

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ В КАКАО И ШОКОЛАДЕ

А.Яшин, к.х.н., Я.Яшин, д.х.н., Н.Черноусова, к.х.н., П.Федина, к.т.н.,  
НТЦ "Хроматография",  
НПО "Химавтоматика",  
Б.Немзер,  
VDF FutureCeuticals, США

**К**онцепция современной медицины – профилактика заболеваний. Здоровый образ жизни помогает человеку сохранить на долгие годы работоспособность, бодрость, социальную активность. Немаловажную роль в поддержании тонуса играет питание. Еда становится фактором поддержания здоровья благодаря содержанию витаминов, минералов и антиоксидантов. В последние годы к природным антиоксидантам обращено пристальное внимание. Множество исследований свидетельствуют об их благоприятном влиянии на человеческий организм: укрепляется иммунитет, уменьшается вероятность сердечно-сосудистых, онкологических и эндокринных заболеваний. К числу особенно богатых антиоксидантами продуктов относится какао. Изучению его антиоксидантных свойств и посвящена статья.

Какао известно более 3000 лет. В виде напитка его потребляли ольмеки, майя и ацтеки. Ацтеки называли дерево, на котором росли плоды какао, "кака хуатль", а напиток из его плодов – "чокоатль", что означает "горькая вода". Какао-бобы – это семена плодов. Перед употреблением их сушили, измельчали и разводили водой. Чтобы уменьшить горечь, в какао добавляли разные пряности и соки других растений. Ацтеки очень высоко ценили плоды какао, одно время они даже использовали их как деньги. Впервые в Испанию какао ввез Кортес в 1528 году. Через 150–200 лет какао и шоколад потребляли во всех странах Европы. До начала 20 века какао считалось лекарством, оно было включено в фармакопее некоторых стран. С тридцатых годов 20 века какао стали широко использовать как пищевой напиток.

В последние десятилетия опубликованы обзоры [1–14], показывающие исключительно

высокий оздоровительный эффект от употребления какао и шоколада, в частности при сердечно-сосудистых заболеваниях [3, 10, 13], онкологических [1, 6], нейродегенеративных [5] и др. Антиоксиданты какао биодоступны, при потреблении какао повышается общая антиоксидантная активность плазмы человека [5]. Наивысшего значения она достигает через 1–2 часа после приема какао, а затем снижается в течение 6 часов [15]. После потребления темного шоколада содержание маркеров окислительного стресса, в частности малонового диальдегида, в плазме уменьшается.

Какао – один из самых сбалансированных и полноценных пищевых продуктов. В нем содержится около 10% белков, 14% сахаров, 32% жиров [5], суммарное содержание антиоксидантов достигает 7 г/100 г, метилксантинов 0,5–2%. В отличие от кофе и чая, в какао мало кофеина, но больше тео-

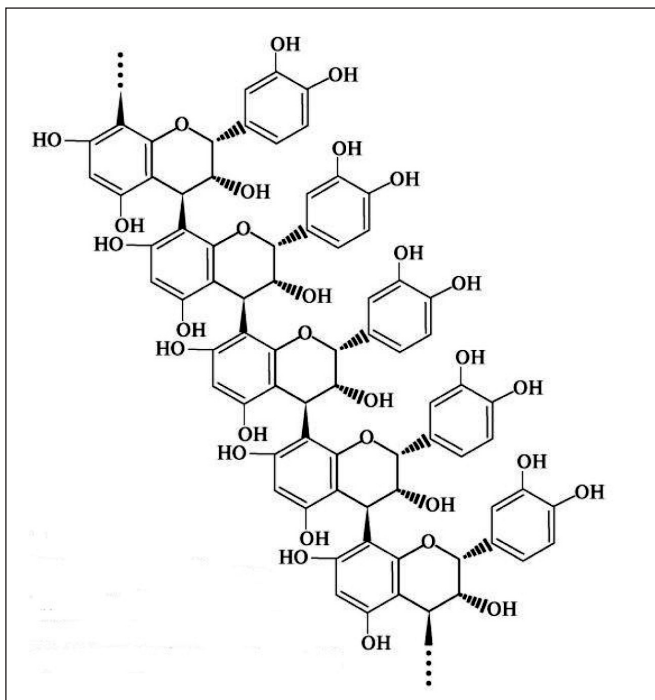


Рис. 1. Проантоцианидины

брома. В какао содержатся витамины А, Е, В, В2 и др. в пределах от 0,2 до 2,4 мг/100 г, а также необходимые для человека микроэлементы. Таким образом, какао содержит все необходимые для здорового питания человека компоненты: белки, жиры, углеводы, витамины, микроэлементы и антиоксиданты. Поэтому не случайно какао называют "пищей богов" [16].

Ежегодно в мире продается более 3,5 млн. тонн какао-порошка. Производят какао в странах Латинской Америки (родина какао), Африки, Азии. Самые большие потребители какао – Европа (42,7%), Америка (23,7%), Азия (19,4%), Африка (4,2%). Больше всего потребляют шоколада в Швейцарии – до 10 кг в год на человека.

Какао употребляют в виде напитка либо в составе шоколада. Настоящий шоколад – это смесь какао-порошка, масла какао и сахара. Шоколад должен содержать более 50% какао-порошка. В последние годы стал особенно популярен темный горький шоколад с содержанием какао 70, 80, 90 и даже 99%. Белый шоколад содержит масло какао, молоко, а какао-порошка в нем нет.

Какао и шоколад обладают высокой антиоксидантной активностью, что связано с высоким содержанием проантоцианидинов и флавоноидов [17]. Ранее антиоксидантная активность какао и шоколада измерялась методом ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) [17]. Порция темного шоколада (40 г), содержащая 517 мг про-

цианидина, обеспечивала антиоксидантную активность 9100 единиц по методу ORAC (стандарт – тролокс). По данным работы [15], количество антиоксидантов, получаемое с одной порцией какао или шоколада, превосходит ежедневную норму потребления антиоксидантов, установленную в США. Потребление какао вносит большой вклад и в испанскую диету [24]. В работе [25] показано, что в какао антиоксидантов больше, чем в чае и красном вине, а в работе [26] исследовано, что в какао есть флавоноиды, не обнаруженные в чае.

В основном лечебный эффект какао обусловлен высоким содержанием в нем водо- и жирорастворимых антиоксидантов [15], а также антоцианов. Ранее в основном измерялась антиоксидантная активность водорастворимых фракций какао [17]. В этой работе впервые определено содержание водо- и жирорастворимых антиоксидантов в какао и шоколаде.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В КАКАО И ШОКОЛАДЕ

Определение суммарного содержания антиоксидантов проводилось на проточно-инжекционной системе "ЦветЯуза-01-АА" с амперометрическим детектированием. На этом приборе селективно и с высокой чувствительностью определяются только антиоксиданты за счет выбора типа рабочего электрода и приложенного к нему потенциала. В отличие от многих других косвенных методов, амперометрический метод – прямой, так как антиоксиданты определяются в режиме реального времени. Антиоксиданты – восстановители, на рабочем электроде из стеклоуглерода они окисляются при постоянном потенциале, за счет чего возрастает электрический ток.

Перед началом измерений строится градуировочный график по стандартному соединению. Для определения водорастворимых антиоксидан-

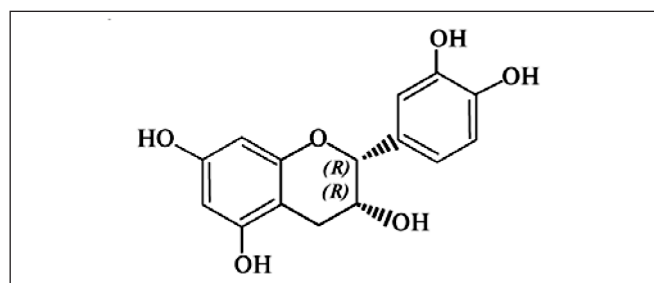


Рис. 2. Эпикатехин

Таблица 1. Суммарное содержание жирорастворимых (ССЖА) (стандарт – галловая кислота) и водорастворимых антиоксидантов (ССА) (стандарт – кверцетин) в какао

Наименование	ССЖА мг/100г	ССА мг/100г	Производитель
Какао порошок "Золотой ярлык"	522,0	420,0	ОАО "Красный Октябрь", Россия
Какао порошок "Смак"	377,0	1770,0	ЗАО "Пресконита", Литва
Какао "Золотой якорь"	325,0	870,0	ООО "Кондитерская фабрика "Богородская", Россия
Какао обезжиренное VAN	105,0	800,0	Маспекс-ГМВ, Польша
Какао порошок "Российский"	97,0	1500,0	ОАО "Кондитерское объединение "Россия", Россия
Какао "Nesquik Plus"	45,0	-	ОАО "Кондитерское объединение Россия", ООО "Нестле Россия"
Какао "Wawel SA" (какао Naturalne)	43,0	2570,0	Польша
Какао "Cacao Wadel E"	32,0	2370,0	Польша
Какао "Hot Cacao Mix"	31,0	139,0	Nestle
Какао "Ренессанс с сахаром и сливками"	10,0	149,0	ЗАО "Ренессанс Русской упаковки", Россия
Какао "Mix Fix"	8,0	170,0	ЗАО "Крюгер-Гранд", Россия
Какао "Cocoa Deco Morreno"	7,0	1800,0	Польша
Organic Hot Cacao Mix	6,0	200,0	США

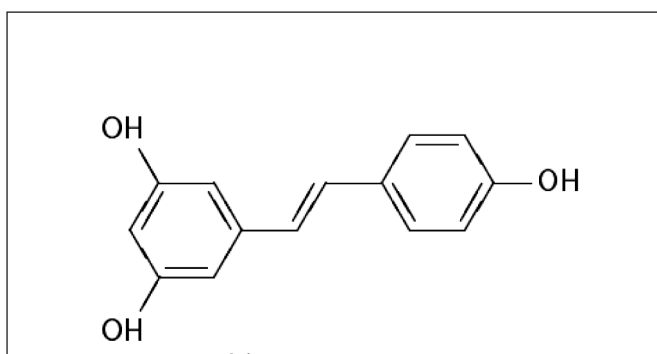


Рис. 3. Транс-ресвератрол

тов стандарт – кверцетин, для жирорастворимых – галловая кислота.

Дозирование и ввод пробы проводится шестиходовым краном (среднеквадратичное отклонение (СКО) дозирования краном менее 0,5%, СКО последовательных измерений – менее 5%). Доза пробы обычно в пределах 20–50 мкл. В качестве элюента при определении водорастворимых антиоксидантов служит постоянно протекающая через коммуникации прибора бидистиллированная вода, подкисленная ортофосфорной кислотой, при определении жирорастворимых

антиоксидантов – ацетон, подкисленный ортофосфорной кислотой. Скорость подачи элюентов – в пределах 0,5–1,5 мл/мин. Проба измельчается, взвешивается точная навеска и производится экстракция водорастворимых антиоксидантов 70%-ным раствором этилового спирта, для экстракции жирорастворимых антиоксидантов используется ацетон.

Полученный сигнал фиксируется на экране компьютера в виде пиков. С помощью программного обеспечения рассчитывается площадь полученного пика. Результаты анализа в виде полного протокола можно распечатать на принтере.

Прибор "ЦветЯуза-01-АА" зарегистрирован в Госреестре средств измерений, на него также получено свидетельство прибора медицинского назначения для определения антиоксидантного статуса человека. Методики измерения как водорастворимых антиоксидантов так и жирорастворимых антиоксидантов аттестованы [18, 19]. С 2012 года вышли ГОСТы с использованием амперометрического метода и прибора "ЦветЯуза-01-АА" для определения антиоксидантов разных пищевых продуктов и напитков [20, 21].

Таблица 2. Суммарное содержание жирорастворимых (ССЖА) (стандарт – галловая кислота) и водорастворимых антиоксидантов (ССА) (стандарт – кверцетин) в шоколаде

Наименование	ССЖА мг/100г	ССА мг/100г	Производитель
Шоколад "Alpen Gold" (темный)	135,0	-	ООО "Крафт Фудс Рус", Россия
Шоколад "Luker" (черный)	115,0	-	Колумбия
Шоколад "Красный Октябрь" (горький 80% какао)	66,0	-	ОАО "Красный Октябрь", Россия
Шоколад "Вечерний звон"	66,0	-	ОАО "Рот Фронт", Россия
Шоколад "NOIR AUTHENTIQUE"	56,0	-	FREY AG, Швейцария
Шоколад "Люкс"	49,0	-	ОАО "Кондитерский концерт Бабаевский", Россия
Шоколад "Ritter Sport" с элитным какао из Эквадора (горький 71% какао)	47,0	-	Alfred Ritter GmbH & Co. KG, Германия
Шоколад черный (мелкокусковый)	45,0	-	Kakao Verarbeitung Berlin, Германия
Шоколад "Alpen Gold" молочный с цельным фундуком	34,0	-	ООО "Крафт Фудс Рус", Россия
Шоколад горький, 80% какао	27,0	-	ОАО "Красный Октябрь", Россия
Молочный шоколад с кофе "Кофе с молоком"	26,0	-	ОАО "Кондитерское объединение Россия", Россия
Шоколад "Luker" (белый)	25,0	-	Колумбия
Элитный горький шоколад, 87% какао	24,0	-	Кондитерская фабрика "Русский шоколад", Россия
Шоколад "Российский" (темный)	22,0	-	ОАО "Кондитерское объединение Россия", Россия
Шоколад белый (мелкокусковый)	17,0	-	Kakao Verarbeitung Berlin, Германия
Горячий шоколад классический "LaFesta" (какао-напиток)	16,0	-	ООО "Маспекс-Калининград", Россия
Шоколад "Lindt excellence" dark 70% какао	14,0	-	Lindt & Sprungli, Франция
Шоколад горький	14,0	-	ОАО "Кондитерское объединение "Сладко", Россия
Горячий шоколад "Лесной орех"	13,0	386,0	ЗАО "Сантэк", Россия
Organic Hot Chocolate Drink	12,0	1080,0	Англия
Горячий шоколад "Молочный"	11,0	397,0	ЗАО "Сантэк", Россия

Разделение компонентов какао проводилось на жидкостном хроматографе "Цветяуза" с амперометрическим и УФ-детектором.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ

Самые известные антиоксиданты в какао – полифенолы: проантоцианидины (рис.1), эпикатехин (рис.2) и транс-ресвератрол (рис.3). В последние

годы состав какао исследуют всеми современными методами, особенно часто – методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС [22, 23]. Этими методами удалось количественно определить сотни разных антиоксидантов: проантоцианидины (5–7 г/100 г), флаванолы – эпикатехин и катехин (0,35 мг/100 г), ресвератрол, флавонолы (кверцетин, кверцетин глюкозид), флавоны (лютеолин, ориентин, изо-

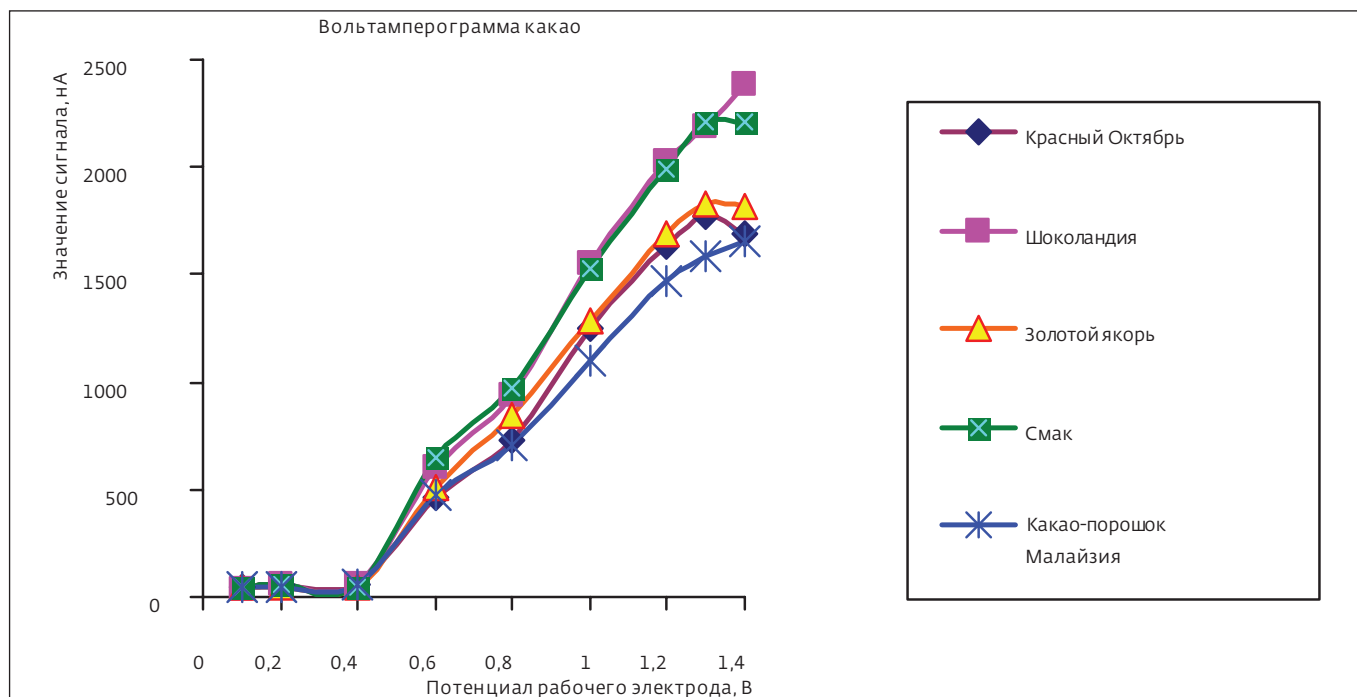


Рис. 4. Динамическая вольтамперограмма разных сортов какао

ориентин), флаваноны, оксиароматические кислоты (феруловая, кофейная, сиреневая, ванилиновая, кумариновая, хлорогеновая и др.).

Мы измерили суммарное содержание антиоксидантов (ССА) – как водорастворимых, так и жирорастворимых – во многих образцах какао и шоколада разного происхождения. Суммарное содержание водорастворимых и жирорастворимых антиоксидантов определялось амперометрическим методом в какао, производимом в РФ, Литве, Польше, США, Германии (табл.1). К сожалению, на упаковках какао не была указана страна происхождения какао-порошка. Подобные измерения выполнены впервые.

Наибольшее количество жирорастворимых антиоксидантов содержится в отечественных

образцах какао ("Золотой ярлык", "Смак" и "Золотой якорь"). Это связано с тем, что многие зарубежные производители отжимают масло какао под давлением 400 атм, поскольку масло какао – самое ценное в косметике. По суммарному содержанию водорастворимых антиоксидантов впереди польские образцы какао, приобретенные в США. В смесях какао (для потребления в виде горячих напитков) содержится мало как водорастворимых, так и жирорастворимых антиоксидантов.

Наибольшее содержание жирорастворимых антиоксидантов обнаружено в образцах шоколада из Швейцарии, Колумбии и России ("Красный Октябрь") (табл.2). Низкое содержание жирорастворимых антиоксидантов (менее 20 мг/100 г)

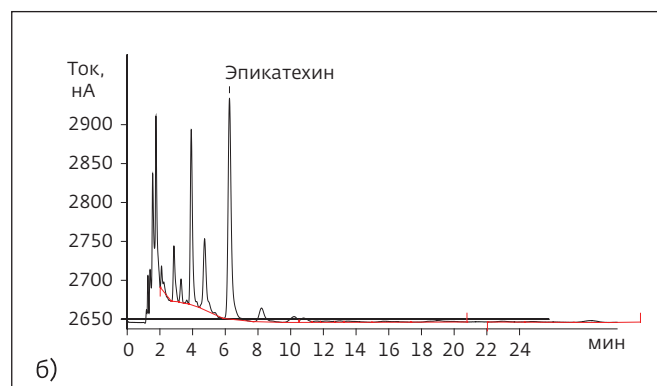
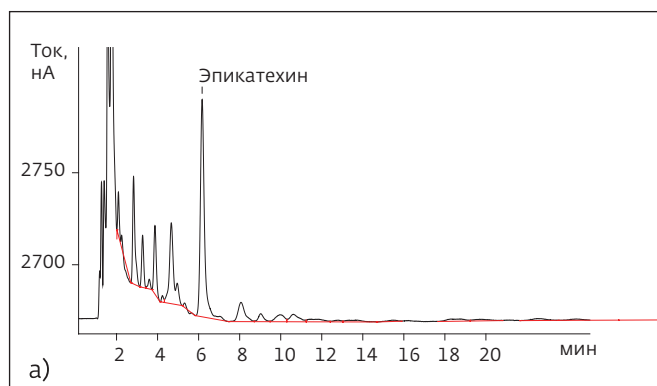


Рис. 5. Хроматограммы водного раствора какао на колонке C18 150x4 мм, элюент - ацетонитрил: вода. а) Какао "Золотой ярлык", б) какао "Смак"



в образцах шоколада связано с тем, что в них находится мало масла какао. Стоимость шоколада и какао должна быть связана с содержанием антиоксидантов. Производители должны указывать содержание антиоксидантов в продаваемых образцах какао и шоколада.

О соотношении разных водорастворимых антиоксидантов в какао можно судить по динамическим вольтамперограммам – зависимостям площадей пиков (сигналов) от приложенного потенциала к рабочему электроду (рис.4). Как видно из рис.4, зависимости для разных видов какао близки. По динамическим вольтамперограммам можно судить о подлинности какао.

Профильные хроматограммы антиоксидантов получены методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором (рис.5). В этих условиях регистрируются только антиоксиданты – это в основном разные флавоноиды и оксиароматические кислоты одного происхождения. По сравнению с другими флавоноидами, в какао больше всего эпикатехина. Его содержание нами оценено более 100 мг/100 г.

\*\*\*

Экспериментальные данные содержания водорастворимых и жирорастворимых антиоксидантов для какао (13 образцов) и шоколада (21 образец), продаваемых в разных странах разными производителями, сильно различаются. Поскольку антиоксиданты защищают человека от опасных болезней и старения, на них в разных странах установлены нормы потребления, в том числе и в нашей стране [27].

Чтобы не болеть и меньше стареть, каждый человек должен потреблять ежедневно не менее 250 мг антиоксидантов. Для больных людей, а также для тех, кто испытывает тяжелые физические нагрузки (например, спортсмены на ответственных соревнованиях) норма потребления антиоксидантов должна быть в четыре раза больше. Необходимо указывать количество антиоксидантов на упаковках какао и шоколада, для того, чтобы потребители этих продуктов смогли составлять личную антиоксидантную диету.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Cooper K.A., Donovan J.L., Waterhouse A.L., Williamson G.** Cocoa and health: a decade of research. – *British Journal of Nutrition*, 2008, v. 99, p.1-11.
2. **Pucciarelli D.L., Grivetti L.E.** The medicinal use of chocolate in early North America. – *Molecular Nutrition and Food Reserch*, 2008, v. 52, p.1215-1227.
3. **Ding E.L., Hutfless S.M., Ding X., Girota S.** Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. – *Nutrition and Metabolism*, 2006, v. 3, p. 1-12.
4. **Wollgast J., Anklam E.** Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? – *Food Research Internation*, 2000, v. 33, p.449-459.
5. **Ramiro-Puig E., Casadesus G., Lee H.-G. et al.** Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. – *European Journal of Nutrition*, 2009, v. 48, p.54-61.
6. **Maskarinec G.** Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. – *Nutrition and Cancer*, 2009, v. 61, p.573-579.
7. **Lippi G., Franchini M., Montagnana M., Favalaro E.J., Guidi G.C., Targher G.** Dark Chocolate: consumption for pleasure or therapy? – *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2009, v. 28, p. 482-488.
8. **Ramiro-Puig E., Castell M.** Cocoa: antioxidant and immune modulator. – *Review British Journal of Nutrition* 2009, v. 101, p. 931-940.
9. **Corti R., Flammer A.J., Hollenberg N.K., Luscher T.F.** Cocoa and cardiovascular health. – *Circulation AHA*, 2009, v.108, p. 1433-1441.
10. **Flammer A.J., Hermann F., Sudano I. et al.** Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. – *Circulation*, 2007, v. 116, p. 2376-2382.
11. **Selmi C., Mao T.K., Keen C.L., Schmitz H.H., Eric G.M.** The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. – *Journal Cardiovascular Pharmacology*, 2006, v. 47, p.163-171.
12. **Keen C.L.** Chocolate: food as medicine/medicine as food. – *Journal of the American. College of Nutrition*, 2001, v. 20, p. 436S-439S.
13. **Kurlandsky S.B., Stote K.S.** Cardioprotective effects of chocolate and almond consumption in healthy women – *Nutrition Research*, 2006, v. 26, p. 509-516.
14. **Sies H., Schewe T., Heiss C. and Kelt M.** Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. – *American Journal of Clinical. Nutrition*, 2005, v. 81, p. 304S-312S.
15. **Vinson J.A., Proch J., Bose P. et al.** Chocolate is as a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, on antiatherosclerotic agent in on animal model and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. – *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, v. 54, p.8071-8076.

16. **Dillinger T.L., Barriga P., Escarcega S., Jimenez M., Salazar Lowe D., Grivetti L.E.** Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. – *Journal of Nutrition*, 2000, 130(8S Suppl):2057S–72S.
17. **Gu L., House S.S., Wu X. et al.** Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, v. 54, p. 4057–4061.
18. **Яшин А.Я., Черноусова Н.И.** Методика выполнения измерений содержания антиоксидантов в напитках и пищевых продуктах, биологически активных добавках, экстрактах лекарственных растений амперометрическим методом. Свидетельство об аттестации №31-07, 2007.
19. **Яшин А.Я., Черноусова Н.И., Федина П.А.** Методика выполнения измерений суммарного содержания жирорастворимых антиоксидантов в пищевых продуктах амперометрическим методом. Свидетельство об аттестации №120-08, 2008.
20. **ГОСТ Р 54037-2010.** Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов амперометрическим методом в овощах, фруктах, продуктах их переработки, алкогольных и безалкогольных напитках.
21. **ГОСТ Р 54036-2010.** Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов в клубнях картофеля амперометрическим методом.
22. **Del Rosario Brunetto M., Guttierrez L., Delgado Y., Galignani M. et al.** Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by HPLC method with on-line sample clean up in a switching-column system. – *Food Chemistry*, 2007, v. 100, p. 459–467.
23. **Nelson B.C., Sharpless K.E.** Quantification of the predominant monomeric catechins in baking chocolate standard reference material by LC/APCI-MS. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, v. 51, p. 531–537.
24. **Maria Tabernero, Jose Serrano, Fulgencio Saura-Calixto.** The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. – *International Journal of Food Science and Technology*, 2006, 41 (Supplement 1), p.28–32.
25. **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(25):7292–7295.
26. **Lazarus S.A., Hammerstone J.F., Schmitz H.H.** Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. – *Lancet*, 1999, 354(9192):1825.
27. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации (Утверждено главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко).

## НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"



### УСПЕХИ НАНОИНЖЕНЕРИИ: ЭЛЕКТРОНИКА, МАТЕРИАЛЫ, СТРУКТУРЫ

Под ред. Дж. Дэвиса, М. Томпсона

Москва: Техносфера, 2011. – 496 с.+ 16 с. цв. вклейки, ISBN 978-5-94836-292-2

Новейшие технологии включают в себя разработку, описание, а также производство и практическое использование самых разнообразных наноразмерных структур, устройств и систем. В междисциплинарном поле этой области исследований пересекаются и перекрываются экспериментальные и теоретические разработки химиков, физиков, инженеров-электронщиков, механиков, материаловедов, биохимиков, молекулярных биологов. Именно сочетание различных подходов и методов является характерной особенностью наиболее интересных и многообещающих разработок в нанотехнологиях. Книга представляет собой сборник последних результатов, полученных молодыми английскими учеными, многие из которых являлись стипендиатами Королевского общества или Исследовательского совета инженерных и физических наук Великобритании. Проводимые ими работы ведутся на самых передовых рубежах познания, а в более широком контексте создают панораму современного состояния нанонауки и нанотехнологии вообще.

Цена: 975 р.

Как заказать наши книги?

☎ 125319 Москва, а/я 594; ☎ (495) 956-3346, 234-0110; knigi@technosphaera.ru, sales@technosphaera.ru