

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2012

Jana Kujínková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



Analýza čokolády- stanovení vitamínu E plynovou
chromatografií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Jana Kujínková

Studijní obor: Management v chemii

Forma studia: Prezenční

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

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu, panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce, cenné rady, informace, ochotu a čas věnovaný konzultacím.

Poděkování patří i mým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jana Kujínková
Název práce:	Analýza čokolády- stanovení vitamínu E plynovou chromatografií
Typ práce:	Bakalářská
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2012
Abstrakt:	Cílem této práce bylo stanovit množství vitamínu E v různých typech čokolády. Stanovení byla provedena metodou plynové chromatografie (GC).
Klíčová slova:	Čokoláda, plynová chromatografie, vitamin E
Počet stran:	42
Počet příloh:	6
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jana Kujínková

Title: Analysis of chocolate- determination of vitamin E
by gas chromatography

Type of thesis: Bachelor

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

The year of presentation: 2012

Abstract: The aim of this thesis was to determine an amount of vitamin E in several types of chocolate. Analysis were carried out by gas chromatography (GC).

Keywords: Chocolate, gas chromatography, vitamin E

Number of pages: 42

Number of appendices: 6

Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Čokoláda.....	10
2.1.1 Kakao	10
2.1.2 Složení kakaových bobů	10
2.1.3 Vznik čokolády	10
2.2 Vitamin E	11
2.2.1 Historie vitaminu E	11
2.2.2 Chemické vlastnosti	12
2.2.3 Chemická struktura tokoferolu a tokotrienolu	14
2.2.4 Fyzikální vlastnosti tokoferolů.....	15
2.2.5 Průmyslová výroba α -tokoferolu	15
2.2.6 Biochemické funkce.....	16
2.2.7 Zdroje vitaminu E v potravinách.....	16
2.3 Analýza vitaminu E	17
2.3.1 Izolace, extrakce a přečištění vitaminu E.....	18
2.3.2 Kapalinová chromatografie.....	18
2.3.3 Plynová chromatografie	18
2.3.4 Hmotnostní spektrometrie.....	19
2.4 Cíle	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Použité přístroje a pomůcky	20
3.2 Použité chemikálie	20
3.3 Vzorky	21
3.4 Příprava vzorku	21
3.5 Měření	22
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	23
4.1 Opakovatelnost měření	23
4.2 Metody kvantifikace	24

4.2.1	Metoda standardního přídavku.....	24
4.2.2	Metoda vnitřního standardu	25
4.3	Zhodnocení výsledků	28
5.	ZÁVĚR.....	31
6.	SUMMARY	32
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33
8.	SEZNAM PŘÍLOH.....	35

1. ÚVOD

Už od nepaměti je čokoláda velice oblíbenou a vyhledávanou pochoutkou. Její objevení se datuje do sedmého století a je připisováno mayské civilizaci, která obývala značnou část Střední Ameriky. Do Evropy pak kakaové boby přivezl v roce 1502 Kryštof Kolumbus. Avšak přijetí prvních vzorků čokolády nebylo příliš valné. Až o 25 let později se Hernando Cortés, který jako druhý přivezl boby kakaovníku do Španělska, setkal s lepší odezvou a zajistil čokoládě oblibu, která přerostla až v evropskou společenskou vášeň.

Vitaminy jsou tzv. esenciální látky, které nám nedodávají energii, ale jsou nutné pro normální chod organismu. Lidské tělo si nedokáže vitamin E vyrobit samo, a proto ho musíme přijímat ze stravy anebo jako doplněk. V těle se udrží poměrně krátce, takže musí být pravidelně doplňován. Na rozdíl od vitaminů A, D a K, které jsou také rozpustné v tucích a uchovávány v játrech, je vitamin E po celou dobu skladován napříč celým tělem v tukových tkáních^[1].

Co se denní potřeby vitaminu E týče, World Health Organization (Světová zdravotnická organizace) stanovila množství 5-30 mg/den jako dostatečné k pokrytí potřeby u dětí i dospělých^[2]. Doporučené denní dávky se liší v různých etapách života a souvisí také s příjmem polyenových mastných kyselin^[3].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Čokoláda

2.1.1 Kakao

Jádro pravé čokolády. Vědci rozlišují kolem dvaceti druhů kakaovníku, ale obchodně se dá využít jenom jeden- *Theobroma cacao*. Rostlinu pojmenoval Carl von Linné. Ke španělskému slovu *cacao* připojil název *Theobroma*, což v řečtině znamená „pokrm bohů“^[4]. Strom byl vyšlechtěn ve Střední Americe v Mexiku^[5].

Plody kakaovníku zrají šest měsíců a sklizeň je náročnou záležitostí. Existují čtyři základní typy kakaových bobů. Tzv. *criollo* jsou nejvzácnější a nejdražší. Propůjčují čokoládě výjimečnou kvalitu. Nejvíce se při výrobě čokolády využívají boby *forastero* (85%), z nichž se získává běžné kakao. Boby *trinitario* se podařilo vyšlechtit křížením bobů *criollo* a *forastero*. Z celkové světové produkce jim patří 10-15%. Čtvrtým typem jsou tzv. *nacional*, které rostou pouze v Ekvádoru a pochází pravděpodobně z amazonské oblasti^[4,6].

2.1.2 Složení kakaových bobů

Více než jednu polovinu celkové váhy zpracované kakaové drti (odslupkované a zbavené mikrobů) tvoří tuk. Ten je z bobů získáván mechanickým procesem a nazývá se „kakaové máslo“^[6]. Kakaové máslo je velice hodnotné zboží, protože kromě velmi kvalitní čokolády se z něj vyrábí také řada kosmetických a farmaceutických výrobků. Má totiž užitečnou vlastnost a to, že se rozpouští při teplotě jen o něco nižší, než je teplota lidského těla a velmi pomalu žlukne^[4].

2.1.3 Vznik čokolády

Po sklizni se zralé a vyloupané kakaové boby fermentují a suší. Právě správná fermentace je základem chutě čokolády a také se při ní tvoří prekursor aromatických látek kaka^[3]. Proces anaerobní fermentace trvá většinou 5-6 dnů, vždy však záleží na oblasti původu, jednotlivých pěstitelích a jejich zkušenostech. Jakmile jsou boby zfermentovány, nechají se vyschnout na slunci^[5,7]. Poté musí být skladovány tak, aby nenavlhly^[5].

Před pražením se k bobům přidává uhličitan draselný (K_2CO_3), aby došlo ke zneutralizování kyselin obsažených v kakaovém másle. Po zalkalizování se může přidat malé množství kyseliny vinné k vyrovnání pH^[8]. Následuje pražení při teplotě 80 až 130°C po dobu 20 minut až 2 hodin. Během pražení se díky vysoké teplotě zničí nežádoucí mikrobiologické kontaminanty jako je např. salmonela. Také barva bobů se postupně mění na sytě hnědou a dochází ke zjemnění jejich chutě^[6]. Důvodem změny barvy je přítomnost polyhydroxyfenolů v kakau. Upražené kakaové boby jsou rozdrceny a vzniká kakaová hmota, obsahující okolo 55% kakaového másla. Mletím dostáváme další produkt a to kakaový prášek. Pražené boby získávají své aroma především Maillardovou reakcí a karamelizací^[3].

Právě pouze z kakaového másla, kakaového prášku a cukru byla vyrobena úplně první čokoláda^[7]. Poté se do ní začalo přidávat sušené mléko, což bylo součástí tzv. *konšování* za účelem zjemnění čokolády. Do tohoto polotovaru se můžou přidat oříšky, či ovoce a čokoláda, tak jak ji známe, je na světě^[6].

Kromě čokolády se také může vyrábět tzv. čokoládová pochoutka. Ta obsahuje pouze 15 procent kakaové hmoty (opravdu dobrá čokoláda ji má více než 70%), a zbytek tvoří cukr, sušené mléko a levný rostlinný tuk^[6,7]. Právě podle obsahu kakaové hmoty pak výrobci své produkty pojmenovávají.

2.2 Vitamin E

2.2.1 Historie vitaminu E

V roce 1922 se americký lékař a vědec H. M. Evans a jeho asistentka K. S. Bishop zabývali semipurifikovanou a purifikovanou stravou. Své pokusy prováděli na krysách a zjistili, že samicím se nedařilo rodit živá mláďata. Usoudili tedy, že jejich stravě něco chybělo, nevěděli však co. V dalších výzkumech, kdy byla dieta krys obohacena pšeničnými klíčky a salátem, se samicím narodila zdravá mláďata.

Později doktor Evans přišel na to, že záhadná substance je rozpustná v tuku, jelikož se dala získat lipidovou extrakcí. Bylo objeveno, že její nedostatek se projevuje poškozením varlat a dělohy. Ke stejným závěrům, zcela nezávisle, došel i doktor Barnett Sure. V té době byla písmena A, B, C i D jako názvy vitaminů již obsazena, a proto lékaři Evans a Sure souhlasili s návrhem pojmenovat tuto substanci vitamin E.

Vědci byli tedy přesvědčeni, že vitamin E je naprosto nezbytný pro reprodukci a na základě toho se doktor George Calhoun rozhodl použít slovo *tokoferol* jako vědecký název tohoto vitaminu. *Tocos* v řečtině znamená „narození“ a *ferein* „přinést“. Přípona *ol* pak označuje alkohol.

Při výzkumu funkcí vitaminu E se vědci potýkali s nemalými překážkami. V té době nebyla známa žádná metoda jak vitamin E analyzovat. Nicméně i přesto vědci odhalili, jaký dopad může mít nedostatek tohoto vitaminu na svaly a nervový systém. Především ale dospěli k závěru, že vitamin E je mnohem více důležitý na poli prevence než při léčbě nemoci. O pár desítek let později se potvrdila i antioxidační funkce tokoferolů^[9].

Nicméně během 20 let výzkumu vitaminu E se tvrzení o jeho antisterilním účinku ukázalo být poněkud nepřesné^[10].

2.2.2 Chemické vlastnosti

Vitamin E řadíme mezi vitaminy rozpustné v tucích. Pojem vitamin E v sobě zahrnuje všechny deriváty tokoferolu a tokotrienolu, jejichž biologická aktivita je porovnatelná s tou, kterou pozorujeme u α -tokoferolu^[11].

Tokoferol se v přírodě vyskytuje jako směs vitamerů alfa (α), beta (β), gama (γ) a delta (δ)^[12]. Vitamery jsou sloučeniny, které patří do jedné vitaminové skupiny, mající podobnou strukturu i biologický účinek.

Díky třem chirálním centrům ve struktuře tokoferolu (viz obrázek 1) může každý z vitamerů tvořit i stereoizomerní formy: RRR-, RSR-, RRS-, RSS-, SSS-, SSR-, SRS-, SRR-. „R“ bylo odvozeno z latinského slova *recto* , což v překladu znamená „pravý“^[9,13]. (RRR)-tokoferol může být též označován jako (+)-tokoferol^[3]. Ve struktuře tokotrienolu (viz obrázek 2) je chirální centrum pouze jedno, tudíž se stereoizomerní formy mohou tvořit jen dvě. Dohromady by se tedy mělo jednat o 40 různých forem skrývajících se pod názvem vitamin E. V přírodě a v potravinách se však vyskytují pouze RRR- stereoizomery. Co se týče umělých doplňků vitaminu E, v těch najdeme jen α -tokoferol, který se jako jediný vyrábí synteticky (viz kapitola 2.2.5)^[9,14].

α -tokoferol má ze všech vitamérů nejvyšší biologickou aktivitu (viz tabulka 1) a tudíž je pro tělo nejdůležitější^[12]. Je také v přírodě nejvíce rozšířen. Hraje stěžejní roli při ochraně kůže před poškozením volnými radikály, jejichž zdrojem může být ultrafialové záření. Průzkum, provedený na univerzitách, v nemocnicích a laboratořích na celém světě, poskytl přesvědčivý důkaz o tom, že α -tokoferol je naprosto nepostradatelný pro lidské zdraví^[1,11].

α -tokoferol acetát (viz obrázek 3) je ester, který vzniká reakcí alkoholu (α -tokoferol) s kyselinou octovou. Ta se váže na OH- skupinu v chromanovém kruhu (viz obrázek 1) za současného odštěpení vody. α -tokoferol acetát je stabilnější a lépe odolává oxidačním vlivům než volný α -tokoferol. Existuje pouze jako syntetický^[2,9].

Tab. 1: Biologické a antioxidační aktivity tokoferolů^[12]

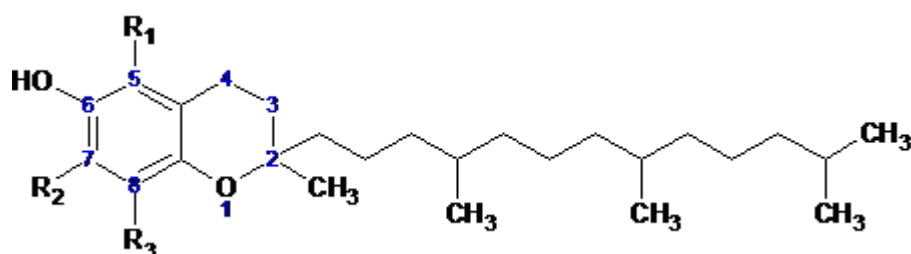
Typ tokoferolu	Biologická aktivita (IU/mg)	Antioxidační aktivita (vzhledem k d- α -tokoferolu)
dl- α -tokoferol acetát	1	0
d- α -tokoferol acetát	1,36	0
dl- α -tokoferol	1,1	100
d- α -tokoferol	1,49	100
d- β -tokoferol	0,75	130
d- γ -tokoferol	0,15	200
d- δ -tokoferol	0,05	300-500

dl-forma= syntetická, d-forma= přírodní

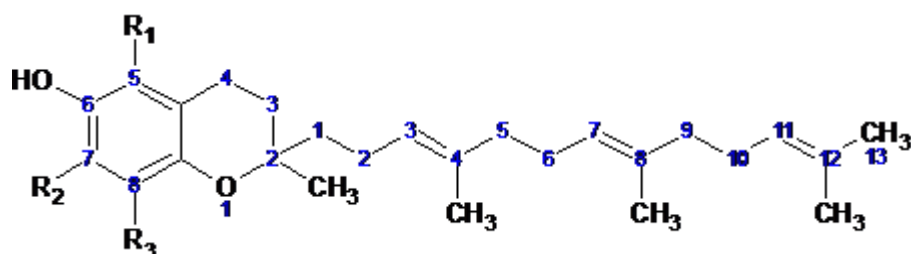
Z tabulky 1 je patrné, že biologická účinnost od α -tokoferolu k δ -tokoferolu klesá. Nicméně δ -tokoferol má nejvyšší antioxidační účinek, a proto je v ochraně α -tokoferolu nepostradatelný^[2,12]. γ -tokoferol ničí volné radikály, které postihují svalstvo a způsobují roztroušenou sklerózu a artritidu^[9].

2.2.3 Chemická struktura tokoferolu a tokotrienolu

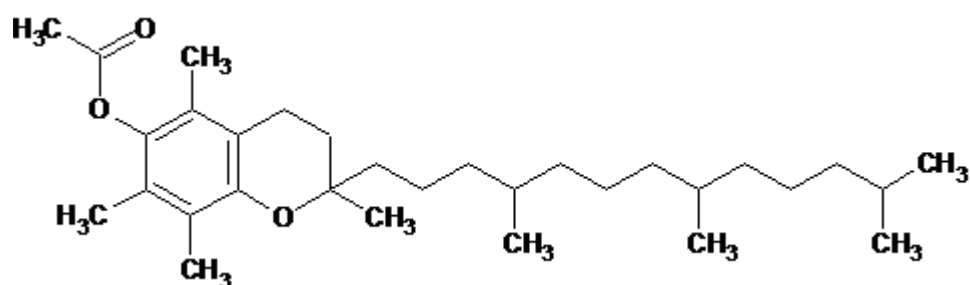
Tokoferoly jsou methylderiváty 6-hydroxychromanu substituovaného v poloze 2 fytylovým řetězcem (16-ti uhlíkatý isoprenoidní zbytek). Základem struktury je tokol (2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)chroman-6-ol). Jednotlivé vitamery se od sebe liší umístěním methylových skupin v polohách 5, 7 a 8 v chromanovém kruhu. Ve strukturách nazývaných alfa jsou navázány dohromady čtyři methylové skupiny. α -tokoferol je tedy systematickým názvem 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)chroman-6-ol. Struktury beta a gama jsou navzájem izomery a odlišují se od sebe pouze polohami, ve kterých jsou methylové skupiny připojeny. Vitamery delta mají methylové skupiny jen dvě. Tokotrienoly se od tokoferolů liší třemi dvojnými vazbami (v polohách 3, 7 a 11) ve fytylovém řetězci^[9,15].



Obr. 1: Strukturní vzorec tokoferolu



Obr. 2: Strukturní vzorec tokotrienolu



Obr. 3: Strukturní vzorec α -tokoferol acetátu

Vitamer	R ₁	R ₂	R ₃
Alfa-tokoferol (tokotrienol)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta-tokoferol (tokotrienol)	CH ₃	H	CH ₃
Gama-tokoferol (tokotrienol)	H	CH ₃	CH ₃
Delta-tokoferol (tokotrienol)	H	H	CH ₃

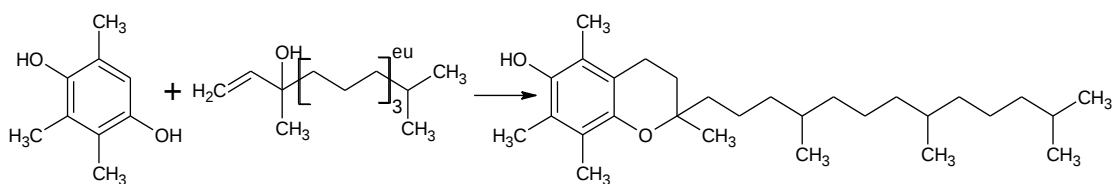
2.2.4 Fyzikální vlastnosti tokoferolů

Tokoferoly jsou čiré, bezbarvé nebo slabě zelenožluté olejovité kapaliny mdlé chuti s velmi jemným zápachem. Jsou prakticky nerozpustné ve vodě, zato dobře rozpustné v organických rozpouštědlech jako jsou např. ethanol, chloroform a hexan. Na vzduchu se jejich barva pozvolna mění na hnědou^[12].

2.2.5 Průmyslová výroba α -tokoferolu

α -tokoferol se průmyslově vyrábí reakcí 2,3,6-trimethylhydrochinonu s isofytolem za kyselé katalýzy (viz obrázek 4). Jako katalyzátor se používají Brönstedovy a Lewisovy kyseliny (př. H₂CO₂, ZnCl₂). Produktem reakce na obrázku 4 je racemická směs osmi α -tokoferolových stereoizomerů, proto se vzniklý produkt pojmenovává (*all-rac*)- α -tokoferol^[9,14].

Nicméně studie dokázaly, že přírodní α -tokoferol je až o 100% účinnější než syntetický^[9].



Obr. 4: Reakce 2,3,6-trimethylhydrochinonu s isofytolem

2.2.6 Biochemické funkce

V lidském těle hraje vitamin E nejdůležitější roli jako přirozený lipofilní antioxidant^[11]. Antioxidanty chrání nenasycené lipidy před volnými radikály. Radikál obsahuje jeden či více nepárových elektronů, což způsobuje jeho vysokou reaktivitu, nestabilitu a neschopnost nezávislé existence. Může se jednat buď o atom nebo skupinu atomů způsobujících nevratné poškození buněk. Za nejškodlivější radikál je považován hydroxylový^[9].

Funkce antioxidantů spočívá v přerušení řetězové reakce volných radikálů a v zabránění jejich nadměrné tvorby^[16]. K přerušení dochází díky schopnosti tokoferolů přenést vodík z fenolové skupiny na volný peroxyradikál. Fenoxyl radikály, které vzniknou, mohou reagovat s vitaminem C a tím jsou tokoferoly regenerovány^[17]. Antioxidační účinky tokoferolu byly prokázány v lipidech s vysokou koncentrací kyslíku^[11].

Vitamin E brání oxidaci „špatného“ cholesterolu LDL (Low Density Lipoprotein), což jsou lipoproteiny s nízkou hustotou^[17].

2.2.7 Zdroje vitaminu E v potravinách

Největším zdrojem vitaminu E jsou potraviny rostlinného původu, menší množství najdeme i v živočišných produktech. Podle údajů uvedených v tabulce 2 je patrné, že nejvyšší obsah vitaminu E je v obilných klíčcích, ze kterých se vyrábí olej. Vitamin E je však ve velkém množství přítomen i v ořechách, zelenině anebo ve vejcích^[18].

Tab. 2: Obsah vitaminu E v potravinách^[18]

Potravina	mg/100g
Slunečnicový olej	50
Olej z kukuřičných klíčků	31,1
Mandle	25,2
Sója	13,3
Olivový olej	13,2
Ořechy	12,3
Pšeničné klíčky	8

Maliny	4,5
Paprika	3,1
Avokádo	3
Máslo	2,2
Špenát	1,7
Morio cerna (mořská ryba)	0,9
Vejce	0,8
Játra kravská	0,7
Broskve	0,6
Jehněčí kýta	0,5
Kuřecí prsa	0,3
Kravské mléko	0,1
Libové vepřové maso	0,1

2.3 Analýza vitaminu E

Pro stanovení vitaminu E bylo vypracováno mnoho metod. Nejčastěji používané jsou metody chromatografické, spektrofotometrické a polarografické^[19]. Dříve se také používala metoda potenciometrická^[20]. Spektrofotometrická metoda je oficiální metodou pro stanovení vitaminu E, vysoce citlivá a rychlá, nicméně je vhodná spíše pro čisté vzorky.

Z chromatografických metod se pro stanovení tokoferolů v potravinách využívá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC- High Performance (Pressure) Liquid Chromatography)^[21]. Dále chromatografie plynová (GC- Gas Chromatography) nebo méně často tenkovrstvá chromatografie (TLC- Thin Layer Chromatography), která se používala spíše v 60. letech 20. století^[15,21,22,23].

2.3.1 Izolace, extrakce a přečištění vitaminu E

Izolace lipofilního vitaminu E z potravin se provádí zmýdelněním neboli saponifikací. Ze zmýdelněných vzorků se poté extrahuje různými rozpouštědly (např. hexan, heptan, ethanol, diethylether). V analýze těchto vitaminů dochází při extrakci vzorku ke vzniku největších chyb. Výťažnost extrakce kapalina-kapalina je omezena obsahem tuku ve vzorku a také koncentrací organického rozpouštědla v hydrolyzátu. Čím vyšší je obsah mastných kyselin v hydrolyzátu, tím nižší je výťažnost extrakce. V případě vysokého obsahu tuku dochází k hydrolýze na soli mastných kyselin (mýdla). Přečištění vzorku lze provést např. na silikagelu^[24].

2.3.2 Kapalinová chromatografie

Metoda HPLC je též někdy označována jako vysokotlaká. V dnešní době je analýza vitaminu E v potravinách pomocí HPLC nejčastější. Kolonové uspořádání umožňuje vysoce účinnou separaci. V mobilní fázi je obsažen obvykle methanol s malým množstvím vody^[15]. Výhodou u HPLC je separace na normálních fázích, které jsou navzájem slučitelné s extrakty v nepolárních rozpouštědlech^[22]. Jako detektory při stanovení vitaminu E jsou používány především elektrochemické a fluorimetrické^[15]. U této metody můžeme dosáhnout rozdělení polohových izomerů beta a gama.

2.3.3 Plynová chromatografie

Díky kapilárním kolonám v plynovém chromatografu je též možné od sebe separovat izomery beta a gama. Pro analýzu vitaminu E se využívá separace na nepolárních stacionárních fázích a je pro ni též důležité spojení GC/MS^[15]. V porovnání s jinými fyzikálně-chemickými metodami jsou výhodami plynové chromatografie rychlost, reprodukovatelnost a možnost stanovení volného i esterifikovaného α -tokoferolu ve stejném produktu. I když je metoda HPLC primární pro stanovení vitaminu E, GC umožňuje identifikaci analytů ze složitější matrice. Nicméně pokud se jedná o analýzu stopového množství vitaminu E, tato metoda vyžaduje větší čistotu extraktu^[22].

2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr se jako detektor může použít jak u plynové, tak i u kapalinové chromatografie. Jedná se o přístroj, který poskytuje záznam hmotnostního spektra. Měřené molekuly přemění na ionty, kterými může být manipulováno elektromagnetickým polem. Ionty jsou poté rozděleny podle podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometr také umožňuje získání informace o struktuře analytu^[25]. Ve spojení s plynovou chromatografií (GC/MS) slouží k detekci organických látek a je vhodným detektorem při stanovení vitaminů a provitaminů^[26].

2.4 Cíle

Jelikož jsou kakaové boby, ze kterých se čokoláda vyrábí, produktem rostlinného původu, bylo možné předpokládat, že v nich bude obsažen i vitamin E. Jsou také nejbohatší plodinou na antioxidanty díky obsahu velkého množství flavanolů^[8]. Vitamin E a již zmíněné flavanoly vedou ke snížení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění^[8,9]. Čokoláda se tak jeví jako výborná kombinace těchto substancí, obsahuje také dost tuku, který je potřebný pro vstřebání vitaminu E.

Mým cílem bylo zjistit, kolik tohoto vitaminu je v různých typech čokolády obsaženo, zda ty s vysokým procentem kakaa jsou zároveň i bohatým zdrojem vitaminu E.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Plynový chromatograf Agilent 7890A, Agilent Technologies, USA
- Hmotnostní spektrometr Agilent 5975C, Agilent Technologies, USA
- Křemenná kapilární kolona HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Nosný plyn (mobilní fáze): He čistota 5.5 (99,9995%) Siad, Bergamo Itálie
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Analytické váhy Mettler toledo, NewClassic MS205S, Švýcarsko
- Ultrazvuková lázeň, Merci, ČR
- Automatické mikropipety
- Laboratorní sklo, pryžový balonek, plastové špičky, plastové zkumavky, umělohmotná víčka, špachtle, krimpovací vialky (1,8 ml), hliníková víčka, gumová septa, krimpovací kleště

3.2 Použité chemikálie

- Heptan, p.a. – C_7H_{16}
LACHEMA, o.p. Brno, závod Neratovice
- Methanol, p.a. – CH_3OH
PENTA, Praha 6
- Syntetický α -tokoferol, p.a.
FLUKA, Buchs, Švýcarsko
- Syntetický α -tokoferol acetát, p.a.
FLUKA, Buchs, Švýcarsko

3.3 Vzorky

- 81% exkluzivní hořká čokoláda Arriba superieur, 125 g, J. D. Gross Německo
- 75% extra hořká čokoláda Trinidad, 125 g, J. D. Gross Německo
- 74% hořká čokoláda deluxe, 100 g, Bellarom Německo
- 70% jakostní hořká čokoláda s malinami 6% Ecuador, 125 g, J. D. Gross Německo
- 70% jemná hořká čokoláda, 100 g, Alnatura Německo
- 56% extra hořká čokoláda Venezuela, 125 g, J. D. Gross Německo
- Hořká čokoláda s celými mandlemi Orion, 80 g, Nestlé ČR
- Čokoláda na vaření Figaro, 100 g, Kraft Foods ČR
- Čokoláda Animal Kingdom pro děti, 15 g, Kraš Chorvatsko
- Oříšková čokoláda Milka, 100 g, Kraft Foods ČR
- Kakaová pochoutka s karamellem, 100 g, Sweet Rumunsko
- Mléčná kakaová pochoutka, 100 g, ZWC Millano Polsko
- Bílá čokoláda, 100 g, Albert Quality Německo
- Nusco chocolate, 400 g, Brinkers Food Holandsko

Čokoládové výrobky byly zakoupeny v supermarketech Albert, Kaufland, Lidl a Jednota Coop v Olomouckém kraji a kraji Vysočina.

3.4 Příprava vzorku

Z každého vzorku bylo na analytických vahách odváženo, do dvou umělohmotných centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml, po jednom gramu. K jedné z nich bylo přidáno 20 μ l α -tokoferolu ($c= 29,2 \mu\text{g/g}$) a α -tokoferol acetátu ($c= 29,6 \mu\text{g/g}$).

Tuky byly ze vzorku extrahovány 5 ml heptanu při teplotě asi 45°C protřepáním po dobu 10 minut. Kapalná fáze byla oddělena centrifugací při 4400 ot/min po dobu 10 minut, převedena do čisté zkumavky a reextrahována 3 ml methanolu. Pevný podíl byl reextrahován 5 ml methanolu. Methanolické fáze byly odděleny centrifugací (4400 ot/min, 20 min) a spojené methanolické extrakty byly analyzovány plynovou chromatografií. Heptanová fáze byla použita pro stanovení mastných kyselin v rámci navazující studie^[27].

3.5 Měření

Všechna měření byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C použitým jako detektor (GC/MS). K analýze byl dávkován 1 μ l vzorku metodou pulzního dávkování (140 kPa, 24 s) bez děliče toku. Teplota nástřiku byla nastavena na 280°C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml/min. Separace byla provedena na kapilární koloně HP-5ms o délce 30 m, s vnitřním průměrem 0,25 mm, tloušťkou filmu stacionární fáze 0,25 μ m a s teplotním programem 50°C – 2 min – 10°C/min – 300°C – 15 min. Hmotnostní spektrometr využíval pozitivní ionizaci elektronem (70eV). Hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu 29- 520 m/z.

Kvantitativní údaje byly získány integrací rekonstruovaných iontových chromatogramů a dále byly vyhodnoceny plochy ve vzorcích a standardech. Pro kvantifikaci byly využity ionty 430 m/z (α - tokoferol a α - tokoferol acetát), 416 a 151 m/z (β - tokoferol a γ - tokoferol) a 402 m/z (δ - tokoferol).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vitamin E byl z matrice izolován pomocí standardních extrakčních metod, konkrétně extrakcí kapalina-kapalina, za použití heptanu a methanolu^[15]. Proces extrakce vitaminu patřil k nejpracnějšímu krokům při úpravě vzorku. K oddělení pevné fáze od kapalné bylo využito centrifugace a pomocí odstředivé síly došlo k sedimentaci pevných částic. Po spojení methanolických extraktů, bylo odebráno 1 ml do skleněných vialek, ty byly krimpováním uzavřeny a vloženy do dávkovače plynového chromatografu. Poté bylo spuštěno měření. Rozdělování mezi heptanovou a methanolovou fází bylo využito k efektivnímu oddělení tuků obsažených v matrici vzorku. Heptanová fáze byla dále využita pro analýzu mastných kyselin v čokoládách v rámci řešení navazující bakalářské práce^[27].

Jednotlivé vitamery byly identifikovány na základě pořízených hmotnostních spekter (viz obrázek 6) s využitím knihovny NIST 2008 a známého elučního pořadí při separaci na nepolární stacionární fázi^[28,29]. Z kolony byl jako první eluován δ -tokoferol v retenčním čase 27,56 min (viz obrázek 9), jako druhý β -tokoferol v čase 28,43 min (viz obrázek 7), třetí γ -tokoferol v čase 28,81 min, čtvrtý α -tokoferol v čase 29,16 min (viz obrázek 8) a nakonec α -tokoferol acetát v čase 29,24 min. Pro kvantifikaci β a γ -tokoferolu byl vedle molekulárního iontu využit také dominantní ion 151 m/z.

Tokotrienoly ve vzorcích čokolád nalezeny nebyly. Důvodem mohlo být, že jsou obsaženy spíše v rostlinných olejích. Nicméně díky přítomnosti tří dvojných vazeb v molekule tokotrienolů je jejich biologická aktivita v porovnání s tokoferoly mnohem nižší, a proto jsou pro nás tokoferoly mnohem důležitější^[3,9].

4.1 Opakovatelnost měření

V této analýze bylo z jednoho vzorku odebráno pět paralelních navážek. Postup byl stejný jako u všech ostatních analýz, s výjimkou přidání standardu. Vzorky byly extrahovány za stejných pracovních podmínek. Tato analýza byla provedena za účelem určení opakovatelnosti. Výsledky jsou vyjádřeny pomocí relativní směrodatné odchylky, ze které vyplývá, že měření byla provedena s chybou do 10%. Podle škály vypracované pro hodnocení měřících systémů spadá tento výsledek do kategorie „výborný měřící systém“^[30]. Data jsou uvedena v tabulce 3.

Tab. 3: Opakovatelnost měření

měření	Vitamery (plochy píků)					
	alfa (430 m/z)	alfa acetát (430 m/z)	beta (416 m/z)	beta (151 m/z)	gama (151 m/z)	delta (402 m/z)
1.	921015	76964	13096315	10596191	595297	233777
2.	792415	72753	12321849	9315613	482611	2351482
3.	908362	64018	13859386	10869163	571357	277617
4.	783056	74926	12751129	9377655	501646	240206
5.	900778	66336	12487909	9489633	498186	253405
průměr	861125,2	70999,4	12903318	9929651	529819,4	248030,6
směrodat. odchylka	60342,9	5580,3	609332,9	742010,2	50089,3	18266
relativní směrodat. odchylka	7,01%	7,86%	4,72%	7,47%	9,45%	7,36%

4.2 Metody kvantifikace

4.2.1 Metoda standardního přídávku

Ke kvantitativnímu vyhodnocení obsahu α -tokoferolu a α -tokoferol acetátu ve vzorcích bylo využito metody standardního přídávku. Jako standard byly použity α -tokoferol a α -tokoferol acetát. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci α -tokoferolu: 1,46 mg/ml a α -tokoferol acetátu: 1,48 mg/ml. K analýze vzorků bylo vždy odebráno 20 μ l, což odpovídá koncentracím 29,2 μ g/g a 29,6 μ g/g.

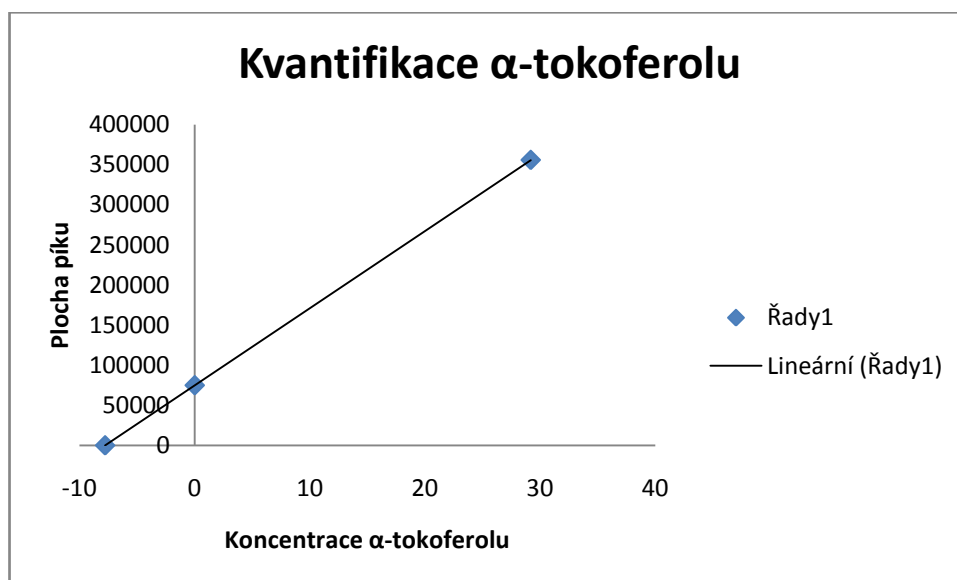
Po nástřiku samotného vzorku a vzorku se standardem se hodnotily plochy píků. Tato metoda se využívá při analýze složitější matrice, která by mohla ovlivnit výsledek stanovení. Metoda je také vhodná pro ověření vlivu matrice. Nevýhodou této metody je, že ke každému vzorku musíme přidat standard, u kterého musíme znát i jeho přesnou koncentraci.

Ke kvantifikaci α -tokoferolu a α -tokoferol acetátu byl použit vzorec 1.

$$\frac{m_x \cdot m_{n(STD)}}{m_n} = \frac{A_x \cdot m_{STD}}{A_{STD} - A_x} \quad (1)$$

kde m_x označuje neznámou hmotnost vitamínu E v navážce, m_n je hmotnost navážky, $m_{n(STD)}$ je hmotnost navážky vzorku se standardem, m_{STD} je hmotnost standardního přídatku, A_x je plocha píku vzorku a A_{STD} je plocha píku vzorku se standardním přídatkem.

Důvodem volby metody standardního přídatku bylo, že matrice mohla obsahovat další substance, mající rušivý vliv na analytický signál^[31].



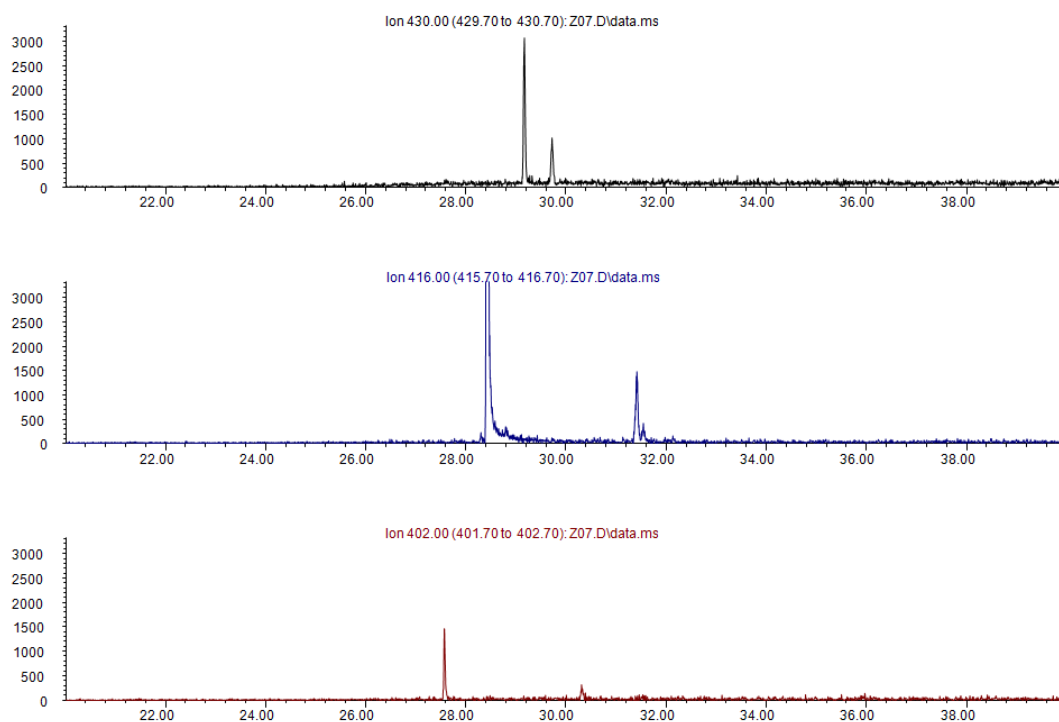
Obr. 5: Kvantifikace α -tokoferolu v 81% čokoládě Arriba superieur

4.2.2 Metoda vnitřního standardu

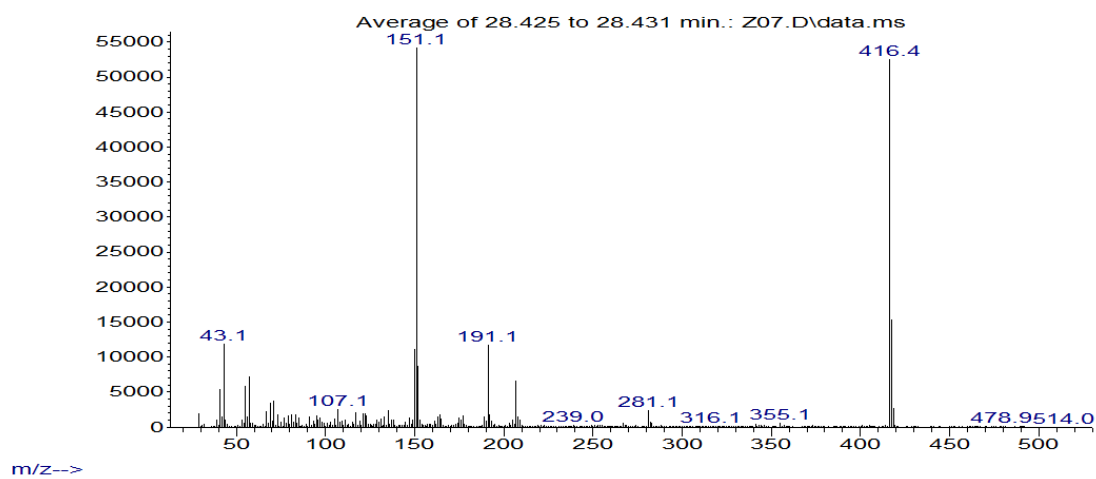
Množství zbývajících vitamerů ve vzorcích bylo stanoveno metodou vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit α -tokoferol, který byl v každém ze vzorků již kvantifikován metodou standardního přídatku. Nalezené koncentrace všech sledovaných látek jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Obsah tokoferolů v různých vzorcích čokolád

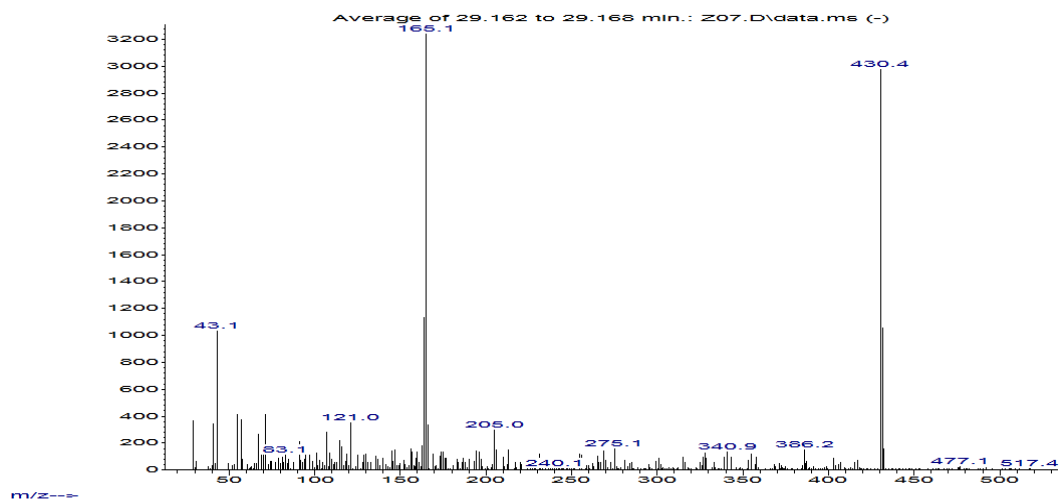
Vzorek	Vitamery [$\mu\text{g/g}$]					Σ [mg/100g]
	alfa	alfa acetát	beta	gama	delta	
81% Arriba superieur	7,79	3,59	129,07	3,78	3,28	14,75
75% Trinidad	6,83	3,94	86,35	2,50	2,30	10,19
70% Ecuador s malinami	17,36	50,38	114,60	3,16	3,63	18,91
70% Alnatura	8,78	2,78	126,73	3,29	1,86	14,34
56% Venezuela	4,97	5,37	48,70	2,15	1,62	6,28
Orion s mandlemi	7,87	0,45	86,99	5,66	1,59	10,26
Čokoláda na vaření	4,70	1,58	47,72	1,13	3,08	5,82
Čokoláda pro děti	5,02	0,71	82,96	4,57	1,78	9,50
Milka oříšková	2,69	2,26	11,48	0,56	0,47	1,75
Kakaová pochoutka I	4,47	0	3,51	–	0,94	0,89
Kakaová pochoutka II	11,49	0,50	17,55	–	0,59	3,01
Bílá čokoláda	0,84	0,31	16,27	0,81	0,73	1,90
Nusco	99,46	0	167,80	0,45	6,22	194,35
Vlašský ořech	425,82	0	4411,44	230,53	602,22	567,01
Lískový ořech	431,32	0	30,99	2,56	1,82	46,67



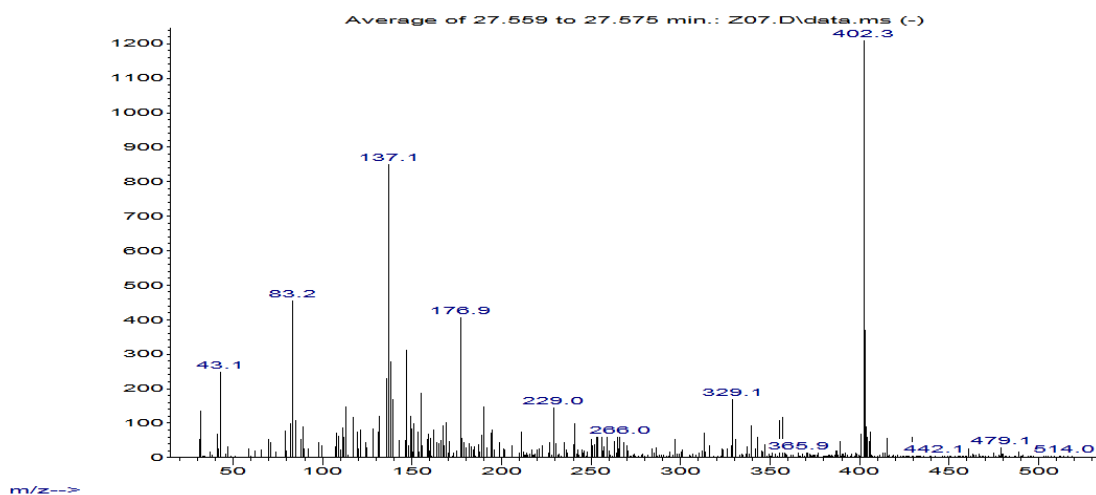
Obr. 6: Ukázka chromatogramu 81% čokolády Arriba superieur



Obr. 7: Hmotnostní spektrum β -tokoferolu



Obr. 8: Hmotnostní spektrum α -tokoferolu



Obr. 9: Hmotnostní spektrum δ -tokoferolu

4.3 Zhodnocení výsledků

Při stanovení obsahu tokoferolů v lískovém a vlašském ořechu je z tabulky 4 patrné, že α -tokoferol acetát se v přírodě volný nevyskytuje. Do čokoládových produktů, ve kterých byl naměřen, mohl být dodán při výrobě. Data potvrzují, že ořechy jsou velice bohatým přírodním zdrojem vitamínu E. Lískový ořech dopadl v mé analýze podstatně hůř než vlašský. Obsah α -tokoferolu byl sice o něco vyšší než ve vlašském ořechu, ale hodnoty vitamérů β , γ a δ byly o poznání nižší. Je zajímavé, že ve výčtu ořechů, obsahujících vitamin E, byl ten lískový zmíněn, vlašský však nikoliv^[32].

Jedním z předpokladů bylo, že velké množství vitamínu E bude v čokoládách s vysokým obsahem kakaa, jelikož právě kakaové boby, ze kterých se čokoláda vyrábí, obsahují značné množství tohoto vitamínu. Tento předpoklad se potvrdil. 70% čokoláda Ecuador s malinami měla ze všech čokolád, obsahujících vysoké procento kakaa, nejvyšší obsah tokoferolů. I když se v rámci mých vzorků nejednalo o tu „nejvíce kakaovou“, vyšší obsah vitamínu E, v porovnání s ostatními čokoládami, mohl být způsoben malinami, o které byla tato čokoláda obohacena. Výslednou hodnotu celkového množství tokoferolů ale ovlivnil α -tokoferol acetát, kterého bylo v tomto vzorku oproti ostatním podstatně víc. Jak už však bylo zmíněno, α -tokoferol acetát existuje pouze jako syntetický, což znamená, že byl do produktu pravděpodobně přidán. Nicméně ze všech vysokoprocentních čokolád byl v této 70% nejvyšší obsah α -tokoferolu, což je pro nás stěžejní. Všechny tyto vzorky (kromě 56% Venezuela) měly obsah vitamínu E nad 10mg/100g čokolády.

Dalším odhadem bylo, že z řad čokoládových produktů bude největší obsah vitamínu E v Nuscu. Jedná se totiž o podobný produkt jako je Nutela, tudíž je vyroben z lískových oříšků, mléka a kakaa. Ořechy jsou všeobecně známy jako bohatý zdroj vitamínu E a i kakao je přírodní surovinou. Tento předpoklad se také potvrdil. Bylo v ní obsaženo i nejvíce α -tokoferolu, což pro spotřebitele může být velice dobrá zpráva.

V případě kakaových pochoutek jsou pole udávající obsah γ -tokoferolu proškrtnutá. Koncentrace tohoto vitamínu ve vzorku mohla být nižší než byl limit detekce.

Zajímavé je, že ve všech vzorcích, kromě kakaové pochoutky s karamellem a lískového oříšku, bylo z vitamínů vždy nejvíce β -tokoferolu. Důvodem může být závěrečná fáze biosyntézy tokoferolů. Methyloací δ -tokoferolu totiž vzniká právě β -tokoferol, kterého se v rostlinném materiálu pravděpodobně hromadí více než ostatní vitamíny^[3,33]. Tato analýza zároveň vyvrací tvrzení, že α -tokoferol je ze všech vitamínů v přírodě nejrozšířenější.

Nejhůře, co do obsahu vitamínu E, na tom byla podle očekávání jedna z kakaových pochoutek. Překvapivě oříšková čokoláda Milka byla druhá s nejmenším obsahem vitamínu E.

Z výsledků vyplývá, že z prezentovaných vzorků, co se týče vitamínu E, je pro spotřebitele „nejlepší“ 81% čokoláda Arriba superieur. Má relativně dost vysoký obsah α -tokoferolu a zároveň je v ní obsaženo i úměrné množství δ -tokoferolu, který α -tokoferol chrání před oxidací.

5. ZÁVĚR

Při nedostatku vitaminů se mohou objevit poruchy funkcí organismu nebo i velmi vážná onemocnění. Zvláště je tomu tak v případě vitaminu E. Není to zázračný všelék, nicméně jeho úloha v lidském těle je naprosto klíčová.

V analýze čokoládových produktů, kterou jsem provedla, byly potvrzeny mé předpoklady a pracovní hypotézy. Snad bylo i zároveň poněkud pozměněno všeobecné mínění o čokoládě jako cukrovince pouze kazící zuby a způsobující další řadu potíží. Vždy však bude oblíbenost čokolády spíše pocitová záležitost než chemicky podložená. V mém experimentu byla také provedena analýza dvou typů ořechů, ve kterých byl potvrzen bohatý obsah vitaminu E.

Konzumace čokolády nemusí být za každou cenu vnímána jako prohřešek. V čokoládě je také relativně velký obsah hořčíku^[8]. Spotřebitel by tak po požití kvalitní čokolády mohl přestat trpět pocitem viny.

6. SUMMARY

The aim of my thesis was to analyse several types of chocolate by gas chromatography (GC). Gas chromatography is one of the most important method for determination of volatile and gaseous compounds.

I wanted to found out if those chocolate with high content of cocoa are also products with high content of vitamin E. I analysed 13 chocolate's products and two types of nuts. In my analysis was confirmed what has been supposed.

Vitamin E is an amazing substance. This compound is more important and powerful in prevention than in medical treatment. It has great effects on cardiovascular and muscular systems as well as inside of cells as an antioxidant.

Human body cannot make vitamin E on itself so it has to be supplied from food we eat or as a food supplement.

Lot of people all around the world think of chocolate as a sweet causing just tooth decays and other health problems. Analysis revealed that consumption of chocolate should not be found solely as a sin even though that eating of chocolate will be probably always perceived as a pleasure rather than biochemical event.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. <http://www.yourhealthbase.com/tocopherol.htm>, staženo 3. 3. 2012
2. SKLENÁŘ, Zbyněk a HORÁČKOVÁ, Kateřina. Praktické lékárenství 7(1), 30-33 (2011).
3. VELÍŠEK, Jan a HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
4. NORMAN, Jill. *Čokoláda*. 1. vyd. Bratislava: Champagne Avantgarde, 1994. 39 s. ISBN 80-7150-157-3.
5. KEMPF, Norman W. *The Technology of Chocolate*. Illinois: Manufacturing Confectioner Pub. Co, 1964. 118 s.
6. BECKETT, Stephen T. *The science of chocolate*. 2nd edition. York: The Royal Society of Chemistry, 2008. 240 s. ISBN 978-0-85404-970-7.
7. COE, Sophie D. a COE, Michael D. *Čokoláda: historie sladkého tajemství*. Praha: Pragma, 2000. 263 s., ISBN 80-7205-478-3.
8. ČOPÍKOVÁ, Jana. Chemické listy 95, 610-615 (2001).
9. PAPAS, Andreas M. *Vitamin E: zázračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí*. Praha: Pragma, 2001. 380 s. ISBN 80-7205-773-1.
10. BARTOŠEK, V. *Vitamín E*, Spofa, Praha 1967
11. DI MAMBRO, Valeria M., AZZOLINI, Ana E. C. S., VALIM, Yara M. L., FONSECA, Maria J. V. International journal of Pharmaceutics 262, 93-99 (2003).
12. <http://www.rikenvitamin.jp/int/tocopherol/toc1.html>, staženo 3. 3. 2012
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628178>, staženo 22. 3. 2012
14. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-495-5/pdf/363.pdf, staženo 28. 3. 2012
15. VÁVROVÁ, Jaroslava. *Vitaminy a stopové prvky 2007*. 1. vyd. Pardubice: SEKK, 2007. 155 s. ISBN 978-80-254-1171-1.
16. ŠTÍPEK, Stanislav a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
17. FRAGNER, Jiří. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. Sv. 2. 1. vyd. Praha: ČSAV, 1961. s. 657-1298.

18. <http://www.vegetarian.cz/vitaminy/vit-e.html>, staženo 19. 3. 2012
19. SUNDL, Isabella, MURKOVIC, Michael, BANDONIENE, Donata, WINKLHOFER-ROOB, Brigitte. M. *Clinical Nutrition* 26, 145-153 (2007).
20. FRAGNER, Jiří, ed. *Sborník vědeckých prací potravinářského průmyslu: Stanovení vitaminů*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1955. 165 s.
21. MOTTIER, Pascal, GREMAUD, Eric, GUY, Philippe A., TURESKY, Robert J. *Analytical biochemistry* 301, 128-135 (2002).
22. EITENMILLER, Ronald, LEE, Junsoo. *Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis*. New York: Marcel Dekker Inc., 2004. 540 s. ISBN 0-8247-0688-9.
23. GALLI, Francesco, LEE, Rosalind, DUNSTER, Christina, KELLY, Frank J. *Free Radical Biology & Medicine* 32, 333-340 (2002).
24. DOUŠA, Michal. *Stanovení vitaminů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2007. 376 s. ISBN 978-80-86548-94-4.
25. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>, staženo 28. 3. 2012
26. ŠIŠTÍK, Pavel. *Možnosti stanovení vitaminů plynovou chromatografií*. Diplomová práce, UP Olomouc 2009.
27. PRUKNEROVÁ, Kateřina. *Analýza čokolády- stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií*. Bakalářská práce, UP Olomouc 2012.
28. ZWEIG, Gunter a SHERMA, Joseph *CRC Handbook of chromatography: general data and principles*. Boca Raton: CRC Press, 1972. 343 s., ISBN 0-8493-3002-5.
29. SLOVER, H. T., THOMPSON R. H., MEROLA G. V. *JAACS* 60, 1524-1528 (1983).
30. ZMATLÍK, Jiří. *Automatizace* 51, 751-752 (2008).
31. http://www.asi-sensors.com/ASI/learning/standard_addition.pdf, staženo 28. 3. 2012
32. <http://www.bonella.cz/dulezite-potraviny-a-vitaminy/orisky-jak-prispivaji-nasemu-zdravi-a-kolik-jich-mame-jist.html>, staženo 24. 3. 2012
33. JIŘÍČKOVÁ, Barbora. *Genetické modifikace rostlin v prevenci chorob člověka*, Bakalářská práce, Masarykova univerzita Brno 2011.

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Stereoizomerní formy α -tokoferolu

Příloha č. 2: Plynový chromatograf- schéma

Příloha č. 3: Plynový chromatograf- foto

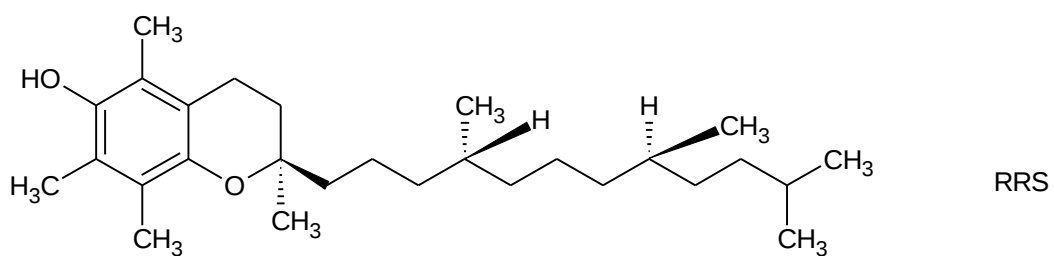
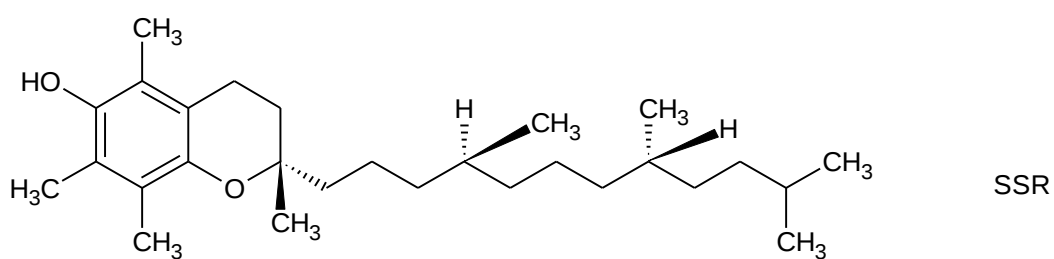
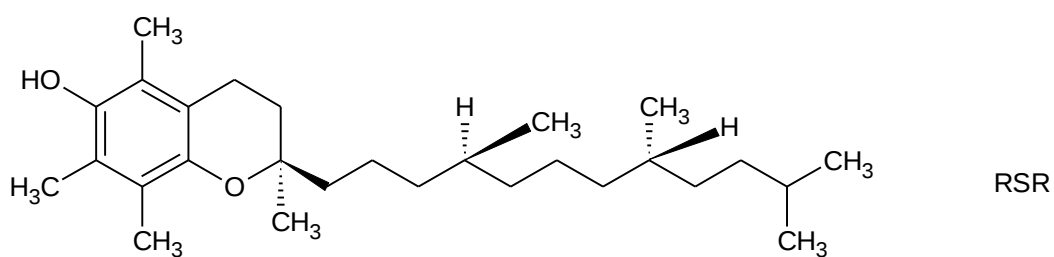
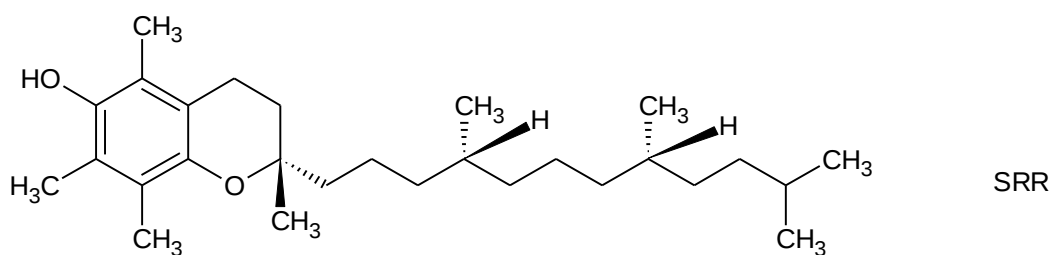
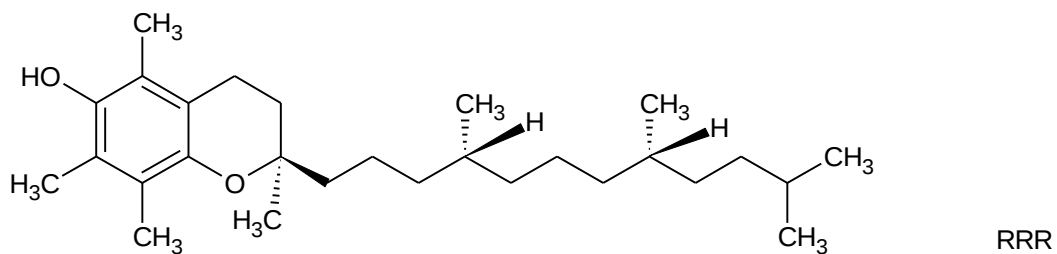
Příloha č. 4: Chromatogram při eluční metodě

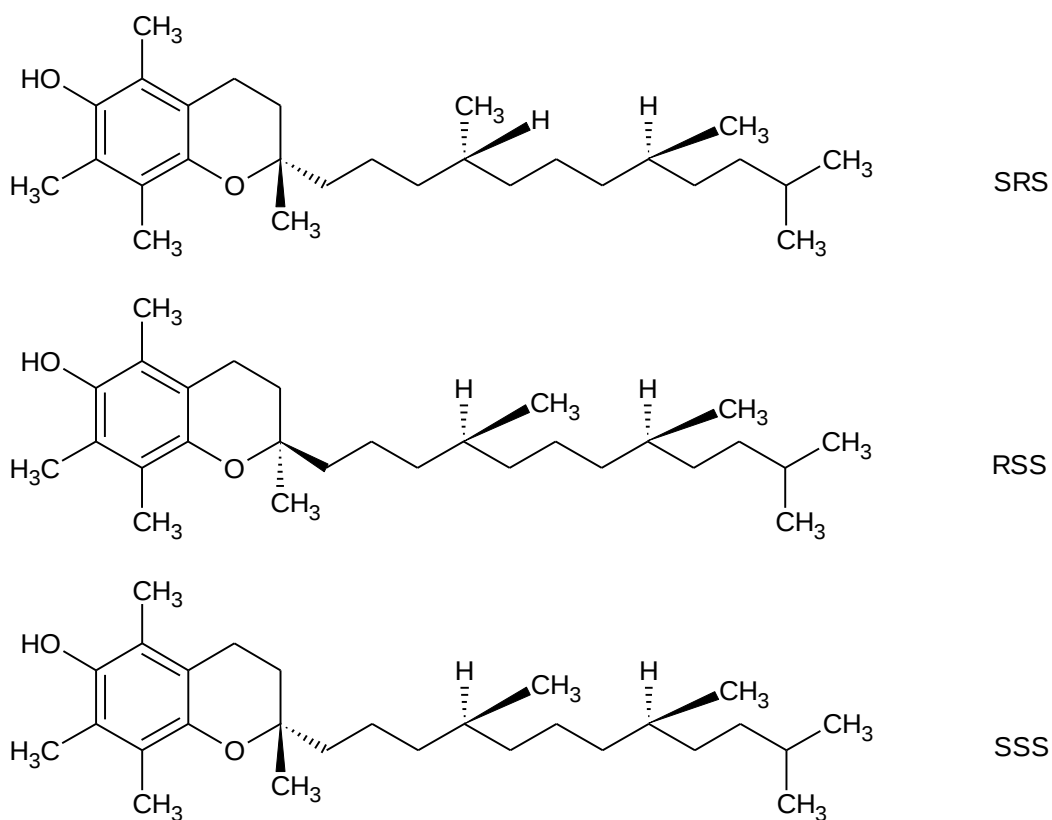
Příloha č. 5: Kapalinový chromatograf- schéma

Příloha č. 6: Vzorky čokolád

Příloha č. 1

Stereoizomerní formy α -tokoferolu

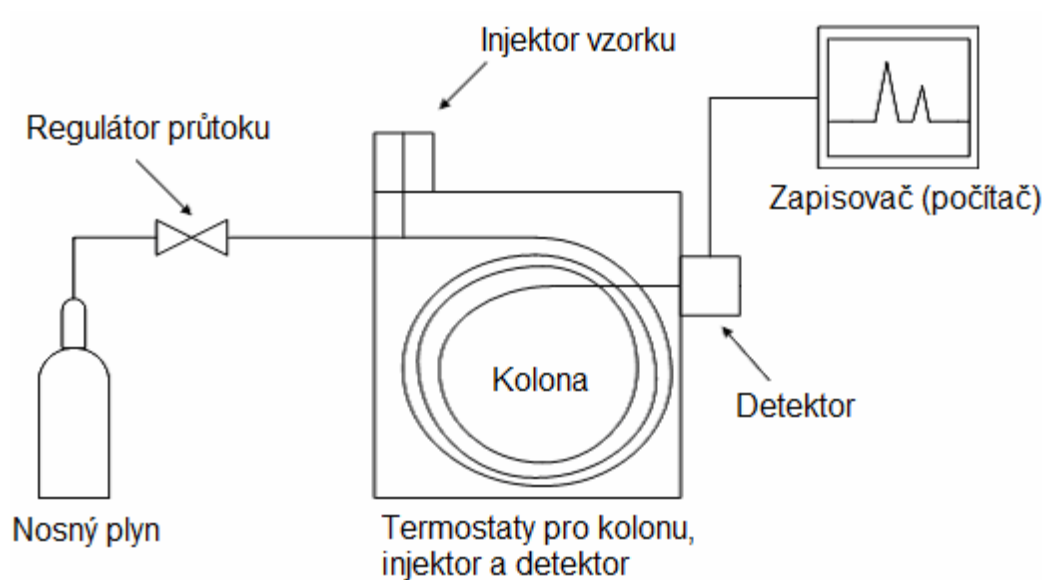




Převzato z: EITENMILLER, Ronald, LEE, Junsoo. *Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis*. New York: Marcel Dekker Inc., 2004. 540 s. ISBN 0-8247-0688-9.

Příloha č. 2

Plynový chromatograf- schéma



Převzato z:

http://www.cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/.../uvod.pdf.

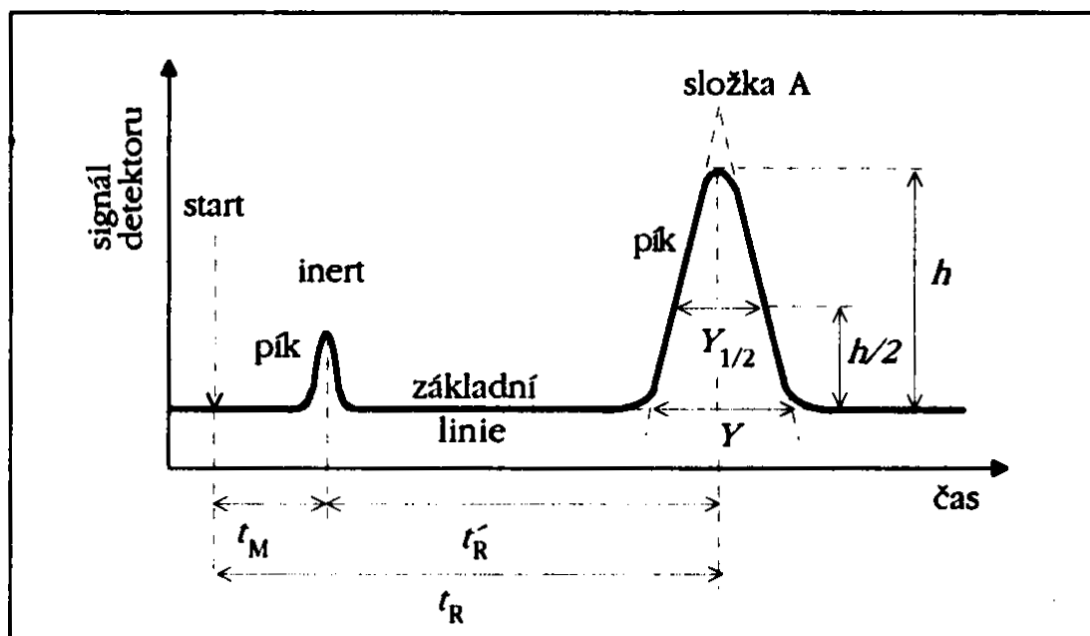
Příloha č. 3

Plynový chromatograf- foto



Příloha č. 4

Chromatogram při eluční metodě



h výška píku

Y šířka píku v základně

$Y_{1/2}$ šířka píku v polovině výšky

A plocha píku

t_R retenční čas

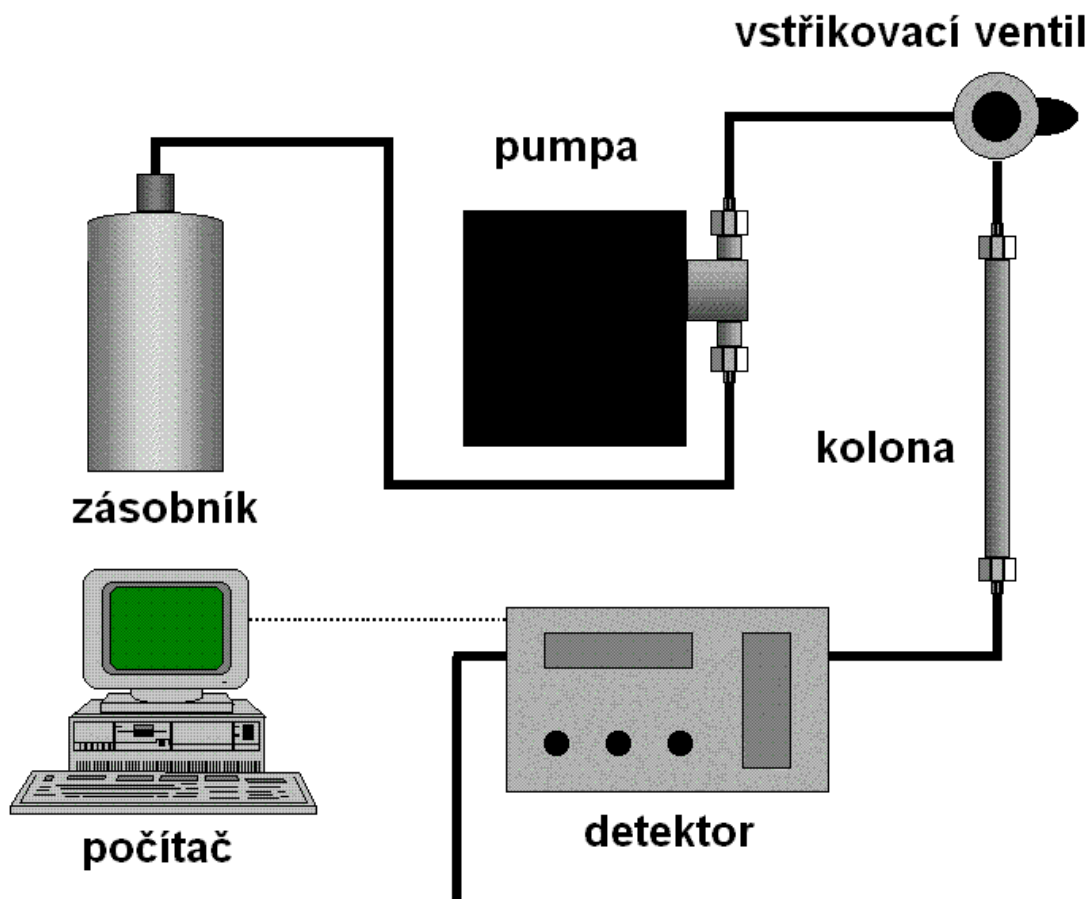
t_M mrtvý reteční čas

t'_R redukovaný retenční čas

Převzato z: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf.

Příloha č. 5

Kapalinový chromatograf- schéma



Převzato z:

http://www.dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/7407/jel%C3%ADnkov%C3%A1_2008_bp.pdf?sequence=1.

Příloha č. 6

Vzorky čokolád

