Utjecaj dodatka kakaove ljuske na sastav i udio bioaktivnih komponenti u čokoladi

Gudelj, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:449924

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Veronika Gudelj

UTJECAJ DODATKA KAKAOVE LJUSKE NA SASTAV I UDIO BIOAKTIVNIH KOMPOMENTI U ČOKOLADI

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode I
Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30. rujna 2019.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*
Komentor: doc. dr. sc. *Ante Lončarić*
Pomoć pri izradi: *Veronika Barišić*, mag. ing. techn. aliment.

Utjecaj dodatka kakaove ljuske na sastav i udio bioaktivnih komponenti u čokoladi

Veronika Gudelj, 0177045681

Sažetak:
Čokolada je jedna od najpoznatijih svjetskih slastica stoga je često predmet istraživanja. U novije vrijeme fokus istraživanja jest poboljšanje nutritivnih svojstva čokolade. Kakaova ljuska sadrži fenolne tvari, metilksantine, prehrambena vlakna i vitamin D te je pogodan dodatak u proizvodnji funkcionalnih čokolada. Zadatak ovog rada je ispitati utjecaj dodatka različitih udjela kakaove ljuske na sastav i udio polifenola i metilksantina u različitim vrstama čokolade. Sastav i udio polifenola (galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata) i metilksantina (teobromina i kofeina) određen je HPLC metodom, a udio ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom. U čokoladama gdje je dodana kakaova ljuska bio je manji udio bioaktivnih komponenti, uz izuzetak udjela (-)-epikatehin galata. Uzorci s netretiranom kakaovom ljuskom u usporedbi s uzorcima koji sadrže tretiranu kakaovu ljusku imali su veće koncentracije pojedinačnih fenola i metilksantina određenih HPLC metodom te ukupnih fenola određenih spektrofotometrijskom metodom. Zamjena dijela kakaove mase kakaovom ljuskom nije značajno smanjila udio bioaktivnih komponeneti što otvara mogućnost proizvodnje funkcionalnih čokolada sa dodatkom kakaove ljuske.

Ključne riječi: čokolada, bioaktivne komponente, kakaova ljuska

Rad sadrži: 42 stranice
10 slika
7 tablica
0 priloga
38 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Đurđica Ačkar*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Ante Lončarić*	član-komentor
4.	doc. dr. sc. *Antun Jozinović*	zamjena člana

Datum obrane: 29. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Food Quality
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Science and Nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Instrumental methods I
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on September 20, 2019.
Mentor: *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.
Co-mentor: *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof.
Technical assistance: *Veronika Barišić*, mag. ing. techn. aliment.

Effect of Cocoa Shell Addition on Content and Composition of Chocolate Bioactive Components

Veronika Gudelj, 0177045681

Summary:
Chocolate is one of the world's most famous desserts so it is often the subject of research. More recently, the focus of research has been on improving the nutritional properties of chocolate. Cocoa shell contains phenolic substances, methylxanthines, dietary fiber and vitamin D and is a suitable additive in the production of functional chocolates. The aim of this study is to examine the effect of the addition of different share of cocoa shell on the composition and content of polyphenols and methylxanthines in different types of chocolate. The composition and content of polyphenols (gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate) and methylxanthines (theobromine and caffeine) were determined by HPLC method, and the total phenolic content by Folin-Ciocalteu method. In chocolates where cocoa shell was added, there was a lower content of bioactive components, with the exception of (-)-epicatechin gallate. Samples with untreated cocoa shell had higher concentrations of individual phenols and methylxanthines determined by HPLC method and total phenols determined by spectrophotometric method compared to samples containing treated cocoa shell. Replacing part of the cocoa mass with cocoa shell did not significantly reduce the share of bioactive components, which opens the possibility of producing functional chocolates with the addition of cocoa shell.

Key words: chocolate, bioactive components, cocoa shell

Thesis contains: 42 pages
10 figures
7 tables
0 supplements
38 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Đurđica Ačkar*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof. — co-supervisor
4. *Antun Jozinović*, PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: September 29, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-8709.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na vremenu, trudu i svoj pomoći koju mi je pružila tijekom pisanja ovog rada, ali i na znanju koje je nesebično dijelila tijekom studiranja.

Veliko i najveće hvala mojim roditeljima, hvala na žrtvi, podršci i vjeri u mene. Hvala mojim sestrama i bratu na bezuvjetnoj radosti koju su pružali kroz ovo vrijeme.

Zahvaljujem svojim prijateljima koji su ovo životno putovanje učinili nezaboravnim.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. ČOKOLADA 4

2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE U ČOKOLADI 9

2.2.1. Polifenoli 10

2.2.2. Metilksantini 13

2.3. DODACI ČOKOLADI 16

2.4. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI 18

2.4.1. Spektroskopske metode 18

2.4.2. Kromatografske metode 19

3. EKSPERIMENTALNI DIO 24

3.1. ZADATAK 25

3.2. MATERIJALI I METODE 25

3.2.1. Materijali 25

3.2.2. Kromatografska metoda 26

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola 28

4. REZULTATI I RASPRAVA 29

4.1. UDIO METILKSANTINA I FENOLNIH KOMPOMENTI 30

4.2. UDIO UKUPNIH FENOLA 35

5. ZAKLJUČCI 37

6. LITERATURA 39

1. UVOD

Čokolada je jedan od najpoznatijih proizvoda u svijetu iako ima visoku energetsku vrijednost, posebno visok udio šećera i masti (Beckett, 2009). Kako bi se poboljšala nutritivna svojstva čokolade, prvenstveno udio polifenola i količina prehrambenih vlakana, u čokoladu se dodaju različiti dodaci biljnog podrijetla bogati polifenolima i vlaknima, kao što su komponente dobivene od *ginsenga*, zelenog čaja, ginka i guarane (Belščak-Cvitanović i sur., 2012) te dodatak posebne vrste *sakura* zelenog čaja tamnoj čokoladi (Martini i sur., 2017). Alternativni izvori za dodatak prehrambenim proizvodima su poljoprivredni i prehrambeni nusprodukti. Nusproizvodi prerade ploda kakaovca su primjer otpada čijim se iskorištavanjem zadovoljavaju ekonomski, ali i ekološki aspekti proizvodnje (Martínez i sur., 2012). Isto tako se može upotrijebiti mangov perikarp koji je jeftin ali učinkovit nusprodukt prerade voća (Sim i sur., 2016).

Kakaova ljuska nusproizvod je proizvodnje čokolade koji može činiti 14-20 % udjela zrna kakaovca. To čini veliki postotak s obzirom na ukupnu proizvodnju i zato bi bilo bitno iskoristiti taj nusproizvod na koristan način. Stoga se koristi kao izvor energije za proizvodnju biogoriva, sastojak hrane za životinje i sredstva za gnojenje. Osim toga ljuska je bogata polifenolima, vlaknima, sadrži metilksantine te vitamin D. Zahvaljujući tim značajkama može se iskoristiti kao dodatak u proizvodnji funkcionalnih proizvoda (Okiyama i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka različitih udjela kakaove ljuske na sastav i udio polifenola i metilksantina u različitim vrstama čokolade. Sastav i udio polifenola (galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata) i metilksantina (teobromina i kofeina) određen je HPLC metodom, a udio ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ČOKOLADA

Omiljena slastica diljem svijeta, čokolada, proizvodi se od biljke ploda *Theobroma cacao* što u doslovnom prijevodu znači „hrana bogova“. Sastojci i udio bioaktivnih komponenti u toj biljci te njihov pozitivan utjecaj na ljudski organizam opravdava takav naziv biljke (Wilson, 2015). Udio aktivnih komponenti kao i kvaliteta čokolade ovise o sirovini koja se koristi u proizvodnji, njenom podrijetlu, tlu i klimi u kojoj sirovina raste (Gutierrez, 2017). Postoje 3 sorte kakaovca čije se sjemenke u današnje vrijeme najviše koriste u proizvodnji, to su *Forastero* koji je najčešće korišten, čak 90 % globalne potrošnje spada na tu vrstu; *Criollo*, rjeđe korišten i koristi se samo za proizvodnju najfinije čokolade; *Trinitario* koji je hibrid dvije prethodne vrste (Wilson, 2015). Prema Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima, čokolada je proizvod dobiven od kakaovih proizvoda i šećera te mora sadržavati najmanje 35 % ukupne suhe tvari kakaovih dijelova, a njih treba činiti najmanje 18 % kakaovog maslaca i najmanje 14 % bezmasne suhe tvari kakaovih dijelova (MPŠVG, 2005).

Čokolada je jedna od najomiljenijih namirnica u svijetu zbog svog privlačnog izgleda, tamne smeđe boje, većinom kremaste teksture i slatkog ili slatko-gorkog okusa, ovisno o udjelu kakaa (**Slika 1**) (Munjal i sur., 2019).



Slika 1 Tamna čokolada (Munjal i sur., 2019)

Razni tehnološki postupci i uvjeti pod kojima se oni provode utječu na kvalitetu čokolade. U slučaju proizvodnje čokolade okus i tekstura ovise o genetskoj vrsti kakaova zrna, sastojcima koji su dodani u čokoladu i postupcima i metodama korištenim u različitim stupnjevima proizvodnje. Sve od prethodno navedenog mora se pažljivo kontrolirati da bi konačni produkt bio zadovoljavajući (Gutierrez, 2017). Nutricionistički aspekti čokolade te samim time pozitivni utjecaj čokolade na čovjekovo zdravlje ovise o sastojcima od kojih je određena vrsta čokolade

proizvedena. To je određeni udio kakaovih spojeva, dodatak mliječnih sirovina, šećera i ostalih dodataka koji se mogu dodati čokoladi da bude privlačnija i samim time bogatija pozitivnim komponentama (npr. lješnjaci, bademi). Čokolada je bogata energijom, najviše ugljikohidratima ali i mastima, što se vidi u **Tablici 1** (Beckett, 2009). Šećeri, kao glavni sastojci, imaju glavnu ulogu jer ne samo da pružaju izvor energije i ugljikohidratni kostur već djeluju kao signalne molekule koje utječu na gensku ekspresiju i reguliraju je. Saharoza, nereducirajući disaharid, je jedan od glavnih transportnih šećera za raspodjelu ugljika unutar biljke, a u sjemenkama kakaa se saharoza pretvara u fruktozu i glukozu kod mladih biljaka. U zreloj fazi rasta biljke iz saharoze i galaktinola nastaje rafinoza, a smatra se da pomaže u zaštiti sjemenki od abiotičkog stresa, na primjer od hladnoće, suše i visokog saliniteta (Wang i sur., 2016).

Tablica 1 Sadržaj makronutrijenata u čokoladi (Food Standards Agency, 2002)

Nutrijenti na 100 g					
	Proteini (g)	Masti (g)	Ugljikohidrati (g)	Energija	
Tip čokolade				kcal	kJ
Tamna	5,0	28,0	63,5	510	2137
Mliječna	7,7	30,7	56,9	520	2177
Bijela	8,0	30,9	58,3	529	2212
Punjena	4,9	21,3	62,9	447	1878

Masti u čokoladi su podrijetlom iz kakaovog maslaca koji je zapravo glavni izvor masti u čokoladi. Masti od kojih se sastoji kakaov maslac su najvećim dijelom zasićena stearinska kiselina (34 %), oleinska kiselina, koja je nezasićena (34 %), te palmitinska kiselina (27 %) koja je zasićena masna kiselina. Dokazano je da stearinska kiselina, iako je zasićena nema većeg utjecaja na povećanje udjela kolesterola u organizmu, dok je za oleinsku kiselinu dokazano čak pozitivno djelovanje na udio HDL (high density lipoprotein- lipoprotein velike gustoće) kolesterola u organizmu (Beckett, 2009).

Osim glavnih sastojaka, tj. makronutrijenata, kakao i njegovi proizvodi sadrže i razne mikronutrijente, točnije vitamine i minerale. Posebno su prisutni minerali, od kojih u najvećoj

mjeri: željezo, bakar, cink, magnezij, fosfor, mangan i kalij, a svi oni imaju jako važne uloge u metabolizmu ljudskog tijela. Što se tiče vitamina, oni su prisutni u manjoj mjeri u kakau, dok se u kakaovom maslacu nalaze vitamin E i vitamin K. U čokoladi, kao proizvodu kojem se dodaje mlijeko, nalaze se riboflavin (vitamin B2) i vitamin B12 (Beckett, 2009).

Proizvodnja čokolade

Jedan od ključnih koraka u proizvodnji čokolade je izbor sirovine, kakaovog zrna, i njegovo podrijetlo. Kvaliteta kakaovog zrna određena je mnogim čimbenicima: vrsti zrna, klimi i vrsti tla gdje je raslo zrno (Guttierez, 2017). Većina kakaovih zrna, otprilike 90 %, se proizvode u Obali Bjelokosti, Ghani, Indoneziji, Nigeriji, Ekvadoru, Kamerunu i Brazilu (Okiyama i sur., 2017).

Kakaovac raste u kišnim područjima, preporučljivo je da padaline budu između 1500 mm-2500 mm godišnje, podjednako raspoređenih kroz godinu. Poželjno je da i vlažnost bude visoka, 70-80 % tijekom dana, a tijekom večeri i do 100 %. Što se tiče temperature zahtjevi su da je temperatura u prosjeku 18 °C do maksimalnih 32 °C. Tlo na kojem raste kakaovac treba imati pH od 5 do 7, što znači neutralno do blago kiselo, a bitno je da je i duboko (1,5 m minimalno). Svi ti zahtjevi su bitni jer tlo određuje bitan čimbenik kvalitete kakaa, a to je sadržaj kadmija (Beckett, 2009). Koncentracija kadmija, olova, bakra i arsena je bitna zbog toga što se smatraju toksičnim za živi organizam, oni se mogu naći u zrnima kakaa a samim time i čokoladi. Zbog navedenog, Europska Komisija je odredila maksimalne vrijednosti teških metala koje smiju biti prisutne u kakaovim zrnima (Vitola i Ciproviča, 2016).

Criollo kakaovac (**Slika 2**) sadrži nekoliko aromatičnih vrsta koje rastu u tropskom području, taj kakaovac se koristi za proizvodnju fine čokolade, punjenja i slojeva čokolade u proizvodima te se može miješati s drugim manje aromatičnim vrstama kakaa da bi se kreirala razna druga obilježja čokolade. Kvalitetna obilježja po kojima se rangira kakaovo zrno, ali i diferencira, su ukusnost, intenzitet kakaove arome i note badema. Kada plod kakaa dosegne zrelost bere se, a ta zrelost se pokazuje kroz određenu boju ploda koji može biti žut, crven ili ljubičast, ovisno o vrsti. Kakaovo zrno se sastoji od ljuske (egzokarp, mezokarp i endokarp), kotiledona i klice. Nakon branja kakaovac se rasjeca i tada se odvaja kora, nakon toga zrna obavijena pulpom se spremaju za fermentaciju (Guttierez, 2017).



Slika 2 Criollo kakaovac sa Forastero tipom kakaovih zrna (ljubičasta zrna) (Guttierez, 2017)

Fermentacija je proces u kojem se svježe sjemenke naslažu na hrpu ili u drvenu kutiju i tako stoje pet dana. Ona je bitna zbog toga što se uništava pulpa koja obavija zrno, stvara se octena kiselina, uništavaju mikroorganizmi te dolazi do biokemijskih i kemijskih promjena sastojaka sjemenke zbog utjecaja prirodnih plijesni i bakterija koje se nalaze u pulpi. Razvitak prekursora kakaovih aroma događa se u kotiledonu tijekom fermentacije i sušenja (Beckett, 2009). Zrna se nakon tih procesa prže, tako se odvajaju od ljuske i uklanja višak vode, zrna za daljnji transport trebaju imati vlažnost 7 do 8 % (Guttierez i Perez, 2015). Kakaova zrna se inače pohranjuju i transportiraju u vrećama od jute, a tijekom transporta je bitno da ne dođe do vlaženja suhih kakaovih zrna jer može doći do rasta plijesni i samim time uništavanja sirovine (Beckett, 2009).

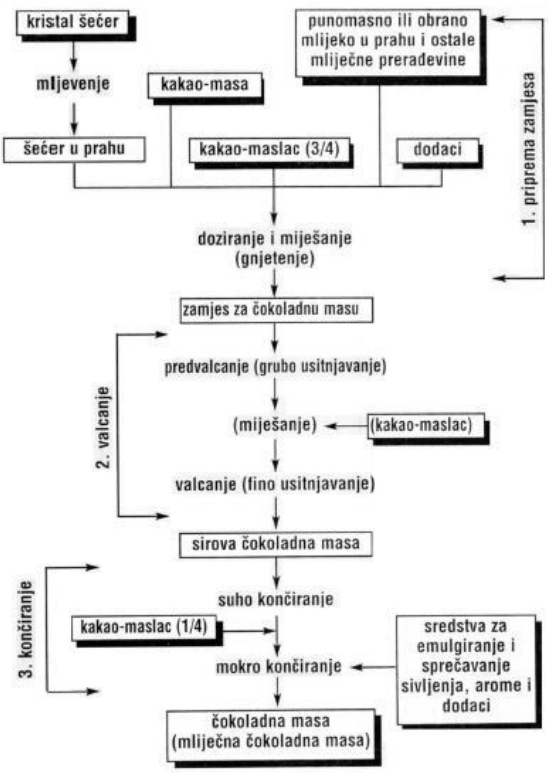
Prženje se smatra prvim korakom tehnološke proizvodnje čokolade prilikom čega se koriste visoke temperature koje su bitne za nastanak Maillardovih reakcija. One su zaslužne za nastanak novih aromatskih spojeva iz prekursora nastalih u prethodnim procesima obrade. Ljuska i klica se odvajaju nakon faze prženja, jer ona postaje lomljivija i lakše se odvaja od zrna. Prešanjem kakaove mase, kakaovog loma, alkalizirane kakaove mase i alkaliziranog kakaovog loma nastaje kakaov maslac. Nadalje, u proizvodnji čokolade mogu se dodati šećer i mlijeko (najčešće mlijeko u prahu) kod proizvodnje mliječne čokolade (Barišić i sur., 2019). Miješanjem, koje najčešće traje 20 do 30 minuta, se dobije čokoladna masa sa određenim svojstvima nakon čega slijedi valcanje (Škrabal, 2009).

Kako mu samo ime kaže, proces valcanja se najčešće provodi na mlinovima s valjcima. To je postupak usitnjavanja čestica bezmasne suhe tvari čokoladne mase mehaničkom obradom u

već spomenutim mlinovima. Zahvaljujući valcanju dobije se određena veličina i oblik čestica koje su zaslužne za lakšu i učinkovitiju izradu mase te postizanje glatke teksture. Kod mliječnih čokolada veličina čestica bi trebala biti do 65 µm, a kod desertnih čokolada do 35 µm (Ačkar, 2020).

Nakon toga slijedi končiranje koje se može podijeliti u tri faze. Tijekom prve faze (suho končiranje) krute čestice su pokrivene tankim slojem masti, vlaga se smanjuje na manje od 1 % i hlapivi spojevi nestaju. U drugoj fazi (pastozna faza) vlaga nestaje i okusi postaju intenzivniji. Mokro končiranje (treća faza) je faza u kojoj čokoladna smjesa postaje tekuća i homogenizirana. Končiranje je bitno jer se tako osigurava da su sve krute čestice u masi obložene masnoćom (Ačkar, 2020).

Temperiranje je korak koji dolazi nakon končiranja, ono je zaslužno za dobivanje stabilne kristalne konfiguracije kristala kakaovog maslaca čime se osigurava sjajni izgled te dobar lom čokolade (Guttierez, 2017). Prije nego se čokolada oblikuje iz tekućeg u čvrsti oblik bitno je dobro provesti temperiranje, to je tehnika kontroliranja kristalizacije kojom se dobiva stabilni čvrsti oblik kakao maslaca (Beckett, 2009).



Slika 3 Shematski prikaz proizvodnje čokoladne mase (prilagođeno iz: Goldoni, 2004)

2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE U ČOKOLADI

Bioaktivne tvari su produkti sekundarnog metabolizma biljaka i imaju određene uloge koje vrše u njima, kao što su obrana protiv mikroorganizama ili uloga signalnih molekula (Wollgast i Anklam, 2000). Većina studija naglašava pozitivne učinke polifenola na zdravlje, no bitno je spomenuti da su kakao i njegovi proizvodi bogati i metilksantinima. Polifenoli u kakau se klasificiraju u tri glavne grupe: flavan-3-oli, antocijani i proantocijani, a što se tiče metilksantina, teobromin je najzastupljeniji, a u kakau se nalazi i oko 0,2 % kofeina (Belščak i sur., 2009).

Općenito, polifenoli se sastoje od više različitih grupa molekula koje se razlikuju po kemijskim strukturama. Zaslužni su za sve veći interes za „super hranu“ zbog toga što posjeduju dobra antioksidativna svojstva i time poželjni pozitivni učinak na ljudski organizam. Smatra se da utječu pozitivno na prevenciju raznih bolesti koje su povezane s oksidativnim stresom, kao što su rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Galanakis, 2018).

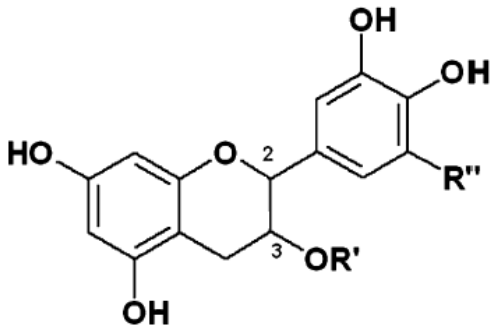
U istraživanjima se najčešće koriste tamne čokolade sa visokim udjelom flavonoida jer se kod proizvodnje takvih čokolada koriste posebne metode za očuvanje flavonoida u kakaovim zrnima. Takvim metodama se može očuvati i do 70 % flavonoida koji su prisutni u konačnom proizvodu. U intervencijskim studijama se tamna čokolada koristi i zbog toga što sadrži više bezmasne suhe tvari kakaovca od ostalih čokolada dok se bijela čokolada manje koristi u istraživanjima jer ne sadrži bezmasnu suhu tvar kakaovca već je pravljena samo od kakaovog maslaca i šećera. Mliječna i tamna čokolada su one koje trebaju imati određeni udio flavonoida i time bolje antioksidacijsko djelovanje (Abbe i Amin, 2008). Na primjer, od dvadeset osam raznih kliničkih studija koje navodi Cooper (2008), dvije su koristile mliječnu čokoladu. Jedna od navedenih studija koja je objavljena u časopisu Nature je pokazala da 100 g tamne čokolade povećava antioksidacijski kapacitet, ali se taj kapacitet smanjuje uz konzumaciju 200 mL mlijeka ili kad se uzima 200 g mliječne čokolade. Hipoteza je bila ta da mliječni proteini vežu polifenole i tako otežavaju apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, no studije nakon te nisu pokazale takva odstupanja, ali nisu ni našla razlog zbog kojeg je to dokazano u prethodnoj studiji (Cooper, 2008).

Bitno je naglasiti da su faktori koji utječu na kvalitetu i kvantitetu kakaa i njegovih proizvoda pod utjecajima raznih stvari na koje je bitno paziti od uzgoja pa sve do konačnog proizvoda jer se različitim postupcima može smanjiti udio polifenola. Osim toga, još uvijek se treba

odgovoriti na mnoga pitanja koja se tiču bioraspoloživosti i antioksidacijskih svojstava koji utječu na biološki sustav (Abbe i Amin, 2008).

2.2.1. Polifenoli

Polifenoli su grupa prirodnih spojeva s fenolnom skupinom u strukturi molekule, ali također i molekule koje sadrže fenolni prsten kao što su fenolne kiseline i alkoholi. To su sekundarni metaboliti biljaka, najraširenija klasa metabolita u prirodi. Sastav biljnih polifenola je jako varijabilan kako kvalitativno tako i kvantitativno, neki metaboliti mogu biti široko rasprostranjeni dok su drugi ograničeni na samo određene vrste. Polifenole možemo podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignine i ostale. Flavonoide dijelimo na flavonole (**Slika 4**), flavone, flavanole, antocijane i izoflavone (Galanakis, 2018).



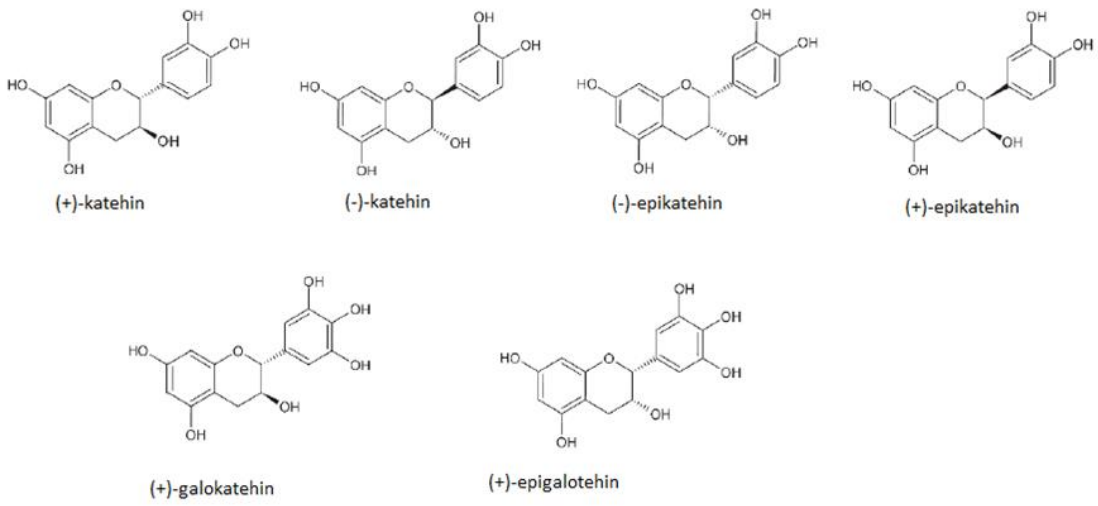
Slika 4 Osnovna struktura flavonola (Abbe i Amin, 2008)

Flavonoli su najčešće prisutni u hrani, od kojih su najpoznatiji kvercetin i kampeferol. Biljke koje imaju najveću koncentraciju tih spojeva su crveni luk, kelj, poriluk, brokula te od voća borovnice. Crno vino i čaj također sadrže visoki udio flavonola, čak do 45 mg flavonola/L. Flavoni su manje prisutni u voću i povrću od flavonola, a neki od rijetkih izvora flavona su peršin i celer. Što se tiče flavonona oni se najviše nalaze u rajčicama, aromatičnim biljkama (npr. menta) i u visokim koncentracijama u citrusnom voću. Soja je glavni izvor izoflavonola u prehrani, a još se nalaze i u leguminozama. Katehini, polimerna forma flavonola, prisutni su u marelicama, crnom vinu, ali najviše u zelenom čaju i čokoladi. Antocijani u ljudskoj prehrani su prisutni najviše i najčešće u voću, a može se povući i paralela s intenzitetom boje i koncentracije antocijana u biljkama. Osim voća, mogu se naći i u crnom vinu, nekim žitaricama te u nekim vrstama lisnatog i korjenastog povrća. U prirodnom stanju kakaove sjemenke se ne

mogu jesti zbog jako gorkog okusa za koji su zaslužne visoke koncentracije polifenola (Galanakis, 2018).

Ultee i van Dorsen su prvi identificirali glavni polifenol u kakau 1909. godine te ga nazvali kakaool, empirijska formula tog spoja je bila $C_{16}H_{16}O_6$. Više od 20 godina nakon toga počele su polemike oko toga da je taj spoj zapravo katehin s empirijskom formulom $C_{16}H_{16}O_6$, no tada su taj spoj imenovali L-akatehinom što također nije bilo točno. Nakon toga znanstvenici su se složili da taj spoj nije L-akatehin već su katehini i epikatehini zapravo stereoizomeri. Zaključeno je da se kakaova zrna sastoje najvećim dijelom od četiri vrste katehina od kojih je (-)-epikatehin najznačajniji te je njegov udio u tom sastavu čak 92 % (Abbe i Amin, 2008).

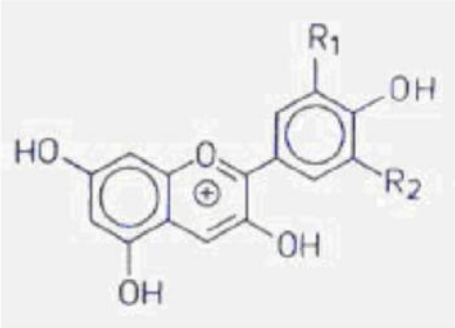
Kao što je već spomenuto kakao i čokolada su bogati polifenolima, a sadržaj polifenola u nefermentiranim kakaovim zrnima je otprilike 37 % flavan-3-ola, 4 % antocijana i 58 % proantocijana. Katehini, podvrsta flavanola, čine čak do 29-30 % cjelokupnih polifenola. Od katehina u kakau i njegovim proizvodima nalaze se (-)-epikatehini, (+)-katehini, (+)-galokatehini i (-)-epigalokatehini čiju kemijsku strukturu možemo vidjeti na **Slici 5** (Barišić i sur., 2019).



Slika 5 Struktura glavnih katehina u kakau i čokoladi (Barišić i sur., 2019)

Antocijanidini se dijele na šest osnovnih skupina: pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin (**Slika 6**), a vezanjem šećera (glukoza, ramnoza, galaktoza i dr.) na njih nastaju molekule antocijanina. Antocijanini dalje mogu biti acilirani raznim hidroksicimetnim

ili alifatskim kiselinama. Najčešće su to kava, *p*-kumarinska, ferulična kiselina od hidroksicimetnih te od alifatskih octena, jabučna i oksalna. Monomerne molekule flavanola mogu se povezivati u oligo- ili polimerne spojeve koji se zovu proantocijanidini i tanini (Ačkar, 2020). Od antocijana glavni spojevi koji se nalaze u kakau su cijanidin-3-α-L-arabinozid i cijanidin-3-β-D-galaktozid, dok su u slučaju procijanidina to dimeri, trimeri ili oligomeri flavan-3,4-diola, a B2 i B5 su najčešći (Andujar i sur., 2012).



Antocijanidini	R_1	R_2
Pelargonidin	H	H
Cijanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OH	OCH_3
Malvidin	OCH_3	OCH_3

Slika 6 Osnovni antocijani i njihova kemijska struktura (Ačkar, 2020)

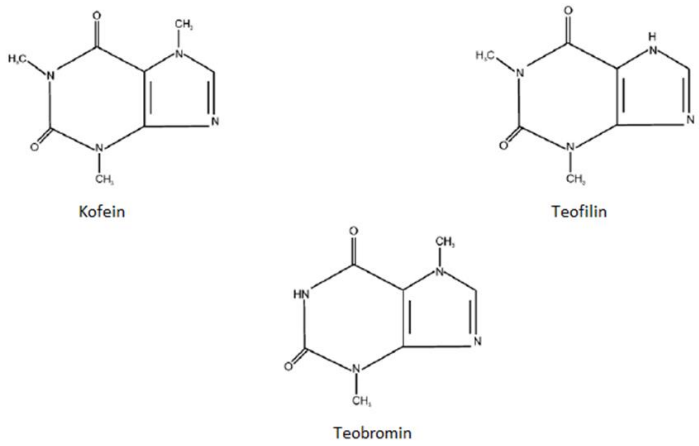
U zadnjih 20 i više godina razne studije su pokazale pozitivan utjecaj kakaovih flavonoida na ljudsko zdravlje. Jedan od takvih utjecaja je onaj na kardiovaskularni sustav. Kardioprotektivni učinak se događa zbog antioksidacijskog kapaciteta flavonoida koji potječu od prethodno navedenih monomera i oligomera u kakau i čokoladi. Međutim, saznanja su bazirana na kratkom trajanju istraživanja između 4 dana do 6 tjedana stoga su moguća i druga istraživanja na duži period. Bitno je objediniti utjecaj i važnost bioraspoloživosti kao i antioksidacijskih utjecaja na organizam (Abbe i Amin, 2008). Adamson i sur. (1999) su pokazali da sadržaj polifenola pozitivno povezan s antioksidacijskim svojstvima kod *in vitro* uvjeta, ali smatraju da to ne bi bio slučaj kod *in vivo* istraživanja niti kod ljudi. No, postoje neke studije koje nisu uspjele dokazati antioksidacijska svojstva u slučaju suplementacije kakaom, naime, suplementacija kakaa tijekom četiri tjedna poboljšala je funkciju trombocita kod zdravih ljudi, ali nije dokazana korelacija između utjecaja kakaa i antioksidacijskog statusa plazme. Također, dokazano je smanjenje LDL (engl. *low density lipoprotein*, hrv. lipoprotein niske gustoće) oksidacije koja je rani indikator razvoja kardiovaskularnih bolesti. Uključivanje tamne čokolade u prehranu tijekom tri tjedna je kod subjekata istraživanja značajno povećalo količinu HDL

kolesterola, ali kao ni kod smanjenja oksidacije LDL-a nije imala utjecaj na antioksidacijska svojstva u plazmi. U drugim istraživanjima se pokazalo da određena količina kakaove mase sprječava razvoj hiperglikemije kod pretilih miševa s dijabetesom, a prijašnja istraživanja su pokazala da kakaov prah koji se suplementirao četiri tjedna na istim takvim miševima je pokazao čak i hipolipidemijska i hipoglikemijska svojstva. Kakaov prah ima i antikancerogena svojstva što se pokazalo u *in vivo* studijama, smatra se da je kakaov ekstrakt smanjio aktivnost tumor marker enzima tijekom hepatokarcinogeneze. Osim toga, suplementacija kakaovim prahom značajno smanjuje incidenciju karcinoma prostate, uz to suplementacija je pokazala produženi život i kognitivne performanse štakora koji su imali tumor (Abbe i Amin, 2008).

2.2.2. Metilksantini

Metilksantini su purinski alkaloidi što znači da su to spojevi sa sustavom spojenih pirimidinskih i imidazolnih prstena. U prirodi se pojavljuju kao metilni derivati ksantina. Metilksantini su slabo topljivi u vodi i etanolu. Teofilin i teobromin su amfoterni spojevi što znači da mogu djelovati kao kiseline ali i baze, svojstva kiselina imaju zbog vodikovih atoma imidne grupe, a bazična svojstva imaju zahvaljujući dušikovu atomu. Za razliku od prethodno navedenih, kofein nema svojstva kiselina (Andreeva i sur., 2012).

Metilksantini su bitni bioaktivni spojevi koji pozitivno djeluju na ljudski organizam. Najrašireniji i najpoznatiji su kofein, teofilin i teobromin (**Slika 7**). Ti spojevi se najčešće nalaze u čaju i ostalom lišću biljaka, sjemenkama kave, kakaovim sjemenkama i kola sjemenkama (Andreeva i sur., 2012). Teobromin je glavni metilksantin prisutan u kakau koji čini 4 % bezmasnog dijela kakaa, kofein čini 0,2 %, a teofilin je prisutan u manjim količinama. Teobromin je prisutan većim dijelom samo u kotiledonu zrna, a kofein i 3-metilksantin su glavni alkaloidi u zrelom perikarpu (Abbe i Amin, 2008).



Slika 7 Prikaz tri glavna metilksantina u kakau (Abbe i Amin, 2008)

Sva tri najznačajnija metilksantina imaju pozitivne učinke na organizam. Kofein stimulira centralni nervni sustav, kardiovaskularni i respiratorni sustav, dok su teofilin i teobromin spojevi koji relaksiraju i umiruju mišiće (Buiarelli i sur., 2019). Također, dobro su poznati učinci i na gastrointestinalni i renalni sustav (Hernández-Hernández i sur., 2018).

Sve nabrojene pozitivne strane metilksantina se koriste u farmakološke svrhe za proizvodnju lijekova i dodataka prehrani. Kod takve upotrebe bitno je paziti na dozu, metilksantini prethodno prolaze kroz temeljite kontrole koncentracije jer povišene doze mogu imati i negativne posljedice (Andreeva i sur., 2012). Tako npr. kofein u većim količinama može dovesti do negativnih posljedica na reproduktivno zdravlje (Abbe i Amin, 2008).

Razlika u koncentraciji koja djeluje negativno ili pozitivno je dosta mala, stoga je važno paziti na vrijednosti metilksantina u proizvodima, npr. terapeutski učinak teobromina se odnosi na 10-20 µg/mL u krvnom serumu dok je toksična doza već od 20 µg/mL. Međutim, bitno je naglasiti da se još ne znaju točni mehanizmi djelovanja metilksantina zbog čega su sve češća istraživanja o njihovom učinku na biološke tekućine, posebno što se tiče studija farmakokinetičkih i farmakodinamičnih metilksantina. Bitno je ograničiti i odrediti unos metilksantina u hrani, na primjer čokoladi i energetskim pićima koja sadrže veće koncentracije kofeina. Stoga su određene optimalne vrijednosti za unos kofeina po danu koje prema Američkoj Agenciji za hranu i lijekove iznose 200 mg/L dnevno (Abbe i Amin, 2008).

Većina studija naglašava pozitivni učinak polifenola na zdravlje, no još nije dokazano jesu li polifenoli sami zaslužni za to ili djeluju sinergički s metilksanitinima, tj. da li metilksantini

pojačavaju pozitivni učinak polifenola. Ujedno, moguće je i obrnuto djelovanje, da metilksantini umanjuju pozitivan učinak polifenola na organizam. Zbog navedenih, kontradiktornih rezultata, sve se više studija bavi djelovanjem metilksantina na polifenole kao bi došli do zajedničkog znanstvenog konsenzusa. Tako se smatra da kofein ima prooksidativni učinak, ali isto tako može imati antioksidacijski učinak kao i teofilin i teobromin u određenim fiziološkim uvjetima. No, postoje istraživanja koja tvrde da teobromin i kofein nemaju ni antioksidacijska niti prooksidacijska svojstva. Stoga se može zaključiti da su potreba daljnja istraživanja i na tu temu. Dokazano je da suplementacija 5 mg kofeina po kilogramu tjelesne mase smanjuje postprandijalni inzulin kod bolesnika dijabetesa tipa 2. Nadalje metilksantini su inhibirali fosfodiesteraze i pri tome povisili intracelularnu koncentraciju AMP-a (ciklični adenozin monofosfat) koji je uključen u regulaciju izlučivanja inzulina i proizvodnje glukoze u jetri. Zbog toga se smatra da prisutnost metilksantina može imati pozitivni učinak na metabolizam glukoze. U daljnjim studijama pokazano je da teobromin utječe na hormonsku lipazu u adipoznom tkivu koja hidrolizira triacilglicerole na slobodne masne kiseline i glicerol. Osim toga, teobromin utječe pozitivno na rak, on ima potencijalno inhibicijsko djelovanje na angiogenezu kod raka jajnika tako što utječe na proizvodnju faktora rasta. Bitno je naglasiti da prevelike količine teobromina mogu imati negativne posljedice kao npr. na spolnu reprodukciju pa čak i smrtnost kod laboratorijskih miševa. Smrtnost kod štakora se povezuje sa srčanim problemima koji se događaju kod velikih doza teobromina. Kod trudnica je posebno bitno paziti na unos metilksantina, točnije kofeina kroz kavu ili kakaove proizvode jer se lako apsorbira kroz placentu i mogu dovesti do retardacije rasta ploda (Abbe i Amin, 2008).

2.3. DODACI ČOKOLADI

Razvitak funkcionalne hrane je posljednjih godina posebno pojačan zbog sve većeg interesa ljudi za zdravim životom i nutritivno bogatom hranom. Iako kakao i njegovi proizvodi imaju dosta visoke koncentracije vrijednih komponenata kao što su polifenoli i metilksantini, znanstvenici i prehrambeni inženjeri ih pokušavaju što više obogatiti bioaktivnim komponentama koje su od značenja za organizam. Neki od takvih proizvoda su kakao prah koji sadrži visoke vrijednosti polifenola; probiotička čokolada; čokolada sa izomaltozom; *whey* čokolada koja je proizvedena bez šećera; tamne čokolade koje sadrže kamilicu, B vitamine, vitamin D i C. Dakle, možemo vidjeti da se u proizvode dodaju polisaharidi ili vlakna kao zamjene za masti te razni umjetni zaslađivači, probiotici i ekstrakti (**Slika 8**) (Belščak-Cvitanović i sur., 2012).



Slika 8 Slika primjera čokolade s prirodnim ekstraktima (Web izvor 1)

Rijetko kad se čokolade obogaćuju prirodno dobivenim polifenolnim spojevima, a kada to je slučaj najčešće se koriste komponente dobivene od ginsenga, zelenog čaja, ginka i guarane (Belščak-Cvitanović i sur., 2012). Tako imamo primjer gdje je tamnoj čokoladi dodan *sakura* zeleni čaj i samim time je dobivena čokolada obogaćena polifenolima. Njihove vrijednosti su bile čak 49 % više epikatehina i 43 % više flavan-3-ola nego u običnoj tamnoj čokoladi (Martini i sur., 2017). Još jedan od primjera dodataka polifenola iz alternativnih izvora je dodatak poljoprivrednih i prehrambenih nusprodukata. Uporaba tih nusprodukata osim što dobro utječu na udio polifenola u proizvodima smanjuje otpad koji nastaje te tako ima i bitan utjecaj na ekologiju. Tako se može upotrijebiti mangov perikarp koji je jeftini nusprodukt, a dodatak

samo 3 % tog praha poboljšava udio bioaktivnih komponenti u čokoladi u koju je dodan (Sim i sur., 2016).

Čokoladi se može dodati jedan od nusprodukata proizvodnje nje same, kakaova ljuska. Naime ljuska se odvoji od kotiledona zrna kakaa koji se dalje koristiti za proizvodnju kakaova praha i ostalih kakaovih proizvoda (Guttierez, 2017). Ljusku bi bilo dobro dodavati, osim zbog ekoloških razloga, zbog toga što sadrži tvari koje pozitivno djeluju na organizam (polifenole, metilksantine, topiva i netopiva vlakna) i njihov dodatak čokoladi može poboljšati nutritivnu vrijednost proizvoda. Inače se kao izvor vlakana dodaju inulin i polidekstroza koji se koriste kao zamjene za šećer te se dodaju na početku procesa proizvodnje (Barišić i sur., 2020).

Rezultati analiza pokazali su da se kakaova ljuska sastoji od približno 45 % peptičkih polisaharida, oko 20 % hemiceluloze, otprilike 35 % celuloze te jako malo lignina. Osim toga istraživanja su pokazala da ljuska sadrži i približno 9 % pektina. U tim istraživanjima se koristila AOAC metoda za određivanje sadržaja vlakana što neki znanstvenici ne podržavaju i predlažu modifikaciju metode da bi se sadržaj vlakana mogao podrobnije odrediti (Okiyama i sur., 2017).

Od kakaovih nusprodukata, kakaova ljuska ima najveću količinu fenolnih spojeva u svom sastavu. Stoga se smatra izvrsnim izvorom za obogaćivanje i poboljšavanje svojstava proizvoda bioaktivnim komponentama zbog niske cijene kakaove ljuske. Smatra se da je velika količina polifenola u kakaovoj ljusci prisutna zbog toga što polifenolni spojevi migriraju iz kotiledona u ljusku. Kotiledon zrna je inače skladište polifenola. U kakaovoj ljusci su detektirani i proantocijanidi, sekundarni metaboliti koji također imaju biološku ulogu i antioksidacijsku aktivnost. Proantocijanidi su najčešće tanini te mogu biti monomeri ili dugolančani polimeri (Okiyama i sur., 2017).

2.4. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI

Kako je sve veće zanimanje za hranu bogatu polifenolima te ostalim bioaktivnim komponentama, tako je veća i potražnja za metodama kojima se mogu determinirati i kvantificirati određeni spojevi. Unatoč mnogim istraživanjima još uvijek je teško naći prave metode za separaciju i kvantifikaciju polifenola posebno ako se radi o različitim skupinama polifenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011). Metodologija koja će se koristiti u istraživanju ovisi o tome koji je cilj metode. Može se: odrediti jesu li flavonoidi prisutni u određenoj grupi biljaka, izolirati flavonoide iz biljaka u kojima se zna da su prisutni, odrediti koncentraciju određenih flavonoida u biljkama u kojima se nalaze te identifikacija izoliranog i pročišćenog flavonoida. Za grubu kvantifikaciju polifenola koriste se kolorimetrijske metode većinom zbog jednostavnosti i visoke osjetljivosti. Neke od tih metoda su Folin-Ciocalteu i Prussian-Blue metode za ukupne polifenole te vanilin-HCl test za katehine i butanol-HCl za proantocijanidi. Specifičniji rezultati se danas sve češće dobiju upotrebom kromatografskih tehnika kao što su: tankoslojna kromatografija (eng. TLC-*thin-layer chromatography*), visokotlačna tekućinska kromatografija (eng. HPLC-*high-performance liquid chromatography*) i kapilarna elektroforeza (eng. CE-*capillary electrophoresis*). Sve navedene tehnike se mogu koristiti za kvantitativne i kvalitativne analize te za izolaciju i pročišćavanje (Harvey, 2000).

2.4.1. Spektroskopske metode

Spektroskopija je grana znanosti koja se bavi svjetlošću (vidljivim zračenjem) razlučenom u valnim duljinama koja daje spektar koji je specifično određen samo za jednu tvar. Osim proučavanja vidljive svjetlosti, spektroskopija danas uključuje proučavanje i drugih vrsta elektromagnetskog zračenja kao što su X-zrake, ultraljubičasto (UV), infracrveno (IR), mikrovalno i radiofrekvencijsko zračenje (Harvey, 2000). Važne su kod analize i istraživanja jer daju velik broj kvantitativnih i kvalitativnih informacija te je granica identifikacije u širokom rasponu, od nekoliko pikograma do nekoliko grama (Matijević i Blažić, 2008).

Elektromagnetsko zračenje ima valna i svojstva čestica. Spektralne analize su zasnovane na mjerenju energije zračenja koje može biti apsorbirano (prelazak u viša energetska stanja) ili emitirano (prelazak iz pobuđenog u osnovno stanje). Apsorpcija u vidljivom dijelu spektra se izvodi na tekućinama i čvrstim tijelima, ali većinom se mjeri količina propuštene svjetlosti kroz obojenu otopinu i nakon prolaska te svjetlosti smanjenje početnog intenziteta. Ta pojava se

zasniva na Lambert-Beerovom zakonu (Harvey, 2000). Prema tom zakonu se intenzitet svjetla monokromatskog snopa, koji prolazi kroz određene tvari, smanjuje uslijed apsorpcije zračenja, pritom je količina svjetla koju medij apsorbira proporcionalna koncentraciji medija i duljini puta svjetlosti (Skoog i sur., 2007).

Instrumenti koji se koriste u kvalitativnoj analizi su fotometri i spektrofotometri. Fotometri koriste filtere koji propuštaju različito područje spektra, ovisno o boji uzorka. Prikladan filter bi trebao imati boju komplementarnu uzorku da može propustiti određene valne duljine svjetlosti (Harvey,2000).

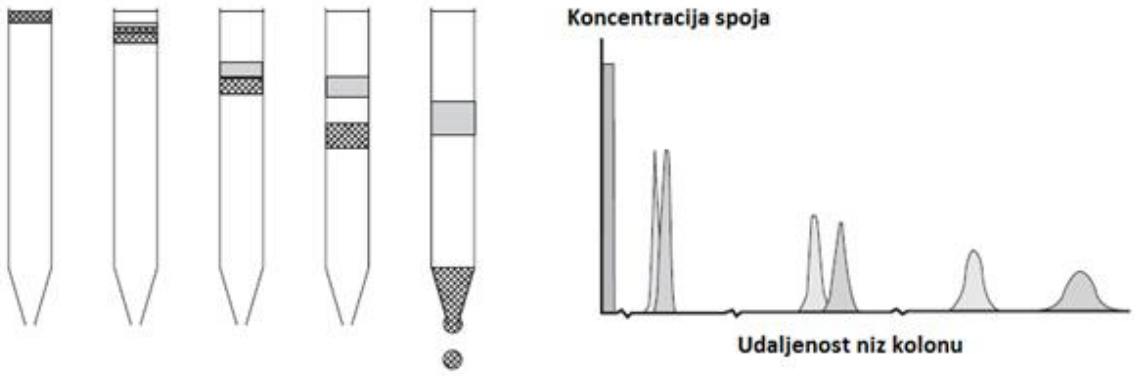
U istraživanju Nsor-Atindana i sur. (2012) određivali su koncentraciju ukupnih fenolnih komponenti u različitim ekstraktima kakaove ljuske upravo spektroskopskom metodom. Nakon priprave uzorka, tj. otapanja i ekstrakcije, dodao se Folin-Ciocalteu reagens i natrijev karbonat te se odredila ukupna količina fenola. Apsorbancija je očitana na 750 nm. Nakon toga su se odredili ukupni flavonoidi kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom te se mjerila apsorbancija na 510 nm. Koristili su različita otapala i prema tome su dobili različitu količinu fenola i flavonoida. O polarnosti otapala ovisi količina otopljenih fenolnih komponenti. Prema autorima rada, najmanje polarno otapalo (aceton) od primijenjenih ima najveću, dok najpolarnije otapalo (voda) najmanju moć ekstrakcije polifenola (Nsor-Atindana i sur., 2012).

Yapo i sur. (2013) su proveli slično istraživanje, koristili su četiri različita otapala: 80 %-tni etanol, 60 %-tni aceton, vodu i zakiseljeni butanol. Prve tri frakcije su spojene te su okarakterizirali ukupne fenolne komponente kao topljive fenolne komponente kao što su proantocijani i tanini. Zadnja frakcija sastojala se od depolimeriziranih kondenziranih tanina netopljivih u organskim otapalima. Količina ukupnih fenola je izražena prema galnoj kiselini (GAE, eng. *gallic acid equivalent* – ekvivalent galne kiseline). Ustanovljena je koncentracija topljivih fenolnih komponenti u kakaovoj ljusci od 26,71 ± 4,52 mg GAE/g suhe tvari.

2.4.2. Kromatografske metode

Kromatografija podrazumijeva širok raspon metoda koje se primjenjuju za odjeljivanje i analizu smjesa spojeva. Primjenjuje se za istodobnu separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva. Prilikom kromatografske analize smjesa različitih sastojaka uzorka ulazi u kolonu

(kolonska kromatografija) ili na kromatografsku plohu (plošna kromatografija), pri čemu se spojevi uzorka razdjeljuju između pokretne i nepokretne faze od kojih se sastoji kolona/ploha. Sastojci smjese uzorka posjeduju različite afinitete prema pokretnoj i nepokretnoj fazi te s obzirom da putuju samo u pokretnoj fazi dolazi do različitih brzina putovanja kroz kolonu ovisno o afinitetu prema pokretnoj, odnosno nepokretnoj fazi. Upravo ta razlika u relativnim brzinama putovanja omogućuje veliku selektivnost tehnike, samo je bitno paziti da izbor faza bude najbolji mogući s obzirom na prirodu ispitivanog spoja, prirodu ravnoteže u sustavu i vezi između ispitivanog spoja i nepokretne (stacionarne) faze (Ašperger i sur., 2019). Tipična kolonska kromatografija (**Slika 9**) koristi proces eluiranja pri čemu se komponente ispiru kroz kolonu dodavanjem čistog otapala. Komponente koje su se odijelile na koloni se uz pomoć detektora prikazuju kao kromatogram na kojem možemo vidjeti određene pikove iz kojih se mogu identificirati i kvantificirati pojedine komponente. Takva identifikacija je moguća pomoću vremena zadržavanja, a kvantifikacija preko veličine pika (Harvey, 2000).



Slika 9 Prikaz eluiranja kod kolonske kromatografije i kromatogram (Harvey, 2000)

Kromatografske metode mogu se podijeliti i s obzirom na agregatno stanje pokretne faze, te prema tom kriteriju razlikujemo plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Tekućinsku kromatografiju možemo s obzirom na mehanizam odjeljivanja podijeliti na: razdjelnu (particijsku), adsorpcijsku, ionsko-izmjenjivačku, afinitetnu i kromatografiju isključenjem (Skoog i sur., 2007).

Jedna od najviše korištenih kromatografskih tehnika je HPLC (*high-performance liquid chromatography*), tj. visoko tlačna tekućinska kromatografija. HPLC metoda je toliko često

korištena jer ima visoku osjetljivost, točnost kod kvantitativnog određivanja i pogodna je za određivanje raznih nehlapivih i termički osjetljivih komponenti.

Kod navedene kromatografije tekući ili kruti uzorak, koji se prethodno otopi u odgovarajućem otapalu, se provodi kroz kromatografsku kolonu pomoću tekuće pokretne faze. Separacija je određena interakcijom između otapala i stacionarne faze, adsorpcijom između tekućine i krutine, interakcijom tekućine i tekućine u ovisnosti o polarnosti, veličinom čestica, razmjenom iona i interakcijom između otopine uzorka i mobilne faze (Harvey, 2000).

Tipični HPLC uređaj uključuje dvije kolone, analitičku kolonu koja služi za odjeljivanje i pretkolonu koja služi za pročišćavanje uzorka, tj. otklanjanje čestica koje bi mogle ometati analizu, a samim time produžuje vijek trajanja analitičke kolone. Kolone su središnji dio uređaja čiji odabir ovisi o komponentama u uzorku i mehanizmu odjeljivanja. Osim kolona, dijelovi HPLC uređaja su: rezervoar s mobilnom fazom, crpka, detektor i pisač (ili računalo). Pomoću crpke se iz rezervoara doprema mobilna faza. Detektori služe da na osnovu nekog fizikalnog ili kemijskog svojstva komponente registriraju njenu prisutnost u analiziranom uzorku. Mogu registrirati komponentu na temelju promjene nekog svojstva pokretne faze, kao što su detektor indeksa loma ili konduktometrijski detektor. Takvi detektori rade na osnovi indirektne detekcije, a postoje i oni koji direktno detektiraju sastojke na temelju njihovih svojstava. U takve detektore ubrajaju se apsorpcijski, fluorimetrijski i amperometrijski (elektrokemijski) detektori. Informacije koje daje detektor se bilježe i tako nastaje kromatogram koji je prikaz odziva detektora u vremenu (Skoog i sur., 2007).

Wollst i Anklam (2000) su u svom istraživanju nakon pripremanja uzorka i ekstrakcije spojeva koristili više kromatografskih tehnika i to: papirnu kromatografiju, plinsku te tankoslojnu kromatografiju, ali ipak najveći naglasak stavljaju na HPLC metodu. Ona se pokazala kao najbitnija zbog visoke rezolucije, učinkovitosti i reproducibilnosti, zbog relativno kratkog trajanja, zbog toga što ne utječe na hlapivost spoja te jer se metoda lako može uklopiti s raznim detektorima. Osim toga, naglasili su da se u većini slučajeva koristi kromatografija obrnutih faza koja se sastoji od C18 nepokretne faze na silikagelu gdje je veličina čestica 3-10 μm. Većinom se koristi gradijentno eluiranje kod kojeg su najčešće otapala koja se koriste vodene otopine octene, mravlje ili fosforne kiseline kao jedno otapalo te metanol ili acetonitril kao drugo. Detektor koji se u ovakvim istraživanjima većinom koristi je detektor s nizom dioda. On

ima prednost nad ostalim detektorima zato što može analizirati više valnih duljina odjednom, identificirati komponente pomoću pikova i odrediti čistoću pikova.

Natsume i sur. (2000) su u svojoj studiji između ostalih tvari kvantificirali polifenole u tamnoj čokoladi. Ukupne polifenole su mjerili Prussian Blue metodom koristeći epikatehin kao standard. HPLC metodom određeni su sljedeći polifenoli: katehin, epikatehin, procijanidin B2, procijanidin C1, cinamtanin A2, a u **Tablici 2** prikazani su rezultati istraživanja.

Tablica 2 Sadržaj polifenola u šest vrsta tamne čokolade (Natsume i sur., 2000)

Tamna čokolada	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6
Ukupni polifenoli (%)	1,59	1,52	2,13	1,23	2,11	1,71
PR-LC						
Katehin (%)	0,027	0,022	0,038	0,023	0,032	0,026
Epikatehin (%)	0,067	0,072	0,122	0,050	0,124	0,085
RP-LC/MS						
Procijanidin B2 (%)	0,034	0,032	0,046	0,021	0,054	0,032
Procijanidin C1 (%)	0,022	0,024	0,033	0,013	0,044	0,020
Cinamtanin A2 (%)	0,040	0,056	0,065	0,029	0,086	0,047
Gal-EC-EC (%)	0,004	0,005	0,006	0,004	0,008	0,004

U studiji Bussyja i sur. (2020) su opisani razvoj, validacija i primjena novih metoda za određivanje flavonola i procijanida u kakau. Pristup je bio taj da se flavonoli i procijanidi detektiraju i kvantificiraju na osnovi fluorescencije. HPLC-HILIC-FLD metoda je idealna opcija za zamjenu nespecifičnih metoda koje se još uvijek koriste za identifikaciju i kvantifikaciju flavanola i procijanidina kao što su Porterov test, Folin-Ciocalteu ili ORAC. Za njih se smatra da nisu prikladni za karakterizaciju ovih spojeva iako su korišteni u ispitnim materijalima prijašnjih studija u kojima se utjecalo na prehranu ispitanika. Ovakva metoda daje važnije informacije o

prirodnim spojevima, pomaže u razlikovanju kakaovih produkata te daje detaljnije informacije o sastojcima što se može iskoristiti kod krivotvorenja kakaovih proizvoda.

U istraživanju Ramli i sur. (2001) provedena je analiza metilksantina i polifenola u kakau i čokoladnim proizvodima. Za odjeljivanje je korištena µ-Bondapak 10 µm kolona (30 cm x 4,0 mm), a kao mobilna faza metanol, octena kiselina i voda u omjeru 20:1:79. Ova metoda je omogućila brzu identifikaciju, visoku reproducibilnost i linearnost širokog raspona ispitivanih vrsta spojeva. Rezultati istraživanja prikazani su u **Tablici 3**, a iz ove studije se može zaključiti da su najviše količine teobromina i kofeina bile u tamnoj čokoladi. Ukupni polifenoli kretali su se od 45 do 52 mg/g u čokoladnoj masi, 34 do 60 mg/g u kakaovim sjemenkama i 20 do 62 mg/g u kakaovom prahu (Ramli i sur., 2001).

Tablica 3. HPLC analiza teobromina i kofeina u čokoladi (Ramli i sur., 2001)

Uzorak	Tamna čokolada		Mliječna čokolada		Bijela čokolada	
	Teobromin	Kofein	Teobromin	Kofein	Teobromin	Kofein
Prosječna vrijednost (mg/g)	0,74	0,06	0,93	0,08	0,56	0,04
Raspon (mg/g)	0,36-1,04	0,03-0,09	0,82-1,04	0,06-0,09	0,36-0,70	0,03-0,07
Koeficijent varijacije (%)	3,64	5,49	3,73	4,84	3,56	5,52

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka različitih udjela kakaove ljuske na sastav i udio polifenola i metilksantina u različitim vrstama čokolade. Sastav i udio polifenola (galne kiseline, kava kiseline, *p*-kumarinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata) i metilksantina (teobromina i kofeina) određen je HPLC metodom, a udio ukupnih polifenola spektrofotometrijskom metodom.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Za proizvodnju čokolade korištena je kakaova masa (tvrtka DGF iz Francuske, na tržište stavlja tvrtka Gourmandise). Osim kakaove mase koristile su se dvije vrste kakaove ljuske, jedna netretirana kakaova ljuska (nusproizvod nakon prženja kakaovog zrna pri 135 °C, 55 minuta) te druga, kakaova ljuska tretirana visokonaponskim električnim pražnjenjem. Osim navedenih koristile su se još sljedeće sirovine: kakaov maslac (tvrtka DGF iz Francuske, na tržište stavlja tvrtka Gourmandise), šećer u prahu (tvrtka DGF iz Francuske, na tržište stavlja tvrtka Gourmandise) te lecitin (tvrtka Azelis Croatia d.o.o.). Čokolada sa osnovnim sastojcima (bez kakaove ljuske) se miješala ukupno 3 h. Sve sirovine su dodane na početku osim emulgatora koji je dodan nakon 2 h te vanilina koji je dodan nakon 2,5 h miješanja. Kakaova ljuska, dodana uz kakaov maslac pola sata prije ostalih sirovina, koristila se samljevena, prosijana na sitima i odvojene su frakcije ispod 71 µm. Temperatura kupelji je bila 55 °C, a brzina miješanja 60 okretaja po min za sve recepture. Za mliječne čokolade korišteno je 3 kg kuglica, a za tamne 2,5 kuglica. Za proizvodnju čokolada s dodatkom kakaove ljuske na početku su dodani kakaov maslac i kakaova ljuska, a nakon pola sata ostatak sirovina. Nakon 2,5 h dodani su emulgatori te nakon 3 h vanilin. Ukupno vrijeme miješanja za ovakve čokolade je bilo 3,5 h.

Tablica 4 Recepture čokolada korištenih u istraživanju

OZNAKA UZORKA	RECEPTURA
M0	kakaova masa 14,74 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN2,5	kakaova masa 12,24 %, netretirana kakaova ljuska 2,5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN5	kakaova masa 9,74 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN5-SIRUTKA	kakaova masa 9,74 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 10 %, sirutka 5 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN5-PALMINA MAST	kakaova masa 9,74 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 19,83 %, palmina mast 5 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN5-KOKOSOVA MAST	kakaova masa 9,74 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 19,83 %, kokosova mast 5 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MN5-LEC+PGPR	kakaova masa 9,74 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin (LEC) 0,2 %, PGPR (poliglicerol poliricinoleat) 0,2 %, vanilin 0,03 %
MT2,5	kakaova masa 12,24 %, tretirana kakaova ljuska 2,5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer u prahu 45 %, mlijeko u prahu 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
MT5	kakaova masa 9,74 %, tretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 24,83 %, šećer 45 %, mlijeko 15 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
T0	kakaova masa 36 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN5	kakaova masa 31 %, netretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN10	kakaova masa 26 %, netretirana kakaova ljuska 10 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN15	kakaova masa 21 %, netretirana kakaova ljuska 15 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN15-PALMINA MAST	kakaova masa 21 %, netretirana kakaova ljuska 15 %, kakaov maslac 16,57 %, palmina mast 5 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN15-KOKOSOVA MAST	kakaova masa 21 %, netretirana kakaova ljuska 15 %, kakaov maslac 16,57 %, kokosova mast 5 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TN15-LEC+PGPR	kakaova masa 21 %, netretirana kakaova ljuska 15 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin (LEC) 0,2 %, PGPR 0,2 %, vanilin 0,03 %
TT5	kakaova masa 31 %, tretirana kakaova ljuska 5 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TT10	kakaova masa 26 %, tretirana kakaova ljuska 10 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %
TT15	kakaova masa 21 %, tretirana kakaova ljuska 15 %, kakaov maslac 21,57 %, šećer u prahu 42 %, lecitin 0,4 %, vanilin 0,03 %

3.2.2. Kromatografska metoda

Za određivanje bioaktivnih komponenti korištena je HPLC metoda prema Barišić i sur. (2020) sa apsorpcijskim detektorom. Analiza je provedena na HPLC uređaju proizvođača Shimadzu koji se sastoji od kvarterne crpke LC-20AD, komore za kolonu CTO-20AC, pretkolone, detektora s nizom dioda (PDA, engl. *photo diode array*) SPD-M20A i autosamplera SIL-10 AF.

Odjeljivanje komponenti se izvršilo na HPLC koloni Inertsil ODS-3V (GL Sciences), dimenzija 250 x 4,6 cm, sa veličinama čestica punila od 5 µm. Upravljanje sustavom provedeno je uz pomoć računalnog programa LabSolution Life (Release 5.52).

Svi standardi i reagensi koji su korišteni za analizu su bili HPLC čistoće: (-)-epikatehin (EPI) (čistoće ≥ 90 %), (+)-katehin (KAT) (čistoće ≥ 99 %), (-)-epikatehin galat (EPG) (čistoće 98,59 %), galna kiselina (GK) (čistoće 95,5 %), *p*-kumarinska kiselina (*p*-KK) (čistoće ≥ 98 %), teobromin (TEO) (čistoće ≥ 99 %), kofein (KOF) (čistoće ≥ 99 %), kava kiselina (CK) (čistoće ≥ 98 %). Standardi metilksantina i fenolnih komponenti su kupljeni od proizvođača Sigma Aldrich (St. Louis, SAD).

Kao pokretna faza korišteni su metanol, čistoće ≥ 99,9 % (J.T.Baker, Nizozemska) i 1 %-tna mravlja kiselina, čistoće 98-100 % (Scharlau Chemie, Španjolska). Tijekom analize uvjeti gradijentog eluiranja bili su sljedeći: početni udio metanola u mobilnoj fazi bio je 10 %. Zatim je slijedilo linearno povećanje udjela metanola do 32 % u 15. minuti odnosno 40 % u 25. minuti analize. Udio metanola od 40 % zadržan je sljedećih 5 minuta, a zatim se linearno povećavao do 60 % u 30. minuti. U sljedećih 5 minuta udio metanola u mobilnoj fazi smanjio se na početnih 10 %. Volumen injektiranja uzorka je iznosio 20 µL, protok mobilne faze podešen je na 0,8 mL/min, a temperatura kolone i detektora na 30 °C. Snimanje spektra je provedeno u rasponu valnih duljina od 200 do 400 nm, dok je detekcija komponenti izvršena na valnoj duljini od 278 nm. Identifikacija odijeljenih komponenti provedena je na osnovu vremena zadržavanja te usporedbe apsorpcijskih spektara komponenti u uzorcima kakaove ljuske sa spektrima standarda. Kvantifikacija komponenti je izvršena metodom vanjske kalibracije, a za svaku komponentu je izrađena kalibracijska krivulja s otopinama standarda. Dobiveni kromatografski podaci su uspoređivani s podacima kalibracijske krivulje svake pojedine komponente.

Za analizu je odvagano 3,00 g uzorka čokolade te je izvršena ekstrakcija tri puta sa po 10 mL n-heksana (Carlo Erba Reagents, Italija), HPLC čistoće, da bi se uklonili lipidi. Nakon zadnjeg dekantiranja n-heksana talog je prenesen na filter papir i sušen na zraku 24 sata. Uslijedila je ekstrakcija suhog, odmašćenog uzorka s 5 mL 70 %-tnog metanola (J.T.Baker, Nizozemska) HPLC čistoće te 30 minuta ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Nakon ekstrakcije, uzorak se centrifugirao 10 minuta na 3000 rpm, a supernatant se dekantirao u odmjernu tikvicu od 10 mL. Postupak ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji i centrifugiranje je ponovljeno još jednom s

istom količinom 70 %-tnog metanola (5 mL). Nakon spajanja ekstrakata odmjerna tikvica je nadopunjena do oznake 70 %-tnim metanolom. Tako dobiveni ekstrakt se čuvao na -18 °C. Prije injektiranja u HPLC uređaj, ekstrakt je profiltriran kroz membranski filter promjera 0,45 μm.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

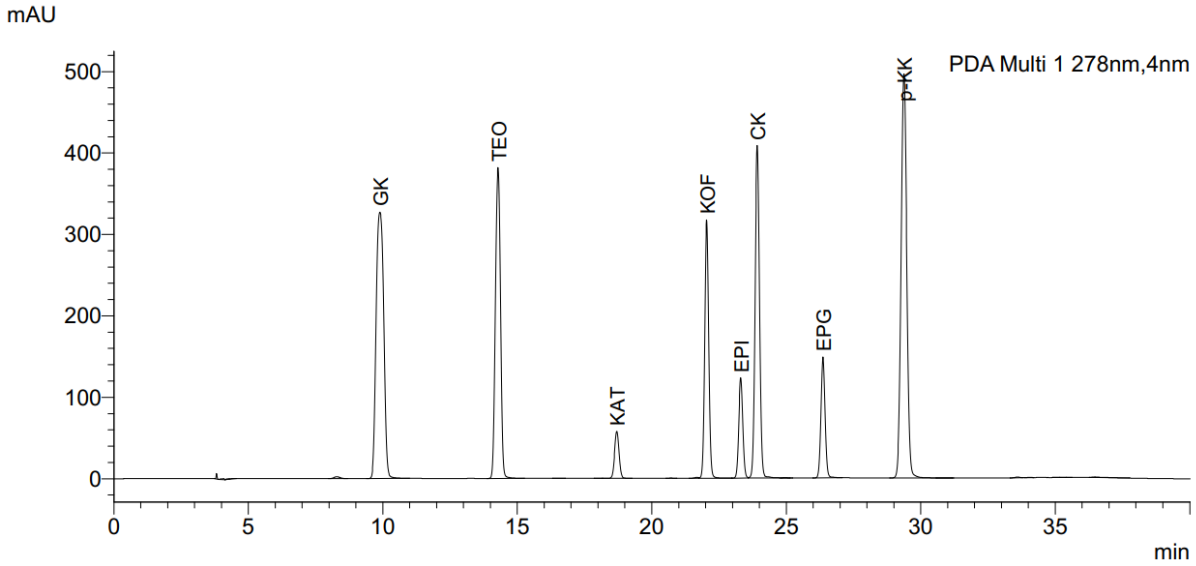
Za određivanje ukupnih fenolnih komponenti u uzorcima upotrebljavala se spektrofotometrijska metoda prema Singleton i sur. (1999). Za pripremu uzoraka korišten je metanolni ekstrakt koji je pripremljen za HPLC analizu. Temperiran je na sobnu temperaturu i homogeniziran te je nakon toga 100 μL preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL i poslije toga dodano 6 mL vode i 500 μL nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa (Kemika, Hrvatska). U šestoj minuti od dodatka reagensa je dodano 1,5 mL prethodno pripremljene otopine 20 %-tnog natrijevog karbonata (p.a. čistoće) te je na kraju tikvica nadopunjena vodom do oznake. Tako pripremljeni uzorci stajali su dva sata u tamnom na sobnoj temperaturi. Uz uzorke je priređena i slijepa proba. Mjerenje se vršilo na spektrofotometru UV-1800 proizvođača Shimadzu, na valnoj duljini od 760 nm.

Za kvantifikaciju komponenti je izrađena kalibracijska krivulja, a kao standard je korištena galna kiselina (Sigma-Aldrich, SAD). Koncentracijski raspon se kretao od 0,14 do 1,0 mg/mL galne kiseline.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UDIO METILKSANTINA I FENOLNIH KOMPOMENTI

Identifikacija bioaktivnih komponenti u čokoladama određenih HPLC metodom se vrši na temelju usporedbe vremena zadržavanja komponenti uzoraka čokolada s vremenima zadržavanja standarda koji su analizirani pod istim radnim uvjetima (**Slika 10**).



Slika 10 Kromatogram standarda ispitivanih bioaktivnih komponenti pri 278 nm (GK, galna kiselina; TEO, teobromin; KAT, (+)-katehin; KOF, kofein; EPI, (-)-epikatehin; CK, kava kiselina; EPG, (-)-epikatehin galat; *p*-KK, *p*-kumarinska kiselina)

HPLC analiza se provodila tako da su bile pripremljene po tri ekstrakcije svakog od 19 analiziranih uzoraka čokolada. **Tablice 5** i **6** prikazuju srednje vrijednosti tri mjerenja fenolnih komponenti i metilksantina u uzorcima čokolada. Uspoređujući te dvije tablice vidi se znatno veći udio bioaktivnih komponenti kod tamnih čokolada nego kod mliječnih čokolada jer je veći udio kakaove mase u čokoladama (**Tablica 4**).

Tablica 5 Udio metilksantina i fenolnih komponenti u analiziranim mliječnim čokoladama

OZNAKA UZORKA	Udio (mg/g)							
	TEO	KOF	KAT	EPI	EPG	GK	CK	*p*-KK
M0	3,198 ± 0,139	0,339 ± 0,028	0,237 ± 0,019	0,242 ± 0,019	0,215 ± 0,018	0,014 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,014 ± 0,000
MN2,5	2,799 ± 0,171	0,287 ± 0,024	0,165 ± 0,012	0,171 ± 0,012	0,338 ± 0,040	0,011 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,014 ± 0,000
MN5	3,056 ± 0,009	0,338 ± 0,004	0,183 ± 0,003	0,184 ± 0,002	0,410 ± 0,040	0,011 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,013 ± 0,001
MN5-SIRUTKA	2,932 ± 0,030	0,304 ± 0,003	0,167 ± 0,002	0,173 ± 0,002	0,364 ± 0,029	0,014 ± 0,001	0,004 ± 0,000	0,009 ± 0,005
MN5-PALMINA MAST	2,843 ± 0,041	0,270 ± 0,004	0,149 ± 0,004	0,154 ± 0,004	0,182 ± 0,003	0,010 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,013 ± 0,000
MN5-KOKOSOVA MAST	2,868 ± 0,057	0,288 ± 0,004	0,162 ± 0,004	0,166 ± 0,005	0,185 ± 0,024	0,011 ± 0,000	0,003 ± 0,001	0,014 ± 0,002
MN5-LEC+PGPR	2,992 ± 0,071	0,311 ± 0,010	0,167 ± 0,007	0,176 ± 0,005	0,304 ± 0,063	0,010 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,012 ± 0,000
MT2,5	3,029 ± 0,068	0,327 ± 0,015	0,202 ± 0,009	0,204 ± 0,009	0,244 ± 0,021	0,010 ± 0,001	0,004 ± 0,000	0,014 ± 0,001
MT5	2,146 ± 0,100	0,211 ± 0,011	0,113 ± 0,006	0,120 ± 0,008	0,201 ± 0,016	0,005 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,013 ± 0,001

GK, galna kiselina; EPI, (-)-epikatehin; KAT, (+)-katehin; EPG, (-)-epikatehin galat; TEO, teobromin; KOF, kofein; CK, kava kiselina; *p-KK*, *p*-kumarinska kiselina

Iz **Tablice 5** može se vidjeti da je udio metilksantina teobromina i kofeina veći nego udio fenolnih komponenti u svim mliječnim čokoladama koje su analizirane. Promatrajući uzorke i njihove recepture iz **Tablice 4** može se zaključiti da se kod čokolada gdje je dodana kakaova ljuska smanjuje udio bioaktivnih komponenti, svih osim udjela (-) epikatehin galata (EPG) čiji se udio povećao dodatkom kakaove ljuske kod većine analiziranih čokolada. Teobromin je najzastupljenija komponenta u svim mliječnim čokoladama, a najviši mu je udio u uzorku M0 (mliječna čokolada bez dodatka kakaove ljuske) u iznosu od 3,198 ± 0,139 mg/g (**Tablica 5**). S obzirom na to da je taj uzorak sadržavao najveći postotak kakaove mase (14,74 %) (**Tablica 4**), najveći udio teobromina u navedenom uzorku u odnosu na ostale analizirane mliječne čokolade bio je i za očekivati. Najmanji udio teobromina ima uzorak MT5 (mliječna čokolada sa dodatkom 5 % tretirane kakaove ljuske), a iznosi 2,146 ± 0,100 mg/g.

Također, dodatkom kakaove ljuske smanjuje se udio kako teobromina kao i ostalih bioaktivnih komponenti, osim EPG, upravo zbog toga što se smanjuje udio kakaove mase. Usporedivši uzorke slične recepture koje se razlikuju ponajviše u postotku kakaove ljuske u sastavu, npr. uzorci M0, MN2,5 i MN5 (**Tablica 5**), vidljivo je da uzorak M0 ima najviši udio bioaktivnih

spojeva od ta tri uzorka. M0 je mliječna čokolada bez kakaove ljuske stoga ima veći postotak kakaove mase zbog čega i jesu najviše razine analiziranih spojeva. MN2,5 u svom sastavu sadrži 2,5 % netretirane ljuske, a MN5 sadrži 5 % netretirane ljuske, pošto je u pitanju netretirana kakaova ljuska udijeli antioksidacijskih spojeva su viši kod MN5 uzorka. Usporedbom MT2,5 i MT5 uzoraka (**Tablica 4 i 5**) vidi se da povećanjem udjela tretirane kakaove ljuske u sastavu smanjuje udio bioaktivnih spojeva što se može pripisati utjecaju procesiranja kakaove ljuske prije dodatka u čokoladu.

Receptura i posljedični sastav uzorka je bitan za usporedbu rezultata kod određenih čokolada. Cilj je dobiti nutritivno bogatiji proizvod čime se smatra čokolada sa što većim udjelom bioaktivnih komponenti. Tako se dalje mogu usporediti uzorci MN5-sirutka, MN5-palmina mast, MN5-kokosova mast, MN5-LEC+PGPR (**Tablica 5 i 4**), oni imaju isti postotak kakaove ljuske (5 %) ali različit sastav mliječne sirovine (ili dio emulgatora) u recepturi. Može se primijetiti da uzorak koji u sastavu ima sirutku ima veći udio bioaktivnih komponenti dok su palmina i kokosova mast slične što se tiče udjela istih. Uzorak u koji su dodani lecitin i PGPR je po vrijednostima sličan uzorku sa sirutkom.

U **Tablici 6** se nalaze podaci o udjelu metilksantina i fenolnih spojeva u tamnim čokoladama, iz koje se vidi se da su najzastupljenije bioaktivne komponente teobromin i kofein, zatim (-)-epikatehin te (+)-katehin bez obzira da li je dodana kakaova ljuska ili ne.

Tablica 6 Udio metilksantina i fenolnih komponenti u analiziranim tamnim čokoladama

OZNAKA UZORKA	Udio (mg/g)							
	TEO	KOF	KAT	EPI	EPG	GK	CK	*p*-KK
T0	4,819 ± 0,082	0,887 ± 0,079	0,667 ± 0,065	0,701 ± 0,073	0,272 ± 0,033	0,042 ± 0,005	0,032 ± 0,005	0,024 ± 0,004
TN5	4,621 ± 0,042	0,856 ± 0,012	0,596 ± 0,008	0,613 ± 0,015	0,346 ± 0,013	0,041 ± 0,001	0,028 ± 0,002	0,023 ± 0,001
TN10	4,326 ± 0,016	0,738 ± 0,045	0,464 ± 0,030	0,471 ± 0,032	0,295 ± 0,029	0,039 ± 0,002	0,021 ± 0,002	0,017 ± 0,000
TN15	4,171 ± 0,066	0,653 ± 0,026	0,379 ± 0,027	0,384 ± 0,019	0,289 ± 0,019	0,035 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001
TN15-PALMINA MAST	4,221 ± 0,023	0,669 ± 0,008	0,410 ± 0,015	0,417 ± 0,005	0,273 ± 0,016	0,039 ± 0,004	0,024 ± 0,001	0,020 ± 0,000
TN15-KOKOSOVA MAST	4,043 ± 0,013	0,614 ± 0,015	0,355 ± 0,008	0,362 ± 0,007	0,237 ± 0,006	0,032 ± 0,001	0,017 ± 0,000	0,017 ± 0,000
TN15-LEC+PGPR	4,103 ± 0,071	0,690 ± 0,007	0,394 ± 0,006	0,404 ± 0,012	0,335 ± 0,016	0,039 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,018 ± 0,001
TT5	4,568 ± 0,061	0,812 ± 0,031	0,553 ± 0,018	0,561 ± 0,029	0,431 ± 0,036	0,033 ± 0,001	0,023 ± 0,003	0,021 ± 0,005
TT10	4,665 ± 0,528	0,683 ± 0,032	0,393 ± 0,027	0,473 ± 0,050	0,382 ± 0,044	0,030 ± 0,007	0,027 ± 0,010	0,022 ± 0,010
TT15	3,771 ± 0,106	0,562 ± 0,036	0,319 ± 0,021	0,280 ± 0,020	0,403 ± 0,037	0,019 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,013 ± 0,000

GK, galna kiselina; EPI, (-)-epikatehin; KAT, (+)-katehin; EPG, (-)-epikatehin galat; TEO, teobromin; KOF, kofein; CK, kava kiselina; *p-KK*, *p*-kumarinska kiselina

Rezultati analize ukazuju na to da je najzastupljenija bioaktivna komponenta teobromin i to u uzorku T0 koji sadrži najviši udio kakaove mase (36 %) (4,819 ± 0,082 mg/g), a najmanju količinu teobromina ima uzorak TT15 (tamna čokolada sa dodatkom 15 % tretirane kakaove ljuske) te ona iznosi 3,771 ± 0,106 mg/g. Ostali uzorci tamne čokolade (TN5, TN10, TN15), koji se razlikuju samo u udjelu netretirane kakaove ljuske, imaju manji udio teobromina i svih ostalih bioaktivnih spojeva. Razlog smanjenju teobromina u čokoladama sa dodatkom ljuske je taj što se dodatkom kakaove ljuske smanjuje udio kakaove mase u kojoj se nalazi veći udio tih spojeva. Smanjuje se udio svih bioaktivnih komponenti osim udjela (-)-epikatehin galata (EPG). Slične su usporedbe rezultata i kod uzoraka tamnih čokolada s dodatkom tretirane kakaove ljuske u udjelima 5 %, 10 % i 15 % (TT5, TT10 i TT15). Kod takvih čokolada vidljivo je smanjenje udjela bioaktivnih komponenti s povećanjem udjela kakaove ljuske (**Tablica 6**), s izuzetkom udjela (-)-epikatehin galata (EPG).

Ostale tamne čokolade TN15-palmina mast, TN15-kokosova mast, TN15-LEC+PGPR imaju isti udio netretirane kakaove ljuske, ali je razlika u dodanim emulgatorima i zamjenskim mastima.

Iz **Tablice 6** se vidi da je najpovoljniji utjecaj na sastav ispitivanih bioaktivnih komponenti imala palmina mast te su vrijednosti svih ispitivanih bioaktivnih komponenti najviše. Slijedi je uzorak TN15-LEC+PGPR koja ima viši udio bioaktivnih spojeva od čokolade koja u svom sastavu sadrži kokosovu mast.

Kada se usporede uzorci iste recepture, istog udjela kakaove ljuske, ali različito tretirane ljuske vidljivo je da uzorci koji sadrže netretiranu ljusku imaju viši udio bioaktivnih komponenti. Više je primjera za usporedbu, npr. količina teobromina u TT5 i TN5, kod TN5 uzorka ona iznosi 4,621 ± 0,042 mg/g, a kod TT5 iznosi 4,568 ± 0,061 mg/g (**Tablica 6**). Isto tako usporedi li se udio (+)-katehina kod uzoraka TN10 i TT10 dolazi se do istog zaključka, TN10 sadrži 0,464 ± 0,030 mg/g, a TT10 sadrži 0,393 ± 0,027 mg/g (**Tablica 6**). Dakle, udio bioaktivnih tvari u čokoladi se razlikuje i ovisi o tome kakva kakaova ljuska je u sastavu recepture, uzorci s netretiranom kakaovom ljuskom imaju viši udio bioaktivnih tvari od onih koje u sastavu sadrže tretiranu ljusku.

Glavne bioaktivne komponente tamnih čokolada bez i sa dodatkom kakaove ljuske su teobromin i kofein, (-)-epikatehin te (+)-katehin. U čokoladama gdje je dodana kakaova ljuska bio je manji udio bioaktivnih komponenti, uz izuzetak udjela (-)-epikatehin galata (EPG) čiji se udio povećao dodatkom kakaove ljuske kod gotovo svih analiziranih čokolada. Obzirom da je u uzorcima čokolada u koje je dodana kakaova ljuska, manji udio kakaove mase, dobiveni rezultati su očekivani.

4.2. UDIO UKUPNIH FENOLA

Spektrofotometrijskom metodom je određen ukupni udio fenolnih komponenti u ispitivanim uzorcima čokolada (**Tablica 7**).

Tablica 7 Udio ukupnih fenola u analiziranim uzorcima čokolada određen spektrofotometrijskom metodom

Uzorak	Ukupni fenoli (mg GAE/g)
M0	3,63 ± 0,22
MN2,5	2,61 ± 0,32
MN5	3,18 ± 0,07
MN5-sirutka	2,92 ± 0,07
MN5-palmina mast	2,35 ± 0,17
MN5-kokosova mast	2,78 ± 0,14
MN5-PGPR+LEC	2,71 ± 0,08
MT-2,5	3,09 ± 0,08
MT5	1,70 ± 0,23
T0	12,71 ± 0,11
TN5	10,86 ± 0,09
TN10	8,95 ± 0,44
TN15	8,87 ± 0,61
TN15-palmina mast	8,84 ± 0,28
TN15-kokosova mast	7,82 ± 0,14
TN15-LEC+PGR	8,57 ± 0,19
TT5	10,68 ± 0,50
TT10	7,94 ± 0,11
TT15	7,54 ± 0,40

Rezultati su dobiveni na temelju mjerenja istih metanolnih ekstrakata koji su korišteni za HPLC analizu, a dobivene srednje vrijednosti i pripadajuća standardna odstupanja su iskazana na temelju tri mjerenja. Iz **Tablice 7** je vidljivo da postoje velike razlike u udjelima ukupnih fenola između uzoraka tamne i mliječne čokolade što je razumljivo s obzirom na udio kakaove mase u uzorcima. Uzorak T0 pokazuje najvišu srednju vrijednost koja iznosi 12,71 ± 0,11 mg GAE/g

(**Tablica 7**) zbog najvišeg udjela kakaove mase u recepturi (**Tablica 4**). Udio ukupnih fenola se smanjuje sa smanjenjem kakaove mase u uzorcima tamne čokolade s dodanom kakaovom ljuskom. Mliječne čokolade imaju niže vrijednosti ukupnih fenola od tamnih čokolada, a najviši od njih ima uzorak M0 koja iznosi 3,63 ± 0,22 mg GAE/g, a najnižu uzorak MN5-palmina mast 2,35 ± 0,17 mg GAE/g.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Najzastupljenija komponenta u svim uzorcima bio je teobromin, a samim time i najzastupljeniji metilksantin; najzastupljenija fenolna komponenta bio je (+)-katehin, a zatim ga slijede (-)-epikatehin i galna kiselina.
- Tamne čokolade imale su značajno viši udio svih bioaktivnih komponenti u usporedbi s mliječnim čokoladama.
- U čokoladama gdje je dodana kakaova ljuska bio je manji udio bioaktivnih komponenti, uz izuzetak udjela (-)-epikatehin galata (EPG) čiji se udio povećao dodatkom kakaove ljuske kod većine analiziranih čokolada.
- Uzorci s netretiranom kakaovom ljuskom u usporedbi s uzorcima koji sadrže tretiranu kakaovu ljusku imali su veće koncentracije pojedinačnih fenola i metilksantina određenih HPLC metodom te ukupnih fenola određenih spektrofotometrijskom metodom.
- Zamjena dijela kakaove mase kakaovom ljuskom nije značajno smanjila udio bioaktivnih komponeneti što otvara mogućnost proizvodnje funkcionalnih čokolada sa dodatkom kakakove ljuske, ali je potrebno analizirati i druge parametre kvalitete čokolada.

6. LITERATURA

Abbe MMJ, Amin I: Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?. *Molecules*, 13:2190-2219, 2008.

Ačkar Đ: Materijali s predavanja na kolegiju „*Tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda*“. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2020.

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao, G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH: HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47:4184-4188, 1999.

Andreeva EY, Dmitrienko SG, Zolotov YA: Methylxanthines: properties and determination in various objects. *Russian Chemical Reviews*, 81(5):397-414, 2012.

Andujar I, Recio MC, Giner RM, Rios JL: Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012.

Ašperger D, Babić S, Bolanča T, Mutavdžić Pavlović D, Ukićl Š: Kromatografska analiza u sustavu kvalitete analitičkoga procesa u Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. pregledni rad, *Kemija u industriji*, 68(9-10):535−546, 2019.

Barišić V, Kopjar M, Jozinović A, Flanjak I, Ačkar Đ, Miličević B, Šubarić D, Jokić S, Babić J: The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules.* 24, 3163, 2019.

Barišić V, Flanjak I, Križić I, Jozinović A, Šubarić D, Babić J, Miličević B, Ačkar Đ: Impact of high-voltage electric discharge treatment on cocoa shell phenolic components and methylxanthines. *Journal of Food Process Engineering*, 43:13057, 2020.

Beckett ST: Industrial chocolate manufacture and use: Fourth edition, Blackwell Publishing, New York, 2009.

Belščak A, Komes D, Horžić D, Kovačević Ganić K, Karlovic D: Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International,* 42:707–716, 2009

Belščak-Cvitanović A, Komes D, Benković M, Karlović S, Hečimović I: Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from Rubus idaeus L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International,* 48:820–830, 2012.

Buiarelli F, Bernardini F, Simonetti G, Di Filippo P, Pomata D, Riccardi C, Risoluti R: A Rapid and Accurate Method for the Determination of Methylxanthines in Different Nervous System Stimulant Beverages. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 102(3): 865–871, 2019.

Bussy, U, May BR, Olanrewaju Y, Hewitt G, Anderson N, Crozier A, Ottaviania JI, Kwik-Uribea C: Reliable, accessible and transferable method for the quantification of flavanols and procyanidins in foodstuffs and dietary supplements. *Food Function*, 11:131, 2020.

Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G: Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99: 1-11, 2008.

Food Standards Agency: McCance and Widdowson's the Composition of Foods, *Royal Society of Chemistry,* 2002.

Galanakis CM: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, Woodhead Publishing, UK, 2018.

Goldoni L: Tehnologija konditorskih proizvoda - kakao i čokolada. Kugler, Zagreb, RH, 2004.

Gutiérrez TJ: State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16:131-1344, 2017.

Hernández-Hernández C, Viera-Alcaide I, Morales-Sillero AM, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez, G: Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240: 831–839, 2018.

Ignat I, Volf I, Pope VI: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4):1821-1835, 2011.

Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA , Viuda-Martos M: Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International,* 49:39-45, 2012.

Martini S, Conte A, Tagliazucchi D: Comprehensive Evaluation of Phenolic Profile in Dark Chocolate and dark chocolate Enriched with Sakura Green Tea Leaves or Turmeric Powder. *Food Research International*, 112: 1–16, 2017.

Matijević B, Blažić M: Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka, pregledni rad, *Mljekarstvo* 58(2): 151-169, 2008.

MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva RH: Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima. Narodne novine 73/05, 2005.

Munjal S, Mathur H, Lodha L, Singh A: The Chemistry Of Chocolate. *Internatinal Journal of Innovative Research & Growth*, 8(10): 106-109, 2019.

Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T: Analyses of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa, and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64:12, 2581-2587, 2000.

Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe KJ: In vitro hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food & Function*, 3:1044-1050, 2012.

Okiyama DCG, Navarro SLB, Rodrigues CEC: Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology,* 63:103-112, 2017.

Ramli N, Yatim AM, Said M, Hok HC: HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 7:2, 377-386, 2001.

Sim SYJ, Ng, JW, Ng WK, Forde CG, Henry CJ: Plant Polyphenols to Enhance the Nutritional and Sensory Properties of Chocolates. *Food Chemistry*, 200: 46–54, 2016.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Principles of Instrumental Analysis*. Sixth edition, Thomson, 2007.

Škrabal S: Utjecaj sastojaka na reološko ponašanje čokoladnih masa i stabilnost čokolada. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Vitola V, Ciproviča I: The Effect of Cocoa Beans Heavy and Trace Elements on Safety and Stability of Confectionery Products, Rural Sustainability Research, 35:330, 20-23, 2016.

Wang L, Neagele T, Doerfler H, Fragner L, Chaturvedi P, Nukarinen L, Bellaire A, Huber W, Weiszmann J, Engelmeier D, Ramsak Z, Gruden K, Weckwerth W: System level analysis of cacao seed ripening reveals a sequential interplay of primary and secondary metabolism leading to polyphenol accumulation and preparation of stress resistance. *The Plant Journal*, 87: 318–332, 2016.

Web izvor 1: https://www.trendhunter.com/trends/herbal-chocolates

Wilson PK: Chocolate and Health: Chemistry, Nutrition and Therapy An Historical Perspective. *The Royal Society of Chemistry*, Chapter 1, 2015.

Wollgast J, Anklam E: Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33:423-447, 2000.

Yapo BM, Besson V, Koubala BB, Koffi KL: Adding Value to Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source*. American Journal of Food and Nutrition*, 1(3):38-46, 2013.