 při titraci vzorku [34].

$$\text{číslo zmýdelnění} = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot c_{\text{HCl}} \cdot (V_1 - V_2)}{m_{\text{vz}}} \text{ [mg/g]} \quad (2)$$

1.5.3 Stanovení hydroxylového čísla

Hydroxylovým číslem se stanoví obsah volných hydroxylových skupin. Ke vzorku se přidá acetanhydrid a vzniklý acetylovaný tuk se oddělí extrakcí hexanem. Následuje promytí organické fáze vodou, která se ztitruje hydroxidem draselným za použití indikátoru fenolftalein [35]. Slepý pokus je proveden stejným způsobem, avšak bez vzorku. Hydroxylové číslo vyjadřujeme jako obsah kyseliny octové, která reaguje s hydroxylovými skupinami v 1 gramu vzorku tuku a je shodná s počtem mg hydroxidu draselného [35]. Do rovnice (3) pro výpočet hydroxylového čísla se za V_1 dosadí počet ml spotřebovaného KOH při slepém pokusu, za V_2 spotřeba při titraci vzorku, dále se za c_{KOH} dosadí jeho látkovou koncentraci, M_{KOH} molární hmotnost a za m_{vz} hmotnost vzorku [34].

$$\text{hydroxylové číslo} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_{\text{KOH}} \cdot M_{\text{KOH}}}{m_{\text{vz}}} \text{ [mg/g]} \quad (3)$$

1.5.4 Stanovení esterového čísla

Esterové číslo vyjadřuje obsah esterově vázaných mastných kyselin. Esterové číslo se vypočítá z rozdílu čísla zmydlnění a čísla kyselosti. Výsledek je vyjádřen jako počet miligramů hydroxidu draselného, který byl potřeba na zmydlnění esterů v 1 g tuku [34][35].

1.5.5 Stanovení jodového čísla

Jodovým číslem se stanoví obsah dvojných vazeb, zároveň tedy množství nenasycených mastných kyselin. Principem této metody je navázání halogenu na dvojnou vazbu a jeho přebytek se stanoví titračně thiosíranem sodným [27]. Jodové číslo lze stanovit několika metodami, z nichž nejznámější je metoda podle Hanuše, ve které se používá jako činidlo jodmonobromid. Další často používanou metodou je podle Wijse s činidlem jodtrichlorid. Postup podle Wijse je následovný, navážka vzorku se převede do baňky se zábrusem. Přidá se chlorid uhličitý, roztok halogenu a roztok se nechá hodinu stát v temnu. Po uplynutí doby se přidá jodid draselný, voda a roztok se titruje thiosíranem sodným za přítomnosti roztoku škrobového mazu jako indikátoru. Stejný postup je proveden u slepého pokusu bez vzorku. Výsledek se vyjádří jako množství halogenu v procentech, které je schopno se navázat na daný tuk [30]. Pro výsledek doplníme do níže uvedené rovnice (4) objem spotřebovaného thiosíranu sodného pro slepý vzorek za V_1 a pro spotřebu při stanovení vzorku za V_2 (objemy dosazujeme v ml). Dále objemy vynásobíme látkovou koncentrací thiosíranu sodného ($c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$), molární hmotností halogenu (M_{I_2}), stechiometrickým poměrem a vydělené hmotností vzorku [34].

$$\text{jodové číslo} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_{Na_2S_2O_3} \cdot M_{I_2} \cdot F_t}{m_{vz}} [\%] \quad (4)$$

1.5.6 Stanovení peroxidového čísla

Principem této metody je reakce, kdy je jodid draselný zoxidován pomocí peroxidů nebo hydroxyperoxidů, které se nachází ve vzorku. Oxidace probíhá v kyselém prostředí a po přidání indikátoru škrobový maz se vyloučí jod, který se stanoví titračně za pomoci thiosíranu draselného. Peroxidové číslo se vyjadřuje pomocí jednotky $[\text{mmol } (\frac{1}{2} \text{O}_2) / \text{kg}]$, slovy vyjádřeno v milimolech aktivního kyslíku na 1 kilogram vzorku. Do rovnice (5) dosadíme za V_1 množství spotřebovaného thiosíranu sodného na vzorek a za V_2 při slepém pokusu (ml), c je látková koncentrace thiosíranu sodného a m_{vz} je hmotnost vzorku [36].

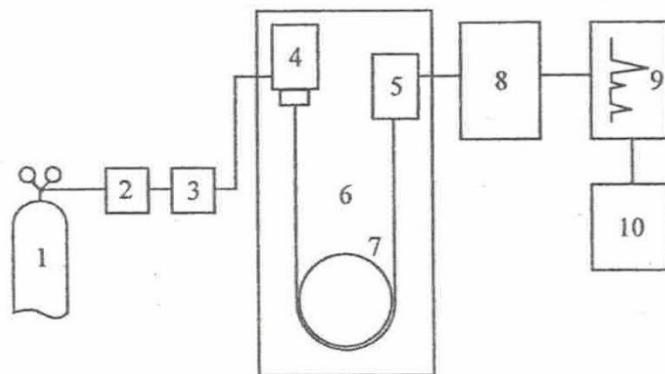
$$\text{peroxidové číslo} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot 1000}{m_{vz}} \left[\text{mmol } \left(\frac{1}{2} \text{O}_2 \right) / \text{kg} \right] \quad (5)$$

1.6 Stanovení mastných kyselin

1.6.1 Použitelné metody

1.6.1.1 Plynová chromatografie

Metodou plynové chromatografie můžeme stanovit směsi složené z kapalných, plyných i pevných látek, avšak musí mít bod varu do 400 °C. Princip spočívá v rozdělení všech elementů látky mezi pohyblivou (značeno i jako mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi [37]. Mobilní fázi je nosný plyn (vodík, helium), který musí být inertní, tedy nesmí reagovat se vzorkem. Pro stacionární fázi platí, že pokud máme polární látku, musíme zvolit polární stacionární fázi. Pro nepolární látku se zvolí nepolární stacionární fáze. Používá se dimethylpolysiloxan nebo polyethylenglykol [38]. Prvotním krokem je vstříknutí vzorku do nástřikové komory za pomoci injekční stříkačky. Plynová chromatografie je nazývána z důvodu odpaření vzorku po nástřiku a následným dělením mezi dvě fáze již ve formě plynu. Nezbytnou součástí plynového chromatografu (Obrázek 15) je detektor, díky kterému získáme chromatogram, což je graf, který udává závislost odezvu detektoru na čase [37].



Obrázek 15 - Plynový chromatograf [37]

Na Obrázku 15 je znázorněno číslem 1 (tlaková láhev s nosným plynem), 2,3 (regulátory tlaku a průtoku), 4 (injektor), 5 (detektor), 6 (termostat), 7 (kolona), 8 (zesilovač), 9 (zapisovač) a 10 (integrátor).

1.6.1.2 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Metodu plynové chromatografie s hmotností spektrometrií lze v literatuře najít také pod zkratkou GC/MS (odvozeno z anglického názvu Gas Chromatography-Mass Spectrometry). Metoda slouží ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení složek ve směsi. V praxi se využívá k detekci drog, ve forenzní chemii, pro stanovení kvality potravin nebo pro identifikaci látek ve vodě a půdě. Postup spočívá v přípravě vzorku, jeho vstříknutí do chromatografu, kde se složky oddělí a přechází do hmotnostního spektrometru v prostoru vakua. Látky přechází do ionizační komory, kde se převedou na ionty. Ionty jsou rozděleny podle poměru hmotnosti a náboji (m/z) za pomoci elektrického nebo magnetického pole. Tyto ionty jsou pomocí detektoru zachyceny v podobě signálu a následně vyhodnoceny počítačem. Dnes už existují databáze s velkým množstvím standardů, které usnadní identifikaci složek směsi, což patří mezi výhody této metody [38].

1.7 Úprava mastných kyselin pro stanovení

Před samotným stanovením je zapotřebí mastné kyseliny převést na methylestery, se kterými lze dále pracovat. Mastné kyseliny se určují podle výsledných retenčních časů a ploch píků na chromatogramu [30]. Postup je následovný, ke vzorku tuku s obsahem mastných kyselin se přidá fluorid boritý, methanol a směs se zahřívá 1 hodinu při teplotě 90–110 °C. Následná extrakce methylesterů se provádí za pomoci přidaného hexanu a po oddělení fází, které trvá několik desítek minut, se může rovnou vstříknout horní oddělená fáze do plynového chromatografu. Stanovení mastných kyselin probíhá v plynovém chromatografu za přítomnosti plamenově ionizačního detektoru, kapilární kolony a s použitím standardů mastných kyselin.

Z chromatogramu se odečte procentuální zastoupení přítomných mastných kyselin ve vzorku [39].

2 Experimentální část

2.1 Stanovení celkového tuku podle Soxhleta

Stanovení celkového tuku bylo provedeno metodou podle Soxhleta podle postupů z předmětu Laboratoř analýzy potravin [36].

2.1.1 Přístroje a zařízení

- Aparatura pro Soxhletovu extrakci
- Extrakční patrony
- Obvazová vata
- Destilační baňky
- Skleněné kuličky
- Sušárna
- Exsikátor
- Analytické váhy (výrobce KERN)
- Kádinka (200 ml)

2.1.2 Chemikálie

- Petrolether

2.1.3 Vzorky

Pro stanovení celkového tuku bylo použito 6 čokolád, které byly zakoupeny v několika obchodních řetězcích. Pro stanovení byla vybrána jak hořká, tak i mléčná a bílá čokoláda. Vzorky čokolád a jejich charakteristika je uvedena v Tabulce 3. Složení vzorků čokolád je uvedeno v Příloze A.

Tabulka 3 - Charakteristika použitých vzorků

Číslo vzorku	Název produktu	Druh čokolády
1	Milk chocolate Fin Carré	Mléčná
2	J. D. Gross Arriba 85 % cacao	Hořká
3	Milka white chocolate	Bílá
4	Cooking Chocolate Fin Carré	Hořká
5	J. D. Gross Raspberry 70 % cacao	Hořká
6	J. D. Gross Amazonas 60 % cacao	Hořká

2.1.4 Pracovní postup

Na analytických vahách bylo naváženo 5 g vzorku (s přesností na 4 desetinná místa) a kvantitativně vpraven do extrakční patrony, v níž byl ve spodní části kousek vaty. Nad vzorek byl opět vložen kousek vaty. Patrona byla vložena do Soxhletova extraktoru, který byl nasazen na předem zváženou a vysušenou destilační baňku s dvěma skleněnými kuličkami. Horní částí bylo do extraktoru nalito 150 ml petroletheru a následně byl připojen zpětný chladič. Aparatura pro Soxhletovu extrakci byla zpočátku nastavena na 100% výkon topné desky a po cca 15 minutách byl snížen na 40% výkon. Po skončení extrakce (3 hodiny) bylo vypouštěno rozpouštědlo výpustním kohoutem do předem připravené nádoby. Destilační baňka s vyextrahovaným tukem byla vložena na 15 minut do sušárny při teplotě 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru byla baňka zvážena na analytických vahách a následně byl vypočítán obsah tuku.

2.2 Stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorku

Stanovení obsahu mastných kyselin bylo provedeno pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Postup byl použit z diplomové práce Bc. Michaely Kamenické [40].

2.2.1 Přístroje a zařízení

- Plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostní detektor Agilent 5977A – elektronová ionizace a kvadrupólový analyzátor (Agilent Technologies, USA)
- Termoblok IKA 1 (IKA Dry Block Heater 1) (IKA, Staufen, Německo)

2.2.2 Chemikálie

- Methanolát sodný, 95 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chlorid sodný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Helium 5.0 (Linde Gas, Praha, ČR)
- n-hexan ≥ 98 % (Merck, Darmstadt, Německo)

2.2.3 Vzorky

Pro stanovení obsahu mastných kyselin byly použity vyextrahované tuky ze vzorků čokolád (kapitola 2.1.3).

2.2.4 Pracovní postup

Po navážení cca 25 mg tuku do vialky bylo přidáno 1,5 ml 0,25 M methanolického roztoku methanolátu sodného. Vialka byla po uzavření protřepána a vložena do termobloku na 20 minut vytemperovaného na 60 °C. Po vychladnutí vialky ke vzorku napipetován 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 2 ml hexanu. Po protřepání došlo k oddělení dvou fází a vrchní hexanová vrstva byla odpipetována přes stříkačkový filtr do vialky pro GC/MS analýzu (chromatografické podmínky jsou uvedeny v Tabulce 4). Každý vzorek byl dvakrát proměřen.

Tabulka 4 - Chromatografické podmínky

Kolona	SLB®-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)
Mobilní fáze a její průtok	Helium, 1 ml/min
Objem nástřiku a splitovací poměr	1 µl, 10
Teplota nástřiku	250 °C
Teplotní program	70 °C 3 min, gradient 90 °C/min na 160 °C, 160 °C 2 min, 3 °C/min na 250 °C, 250 °C 5 min
Teplota MSD Transfer line	300 °C
Podmínky MS s EI ionizací	Ionizace: pozitivní elektronová ionizace, 70 eV Teplota MS zdroje: 300 °C Teplota MS kvadrupólu: 150 °C Skenovací rozsah: 40–500 m/z Izolační šířka: 0.1 m/z Rychlost skenování: 6 skenů/min Solvent delay: 3 min

3 Výsledky a diskuze

Cílem experimentální práce bylo stanovení celkového tuku v různých typech čokolád a porovnání s deklarovanými hodnotami na obale. Dalším cílem bylo zjištění zastoupení přítomných mastných kyselin v již vyextrahovaném tuku z čokolád. Všechna měření byla provedena na 6 vzorcích čokolád. Výsledky byly zpracovány formou tabulek a chromatogramů, z nichž každý vzorek byl proměřen dvakrát.

3.1 Stanovení celkového tuku

Obsah celkového tuku byl stanoven metodou podle Soxhleta, jejíž principem je extrakce tuku nepolárním rozpouštědlem, které se zahřeje na svou teplotu varu. Rozpouštědlo postupně kondenzuje v chladiči, zkapává na vzorek umístěný v papírové patroně a extrahuje látky tukové povahy. Když rozpouštědlo naplní prostor s patronou, přepadává a nese s sebou do destilační baňky i tuky. Tento proces se několikrát za dobu extrakce opakuje. Extrakce trvá přibližně 3 hodiny a po této době se začne odpouštět rozpouštědlo. Vyextrahovaný tuk v destilační baňce se vloží do sušárny, exsikátoru a zváží. Podrobný postup uveden v kapitole 2.1.4.

Obecný výpočet obsahu celkového tuku (%), kde m_2 je hmotnost destilační baňky s vyextrahovaným tukem, m_1 je hmotnost prázdné destilační baňky a m_{vz} je hmotnost vzorku je dán vztahem (6):

$$x = \frac{m_2 - m_1}{m_{vz}} \cdot 100 \quad (6)$$

Každý vzorek byl podroben analýze dvakrát a získané výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 5.

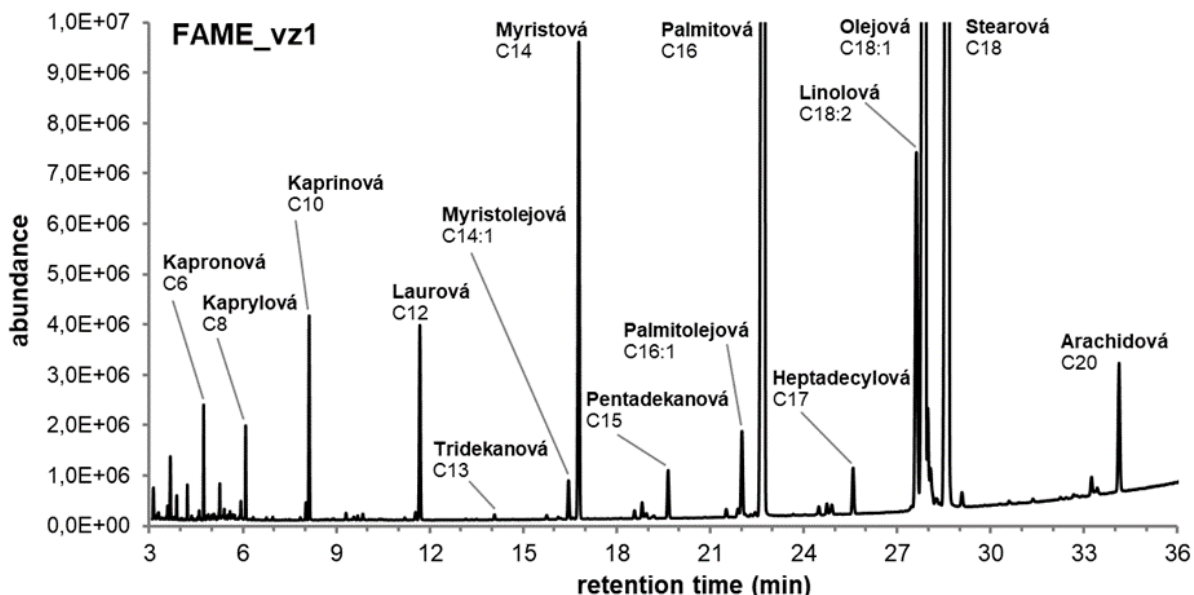
Tabulka 5 - Obsah celkového tuku ve vzorcích

Vzorek	Obsah celkového tuku (%)				
	1. měření	2. měření	Průměr	údaj na obalu	zjištěný rozdíl
1	21,34	22,20	21,77	29,7	-7,93
2	37,38	43,30	40,34	46,8	-6,46
3	35,35	37,22	36,29	35,0	+1,29
4	24,97	25,35	25,16	28,0	-2,84
5	36,42	37,06	36,74	39,3	-2,56
6	41,13	40,16	40,65	41,0	-0,35

Rozsah obsahu celkového tuku ve vzorcích čokolád byl velice široký, cca 21–40 %. Průměrný obsah celkového tuku u všech vzorků v porovnání s obalem vyšel nižší až na vzorek č. 3 (Milka white chocolate). Z průměrů hodnot vyplývá, že stanovení a hodnota na obale se nejvíce shoduje u vzorku 6 (J. D. Gross Amazonas 60 % cacao). Naopak nejvyšší rozdíl (-7,93 %) byl stanoven u vzorku č. 1 (Milk chocolate Fin Carré). Nejvyšší průměrný obsah celkového tuku ze všech vzorků (40,65 %) byl stanoven u vzorku 6 (J. D. Gross Amazonas 60 % cacao). Nejnižší obsah celkového tuku, pouze 21,77 %, byl stanoven u vzorku č. 1 (Milk chocolate Fin Carré).

3.2 Stanovení obsahu mastných kyselin

Principem stanovení zastoupení mastných kyselin v triacylglycerolech je převedení mastných kyselin z tuku na těkavé methylestery. Toto převedení bylo provedeno pomocí methanolického roztoku methanolátu sodného za zvýšené teploty. Následovalo přidání roztoku chloridu sodného, hexanu a po oddělení dvou fází byla horní hexanová vrstva použita pro GC/MS analýzu (přesný postup v kapitole 2.2.4). Výsledné píky daných methylesterů byly identifikovány na základě retenčních časů a porovnáním s databází spekter (NIST Mass Spectrometry Data Center). Ukázkový chromatogram pro vzorek č.1 je uveden na Obrázku 16.



Obrázek 16 - GC/MS separace methylesterů mastných kyselin získaných ze vzorku 1

Retenční časy jednotlivých esterů mastných kyselin jsou uvedeny v Tabulce 6. Procentuální zastoupení mastných kyselin bylo vypočítáno na základě ploch píků. Relativní procentuální zastoupení bylo vypočteno pomocí ploch píků a odezvoých faktorů (*RF*, Tabulka 6), které byly převzaty z diplomové práce Michaely Kamenické [40].

Tabulka 6 - Charakteristika methylesterů mastných kyselin [40]

Číslo píku	Ester kyseliny	Vzorec	Retenční čas [min]	Odezvový faktor RF
1	Kapronová	C6:0	4,73	2,41
2	Kaprylová	C8:0	6,07	1,69
3	Kaprinová	C10:0	8,09	1,43
4	Laurová	C12:0	11,62	1,22
5	Tridekanová	C13:0	14,02	1,09
6	Myristolejová	C14:1	16,37	1,10
7	Myristová	C14:0	16,69	1,10
8	Pentadekanová	C15:0	19,56	0,99
9	Palmitolejová	C16:1	21,92	1,00
10	Palmitová	C16:0	22,63	1,01
11	Heptadecylová	C17:0	25,49	0,87
12	Linolová	C18:2	27,52	0,98
13	Olejová	C18:1	27,82	0,89
14	Stearová	C18:0	28,57	0,85
15	Arachidová	C20:0	34,05	0,71

Obecný výpočet procentuálního zastoupení mastných kyselin (%), kde A_i je plocha píku daného methylesteru mastné kyseliny a $\sum A_i$ je součet ploch všech píků methylesterů [40]:

$$x = \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100 \quad (7)$$

Obecný výpočet relativního procentuálního zastoupení mastných kyselin ve vzorcích, kde A_i je plocha píku dané mastné kyseliny, $\sum A_i$ je součet všech píků a RF je odezvový faktor [40]:

$$rel. \% = RF \cdot \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100 \quad (8)$$

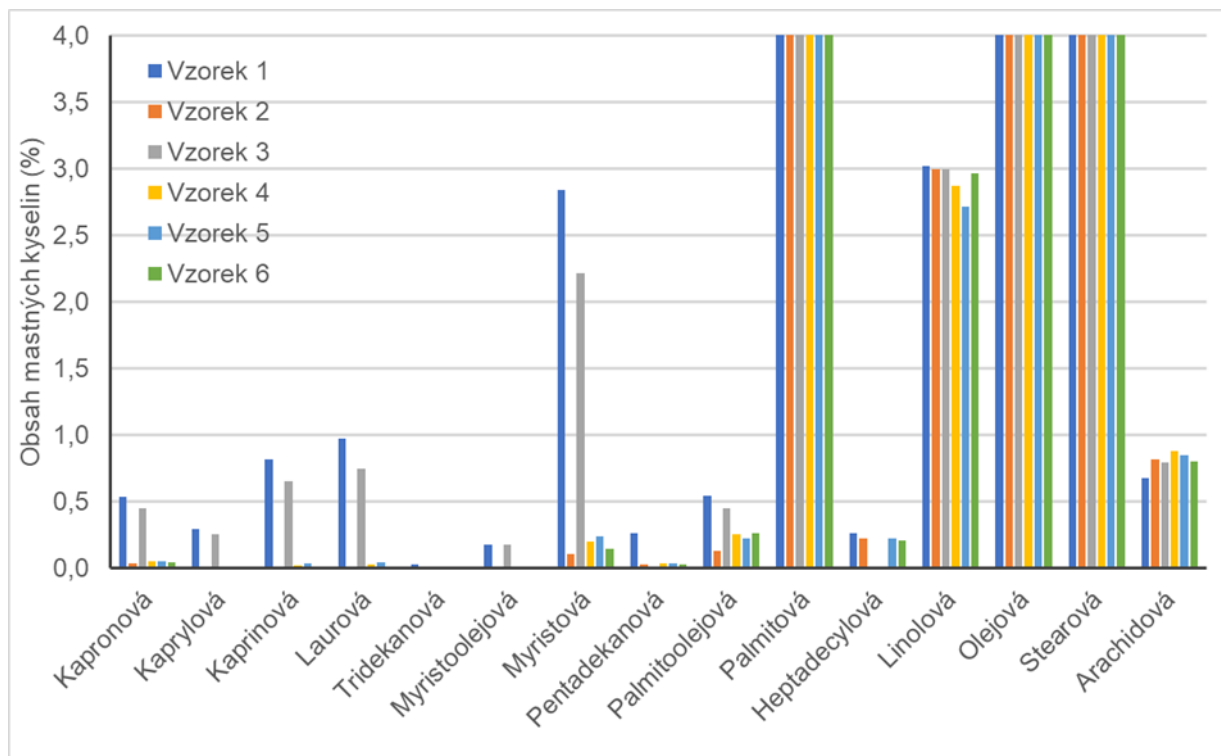
V Tabulce 7 je uvedeno průměrné zastoupení mastných kyselin s odezovým faktorem. Výsledky měření pro každý vzorek, jak s procentuálním, tak s relativním procentuálním zastoupením mastných kyselin jsou uvedeny v Tabulkách 8–13 v Příloze B.

Tabulka 7 - Průměrné zastoupení mastných kyselin s odezvoým faktorem

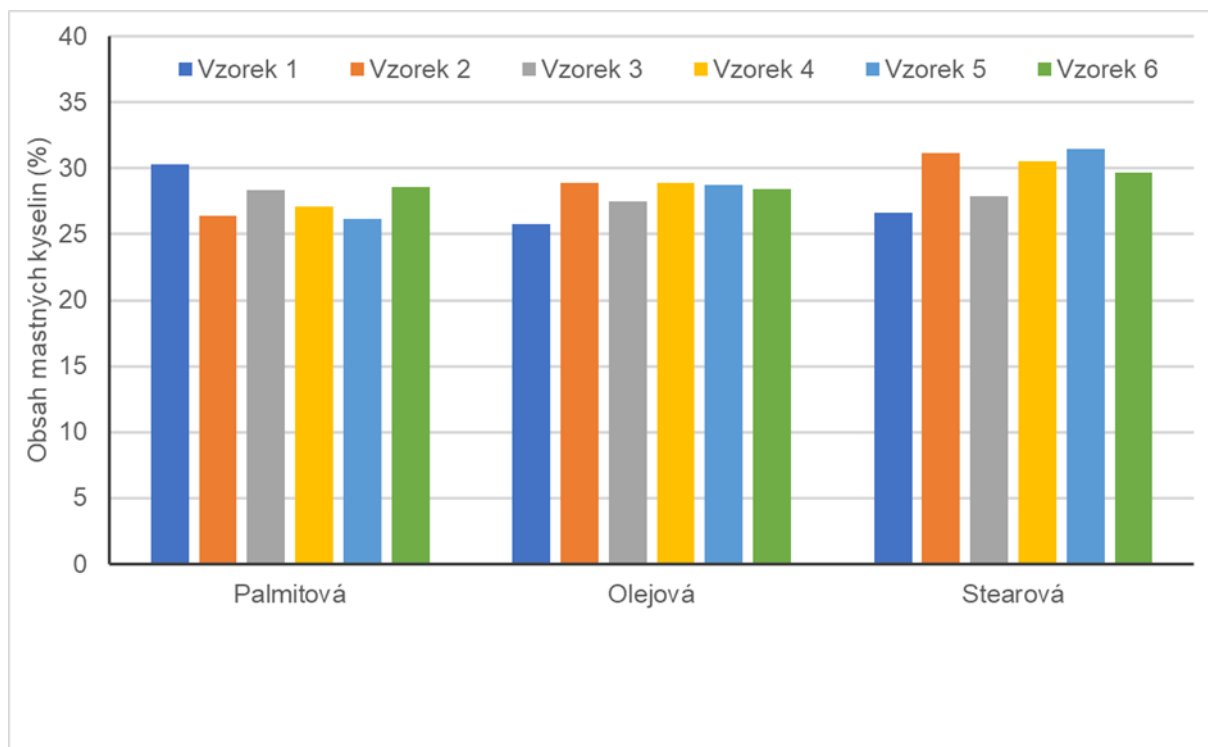
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Kapronová	0,54	0,04	0,45	0,05	0,05	0,04
Kaprylová	0,29	0,01	0,26	0,01	0,01	0,01
Kaprinová	0,82	0,00	0,66	0,02	0,04	0,01
Laurová	0,98	0,01	0,75	0,03	0,05	0,02
Tridekanová	0,03	-	-	-	-	-
Myristolejová	0,18	-	0,18	0,01	0,01	-
Myristová	2,84	0,11	2,21	0,20	0,24	0,14
Pentadekanová	0,26	0,03	-	0,04	0,04	0,03
Palmitolejová	0,54	0,13	0,45	0,26	0,23	0,26
Palmitová	30,33	26,43	28,35	27,12	26,15	28,56
Heptadecylová	0,26	0,23	-	-	0,23	0,21
Linolová	3,02	3,00	2,99	2,87	2,72	2,97
Olejová	25,76	28,87	27,52	28,92	28,73	28,40
Stearová	26,63	31,14	27,88	30,53	31,46	29,71
Arachidová	0,68	0,82	0,80	0,88	0,85	0,80

Z Tabulky 7 a Obrázku 17, 18 vyplývá, že nejvyšší relativní procentuální zastoupení mastných kyselin v čokoládách měla kyselina palmitová, olejová a stearová bez ohledu na druhu čokolády. Všechny tyto tři mastné kyseliny patří v kakaovém másle mezi majoritní (viz Tabulka 2). Obsah kyseliny palmitové byl ve vzorcích v rozmezí 26,15–30,33 %, obsah kyseliny olejové 25,76–28,92 % a obsah kyseliny stearové v rozmezí 26,63–31,46 %. Lze tedy předpokládat, že ve všech analyzovaných vzorcích bylo jako základ použito kakaové máslo. U vzorku č. 1 (Milk chocolate Fin Carré) a č.3 (Milka white chocolate) byl zjištěn vyšší obsah kyseliny laurové (0,75–0,98 %), myristové (2,21–2,84 %) a dalších nasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem (Obrázek 18), které se běžně v kakaovém másle prakticky nevyskytují (v množství do 0,1 %). Výskyt těchto mastných kyselin by mohl odpovídat použití nejen kakaového másla, ale i mléčného tuku (viz Příloha A). U vzorku č. 1 (Milk chocolate Fin Carré) a č. 3 (Milka white chocolate) byl stanoven nejvyšší obsah většiny minoritních mastných kyselin ve srovnání s ostatními vzorky. U vzorku č. 5 (J. D. Gross Raspberry 70 % cacao) bylo sice také stanoveno vyšší procento kyseliny myristové (0,24 %), avšak na obale je uvedeno, že kousky malin obsahují palmový tuk, ze kterého pravděpodobně pochází. Obecně lze říct, že z analyzovaných vzorků se jeví jako nejkvalitnější čokolády značky J. D. Gross a Cooking Chocolate Fin Carré, které obsahují i dle obalu kakaové máslo a jedná se o hořké čokolády. U čokolád (Milk

chocolate Fin Carré, Milka white chocolate) bylo použito kakaové máslo i mléčný tuk, čemuž odpovídá vyšší obsah kyseliny laurové, myristové a dalších minoritních mastných kyselin.



Obrázek 17 - Grafické znázornění obsahu mastných kyselin ve vzorcích



Obrázek 18 - Grafické znázornění obsahu majoritních mastných kyselin ve vzorcích

4 Závěr

V teoretické části se bakalářská práce věnuje čokoládě, její historii a popisu výroby. Mimo jiné je v této části charakterizován tuk z pohledu mastných kyselin, které jsou dále rozděleny na základě výskytu dvojných vazeb v řetězci. Dále jsou definovány metody pro stanovení celkového tuku a jeho vlastnosti.

Cílem experimentální části bylo stanovit celkový tuk ve vzorcích čokolád, přičemž byla použita metoda podle Soxhleta. Obsah celkového tuku byl stanoven u většiny vzorků nižší, než uvádí výrobce na obalech. Při porovnání obsahu celkového tuku ve vzorcích čokolád bylo zjištěno, že nejvíce tuku obsahují hořké čokolády značky J. D. Gross (36,74–40,65 %). Naopak nejméně tuku bylo stanoveno u Milk chocolate Fin Carré (21,77 %).

Dalším cílem bylo zjistit pomocí metody GC/MS procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných vzorcích čokolád. Z celkových 15 mastných kyselin ve vzorcích čokolád bylo zjištěno, že nejvyšší procentuální zastoupení vykazuje mastná kyselina palmitová, stearová a olejová. Lze tedy říct, že všechny druhy čokolád obsahují kakaové máslo. Čokoláda Milk chocolate Fin Carré a Milka white chocolate obsahují kakaové máslo i mléčný tuk, čemuž odpovídá vyšší obsah kyseliny laurové (0,75–0,98 %), myristové (2,21–2,84 %) a dalších minoritních mastných kyselin. Závěrem mohu konstatovat, že čokolády obsahující pouze kakaové máslo jsou cenově dražší, avšak kvalitnější. Čokolády značky J. D. Gross a Cooking Chocolate Fin Carré tedy můžeme považovat z těchto vzorků za nejkvalitnější.

5 Seznam použité literatury

- [1] VERNA, Roberto. The history and science of chocolate. *The Malaysian Journal of Pathology*. 2013, **35**(2), 111–113. ISSN 0126-8635.
- [2] HERBÁŘ WENDYS. *Theobroma cacao – Kakaovník pravý* [online]. 10. 12. 2015 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://botanika.wendys.cz/index.php/19-fr-polivka-uzitkove-a-pametihodne-rostliny-cizich-zemi/982-kakaovnik-pravy-theobroma-cacao>
- [3] ČOKO MUZEUM. *Historie čokolády* [online]. Tábor: Muzeum čokolády a marcipánu, 2020 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.cokomuzeum.cz/cz/muzeum/historie/historie-cokolady>
- [4] TANNENBAUM, Ginger. Chocolate: a Marvelous Natural Product of Chemistry. *Journal of Chemical Education*. 2004, **81**(8), 1131. ISSN 0021-9584.
- [5] BRETSCHNEIDER, Rudolf a Jana ČOPÍKOVÁ. *Technologie cukrovarnictví: technologie cukrovinek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984.
- [6] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-7080-509-9.
- [7] KUS KAKAA. *Vše o kakau... 100% ceremoniální kakao* [online]. 2021 [cit. 2021-05-06]. Dostupné z: <https://www.kuskakaa.cz/vse-o-kakau/>
- [8] SLUKOVÁ, Marcela. *Výroba potravin a nutriční hodnota*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-947-1.
- [9] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [10] SONWAI, Sopark, Phimnipha KAPHUEAKNGAM a Adrian POVODENĚ. „Míchání tuku z mangového jádra a palmového oleje ve střední frakci za účelem získání ekvivalentu kakaového másla“. *Journal of Food Science and Technology*. 2012, **51**(10), 2357–2369. ISSN 0022-1155.
- [11] TAUFEROVÁ, Alexandra et al. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie [cit. 2021-05-02]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/rostliny-technologie_a_hyg._potravin,skripta.pdf
- [12] FZV. *Lipidy (tuky)* [online]. Fórum zdravé výživy, 2021 [cit. 2021-04-06]. Dostupné z: <https://www.fzv.cz/lipidy-tuky/>

- [13] MENDELU. *Biochemie přednášky: Jednoduché lipidy* [online]. Brno: Mendelova univerzita, 2021 [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1529&typ=html
- [14] DOSTÁLOVÁ, Jana. Tuky v potravinách a jejich nutriční hodnocení. *Interní medicína pro praxi*. 2011, **13**(9), 347–349. ISSN 1803-5256.
- [15] E-CHEMBOOK. *Biochemie: Lipidy* [online]. Multimediální učebnice chemie [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/cz/biochemie/Lipidy.pdf>
- [16] ELUC. *Lipidy: Rozdělení lipidů* [online]. Elektronická učebnice [cit. 2021-05-12]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2487>
- [17] MOJE CHEMIE. *Biochemie: Lipidy* [online]. 2012 [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: <http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Lipidy>
- [18] ARNDT, Tomáš. „Hodný“ HDL cholesterol a „zlý“ LDL cholesterol. *Celostní medicína* [online]. Informační server o zdraví, 2016 [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/hodny-hdl-cholesterol-a-zly-ldl-cholesterol.htm>
- [19] TEPLÁ, Milada. Biochemie: základní kapitoly – Přírodní látky: Lipidy. *Studium biochemie* [online]. Biochemie – vzdělávací portál [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_lipidy.html
- [20] GROFOVÁ, Zuzana. Mastné kyseliny. *Medicína pro praxi*. 2010, **7**(10), 388–390. ISSN 1214-8687.
- [21] MUCHOVÁ, Lucie. *Metabolismus a biochemie trávení lipidů* [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/3651/metabolismus-a-biochemie-traveni-lipidu.pdf>
- [22] MENDELU. *Základy výživy člověka* [online]. Brno: Mendelova univerzita, 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3552&typ=html
- [23] SPOLEČNOST PRO VÝŽIVU. *Encyklopedie výživy: PUFA* [online]. 10. 5. 2017 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/pufa/>
- [24] MELO, de Calionara Waleska Barbosa et al. Chemical composition and fatty acids profile of chocolates produced with different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. *Food Science and Technology*. 2020, **40**(2), 326–333. ISSN 0101-2061.
- [25] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. 3. rozš. a přeprac. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [26] NAIK, Bindu a Vijay KUMAR. Cocoa butter and its alternatives: A review. *Journal of Engineering and Technology Management*. 2014, **1**(2), 7–17. ISSN 0923-4748.

- [27] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2000. ISBN 80-902775-3-5.
- [28] DONATO, P., P., DUGO, P. a L. MONDELLO. Separation of Lipids. In: FANALI, Salvatore et al. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2013, 203–248. ISBN 978-0-124158078. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00009-7>.
- [29] LÓPEZ-BASCÓN, M. A. a M. D. Luque DE CASTRO. Soxhlet extraction. In: COLIN, Poole. *Liquid-Phase Extraction*. Elsevier, 2020, s. 327–354. ISBN 978-0-128169117. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>.
- [30] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1977.
- [31] PEČIVOVÁ, Markéta a Thi Thu Huong NGUYEN. *Biochemická cvičení*. Ústí nad Labem: Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, 2010. ISBN 978-80-7414-223-9.
- [32] ČSN 56 0576. *Čokoláda a čokoládové cukrovinky – Stanovení obsahu mléčného tuku*. Praha: ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT, 2000.
- [33] SIMONEAU, Catherine et al. Comparison of classical and alternative extraction methods for the quantitative extraction of fat from plain chocolate and the subsequent application to the detection of added foreign fats to plain chocolate formulations. *Food research international*. 2000, **33**(9), 733–741. ISSN 0963-9969.
- [34] HÁJEK, Tomáš. *Přednášky předmětu Chemie a analýza potravin*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020.
- [35] KLECKEROVÁ, Andrea. *Chemie potravin: laboratorní cvičení*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-170-3.
- [36] ADAM, Martin. *Návody předmětu Laboratoř analýzy potravin*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020.
- [37] KROFTA, Jiří. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-451-3.
- [38] BRUNO, Thomas J., Ryan DEACON, Jeffrey A. JANSEN, Neal MAGDEFRAU, Erik MUELLER, George F. VANDER VOORT a Dehua YANG. *ASM Handbook®*, Volume 10 – *Materials Characterization*. ASM International, 2019. ISBN 978-1-62708-211-2. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpASMHVM2B/asm-handbook-volume-10/asm-handbook-volume-10>.
- [39] KANG, Jing a Jingdong WANG. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochemistry*. 2005, **6**(5). ISSN 1471-2091.

[40] KAMENICKÁ, Michaela. *Analýza mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC-MS* [online]. Pardubice, 2020 [cit. 2021-06-27]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/0qm5dq/>. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Blanka Švecová, Ph.D.

6 Přílohy

Příloha A – Složení vzorků čokolád použitých v experimentální části	48
Příloha B – Výsledky měření metody GC/MS	49

Příloha A – Složení vzorků čokolád použitých v experimentální části

Vzorek 1 - Milk chocolate Fin Carré

Složení: Cukr, kakaové máslo, 13 % sušené odstředěné mléko, kakaová hmota, sušená sladká syrovátka, mléčný tuk, lískooříšková pasta, emulgátor: slunečnicový lecitin, přírodní aroma.

Vzorek 2 - J. D. Gross Arriba 85 % cacao

Složení: Kakaová hmota, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku, kakaové máslo, cukr, emulgátor: lecitiny (obsahují sóju); vanilkový extrakt.

Vzorek 3 - Milka white chocolate

Složení: Cukr, kakaové máslo, sušené odstředěné mléko, sušená syrovátka (mléko), mléčný tuk, emulgátor (sójový lecitin), přírodní aroma.

Vzorek 4 - Cooking Chocolate Fin Carré

Složení: Cukr, kakaová hmota, kakaové máslo, emulgátor: slunečnicový lecitin, přírodní vanilkové aroma.

Vzorek 5 - J. D. Gross Raspberry 70 % cacao

Složení: Kakaová hmota, cukr, kakaové máslo, glukózo-fruktózový sirup, rýžová mouka, 0,5 % malinová dřev z koncentrátu, emulgátor: lecitiny (obsahují sóju); palmový tuk (v kouscích malin), přírodní aroma, rýžový škrob, zahušťovadlo: pektiny; kyselina citrónová, extrakt z vanilky, šťáva z koncentrátu černé mrkve.

Vzorek 6 - J. D. Gross Amazonas 60 % cacao

Složení: Kakaová hmota, cukr, kakaové máslo, emulgátor: lecitiny (obsahují sóju).

Příloha B – Výsledky měření metody GC/MS

Tabulka 8 - Výsledky měření pro vzorek 1

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	2 343 801,4	2 343 801,4	0,218	0,226	0,22	0,54
Kaprylová	C8:0	2	6,07	1 819 439,9	1 819 439,9	0,169	0,176	0,17	0,29
Kaprinová	C10:0	3	8,1	6 932 072,2	5 139 978,7	0,645	0,496	0,57	0,82
Laurová	C12:0	4	11,64	9 902 845,9	6 999 032,6	0,922	0,676	0,80	0,98
Tridekanová	C13:0	5	14,02	311 110,1	311 110,1	0,029	0,030	0,03	0,03
Myristolejová	C14:1	6	16,38	1 719 338,0	1 719 338,0	0,160	0,166	0,16	0,18
Myristová	C14:0	7	16,72	31 318 089,5	23 121 443,9	2,915	2,232	2,57	2,84
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	3 180 857,8	2 463 136,3	0,296	0,238	0,27	0,26
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	5 740 439,7	5 740 439,7	0,534	0,554	0,54	0,54
Palmitová	C16:0	10	22,66	316 932 342,6	316 932 342,6	29,496	30,593	30,04	30,33
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	3 427 290,9	2 998 833,9	0,319	0,289	0,30	0,26
Linolová	C18:2	12	27,54	33 856 117,5	31 195 973,5	3,151	3,011	3,08	3,02
Olejová	C18:1	13	27,82	305 436 814,6	305 436 814,6	28,426	29,483	28,95	25,76
Stearová	C18:0	14	28,58	341 533 487,8	319 701 800,7	31,786	30,860	31,32	26,63
Arachidová	C20:0	15	34,07	10 038 711,4	10 035 017,1	0,934	0,969	0,95	0,68

Tabulka 9 - Výsledky měření pro vzorek 2

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	145342,46	141477,98	0,015	0,015	0,01	0,04
Kaprylová	C8:0	2	6,07	40030,59	42915,87	0,004	0,004	0,00	0,01
Kaprinová	C10:0	3	8,1	22109,71	14800,01	0,002	0,002	0,00	0,00
Laurová	C12:0	4	11,64	46977,93	36048,05	0,005	0,004	0,00	0,01
Tridekanová	C13:0	5	14,02	-	-	-	-	-	-
Myristolejová	C14:1	6	16,38	-	-	-	-	-	-
Myristová	C14:0	7	16,72	1058653,64	877869	0,110	0,092	0,10	0,11
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	300643,35	279918,93	0,031	0,029	0,03	0,03
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	161344,38	2295488,38	0,017	0,240	0,13	0,13
Palmitová	C16:0	10	22,66	250567976,9	250567976,9	26,119	26,223	26,17	26,43
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	2530524,31	2458639,72	0,264	0,257	0,26	0,23
Linolová	C18:2	12	27,54	28225721,41	30355983,2	2,942	3,177	3,06	3,00
Olejová	C18:1	13	27,82	311547891,1	309644611,5	32,475	32,405	32,44	28,87
Stearová	C18:0	14	28,58	354230317,3	347305176,8	36,924	36,347	36,64	31,14
Arachidová	C20:0	15	34,07	10471391,46	11510695,19	1,092	1,205	1,15	0,82

Tabulka 10 - Výsledky měření pro vzorek 3

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	1 687 750,5	1 710 962,5	0,185	0,187	0,19	0,45
Kaprylová	C8:0	2	6,07	1 393 249,3	1 402 693,8	0,153	0,153	0,15	0,26
Kaprinová	C10:0	3	8,1	4 239 122,5	4 164 279,9	0,464	0,455	0,46	0,66
Laurová	C12:0	4	11,64	5 648 729,3	5 519 321,0	0,619	0,603	0,61	0,75
Tridekanová	C13:0	5	14,02	-	-	-	-	-	-
Myristolejová	C14:1	6	16,38	1 507 315,0	1 507 315,0	0,165	0,165	0,16	0,18
Myristová	C14:0	7	16,72	18 568 376,0	18 201 808,2	2,033	1,990	2,01	2,21
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	-	-	-	-	-	-
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	4 073 880,6	4 132 284,9	0,446	0,452	0,45	0,45
Palmitová	C16:0	10	22,66	255 929 591,4	257 177 645,6	28,026	28,115	28,07	28,35
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	-	-	-	-	-	-
Linolová	C18:2	12	27,54	27 661 914,1	28 171 996,4	3,029	3,080	3,05	2,99
Olejová	C18:1	13	27,82	282 569 434,5	282 569 434,5	30,943	30,891	30,92	27,52
Stearová	C18:0	14	28,58	299 789 925,6	299 789 925,6	32,829	32,773	32,80	27,88
Arachidová	C20:0	15	34,07	10 113 802,2	10 385 215,4	1,108	1,135	1,12	0,80

Tabulka 11 - Výsledky měření pro vzorek 4

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	224 167,4	224 167,4	0,021	0,020	0,02	0,05
Kaprylová	C8:0	2	6,07	59 669,3	59 669,3	0,005	0,005	0,01	0,01
Kaprinová	C10:0	3	8,1	193 044,5	179 216,0	0,018	0,016	0,02	0,02
Laurová	C12:0	4	11,64	279 808,0	262 693,5	0,026	0,024	0,02	0,03
Tridekanová	C13:0	5	14,02	-	-	-	-	-	-
Myristolejová	C14:1	6	16,38	59 261,7	59 261,7	0,005	0,005	0,01	0,01
Myristová	C14:0	7	16,72	2 035 138,6	2 057 275,3	0,186	0,186	0,19	0,20
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	444 137,1	423 989,3	0,041	0,038	0,04	0,04
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	2 838 243,0	2 823 108,1	0,260	0,255	0,26	0,26
Palmitová	C16:0	10	22,66	291 621 977,7	299 165 940,8	26,679	27,032	26,86	27,12
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	-	-	-	-	-	-
Linolová	C18:2	12	27,54	32 979 477,1	31 544 636,6	3,017	2,850	2,93	2,87
Olejová	C18:1	13	27,82	355 718 848,8	359 071 686,9	32,543	32,445	32,49	28,92
Stearová	C18:0	14	28,58	393 001 105,7	397 160 965,3	35,953	35,886	35,92	30,53
Arachidová	C20:0	15	34,07	13 630 700,9	13 689 485,7	1,247	1,237	1,24	0,88

Tabulka 12 - Výsledky měření pro vzorek 5

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	217 591,9	214 868,7	0,021	0,021	0,02	0,05
Kaprylová	C8:0	2	6,07	94 988,9	86 426,2	0,009	0,008	0,01	0,01
Kaprinová	C10:0	3	8,1	275 090,0	297 304,2	0,027	0,029	0,03	0,04
Laurová	C12:0	4	11,64	345 691,0	429 113,9	0,034	0,041	0,04	0,05
Tridekanová	C13:0	5	14,02	-	-	-	-	-	-
Myristolejová	C14:1	6	16,38	109 290,5	89 183,5	0,011	0,009	0,01	0,01
Myristová	C14:0	7	16,72	2 253 214,7	2 220 872,0	0,220	0,215	0,22	0,24
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	408 317,8	394 062,7	0,040	0,038	0,04	0,04
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	2 349 303,7	2 339 092,4	0,230	0,226	0,23	0,23
Palmitová	C16:0	10	22,66	265 310 842,0	267 105 307,2	25,957	25,829	25,89	26,15
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	2 690 185,8	2 690 185,8	0,263	0,260	0,26	0,23
Linolová	C18:2	12	27,54	28 370 711,1	28 671 451,4	2,776	2,773	2,77	2,72
Olejová	C18:1	13	27,82	329 504 028,5	334 206 096,4	32,237	32,318	32,28	28,73
Stearová	C18:0	14	28,58	377 996 886,6	383 051 864,5	36,981	37,041	37,01	31,46
Arachidová	C20:0	15	34,07	12 200 084,0	12 329 153,3	1,194	1,192	1,19	0,85

Tabulka 13 - Výsledky měření pro vzorek 6

				měření 1	měření 2	měření 1	měření 2	průměr	s RF
Mastná kyselina		Pík	RT	Plocha	Plocha	%	%	%	%
Kapronová	C6:0	1	4,73	177 842,4	168 278,6	0,018	0,016	0,02	0,04
Kaprylová	C8:0	2	6,07	32 357,2	32 357,2	0,003	0,003	0,00	0,01
Kaprinová	C10:0	3	8,1	64 107,9	64 236,9	0,006	0,006	0,01	0,01
Laurová	C12:0	4	11,64	120 890,3	159 387,1	0,012	0,016	0,01	0,02
Tridekanová	C13:0	5	14,02	-	-	-	-	-	-
Myristolejová	C14:1	6	16,38	-	-	-	-	-	-
Myristová	C14:0	7	16,72	1 234 667,2	1 429 010,5	0,123	0,139	0,13	0,14
Pentadekanová	C15:0	8	19,58	272 883,4	334 745,3	0,027	0,033	0,03	0,03
Palmitolejová	C16:1	9	21,94	2 524 481,5	2 791 219,3	0,251	0,272	0,26	0,26
Palmitová	C16:0	10	22,66	287 237 470,8	287 237 470,8	28,552	28,010	28,28	28,56
Heptadecylová	C17:0	11	25,51	2 399 682,1	2 399 682,1	0,239	0,234	0,24	0,21
Linolová	C18:2	12	27,54	29 929 281,9	31 593 438,7	2,975	3,081	3,03	2,97
Olejová	C18:1	13	27,82	320 057 708,2	328 230 018,1	31,814	32,008	31,91	28,40
Stearová	C18:0	14	28,58	350 544 552,8	359 485 778,6	34,844	35,055	34,95	29,71
Arachidová	C20:0	15	34,07	11 431 544,5	11 552 042,3	1,136	1,127	1,13	0,80