

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Маслов Олександр Юрійович**

УДК 613.292:663.951:543.062:615.453.3

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Фітохімічне вивчення та стандартизація лікарських засобів антиоксидантної дії з листя зеленого чаю**

226 – Фармація, промислова фармація

22 - Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О. Ю. Маслов

Науковий керівник Колісник Сергій Вікторович,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Харків-2022

## АНОТАЦІЯ

*Маслов О. Ю.* Фітохімічне вивчення та стандартизація лікарських засобів антиоксидантної дії з листя зеленого чаю – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2022.

У дисертаційній роботі наведено результати експериментального вирішення наукової задачі, яка полягає у фітохімічному вивченні екстрактів листя зеленого чаю та розробці методів аналізу лікарських засобів з антиоксидантною дією, створених на їх основі.

Обґрунтовано доцільність визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом; обрані оптимальний робочий електрод (платиновий), електроліт (0,067 моль/л фосфатний буфер з рН = 7,2 – 7,6) і склад медіаторної системи (співвідношення  $K_3[Fe(CN)_6]$  і  $K_4[Fe(CN)_6]$  – 0,002/0,00002 моль/л).

Досліджено вплив концентрації етанолу при визначенні рівня сумарної антиоксидантної активності. Для одержання коректного значення АОА, величину загальної зміни потенціалу, яку було визначено під час аналізу зразка слід зменшити на величину потенціалу, відповідну концентрації етилового спирту аналізованого розчину. Етанольні розчини мають відсоток вкладу в АОА: 1,85 %, 3,56 %, 4,89 %, 6,76 %, 7,63 % для 20, 40, 60, 80 та 96 % етанолу, відповідно. Розроблено підхід і запропоновано рівняння для розрахунку сумарної АОА з урахуванням впливу концентрації етанолу.

Розроблена потенціометрична методика визначення антиоксидантної активності епігалокатехін-3-О-галлату, проведена її валідація за показниками: лінійність, правильність (відсоток відновлення 96,01-101,61 %), збіжність (1,86 %) і проміжна прецизійність (1,34 %).

Запропоновано терміни, що виражають АОА досліджуваних зразків. Для створення таких термінів як «золотий» стандарт був обраний епігалокатехін-3-О-

галат, оскільки ЕГКГ має найвищу здатність інактивувати вільні радикали. Встановлено АОА максимальної допустимої рекомендованої добової дози ЕГКГ (562 ммоль-екв./г) і дієтичних добавок «Green Tea Extract» (Source Naturals, США) -  $36,51 \pm 0,46$  ммоль/таб., «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна) -  $29,78 \pm 0,35$  ммоль/таб., «Зелений чай» (Pharmacom, Україна) -  $16,67 \pm 0,29$  ммоль/таб.. Значення АОА дієтичних добавок також були розраховані в ммоль-екв./г, щоб класифікувати їх за запропонованими умовними термінами. В цьому випадку антиоксидантна активність «Green Tea Extract» склала  $205,00 \pm 4,10$  ммоль-екв./г, «Екстракту зеленого чаю» і «Зеленого чаю» (Pharmacom, Україна) -  $104,10 \pm 2,08$  ммоль-екв./г та  $60,05 \pm 1,20$  ммоль-екв./г. відповідно.

Проведено стандартизацію листя зеленого чаю відповідно вимог ЄФ 9.0 за параметрами: опис, макроскопія, мікроскопія, ідентифікація (тонкошарова хроматографія), втрата в масі при висушуванні -  $6,2 \pm 0,12$  % (не більше 8,0 %), загальна зола -  $6,5 \pm 0,13$  % (не більше 9,0 %), вміст катехінів -  $25,78 \pm 0,52$  % (не менше 8,5 %) і кофеїну -  $2,8 \pm 0,06$  % (не менше 1,5 %).

Фітохімічний скринінг основних груп БАР листя зеленого чаю показав наявність катехінів, флавоноїдів, алкалоїдів, гідроксикоричних та органічних кислот. Методом ТШХ були ідентифіковані епікатехін, епігалокатехін-3-О-галат, рутин, кофеїн, теобромін, хлорогенова, лимона, янтарна і оксалатна кислоти. Всі досліджені дієтичні добавки містять епігалокатехін-3-О-галат і епікатехін, кофеїн - в слідових кількостях; флавоноїди та гідроксикоричні кислоти не визначені.

Спектрофотометричним методом встановлено, що в листі зеленого чаю сумарний вміст фенольних сполук становить 24,12 %, катехінів – 20,79 %, флавоноїдів – 1,27 %, гідроксикоричних кислот і кофеїну – 0,67 % та 2,56 % відповідно.

Проведено вивчення фенольних сполук у листі зеленого чаю методом ВЕРХ. Було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 4 флавонолів (1,34 %), 3 флавононів (0,25 %), 2 флавонів (0,64 %), 4 фенолкарбонових кислот (1,39 %) і 5 домінуючих флаван-3-олів (20,56 %).

Серед флаван-3-олів превалюють епігалокатехін-3-О-галат – 9,85 %, епікатехін галат – 4,12 %, епігалокатехін – 4,03 %. Епікатехіну (2,95 %) та катехіну (0,61

%) значно менше. На підставі високих показників подібності до стандартних речовин  $I_T$  і  $I_L$  було ідентифіковано 4 флаваноли: кверцетин-3-О-рутенозид – 0,16 %, кемпферол-7-О-глікозид – 0,13 %, кверцетин – 0,16 %, мірицетин-3-О-глікозид – 0,22 %; 3 флаванони: нарінгенін – 0,02 %, гесперидин – 0,19 %, гесперітин – 0,04 %; 2 флавони: лютеолін-6-С-глікозид – 0,33 %, апігенін-8-С-глікозид – 0,31 %. Фенольні кислоти представлені галовою – 0,21 %, кофейною – 1,16 %, коричною – 0,01 %, феруловою – 0,01 % кислотами.

Розроблена потенціометрична методика кількісного визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю, проведена її валідація за параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність. Для визначення оптимальних умов екстракції органічних кислот з сировини проведена оцінка впливу таких факторів, як співвідношення «сировина:екстрагент», температура, кількість та тривалість часу екстракції. Найбільш повне вилучення органічних кислот може бути досягнуто за 2 цикли екстракції при 100 °С зі співвідношенням «сировина:екстрагент» 1:20 протягом 120 хв. За розробленою методикою вміст суми органічних кислот в листі зеленого чаю визначений на рівні  $1,83 \pm 0,03$  %.

Відповідно до розділу «Дієтичні добавки» ДФУ 2.0, всі дієтичні добавки повинні відповідати фармако-технологічним вимогам до дозованих форм за вмістом важких металів, залишкових кількостей пестицидів та мікробіологічною чистотою. Проте відсутні будь-які вимоги до визначення якісного складу та кількісного вмісту основних діючих речовин.

За результатами моніторингу фармакопей різних країн було з'ясовано, що Фармакопея США містить монографію «Декофеїнізований екстракт зеленого чаю», в якій зазначені вимоги щодо якісного складу та кількісного вмісту катехінів у дієтичній добавці на основі екстракту зеленого чаю. Кількісний вміст поліфенолів у перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат має бути не менше 60 %, а кофеїну - не перевищувати 0,1 %. Оскільки не існує інших нормативних документів, що регулюють вміст катехінів у дієтичних добавках з екстрактом зеленого чаю, нами були взяті за основу саме вимоги Фармакопеї США 38.

Для визначення кількісного вмісту катехінів у дієтичних добавках розроблена спектрофотометрична методика, відповідно якої встановлено, що сумарний вміст катехінів у «Green Tea Extract» складає  $156,80 \pm 1,36$  мг, «Екстракті зеленого чаю» –  $89,00 \pm 0,88$  мг, «Зеленому чаї» –  $38,00 \pm 0,75$  мг. Дієтичні добавки «Green Tea Extract» і «Екстракт зеленого чаю» відповідають вимогам Фармакопеї США 38 щодо вмісту катехінів; всі три досліджувані дієтичні добавки за всіма критеріями також відповідають вимогам ДФУ 2.3.

За розробленою методикою визначено сумарну антиоксидантну активність листя, спиртових настоянок і настою зеленого чаю. Максимальна сумарна антиоксидантна активність листя зеленого чаю становить  $660,75$  ммоль-екв./ $m_{\text{сух.зал.}}$ ; настоянка на 60 % етанолі виявляє активність на рівні  $48,27 \pm 1,44$  ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ , 96 % настоянка дещо їй поступається ( $47,49 \pm 1,42$  ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ ), а активність настою – в 2,7 разів менша.

Проведено дослідження по визначенню оптимального екстрагенту і кратності екстракції для одержання рідкого екстракту з листя зеленого чаю. Як екстрагенти використовували спирт етиловий різної концентрації – 96, 60, 40, 20 %; воду та хлороформ. За результатами досліджень кількісного вмісту основних груп БАР встановлено, що з листя зеленого чаю 60 % етанолом забезпечується найкраща екстракція катехінів; оптимальна кратність екстракції з цієї сировини складає два рази. Регресійним аналізом визначено, що найбільш висока кореляція ( $R = 0,9255$ ) спостерігається між рівнем АОА і вмістом фенольних сполук у витягах листя зеленого чаю.

Розроблено параметри стандартизації рідкого екстракту листя зеленого чаю за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (якісні реакції, ТШХ), вміст етанолу (не менше 60,0 %), метанол і 2-пропанол (не більше 0,05 % (об/об) метанолу і 0,05 % 2-пропанолу), сухий залишок (не менше 20 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст суми фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту – не менше 17,00 %), вміст гідроксикоричних кислот (у

перерахунку на хлорогенову кислоту – не менше 1,00 %), антиоксидантна активність (не менше 529 ммоль-екв./m<sub>сух. зал.</sub>). Досліджено 5 серій на відповідність розробленим вимогам та розроблено проект МКЯ «Екстракт зеленого чаю рідкий».

Обґрунтовано склад і технологію одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю; розроблено параметри їх стандартизації досліджено 5 серій на відповідність розробленим вимогам.

Проведена стандартизація дієтичної добавки «Кахінол» за вимогами ДФУ і параметром антиоксидантної активності.

*Ключові слова:* дієтична добавка, лист зеленого чаю, антиоксидантна активність, рідкий екстракт, валідація, біологічні активні речовини, гранули.

#### *Список публікацій здобувача*

1. Дослідження якісного складу та кількісного вмісту деяких груп біологічно активних речовин у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю / О.Ю. Маслов, С.В. Колісник, О.В. Гречана, А.Г. Сербін. *Запорізький медичний журнал*. 2020. Том 23, № 1(124). С. 132-137. (**Web of Science Core Collection**) DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
2. The study of the effect of ethyl alcohol concentrations on the antioxidant activity of ascorbic acid solutions / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, S.V. Ponomarenko, E.Y. Akhmedov, Z.V. Shovkova. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 74. P. 44-47. DOI: 10.24959/ophcj.21.231947 (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовка статті).
3. Study and evaluation antioxidant activity of dietary supplements with green tea extract / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, V. I. Stepanenko. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 2. P. 215-219. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306 (Особистий

внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

4. Determination of catechins in green tea leaves by HPLC compared to spectrophotometry / O.Yu. Maslov, M.A. Komisarenko, Y.S. Kolisnyk, T.A. Kostina. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 3(75). P. 28-33. DOI: 10.24959/ophcj.21.238177 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
5. Study of flavonoids and phenolic acids in green tea leaves / O.Y. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, E.Yu. Akhmedov, S.M. Poluiian, Z.V. Shovkova. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 3. P. 287–291. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.3.240287 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
6. Development and Validation of a Titrimetric Method for Quantitative Determination of Free Organic Acids in Green Tea Leaves / O.Y. Maslov, S.V. Kolesnik, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, T.A. Kostina. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 4. P. 304–311. (**Scopus**) (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
7. Development the composition and technology for obtaining a dietary supplement “Cachinol” with the antioxidant activity in the form of granules used in the polycystic ovary syndrome / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, T.A. Kostina, K.V. Dynnyk. *News of Pharmacy*. 2022. Vol. 103, № 1. P. 42–47. DOI: 10.24959/nphj.22.77 (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовка статті).
8. Study of total antioxidant activity of green tea leaves (*Camellia sinensis* L.) / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, M.Yu. Golik. *Herba Polonica*. 2022. Vol. 68, № 1. P. 1–9. (**Scopus**) DOI: 10.2478/herp-2022-0003. (Особистий внесок – брав

участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

9. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Шовкова З.В., Ахмедов Е.Ю., Полуян С.М., Мороз В.П., Погосян О.Г., Костіна Т.А., Бризицький О.А. Спосіб одержання засобу з антиоксидантною дією з листя зеленого чаю : пат. 150496 Україна : А61К 127/00, А61Р 39/06, А61К 36/82. № u202105657 ; заявл. 07.10.2021 ; опубл. 23.02.2022, Бюл. № 8. 3 с (Особистий внесок – брав участь в проведенні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
10. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Кошовий О.М., Пономаренко С.В., Осолодченко Т.П., Голік М.Ю., Колісник Ю.С., Костіна Т.А., Алтухов О.О., Ахмедов Е.Ю. Спосіб одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю з антиоксидантною дією : пат. 151690 Україна : А61К 36/82; А61К 31/7004; А61Р 39/06. № u 2021 07135; заявл. 10.12.2021 ; опубл. 01.09.2022, Бюл. № 35. 3 с. (Особистий внесок – брав участь в проведенні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).
11. Maslov O.Yu., Kovalenko V.S. Grechana O.V. UV-spectrophotometric determination of caffeine in green tea leaf. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVII міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів, м. Харків, 9-10 квітня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020, С. 96-97.
12. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кофеїну в листі зеленого чаю. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матеріали IV Міжнародної науково-практичної internet-конференції НФаУ, м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 166.
13. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення якісного складу катехінів в листі зеленого чаю. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали V міжнародної науково-практичної інтернет конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 308-309.



14. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology*: матеріали міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 131.
15. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах*: матеріали II міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 3-4 червня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 355.
16. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Kolisnyk Y.S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. *3<sup>rd</sup> International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects*», Tallin, 25-26 June 2021, Tallin: Interconf, 2021. P. 232-233.
17. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А. Визначення кількісного вмісту суми гідроксикорічних кислот в листі зеленого чаю. *Інтеграція освіти, науки, науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути*: III міжнародна дистанційна науково-практична конференція, м. Дніпро, 11-12 серпня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 391.
18. Маслов О.Ю. Вивчення сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету м. Харків, 10 вересня 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 287-288.
19. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А., Колісник С.В. Дослідження антиоксидантної активності дієтичної добавки «Кахінол» з екстрактом листя зеленого чаю. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2021»*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р., Запоріжжя: ЗДМУ, 2021. С. 68.

20. Maslov O.Yu. Development and validation titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. *Youth pharmacy science: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*, НФаУ, м. Харків, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 172.
21. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А. Дослідження технологічних властивостей гранул з екстрактом листя зеленого чаю. *Youth pharmacy science: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*, НФаУ, м. Харків, 7-8 грудня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 174.
22. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Komisarenko M.A., Kolisnyk Y.S. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate. *Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates: 4th International Scientific and Practical Internet Conference*, Dnipro, 15–16 August 2022. Dnipro: Way of Science, 2022. P. 33–34.

## ANNOTATION

*Maslov O.Yu.*: Phytochemical study and standardization medicines with antioxidant activity from green tea leaves – A qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for the degree of Doctor of Philosophy degree in specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy» (22- Health care). - National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis presents the results of an experimental solution to a scientific problem, which consists in the phytochemical study of green tea leaf extracts and the development of methods for the analysis of medicines with antioxidant activity created on their basis.

The expediency of determining the antioxidant activity by the potentiometric method is substantiated; the optimal working electrode (platinum), electrolyte (0.067 mol/l phosphate buffer with pH = 7.2 – 7.6) and composition of the mediator system (ratio of  $K_3[Fe(CN)_6]$  and  $K_4[Fe(CN)_6]$ ) was selected – 0.002/0.00002 mol/l).

The effect of ethanol concentration on determining the level of total antioxidant activity was investigated. To obtain the correct value of AOA, the value of the total

change in potential, which was determined during the analysis of the sample, should be reduced by the value of the potential corresponding to the concentration of ethyl alcohol of the analyzed solution. Ethanol solutions have percentage contribution to AOA: 1.85%, 3.56%, 4.89%, 6.76%, 7.63% for 20, 40, 60, 80 and 96% ethanol, respectively. An approach was developed and an equation was proposed for calculating the total AOA taking into account the effect of ethanol concentration.

A potentiometric method for determining the antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate was developed, and its validation was carried out according to the parameters: linearity, accuracy (recovery percentage 96.01-101.61%), precision (1.86%) and intermediate precision (1.34 %).

The terms expressing the AOA of the studied samples are proposed. Epigallocatechin-3-O-gallate was chosen as the "gold" standard for creating such terms because EGCG has the highest ability to inactivate free radicals. The AOA of the maximum permissible recommended daily dose of EGCG (562 mmol-eq./g) and dietary supplements "Green Tea Extract" (Source Naturals, USA) was established -  $36.51 \pm 0.46$  mmol/tab., "Green Tea Extract" (Elite Pharm, Ukraine) –  $29.78 \pm 0.35$  mmol/tab., Green tea (Pharmacom, Ukraine) –  $16.67 \pm 0.29$  mmol/tab. AOA values of dietary supplements were also calculated in mmol-eq./g to classify them according to the proposed conventional terms. In this case, the antioxidant activity of "Green Tea Extract" was  $205.00 \pm 4.10$  mmol-eq./g, "Green Tea Extract" and "Green Tea" (Pharmacom, Ukraine) -  $104.10 \pm 2.08$  mmol-eq./g and  $60.05 \pm 1.20$  mmol-eq./g. in accordance.

Standardization of green tea leaves was carried out in accordance with the requirements of EPh 9.0 according to the following parameters: description, macroscopy, microscopy, identification (thin-layer chromatography), mass loss during drying -  $6.2 \pm 0.12\%$  (no more than 8.0%), total ash -  $6.5 \pm 0.13\%$  (not more than 9.0%), the content of catechins -  $25.78 \pm 0.52\%$  (not less than 8.5%) and caffeine -  $2.8 \pm 0.06\%$  (not less 1.5 %).

Phytochemical screening of the main BAS groups of green tea leaves showed the presence of catechins, flavonoids, alkaloids, hydroxycinnamic and organic acids. Epicat-

echin, epigallocatechin-3-O-gallate, rutin, caffeine, theobromine, chlorogenic, citric, succinic and oxalic acids were identified by TLC method. All tested dietary supplements contain epigallocatechin-3-O-gallate and epicatechin, caffeine - in trace amounts; flavonoids and hydroxycinnamic acids not determined.

The spectrophotometric method established that the total content of phenolic compounds in green tea leaves is 24.12 %, catechins – 20.79 %, flavonoids – 1.27 %, hydroxycinnamic acids and caffeine – 0.67 % and 2.56 %, respectively.

Phenolic compounds in green tea leaves were studied by HPLC. 4 flavonols (1.34 %), 3 flavonones (0.25 %), 2 flavones (0.64 %), 4 phenylcarboxylic acids (1.39 %) and 5 dominant flavan-3-ols were identified and quantified (20.56 %).

Among flavan-3-ols, epigallocatechin-3-O-gallate prevails - 9.85 %, epicatechin gallate - 4.12 %, epigallocatechin - 4.03 %. Epicatechin (2.95 %) and catechin (0.61 %) are significantly less. On the basis of high indicators of similarity to standard  $I_T$  and  $I_L$  substances, 4 flavanols were identified: quercetin-3-O-ruthenoside - 0.16 %, kaempferol-7-O-glycoside - 0.13 %, quercetin - 0.16 %, myricetin-3-O-glycoside – 0.22 %; 3 flavanones: naringenin – 0.02 %, hesperidin – 0.19 %, hesperitin – 0.04 %; 2 flavones: luteolin-6-C-glycoside – 0.33 %, apigenin-8-C-glycoside – 0.31 %. Phenolic acids are represented by gallic - 0.21 %, caffeic - 1.16 %, cinnamic - 0.01 %, ferulic - 0.01 % acids.

A potentiometric method for quantitative determination of the amount of free organic acids in green tea leaves was developed, and its validation was carried out according to parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, stability. In order to determine the optimal conditions for the extraction of organic acids from raw materials, an assessment of the influence of such factors as the "raw material: extractant" ratio, temperature, amount and duration of extraction time was carried out. The most complete extraction of organic acids can be achieved in 2 cycles of extraction at 100 °C with a ratio of "raw material: extractant" of 1:20 for 120 min. According to the developed method, the content of the amount of organic acids in green tea leaves was determined at the level of  $1.83 \pm 0.03$  %.

According to the "Dietary Supplements" section of the SPhU 2.0, all dietary supplements must meet the pharmaco-technological requirements for dosage forms for the

content of heavy metals, residual amounts of pesticides and microbiological purity. However, there are no requirements for determining the qualitative composition and quantitative content of the main active substances.

Based on the results of monitoring the pharmacopoeias of various countries, it was found that the US Pharmacopoeia contains the monograph "Decaffeinated green tea extract", which specifies the requirements for the qualitative composition and quantitative content of catechins in a dietary supplement based on green tea extract. The quantitative content of polyphenols in terms of epigallocatechin-3-O-gallate should be at least 60 %, and caffeine should not exceed 0.1 %. Since there are no other regulatory documents regulating the content of catechins in dietary supplements with green tea extract, we took as a basis the requirements of the US Pharmacopoeia 38.

To determine the quantitative content of catechins in dietary supplements, a spectrophotometric assay was developed, according to which it was determined that the total content of catechins in "Green Tea Extract" is  $156.80 \pm 1.36$  mg, "Green Tea Extracts" is  $89.00 \pm 0.88$  mg, "Green tea" -  $38.00 \pm 0.75$  mg. Dietary supplements "Green Tea Extract" and "Green Tea Extract" meet the requirements of the US Pharmacopoeia 38 regarding the content of catechins; all three studied dietary supplements by all criteria also meet the requirements of SPhU 2.3.

According to the developed method, the total antioxidant activity of leaves, alcohol tinctures and green tea infusion was determined. The maximum total antioxidant activity of green tea leaves is  $660.75$  mmol-eq./m<sub>dry res</sub> on 60 % ethanol shows activity at the level of  $48.27 \pm 1.44$  mmol/m<sub>dry res</sub>, 96 % tincture is somewhat inferior to it ( $47.49 \pm 1.42$  mmol/m<sub>dry res</sub>), and the activity of the infusion is 2.7 times lower.

The study was conducted to determine the optimal extractant and extraction frequency for obtaining a liquid extract from green tea leaves. Ethyl alcohol of different concentrations was used as extractants - 96, 60, 40, 20 %; water and chloroform. According to the results of research into the quantitative content of the main groups of BAS, it was established that the best extraction of catechins from green tea leaves with 60 % ethanol is ensured; the optimal multiplicity of extraction from this raw material is two

times. Regression analysis determined that the highest correlation ( $R = 0.9255$ ) is observed between the level of AOA and the content of phenolic compounds in green tea leaf extracts.

The parameters of standardization of the liquid extract of green tea leaves were developed according to the following indicators: description, solubility, identification (qualitative reactions, TLC), ethanol content (not less than 60.0 %), methanol and 2-propanol (not more than 0.05 % (v/v) methanol and 0.05% 2-propanol), dry residue (not less than 20 %), heavy metals (not more than 100 ppm), microbiological purity, the content of the sum of phenolic compounds (in terms of gallic acid - not less than 17.00 %), the content of hydroxycinnamic acids (in terms of chlorogenic acid - not less than 1.00 %), antioxidant activity (not less than 529 mmol-eq./m<sub>dry res</sub>). 5 series were studied for compliance with the developed requirements, and the MCQ project "Liquid green tea extract" was developed.

The composition and technology of obtaining granules with green tea leaf extract are substantiated; the parameters of their standardization were developed; 5 series were studied for compliance with the developed requirements.

Standardization of dietary supplement "Kahinol" was carried out according to the requirements of SPhU and the parameter of antioxidant activity.

*Key words:* dietary supplement, green tea, leaf, antioxidant activity, liquid extract, dry extract, validation, biologically active substances, granules.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....</b>	<b>18</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>20</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ЗЕЛЕНИЙ ЧАЙ, ЯК ДЖЕРЕЛО ОДЕРЖАННЯ ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК З АНТИОКСИДАНТНОЮ ДІЄЮ (огляд літератури).....</b>	<b>26</b>
1.1 Хімічний склад листя зеленого чаю.....	26
1.2 Фармакологічна дія листя чаю .....	30
1.3 Вільні радикали у виникненні патогенезу захворювань, класифікація антиоксидантів .....	32
1.4 Аналіз ринку дієтичних добавок на основі листя зеленого чаю.....	38
Резюме .....	50
<b>РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>52</b>
2.1 Об'єкти дослідження.....	52
2.2 Відомості про обладнання, методи і реактиви.....	52
2.3 Методики визначення БАР у сировині листя зеленого чаю та дієтичних добавках.....	55
<b>РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ.....</b>	<b>75</b>
3.1 Обґрунтування доцільності визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом .....	75
3.2 Вибір умов визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом.....	78
3.2.1 Вибір робочого електрода для визначення а нтиоксидантної активності потенціометричним методом .....	78
3.2.2 Вибір електроліту для визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом .....	80

3.2.3 Вибір робочих концентрацій та співвідношення $K_3[Fe(CN)_6]$ , $K_4[Fe(CN)_6]$ для визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом.....	81
3.3 Дослідження впливу концентрації етанолу при визначенні антиоксидантної активності.....	82
3.4 Розробка та валідація потенціометричної методики визначення антиоксидантної активності епігалокатехін-3-О-галлату.....	86
3.5 Дослідження антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю .....	88
Висновки до розділу 3 .....	90
<b>РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БАР В ЛИСТІ ЗЕЛЕНОГО ЧАЮ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ НА ЙОГО ОСНОВІ.....</b>	
4.1 Відповідність сировини листя зеленого чаю вимогам Європейської Фармакопеї 9.0 .....	93
4.2 Ідентифікація основних груп БАР у листі зеленого чаю та дієтичних добавках на основі його екстракту .....	93
4.3 Кількісне визначення основних груп БАР у зеленому чаї.....	95
4.4 Дослідження фенольних сполук у листі зеленого чаю методом ВЕРХ ....	96
4.5 Розробка та валідація методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю.....	100
4.6 Розробка методики кількісного визначення катехинів у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю.....	107
4.7 Відповідність дієтичних добавок на основі листя зеленого чаю вимогам ДФУ.....	110
4.8 Кількісне визначення БАР та антиоксидантної активності настоянок та настою листя зеленого чаю .....	112
4.9 Дослідження сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю .....	113



4.10	Визначення оптимального екстрагенту і кратності екстракції при одержанні рідкого екстракту з листя зеленого чаю .....	120
	Висновки до розділу 4 .....	127
<b>РОЗДІЛ 5 СТАНДАРТИЗАЦІЯ РІДКОГО ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ЗЕЛЕНОГО ЧАЮ ТА ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ НА ЙОГО ОСНОВІ .....</b>		
	<b>НА ЙОГО ОСНОВІ .....</b>	<b>131</b>
5.1	Стандартизація рідкого екстракту листя зеленого чаю .....	131
5.2	Розробка технології одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю .....	138
5.3	Розробка специфікації та стандартизація гранул з екстрактом листя зеленого чаю.....	142
5.4	Стандартизація дієтичної добавки «Кахінол» на основі екстракту листя зеленого чаю згідно вимогам ДФУ .....	148
	Висновки до розділу 5. ....	150
	<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>152</b>
	<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>154</b>
	<b>ДОДАТКИ .....</b>	<b>178</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

- АМР-протеїнкіназа – аденінмонофосфат протеїнкіназа;
- АОА – антиоксидантна активність;
- АОС – антиоксидантна система;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активна форма кисню;
- БАР – біологічно активні речовини;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ВРО – вільнорадикальне окиснення;
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
- ДФУ – Державна Фармакопея України;
- ЕГКГ – епігалокатехін-3-О-галат;
- ІЛ – інтерлейкін;
- ЛВЩ– ліпопротеїди високої щільності;
- ЛНЩ – ліпопротеїди низької щільності;
- НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид;
- НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат;
- ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;
- РНК-залежна РНК-полімераза – рибозонуклеїнова кислота-залежна рибозонуклеїнова кислота-полімераза;
- СПК – синдром полікістозу яєчників;
- ТШХ – тонкошарова хроматографія;
- УФ-спектр – ультрафіолетовий спектр;
- ХА – хвороба Альцгеймера;
- х.ч. – хімічно чистий;
- ч.д.а. – чистий для аналізу;
- АВТС – 2,2'-азіно-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота);
- DRPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил;
- FRAP – фероредуруюча антиоксидантна активність;
- ICH – директива Міжнародної конференції гармонізації;

$I_L$  – ступінь подібності;

$I_T$  – індекс подібності часу утримування;

NF- $\kappa$ B – ядерний фактор каппа ланцюга активованих В клітинами;

RSD – відносне стандартне відхилення;

SD – стандартне відхилення;

$\alpha$ -ФНО –  $\alpha$  – фактор некрозу пухлини

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Основною причиною розвитку захворювань є надлишковий вміст вільних радикалів та порушення балансу між антиоксидантною та прооксидантною системами. Для інактивації вільних радикалів застосовуються антиоксиданти, найсильнішими з яких вважають похідні флавоноїдів – флаван-3-оли (катехіни), основним джерелом яких є листя зеленого чаю. Завдяки різноманітному хімічному складу листя зеленого чаю і продукти його переробки мають широкий спектр фармакологічної дії – протизапальну, антиканцерогенну, антипроліферативну, протівірусну, кардіопротекторну, цукрознижувальну, остеопротекторну і насамперед високу антиоксидантну активність. Це дозволяє розглядати листя зеленого чаю як перспективну сировину для створення на її основі ефективних лікарських засобів різної направленості дії, що можуть застосовуватися для лікування гіпертонії, атеросклерозу, цукрового діабету II, онкологічних захворювань.

На сьогоднішній день в Україні та в усьому світі існує тенденція до широкого використання такої величезної групи товарів, як «Харчові продукти спеціального призначення». Відповідно до Закону України «Про основні принципи та вимоги до безпеки та якості харчових продуктів» до цієї групи товарів відносяться і дієтичні добавки, яким дається таке визначення: «дієтична добавка - харчовий продукт, який споживається в невеликих певних кількостях додатково до основного харчового раціону, є концентрованим джерелом поживних речовин, у тому числі білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, мінеральних речовин (даний перелік не обмежений), і виготовлений у вигляді таблеток, капсул, драже, порошків, рідин та інших форм».

Аналіз українського ринку показав, що частка вітчизняних фірм-виробників дієтичних добавок на основі БАР листя зеленого становить лише 16 %, тому розробка нових лікарських засобів і дієтичних добавок на їх основі є актуальною. При цьому, за діючими вимогами проведення обов'язкового контролю якості дієтичних добавок за технологічними параметрами до лікарських форм, наявності та вмісту діючих речовин не потребується. Однак єдиним нормативним документом, що

встановлює вимоги до лікарських форм, є Державна Фармакопея України, тому необхідне впровадження контролю якості дієтичних добавок відповідно до вимог ДФУ - як за технологічними параметрами, так і за наявністю та вмістом діючих речовин.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України як фрагмент комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

### **Мета і завдання роботи**

Метою роботи було фітохімічне вивчення екстрактів листя зеленого чаю та розробка методів аналізу лікарських засобів з антиоксидантною дією, створених на їх основі.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

- провести аналіз та узагальнити сучасні літературні дані щодо хімічного складу та застосування листя зеленого чаю і продуктів його переробки у медичній та фармацевтичній практиці, стану ринку дієтичних добавок в Україні;
- дослідити вплив допоміжних речовин на сумарний рівень антиоксидантної активності; розробити потенціометричну методіку визначення антиоксидантної активності, провести її валідацію;
- провести фітохімічний скринінг основних груп БАР у листі зеленого чаю та дієтичних добавках «Green Tea Extract» (Source Naturals, США), «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна), «Зелений чай» (Pharmacom, Україна);
- стандартизувати сировину відповідно вимогам Європейської Фармакопеї 9.0;
- визначити параметри екстрагування БАР з досліджуваної сировини та розробити технологію одержання екстрактів;
- визначити параметри стандартизації одержаного екстракту листя зеленого чаю та розробити відповідний проект МКЯ;

- одержати лікарські засоби з листя зеленого чаю та провести їх стандартизацію.

*Об'єкт дослідження:* дослідження параметрів якості дієтичних добавок на основі екстракту листя зеленого чаю, створення нових стандартизованих лікарських засобів з антиоксидантною активністю.

*Предмет дослідження:* дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР у сировині, настоянках, настої та екстрактах листя зеленого чаю; визначення їх антиоксидантної активності, параметри стандартизації одержаних екстрактів та дієтичних добавок.

**Методи дослідження.** Хімічні – реакції ідентифікації БАР, фізичні – визначення втрати в масі при висушуванні, загальної золи, тощо; фізико-хімічні – потенціометрія, тонкошарова хроматографія, паперова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), спектрофотометрія в УФ і видимій областях спектру; технологічні – вибір екстрагенту, співвідношення сировини – екстрагенту, встановлення тривалості та кратності екстракції; дослідження антиоксидантної активності проводили за допомогою методів *in vitro*, математичні. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили за допомогою програм STATISTICA для Windows 95, Microsoft Excel 2010 відповідно до вимог ДФУ.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше розроблена і валідована потенціометрична методика визначення антиоксидантної активності епігалокатехіну3-О-галату, встановлено АОА максимальної допустимої рекомендованої добової дози ЕГКГ, запропоновані терміни, що виражають рівень антиоксидантної активності.

Вперше за розробленими методиками визначені антиоксидантна активність та кількісний вміст катехінів у дієтичних добавках «Green Tea Extract» (Source Naturals, США, «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна), «Зелений чай» (Pharmacom, Україна), перевірена їх відповідність вимогам Фармакопеї США 38 щодо вмісту катехінів та вимогам ДФУ 2.3.

Вперше проведено стандартизацію сировини листя зеленого чаю відповідно вимог ЕФ 9.0.

Вперше розроблена потенціометрична методика кількісного визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю, проведена її валідація.

Вперше були розроблені методики і визначена сумарна АОА листя зеленого чаю і його 96, 60, 40, 20 % етанольних настоянок та настою.

Розроблено параметри стандартизації рідкого екстракту листя зеленого чаю і одержаних на його основі гранул, досліджено 5 їх серій на відповідність розробленим вимогам.

Новизна досліджень підтверджена патентами України на корисну модель № 150496 від 23.02.2022 р. «Спосіб одержання засобу з антиоксидантною дією з листя зеленого чаю» та № 151690 від 01.09.2022 р. «Спосіб одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю з антиоксидантною дією».

### **Практичне значення одержаних результатів**

Розроблено схему одержання рідкого екстракту листя зеленого чаю і гранул на його основі.

За результатами досліджень розроблено проекти МКЯ на рідкий екстракт листя зеленого чаю і гранули з екстрактом зеленого чаю, які передано для подальшого впровадження у виробництво в компанії ТОВ «ЗДРАВОВФАРМ» (Україна).

Результати досліджень упроваджено у навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету; кафедри технології біологічно активних сполук фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка»; кафедри фармацевтичної і токсикологічної хімії, фармакогнозії та ботаніки Казахського Національного медичного університету ім. С.Д. Асфендіярова; кафедри аналітичної хімії Ташкентського фармацевтичного інституту.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертаційна робота є самостійною завершеною працею. Автором особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано і систематизовано дані

першоджерел, проведено дослідження з вивчення якісного складу і кількісного вмісту БАР у об'єктах дослідження. Розроблено схеми одержання рідкого екстракту з листя зеленого чаю і гранул на його основі. Визначено основні показники якості екстракту; розроблено проекти МКЯ на рідкий екстракт і гранули.

Наукові роботи опубліковані в співавторстві з Колісником С.В., Голіком М.Ю., Кошовим О.М., Осолодченко Т.П., Комісаренко М.А., Костіною Т.А., Ахмедовим Е.Ю., Шовковою З.В., Гречаною О.В., Сербіним А.Г., Колісник Ю.С., Алтуховим О.О., Степаненко В.І., Полуян С.М., Погосян О.Г., Динник К.В., Морозом В.П., Бризицьким О.А., Пономаренко С.В., Коваленко В.С..

Співавторами наукових робіт є науковий керівник і вчені, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий внесок.

Постановка мети, завдань дослідження, а також обговорення і узагальнення результатів проведено за участю наукового керівника.

### **Апробація результатів дисертації**

Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на таких науково-практичних конференціях різного рівня: XXVII Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (Харків, 9 – 10 квітня 2020 р.); IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція НФаУ «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 26 – 27 листопада 2020 р.); V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 26 листопада 2020 р.); Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (Харків, 19 лютого 2021 р.); II Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах» (Дніпро, 3 – 4 червня 2021 р.); 3rd International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects» (Таллін, 25 – 26 червня 2021 р.); III Міжнародна дистанційна науково-



практична конференція «Інтеграція освіти, науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути» (Дніпро, 11 – 12 серпня 2021 р.); Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи» (Харків, 10 вересня 2021 р.); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2021» (Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р.); II всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth pharmacy science» (Харків, 7 – 8 грудня 2021 р.); 4th International Scientific and Practical Internet Conference «Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates» (Дніпро, 15 – 16 серпня 2022 р.).

### **Обсяг та структура дисертації**

Дисертаційну роботу викладено на 199 сторінках машинописного тексту. Вона складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 141 сторінку друкованого тексту. Роботу ілюстровано 37 таблицями та 33 рисунками. Список використаних джерел містить 227 найменувань, з яких 74 кирилицею і 153 латиною.

# РОЗДІЛ 1

## ЗЕЛЕНИЙ ЧАЙ, ЯК ДЖЕРЕЛО ОДЕРЖАННЯ ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК З АНТИОКСИДАНТНОЮ ДІЄЮ

### (огляд літератури)

Чай, також відомий як *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *sinensis*, синонім *Thea sinensis* L. відноситься до родини Чайні (*Camelliaceae*), яка нараховує близько 19 родів і 600 видів. Рослина поширена в Африці, Східній, Південній Азії, Південній та Північній Америці. Найбільша видова різноманітність Theaceae знаходиться в Південному Китаї та прилеглий Південній Азії. З чайної сировини, що збирають в липні-серпні одержують чорний чай, для виробництва ж зеленого чаю використовують сировину як весняного так і осіннього збору.

#### 1.1 Хімічний склад листя зеленого чаю

Чай має дуже різноманітний хімічний склад. Відповідно до літературних джерел, основним об'єктом дослідження хімічного складу рослини є листя, в якому міститься близько 2000 хімічних компонентів.

У листі чаю були ідентифіковані: флавоноїди, поліфенольні сполуки, фенолкарбонові кислоти, амінокислоти, органічні кислоти тощо. При цьому як якісний склад, так і кількісний вміст різних груп біологічно активних речовин може змінюватися в залежності від виду і сорту чаю, місця зростання рослини [123].

Зведені дані щодо хімічного складу листя чаю представлені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

**Хімічний склад листя чаю**

Об'єкт Речовина	Свіже листя	Зелений чай	Чорний чай
1	2	3	4
Флавоноїди			
Епігалокатехін	(1,27 – 2,73 %) [123]	(0,99 – 9,47 %) [123]	-
Епікатехін	(1,21 – 2,17 %) [123]	(0,13 – 0,73 %) [123]	-
Епігалокатехін галат	(9,51 – 13,86 %) [123]	(1,75 – 4,82 %) [123]	-
Епікатехін галат	(0,88 – 2,09 %) [123]	(0,46 – 1,40 %) [123]	-

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
Астрагалін	✓ [178]	✓ [178]	-
Кемпферол галактопіранозид	✓ [132]	✓ [132]	✓ [132]
Ізокверцетин	(до 0,30 %) [170]	✓	✓
Кверцетин галактопіранозид	(до 0,13 %) [170]	-	-
Кверцетин глікозид	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Мірицетин глікопіранозид	✓ [87]	(до 0,25 %) [170]	✓
Мірицетин галактопіранозид	(до 0,15%) [170]	-	✓
Рутин	(до 0,50 %) [170]	✓ [103]	✓ [103]
Кверцетин рамногалактозид	(до 0,13 %) [170]	-	-
Кверцетин дигалактозид	(до 0,76 %) [103]	-	-
Вітексін	✓ [221]	✓ [221]	✓ [221]
Ізовітексін	✓ [221]	✓ [221]	✓ [221]
Апігенін диглікозид	✓ [103]	✓ [103]	✓ [103]
Сапонарін	✓ [103]	✓ [103]	✓ [103]
Апігенін-8-С-глікозид-7-О-глікозид	✓ [103]	✓ [103]	✓ [103]
Апігенін-6-С-глікозид-8-С-арабінозид	✓ [170]	✓ [170]	✓ [170]
Апігенін-6-С-арабінозид-8-С-глікозид	✓ [170]	✓ [170]	✓ [170]
Лютеолін-6-С-глікозид	✓ [170]	✓ [170]	✓ [170]
Лютеолін-8-С-глікозид	✓ [170]	✓ [170]	✓ [170]
Проантоціанідини			
Проціанідин 2В	✓ [119]	✓ [119]	✓ [119]
Проціанідин 3В	✓ [128]	✓ [128]	✓ [128]
Проціанідин 4В	✓ [128]	✓ [128]	✓ [128]
Катехін-епігалокатехін	✓ [144]	✓ [144]	✓ [144]
Галокатехін-епікатехін	✓ [144]	✓ [144]	✓ [144]
Продельфінідин В4	✓ [144]	✓ [144]	✓ [144]
Теофлавіни			
Теофлавін	-	-	✓ [144]
Теофлавін-3-О-галлат	-	-	(до 0,40%) [144]
Теофлавін дигаллат	-	-	(до 0,40 %) [144]
Неотеофлавін	-	-	✓ [144]
Епітеофлавінова кислота	-	-	✓ [144]
Теофлавінова кислота	-	-	✓ [144]
Епітеофлагалін	-	-	✓ [144]
Епітеофлагалін галат	-	-	✓ [144]
Теорубінігіні	-	-	✓ [144]
Фенолкарбонові кислоти			
Теогалін	✓ [144]	(0,08 – 1,41 %) [144]	(0,11 – 1,01 %) [144]

Продовження табл. 1.1

1	2	3	4
Кофейна	✓ [144]	✓ [144]	✓ [144]
Кумарова	✓ [144]	✓ [144]	✓ [144]
Галова	✓ [144]	(1,0 – 5,0 %) [144]	(1,6 – 4,6 %) [144]
Алкалоїди			
Кофеїн	(до 0,5 – 5,0 %) [87]		
Теобромін	(0,1 – 0,4 %) [87]		
Теофілін	(0,13 – 0,18 %) [87]	✓ [87]	✓ [87]
Амінокислоти			
Теанін	✓ [87]	(0,16 – 0,40 %) [87]	(0,050 – 0,412 %) [87]
Аланін	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Аргінін	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Аспарагін	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Аспарагінова кислота	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Глутамінова кислота	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Ізолейцин	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Гістидин	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Лейцин	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Фенілаланін	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Тирозин	✓ [87]	✓ [87]	✓ [87]
Каротиноїди			
Неоксантин	(до 0,005 %)	✓	(до 0,003 %)
Віолоксантин	(до 0,012 %)	✓	(до 0,004 %)
Лютеїн	(до 0,026 %)	✓	(до 0,015 %)
β-каротин	(до 0,013 %)	✓	(до 0,006 %)
Хлорофіли			
Хлорофіл А	(до 0,5 %)	(до 0,5 %)	-
Хлорофіл В	(до 0,2 %)	(до 0,2 %)	-
Вуглеводи			
Арабіноза	✓ [123]	(0,10 %) [123]	✓ [123]
Ксилоза	✓ [123]	(0,04 %) [123]	✓ [123]
Фруктоза	✓ [123]	(0,11 %) [123]	✓ [123]
Глюкоза	✓ [123]	(0,60 %) [123]	✓ [123]
Галактоза	✓ [123]	(0,55 %) [123]	✓ [123]
Жирні кислоти			
Лінолева	✓ [123]	✓ [123]	✓ [123]
Ліноленова	✓ [123]	✓ [123]	✓ [123]
Пальмітинова	✓ [123]	✓ [123]	✓ [123]
Органічні кислоти			
Оксалатна	✓ [178]	(0,4 – 1,0 %) [123]	✓ [178]
Лимонна	✓ [178]	(0,5 – 1,5 %) [123]	✓ [178]
Хінна	✓ [178]	(0,08 – 1,90 %) [123]	-
Аскорбінова	✓ [178]	(0,6 – 2,23 %) [123]	✓ [178]
Янтарна	✓ [178]	(0,2 – 0,5 %) [123]	✓ [178]
Яблучна	✓ [178]	✓ [123]	✓ [178]

Примітка. «✓» - міститься в листі чаю, «-» - відсутній

З представлених в табл. 1.1 даних видно, що листя зеленого чаю містить багато груп біологічно активних речовин, серед них найбільш дослідженими є катехіни або флаван-3-оли, загальний вміст яких може становити до 30г/100г. Основними катехінами зеленого чаю є епікатехін, епігалокатехін галат, епікатехінгалат, епігалокатехін і на відміну від зеленого, в листі чорного чаю присутні теорубінігін та теофлавін, які є продуктами окислення катехінів ферментом поліфенолоксидазою при ферментації зеленого чаю.

У листі чаю містяться агліконові та глікозидні форми флавонолів, флавононів, флавононів. Було визначено, що сумарний вміст агліконів і глікозидів флавонолів, флаванонів та флавононів становить 0,86 і 1,60 г/кг (зелений чай), 0,51 г/кг та 0,90 г/кг (чорний чай), відповідно.

Флавоноли в основному присутні у формі моно-, ди- та триглікозидів (до 4,0 г/100 г); були виявлені кемпферол, мірицетин та кверцетин. Кверцетин рамногалактозид і кверцетин дигалактозид визначені тільки в свіжому листі, а відсутність в зеленому і чорному чаї може бути пов'язана з їх окисненням в процесі висушування. Флавонові глікозиди представлені п'ятьма глікозидами апігеніну, їх загальна кількість сягає до 2,69 г/кг.

Серед алкалоїдів переважає група пуринових алкалоїдів - кофеїн, теобромін, теофілін. Домінує кофеїн, його вміст сягає 5 г/100 г.

Основними фенолкарбоновими кислотами є теогалін, кофейна, кумарова та галова кислоти. Органічні кислоти представлені оксалатною, лимонною, яблучною, аскорбіною, янтарною та хінною. Найбільше накопичуються оксалатна та лимонна. З жирних кислот ідентифіковані лінолева, ліноленова і пальмітинова.

До складу листя чаю входить 11 амінокислот: теанін, аланін, аргінін, аспарагін, аспарагінова кислота, глютамінова кислота, ізолейцин, гістидин, лейцин, фенілаланін, тирозин. Також ідентифіковані такі цукри, як глюкоза, галактоза, фруктоза, ксилоза та арабіноза.

## 1.2 Фармакологічна дія листя чаю

За доступними літературними даними лист зеленого чаю має широкий спектр фармакологічної дії [226]. В експериментах *in vivo* та *in vitro* катехіни листя зеленого чаю виявили високу антиоксидантну активність. У дослідженнях з використанням методів DPPH, ABTS і FRAP, встановлена їх здатність перехоплювати та відновлювати вільні радикали. Катехін інгібує також продукцію вільних радикалів моноцитами периферичної крові [68, 75, 76, 172, 191].

Методом електронного парамагнітного резонансу підтверджено, що ЕГКГ в концентраціях, еквівалентним тим концентраціям, які є в плазмі крові людини при систематичному споживанні зеленого чаю, ефективно відновлює окислений вітамін Е. Антиоксидантна активність катехінів проявляється й у захисті від окислення ліпопротеїнів низької щільності (ЛНЩ), клітин – від попередньо окисленого ЛНЩ. Цю захисну активність катехіни виявляють у відносно низьких дозах (0,1–3 мкМ знижують на 50 % токсичність окисленого ЛНЩ). Ефект досягається за рахунок таких механізмів [4, 226]:

- запобігання окислення мембранних ліпідів за допомогою відновлення  $\alpha$ -токоферолу;
- інгібування ліпоксигеназ;
- інгібування клітинних ферментів, що беруть участь у сигнальній трансдукції.

Відомо, що флавоноїди і особливо катехіни чаю утворюють міцні комплекси з іонами металів, перешкоджаючи їх каталітичній активності чим саме і забезпечують антиоксидантний ефект. Проте надлишок вільних іонів рідкісноземельних металів, Fe (II), Cu (II), а також  $H_2O_2$  (в умовах *in vivo*) здатні змінювати антиоксидантну активність катехінів на прооксидантну [155, 201, 225].

Протизапальна активність екстрактів зеленого чаю була вивчена на моделі індукованого артриту у щурів [177]. Розвиток едеми та еритеми у щурів, яким давали водний екстракт листя в концентрації 1 г/кг впродовж 14 днів, значно уповільнювався з першого дня прийому, а результати не поступались препарату порівняння індометацину. Ймовірно це відбувалось за рахунок блокування запального

сигнального ланцюга при інгібуванні NF- $\kappa$ B, ІЛ-8, ІЛ-6, ІЛ-1, активатора протеїну 1 і  $\alpha$ -ФНП [137, 138, 139].

Дослідженнями *in vitro* було підтверджено, що через активацію АМФ-протеїнкінази, катехіни збільшують поглинання глюкози клітинами [136], у пацієнтів з ризиком метаболічного синдрому знижується рівень глікемії та глікованого гемоглобіну [79].

Хуань та співавт. з'ясували вплив катехінів зеленого чаю на остеогенез і встановили їх здатність збільшувати кісткову масу через апоптоз та інгібування остеокластів NF- $\kappa$ B і ІЛ-1 [182]. Досліджуючи проліферацію клітин, активність лужної фосфатази та експресію споріднених остеогенних маркерів, Джин вивчив остеогенний ефект ЕГКГ на мезенхіальних стовбурових клітинах. Результат показав, що ЕГКГ у концентрації 5 мкМ значно сприяє диференціюванню мезенхіальних стовбурових клітин у кісткових клітинах.

Вивчено вплив катехінів зеленого чаю при лікуванні синдрому полікістозу яєчників, ендометріозу та дисменореї [90]. *In vivo* було показано, що катехіни сприяють поліпшенню овуляцій, дозріванню фолікул, а також перешкоджають утворенню кіст у щурів [117, 124]. Шурі та співавт. застосували катехіни при лікуванні дисменореї на моделі індукованого тамоксифеном аденоміозу у щурів: ЕГКГ у дозі 5 та 50 мг/кг зменшував генералізовану гіперолізію, рівень кортикостерону в плазмі, інфільтрацію міометрію, знижував скоротливість матки [125].

Повідомляється про протівірусну активність катехінів зеленого чаю і встановлену ефективність проти COVID-19 за рахунок впливу на різні мішені вірусу [153], інгібування 3CL – протеїнкінази, РНК-залежної РНК-полімерази і блокування рецептора вірусу.

Доведена ефективність катехінів зеленого чаю при лікуванні атеросклерозу судин, ішемічної хвороби серця, гіпертонічної хвороби, фібриляції передсердь, гіпертрофій та кардіоміопатій [122]. На моделі атеросклерозу у щурів, яким протягом 12 днів давали екстракт зеленого чаю (100 мг/кг) спостерігалось зменшення загального холестерину, тригліцеридів, ЛНЩ; підвищення ЛВЩ [122].

Застосування ЕГКГ у дозах 25, 50 і 100 мг/кг на моделі серцевої гіпертрофії у щурів приводило до зниження показників маси серця, концентрації передсердного натрійуретичного поліпептиду, гідроксипропану та інгібування експресії антигену проліферації клітин [169].

Катехіни зеленого чаю чинять антиканцерогенний і антимутагенний ефект при лікуванні раку грудей, стравоходу, простати, шлунку, тонкого і товстого кишківника, печінки та легень [78, 129, 134, 150].

У дослідженнях *in vivo* підтверджено апоптоз і зупинку клітинного циклу ракових клітин під їх впливом [158]; у дослідженнях *in vivo* на моделі раку легень - пригнічення метастазування меланоми легень. Також на моделі раку легень Фу та співавт. встановлено, що пероральний прийом ЕГКГ збільшує як внутрішній (мітохондріальний), так і зовнішній апоптоз та зменшує ріст ракових клітин [159].

### **1.3 Вільні радикали у виникненні патогенезу захворювань, класифікація антиоксидантів**

В останні десятиліття спостерігається зростаючий інтерес до медичних аспектів впливу вільних радикалів, які є продуктами багатьох окисних біохімічних реакцій у клітині і в нормі беруть участь у біохімічних та фізіологічних процесах. Вони мають високу реакційну здатність в тканинах людини, а організм використовує складні ферментативні та неферментативні системи захисту для запобігання «перевантаженню» вільними радикалами і пероксидами [201, 205]. Існує думка про те, що в організмі має місце тонка рівновага між кількістю вільних радикалів і антиоксидантним захистом і збільшення кількості вільних радикалів порушує дану рівновагу, що викликає в свою чергу розвиток захворювання. Застосування антиоксидантів сприяє захисту і, зрештою, приводить до гомеостазу, коли ці два процеси стають рівними [225].

Супероксид ( $O_2^{\cdot-}$ ) утворюється при переносі електронів у мітохондріях. Супероксиддисмутаза утворює пероксид водню із  $O_2^{\cdot-}$ , потім окислює іони  $Fe^{2+}$  і  $Cu^{1+}$ , які вступають у реакцію Фентона з  $H_2O_2$  з утворенням гідроксильних радикалів та



гідроксид-аніонів.  $\text{Fe}^{3+}$  і  $\text{Cu}^{2+}$  можуть окислювати  $\text{H}_2\text{O}_2$  з утворенням гідропероксильних ( $\text{HO}\cdot$ ) радикалів та протонів ( $\text{H}^+$ ), і реакції перекисного окиснення перетікають циклічно [142, 148, 188].

Тіол ( $\text{SH}\cdot$ ) та ліпідпероксидні радикали ( $\text{L}\cdot/\text{LO}\cdot/\text{LOO}\cdot$ ) спричиняють пошкодження клітинних мембран [163]. Ушкодження білків гідроксильними радикалами призводить до утворення ковалентно зв'язаних білкових агрегатів і білкових аддуктів. Реактивні кисневі радикали модифікують амінокислоти в місцях зв'язування металів і сприяють протеолітичній атаці. Інше пошкодження вільними радикалами включає розрив ланцюга ДНК та процес ПОЛ [85, 121].

Запалення найчастіше є першим етапом захворювання, за яким слідує імунна відповідь, але вона може виникати і майже одночасно з запаленням. Згодом різні молекулярні дисфункції переростають у хронічні захворювання, такі як діабет, серцево-судинні захворювання та рак [184, 223].

Цукровий діабет 2 типу пов'язаний із підвищенням окислювального стресу (особливо, ПОЛ) та зниженням антиоксидантного захисту. Окислювальний стрес порушує функцію бета-клітин через утворення вільних радикалів мітохондріальним дихальним ланцюгом та НАДФН, що помітно знижує вироблення інсуліну, порушує включення везикул проінсуліну в плазматичну мембрану та знижує їх екзоцитоз у відповідь на надходження глюкози [173, 225]. Він також може викликати апоптичні процеси в клітинах підшлункової залози, що призводять до загибелі та втрати бета-клітин. Окислювальний стрес знижує проліферацію і диференціацію бета-клітин за рахунок складних взаємодій з різними факторами, які беруть участь в експресії гена інсуліну, як Pdx-1, Nkx6.1, Ngn.3, FOXO і MafA, що зменшує вироблення інсуліну лише на рівні ДНК [111, 199].

Одна з ключових концепцій вільнорадикального патогенезу серцево-судинних захворювань – ендотеліальна дисфункція, внаслідок чого порушується регуляція мікросередовища судинної стінки. Важливим елементом цієї концепції є те, що ендотелій судин є активним компонентом судинної мережі, який відіграє роль у регуляції судинного тонуусу, активності тромбоцитів, тромбозу, запалення та атеро-

склерозу [185, 206]. Вазоактивний тонус ендотелію підтримується за рахунок вивільнення таких речовин, як простацикліни, ендотеліни, ендотеліальний релаксуючий фактор гідроген (II) оксиду [187]. Зразки крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця показали наявність оксидативного/нітрозативного стресу. При ішемії міокарда гіпоксія та реоксигенація викликають збільшення продукції вільних радикалів у серцевих тканинах і є основними причинами реперфузійного пошкодження. АФК, що утворюються в результаті реоксигенації, призводять до прямого окисного пошкодження клітинних компонентів, а також до непрямого пошкодження через активацію локалізованого запалення [223].

Патогенез атеросклерозу вважається процесом, опосередкованим з запаленням. Атеросклероз пов'язаний з підвищеним рівнем запальних маркерів, включаючи CRP, ІЛ-6,  $\alpha$ -ФНП, гомоцистеїн. Гормони та цитокіни, такі як ангіотензин II і  $\alpha$ -ФНП, можуть збільшувати АФК в атеросклеротичних ураженнях, стимулюючи місцеві судинні міоцити для АФК. Дисфункція мітохондрій та збільшення продукції АФК також пов'язані з раннім формуванням атеросклеротичних уражень [185].

Злоякісні зміни на генетичному рівні є основною патологічною причиною розвитку раку. АФК є важливішим фактором, який викликає генетичну нестабільність у клітинах [189]. Існує ряд біохімічних реакцій, при яких метаболізується кисень, який може призвести до утворення вільних радикалів і викликати ушкодження ДНК. З еволюційної точки зору за нормальної швидкості, нешкідливий мутагенез дає перевагу для клітини або організму в адаптації до нових умов за рахунок мутагенних змін ДНК. Хронічний окислювальний стрес імітує цей природний процес, але в набагато більшому масштабі, чинячи більш жорсткий тиск на клітини і зрештою змушує клітини адаптуватися до цих нових умов або призвести до їх загибелі [129]. Адаптивні зміни, які збільшуються протягом тривалого періоду часу, повинні відбуватися в межах однієї клітини та призводять до злоякісних трансформацій клітини [184]. Існує безліч прикладів того, як генетичні мутації (спадкові або набуті) призводять до підвищеного виробництва АФК, що викликає пош-

кодження ДНК і сприяє злоякісній трансформації. Отже, ракові клітини певною мірою залежать від цього вкрай нестабільного та мутагенного середовища окислювального стресу [134, 171].

Хвороба Альцгеймера (ХА) - нейродегенеративне захворювання з характерними клінічними проявами як дефіцит пам'яті та дисфункція розумової активності. Дослідження показують, що ознаки окислювального стресу, пов'язані з мітохондріальною недостатністю, спостерігаються на ранній стадії розвитку ХА, що призводить до порушення біоенергетики нейроклітин [186]. Крім зниження вироблення АТФ, мітохондріальна недостатність призводить до надмірного виробництва АФК. АФК у свою чергу, пов'язані з пошкодженням мембран, змінами структури цитоскелета та загибеллю нейроклітин. Крім ознак окислювального стресу, прогресування ХА характеризується позаклітинним накопиченням агрегованого амілоїду- $\beta$  і внутрішньоклітинними нейрофібрилярними клубками [131, 168].

Антиоксиданти - речовини, які здатні вступати у взаємодію з різними реактогенними окислювачами, АФК, іншими вільними радикалами і приводити їх до часткової або повної інактивації. Лікарські препарати, що мають антиоксидантну активність, широко застосовуються в медицині з метою корекції процесів ВРО при різних захворюваннях. АО дозволяють ефективно коригувати енергетичний метаболізм за рахунок нормалізації функцій дихального ланцюга мітохондрій, які здійснюють окисне фосфорилування, та інших метаболічних шляхів постачання енергетичних субстратів. В організмі існує фізіологічна АОС, яка підтримує прооксидантно-антиоксидантний баланс в усіх органах та системах [4, 71, 61].

Всі антиоксиданти класифікують на препарати непрямой та прямої дії. Крім того, за походженням антиоксиданти поділяють на дві групи: ферментативної (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР)) та неферментативної природи. Останні в свою чергу - на речовини ендogenous (коензим Q10, глутатіон,  $\alpha$ -ліпоева кислота та ін.) та екзогенного походження - вітаміни А, С, Е, каротиноїди, поліфеноли (флавоноїди) і їх синтетичні аналоги - низькомолекулярні сполуки (убіхінон, глутатіон), мікроелементи (селен) [58].

1. Антиоксиданти непрямой дії проявляють активність *in vivo* і неефективні *in vitro*, стимулюють АОС і здатні зменшувати інтенсивність ВРО.

2. Антиоксиданти прямої дії мають виражені антирадикальні властивості, що визначаються у тестах *in vitro*. Основна частина лікарських препаратів, які виявляють антиоксидантний ефект, відноситься саме до цієї групи [4].

До природних антиоксидантів належать токоферолі/токотрієнолі, вітамін К, убіхінон, аскорбінова кислота, каротиноїди та поліфенолі [201].

Токоферолі присутні в насінні, листі та інших зелених частинах вищих рослин, тоді як токотрієнолі зустрічаються в основному в насінні та зернових культурах (фракції висівок і зародків), а також в деяких оліях, особливо в пальмовій та олії рисових висівок. Токоферолі можуть запобігати розвитку передракових уражень та пухлин, а також мутації ДНК. Каролл і співаавт. повідомили, що токотрієнолі виявляють кращу протипухлинну активність, ніж  $\alpha$ -токоферол при хіміотерапії раку [225].

Вітаміни групи К поєднують групу похідних 2-метил-1,4-нафтохінону, що відрізняються характером бічних ланцюгів: вітамін К<sub>1</sub> (філлохінон); К<sub>2</sub> (менахінон) і вітамін К<sub>3</sub> (менадіон, вікасол) – синтетичне похідне. Як кофермент вітамін К бере участь у транспорті електронів та окисному фосфорилуванні. Вітамін К – один із компонентів клітинних мембран, який активно впливає на її структурні та функціональні властивості [143, 218].

Убіхінон (коензим Q10, убінон) – бензохінон, що містить хіноїдну групу та 10 ізопренілових груп. Кофермент синтезується в організмі людини з мевалонової кислоти, похідних тирозину та фенілаланіну. Міокард містить максимальну кількість убіхінону. Коензим Q10 бере участь у реакціях окисного фосфорилування, як компонент ланцюга переносів електронів з НАДН-дегідрогеназного та сукцинатдегідрогеназного комплексу на цитохром В, і задіяний таким чином, у синтезі АТФ [61].

Аскорбінова кислота – низькомолекулярний водорозчинний антиоксидант. Наявність у структурі молекули двох гідроксильних груп дозволяє їй брати участь в окислювально-відновних процесах, виступаючи як донор і акцептор водню [84].

У ряді випадків аскорбінова кислота здатна індукувати генерацію АФК та виявляти прооксидантну дію. Показано, що прояв нею анти- та прооксидантної дії залежить від швидкості перебігу окисних реакцій, концентрації сполуки, присутності іонів заліза та міді, коливання рН та змін умов оксигенації [201, 220].

Каротиноїди – це група жиророзчинних рослинних пігментів, які налічують понад 600 сполук. Незважаючи на велику різноманітність, їх молекули мають у своїй структурі полієновий ланцюг з подвійними зв'язками, що чергуються. Одна з найбільш важливих фізіологічних ролей каротиноїдів - утворення вітаміну А в організмі тварин. Вони також можуть бути антиоксидантами або прооксидантами, залежно від концентрації кисню. При високому нефізіологічному тиску кисню  $\beta$ -каротин поводить себе як прооксидант, а низькому - антиоксидант [4, 58, 83].

Фенольні сполуки є вторинними метаболітами рослин і зазвичай виробляються для захисту від патогенів [2]. Вони синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі і транспортуються через АТФ-зв'язувальну систему, білки-переносники, транспортні везикули з подальшим утворенням розчинних і нерозчинних сполук у вакуолі і матриксі клітинної стінки відповідно [191]. Залежно від кількості та розташування гідроксильних груп у молекулах діють як первинний антиоксидант. До цієї групи відносять феноли, фенольні кислоти, флавоноїди (флаволи, ізофлаволи, флавоноли, флавонони, флаваноли, антоціани, гідролізовані таніни та проантоціанідіни), стильбени і лігнани. Гідроксильні групи в їх молекулах сприяють розчинності у воді, тому підвищують біодоступність та адсорбцію [83]. Багато з них діють на біологічну мембрану і значно знижують рухливість ліпідів, що лімітує ефективність взаємодії пероксильних радикалів з новими ліпідними молекулами. Одним з основних фізіологічних ефектів фенольних сполук вважається їх здатність підвищувати резистентність стінок капілярів [98].

Ферментні антиоксиданти (супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза) здатні ефективно знижувати рівень супероксиду, запобігати утворенню гідроксильного радикалу та синглетного кисню. Вони є важливим медіатором запа-

лення і знижують секрецію значної кількості лізосомальних ферментів, перешкоджають надмірній активації фібринолізу, запобігають інактивації NO та сприяють поліпшенню мікроциркуляції після вазоспазму [7, 35].

Споживання різних природних антиоксидантів, присутніх у натуральних продуктах харчування, знижує ризик серйозних порушень стану здоров'я через їх антиоксидантну активність. Через токсичність синтетичних антиоксидантів у великих кількостях останнім часом велика увага приділяється натуральним антиоксидантам [34].

#### **1.4 Аналіз ринку дієтичних добавок на основі листя зеленого чаю**

Основним законодавчим актом України щодо дієтичних добавок є Закон України від 23.12.1997 № 771/97-ВР «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» [27]. Згідно з цим законом дієтичні добавки - це харчовий продукт, який споживається в невеликих певних кількостях додатково до основного харчового раціону, є концентрованим джерелом поживних речовин, у тому числі білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, мінеральних речовин (даний перелік не обмежений), і виготовлений у вигляді таблеток, капсул, драже, порошоків, рідин та інших форм. Дієтичні добавки слід розглядати не як ліки, а як окрему групу продукції.

Традиційно виділяють 5 груп дієтичних добавок [54]:

1. нутрицевтики - дієтичні добавки, що застосовуються для корекції хімічного складу їжі для доведення вмісту природних макро- і мікронутрієнтів до рівня вмісту в добовому раціоні, відповідно до потреб здорової людини;

2. парафармацевтики - дієтичні добавки, що приймаються для профілактики, допоміжної терапії та підтримки у фізіологічних межах функціональної активності органів і систем;

3. пребіотики - поживні речовини, вибірково стимулюють ріст або біологічну активність представленої захисної мікрофлори кишківника, таким чином підтримуючи її нормальний склад і біологічну активність;

4. еубіотики – дієтичні добавки, до складу яких входять живі мікроорганізми та (або) їх метаболіти, нормалізують біологічну активність мікрофлори шлунково-кишкового тракту.

5. пробіотичні мікроорганізми - живі непатогенні та нетоксичні мікроорганізми (переважно роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та ін.), представники захисних груп кишкового мікробіоценозу людини і природних симбіотичних асоціацій, позитивно впливають на біологічну активність мікрофлори шлунково-кишкового тракту.

Згідно маркетинговим дослідженням світовий об'єм ринку дієтичних добавок в 2016 р. складав понад 130 млрд. доларів; при цьому прогнозоване його 3-разове зростання до 2022 р. У різних країнах об'єм може значно відрізнятись, наприклад, в Італії в 2015 р. він становив 1601,5 млн. доларів, Російській Федерації - 1079,9 млн доларів, і в Україні - лише 87,1 млн доларів [38].

Неправильне харчування, погіршення стану екологічних ситуацій, хронічні захворювання, стреси послаблюють організм людини, що призводить у свою чергу до появи надлишку вільних радикалів. Для їх уловлювання та відновлення гомеостазу між антиоксидантною та протооксидантною системою, застосовуються дієтичні добавки, що мають антиоксидантний ефект [4].

Недавніми дослідженнями *in vivo* та *in vitro* показано, що катехіни виявляють один з найпотужніших антиоксидантних ефектів, тому дієтичні добавки з екстрактом зеленого чаю користуються високим попитом населення і можуть призначатись лікарем для оптимізації обмінних процесів і функцій організму з урахуванням стану здоров'я людини до раціону харчування пацієнтів [58].

Результати вивчення фірмової та асортиментної структури дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю показали, що на фармацевтичному ринку України присутні 47 дієтичних добавок даної групи [1], які виробляються 38 фармацевтичними компаніями з 9 країн світу (табл. 1.2). При цьому частка іноземних фірм-виробників становить 84 %, а вітчизняних - лише 16 % (рис. 1.1).

**Рейтинг країн за кількістю компаній-виробників дієтичних добавок  
на основі екстракту листя зеленого чаю**

№ п/п	Країна- виробник	За кількістю компаній		За асортиментом	
		Абсолютна кількість пропозицій	Відносна кількість пропозицій, %	Абсолютна кількість пропозицій	Відносна кількість пропозицій, %
1	США	23	60,53	31	65,96
2	Україна	6	15,79	7	14,89
3	Польща	3	7,89	3	6,38
4	Індія	1	2,63	1	2,13
5	Велика Британія	1	2,63	1	2,13
6	Канада	1	2,63	1	2,13
7	Австрія	1	2,63	1	2,13
8	Іспанія	1	2,63	1	2,13
9	В'єтнам	1	2,63	1	2,13
Загалом		38	100	47	100

Перше місце в рейтингу країн-виробників за кількістю компаній посідають США - 60,53 %, друге - Україна (15,79 %), третє - Польща (7,89 %). За асортиментом дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю розподіл такий самий - США (65,96 %), Україна (14,89 %), Польща (6,38 %) (табл. 1.2); компаніями-лідерами по виробництву цієї групи товарів є: NOW Foods – 27 %, Swanson – 20 %, Puritan`s Pride (14 %); Klaine Labs, Source Natural та Elit pharm - по 13 % (рис. 1.2).

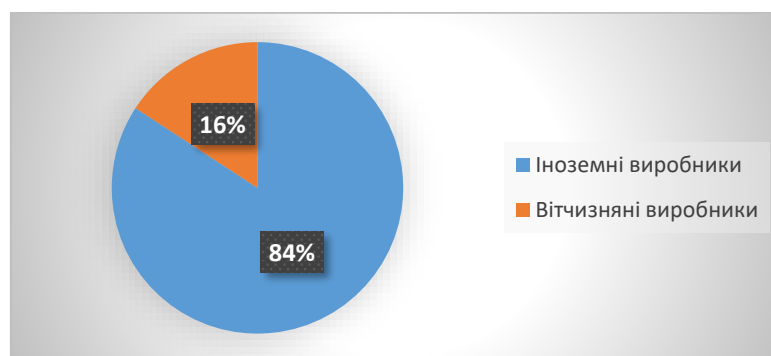


Рис. 1.1 Розподіл іноземних та вітчизняних виробників дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю



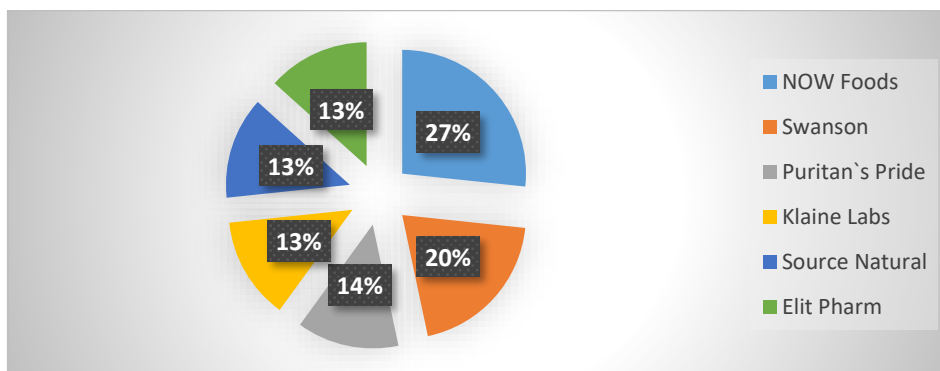


Рис. 1.2 Розподіл компаній-лідерів по виробництву дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю

При визначенні частки моно- та комбінованих препаратів встановлено, що їх кількість складає 23,4 і 76,6 %, відповідно (рис. 1.3).

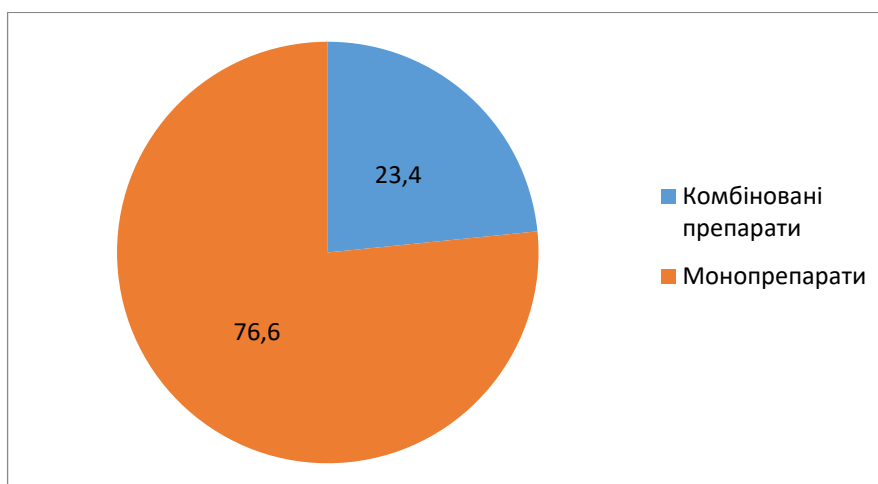


Рис. 1.3 Розподіл моно- і комбінованих дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю

Не можна не враховувати, що поряд з ефективністю, ціна також є важливим критерієм вибору необхідних препаратів. Можна виділити 4 сегменти досліджуваної групи за їх вартістю: до 200 грн - 27,45 %; 200 - 500 грн - 41,18 %; в інтервал цін від 500 до 800 грн входять 21,57 %, та понад 800 грн – 9,80 % пропонує дієтичних добавок (рис. 1.4).

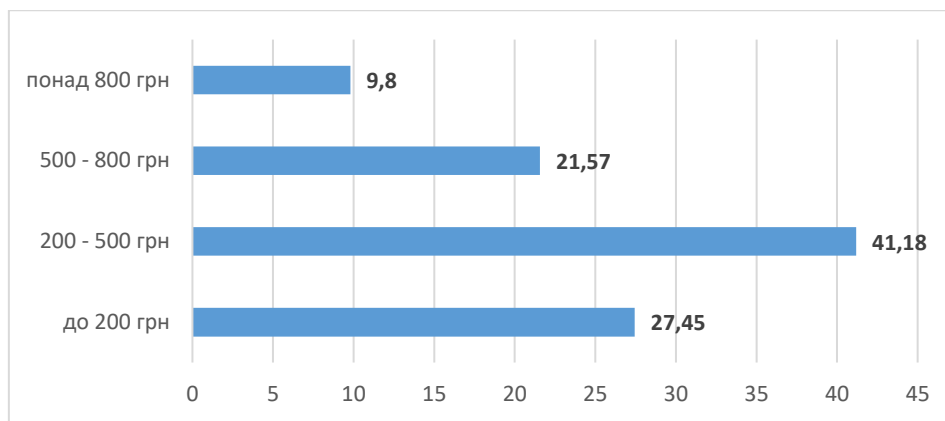


Рис. 1.4 Розподіл дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю за ціною (%)

Мінімальна роздрібна ціна встановлена на «Зелений чай» (Новофіт, Україна) – 75 грн і «Green Tea Extract» (Nosorog, США) – 95 грн. Найбільш коштовними є дієтичні добавки «Advanced Inflammation» виробництва Klaire Labs, США – 1886 грн.

Особливості введення в організм з урахуванням форми випуску допомагають виробникам найбільш вдало вирішити питання щодо зручності застосування та досягнення кращого терапевтичного ефекту. Дослідження за лікарською формою показало гетерогенність аналізованої групи дієтичних добавок. Вона представлена б лікарськими формами, а саме: капсули > таблетки > краплі > чаї > гелі > порошки (рис. 1.5).

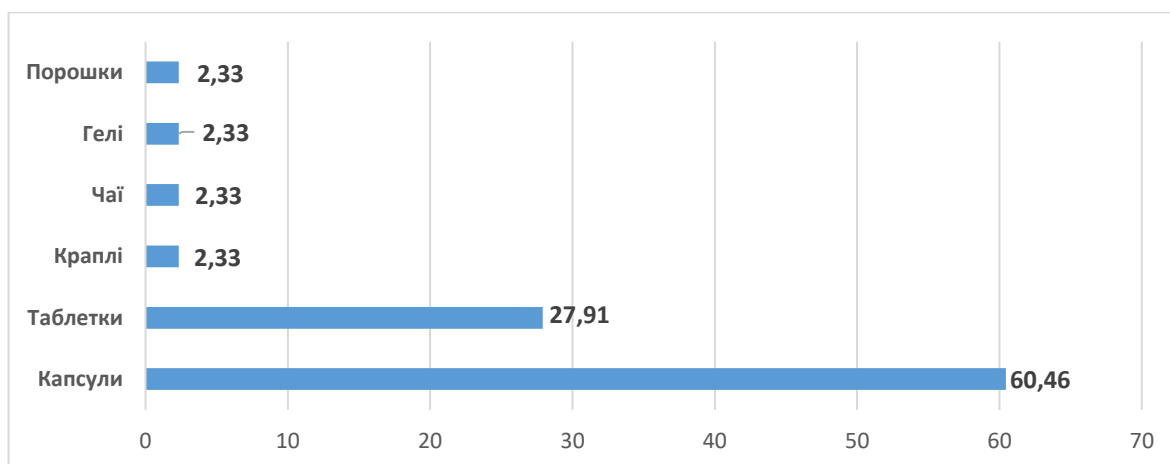


Рис. 1.5 Розподіл асортименту дієтичних добавок на основі екстракту зеленого чаю за лікарськими формами (%)

У табл. 1.3 наведені дієтичні добавки на основі екстракту листя зеленого чаю, представлені на ринку України.

Таблиця 1.3

**Дієтичні добавки на основі екстракту листя зеленого чаю,  
представлені на ринку України**

№	Дієтична добавка	Виробник	Форма випуску	Середня роздрібна ціна, грн	Склад	Фармакологічна дія
1	2	3	4	5	6	7
1	Green Tea [14]	Jarrow Formulas, США	Капсули, 100 шт.	273,60	Екстракт зеленого чаю 500 мг (до 50 % поліфенолів, до 30 % катехінів, до 15 % ЕГКГ, 40 мг кофеїну)	Прискорює метаболізм, покращує імунітет, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали
2	ЕГКГ [15]	Now foods, США	Капсули 90, 100, 180, 250 шт.	90 шт. - 287, 100 т. - 290, 180 шт. - 538,18, 250 шт. - 622	Екстракт зеленого чаю 500 мг (до 80% катехінів, 50% ЕГКГ, 4 мг кофеїну)	Виявляє капілярно-протекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла
3	Decaffeinated Mega Green Tea Extract [15]	Life Extension, США	Капсули, 100 шт.	850	Декофеїнізований екстракт зеленого чаю (до 98 % поліфенолів, 15 % ЕГКГ)	Володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла, прискорює метаболізм, впливає на нормалізацію функціонування судин
4	Green Tea Phytosome [57]	Thorne, США	Капсули, 60 шт.	702	Екстракт зеленого чаю с фосфоліпідними комплексами з соняшника, 250 мг	Сприяє зниженню загальної маси тіла, зміцнює стінки капілярів, знижує рівень холестерину в крові, покращує метаболізм
5	Green Tea Extract [57]	Zhou Nutrition, США	Капсули, 120 шт.	624	Екстракт зеленого чаю (до 98 % поліфенолів, 80 % катехінів, 50 % ЕГКГ, до 15 мг кофеїну)	Виявляє капілярно-протекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла

1	2	3	4	5	6	7
6	Green Tea Extract [37]	Puritan`s Pride, США	Капсули, 200 шт.	298	Екстракт зеленого чаю 315 мг	Прискорює метаболізм, покращує імунітет, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали
7			Капсули, 120 шт.	145	Екстракт зеленого чаю 350 мг	
8	Advanced Inflammation [73]	Klaire Labs, США	Капсули, 120 шт.	1886	Екстракт стефанії 300 мг, екстракт листя кропиви 300 мг, екстракт листя базиліку 250 мг, екстракт імбиру 250 мг, екстракт зеленого чаю 60 мг (до 95 % поліфенолів, 50 % ЕГКГ, екстракт перили (до 90 % лютеїну), екстракт камеді 60 мг (до 20 % 3-О-ацетил-11-кето-β-боснієвої кислоти)	Володіє протизапальною, антиоксидантною, капіляропротекторною дією, прискорює метаболізм, покращує імунітет
9	Green Tea Extract [73]	Klaire Labs, США	Капсули, 60 шт.	1409	Екстракт зеленого чаю 500 мг (до 95% поліфенолів, 50% ЕГКГ)	Знижує рівень холестерину в крові, покращує метаболізм, сприяє зниженню загальної маси тіла, зміцнює стінки капілярів
10	Green Tea Extract [74]	Source Naturals, США	Таблетки, 60 шт.	459	Екстракт зеленого чаю 500 мг (175 мг)	Виявляє капіляропротекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла
11				220	Екстракт зеленого чаю 100 мг і 20 мг епігалокатехін галлату	
12	Екстракт зеленого чаю [65]	Еліт-фарм, Україна	Таблетки, 60 шт.	120	Екстракт зеленого чаю 200 мг	Прискорює метаболізм, покращує імунітет, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали
13	Зелений Чай [31]	Pharmacom, Україна	Таблетки, 60 шт.	50	Екстракт зеленого чаю	Володіє протизапальною, антиоксидантною, капіляропротекторною дією, прискорює метаболізм, покращує імунітет

1	2	3	4	5	6	7
14	Super Green Tea [30]	Natures Answer, США	Краплі	548	Екстракт зеленого чаю 50 мг/мл (до 95% поліфенолів, 80% катехинів і 50% ЕГКГ), екстракт лимону 2,5 мг/мл	Сприяє зниженню загальної маси тіла, зміцнює стінки капілярів, знижує рівень холестерину в крові, покращує метаболізм
15	Green Tea Extract with EGCG+VIT C [23]	Zenwise Health, США	Капсули, 120 шт.	720	Екстракт зеленого чаю 725 мг (до 98% поліфенолів, до 50% ЕГКГ)	Нейтралізує вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла, виявляє кардіопротекторну, протизапальну дію
16	Green Tea Extract [36]	Swanson, США	Капсули, 30 шт.	210	Екстракт зеленого чаю 168 мг (до 90% ЕГКГ)	Покращує імунітет, знижує загальну масу тіла, зміцнює стінки судин та покращує їх функціонування
17	Green Tea Phytosome [36]	Swanson, США	Капсули, 60 шт.	160	Екстракт зеленого чаю с фосфоліпідами 600 мг (19 – 25 % поліфенолів, 13 % ЕГКГ)	Володіє протизапальною, антиоксидантною, капіляропротекторною дією, прискорює метаболізм, покращує імунітет
18	Green Tea Extract [25]	Nosorog, США	Капсули, 60 шт.	95	Екстракт зеленого чаю 400 мг, вітамін С – 60 мг	Виявляє капіляропротекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла
19	Green Tea Fat Metabolizer [24]	Irwin Naturals, США	Капсули, 150 шт.	902	Хром 125 мкг, риб'ячий жир 851 мг, екстракт зеленого чаю 400 мг (до 50 % ЕГКГ), екстракт апельсину (30 % синефрину) 300 мг, кофеїн 100 мг, екстракт чорного перцю (до 95 % піперину), екстракт імбиру (до 5% гінгеролу) 6 мг	Сприяє покращенню обміну речовин, метаболізму, зниженню маси тіла, нейтралізує вільні радикали

1	2	3	4	5	6	7
20	Родіола Плюс [29]	Amway, США	Таблетки, 60 шт.	690	Екстракт зеленого чаю 24 %, екстракт родіоли 14%, концентрат шпинату 7 %, концентрат вишні ацероли 4 %, вітамін С	Прискорює метаболізм, покращує імунітет, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали
21	Green Tea [24]	Gym Beam, США	Таблетки, 60 шт.	219	Екстракт зеленого чаю 500 мг, 10 мг кофеїну	Впливає на обмін речовин, знижує загальну масу тіла
22	Green Tea [23]	Olimp Nutrition, Польща	Капсули, 60 шт.	159	Екстракт зеленого чаю 250 мг (137,50 мг ЕГКГ, 249 мг поліфенолів, катехинів 200 мг, кофеїну до 4 мг)	Прискорює перебіг метаболічних процесів, виводить холестерин, додає сил і витривалості під час тренінгу, підвищує якість, сприяє зниженню загальної маси тіла (з урахуванням збереження м'язової), нормалізує тиск, є відмінним профілактичним засобом проти розвитку серцево-судинних захворювань, підвищує життєвий тонус, додає стійкості до вірусів грипу та ГРЗ
23	Екстракт зелений чай [5]	Осокор, Україна	Капсули, 60 шт.	186	Екстракт зеленого чаю – 200 мг, вітамін С – 35 мг,	Сприяє покращенню обміну речовин, метаболізму, зниженню маси тіла, нейтралізує вільні радикали
	Янтарь с екстрактом зеленого чая [16]	Пріма- флора, Україна	Таблетки, 30 шт.	200	Екстракт зеленого чаю 500 мг, янтарна кислота	Підвищує працездатність, фізичну і розумову активність, активізує захисні сили організму. Надає позитивний ефект при серцево-судинних захворюваннях, знижує рівень холестерину і комплексно очищує судини, підсилює лімфатичний відтік. Як засіб для зниження ваги. Використовується для профілактики онкологічних захворювань

1	2	3	4	5	6	7
24	Green Tea [17]	Aysri, Індія	Капсули, 60 шт.	328	Екстракт зеленого чаю 400 мг	Сприяє зниженню ваги, підвищує витривалість, підвищує чутливість до інсуліну, захищає печінку і нирки, покращує когнітивні функції і затримує появу передчасних ознак старіння
25	Green Tea [5]	Ostrovit, Польща	Таблетки, 60 шт.	216	Екстракт зеленого чаю 1000 мг	Для корекції ваги, посилення захисних функцій, профілактики захворювань серця і судин
26	ЕГКГ [23]	LuckyVitamin, США	Таблетки, 60 шт.	258	Екстракт зеленого чаю 400 мг (до 80% катехинів, 200 мг ЕГКГ)	Володіє потужною дією нейтралізації вільних радикалів
27	Green Tea [60]	IronFlex, США	Таблетки, 60 шт.	245	Екстракт зеленого чаю 1000 мг (50% поліфенолів)	Для корекції ваги, профілактики захворювань серцево-судинної системи, а також для захисту від вірусів
28	Green Tea Leaf Extract [23]	Evaluation Nutrition, США	Таблетки, 60 шт.	355	Екстракт зеленого чаю 500 мг (50% поліфенолів)	Жироспалювач, енергетичний активатор, а також для захисту від окисного стресу
29	Acai & Green Tea [29]	Natrol, США	Капсули, 60 шт.	300	Екстракт Акаї 500 мг, екстракт зеленого чаю 160 мг (епігалокатехін галат 80 мг), екстракт зеленої кави 100 мг	Сприяє зниженню загальної маси тіла та посиленню метаболізму
30	Green Tea [5]	ALL NUTRITION, Польща	Капсули, 60 шт.	380	Екстракт зеленого чаю 1000 мг (500 мг епігалокатехін галату)	Виявляє капілярно-протекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла
31	Екстракт зеленого чаю [50]	Beurre, Україна	Краплі	370	СО <sub>2</sub> Екстракт зеленого чаю	Прискорює метаболізм, покращує імунітет, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали

1	2	3	4	5	6	7
32	Green Tea Light Cleaning Complex [29]	Euro Plus, Австрія	Чаї	600	L-карнітин (40 мг), екстракт зеленого чаю (320 мг), екстракт гарцинії (40 мг), екстракт ананасу (40 мг), екстракт гуарани (40 мг), екстракт сенни (28 мг), вітамін А (2640 МЕ), біотин (2,4 мг), вітамін В1 (800 мкг), вітамін В2 (800 мкг), вітамін В6 (1,6 мг), вітамін В12 (3,2 мкг), нікотинова кислота (8 мг)	Сприяє очищенню організму і насиченню антиоксидантами, вітамінами і мінералами, також покращує когнітивні функції і затримує появу передчасних ознак старіння
33	T-Lean Extreme [15]	Now Food Sports, США	Капсули, 60 шт.	576	Екстракт зеленого чаю 150 мг, екстракт коренів колеусу 125 мг, кофеїн 75 мг, екстракт перцю 10 мг, екстракт женьшеню 10 мг, екстракт листя базилика 10 мг	Для корекції ваги, посилення захисних функцій, профілактики захворювань серця і судин
34	Екстракт Зеленого Чаю [63]	Stark Pharm, Україна	Таблетки, 100 шт.	685	Екстракт зеленого чаю 500 мг, вітамін С 100 мг	Нейтралізує вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла, виявляє кардіопротекторну, протизапальну дію
35	Комплексний захист "Сонячний фільтр в капсулах" з екстрактом зеленого чаю [14]	Fernblock, Іспанія	Капсули, 30 шт.	759	Екстракт зеленого чаю	Захист від УФ-опромінення
36	Green tea [51]	Swanson, США	Капсули, 30 шт.	180	Екстракт зеленого чаю 200 мг	Сприяє покращенню обміну речовин, метаболізму, зниженню маси тіла, нейтралізує вільні радикали



1	2	3	4	5	6	7
37	Green tea [18]	Fito Pharma, В'єтнам	Капсули, 40 шт.	155	Екстракт зеленого чаю 200 мг	Сприяє нормалізації обміну речовин, володіє антиоксидантною активністю, затримує процеси старіння, омолоджує організм, знижує ризик серцево-судинних захворювань, сприяє зниженню рівня холестерину
38	Гарцинія з зеленим чаєм [65]	Еліт-фарм, Україна	Таблетки, 80 шт.	121	Екстракт зеленого чаю 50 мг, екстракт гарцинії 150 мг	Володіє протизапальною, антиоксидантною, капіляропротекторною дією, прискорює метаболізм, покращує імунітет
39	Green Tea Complex [52]	GNC Herbal PLUS, США	Капсули, 100 шт.	470	Екстракт зеленого чаю 500 мг	Виявляє капіляропротекторну дію, володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали, сприяє зниженню загальної маси тіла
40	Зелений Чай [19]	Новофіт, Україна	Гель	75	Екстракт зеленого чаю	Заспокоює і загоює пошкоджену шкіру; покращує колір обличчя; усуває почервоніння шкіри і надмірну жирність; бореться з висипом вугрів; очищує і звужує пори шкіри; сприяє нормалізації обмінних процесів в шкірі; пом'якшує і розгладжує шкіру; бореться з передчасним старінням і в'яненням шкіри; стимулює вироблення колагену; захищає від впливу негативних факторів навколишнього середовища
41	Green Tea Extract Plus [3]	Мувітаміни, Велика Британія	Капсули, 100 шт.	384	Екстракт зеленого чаю 450 мг (67,5 мг поліфеноли, 18 мг катехіни, 4,5 епігалокатехін галат, 36 мг кофеїн)	Підвищує витривалість, покращує пильність і концентрацію, зберігаючи увагу протягом тренування

1	2	3	4	5	6	7
42	Green Tea [8]	Bluebonnet Nutrition, США	Капсули, 60 шт.	720	Екстракт зеленого чаю 350 мг	Сприяє покращенню обміну речовин, метаболізму, зниженню маси тіла, нейтралізує вільні радикали
43	Cyto greens [62]	Allmax Nutrition, Канада	Порошок, 267 г	828	Екстракт зеленого чаю	Сприяє покращенню обміну речовин, метаболізму, зниженню маси тіла, нейтралізує вільні радикали

До 2015 р. всі дієтичні добавки в Україні проходили державну санітарно-епідеміологічну експертизу і згідно висновка могли бути прийняті до реєстрації. Але, згідно Закону України від 22.07.2014 № 1602-VII обов'язкову експертизу та реєстрацію було скасовано в рамках співробітництва України та Європейського Союзу в сфері харчових продуктів і гармонізації законодавства України [28]. На сьогодні не існує реєстру дієтичних добавок в Україні [55, 66].

До ДФУ 2.0 введена стаття «Дієтичні добавки» в якій зазначені вимоги до дієтичних добавок з мінімального вмісту важких металів, пестицидів, радіонуклідів, афлотоксину, мікробіологічної чистоти. При цьому відсутні нормативні документи стосовно методів контролю, уніфікованих методик перевірки для підтвердження якості дієтичних добавок, що в свою чергу може навести на думку про сумнівну якість та безпеку дієтичних добавок [12].

### Резюме

Завдяки різноманітному хімічному складу листя зеленого чаю, що накопичує близько 2000 хімічних компонентів, має широкий спектр фармакологічної дії – протизапальну, антиканцерогенну, антипроліферативну, противірусну, кардіопротекторну, цукрознижувальну, остеопротекторну і насамперед високу антиоксидантну активність. Це дозволяє розглядати листя зеленого чаю як перспективну сировину для створення на її основі ефективних лікарських засобів різної направленості дії, а також дієтичних добавок, що містять природні антиоксиданти. Їх вживання дозволяє інактивувати вільні радикали, надлишок яких є першопричиною більшості

захворювань і сприяє відновленню гомеостазу між антиоксидантною і прооксидантною системою. Аналіз українського ринку показав, що частка вітчизняних фірм-виробників дієтичних добавок на основі БАР листя зеленого становить лише 16 %, тому розробка нових лікарських засобів і дієтичних добавок на їх основі є актуальною.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження були: листя зеленого чаю (*Camellia sinensis L.*) сорту Чун Мі, заготовлене у провінції Аньхой (Китай) у весняний сезон; етанольні екстракти, настій, настоянки і гранули з екстрактом листя зеленого чаю; придбані в аптечній мережі фірми «911» дієтичні добавки: «Green Tea» (Source Natural, США), що містить 100 мг сухого стандартизованого екстракту листя зеленого чаю; «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна), що містить 200 мг сухого стандартизованого екстракту листя зеленого чаю; «Зелений чай» (Pharmacom, Україна), що містить 31,25 мг сухого стандартизованого екстракту листя зеленого чаю та 17 мг аскорбінової кислоти.

#### 2.2 Відомості про обладнання, методи і реактиви

Для хроматографування використовували хроматографічні пластини «Sorbfil» – ПТСХ-АФ-А-УФ 10×10, 10×15, 10×20; ПТСХ-П-А-УФ 10×10, 10×15, 10×20 (ТУ 26-11-17-89, РФ), «Silicagel 60 F 254» (Merck).

Хроматографічні дослідження проводили методами висхідної та низхідної одновимірної і двовимірної хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Результати досліджень і значення  $R_f$  на хроматограмах є середніми величинами 5 вимірювань.

Для визначення втрати в масі при висушуванні сировини, гранул, сухого залишку, суми екстрактивних речовин використовували шафу сушильну типу 2В-151 (Одеський завод медичного обладнання, МРТУ 42-1411-61).

Загальну золу визначали з використанням муфельної печі (ЧНВП Промприлад, ТРЦ-02, Україна, ТУ У 20429053.002-2000).

Взяття наважок досліджуваних зразків і речовин проводили з точністю  $\pm 2$  мг на аналітичних вагах AN100 (ДСТУ 24104-88 «AXIS», Польща) та вагах лабораторних ТВЭ-1-0,01 (ДСТУ 45501, «Техноваги», Україна).

Усі спектрофотометричні вимірювання проводилися на однопроменевому спектрофотометрі UV-1000 (Китай) із довжиною хвилі сканування від 1100 до 190 нм. Для отримання спектру досліджуваної проби було використано програмне забезпечення WinASPECT Specol 2.3. Ширина спектральної смуги становила 1 нм. Використовувались кварцові квадратні кювети S90-309Q (UNICO, США) з довжиною оптичного шляху 10 мм, що придатні для вимірювань в діапазоні довжин хвиль від 200 до 1200 нм.

Вимірювання електродного потенціалу проводилось на рН-метрі HANNA 2550 (ДСТУ 9021:2020, Німеччина) з комбінованим платиновим електродом EZDO PO 50 (ДСТУ 6563-2016, Тайвань).

Для екстракцій було використано баню водяну лабораторну з електричним підігрівом 1,4 л (ТУ 64-1-2850-80, Україна).

Настоянку та настій листя зеленого чаю одержували методом мацерації. Упакування екстрактів проводили за допомогою роторного випарника RV 10 CONTROL V (ІКА, Німеччина).

Коефіцієнт поглинання сировини розраховували згідно з настановою «Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек» СТ-Н МЗУ 42-4.5: 2015.

Час розпадання гранул встановлювали з застосуванням приладу моделі 545 Р-АК-1 (МНПО «Минмедбиоспецтехоборудование», СРСР).

Насипний об'єм визначали з використанням приладу моделі 545 Р-АН-3 (МНПО «Минмедбиоспецтехоборудование», СРСР).

Для визначення плинності використовували прилад моделі ВП-12А (МНПО «Минмедбиоспецтехоборудование», СРСР).

При виконанні досліджень використовували такі реактиви:  $K_3[Fe(CN)_6]$  (ДСТУ 4206-75, Китай) кваліфікація х.ч.;  $K_4[Fe(CN)_6]$  (ДСТУ 4207-75, Китай) кваліфікація х.ч.;  $KH_2PO_4$  (ДСТУ 4198-75, Китай) кваліфікація х.ч.;  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

(ДСТУ 4172-76, Китай) кваліфікація х.ч.;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ДСТУ 10931-74, Китай) кваліфікація х.ч.;  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ДСТУ 3759-75, Китай) кваліфікація х.ч.; метанол (ДСТУ 2222-95, Китай) кваліфікація х.ч.; ортофосфорна кислота 85 % (ДСТУ 6552-80, Китай) кваліфікація х.ч.; амоніак водний 25 % (ДСТУ 9-92, Україна, Хімреагент) кваліфікація ч.д.а.; хлороформ (ДСТУ 20015-88, Франція) кваліфікація ч.д.а.; фіксанали хлористоводневої кислоти 0,1 М (ТУ 6-09-2540-72, Харківреакхім, Україна); KI (ДСТУ 4232-74, Китай) кваліфікація х.ч.;  $\text{I}_2$  (ДСТУ 4159-79, Китай) кваліфікація х.ч.; NaOH (ДСТУ 4328-77, Китай) кваліфікація х.ч.; ванілін (ДСТУ 16599-71, Китай) кваліфікація х.ч.;  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (ДСТУ 84-76, Україна, Харківреакхім); спирт етиловий ректифікований (ДСТУ 4221:2003, Україна), концентрацією 96, 60, 40, 20 %; мезо-інозит (ДСТУ 20370-74, Китай) кваліфікація фарм.; фосфорномолібденово-вольфрамовий реактив (Sigma-Aldrich, F9252, Німеччина) аналітична категорія; рутин (Sigma-Aldrich, 78095, Німеччина) аналітична категорія; аскорбінова кислота (Sigma-Aldrich, A92902, Німеччина) аналітична категорія; кислота лимонна (Sigma-Aldrich, C0759, Німеччина) аналітична категорія; кислота галова (Sigma-Aldrich, G7384, Німеччина) аналітична категорія; (-)-епікатехін (Sigma-Aldrich, E1753, Німеччина) аналітична категорія; (+)-катехін (Sigma-Aldrich, C1251, Німеччина) аналітична категорія; епігалокатехін-3-О-галат (Sigma-Aldrich, E4268, Німеччина) аналітична категорія; епігалокатехін (Sigma-Aldrich, E3768, Німеччина) аналітична категорія; епікатехін галат (Sigma-Aldrich, E3893, Німеччина) аналітична категорія; кислота кофеїнова (Sigma-Aldrich, C0625, Німеччина) аналітична категорія; кислота ферулова (Sigma-Aldrich, PHR1791, Німеччина) аналітична категорія; кислота корична (Sigma-Aldrich, 8.00235, Німеччина) аналітична категорія; мірицетин-3-О-глікозид (Sigma-Aldrich, 70050, Німеччина) аналітична категорія; кверцетин (Sigma-Aldrich, Німеччина) аналітична категорія; нарінгенін (Sigma-Aldrich, N5893, Німеччина) аналітична категорія; нарінгін (Sigma-Aldrich, 71162, Німеччина) аналітична категорія; лютеолін-6-С-глікозид (Sigma-Aldrich, I1536, Німеччина) аналітична категорія; апігенін-8-С-глікозид (Sigma-Aldrich, SMB00702, Німеччина) аналітична категорія.

Для вимірювання об'ємів розчинів використовували піпетки об'ємом 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00; 50,00 мл; мікробюретки об'ємом 1,00; 2,00 мл; мірні колби об'ємом 10,00; 25,00; 50,00; 100,00; 200,00; 250,00; 1000,00 мл, колби зі шліфом 29 об'ємом 500, 1000 мл; циліндри, мензурки 1 і 2 класу точності, що відповідають ГОСТ 29169-91 «Посуд мірний лабораторний скляний. Піпетки з однією міткою» (ISO 648-77), 1770-74 «Посуд мірний лабораторний скляний. Циліндри, мензурки, колби, пробірки. Загальні технічні умови» (ISO 1042-83, ISO 4788-80), 29251-91 «Посуд лабораторний скляний. Бюретки. Частина I. Загальні вимоги» (ISO 385-1-84). Посуд був відкалібрований відповідно до [94, 99, 145].

Фармакологічні дослідження проводили *in vitro*.

Визначення антиоксидантної активності проводили потенціометрично з використанням рН-метра - HI 2550, з редокс-електродом EZDO PO50.

Статистична обробка отриманих експериментальних даних проводилася за допомогою програм STATISTICA для Windows 95, Microsoft Excel 2010 відповідно до вимог ДФУ.

### **2.3 Методики визначення БАР у сировині листя зеленого чаю та дієтичних добавках**

Методом ТШХ було проведено ідентифікацію флаван-3-олів (катехинів), кофеїну, флавоноїдів, гідроксикоричних і органічних кислот у дієтичних добавках та сировині зеленого чаю.

Перед виконанням ТШХ-аналізу пластини розрізали на відповідні розміри і перед використанням активували в сушильній шафі при 100-105 °С протягом 1 год. Нанесення досліджуваних зразків проводили мікропіпеткою в об'ємах 10, 20 і 30 мкл, для стандартних розчинів - 10 мкл; смуги мали розмір 10мм×2мм, відстань між смугами становила 1см. Хроматографічну пластинку з нанесеними розчинами поміщали в хроматографічну камеру, попередньо насичену відповідною системою розчинників протягом 40 хв.

Ідентифікацію катехінів в сировині зеленого чаю та дієтичних добавках проводили за таких умов [217]:

- *Досліджуваний розчин сировини зеленого чаю:* до 0,1 г сировини додавали 10 мл суміші *етанолу (96 %) Р* і *води Р* (80:20 в/в). Струшували протягом 10 хв і фільтрували.

- *Досліджувані розчини дієтичних добавок:* порошок подрібнених таблеток повністю розчиняли в *етанолі (96 %) Р*, фільтрували у мірну колбу об'ємом 50 мл та доводили до мітки тим же розчинником.

- *Стандартні розчини:*

- 1) приготування стандартного розчину епігалокатехін-3-О-галату: 0,010 г (точна наважка) епігалокатехін-3-О-галату поміщали в мірну колбу на 50 мл, розчиняли в *етанолі (96 %) Р* і доводили до мітки тим же розчинником;

- 2) приготування стандартного розчину епікатехіну: 0,010 г (точна наважка) епікатехіну поміщали у мірну колбу на 25 мл, розчиняли в *етанолі (96 %) Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- *Мобільна фаза:* *толуол Р* – *ацетон Р* – *мурашина кислота безводна Р* (9:9:2).

- *Детектування:* обприскували пластинку розчином 10 г/л *ваніліну Р* в *хлористоводневій кислоті розведеної Р*.

Для ідентифікації кофеїну і теоброміну в дієтичних добавках та сировині використовували такі хроматографічні умови:

- *Досліджуваний розчин сировини зеленого чаю:* до 0,1 г сировини додавали 10 мл гарячої *води Р*, струшували протягом 30 хв і фільтрували. Отриманий витяг екстрагували *метиленхлоридом Р* двічі по 10 хв. Відбирали аліквоту 10 мл і випарювали насухо. Сухий залишок розчиняли в 1 мл *метанолу Р*.

- *Досліджувані розчини дієтичних добавок:* порошок подрібнених таблеток повністю розчиняли в *етанолі (96 %) Р*, фільтрували у мірну колбу об'ємом 50 мл та доводили до мітки тим же розчинником.



- *Стандартний розчин кофеїну*: 0,030 г (точна наважка) кофеїну поміщали в мірну колбу на 25 мл, розчиняли в *етанолі (60 %, об/об) Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- *Стандартний розчин теоброміну*: 0,020 г (точна наважка) теоброміну поміщали в мірну колбу на 25 мл, розчиняли в *етанолі (60 %, об/об) Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- *Рухома фаза*: *етилацетат Р – метанол Р – амоніак концентрований Р (85:10:5)*.

- *Детектування*: обприскували пластинку сумішшю рівних об'ємів *етанолу (96 %) Р* і *4 % хлористоводневої кислоти Р*, а потім розчином, приготованим безпосередньо перед використанням шляхом розчинення *1 г йоду Р* і *1 г калію йодиду Р* в *100 мл етанолу (96 %) Р*.

Ідентифікацію флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у дієтичних добавках та сировині проводили за таких хроматографічних умов [12]:

- *Досліджуваний розчин сировини зеленого чаю*: до 1,0 г сировини додавали 10 мл *метанолу Р*, нагрівали на водяній бані при температурі 65 °С впродовж 5 хвилин при енергійному перемішуванні.

- *Досліджувані розчини дієтичних добавок*: порошок подрібнених таблеток повністю розчиняли в *етанолі (96 %) Р*; одержаний розчин фільтрували у мірну колбу об'ємом 50 мл та доводили до мітки тим же розчинником.

- *Стандартний розчин*:

- 1) приготування стандартного розчину рутину: 0,020 г (точна наважка) *ДСЗ рутину* поміщали у мірну колбу на 25 мл, розчиняли в *етанолі (60 %, об/об) Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- 2) приготування стандартного розчину кислоти хлорогенової: 0,020 г (точна наважка) кислоти хлорогенової поміщали у мірну колбу на 10 мл, розчиняли в *етанолі (96 %) Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- *Мобільна фаза*: *етилацетат Р – льодяна оцтова кислота Р – мурашина кислота безводна Р – вода Р (100:11:11:26)*.

- *Детектування*: обприскували пластинку розчином 100 г/л натрію гідроксиду в *етанолі (96 %) Р*, висушували, після чого визначали зони флуоресценції у фільтрованому УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Для ідентифікації органічних кислот у сировині використовували такі хроматографічні умови:

- *Досліджуваний розчин сировини зеленого чаю*: до 1,0 г сировини додавали 10 мл *води Р*, нагрівали в колбі зі зворотним холодильником на водяній бані при температурі 100 °С впродовж 120 хв.

- *Стандартний розчин*:

1) приготування стандартного розчину лимонної, оксалатної, аскорбінової, винної, бурштинової, яблучної кислот: 0,200 г (точна наважка) лимонної, оксалатної, аскорбінової, винної, бурштинової, яблучної кислоти поміщали у мірні колби на 25 мл, розчиняли у *воді Р* і доводили до мітки тим же розчинником.

- *Мобільна фаза*: *етилацетат Р* – *льодяна оцтова кислота Р* – *мурашина кислота безводна Р* – *вода Р* (100:11:11:25).

*Детектування*: обробляли розчином 2 г/л бромкрезолового зеленого в *етанолі (96%) Р*.

*Визначення кількісного вмісту суми катехінів у листі зеленого чаю*

Визначення кількісного вмісту суми катехінів у листі зеленого чаю проводили за методикою [105]. До 2,5 мл фільтрату додавали 7,5 мл розчину 10 г/л *ваніліну Р* в *етанолі (96 %) Р* і доводили розчином 4 % (об/об) *хлористоводневої кислоти* до об'єму 25 мл. Оптичну густину досліджуваного розчину вимірювали через 30 хв після приготування за довжини хвилі 505 нм щодо компенсаційного розчину. Як компенсаційний розчин використовували *етанол (96 %) Р*. Кількісний вміст суми катехінів у перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат, %, розраховували за формулою (2.1):

$$X = \frac{C_x \cdot K_{розв} \cdot 100}{m_n \cdot (100 - W)}, \quad (2.1)$$

де:

$C_x$  – концентрація епігалокатехін-3-О-галату за калібрувальним графіком (рис. 2.1), г/мл;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення;

$m_n$  – маса наважки сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

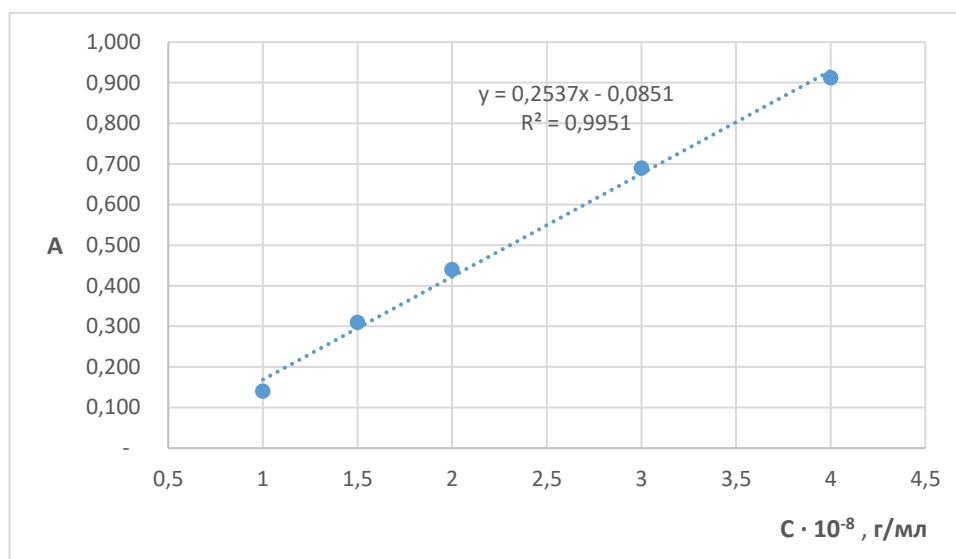


Рис. 2.1 Калібрувальний графік епігалокатехін-3-О-галату

Кількісний вміст суми катехінів в екстракті, настоянці, настої зеленого чаю визначали за методикою [105]: 1,0 мл екстракту, настоянки, настою змішували з 7,5 мл 10 г/л розчину ваніліну  $P$  в етанолі (96 %)  $P$  у мірній колбі на 25 мл. Потім об'єм доводили до 25 мл розчином, приготованим додаванням 0,5  $M$  хлористоводневої кислоти до етанолу (96 %)  $P$ . Через 30 хв приготований розчин аналізували за довжини хвилі 505 нм. Калібрувальну криву будували в інтервалі концентрацій 1 –  $4 \cdot 10^{-8}$  г/мл; рівняння калібрувальної кривої:  $y = 0,2537 \cdot x - 0,0851$  ( $R^2 = 0,9951$ ). Загальний вміст катехінів в екстракті, настоянці, настої у перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат ( $X$ , мг/мл), розраховували за формулою (2.2):

$$X (\text{мг/мл}) = \frac{C_x \cdot m_n \cdot K_{розв} \cdot 1000}{V}, \quad (2.2)$$

де:

$C_x$  – концентрація епігалокатехін-3-О-галату за градувальним графіком,  $C \cdot 10^{-6}$  г/мл (рис. 2.1);

$V$  – об'єм екстракту, настойки, настою, мл;

$m_n$  – маса наважки сировини, г;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення.

*Визначення кількісного вмісту суми катехінів у дієтичних добавках*

Для кількісного визначення суми катехінів у дієтичних добавках, зважували 1,0 г (точна наважка) подрібнених таблеток дієтичних добавок, розчиняли в *етанолі* (96 %) *P*, фільтрували, доводили об'єм до 50,0 мл тим же розчинником. Аліквоту отриманого розчину переносили в мірну колбу на 100,0 мл і доводили до мітки тим же розчинником. Вміст суми катехінів, в перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат ( $X$ , мг), розраховували за формулою (2.3):

$$X (мг) = \frac{A \cdot m_{ст} \cdot K_{розв} \cdot 1000 \cdot 100 \cdot m_{срт}}{A_{ст} \cdot m \cdot (100 - W)}, \quad (2.3)$$

де:

$A$  – оптична густина досліджуваного розчину;

$A_{ст}$  – оптична густина стандартного розчину епігалокатехін-3-О-галату;

$m$  – маса наважки, г;

$m_{ст}$  – маса наважки стандарту епігалокатехін-3-О-галату, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %;

$m_{срт}$  – маса середньої таблетки, г;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення.

*Визначення кількісного вмісту суми фенольних сполук*

Для кількісного визначення суми фенольних сполук в листі зеленого чаю [12], 2,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом на 100 мл, заливали 40 мл *етанолу* (60 %, об/об) *P* і витримували 1 годину на киплячій водяній бані. Після охолодження розчин кількісно переносили в мірну колбу на 50,0 мл, доводили об'єм до мітки тим же розчинником (розчин А). В мірну колбу ємністю 50,0 мл вносили 1,0 мл розчину А, доводили до мітки *етанолом* (60 %, об/об) *P*. Потім відбирали аліквоту 1,0 мл приготованого розчину, вносили в мірну

колбу на 50,0 мл і доводили об'єм до мітки *етанолом* (60 %, об/об) *P* (розчин Б). В колбі на 25,0 мл змішували 1,0 мл розчину Б, 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву P*, 10,0 мл *води P* та доводили розчином 290 г/л *натрію карбонату P* об'єм до мітки. Через 30 хвилин вимірювали оптичну густину при 760 нм, як компенсаційний розчин використовували воду. Кількісний вміст суми фенольних сполук, в перерахунку на кислоту галову, (X, %) розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_x \cdot K_{розв} \cdot 100}{m_n \cdot (100 - W)}, \quad (2.4)$$

де:

$C_x$  – концентрація кислоти галової за калібрувальним графіком,  $C \cdot 10^{-6}$ , г/мл (рис. 2.2);

$K$  – коефіцієнт розведення;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %;

$m_n$  – маса наважки.

Кількісний вміст фенольних сполук в екстракті, настоянці, настої листя зеленого чаю визначали за методом Фоліна-Чокальтеу [12]. 1,0 мл екстракту, настоянки, настою змішували з 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву P*, суміш перемішували і доводили до мітки 20 % розчином *натрію карбонату P*, витримували при кімнатній температурі впродовж 30 хвилин, потім вимірювали оптичну густину при 760 нм. Рівняння калібрувальної кривої:  $y = 0,1055 \cdot x + 0,1745$  ( $R^2 = 0,9951$ ) (рис. 2.2). Загальний вміст фенольних сполук (X, мг/мл) в екстракті, настоянці, настої розраховували за формулою (2.5):

$$X (\text{мг/мл}) = \frac{C_x \cdot m_n \cdot K_{розв} \cdot 1000}{V}, \quad (2.5)$$

де:

$C_x$  – концентрація кислоти галової за калібрувальним графіком,  $C \cdot 10^{-6}$ , г/мл;

$V$  – об'єм екстракту, настоянки, настою, мл;

$m_n$  – маса наважки сировини, г;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення.

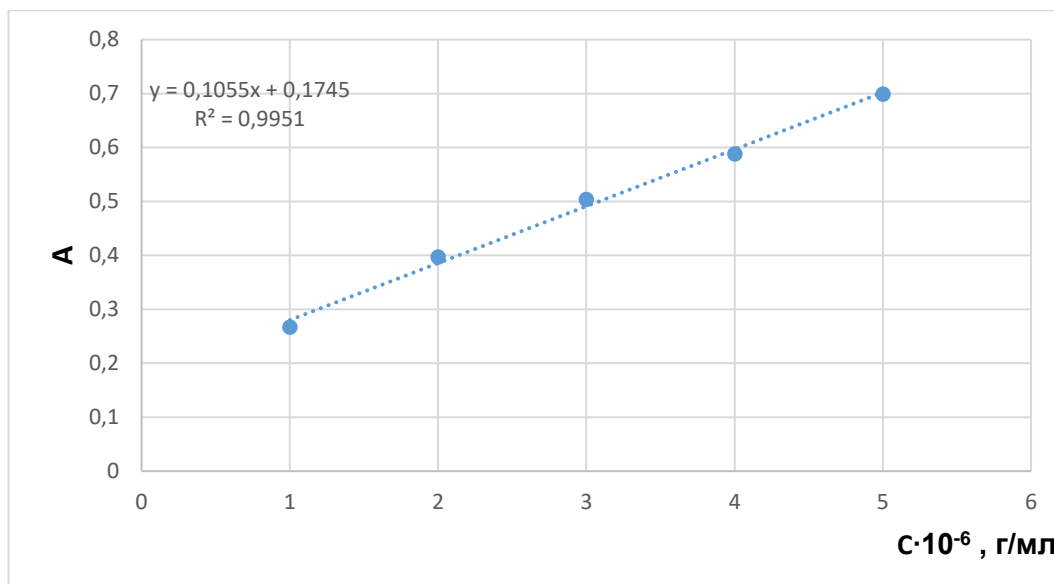


Рис. 2.2 Калібрувальний графік кислоти галової

### *Аналіз фенольних сполук листя зеленого чаю методом ВЕРХ*

Аналіз фенольних сполук листя зеленого чаю проводили за допомогою рідинної хроматографічної системи Prominence LC-20 Shimadzu (Японія), що складається з таких функціональних модулів: дегазатор DGU-20A3, насосний модуль LC-20AD, автосемплер-холодильник SIL-20AC, фотометричний детектор SPD-20AV, колонковий термостат CTO-20A, колонка Thermo Scientific Synchronis aQ (обернено-фазова, наповнювач aQ з пришитою групою C<sub>18</sub> (-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>), довжина 250 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм, розмір зерна сорбенту 4,6 мкм). Для очищення екстракту від домішок використовували шприцевий фільтр Supelco Iso-Disc Filters PTFE 25-4 (25 мм x 0,45 μм).

Умови проведення ВЕРХ:

1) Склад рухомої фази: компонент А – метанол, компонент В – 1 % розчин фосфорної кислоти в деіонізованій воді.

2) Режим хроматографування – градієнтний.

Рухома фаза складалася з метанолу та фосфорної кислоти.

Схема градієнта за вмістом компонента А в рухомій фазі була наступною:

- початковий вміст – 20 %;
- перші 15 хвилин – підвищення вмісту від 20 до 42 %;
- з 15 до 25 хвилини – підвищення вмісту від 42 до 43 %;

- з 25 до 45 хвилини – підвищення вмісту від 43 до 90 %;
- з 45 до 55 хвилини – утримання вмісту 90 %;
- з 55 до 60 хвилини – зниження вмісту до 20 %;
- з 60 до 70 хвилини – утримання вмісту 20 %.

3) Швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв.

4) Температура колонки – 40 °С.

5) Об'єм інжекції – 5 мкл.

Аналіз рослинного об'єкта є досить складним, тому ідентифікувати кожен речовину іноді проблематично. Крім того, деякі стандарти речовин дуже коштовні, тому був використаний метод індексу подібності. Як спектральні характеристики речовин використовували висоти піків цих речовин на хроматограмах при довжинах хвиль 255, 286 і 350 нм, приведені до висоти піку при довжині хвилі 225 нм [157]. Ці довжини хвиль є середніми значеннями максимумів поглинання світла в ультрафіолетовій області для вищеперерахованих стандартів, відомості про які взяті з літературних джерел. Індеси подібності розраховували за формулами (2.6-2.9) [66]:

$$I_T = 1 - |T_{st} - T_u|, \quad (2.6)$$

$$I_{255} = 1 - |h_{255st} - h_{255u}|, \quad (2.7)$$

$$I_{286} = 1 - |h_{286st} - h_{286u}|, \quad (2.8)$$

$$I_{350} = 1 - |h_{350st} - h_{350u}|, \quad (2.9)$$

де:

$I_T$  – індекс подібності часу утримання;

$T_{st}$  – час утримання стандарту (хв.);

$T_u$  – час утримання досліджуваної речовини (хв.);

$I_{255}$ ,  $I_{286}$  і  $I_{350}$  – індекси подібності;

$h_{255st}$ ,  $h_{286st}$ , і  $h_{350st}$  – спектральні характеристики стандарту;

$h_{255u}$ ,  $h_{286u}$  і  $h_{350u}$  – спектральні характеристики досліджуваної речовини.

Найменший із трьох за значенням індекс подібності спектральних характеристик визначає ступінь подібності  $I_L$ . Чим вище  $I_L$ , тим більше ймовірність точної

ідентифікації речовини. Для ідентифікації хроматографічного піку значення подібності повинно бути більше 0,7, у протилежному випадку пік є не ідентифікованим. [151].

*Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю*

Для визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю [70] 2,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом на 100,0 мл, заливали 40 мл *етанолу (60 %, об/об) Р* і витримували 1 годину на киплячій водянній бані [4]. Після охолодження розчин кількісно переносили в мірну колбу на 50,0 мл, доводили об'єм до мітки тим же розчинником (розчин А). В мірну колбу ємністю 25,0 мл вносили 1,0 мл розчину А, потім додавали 1,0 мл 2 % розчину *алюмінію (III) хлориду Р в етанолі (96 %, об/об) і 5 % розчином кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р* доводили об'єм до мітки. Компенсаційний розчин: в мірну колбу ємністю 25,0 мл вносили 1,0 мл розчину А; доводили до мітки 5 % розчином *кислоти оцтової льодяної Р у метанолі Р*. Через 30 хвилин вимірювали оптичну густину при 417 нм. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину комплексу *ДСЗ рутину Р з розчином алюмінію (III) хлориду Р в етанолі (96 %, об/об)*. Кількісний вміст суми флавоноїдів (X, мг/г) в перерахунку на рутин в абсолютно сухій сировині розраховували за формулою (2.10):

$$X = \frac{A \cdot m_{cm} \cdot 1,0 \cdot 50,0 \cdot 25,0 \cdot 100 \cdot 100}{A_{cm} \cdot m_n \cdot 1,0 \cdot 25,0 \cdot 25,0 \cdot (100 - W)}, \quad (2.10)$$

де:

A – оптична густина досліджуваного розчину;

$A_{cm}$  – оптична густина *ДСЗ рутину Р*;

$m_n$  - маса наважки сировини, г;

$m_{cm}$  – маса *ДСЗ рутину Р*;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

Загальний вміст флавоноїдів в екстракті, настоянці, настої листя зеленого чаю визначали за методом [70]. 1,0 мл екстракту, настоянки, настою змішували з 1,0 мл 2 % розчину *алюмінію (III) хлориду Р в 5 % розчині льодяної оцтової кислоти*



*P* в метанолі *P* і розбавляли до об'єму 25,0 мл 5 % розчином льодяної оцтової кислоти *P* в метанолі *P*. Через 30 хв при довжині хвилі 417 нм вимірювали оптичну густину розчину. Компенсаційний розчин: 1,0 мл розчину екстракту, настоянки, настою листя зеленого чаю, що розведені до об'єму 25,0 мл 5 % розчином льодяної оцтової кислоти *P* в метанолі *P*. Загальний вміст флавоноїдів в екстракті, настоянці, настої в перерахунку на рутин розраховували за формулою (2.11):

$$X \text{ (мг/мл)} = \frac{A \cdot m_n \cdot K_{\text{розв}} \cdot 1000}{A_{\text{ст}} \cdot V}, \quad (2.11)$$

де:

*A* – оптична густина аналізованого розчину;

*A*<sub>ст</sub> – оптична густина стандартного розчину рутину;

*V* – об'єм екстракту, настоянки, настою, мл;

*m*<sub>н</sub> – маса наважки сировини, г;

*K*<sub>розв</sub> – коефіцієнт розведення.

#### *Визначення кількісного вмісту суми гідроксикоричних кислот*

Для визначення кількісного вмісту суми гідроксикоричних кислот в сировині зеленого чаю 2,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом на 100 мл, заливали 40 мл *етанолу* (60 %, об/об) *P* і витримували 1 годину на киплячій водяній бані [12]. Після охолодження розчин відфільтровували і кількісно переносили в мірну колбу на 50,0 мл, доводили об'єм *етанолом* (60 %, об/об) до мітки (розчин *A*). В мірну колбу ємністю 25,0 мл вносили 8,0 мл розчину *A*, додавали 2,0 мл 0,5 *M* розчину *хлористоводневої кислоти*, 2,0 мл 10 % розчинів *натрію нітриту P* і *натрію молібдату P*, потім додавали 2,0 мл розчину *натрію гідроксиду розведеного P*, доводили об'єм розчину водою до мітки. Компенсаційний розчин: в мірну колбу ємністю 25,0 мл вносили 8,0 мл розчину *A*, 2 мл 0,5 *M* розчину *хлористоводневої кислоти*, 2 мл розчину *натрію гідроксиду розведеного P*, перемішували і доводили об'єм розчину водою до 25,0 мл. Одразу вимірювали оптичну густину при 525 нм.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (*X*, %) в перерахунку на хлорогенову кислоту в абсолютно сухій сировині розраховували за формулою (2.12):

$$X = \frac{A \cdot K_{розв} \cdot 100}{188 \cdot m_n \cdot (100 - W)}, \quad (2.12)$$

де:

$A$  – оптична густина аналізованого розчину;

188 – питомий коефіцієнт поглинання хлорогенової кислоти;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення;

$m_n$  – маса наважки сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст суми гідроксикоричних кислот в екстракті, настоянці, настої зеленого чаю визначали за методом [13]. 1,0 мл екстракту, настоянки, настою змішували з 2,0 мл 0,5 М хлористоводневої кислоти, 2,0 мл 10 % розчину натрію нітриту  $P$ , 2,0 мл 10 % розчину натрію молібдату  $P$ , 2,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного  $P$  і доводили водою  $P$  до об'єму 25,0 мл. Одразу вимірювали оптичну густина при 525 нм. Компенсаційний розчин: 1,0 мл розчину екстракту, настоянки, настою; 2,0 мл 0,5 М хлористоводневої кислоти; 2,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного  $P$  змішували та доводили об'єм водою  $P$  до 25 мл. Загальний вміст гідроксикоричних кислот в екстракті, настоянці, настої, у перерахунку на хлорогенову кислоту ( $X$ , мг/мл), розраховували за формулою (2.13):

$$X \text{ (мг/мл)} = \frac{A \cdot m \cdot K_{розв} \cdot 1000}{188 \cdot V}, \quad (2.13)$$

де:

$A$  – оптична густина аналізованого розчину;

188 – питомий коефіцієнт адсорбції хлорогенової кислоти;

$V$  – об'єм екстракту, настоянки, настою, мл;

$m_n$  – маса сухого залишку в отриманому екстракті, настоянці, настої, г;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення.

*Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот в листі зеленого чаю методом потенціометричного титрування*

2,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом на 100 мл, заливали 40 мл *води Р*, приєднували до зворотного холодильника і витримували 2 години на киплячій водяній бані. Після охолодження розчин відфільтровували, кількісно переносили у мірну колбу на 50 мл та доводили об'єм до мітки (розчин А). 5,0 мл розчину А поміщали в хімічний стакан на 100 мл і додавали 45,0 мл *води Р*. Титрували 0,05 М розчином натрію гідроксиду. Після додавання кожної порції титранту суміш ретельно перемішували і реєстрували електродний потенціал. Також було проведено холостий дослід, відповідно до якого холостий об'єм 0,05 М розчину натрію гідроксиду *Р* склав 0,03 мл.

Кількісний вміст суми органічних кислот розраховували зі значення еквівалентного об'єму титранту, який визначався за побудованою диференційною кривою в координатах  $\Delta E/\Delta V - V$  в перерахунку на лимонну кислоту (X, %) за формулою (2.14):

$$X(\%) = \frac{(V_{екв} - V_x) \cdot 0,0032 \cdot 25,0 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m_n \cdot 5,0 \cdot (100 - W)}, \quad (2.14)$$

де:

0,0032 – кількість лимонної кислоти, еквівалентна 1 мл 0,05 М розчину натрію гідроксиду, г;

$V_{екв}$  – об'єм 0,05 М розчину натрію гідроксиду, використаний для титрування, мл;

$V_x$  – об'єм 0,05 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування в холостому досліді, мл;

$m$  – маса наважки сировини, г;

$K$  – поправочний коефіцієнт для 0,05 М розчину натрію гідроксиду;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

### Визначення кількісного вмісту кофеїну

Для визначення кількісного вмісту кофеїну, 5,0 г (точна наважка) подрібненої до розміру 3 - 4 мм сировини листя зеленого чаю поміщали в плоскодонну колбу, додавали 100 мл гарячої води *P* і перемішували з магнітною мішалкою протягом 30 хвилин. Настоявали двічі, охолоджували і фільтрували в мірну колбу об'ємом 200 мл; доводили об'єм до мітки водою *P* (розчин А) [22]. 20,00 мл розчину А поміщали в ділильну лійку і екстрагували 20,00 мл метиленхлориду *P* протягом 10 хвилин, двічі. Органічний шар фільтрували через паперовий фільтр з 1 г натрію сульфату безводного *P* в мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводили об'єм до мітки метиленхлоридом *P*. 5,00 мл отриманого розчину випарювали на водяній бані до повного видалення органічного розчинника, сухий залишок розчиняли в 10,00 мл 0,1 М хлористоводневої кислоти *P*. Вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 272 нм. Вміст кофеїну *X* (%), у сировині визначали за формулою (2.15):

$$X(\%) = \frac{A \cdot K_{розв} \cdot m_{ст} \cdot 100 \cdot 100}{A_{ст} \cdot m_n \cdot (100 - W)}, \quad (2.15)$$

де:

*A* – оптична густина випробуваного розчину за довжини хвилі 272 нм;

*A<sub>ст</sub>* – оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 272 нм;

*m<sub>n</sub>* – маса наважки сировини, г;

*m<sub>ст</sub>* – маса наважки стандарту кофеїну, г;

*K<sub>розв</sub>* – коефіцієнт розведення;

*W* – втрата в масі при висушуванні, %.

Для визначення кількісного вмісту кофеїну в екстракті, настоянці, настої листя зеленого чаю 1,0 мл екстракту, настоянки, настою випарювали на водяній бані до повного видалення органічного шару, сухий залишок розчиняли в 10,0 мл 0,1 М хлористоводневої кислоти *P*. Вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 272 нм. Вміст кофеїну в екстракті, настоянці, настої (мг/мл) розраховували за формулою (2.16):

$$X(\text{мг/мл}) = \frac{A_x \cdot m_n \cdot K_{розв} \cdot 1000}{A_{ст} \cdot V}, \quad (2.16)$$

де:

$A_x$  – оптична густина аналізованого розчину при 272 нм;

$A_{cm}$  – оптична густина стандартного розчину кофеїну при 272 нм;

$V$  – об'єм екстракту, настоянки, настою, мл;

$m_n$  – маса наважки сировини, г;

$K_{розв}$  – коефіцієнт розведення.

#### *Визначення сухого залишку*

5,0 мл екстракту поміщали у бюкс, доведений до сталої маси, випарювали на водяній бані і сушили при температурі від 100 до 105 °С протягом 3 год. Бюкс охолоджували в ексікаторі при кімнатній температурі протягом 30 хв і зважували [13].

Сухий залишок  $\omega$ , (%) у зразках екстрактів, отриманих при певному співвідношенні «сировина : екстрагент», обчислювали за формулою (2.17):

$$\omega = \frac{m_{сyx} \cdot 100}{V_a}, \quad (2.17)$$

де:

$m_{сyx}$  – маса сухого залишку після висушування аліквоти зразка екстракту, г;

$V_a$  – об'єм аліквоти зразка екстракту, мл.

Вихід екстрактивних речовин  $E$  (%) з рослинної сировини обчислювали за формулою (2.18):

$$E = \frac{\omega \cdot V}{m_{рос}}, \quad (2.18)$$

де:

$V$  – загальний об'єм отриманого екстракту, мл;

$\omega$  – сухий залишок в отриманому екстракті, %;

$m_{рос}$  – маса рослинної сировини, використаної для вилучення, г.

#### *Визначення розпадання гранул*

Для визначення розпадання гранул з екстрактом листя зеленого чаю у кожну з шести трубок приладу поміщали 5,0 г гранул, опускали кошик у посудину з рідиною температури 37 °С ± 2 °С. Вмикали прилад, включали секундомір та визначали

час, за який відбувається розпадання гранул. Після цього виймали кошик і досліджували стан гранул [13].

*Визначення фракційного складу гранул*

20,0 г гранул з екстрактом листя зеленого чаю просіювали крізь набір сит з діаметром 3,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 мм [13]. Розраховували вміст кожної фракції гранул,  $X$ , у відсотках, відповідно до формули (2.19):

$$X(\%) = \frac{m_{fp}}{m_{gp}} \cdot 100, \quad (2.19)$$

де:

$m_{fp}$  – маса наважки фракції гранул, г;

$m_{gp}$  – маса наважки гранул, г.

*Визначення насипного об'єму гранул*

У сухий циліндр об'ємом 250 мл поміщали без ущільнення 100,0 г гранул з екстрактом листя зеленого чаю. Закріплювали циліндр на підставці й фіксували насипний об'єм до усадки  $V_0$ . Проводили 1250 зіскоків циліндра і фіксували насипний об'єм після усадки  $V_{1250}$  з точністю до найближчої позначки [13].

Розраховували насипну густину до усадки,  $\rho$  в г/мл, за формулою (2.20):

$$\rho = \frac{m_{gp}}{V_0}, \quad (2.20)$$

де:

$m_{gp}$  – маса наважки гранул, г;

$V_0$  – насипний об'єм до усадки, мл.

Розраховували насипну густину після усадки,  $\rho$  в г/мл, відповідно до формули (2.21):

$$\rho = \frac{m_{gp}}{V_{1250}}, \quad (2.21)$$

де:

$m_{gp}$  – маса наважки гранул, г;

$V_{1250}$  – насипний об'єм після усадки, мл.

### *Визначення плинності гранул*

У суху лійку з закритим вихідним отвором поміщали без ущільнення 20,0 г гранул з екстрактом листя зеленого чаю. Відкривали отвір, включали секундомір і визначали час, необхідний для повного витікання гранул з лійки [13]. Плинність,  $X$  (г/с), розраховували за формулою (2.22):

$$X(\text{г/с}) = \frac{m_{\text{гр}}}{\tau}, \quad (2.22)$$

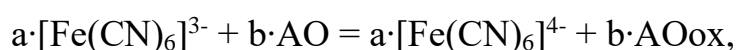
де:

$m_{\text{гр}}$  – маса наважки гранул, г;

$\tau$  – час витікання гранул, с.

### *Методика визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом*

Для приготування робочого розчину  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  з концентрацією 2 ммоль/л, 0,8232 г  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  поміщали у мірну колбу на 25,0 мл, розчиняли у бідистильованій воді та доводили об'єм до мітки тим самим розчинником. Розчин 0,02 ммоль/л  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ : наважку 0,0921 г  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  кількісно переносили у мірну колбу на 250,0 мл, розчиняли у бідистильованій воді та доводили об'єм до мітки тим самим розчинником. Аліквоти 5,00 мл обох приготованих розчинів переносили у мірну колбу на 250,0 мл і доводили до мітки фосфатним буферним розчином (0,067 моль/л). 50,00 мл приготованого розчину медіатора переносили в електрохімічну комірку і вимірювали початковий потенціал. Додавали аліквоту 1,00 мл досліджуваного зразка, вимірювали кінцевий потенціал. Розраховували різницю ( $\Delta E$ ) між початковим ( $E_0$ ) та кінцевим ( $E_1$ ) потенціалами. Зміна потенціалу пояснюється зміною співвідношення окисленої та відновленої форм медіаторної системи в результаті хімічної реакції:



де:

АО – антиоксидант;

АО<sub>ox</sub> – окислена форма антиоксиданту;

a, b – стехіометричні коефіцієнти.

Значення АОА настойки, екстракту розраховували в ммоль/100 мл за формулою (2.23):

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^3 \cdot V, \quad (2.23)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF / 2.3RT},$$

C<sub>ox</sub> – концентрація K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], М;

C<sub>red</sub> – концентрація K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], М;

ΔE – різниця потенціалів до та після взаємодії з антиоксидантом;

E<sub>стан</sub> = 0,0546 · C% – 0,0091; C% – концентрація спирту;

F = 96485,333 Кл/моль – стала Фарадея;

n = 1 – кількість електронів в електродній реакції;

R = 8,314 Дж/моль·К – універсальна газова стала;

T – 298 °К;

K<sub>dil</sub> – коефіцієнт розведення;

V – об'єм екстракту, настойки, що отриманий зі 100 г сировини, мл;

Значення АОА екстракту в перерахунку на ммоль-екв./m<sub>сух.зал.</sub> розраховували за формулою (2.24):

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_2}, \quad (2.24)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF / 2.3RT},$$

C<sub>ox</sub> – концентрація K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], М;

C<sub>red</sub> – концентрація K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], М;

ΔE – різниця потенціалів до та після взаємодії з антиоксидантом;

E<sub>стан</sub> = 0,0546 · C% – 0,0091; C% – концентрація спирту;

F = 96485,333 Кл/моль – стала Фарадея;

n = 1 – кількість електронів в електродній реакції;



$R = 8,314$  Дж/моль·К – універсальна газова стала;

$T = 298$  °К;

$K_{dil}$  – коефіцієнт розведення;

$m_1$  – маса сухого залишку екстракту, г;

$m_2$  – маса сухого залишку в 1 мл екстракту, г.

Рівень АОА дієтичної добавки розраховували в ммоль/таб. за формулою:

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^3 \cdot V, \quad (2.25)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF / 2.3RT},$$

$C_{ox}$  – концентрація  $K_3[Fe(CN)_6]$ , М ;

$C_{red}$  – концентрація  $K_4[Fe(CN)_6]$ , М;

$\Delta E$  – різниця потенціалів до та після взаємодії з антиоксидантом;

$E_{стан} = 0,0546 \cdot C_{\%} - 0,0091$ ;  $C_{\%}$  – концентрація спирту;

$F = 96485,333$  Кл/моль - стала Фарадея;

$n = 1$  – кількість електронів в електродній реакції;

$R = 8,314$  Дж/моль·К - універсальна газова стала;

$T = 298$  °К;

$K_{dil}$  – коефіцієнт розведення;

$V$  – об'єм, в якому розчиняли таблетку дієтичної добавки, мл.

#### *Методика визначення кореляції*

Коефіцієнт кореляції Пірсона (R) був використаний для аналізу кореляції між антиоксидантною активністю і загальним вмістом біологічно активних речовин. Коефіцієнт кореляції - це безрозмірна величина, що набуває значення в діапазоні від -1 до +1. Кореляція є дуже високою, якщо знаходиться в діапазоні від 0,90 до 1,00; від 0,70 до 0,90 - висока кореляція; від 0,50 до 0,70 - помірна кореляція; від 0,30 до 0,50 - низька кореляція; від 0,00 до 0,30 незначна кореляція [174].

#### *Дослідження на мікробіологічну чистоту*

Вивчення мікробіологічної чистоти досліджуваних об'єктів проводили методом дифузії в агар за ДФУ, 2.6.12 [13]. Згідно з рекомендаціями ВООЗ для оцінки

активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 і *Candida albicans* 653/885 ATCC. Дослідження виконувались у лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова під керівництвом під керівництвом к.біол.н. ст.н.співр. Т.П. Осолодченко.

#### *Дослідження на вміст важких металів*

Вміст важких металів методом атомно-адсорбційної спектроскопії встановлювали відповідно до ДФУ, 2.4.8 [13].

#### *Дослідження на вміст афлотоксину*

Визначення вмісту афлотоксину проводили методом рідинної хроматографії відповідно до ДФУ, 2.8.18 [13].

#### *Дослідження на вміст залишкової кількості пестицидів*

Залишкову кількість пестицидів встановлювали методом газорідинної хроматографії відповідно до ДФУ, 2.8.13 [13].

#### *Дослідження на радіонукліди*

Визначення радіонуклідів проводили методом  $\beta$ - і  $\gamma$  – спектрометрії відповідно до ДФУ, 2.2.66 [13].

Вміст важких металів, залишкову кількість пестицидів, афлотоксин і радіонукліди встановлювали у лабораторії Харківського обласного центру контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України.

## РОЗДІЛ 3

### РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ

На сьогоднішній день розроблені методи визначення антиоксидантної активності, які ґрунтуються на хімічних, фізико-хімічних та біохімічних механізмах. За технікою виконання ці методи можна розділити на титриметричні, спектрофотометричні, хемілюмінесцентні, флуоресцентні, електрохімічні та ряд більш специфічних.

Потенціометрія – це високочутливий метод експрес-аналізу, який не вимагає коштовних обладнання і реактивів. Основною його перевагою є відсутність необхідності застосування стандарту для порівняння, оскільки використовується інтегроване значення АОА.

#### **3.1 Обґрунтування доцільності визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом**

Хімічна реакція між окисником і антиоксидантом залежить від величини окисно-відновних потенціалів сполучених пар учасників. У свою чергу, повнота перебігу визначається різницею потенціалів і швидкості окисно-відновної реакції [82, 32].

Одним з важливих факторів, що впливають на величину окисно-відновного потенціалу системи є рН середовища. Визначений рівень АОА зразків, що встановлений в сильноокислому або лужному середовищі ймовірно слід вважати некоректним, оскільки фізіологічне середовище організму має нейтральне середовище [53, 10].

Також необхідно враховувати той факт, що методика визначення повинна бути достатньо експресною і мати можливість визначення забарвлених компонентів.

Відповідно до зазначених умов, можна сформулювати такі вимоги:

- 1) перебіг реакції між окисником і антиоксидантом має бути термодинамічно можливим;
- 2) між окисно-відновними потенціалами окисника та антиоксидантів повинна бути певна різниця;
- 3) визначення АОА досліджуваного зразка бажано проводити в нейтральному середовищі;
- 4) методика дозволяє визначати АОА у забарвлених розчинах;
- 5) швидкість визначення АОА має бути високою.

Існують різні методи визначення АОА, що ґрунтуються на передачі електронів від антиоксиданта до окисника [69]. Окисники, які використовуються для визначення АОА зазвичай мають різні величини редокс-потенціалу. Як наведено в табл. 3.1,  $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Br}_2$  і  $[1,10\text{-фенантролін}]\text{Fe}^{3+}$  мають високе значення редокс-потенціалу і для перебігу хімічної реакції не потрібне додавання кислоти. Але, існує ймовірність того, що речовини, які не володіють антиоксидантною властивістю (органічні кислоти, амінокислоти) також здатні вступати у взаємодію, що може призводити до хибного визначення рівня антиоксидантної активності.

Таблиця 3.1

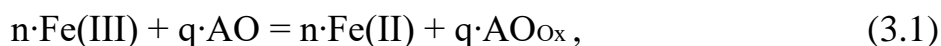
**Окисно-відновні потенціали окисників, які використовуються  
для визначення АОА**

Сполучена пара окисників	Метод	Потенціал, В
$\text{I}_2/2\text{I}^-$	Кулонометрія з електрогенованим йодом	+0,621 [161]
$\text{Br}_2/2\text{Br}^-$	Кулонометрія з електрогенованим бромом	+1,087 [161]
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Потенціометричний метод	+0,360 [161]
1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил	DPPH метод	+0,495 [161]
$[1,10\text{-фенантролін}]\text{Fe}^{3+} / [1,10\text{-фенантролін}]\text{Fe}^{2+}$	FRAP	+1,02 [161]
$\text{Cu}(\text{II})\text{-неокупроїн} / \text{Cu}(\text{I})\text{-неокупроїн}$	CUPRAC	+0,6 [161]
$\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$	Цериметрія	+1,4 [161]

Івановою А.В. та співавт. було встановлено, що різниця потенціалів учасників реакції в залежності від числа функціональних антиоксидантних груп складає від 220 до 360 мВ, тобто величина 360 мВ є термодинамічно необхідною і достат-

ньою для реалізації із всіма АО [146]. Також повідомляється, що значення стандартних потенціалів для спряженої пари  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  залежить від природи ліганду. Комплекси гексаціаноферату (III) та (II) калію стійкі в нейтральному середовищі. Отже, найбільш підходящим окисником для визначення АО властивостей в нейтральному середовищі з термодинамічної точки зору є гексаціаноферат (III) калію [130].

Зміна співвідношення концентрацій окисленої та відновленої форм медіаторної системи, що містить фероціанід/фериціанід, є результатом перетікання реакції переносу електрона з досліджуваного АО на окислений компонент системи, що супроводжується зміною потенціалу системи, який можна визначити відповідно до рівняння (3.1)[193]:



де:

АО – антиоксидант;

$\text{АО}_{\text{ox}}$  – продукт окислення антиоксиданту;

$n, q$  – стехіометричні коефіцієнти.

Потенціал системи в певних умовах підпорядковується рівнянню Нернста, тому до введення досліджуваного зразка може бути визначений за рівнянням (3.2):

$$E = E_0 + \alpha \cdot \lg \frac{C_{\text{ox}}}{C_{\text{red}}}, \quad (3.2)$$

де:

$\alpha = 2,3 \cdot \text{RT}/n\text{F}$ ;

$E$  – потенціал системи до введення досліджуваного зразка, В;

$E_0$  – стандартний потенціал системи, В;

$C_{\text{ox}}$  – концентрація окисленої форми, моль;

$C_{\text{red}}$  – концентрація відновленої форми, моль.

Після завершення реакції окислення досліджуваного компонента антиоксидантом, потенціал системи визначатиметься за рівнянням (3,3) [146]:

$$E_1 = E_0 + \alpha \cdot \lg \frac{C_{\text{ox}} - \sum C_{\text{АО1/z}}}{C_{\text{red}} + \sum C_{\text{АО1/z}}}, \quad (3.3)$$

де:

$E_1$  – потенціал системи після завершення реакції взаємодії окисленого компонента з досліджуваним АО, В;

$\sum C_{AO_{1/z}}$  – сумарний вміст АО в досліджуваному зразку, моль-екв./л;

Загальний вміст АО у досліджуваному зразку, виражений у моль-екв./л буде відповідати інтегральному параметру антиоксидантної ємності досліджуваного розчину. Таким чином, зміна потенціалу ( $E_1 - E_0$ ) слугує джерелом інформації про антиоксидантну ємність. Якщо виразити рівняння (3.2) та (3.3) через різницю та перетворюючи їх відносно  $\sum C_{AO_{1/z}}$ , для величини АОА (моль-екв./л) отримуємо рівняння (3.4) та (3.5) [93]:

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha}, \quad (3.4)$$

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{\Delta E_{nF}/2.3RT}, \quad (3.5)$$

### 3.2 Вибір умов визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом

#### 3.2.1 Вибір робочого електрода для визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом

Робочий електрод повинен відповідати наступним критеріям [32]:

1. діапазон вимірюваного потенціалу має бути більше 0,36 В;
2. електрод повинен забезпечувати Нернстівську залежність зміни потенціалу системи від зміни концентрацій компонентів;
3. швидке встановлення рівноважного потенціалу.

На практиці для вимірювання окисно-відновних потенціалів використовуються електроди, виготовлені з платинових, золотих та скловуглецевих матеріалів. Діапазони вимірювання потенціалів робочих електродів представлені в табл. 3.2.

## Діапазони вимірювання потенціалів робочих електродів

Робочий електрод	Діапазон вимірювання, В
Платиновий електрод	від -0,1 до +0,9
Золотий електрод	від -0,1 до +0,3
Скловуглецевий електрод	від -0,9 до +0,8

Золотий електрод не можна застосовувати для визначення антиоксидантної активності у зв'язку з тим, що діапазон його вимірювання менше 0,36 В, інші ж електроди відповідають за даним критерієм.

Досить важливим критерієм є швидкість встановлення потенціалу. На платинових електродах швидкість встановлення потенціалу вища (~60 сек.) в порівнянні зі скловуглецевими електродами (~4 хв.); до того ж, потенціал на платиновому електроді більш стабільний, ніж на інших типах електродів [10, 32]. Також важливі економічна складова і доступність електродів: вартість скловуглецевого електрода набагато вище, ніж платинового, і він менш доступний на ринку.

Точність визначення потенціалу системи залежить від підпорядкування Нернстівській залежності. На рис. 3.1 показано залежність величини потенціалу платинового електрода EZDO PO 50 у натрій фосфатному буфері рН 7,4 від різних концентрацій  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ .

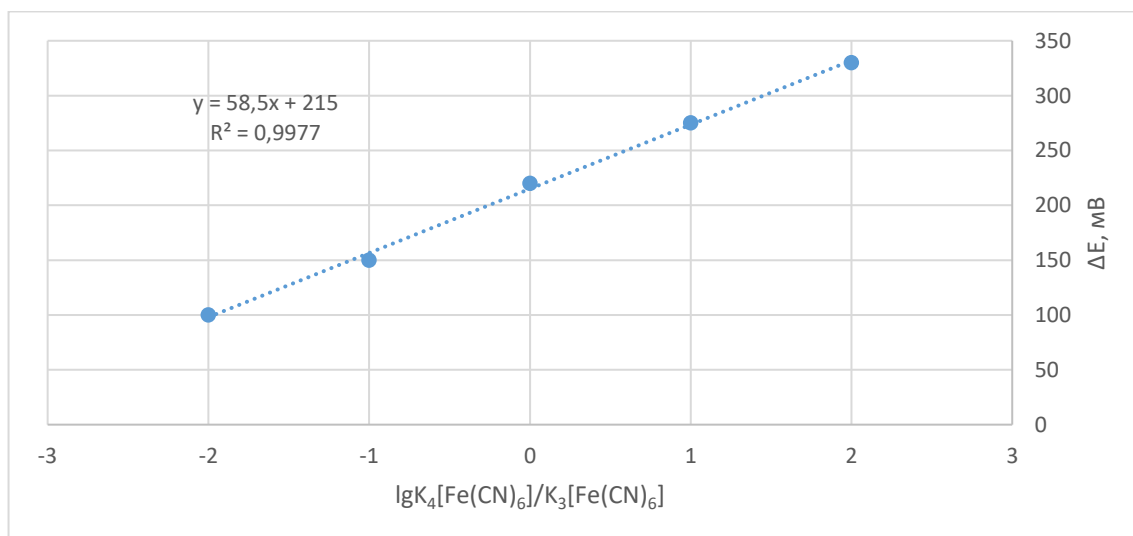


Рис. 3.1 Залежність величини потенціалу платинового електрода EZDO PO 50 у натрій фосфатному буфері рН 7,4, що містить різні концентрації  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$

Предлогарифмічний коефіцієнт цієї залежності дорівнює 58,5 мВ, що близько до теоретичного значення  $RT/nF = 59,16$  мВ в рівнянні Нернста для одноелектронного процесу при 25 °С.

Таким чином, платиновий електрод відповідає пред'явленим критеріям і його можна вважати оптимальним вибором для даного визначення.

### 3.2.2 Вибір електроліту для визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом

Електроліт, який використовується для визначень АОА повинен забезпечувати фізіологічні умови (рН 7) для того, щоб отримані результати величини АОА можна було застосувати до людини. Але, наприклад, екстракти можуть мати різне значення рН, а потенціал системи прямо залежить від кислотності середовища [10, 32]. Отже, для проведення аналізу потрібно застосовувати електроліт, який здатний підтримувати певне рН середовища. Також електроліт повинен мати високу провідність і постійну іонну силу розчину.

Для вибору електроліту було сформульовано такі критерії:

1. буферна ємність повинна бути досить високою;
2. рН середовища має бути близьким до нейтрального;
3. високе значення іонної сили електроліту.

На наш погляд фосфатний буфер з рН 7,2 – 7,4 є оптимальним. В табл. 3.3 наведені значення іонної сили та буферної ємності електроліту, що відповідають сумарній концентрації  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  і  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  фосфатного буфера.

Таблиця 3.3

#### Значення іонної сили та буферної ємності електроліту, що відповідають сумарній концентрації $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ і $\text{K}_2\text{HPO}_4$ фосфатного буфера

№	Молярна концентрація, моль	Іонна сила, моль	Буферна ємність, моль
1	0,005	0,0125	0,0025
2	0,020	0,051	0,096
3	0,025	0,063	0,012
4	0,067	0,168	0,033
5	0,100	0,252	0,048



Фосфатний буфер з концентрацією 0,067 М забезпечує високу іонну силу розчину, а його буферна ємність достатня для компенсації зміщення рН при додаванні кислих зразків до розчину фонового електроліту.

3.2.3 Вибір робочих концентрацій та співвідношення  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $K_4[Fe(CN)_6]$  для визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом

Для вибору оптимальної концентрації та співвідношення  $K_3[Fe(CN)_6]$  і  $K_4[Fe(CN)_6]$  були враховані такі критерії:

1. мінімальна зміна потенціалу системи після додавання досліджуваного зразка має бути не меншою 20 мВ;
2. висока швидкість встановлення рівноваги;
3. потенціал системи має бути стабільним у часі.

Для визначення складу медіаторної системи при аналізі досліджуваних зразків були використані модельні розчини аскорбінової кислоти з концентраціями 1,0 та 8,0 мМ, оскільки аскорбінова кислота вважається одним із найсильніших антиоксидантів. У табл. 3.4 показано, як змінюється потенціал системи при різних співвідношеннях концентрацій  $K_3[Fe(CN)_6]$  і  $K_4[Fe(CN)_6]$  після введення досліджуваних зразків (1,0 та 8,0 мМ аскорбінової кислоти). У системах 1 і 2 мінімальна зміна потенціалу становить більше ніж 20 мВ. Проте окисно-відновний потенціал системи 2 не є стабільним впродовж 30 хвилин. Це може бути пов'язано з тим, що концентрація  $K_4[Fe(CN)_6]$  досить низька для того, щоб потенціал системи був стабільний протягом тривалого часу. Система 1 виявилася більш стабільною у часі, її потенціал не змінювався протягом години і дана медіаторна система була обрана для визначення АОА досліджуваних зразків.

**Залежність потенціалу медіаторної системи з різною концентрацією та співвідношенням  $K_3[Fe(CN)_6]$  і  $K_4[Fe(CN)_6]$  від введення аскорбінової кислоти**

Медіаторна система	$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ , моль	$\Delta E$ , мВ	
		1,0 мМ	8,0 мМ
Система 1	0,002/0,00002	30	60
Система 2	0,001/0,00001	60	140
Система 3	0,1/0,001	5	20
Система 4	0,05/0,001	15	40

**3.3 Дослідження впливу концентрації етанолу при визначенні антиоксидантної активності**

У дослідженнях [86, 160] представлено визначення АОА спиртових екстрактів рослин та грибів потенціометричним методом без урахування впливу етилового спирту на величину АОА. На наш погляд, отримані результати дещо некоректні, оскільки етиловий спирт може бути окислений, що збільшує рівень АОА досліджуваного зразка.

Щоб з'ясувати додатковий вплив етилового спирту на величину АОА, з ряду причин в якості модельної речовини була обрана аскорбінова кислота. По-перше, аскорбінова кислота входить до складу настоянок, наприклад, настоянки з насіння лимонника, по-друге, вона розчинна у воді та етиловому спирті різних концентрацій.

Було приготовлено 5 модельних розчинів аскорбінової кислоти з концентрацією 0,002 М у дистильованій воді та етанолі 20, 40, 60, 96 %. Для оцінки лінійності залежності різниці потенціалу від концентрації етанолу були взяті аліквоти модельних розчинів аскорбінової кислоти - 1,00; 3,00; 5,00; 7,00; 9,00 мл. Аліквоти переносили в електрохімічну комірку і одержували розчини з концентрацією 0,039; 0,11; 0,18; 0,25; 0,31 мМ, відповідно.

У результаті встановлено, що зі збільшенням концентрації етилового спирту в електрохімічній комірці  $\Delta E$  також збільшується (рис. 3.2). У разі спиртових розчинів аскорбінової кислоти спостерігається така сама залежність. Це свідчить про взаємодію етанолу з  $K_3[Fe(CN)_6]$ , що впливає на рівень АОА аскорбінової кислоти.

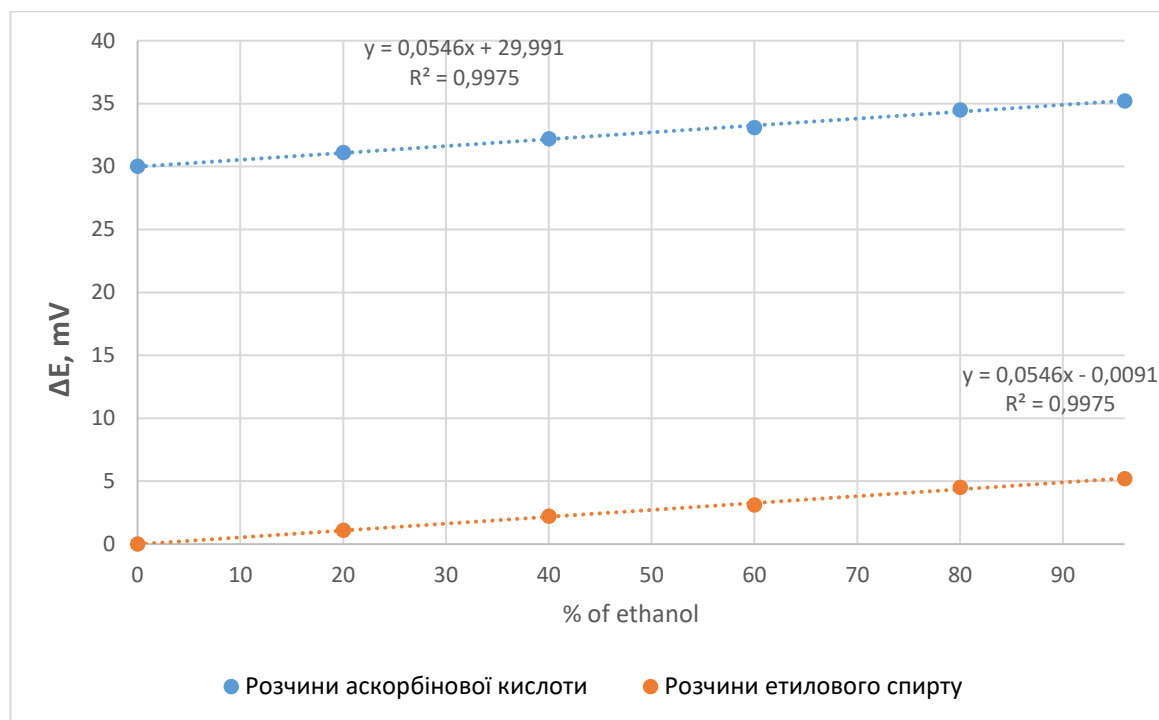


Рис. 3.2 Вплив концентрації етанолу на величину  $\Delta E$  при визначенні АОА етанольних розчинів аскорбінової кислоти

Такий вплив етилового спирту можна пояснити тим, що в структурі його молекули присутня гідроксильна група, яка може окислюватись  $K_3[Fe(CN)_6]$  до альдегідної. Як наслідок, окислення етанолу приводить до додаткового вкладу в значення АОА аскорбінової кислоти. Отже, при визначенні АОА потенціометричним методом, слід враховувати внесок концентрації етилового спирту. Щоб одержати коректне значення АОА, величину загальної зміни потенціалу, яку було визначено під час аналізу зразка слід зменшити на величину потенціалу, відповідну концентрації етилового спирту аналізованого розчину. Згідно результатів проведених досліджень, етанольні розчини мали наступний відсоток вкладу в АОА: 1,85 %, 3,56 %, 4,89 %, 6,76 %, 7,63 % для 20, 40, 60, 80 та 96 % етанолу, відповідно. Найбільший

вплив при визначенні АОА вносить 96 % етанол, найменший – 20 % етанол (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

### Вплив етанолу на рівень АОА розчинів аскорбінової кислоти

	вода	20 % етанол	40 % етанол	60 % етанол	80 % етанол	96 % етанол
ΔE, розчин аскорбінової кислоти, мВ	30	31,1	32,2	33,1	34,5	35,2
ΔE, розчин етанолу, мВ	0	1,1	2,2	3,1	4,5	5,2
АОА аскорбінової кислоти, мМ	3449± 7,42	3515± 10,43	3578± 5,17	3628± 16,39	3700± 17,15	3735± 11,18
АОА розчину етанолу, мМ	0	65,0	127,5	177,5	250,0	285
% доданої АОА	0	1,85	3,56	4,89	6,76	7,63

Для розрахунку АОА досліджуваного зразка (рідкий екстракт, настоянка, індивідуальні речовини, приготовані у водно-спиртових і спирто-водних розчинах) з урахуванням концентрації етилового спирту, слід використовувати рівняння (3.6):

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^6, \quad (3.6)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF/2.3RT};$$

$C_{ox}$  – концентрація  $K_3[Fe(CN)_6]$ , М;

$C_{red}$  – концентрація  $K_4[Fe(CN)_6]$ , М;

ΔE – різниця потенціалів до та після взаємодії АО з медіаторною системою;

$$E_{стан} = 0,0546 \cdot C_{\%} - 0,0091;$$

$C_{\%}$  – концентрація етанолу;

F = 96485,333 Кл/моль - стала Фарадея;

$n = 1$  – кількість електронів у електродній реакції;

$R = 8,314$  Дж/моль · К - універсальна газова стала;

$T = 298$  °К;

$K_{dil}$  – коефіцієнт розведення.

На рис. 3.3 наведено калібрувальні криві залежності величини  $\Delta E$  від концентрації аскорбінової кислоти в діапазоні від 0,039 до 0,31 мМ в різних розчинниках.

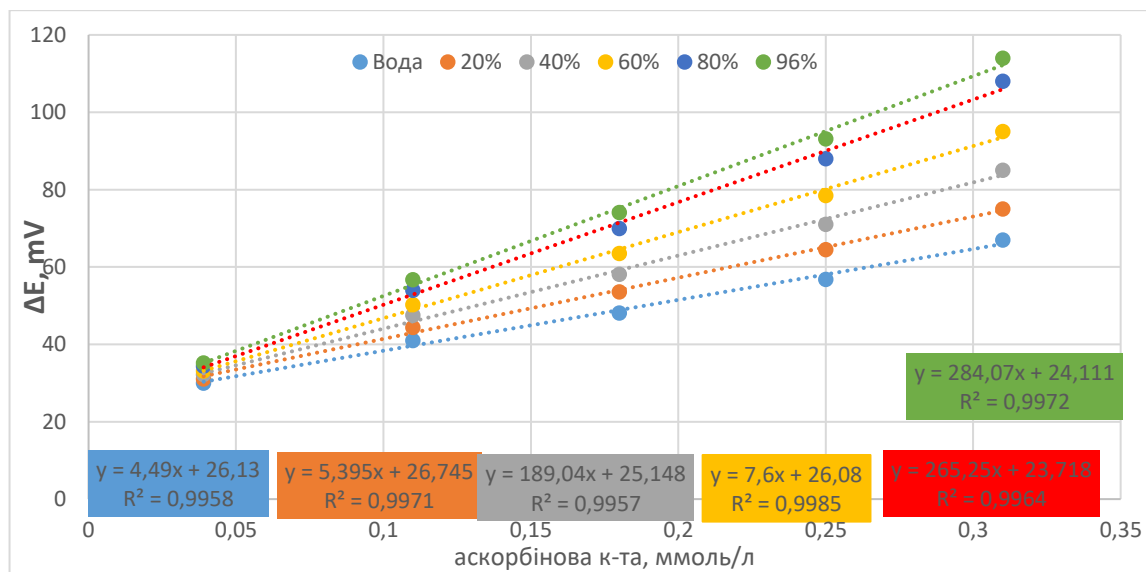


Рис. 3.3 Криві залежності величини  $\Delta E$  від концентрації аскорбінової кислоти у різних розчинниках

Рівняння регресії та  $R^2$  отриманих кривих дорівнюють:

$y = 4,49 \cdot x + 26,13$ ,  $R^2 = 0,9958$  для водного розчину аскорбінової кислоти;

$y = 5,395 \cdot x + 26,745$ ,  $R^2 = 0,9971$  для 20 % етанольного розчину аскорбінової к-ти;

$y = 189,04 \cdot x + 25,148$ ,  $R^2 = 0,9957$  для 40 % етанольного розчину аскорбінової к-ти;

$y = 7,6 \cdot x + 26,08$ ,  $R^2 = 0,9985$  для 60 % етанольного розчину аскорбінової кислоти;

$y = 265,25 \cdot x + 23,718$ ,  $R^2 = 0,9964$  для 80 % етанольного розчину аскорбінової к-ти;

$y = 284,07 \cdot x + 24,111$ ,  $R^2 = 0,9972$  для 96 % етанольного розчину аскорбінової к-ти.

Таким чином доведено пряму лінійну залежність між  $\Delta E$  потенціалу в електрохімічній комірці та концентрацією аскорбінової кислоти у різних розчинниках.

### 3.4 Розробка та валідація потенціометричної методики визначення антиоксидантної активності епігалокатехін-3-О-галлату

Потенціометричний метод визначення антиоксидантної активності ґрунтується на вимірюванні зміни потенціалу в медіаторній системі  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  внаслідок її взаємодії з антиоксидантами. На відміну від спектрофотометричних методів, потенціометрично можна проводити аналіз каламутних та забарвлених розчинів.

Валідація розробленої потенціометричної методики визначення антиоксидантної активності ЕГКГ була проведена відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) за такими параметрами: лінійність, правильність, збіжність, проміжна прецизійність [222].

Для приготування модельного розчину з концентрацією 0,05 моль/л, 1,1450 г ЕГКГ поміщали в мірну колбу на 50,00 мл, розчиняли в 96 % етанолі та доводили до мітки тим же розчинником. Аліквоти модельного розчину переносили в мірні колби на 50,00 мл і доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Одержували розчини з концентрацією ЕГКГ 0,002; 0,006; 0,01; 0,014; 0,02 моль/л.

Лінійність методики була підтверджена в діапазоні концентрацій від 0,001 до 0,005 моль/л. Рівняння регресії кривої має такий вигляд:  $y = 9,2299 \cdot x + 32,828$ , значення коефіцієнта кореляції ( $R^2$ ) дорівнює 0,9992 (рис. 3.4).

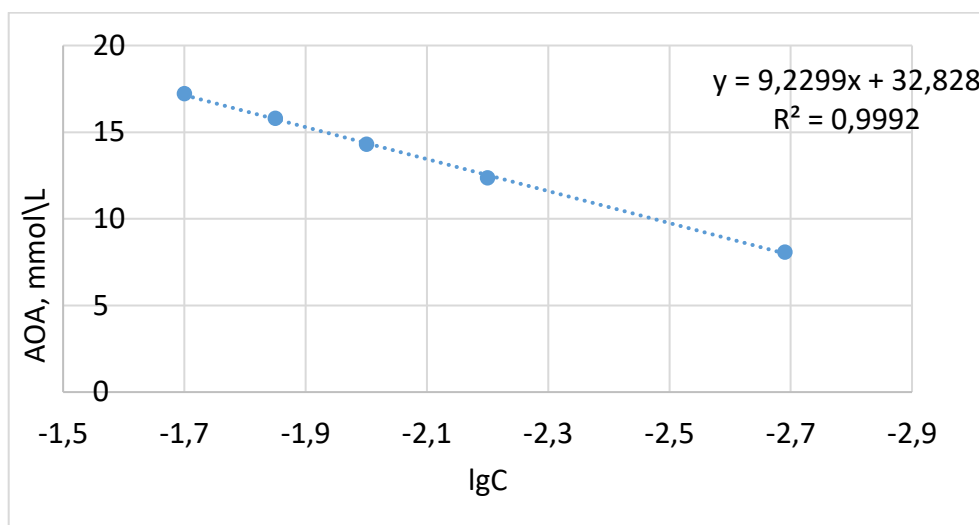


Рис. 3.4 Калібрувальна крива залежності антиоксидантної активності ЕГКГ від логарифма концентрації

Правильність методики оцінювали за відсотком відновлення. Встановлено, що відсоток відновлення знаходиться в діапазоні від 96,01 % до 101,61 % і не перевищує діапазон відновлення 95-105% (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Результати визначення правильності потенціометричної методики встановлення антиоксидантної активності ЕГКГ**

АО	АОА, ммоль-екв./л	Кількість доданого ЕГКГ, ммоль-екв./л	Сумарна АОА (C <sub>1</sub> ), ммоль-екв./л	Знайдено (C <sub>2</sub> ), ммоль-екв./л	Відсоток відновлення $R = \frac{C_2}{C_1} \cdot 100\%$
ЕГКГ	14,27	7,14	21,41	21,38	99,86
				21,50	101,42
				21,72	101,45
	14,27	14,27	28,54	29,00	101,61
				28,30	99,16
				28,00	99,11
	14,27	28,54	42,81	43,00	100,45
				42,00	98,11
				41,10	96,01

Прецизійність методики була підтверджена збіжністю (табл. 3.7) та проміжною прецизійністю (табл. 3.8).

Таблиця 3.7

**Результати встановлення збіжності потенціометричної методики визначення антиоксидантної активності ЕГКГ**

Досліджуваний зразок	АОА ЕГКГ, ммоль-екв./л
1	14,30
2	14,25
3	14,00
4	14,80
5	14,50
6	14,35
Середнє значення, ммоль-екв./л	14,37
SD	0,26771
Довірчий інтервал, (P=95%), ммоль-екв./л	0,28
RSD, %	1,86

Значення % RSD для збіжності та проміжної прецизійності склали 1,86 % і 1,34 %, відповідно були менше 2 %, що доводить точність методики.

Таблиця 3.8

**Результати встановлення проміжної прецизійності потенціометричної методики визначення антиоксидантної активності ЕГКГ**

Досліджуваний зразок	ЕГКГ	
	Перший день	Другий день
1	14,35	14,65
2	14,27	14,15
3	14,50	14,17
4	14,20	14,20
5	14,60	14,30
6	14,10	14,45
Середнє значення, ммоль-екв./л	14,37	14,32
SD	0,18726	0,19596
Довірчий інтервал, (P=95%), ммоль-екв./л	0,20	0,21
RSD, %	1,34	RSD, %

### 3.5 Дослідження антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю

При погіршенні екологічної обстановки, зниженні вмісту поживних речовин в продуктах харчування та збільшенні негативного впливу життя в стресових умовах сучасного мегаполісу, інтерес до антиоксидантів невідпинно зростає. Антиоксиданти пригнічують окислювальні процеси і беруть участь у системі захисного механізму людського організму, основним завданням якого є боротьба з патологіями та захворюваннями, що пов'язані з атакою вільних радикалів та реактивного кисню. Антиоксиданти відіграють важливу роль у профілактиці та лікуванні багатьох захворювань, поліпшенні здоров'я людини та збільшенні тривалості життя [9].

На ринку з'являється велика кількість дієтичних добавок, виробники яких заявляють про їх антиоксидантні властивості. Спостерігається досить високий попит і на дієтичні добавки з екстрактом зеленого чаю через високі значення його АОА



завдяки присутності в рослині флавоон-3-олів або катехинів [128, 214], які є найбільш сильним відновником серед флавоноїдів і мають найбільший антиоксидантний потенціал [6].

Однак на сьогоднішній день відсутні нормативні документи, в яких би використовувався універсальний метод для визначення та оцінки рівня АОА таких об'єктів, як дієтичні добавки, лікарські препарати, косметичні продукти. Також відсутні конкретні умовні терміни для оцінки рівня АОА.

АОА дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю визначали за методикою, наведеною у розділі 2.

Рівень АОА «Green Tea Extract» був досить високим і складав  $36,51 \pm 0,46$  ммоль/таб.; «Екстракту зеленого чаю» і «Зеленого чаю» (Pharmacom, Україна) -  $29,78 \pm 0,35$  ммоль/таб. та  $16,67 \pm 0,29$  ммоль/таб. відповідно. Також значення АОА дієтичних добавок були розраховані в ммоль-екв./г, щоб класифікувати їх за запропонованими нами умовними термінами. В цьому випадку антиоксидантна активність «Green Tea Extract» склала  $205,00 \pm 4,10$  ммоль-екв./г, «Екстракту зеленого чаю» і «Зеленого чаю» (Pharmacom, Україна) -  $104,10 \pm 2,08$  ммоль-екв./г  $60,05 \pm 1,20$  ммоль-екв./г. відповідно.

Нами запропоновано умовні терміни, що виражають АОА досліджуваних зразків. Епігалокатехин-3-О-галат був обраний як «золотий» стандарт для створення таких термінів через те, що ЕГКГ має найвищу здатність інактивувати вільні радикали [6, 181].

Для розробки термінів було визначено рівні АОА для наступних концентрацій ЕГКГ: 0,5; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 і 0,00001 моль/л (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

#### Антиоксидантна активність ЕГКГ в різних концентраціях

Концентрація ЕГКГ, моль/л	АОА, ммоль-екв./г
0,5	$430,87 \pm 8,62$
0,1	$86,12 \pm 1,72$
0,01	$21,54 \pm 0,43$
0,001	$5,47 \pm 0,11$
0,0001	$0,67 \pm 0,01$
0,00001	$0,38 \pm 0,01$

Відповідно до одержаних результатів, запропоновано шість термінів (табл. 3.10).

Ці терміни в подальшому можуть бути використані для оцінки антиоксидантної активності продуктів фармацевтичної, харчової та косметологічної промисловості.

*Таблиця 3.10*

**Терміни, що виражають рівень антиоксидантної активності**

<b>Термін</b>	<b>АОА, ммоль-екв./г</b>	<b>ЕГКГ, мг</b>
Дуже високий	більше 430,87	більше 230
Високий	від 86,12 до 430,87	від 45,97 до 230
Середній	від 21,54 до 86,12	від 11,50 до 45,97
Нижче середнього	від 5,47 до 21,54	від 2,92 до 11,50
Низький	від 0,67 до 5,47	від 0,36 до 2,92
Дуже низький	від 0,38 до 0,67	від 0,20 до 0,36
Відсутня	нижче 0,38	нижче 0,20

На сьогодні визначені норми добової потреби в вітамінах, мінеральних речовинах, інших БАП, залежно від статі, віку, групи фізичної активності людини. В доступних нам наукометричних базах Science Direct і Web of Science не було знайдено публікацій щодо встановлення таких норм відносно речовин, які виявляють АОА. Тому нами запропоновано підхід щодо вирішення цього питання. Добре відомо, що ЕГКГ є одним з найсильніших антиоксидантів [91, 172, 195], тому він був обраний нами як стандарт-антиоксидант. «Регламентом (ЄС) 2017/2470 від 20 листопада 2017 р про список нових продуктів харчування» [197], встановлено, що максимальна допустима рекомендована добова доза ЕГКГ у вигляді очищеного екстракту становить 300 мг, а максимальна доза на одну порцію – 150 мг. За розробленою нами методикою (розділ 2) було досліджено антиоксидантну активність ЕГКГ в дозі 300 мг. Згідно з отриманими результатами вона становить 562 ммоль-екв./г.

**Висновки до розділу 3**

1. Вперше обґрунтовано доцільність і умови визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом. Оптимальним робочим електродом обрано

платиновий, електролітом – 0,067 моль/л фосфатний буфер з рН = 7,2 – 7,6, співвідношенням  $K_3[Fe(CN)_6]$  і  $K_4[Fe(CN)_6]$  – 0,002/0,00002 моль/л.

2. Вперше досліджено вплив концентрації етанолу при визначенні рівня сумарної антиоксидантної активності. Розроблено підхід і запропоновано рівняння для розрахунку АОА з урахуванням зазначеного впливу.
3. Вперше розроблена потенціометрична методика визначення антиоксидантної активності епігалокатехіну-3-О-галату, проведена її валідація за показниками: лінійність, правильність, збіжність і проміжна прецизійність.
4. Вперше за розробленою методикою визначено антиоксидантну активність дієтичних добавок: «Green Tea Extract» (Source Naturals, США) – 205,00 ммоль-екв./г, «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна) – 104,10 ммоль-екв./г, «Зелений чай» (Pharmacom, Україна) – 60,05 ммоль-екв./г.
5. Вперше запропоновані терміни, що виражають рівень антиоксидантної активності.
6. Вперше потенціометричним методом встановлено антиоксидантну активність максимальної допустимої рекомендованої добової дози ЕГКГ – 562 ммоль-екв./г.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу приведені в таких публікаціях:*

1. The study of the effect of ethyl alcohol concentrations on the antioxidant activity of ascorbic acid solutions / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, S.V. Ponomarenko, E.Y. Akhmedov, Z.V. Shovkova. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 74. P. 44-47. DOI: 10.24959/ophcj.21.231947.
2. Study and evaluation antioxidant activity of dietary supplements with green tea extract / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, V.I. Stepanenko. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 2. P. 215-219. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306
3. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю. *Modern approach of experimental and*

*preclinical pharmacology*: матеріали міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 131.

4. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Komisarenko M.A., Kolisnyk Y.S. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate. *Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates* : 4th International Scientific and Practical Internet Conference, Dnipro, 15–16 August 2022. Dnipro: Way of Science, 2022. P. 33–34.

## РОЗДІЛ 4

### ВИВЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БАР В ЛИСТІ ЗЕЛЕНОГО ЧАЮ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ НА ЙОГО ОСНОВІ

#### 4.1 Відповідність сировини листя зеленого чаю вимогам Європейської Фармакопеї 9.0

Для розробки дієтичної добавки з антиоксидантною активністю на відповідність вимогам Європейської Фармакопеї 9.0 були визначені такі показники листя зеленого чаю: опис, ідентифікація А, В, С (макроскопія, мікроскопія, тонкошарова хроматографія), випробовування - втрата в масі при висушуванні, загальна зола, вміст кофеїну та катехінів (див. табл. 4.1) [127].

Проведеним аналізом зразків досліджуваного листя зеленого чаю, було встановлено, що вони відповідають вимогам монографії Європейської Фармакопеї 9.0. Таким чином, дану сировину можна використовувати для розробки та одержання дієтичних добавок та фітопрепаратів.

#### 4.2 Ідентифікація основних груп БАР у листі зеленого чаю та дієтичних добавках на основі його екстракту

Методика ідентифікації катехінів наведена у розділі 2. Результати ТШХ-аналізу показали, що листя зеленого чаю та всі досліджувані дієтичні добавки містять катехіни, які виявлені за синьо-фіолетовими смугами у видимому світлі. Також при проявленні хроматограм 1 % розчином ваніліну в хлористоводневій кислоті проявлялися червоні смуги, перша з яких відповідає епігалокатехін-3-О-галату ( $R_f \sim 0,45$ ), друга смуга – епікатехіну ( $R_f \sim 0,61$ ) [44].

Кофеїн в досліджуваних дієтичних добавках міститься в слідових кількостях, на хроматограмі спостерігалась лише смуга стандартного розчину кофеїну з величиною  $R_f \sim 0,43$ . В той самий час, в сировині листя зеленого чаю кофеїн було ідентифіковано.

**Результати аналізу листя зеленого чаю на відповідність вимогам  
Європейської Фармакопеї 9.0**

Показ-ник	Нормування за ЄФ 9.0	Результати аналізу
1	2	3
Опис	Молоді, не ферментовані листя <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze швидко стабілізовані короткочасним нагріванням, а потім висушені.	✓
Характеристика	Черешок видалений, згорнутий і часто складений або скручений, цілий або розрізаний перед скручуванням	✓
Ідентифікація		
Макроскопія	Лист овальний, видовжений і гострокінцевий. Починаючи з чверті відстані від основи край пильчастий, з зубцями незвичайної форми з невеликим чорнуватим вістрям, вигнутим у формі кігтя. Вторинні жилки відгалужуються від серединної жилки, вигинаючись біля країв пластинки так, що вони анастомозують дугою. На нижній поверхні листя густо розміщуються хвилясті, конічні, покривні трихоми.	✓
Мікроскопія	Порошок зеленувато-сірий. Дослідження проводили у розчині хлоралгідрату. Порошок показує такі діагностичні ознаки: численні фрагменти одноклітинних, хвилястих, товстостінних покривних трихом; фрагменти абаксіального епідермісу (вид з поверхні А) складається з клітин зі злегка хвилястими стінками, численними аномоцитними продихами, оточеними 3 або 4 вузькими біляпродиховими клітинами та довгими, хвилястими, товстостінними одноклітинними криючими трихомами, загостреними на верхівці; фрагменти адаксіального епідермісу (вид з поверхні), що складається з клітин з жорсткими, слабо потовщеними стінками, що супроводжуються клітинами палісадної паренхіми, а іноді є склереїди; численні ізольовані склереїди, часто дуже розгалужені, з товстими стінками та чіткими каналами; фрагменти пластинки (поперечний розріз), видно, що адаксіальний епідерміс вкритий гладкою кутикулою, палісадна паренхіма 2-шарова, губчаста паренхіма включає клітини, що містять зростки кристалів оксалату кальцію, та абаксіальний епідерміс з продихами; фрагменти спіральних судин (продольний розріз), супроводжувані губчастою паренхімою з деякими клітинами, що містять кластери кристалів оксалату кальцію; судини головних жилок оточені здеревілими волокнами.	✓
ТШХ	На хроматограмі випробовуваного розчину повинні виявлятися дві червоні зони, які відповідають епікатехіну і епігалокатехін галату	✓ (На хроматограмі виявлені дві червоні плями епікатехіну з $R_f \sim 0,61$ та епігалокатехін галату з $R_f \sim 0,45$ )
Випробовування		
Втрата в масі при висушуванні	не більше 8,0 %	✓ (6,2 ± 0,12 %)

1	2	3
Загальна зола	не більше 9,0 %	✓ (6,5 ± 0,13 %)
Вміст катехинів	не менше 8,5 %	✓ (20,78 ± 0,52 %)
Вміст кофеїну	не менше 1,5 %	✓ (2,56 ± 0,06 %)

Примітка. «✓» - відповідає параметру, «-» - не відповідає параметру

Для остаточного визначення його наявності використовували розчин йоду в КІ; після проявлення виявлялась коричнева смуга стандартного розчину кофеїну та слідові кількості кофеїну в дієтичних добавках, а в сировині зеленого чаю визначені кофеїн ( $R_f \sim 0,43$ ) та теобромін ( $R_f \sim 0,50$ ).

У листі зеленого чаю були ідентифіковані рутин ( $R_f \sim 0,58$ ) і хлорогенова кислота ( $R_f \sim 0,65$ ). Флавоноїди та гідроксикоричні кислоти не виявлені у дієтичних добавках, на хроматограмах спостерігались лише смуги стандартних розчинів ДСЗ рутину і хлорогенової кислоти.

Методика ідентифікації органічних кислот наведена у розділі 2. У листі зеленого чаю було ідентифіковано лимонну ( $R_f \sim 0,39$ ), бурштинову ( $R_f \sim 0,93$ ) і оксалатну ( $R_f \sim 0,14$ ) кислоти.

За результатами ТШХ-аналізу всі досліджувані дієтичні добавки містять епігалокатехін-3-О-галат і епікатехін, а кофеїн міститься лише в слідових кількостях; флавоноїди та гідроксикоричні кислоти не визначені. В свою чергу, в листі зеленого чаю були ідентифіковані катехіни, кофеїн, теобромін, рутин і хлорогенова кислота.

#### 4.3 Кількісне визначення основних груп БАР у зеленому чаї

Хімічний склад зеленого чаю представлений різними групами БАР, основними з яких є фенольні сполуки, флавоноїди, катехіни, гідроксикоричні кислоти,

органічні кислоти та алкалоїди. Кількісний вміст основних груп біологічних активних речовин в листі зеленого чаю визначений нами спектрофотометричним методом. Результати представлені в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

**Кількісний вміст основних груп біологічних активних речовин  
у листі зеленого чаю**

<b>Кількісний вміст в сухій сировині, %</b>				
Сума фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту)	Сума катехинів (у перерахунку на епігалокатехин галат)	Сума флавоноїдів (у перерахунку на рутин)	Сума гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту)	Кофеїн
24,12±1,20	20,79±1,03	1,27±0,03	0,67±0,02	2,56±0,08

Встановлено, що в сухій сировині кількісний вміст фенольних сполук становить 24,12±1,20 %, а катехинів – 20,79±1,03 % - тобто 86,19 % від загального вмісту цієї групи БАР. Флавоноїдів (1,27 %) та гідроксикоричних кислот (0,67 %) значно менше, у відсотковому відношенні до фенольних сполук їх міститься 5,27 і 2,78 % відповідно.

Вміст кофеїну у сухій сировині встановлений на рівні 2,56±0,08 %. Таким чином, при порівнянні кількісного вмісту основних груп БАР встановлено, що відносно флавоноїдів та гідроксикоричних кислот превалює кофеїн.

#### **4.4 Дослідження фенольних сполук у листі зеленого чаю методом ВЕРХ**

Для дослідження фенольних сполук у листі зеленого чаю проведено їх вивчення методом ВЕРХ за допомогою рідинної хроматографічної системи Prominence LC20 Shimadzu (Японія), колонка Thermo Scientific Synchronis aQ C18 column (4.6 × 250), в умовах, наведених у розділі 2.

Екстракцію проводили методом мацерації. До наважки зразка додавали 60 % етанол у співвідношенні «сировина : екстрагент» 1:20. Вилучення проводили двічі у герметичній ємності протягом 1 доби за кімнатної температури при періодичному



перемішуванні. Екстракцію проводили без доступу світла для запобігання окислення фенольних сполук. Результати дослідження фенольних сполук у листі зеленого чаю представлені в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

## Дослідження фенольних сполук у листі зеленого чаю

Пік, №	Сполука	Індекс подібності, $I_L$	Час утр., хв
1	галова кислота	0,826	8,815
2	епігалокатехін	0,875	13,013
3	катехін	0,996	13,780
4	гесперидин	0,921	14,850
5	епікатехін	0,851	16,494
6	епігалокатехін галат	0,990	17,686
7	епікатехін галат	0,814	20,754
8	апігенін-8-С-глікозид	0,816	22,295
9	мірицетин-3-О-глікозид	0,859	24,372
10	кофейна кислота	0,863	25,801
11	кемпферол-7-О-глікозид	0,988	27,275
12	кверцетин-3-О-рутинозид	0,943	29,915
13	лютеолін-6-С-глікозид	0,888	33,147
14	корична кислота	0,527	40,327
15	кверцетин	0,760	40,727
16	нарінгенін	0,725	40,977
17	гесперітин	0,928	41,788
18	ферулова кислота	0,793	45,681

Примітки: час утрим. – середній час утримування речовини для чотирьох довжин хвиль (225, 255, 286 і 350 нм); індекс подібності,  $I_L$  – схожість між речовиною і стандартом за спектральними характеристиками; ідентифікація – стандарт, до якого речовина виявляє найбільшу схожість.

Виявлено 18 піків, які проаналізовано за показниками подібності до стандартів (рис. 4.1 - 4.4).

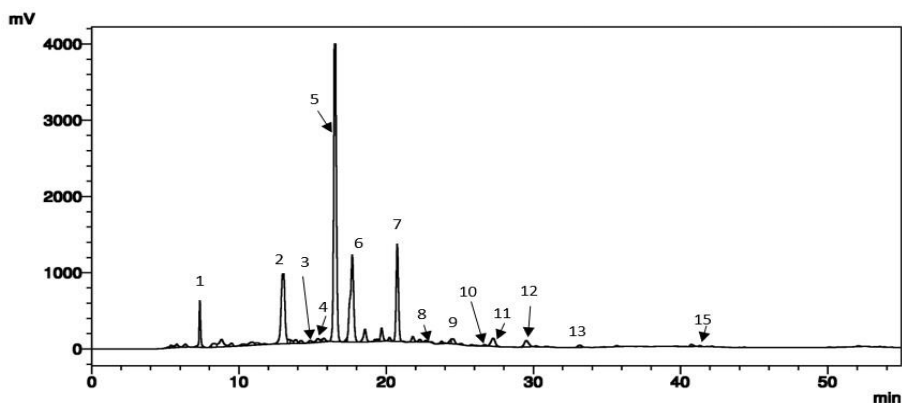


Рис. 4.1 Хроматограма визначення фенольних сполук у листі зеленого чаю за довжини хвилі 225 нм

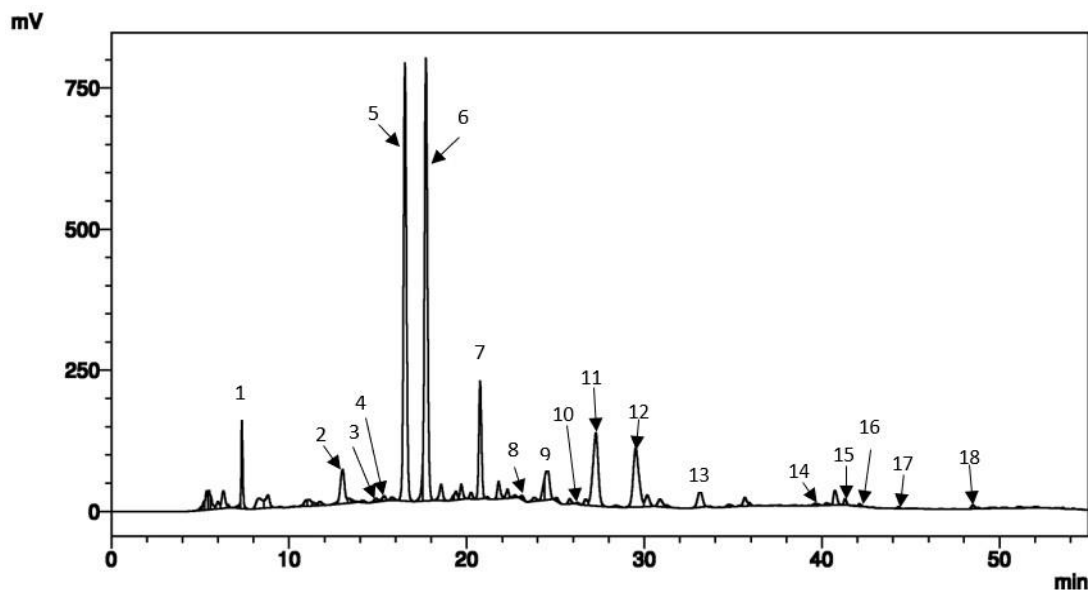


Рис. 4.2 Хроматограма визначення фенольних сполук у листі зеленого чаю за довжини хвилі 255 нм

Сумарний вміст фенольних сполук у сухій сировині становив 23,51 %, з них флаван-3-олів (катехінів) – 20,56 % (87,37 % від суми поліфенолів), флавонолів – 1,34 % (5,69 % від суми поліфенолів), флавононів – 0,25 % (1,06 % від суми поліфенолів), флавонів – 0,64 % (2,72 % від суми поліфенолів) та фенолкарбонових кислот – 1,39 % (5,91 % від суми поліфенолів).

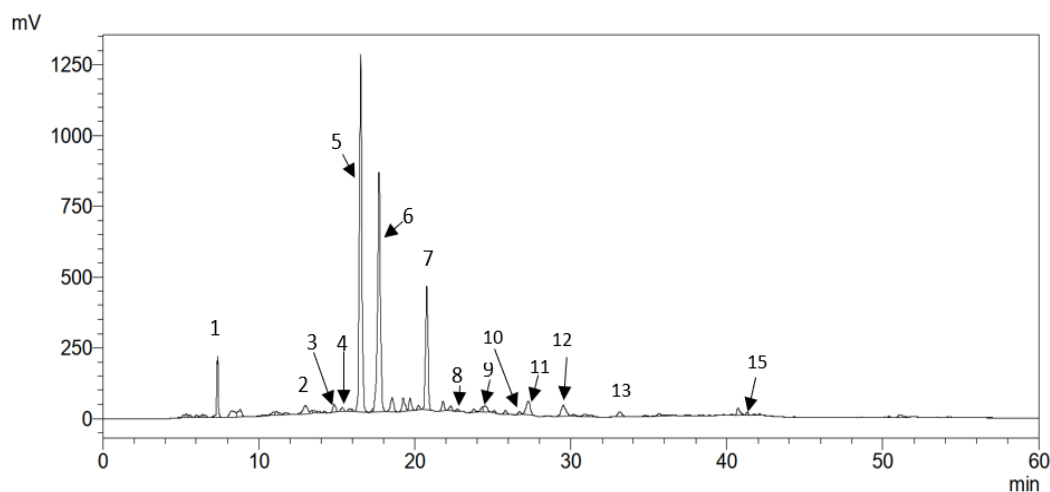


Рис. 4.3 Хроматограма визначення фенольних сполук у листі зеленого чаю за довжини хвилі 286 нм

Серед флаван-3-олів превалюють епікатехін галат – 4,12 % (17,52 % від суми поліфенолів), епікатехін – 2,95 % (12,55 % від суми поліфенолів), епігалокатехін галат – 9,85 % (41,90 % від суми поліфенолів). Катехіну – 0,61 % (2,59 % від суми поліфенолів) та епігалокатехіну – 4,03 % (17,14 % від суми поліфенолів) значно менше. На підставі високих показників подібності до стандартних речовин I<sub>T</sub> і I<sub>L</sub> було ідентифіковано 4 флаваноли: кверцетин-3-О-рутинозид – 0,16 % (0,68 % від суми поліфенолів), кемпферол-7-О-глікозид – 0,51 % (0,55 % від суми поліфенолів), кверцетин – 0,16 % (0,68 % від суми поліфенолів), мірицетин-3-О-глікозид – 0,22 % (0,94 % від суми поліфенолів); 3 флаванони: нарінгенін – 0,02 % (0,09 % від суми поліфенолів), гесперидин – 0,19 % (0,81 % від суми поліфенолів), гесперітин – 0,04 % (0,17 % від суми поліфенолів); 2 флаволи: лютеолін-6-С-глікозид – 0,33 % (1,40 % від суми поліфенолів), апігенін-8-С-глікозид – 0,31 % (1,31 % від суми поліфенолів).

Фенольні кислоти були представлені галовою – 0,21 % (0,89 % від суми поліфенолів), кофейною – 1,16 % (4,93 % від суми поліфенолів), коричною – 0,01 % (0,04% від суми поліфенолів), феруловою – 0,01 % (0,04 % від суми поліфенолів) кислотами.

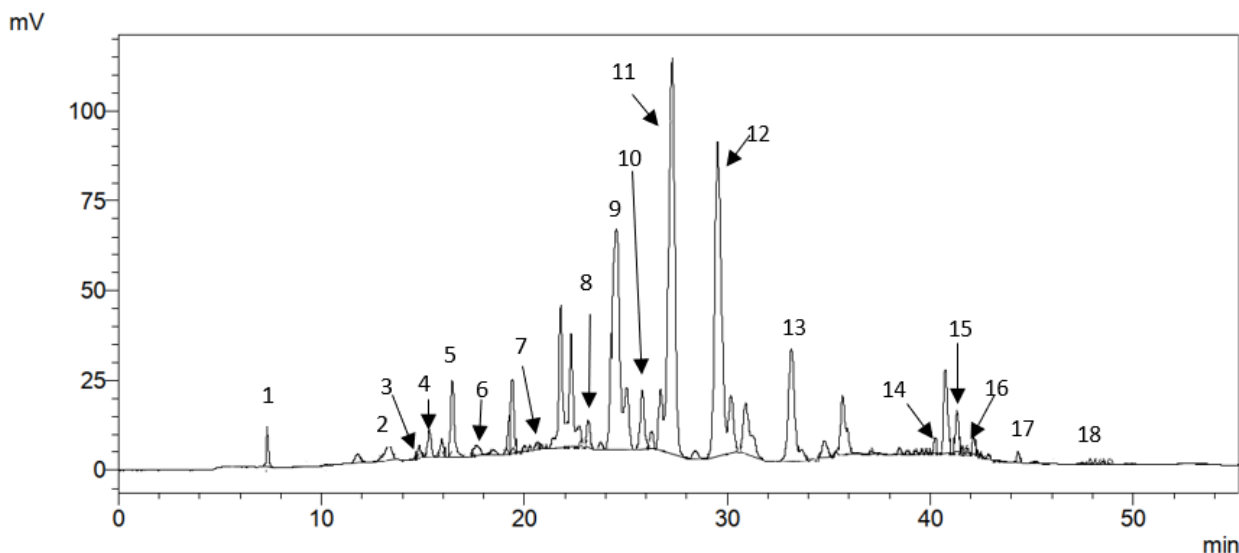


Рис. 4.4 Хроматограма визначення фенольних сполук у листі зеленого чаю за довжини хвилі 350 нм

Узагальнені дані визначення кількісного вмісту фенольних сполук у листі зеленого чаю представлені в табл. 4.4.

**Результати дослідження кількісного вмісту фенольних сполук  
у листі зеленого чаю**

Група поліфенолів	Вміст в сухій сировині, %	Використані стандарти	Вміст у сухій сировині, %
Флавоноли	1,34	кверцетин-3-О-рутинозид	0,16±0,01
		кемпферол-7-О-глікозид	0,13±0,01
		кверцетин	0,16±0,01
		мірицетин-3-О-глікозид	0,22±0,03
Флаванони	0,25	нарінгенін	0,02±0,001
		гесперидин	0,19±0,01
		гесперітин	0,04±0,001
Флаволи	0,64	лютеолін-6-С-глікозид	0,33±0,01
		апігенін-8-С-глікозид	0,31±0,01
Флаван-3-оли	20,56	епігалокатехін-3-О-галат	9,85±0,11
		епікатехін	2,95±0,04
		катехін	0,61±0,01
		епігалокатехін	4,03±0,10
		епікатехін галат	4,12±0,10
Фенолкарбонові кислоти	1,39	галова кислота	0,21±0,05
		кофейна кислота	1,16±0,01
		корична кислота	0,01±0,01
		ферулова кислота	0,01±0,01
Сума поліфенолів	23,51		

#### **4.5 Розробка та валідація методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю**

Окрім основних груп БАР – фенольних кислот, поліфенольних сполук, алкалоїдів, зелений чай містить амінокислоти, жири, а також органічні кислоти [213]. Органічні кислоти - це аліфатичні або ароматичні сполуки, які характеризуються наявністю в їх молекулах карбоксильних груп [106]. Вони важливі для перетікання біологічних процесів, оскільки беруть участь в метаболізмі та катаболізмі рослин і тварин як проміжні або кінцеві продукти, відіграючи ключову роль у циклі лимонної кислоти або циклі Кребса [192].

Органічні кислоти виявляють антиоксидантну, протизапальну, антимикробну та імуномодулюючу активність; створюють сприятливі умови для життєдіяльності корисних кишкових мікроорганізмів [113, 196, 209, 207, 212].

У розділі 1 показано, що зелений чай містить оксалатну (0,3–1,5 %), хінну (0,07–1,0 %), лимонну (0,2 %), бурштинову (0,25 %) і яблучну кислоти (0,25 %).

Відомо, що оксалатна кислота може сприяти утворенню каменів у нирках [118], проте підтверджено, що чай захищає від утворення каміння в нирках завдяки його антиоксидантним властивостям [101, 209].

Органічні кислоти визначають методами іонної хроматографії, капілярного електрофорезу, газової хроматографії та хромато-мас-спектрометрії [120, 175, 180, 203]. Пошук останніх публікацій у Pubmed і ScienceDirect показав, що титриметричний метод не використовується для кількісного визначення цієї групи БАР у листі зеленого чаю. З огляду на це, нами була розроблена алкаліметрична методика кількісного визначення суми вільних органічних кислот в листі зеленого чаю з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності.

Для визначення оптимальних умов екстракції органічних кислот з сировини, оцінювали вплив таких факторів: співвідношення «сировина:екстрагент», температура, кількість та тривалість часу екстракції (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Вплив різних факторів на повноту вилучення вільних органічних кислот із листя зеленого чаю**

Співвідношення «сировина:екстрагент»	Температура, °С	Число екстракцій	Час екстракції, хв	Кількісний вміст суми органічних кислот, %
співвідношення «сировина:екстрагент»				
1:20	100	1	30	1,48±0,07
1:30				1,32±0,11
1:50				1,18±0,06
1:90				1,05±0,10
температура				
1:20	20	1	30	1,19±0,06
	40			1,24±0,13
	60			1,30±0,07
	80			1,40±0,22
	100			1,45±0,15
кількість екстракцій				
1:20	100	1	30	1,50±0,11
		2		1,57±0,10
		3		1,56±0,07
		4		1,55±0,09
час екстракції				
1:20	100	2	30	1,57±0,06
			60	1,64±0,06
			90	1,75±0,10
			120	1,81±0,04

Встановлено, що найбільш повне вилучення органічних кислот з листя зеленого чаю може бути досягнуто за 2 цикли екстракції при 100 °С зі співвідношенням «сировина:екстрагент» 1:20 протягом 120 хв.

За розробленою нами методикою (розділ 2) вміст суми органічних кислот в листі зеленого чаю визначений на рівні  $1,83 \pm 0,03$  % (рис. 4.5).

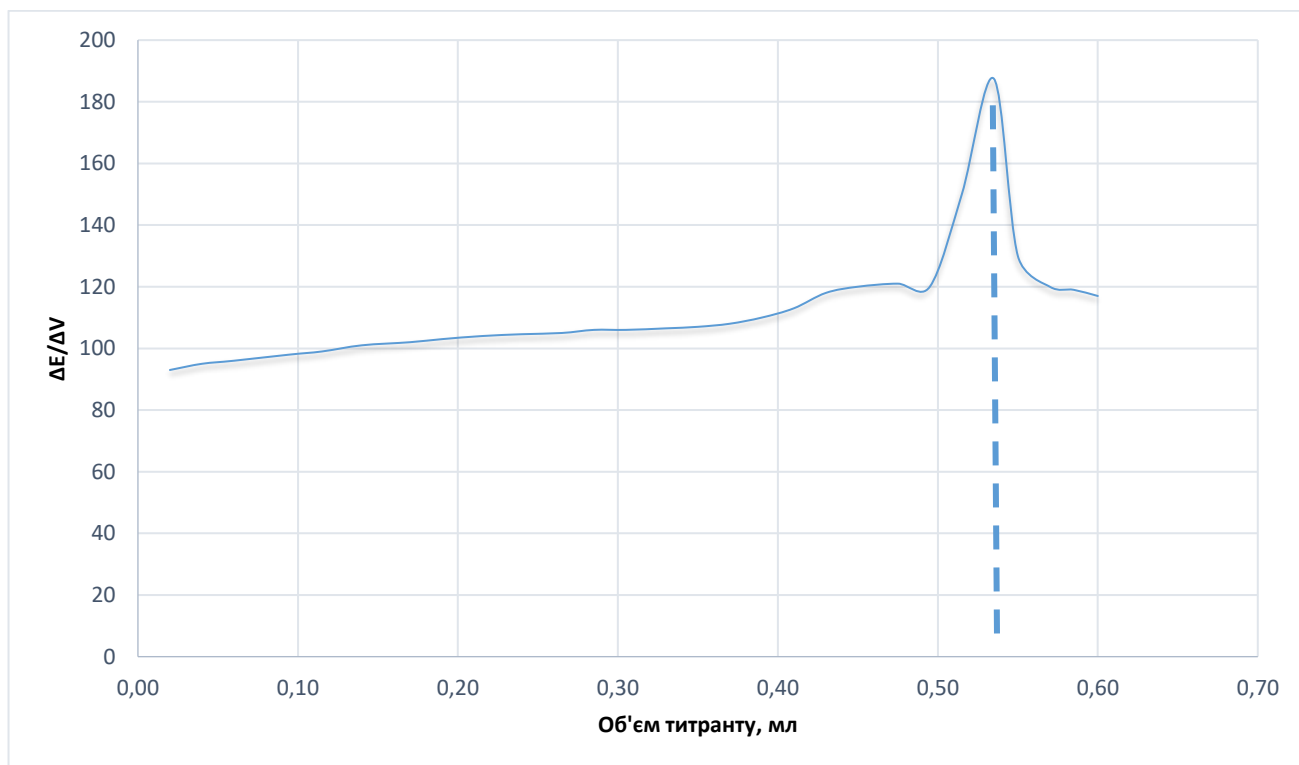


Рис. 4.5 Крива титрування суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю

Валідація алкаліметричної методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності у листі зеленого чаю була проведена відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) [222]. Запропонована методика була підтверджена за такими параметрами: специфічність, правильність, лінійність, збіжність, проміжна прецизійність, стабільність.

Специфічність методики визначалась потенціометричним титруванням розчинника. Встановлено, що розчинник, який використовується для підготовки зразків та ймовірні домішки не впливають на результат визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Результати визначення специфічності методики визначення суми  
вільних органічних кислот у листі зеленого чаю**

<b>V<sub>титранту</sub>, мл</b>	<b>Вміст органічних кислот, %</b>	<b>Статистичний аналіз</b>
Холостий дослід (титрування дистильованої води)		
0,03	0,05	0,05±0,02 % s <sub>x</sub> = 0,0048
0,02	0,04	
0,03	0,05	
0,02	0,04	
0,03	0,05	
Результати титрування органічних кислот		
0,57	1,83	1,83±0,04 % s <sub>x</sub> = 0,0049
0,56	1,82	
0,57	1,83	
0,56	1,82	
0,57	1,83	

Примітки: n = 5, P = 95 %

Лінійність методики вивчалася на 9 рівнях концентрації (60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 %) від теоретичного вмісту суми вільних органічних кислот. Сировину листя зеленого чаю 0,8; 1,2; 1,6; 1,8; 2,0; 2,4; 3,2; 3,6; 4,0 г (точна наважка) екстрагували відповідно до розробленої методики і в одержаних розчинах визначали кількісний вміст суми вільних органічних кислот (у перерахунку на лимонну кислоту, %). Згідно з вимогам ІСН значення коефіцієнта кореляції для лінійності аналітичної методики визначення кількісного вмісту активної речовини має бути  $\geq 0,999$ . Лінійність була доведена в діапазоні концентрацій від 0,72 до 3,75 %. Графік залежності еквівалентного об'єму титранту від концентрації вільних органічних кислот наведено на рис. 4.6. Рівняння регресії кривої має вигляд:  $y = 0,2834 \cdot x + 0,0164$ . Значення коефіцієнта кореляції ( $R^2$ ) дорівнює 0,9991.

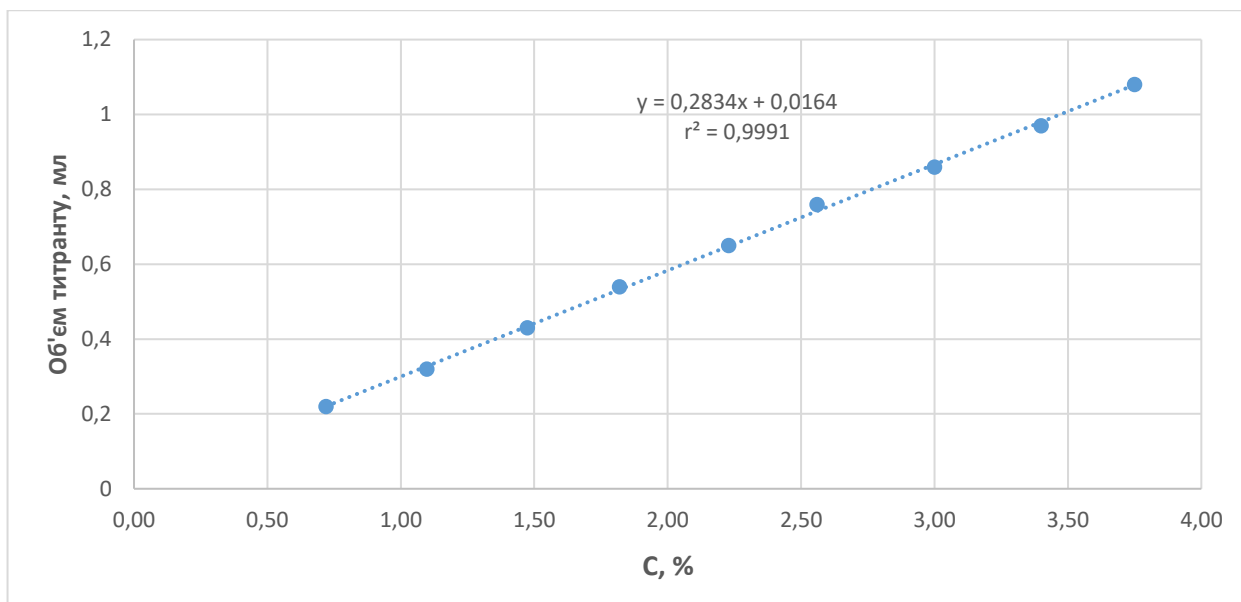


Рис. 4.6 Графік залежності еквівалентного об'єму титранту від концентрації вільних органічних кислот в листі зеленого чаю

Правильність методики перевірена за методом добавок при триразовому аналізі трьох рівнів концентрації органічних кислот, що відповідають 40, 60, 80 % від робочої концентрації органічних кислот. Стандартний розчин, приготований з 0,076 г (точна наважка) лимонної кислоти поміщали в мірну колбу місткістю 200,00 мл і доводили об'єм розчину водою очищеною до мітки. Аліквоти стандартного розчину (2,00, 3,00, 4,00 мл) поміщали в мірні колби місткістю 100,00 мл, додавали 5,00 мл досліджуваного витягу, потім дистильовану воду і титрували приготований розчин. Критерієм оцінки щодо правильності слугує значення відносного стандартного відхилення, яке відповідно до вимог має бути не більше 2 %, а відсоток відновлення становити від 95 до 105 %. Правильність методики оцінювалася за допомогою відсотка відновлення та відносного стандартного відхилення. Відсоток відновлення знаходиться в інтервалі від 98,08 до 101,92 %. Значення відносного стандартного відхилення при оцінюванні правильності методики становило 1,73 %, що не перевищує 2 % (табл. 4.7).



Таблиця 4.7

**Результати визначення правильності методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот в листі зеленого чаю**

Початковий вміст, г	Добавлено лимонної к-ти, г	Знайдено, г	Знайдено органічних кислот, г	Відновлення, %	RSD, %
0,036	0,015	0,052	0,051	98,08	1,73
			0,053	101,92	
			0,052	100,00	
0,036	0,022	0,058	0,059	101,72	
			0,058	100,00	
			0,057	98,28	
0,036	0,029	0,065	0,065	100,00	
			0,066	101,54	
			0,064	98,46	

Прецизійність методики була підтверджена збіжністю та проміжною прецизійністю. Збіжність перевіряли шляхом приготування водної витяжки листя зеленого чаю з 6 наважок сировини в межах короткого проміжку часу із застосуванням однакового набору реактивів та за участі одного дослідника. Проміжну прецизійність визначали, як описано вище в умовах тієї ж лабораторії, але в різні дні. Критерій прийнятності виражається величиною відносного стандартного відхилення, який не повинен перевищувати 2 %. Значення RSD для збіжності та проміжної прецизійності становили 1,76 % і 1,59 відповідно. Значення RSD були менше 2 % і це доводить, що методика є точною (табл. 4.8, 4.9).

Таблиця 4.8

**Результати визначення збіжності методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот в листі зеленого чаю**

Досліджуваний зразок	Вміст суми вільних органічних кислот, %
1	1,86
2	1,81
3	1,83
4	1,85
5	1,77
6	1,83
Середнє значення, %	1,83
SD	0,0321
Довірчий інтервал (P = 95 %), %	0,03
RSD, %	1,76

**Результати визначення проміжної прецизійності методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот в листі зеленого чаю**

Досліджуваний зразок	Вміст суми вільних органічних кислот, %	
	перший день	другий день
1	1,83	1,85
2	1,81	1,86
3	1,86	1,80
4	1,84	1,83
5	1,82	1,87
6	1,78	1,79
Середнє значення, %	1,82	1,83
SD	0,0269	0,0311
Довірчий інтервал (P=95%), %	0,02	0,02
%RSD	1,48	1,69
Середнє значення RSD, %	1,59	

Стабільність методики була перевірена при 100 % концентрації вільних органічних кислот за участі двох різних аналітиків та використанні двох різних бюреток. Критерій прийнятності виражається величиною відносного стандартного відхилення, яке не має перевищувати 2 %. Стабільність методики визначалася протягом 60 хв. Виявлено, що значення RSD склало 1,24 % і відповідно було менше 2 %, що показує стабільність аналітичного розчину впродовж 60 хвилин (табл. 4.10).

*Таблиця 4.10*

**Результати визначення стабільності методики кількісного визначення суми вільних органічних кислот в листі зеленого чаю**

t, хв	Вміст суми вільних органічних кислот, %
0	1,85
15	1,82
30	1,81
45	1,80
60	1,79
Середнє значення, %	1,81
SD	0,0225
Довірчий інтервал (P=95%), %	0,02
RSD, %	1,24

Підтверджено, що розроблена алкаліметрична методика визначення в листі зеленого чаю суми вільних органічних кислот з потенціометричним фіксуванням еквівалентного об'єму відповідає параметрам специфічність, лінійність, точність, збіжність, внутрішня прецизійність, робастність. Метод є простим, надійним, точним та економічно вигідним.

#### **4.6 Розробка методики кількісного визначення катехінів у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю**

Відповідно до розділу «Дієтичні добавки» ДФУ 2.0, всі дієтичні добавки повинні відповідати фармако-технологічним вимогам до дозованих форм за вмістом важких металів, залишкових кількостей пестицидів та мікробіологічною чистотою [12]. Проте відсутні будь-які вимоги до визначення якісного складу та кількісного вмісту основних діючих речовин.

За результатами моніторингу фармакопей різних країн було з'ясовано, що Фармакопея США містить монографію «Декофеїнізований екстракт зеленого чаю», в якій зазначені вимоги щодо якісного складу та кількісного вмісту катехінів у дієтичній добавці на основі екстракту зеленого чаю. Кількісний вміст поліфенолів у перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат має бути не менше 60 %, а кофеїну - не перевищувати 0,1 % [217]. Оскільки не існує інших нормативних документів, що регулюють вміст катехінів у дієтичних добавках з екстрактом зеленого чаю, нами були взяті за основу саме вимоги Фармакопеї США 38.

Основний метод, який використовується для визначення якісного складу та кількісного вмісту катехінів згідно Фармакопеї США 38 є ВЕРХ по таким причинам: метод здатний ідентифікувати всі похідні катехінів в екстракті зеленого чаю; висока точність кількісного визначення; високий рівень чутливості. Але поряд із перевагами цього методу є певні недоліки: висока вартість обслуговування обладнання і реактивів; крім того аналіз може бути проведений лише кваліфікованим спеціалістом.

З урахуванням зазначених переваг і недоліків методу ВЕРХ, нами було розроблено спектрофотометричну методику визначення кількісного вмісту катехінів у дієтичних добавках з екстрактом зеленого чаю, оскільки цей метод має такі переваги перед ВЕРХ, як простота і експресність.

Для розробки методики були вивчені УФ-спектри стандартного розчину епігалокатехін-3-О-галату і розчинів досліджуваних дієтичних добавок.

Як показано на рис. 4.7, максимуми поглинання стандартного розчину епігалокатехін-3-О-галату і розчинів досліджуваних дієтичних добавок знаходяться при  $275 \pm 2$  нм.

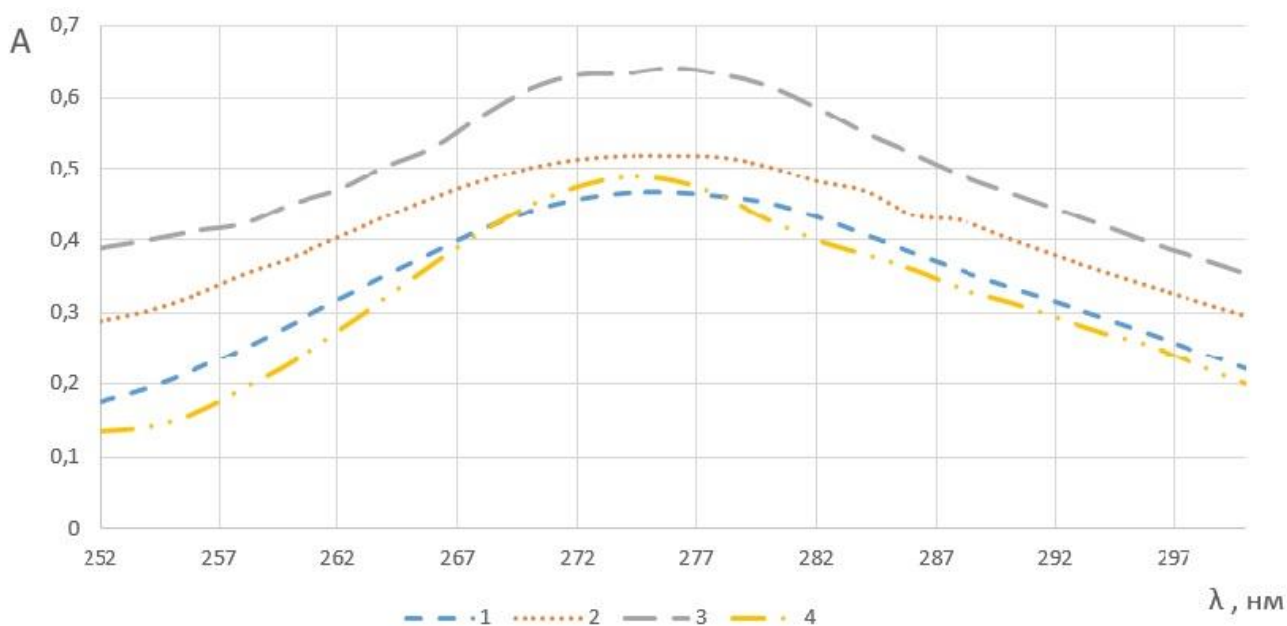


Рис. 4.7 УФ-спектри поглинання розчинів: 1 – епігалокатехін-3-О-галат; 2 – ДД «Green Tea Extract»; 3 – ДД «Екстракт зеленого чаю»; 4 – ДД «Зелений чай»

Згідно до результатів визначення, «Green Tea Extract» містить  $156,80 \pm 1,36$  мг, «Екстракт зеленого чаю» -  $89,00 \pm 0,88$  мг і «Зелений чай» -  $38,00 \pm 0,75$  мг катехінів. Виходячи з маси екстракту, сумарна кількість катехінів становить 156,80 %; 49,50 %; 99,60 % для зазначених дієтичних добавок відповідно (табл. 4.11, табл. 4.12).

**Метрологічні характеристики методики кількісного визначення суми катехінів у дієтичних добавках на основі зеленого чаю**

Дієтична добавка	$\bar{x}$	$S^2$	$S$	$S_{\bar{x}}$	$\Delta x$	$\varepsilon, \%$	$\bar{x} + \Delta x$
«Green Tea Extract»	156,80	1,2000	1,095	0,4899	1,36	0,93	156,80 ± 1,36
«Екстракт зеленого чаю»	89,00	0,5000	0,7071	0,3162	0,88	1,11	89,00 ± 0,88
«Зелений чай»	38,00	0,3620	0,6017	0,2691	0,75	2,67	38,00 ± 0,75

Таблиця 4.12

**Вміст катехінів в дієтичних добавках на основі зеленого чаю**

Дієтична добавка	Маса екстракту в одній дозованій формі, мг	Сума катехінів, %
«Green Tea Extract», (Source Nature, США)	100,00	156,80±3,14
«Екстракт зеленого чаю», (Еліт-фарм, Україна)	200,00	49,50±0,99
«Зелений чай», (Pharmacom, Україна)	31,25	99,60±1,99

Раніше Абу Рашид Е. А. та співавт. за допомогою ВЕРХ визначили сумарний вміст катехінів у 26 дієтичних добавках. Він становив від 3,8 до 70,2 % і тільки два досліджуваних об'єкти відповідали вимогам Фармакопеї США 38 [77]. Крім того чотири дієтичні добавки не мали жодної інформації про сумарний вміст катехінів або поліфенольних сполук.

В проаналізованих нами дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю, сумарний вміст катехінів становив від 49,50 до 156,80 % (табл. 4.12). «Green Tea Extract» (Source Nature, США) і «Зелений чай» (Pharmacom, Україна) відповідають вимогам Фармакопеї США 38 щодо вмісту катехінів. Дві дієтичні добавки

не містили інформацію про сумарний вміст катехинів або поліфенольних сполук. Слід зауважити, що вміст катехинів в «Green Tea Extract» занадто завищений імовірно внаслідок додаткового внесення виробником до екстракту епігалокатехін-3-О-галату з метою підвищення антиоксидантної активності. Жоден з виробників не вказав на упаковці свого продукту або в інструкції про використання декофеїнізованого екстракту листя зеленого чаю, що може вводити споживача в оману.

#### **4.7 Відповідність дієтичних добавок на основі листя зеленого чаю вимогам ДФУ**

З метою перевірки відповідності досліджуваних дієтичних добавок вимогам ДФУ 2.3 було визначено такі параметри, як важкі метали, афлотоксин, мікробіологічна чистота, залишкова кількість пестицидів, радіонукліди [12]. Як зазначено вище, у розділі ДФУ «Дієтичні добавки» відсутні вимоги до ідентифікації і кількісного визначення БАР дієтичних добавок, хоча дані параметри є досить важливими для оцінки якості. Також ми вважаємо, якщо виробником в інструкції до застосування повідомляється про антиоксидантні властивості продукту, це має бути підтверджено і зазначено рівень антиоксидантної активності дієтичної добавки. Відповідно до розділу «Дієтичні добавки» ДФУ 2.3 мінімальний вміст кожного вітаміну та/або мінеральної речовини (поживні речовини) у рекомендованій добовій кількості дієтичної добавки повинні становити не менше 15 % від рекомендованого добового споживання [12]. Дане правило було застосовано нами у формуванні вимог щодо кількісного вмісту та рівня антиоксидантної активності. Оскільки максимальна допустима рекомендована добова доза ЕГКГ в очищеному екстракті становить 300 мг, що відповідає 562 ммоль-екв./г АОА (розділ 3), то добова кількість катехинів має становити не менше 45 мг, а антиоксидантна активність не менше 84,30 ммоль-екв./г. Результати аналізу дієтичних добавок на відповідність показникам якості наведені у табл. 4.13.

## Відповідність дієтичних добавок показникам якості

Показник	Вимоги	Результати аналізу ДД		
		«Green Tea Extract»	«Екстракт зеленого чаю»	«Зелений чай»
1	2	3	4	5
Ідентифікація				
Катехіни	При хроматографуванні досліджуваного розчину дієтичних добавок у системі: толуол : ацетон : мурашина кислота безводна (9 : 9 : 2) повинно спостерігатися розділення катехінів на 2 смуги, які при проявленні 1 % розчином ваніліну виявляються посередині у вигляді червоних плям	✓	✓	✓
Кофеїн	повинен бути відсутній	✓	✓	✓
Важкі метали	Pb ≤ 6,0 мг/кг As ≤ 0,5 мг/кг Cd ≤ 1,0 мг/кг Hg ≤ 0,1 мг/кг	✓	✓	✓
Афлотоксин	Афлотоксин В <sub>1</sub> ≤ 2 мкг/кг	✓	✓	✓
Мікробіологічна чистота	В препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10 <sup>4</sup> бактерій і не більше 10 <sup>2</sup> грибів у мілілітрі. Не допускається наявність бактерій род. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 мл.	✓	✓	✓
Залишкова кількість пестицидів	Гексахлорциклогексан ≤ 0,1 мг/кг Гептахлор, алдрин – не допускається	✓	✓	✓
Радіонукліди	Cs-132 ≤ 600 Бк/кг Sr-90 ≤ 200 Бк/кг	✓	✓	✓
Кількісний вміст				
Катехіни	не менше 45 мг	✓ (293,60)	✓ (158,00)	✓ (56,00)
АОА, ммоль-екв./г	не менше 84,30	✓ доб. кільк. (410,00)	✓ доб. кільк. (218,4)	✓ доб. кільк. (180,15)

Примітка. «✓» - відповідає параметру, «-» - не відповідає параметру

За результатами досліджень було встановлено, що всі досліджувані дієтичні добавки відповідають висунутим вимогам за усіма критеріями.

#### 4.8 Кількісне визначення БАР та антиоксидантної активності настоянок та настою листя зеленого чаю

Настоянки та настій листя зеленого чаю одержували методом мацерації (співвідношення 1:10), враховуючи коефіцієнт поглинання екстрагента сировиною. Для цього 10,0 г подрібненого листя зеленого чаю поміщали в колбу, додавали 96, 60, 40, 20 % етанол. У випадку приготування настою, до наважки сировини додавали воду і нагрівали на киплячій водянній бані 15 хв, потім охолоджували впродовж 40 хв. Витяжки зливали, віджимали залишок і проводили очищення (відстоювання та фільтрація). Вміст основних груп БАР у настоянках і настої листя зеленого чаю наведений в табл. 4.14.

Таблиця 4.14

##### Вміст основних груп БАР у настоянках і настої листя зеленого чаю

Екстрагент	Сухий залишок, %	Кількісний вміст, мг/мл						АОА, ммоль/г сух. зал.
		фенольних сполук в (в перерах. на галову к-ту)	катехинів (в перерах. на епігалокатехін галат)	флавоноїдів (в перер. на рутин)	гідрокси коричних к-т (в перерах. на хлорогенову к-ту)	кофеїну	органічних к-т (в перерах. на лимонну к-ту)	
Настоянка 96 %	0,68±0,01	5,98±0,12	5,80±0,12	0,36±0,01	0,54±0,02	0,29±0,01	0,82±0,03	47,49±1,42
Настоянка 60 %	0,99±0,01	7,90±0,16	8,43±0,17	0,25±0,01	0,45±0,02	0,21±0,01	0,94±0,03	48,27±1,44
Настоянка 40 %	1,10±0,01	5,01±0,10	5,21±0,10	0,13±0,01	0,55±0,02	0,51±0,02	0,92±0,03	29,27±0,88
Настоянка 20 %	0,47±0,01	4,14±0,10	3,61±0,10	0,18±0,01	0,14±0,02	0,26±0,01	0,92±0,03	22,50±0,68
Настій	0,43±0,01	3,54±0,10	3,36±0,10	0,38±0,01	0,36±0,01	0,65±0,02	1,05±0,03	18,13±0,54

У результаті проведених досліджень встановлено, що настоянка на 60 % етанолі виявляє найбільший рівень антиоксидантної активності (48,27±1,44



ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ ), 96 % настоянка дещо поступається їй ( $47,49 \pm 1,42$  ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ ), а активність настою - в 2,7 разів менша.

#### **4.9 Дослідження сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю**

Публікації останніх років у Pubmed та Scopus демонструють велику зацікавленість вчених до визначення антиоксидантної активності рослинних екстрактів [80], настоїв [130] і дієтичних добавок з БАР листя зеленого чаю [96]. Як показано в розділі 1, АОА листя зеленого чаю можна встановлювати електрохімічними [76], титриметричними [215], хроматографічними [75] і спектральними методами [208]. У дослідженнях Л. Ценга [190] і Л. Шпігуна антиоксидантна активність настоїв та екстрактів листя зеленого чаю вивчалась потенціометричним та DPPH методами [130]. Але імовірно, що одержані результати не дають точної оцінки рівня АОА листя зеленого чаю. Це зумовлено тим, що в водних витягах не досягається повного вилучення всіх груп біологічно активних речовин, а екстрагуються лише гідрофільні сполуки. Згідно з літературними джерелами, листя зеленого чаю містить крім глікозидів флавоноїдів, також і їх аглікони, які є гідрофобними і відповідно не можуть бути виділені водною екстракцією [97, 155]. Оскільки аглікони не поступаються за рівнем антиоксидантної активності глікозидам флавоноїдів, то і нехтування внеском даних сполук в сумарну АОА листя зеленого чаю не припустимо [98, 103].

На сьогодні відсутні дослідження щодо загального рівня АОА листя зеленого чаю, хоча отримані результати в подальшому можна було би використовувати для визначення оптимальної технології одержання екстрактів, а саме: кратності екстракції та співвідношення «сировина : екстрагент», а також настоянок і настоїв з метою розробки з них лікарських засобів, дієтичних добавок і косметичних продуктів.

Для вибору розчинника та встановлення оптимального співвідношення «сировина : екстрагент» був розроблений підхід визначення сумарної АОА листя зеле-

ного чаю шляхом проведення вичерпної екстракції. Даний метод екстракції дозволяє повністю екстрагувати як глікозидні, так і агліконові форми флавоноїдів, які мають різну полярність. Метод заснований на послідовній екстракції 96, 60, 40, 20 % етанолом та водою. При вичерпній екстракції сировина не піддавалася сушінню після вилучення, отже, було враховано об'єм екстрагента, що попередньо поглинався сировиною, тому концентрація екстрагента становила 60+14 %, 40+4 %, 20+5 %.

Для визначення кількісного вмісту суми фенольних сполук, катехінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот та антиоксидантної активності листя зеленого чаю при вичерпній послідовній екстракції з різним співвідношенням «сировина:екстрагент» 10,0 г (точна наважка) висушеного листя зеленого чаю подрібнювали до розміру 1-2 мм поміщали в колбу зі шліфом. Екстракцію проводили на водяній бані послідовно етанолом 96 %, 60 %, 40 %, 20 % і водою у співвідношенні 1:10, 1:20 і 1:30 впродовж 1 години. Після охолодження розчини фільтрували та концентрували за допомогою вакуумного випарника при температурі 50-60 °С до співвідношення маси екстракту до сировини 1 : 2 (табл. 4.15, табл. 4.16, табл. 4.17).

Таблиця 4.15

**Результати дослідження вмісту основних БАР та АОА при послідовній екстракції листя зеленого чаю екстрагентами у співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:10**

Екстрагент	Вміст сухого залишку, %	Сума фенольних сполук (у перерахунку на галову к-ту), мг/мл	Сума катехінів (у перерахунку на епігалогалат), мг/мл	Сума флавоноїдів (у перерахунку на рутин), мг/мл	Сума гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), мг/мл	АОА, ммоль-екв./т <sub>сух. зал.</sub>
96 % етанол	7,81±0,08	47,20±0,94	51,00±1,02	3,95±0,12	5,12±0,14	219,50±3,29
60 % етанол	3,07±0,03	20,00±0,40	23,00±0,46	1,68±0,05	3,27±0,09	129,00±1,94
40 % етанол	0,71±0,01	4,16±0,10	5,30±0,11	0,48±0,02	0,53±0,02	38,50±0,77
20 % етанол	0,43±0,01	2,10±0,05	3,00±0,11	0,15±0,01	0,12±0,01	15,10±0,30

вода	0,27± 0,01	1,53±0,05	1,70±0,06	0,10±0,01	0,08±0,01	4,80±0,11
Сума	12,29	74,99	84,00	6,36	9,12	406,92

Відомо, що фенольні сполуки виявляють різні види біологічної активності, такі як антиоксидантна, протимікробна, протизапальна [90, 172, 176, 177]. Загальну кількість фенольних сполук в екстрактах зеленого чаю визначали за методом Фоліна-Чокальтеу в перерахунку на галову кислоту. Найбільша кількість встановлена в 96 % етанольному екстракті, найменша - у водному екстракті. Також, найвищий вміст фенольних сполук ( $56,64 \pm 0,04$  мг/мл) досягається при екстракції у співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:20 (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

**Результати дослідження вмісту основних БАР та АОА при послідовній екстракції листя зеленого чаю екстрагентами у співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:20**

Екстрагент	Вміст сухого залишку, г	Сума фенольних сполук (у перерахунку на галову к-ту), мг/мл	Сума катехинів (у перерахунку на епігалокатехін галат), мг/мл	Сума флавоноїдів (у перерахунку на рутин), мг/мл	Сума гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), мг/мл	АОА, ммоль-екв./г <sub>сух. зал.</sub>
96 % етанол	8,11± 0,08	56,64±0,94	61,20±1,02	4,66±0,12	6,14±0,14	357,50±10,75
60 % етанол	3,24± 0,03	22,84±0,40	24,68±0,46	1,85±0,05	2,44±0,09	204,50±4,09
40 % етанол	0,80± 0,01	5,57±0,10	6,17±0,11	0,46±0,02	0,61±0,02	65,72±1,31
20 % етанол	0,49± 0,01	1,52±0,05	1,76±0,11	0,29±0,01	0,38±0,01	25,03±0,50
вода	0,33± 0,01	1,01±0,05	1,17±0,06	0,20±0,01	0,26±0,01	8,00±0,16
Сума	12,97	87,58	94,98	7,46	9,83	660,75

Катехіни є основними фенольними складовими листя зеленого чаю. ЕГКГ становить близько 40 % від загального вмісту катехинів, він широко визнаний як основний антиоксидантний інгредієнт [191]. Загальну кількість катехинів розраховували в перерахунку на епігалокатехін-3-О-галат. За кількісним вмістом, катехіни

переважають фенольні сполуки, флавоноїди та гідроксикоричні кислоти. Найбільший вміст цієї групи БАР встановлено у 96 % етанольному екстракті, найменший - у водному екстракті. Порівняння вмісту катехінів у 96 % етанольних екстрактах, які отримані при екстракціях з різним співвідношенням «сировина:екстрагент» свідчить, що оптимальним є співвідношення 1:20.

Таблиця 4.17

**Результати дослідження вмісту основних БАР та АОА при послідовній екстракції листя зеленого чаю екстрагентами у співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:30**

Екстрагент	Вміст сухого залишку, %	Сума фенольних сполук (у перерахунку на галову к-ту), мг/мл	Сума катехінів (у перерахунку на епігалогалат), мг/мл	Сума флавоноїдів (у перерахунку на рутин), мг/мл	Сума гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), мг/мл	АОА, ммоль-екв./т <sub>сух. зал.</sub>
96 % етанол	7,94 ±0,08	52,95±0,94	61,10±1,02	4,50±0,12	6,10±0,14	349,02±3,29
60 % етанол	3,18 ±0,03	21,18±0,40	24,44±0,46	1,80±0,05	2,54±0,09	139,61±1,94
40 % етанол	0,79 ±0,01	5,30±0,10	6,11±0,11	0,41±0,02	0,65±0,02	36,74±0,77
20 % етанол	0,47 ±0,01	3,35±0,05	3,87±0,11	0,26±0,01	0,41±0,01	23,25±0,30
вода	0,31 ±0,01	0,96±0,05	1,11±0,06	0,08±0,01	0,12±0,01	6,84±0,11
Сума	12,69	83,74	96,63	7,05	9,82	555,46

Флавоноїди, як один із видів вторинних метаболітів рослин, хоча і не є життєво необхідними при зростанні та розвитку рослини, також відіграють важливу роль у поглинанні вільних радикалів [98]. Їх загальний вміст розраховували в перерахунку на рутин. Екстракт листя зеленого чаю на 96 % етанолі містив відносно високу кількість флавоноїдів (табл. 4.15, 4.16, 4.17). Оптимальне співвідношення «сировина:екстрагент» також 1:20.

Гідроксикоричні кислоти викликають великий інтерес, оскільки відомо, що вони є потужними антиоксидантами [201]. У всіх екстрактах вміст гідроксикоричних кислот вище, ніж флавоноїдів. Як і у випадку розглянутих вище груп БАР найбільша їх кількість екстрагується 96 % спиртом у співвідношенні 1:20.

Загальний вміст фенольних сполук, катехінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот при екстракції збільшується в наступному порядку: водний екстракт < 20 % етанольний екстракт < 40 % етанольний екстракт < 60 % етанольний екстракт < 96 % етанольний екстракт.

З огляду на антиоксидантну активність було встановлено, що при вичерпній екстракції листя зеленого чаю у співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:10 її рівень складає 406,92 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ , при 1:20 – 660,75 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$  і при 1:30 – 555,46 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ . При вичерпній екстракції і оптимальному співвідношенні «сировина:екстрагент» 1:20, АОА зростає у такому порядку: водний екстракт (8,00 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ ) < 20 % етанольний екстракт (25,03 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ ) < 40 % етанольний екстракт (65,72 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ ) < 60 % етанольний екстракт (204,50 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ ) < 96 % етанольний екстракт (357,50 ммоль-екв./ $m_{\text{сух. зал.}}$ ). 96 % етанольний екстракт має найбільший внесок у сумарну антиоксидантну активність листя зеленого чаю, що можна пояснити високою кількістю фенольних сполук в ньому порівняно з іншими розчинниками. Найменшою антиоксидантною активністю закономірно володів водний екстракт, оскільки вміст речовин фенольного характеру в ньому досить низький.

Існує висока позитивна кореляція між антиоксидантною активністю та кількісним вмістом фенольних сполук, катехінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот в екстрактах листя зеленого чаю (табл. 4.18, рис. 4.8- 4.11). При порівнянні значень рівня кореляції між АОА і вмістом зазначених груп БАП, найвища кореляція спостерігалася у випадку катехінів, що говорить про їх значну роль в проявленні антиоксидантної активності.

Таблиця 4.18

**Залежність антиоксидантної активності від вмісту груп біологічно активних речовин в екстрактах листя зеленого чаю**

Коефіцієнт Пірсона	Сума фенольних сполук	Сума катехінів	Сума флавоноїдів	Сума гідроксикоричних кислот
R	0,9852	0,9959	0,9873	0,9899

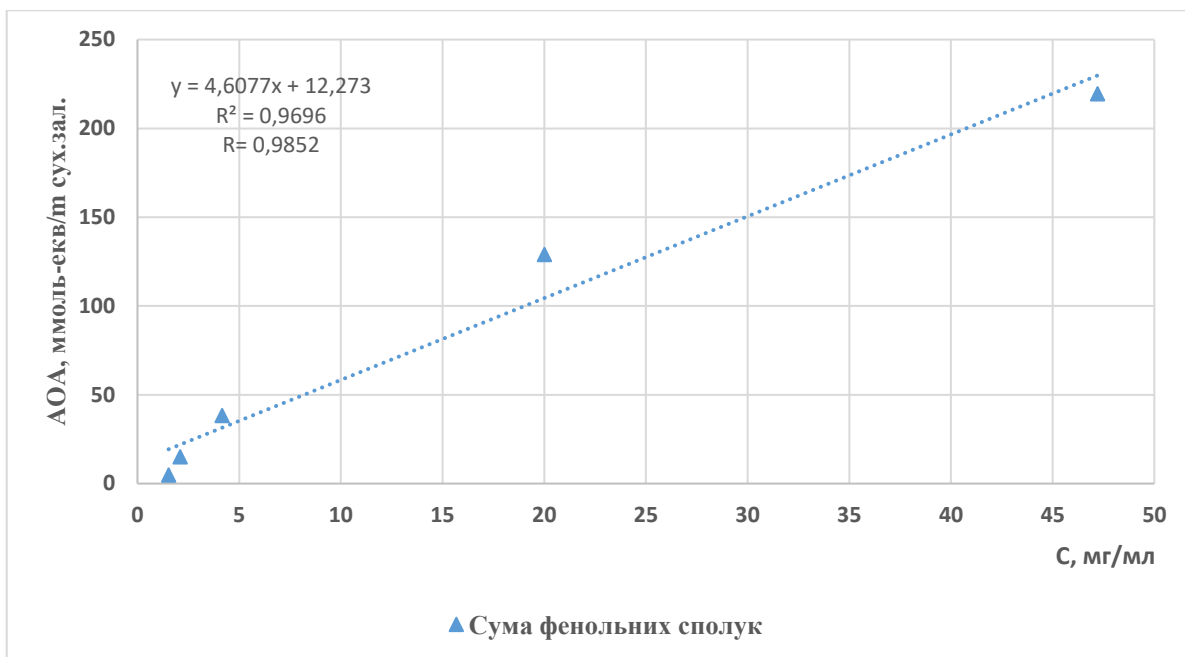


Рис. 4.8 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом фенольних сполук в екстрактах листа зеленого чаю, одержаних вичерпною екстракцією

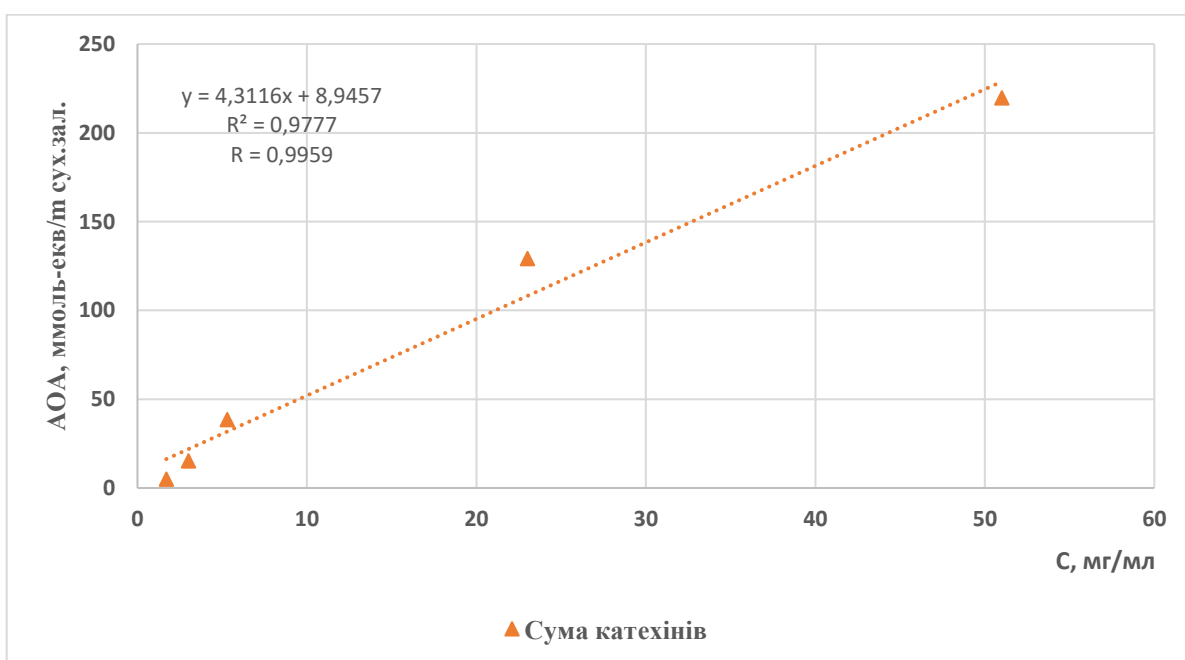


Рис. 4.9 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом катехинів в екстрактах листа зеленого чаю, одержаних вичерпною екстракцією

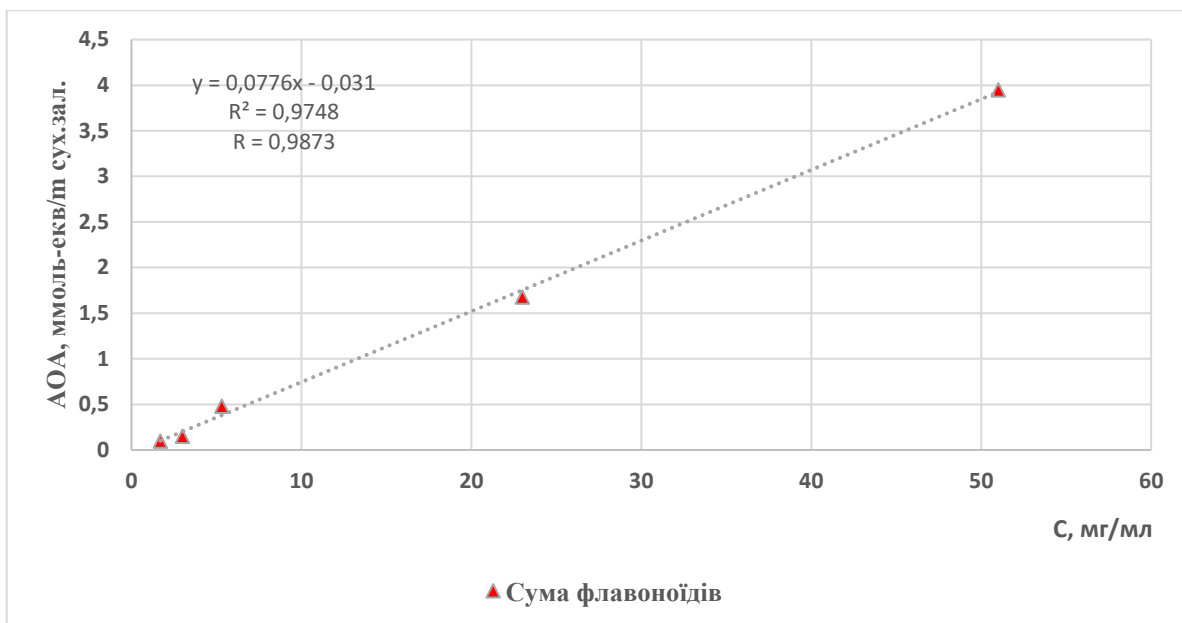


Рис. 4.10 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом флавоноїдів в екстрактах листа зеленого чаю, одержаних вичерпною екстракцією

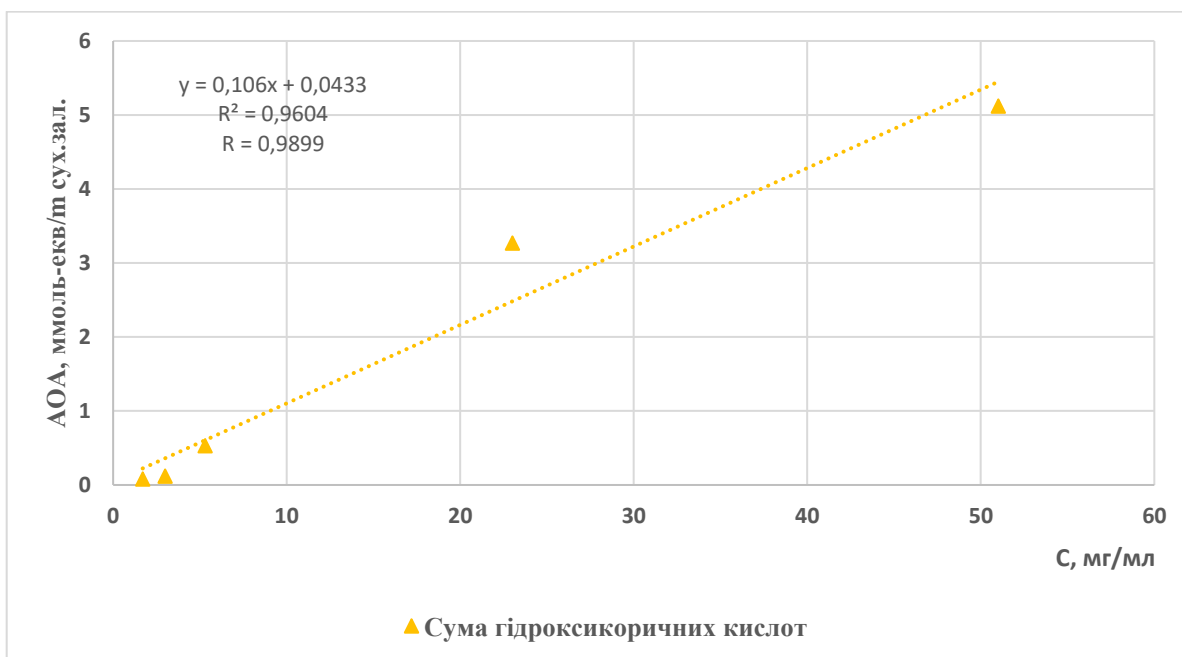


Рис. 4.11 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом гідроксикоричних кислот в екстрактах листа зеленого чаю, одержаних вичерпною екстракцією

#### 4.10 Визначення оптимального екстрагенту і кратності екстракції при одержанні рідкого екстракту з листя зеленого чаю

З метою одержання рідкого екстракту з листя зеленого чаю було проведено дослідження по визначенню оптимального екстрагенту і кратності екстракції. Як екстрагенти використовували етанол різної концентрації – 96, 60, 40, 20 %; воду та хлороформ. За критерій прийнятності вибору оптимального екстрагенту було встановлено 80 % від рівня сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю, який повинний бути не менше 528,60 ммоль-екв./ $m_{\text{сух.зал.}}$ .

Для одержання екстрактів наважки сировини по 5 г (точна наважка) подрібнювали до розміру 1 – 2 мм, поміщали в колбу зі шліфом, заливали відповідним екстрагентом у співвідношенні «сировина : екстрагент» 1 : 20. Проводили триразову екстракцію впродовж 1 год на киплячій водяній бані, після чого витяги фільтрували і упарювали на роторному апараті до об'єму 10 мл. Результати кількісного визначення катехинів, суми фенольних сполук, похідних гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та рівня антиоксидантної активності рідких екстрактів наведені в табл. 4.19.

Таблиця 4.19

#### Динаміка екстрагування БАР різними екстрагентами з листя зеленого чаю та значення АОА

Екстрагент	Екстракція	Сухий залишок, %	Вміст суми, мг/мл						АОА, ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$	Відсоток АОА від значення суми 3 екстракцій, %
			фенольних сполук	катехинів	флавоноїдів	гідроксикоричних к-т	кофеїну	органічних к-т		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Хлороформ	1	0,91 ±0,01	0,64 ±0,02	-	-	-	7,24 ±0,14	-	5,77 ±0,10	59,56
	2	0,13 ±0,01	0,40 ±0,02	-	-	-	4,83 ±0,10	-	3,60 ±0,07	37,15
	3	0,026 ±0,003	0,04 ±0,02	-	-	-	0,43 ±0,01	-	0,32 0,01	3,30
Сума трьох екстракцій		1,07	1,08	-	-	-	12,50	-	9,69	



Продовження табл. 4.19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ета- нол 96 %	1	7,06 ±0,07	62,00 ±1,24	60,00 ±1,20	3,69 ±0,07	5,60 ±0,11	2,64 ±0,04	9,00 ±0,18	442,29 ±8,85	71,06
	2	2,51 ±0,03	24,70 ±0,49	24,00 ±0,48	1,45 ±0,03	2,15 ±0,04	0,44 ±0,01	4,18 ±0,08	175,00 ±3,50	28,12
	3	0,07 ±0,002	0,69 ±0,02	0,67 ±0,02	0,04 ±0,01	0,06 ±0,01	0,04 ±0,01	0,12 ±0,01	5,15 ±0,10	0,83
Сума трьох екст- рак- цій		9,64	87,40	84,70	5,54	7,81	3,12	13,30	622,44	
Ета- нол 60 %	1	10,75 ±0,10	86,00 ±1,72	92,00 ±1,84	2,70 ±0,05	4,90 ±0,10	1,00 ±0,02	10,20 ±0,20	474,08 ±9,48	86,38
	2	1,59 ±0,02	12,90 ±0,26	11,60 ±0,23	0,40 ±0,01	0,65 ±0,01	0,40 ±0,01	1,40 ±0,03	67,70 ±1,35	12,34
	3	0,15 ±0,001	1,20 ±0,03	1,10 ±0,02	0,05 ±0,01	0,07 ±0,01	0,10 ±0,01	0,39 ±0,01	7,01 ±0,14	1,28
Сума трьох екст- рак- цій		12,48	100,10	104,70	3,10	5,62	1,50	12,00	548,79	
Ета- нол 40 %	1	13,09 ±0,13	59,60 ±1,19	62,00 ±1,24	1,56 ±0,03	6,50 ±0,13	4,10 ±0,08	10,90 ±0,22	311,93 ±6,24	91,45
	2	1,01 ±0,01	4,60 ±0,09	4,80 ±0,10	0,12 ±0,01	0,52 ±0,01	0,90 ±0,02	0,83 ±0,02	26,00 ±0,52	7,62
	3	0,12 ±0,001	0,12 ±0,01	0,54 ±0,01	0,014 ±0,01	0,06 ±0,01	0,26 ±0,01	0,10 ±0,01	3,13 ±0,06	0,92
Сума трьох екст- рак- цій		14,22	67,20	67,40	1,69	7,08	5,26	5,10	341,06	
Ета- нол 20 %	1	5,84 ±0,06	51,70 ±1,03	45,10 ±0,90	2,23 ±0,04	1,74 ±0,03	3,10 ±0,06	11,52 ±0,23	253,41 ±5,06	81,64
	2	1,30 ±0,01	11,50 ±0,23	10,30 ±0,21	0,50 ±0,01	0,39 ±0,01	0,45 ±0,02	2,50 ±0,05	54,00 ±1,08	17,40
	3	0,06 ±0,002	0,55 ±0,01	0,48 ±0,01	0,02 ±0,002	0,02 ±0,002	0,04 ±0,003	0,25 ±0,01	3,00 ±0,06	0,97
Сума трьох екст- рак- цій		7,20	63,80	55,90	2,75	2,15	3,6	3,10	310,41	
Вода	1	5,01 ±0,05	41,20 ±0,82	45,60 ±0,91	4,42 ±0,09	4,16 ±0,09	6,36 ±0,13	12,16 ±0,24	189,60 ±3,79	82,57
	2	0,77 ±0,01	6,20 ±0,12	6,90 ±0,14	0,66 ±0,01	0,63 ±0,01	0,57 ±0,01	1,86 ±0,04	37,00 ±0,74	16,11
	3	0,15 ±0,002	1,10 ±0,02	1,30 ±0,03	0,12 ±0,01	0,14 ±0,01	0,07 ±0,002	0,36 ±0,01	3,01 ±0,06	1,31

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Сума трьох екстракцій		5,93	48,10	53,30	5,16	4,86	7,00	5,20	229,61	

При триразовій екстракції хлороформом сумарна антиоксидантна активність була найменшою і склала 9,69 ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ . Для водного витягу це значення було на рівні 229,61 ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ . Зі збільшенням концентрації етанолу спостерігалось і збільшення АОА, сягаючи максимальної величини для 96 % етанолу – 622,44 ммоль/ $m_{\text{сух. зал.}}$ . Відповідно до встановленого нами критерію вибору оптимального екстрагенту (80 % від рівня сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю), даному критерію відповідають 60 % і 96 % етанол. Хоча 60 % етанол екстрагує найбільшу кількість фенольних сполук, проте отриманий витяг поступається за антиоксидантною активністю 96 % етанольному екстракту.

При виборі оптимального екстрагенту необхідно також враховувати економічну складову. Для цього було розраховано вартість 96 і 60 % етанолу для одержання рідкого екстракту з сировини масою 1,0 кг за технологією, описаною вище (табл. 4.20). 96 % етанол для екстракції є економічно не вигідним, при використанні ж 60 % етанолу, вартість одержання цільового продукту знижується на 40 %. Таким чином, 60 % спирт був обраний нами як оптимальний екстрагент для одержання рідкого екстракту з листя зеленого чаю.

Таблиця 4.20

#### Теоретичний розрахунок вартості етанолу для екстракції листя зеленого чаю

Екстрагент	Об'єм етанолу, потрібного для екстракції, л	Вартість етанолу, грн
96 % етанол	40,0	2800,00
60 % етанол	24,0	1680,00

Примітка: вартість 1 л етилового спирту станом на вересень 2021 року становила 70,00 грн

З наведених в табл. 4.19 даних видно, що найбільше вилучення екстрактивних речовин і відповідний високий рівень антиоксидантної активності забезпечують саме перші дві екстракції. Для встановлення оптимальної кратності екстракцій було побудовано графіки залежності виходу екстрактивних речовин і рівня антиоксидантної активності листя зеленого чаю від кількості проведених екстракцій (рис. 4.12, рис. 4.13).

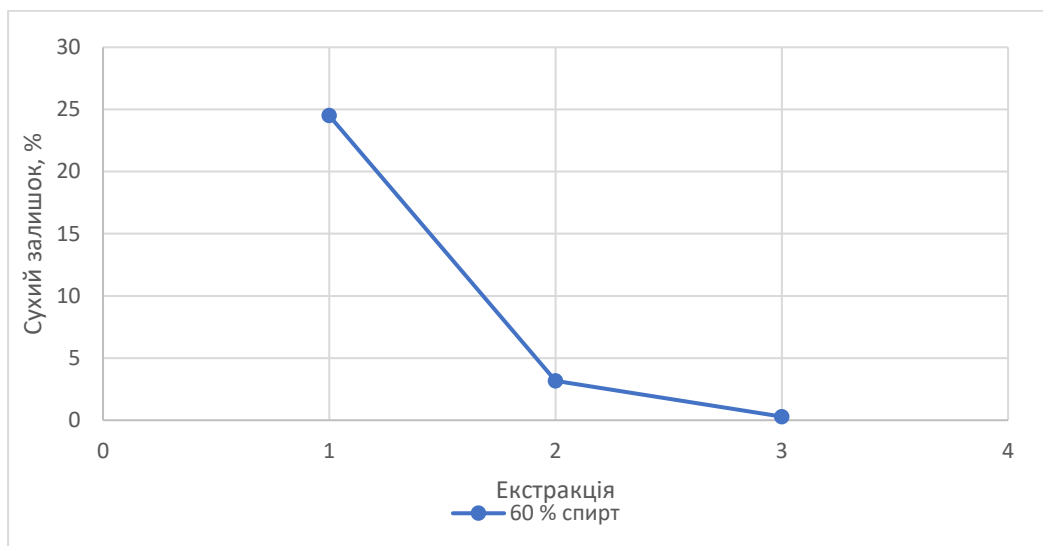


Рис. 4.12 Залежність виходу екстрактивних речовин листя зеленого чаю від кількості проведених екстракцій

Встановлена доцільність проведення дворазової екстракції 60 % етанолом, подальша екстракція призводить лише до надлишкових витрат матеріальних і енергетичних ресурсів.

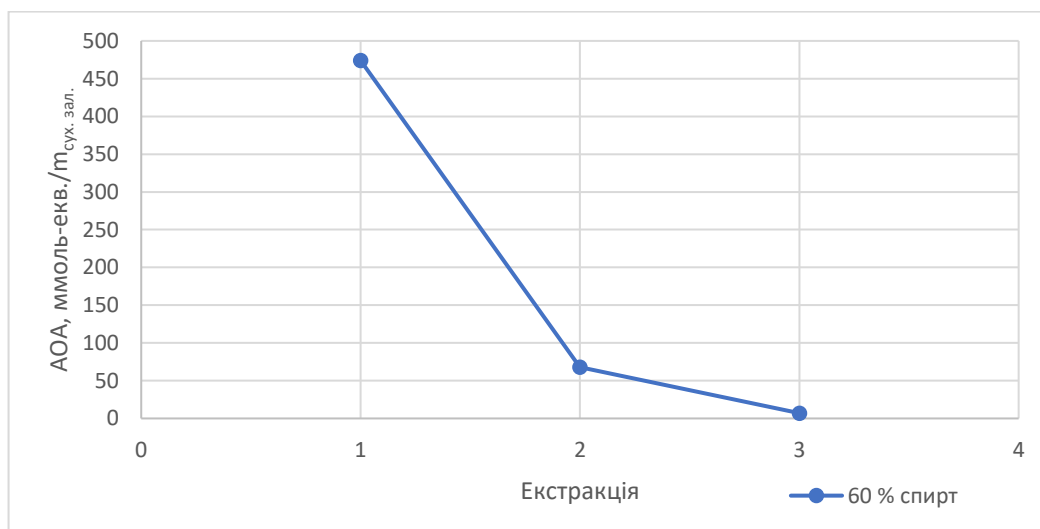


Рис. 4.13 Залежність рівня антиоксидантної активності від кількості проведених екстракцій листя зеленого чаю

Для дослідження кореляції між антиоксидантною активністю та вмістом біологічних активних речовин в екстрактах зеленого чаю використовували лінійний регресійний аналіз та коефіцієнт Пірсона (R). В результаті було встановлено, що між рівнем АОА та сумою фенольних сполук існує дуже висока кореляція ( $R = 0,9255$ ) (рис. 4.14);

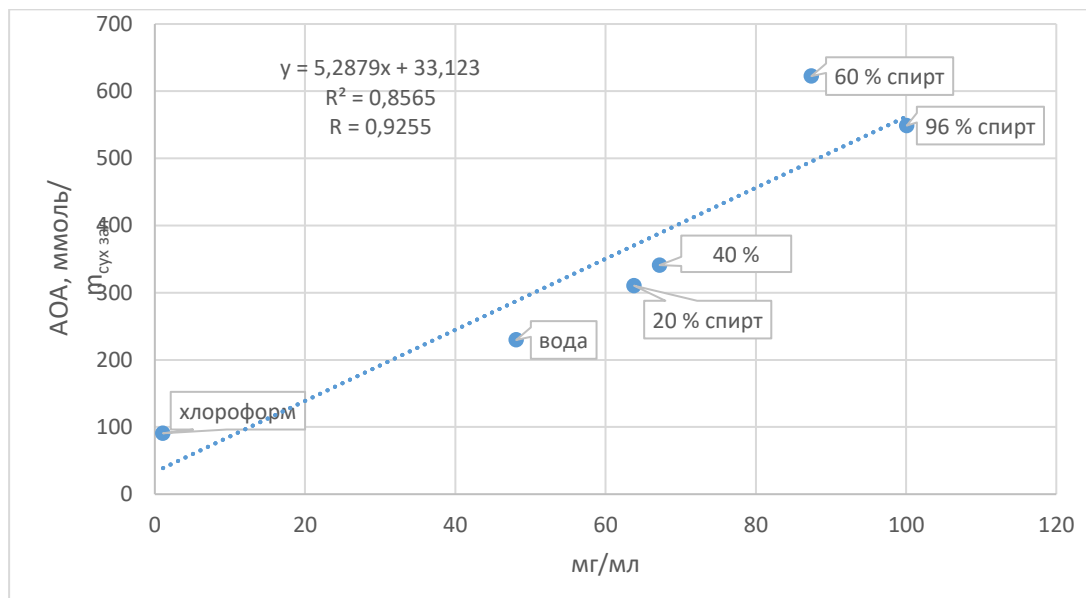


Рис. 4.14 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом суми фенольних сполук

між рівнем АОА та сумою катехинів і кофеїну – висока кореляція ( $R = 0,8710$ ) і ( $R = 0,8050$ ) відповідно (рис. 4.15, рис. 4.16);

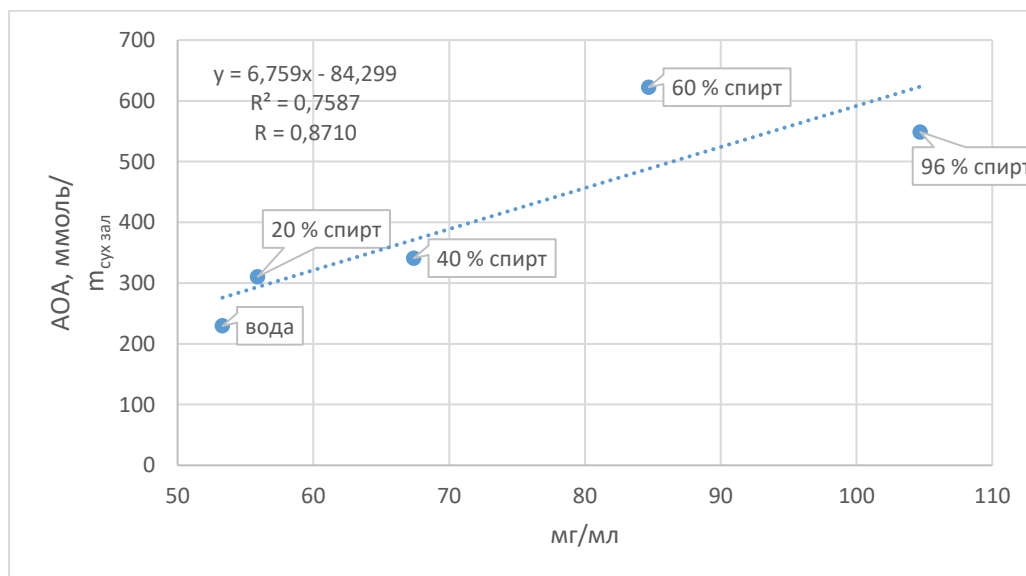


Рис. 4.15 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом суми катехинів

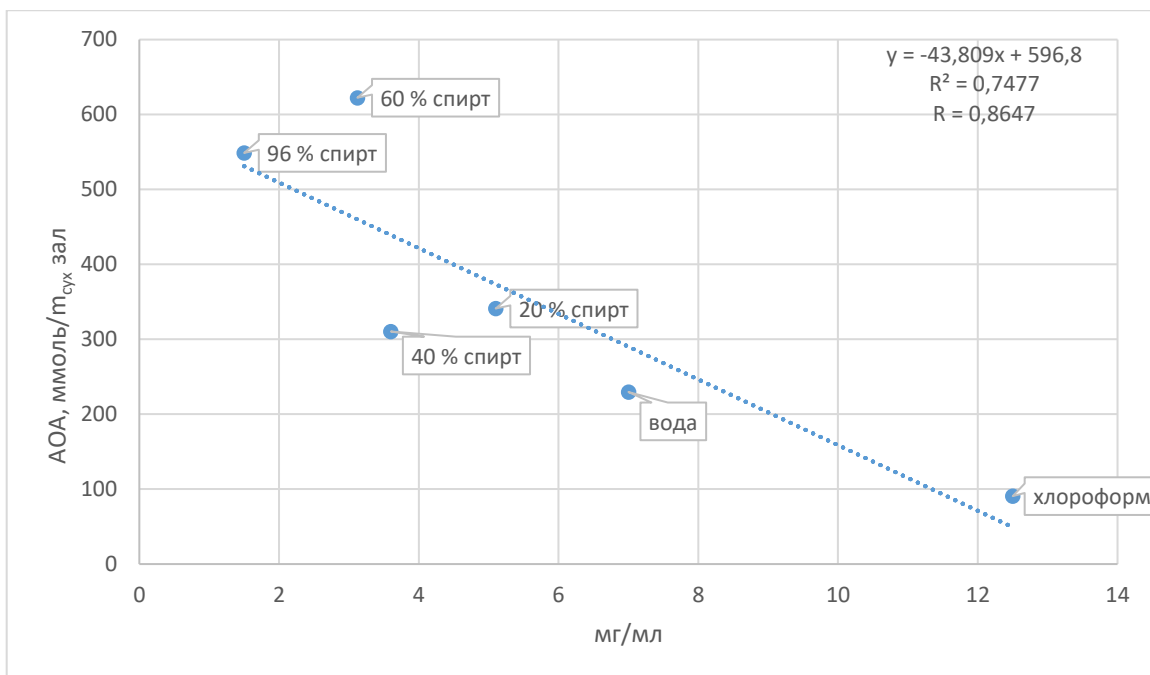


Рис. 4.16 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом кофеїну

між рівнем АОА та сумою гідроксикоричних кислот – помірна кореляція ( $R = 0,5748$ ) (рис. 4.17);

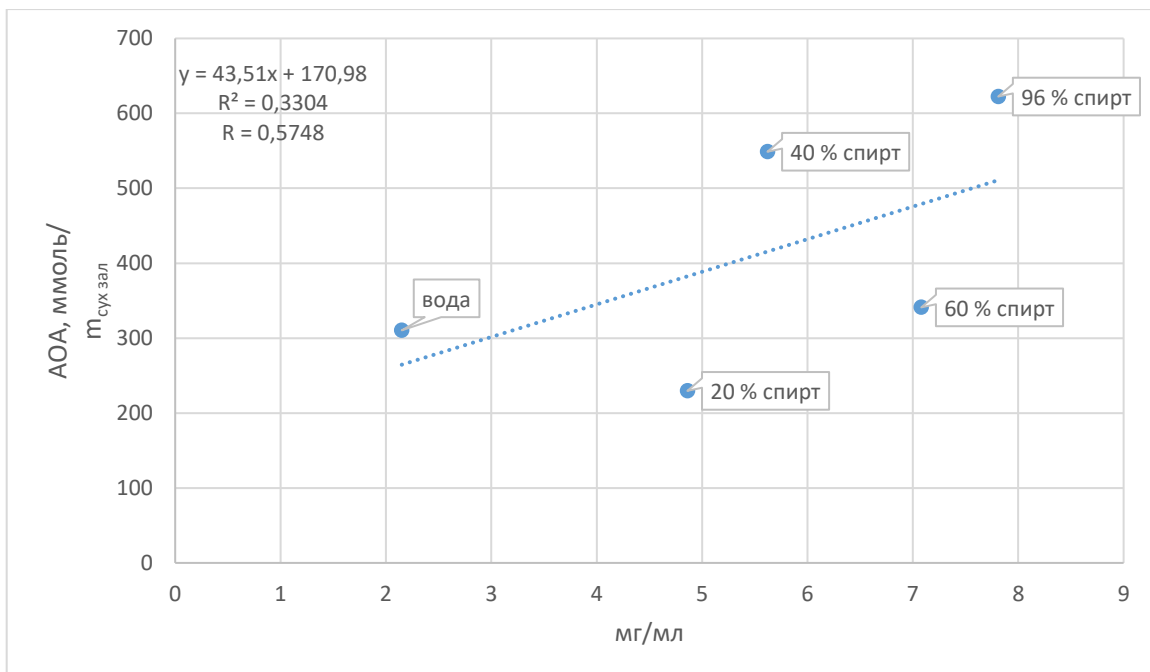


Рис. 4.17 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом суми гідроксикоричних кислот

між рівнем АОА та сумою органічних кислот – низька кореляція ( $R = 0,4578$ ) (рис. 4.18);

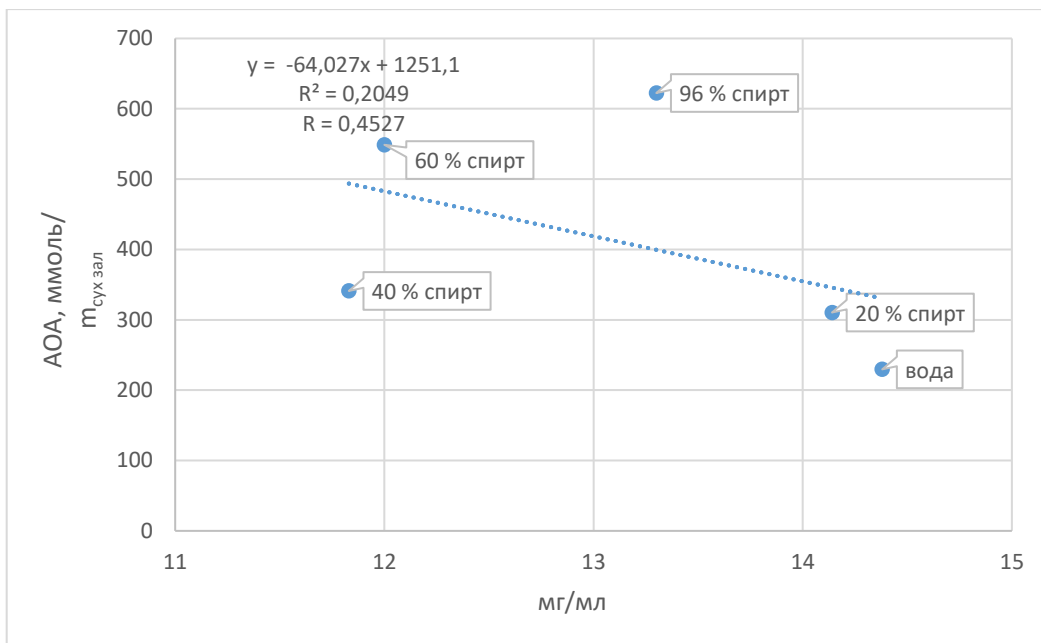


Рис. 4.18 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом суми органічних кислот

між рівнем АОА та сумою флавоноїдів – незначна кореляція ( $R = 0,2528$ ) (рис. 4.19).

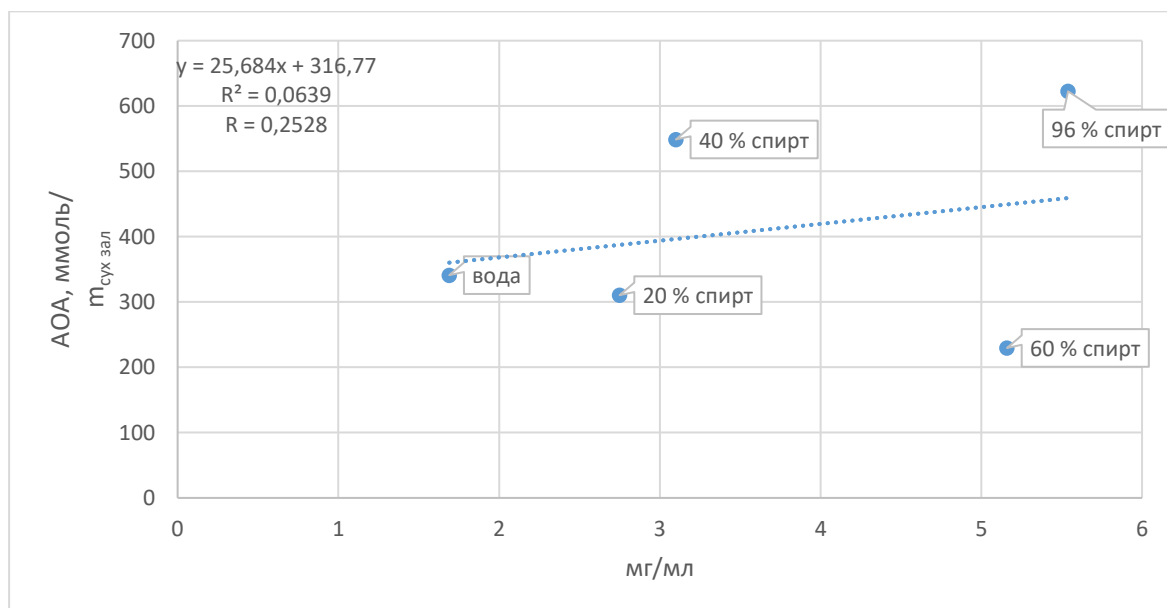


Рис. 4.19 Кореляція між антиоксидантною активністю та вмістом суми флавоноїдів

## Висновки до розділу 4

1. Проведено стандартизацію сировини листя зеленого чаю відповідно вимог ЄФ 9.0 за такими параметрами: опис, макроскопія, мікроскопія, ідентифікація (тонкошарова хроматографія), втрата в масі при висушуванні (не більше 8,0 %), загальна зола (не більше 9,0 %), вміст катехінів (не менше 8,5 %) і кофеїну (не менше 1,5 %).
2. Фітохімічний скринінг основних груп БАР листя зеленого чаю показав наявність катехінів, флавоноїдів, алкалоїдів, гідроксикоричних та органічних кислот. Методом ТШХ були ідентифіковані такі речовини, як епікатехін, епігалокатехін-3-О-галат, рутин, кофеїн, хлорогенова, лимона, бурштинова і оксалатна кислоти. Всі досліджені дієтичні добавки містять епігалокатехін-3-О-галат і епікатехін, кофеїн - в слідових кількостях; флавоноїди та гідроксикоричні кислоти не визначені.
3. Спектрофотометричним методом встановлено, що в листі зеленого чаю сумарний вміст фенольних сполук становить 24,12 %, катехінів – 20,79 %, флавоноїдів – 1,27 %, гідроксикоричних кислот – 0,67 % і кофеїну – 2,56 %.
4. Методом ВЕРХ було ідентифіковано та визначено кількісний вміст у листі зеленого чаю 4 флавонолів (1,34 %), 3 флавононів (0,25 %), 2 флавонів (0,64 %), 4 фенолкарбонових кислот (1,39 %) і домінуючих флаван-3-олів (20,56%).
5. Для визначення оптимальних умов екстракції органічних кислот з сировини проведена оцінка впливу таких факторів, як співвідношення «сировина:екстрагент», температура, кількість та тривалість часу екстракції. Вперше була розроблена потенціометрична методика кількісного визначення суми вільних органічних кислот у листі зеленого чаю, проведена її валідація за параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність. Встановлено сумарний вміст вільних органічних кислот - 1,83 %.
6. Вперше була розроблена спектрофотометрична методика визначення кількісного вмісту катехінів у дієтичних добавках, за якою встановлено, що сумарний вміст катехінів у «Green Tea Extract» складає  $156,80 \pm 1,36$  мг, «Екстракт зеленого чаю» –  $89,00 \pm 0,88$  мг, «Зеленому чаї» –  $38,00 \pm 0,75$  мг. Дієтичні

добавки «Green Tea Extract» і «Екстракт зеленого чаю» відповідають вимогам Фармакопеї США 38 щодо вмісту катехинів; три досліджені ДД за всіма критеріями відповідають вимогам ДФУ 2.3.

7. Вперше була розроблена методика визначення сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю. Встановлено, що максимальна сумарна антиоксидантна активність листя зеленого чаю, становить  $660,75 \text{ ммоль-екв./m}_{\text{сух.зал.}}$ .
8. За розробленою методикою вперше визначено антиоксидантну активність 96, 60, 40, 20 % етанольних настоянок і настою листя зеленого чаю. Настоянка на 60 % етанолі виявляє найбільший рівень антиоксидантної активності ( $48,27 \pm 1,44 \text{ ммоль/m}_{\text{сух. зал.}}$ ), 96 % настоянка дещо поступається їй ( $47,49 \pm 1,42 \text{ ммоль/m}_{\text{сух. зал.}}$ ), а активність настою - в 2,7 разів менша.
9. Результати досліджень кількісного вмісту основних груп БАР показали, що з листя зеленого чаю 60 % етанолом забезпечується найкраща екстракція катехинів; оптимальна кратність екстракції з цієї сировини складає два рази, що буде використано при розробці технології одержання нових екстрактів з листя зеленого чаю. Регресійним аналізом визначено, що найбільш висока кореляція ( $R = 0,9255$ ) спостерігається між рівнем АОА і вмістом фенольних сполук у витягах листя зеленого чаю.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу приведені в таких публікаціях:*

1. Дослідження якісного складу та кількісного вмісту деяких груп біологічно активних речовин у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю / О.Ю. Маслов, С.В. Колісник, О.В. Гречана, А.Г. Сербін. *Запорізький медичний журнал*. 2020. Том 23, № 1(124). С. 132-137. (**Web of Science Core Collection**) DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306
2. Determination of catechins in green tea leaves by HPLC compared to spectrophotometry / O.Yu. Maslov, M.A. Komisarenko, Y.S. Kolisnyk, T.A.



- Kostina. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 3(75). P. 28-33. DOI: 10.24959/ophcj.21.238177
3. Study of flavonoids and phenolic acids in green tea leaves / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, E.Yu. Akhmedov, S.M. Poluian, Z.V. Shovkova. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 3. P. 287–291. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.3.240287
  4. Development and Validation of a Titrimetric Method for Quantitative Determination of Free Organic Acids in Green Tea Leaves / O.Yu. Maslov, S.V. Kolesnik, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, T.A. Kostina. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 4. P. 304–311. (**Scopus**).
  5. Study of total antioxidant activity of green tea leaves (*Camellia sinensis* L.) / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, M.Yu. Golik. *Herba Polonica*. 2022. Vol. 68, № 1. P. 1–9. (**Scopus**). DOI: 10.2478/hepo-2022-0003
  6. Maslov O.Yu., Kovalenko V.S. Grechana O.V. UV-spectrophotometric determination of caffeine in green tea leaf. *Topical issues of new medicines development: матеріали XXVII міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів, м. Харків, 9-10 квітня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020, С. 96-97.*
  7. Маслов О. Ю., Колісник С. В. Визначення кофеїну в листі зеленого чаю. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин: матеріали IV Міжнародної науково-практичної internet-конференції НФаУ, м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 166.*
  8. Маслов О. Ю., Колісник С. В. Визначення якісного складу катехінів в листі зеленого чаю. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V міжнародної науково-практичної інтернет конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 308-309.*
  9. Маслов О. Ю., Колісник С. В. Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах:*

- матеріали II міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 3-4 червня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 355.
10. Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V., Kolisnyk Y. S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. *3<sup>rd</sup> International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects*, Tallin, 25-26 June 2021, Tallin: Interconf, 2021. P. 232-233.
11. Маслов О. Ю., Колісник С. В., Комісаренко М. А. Визначення кількісного вмісту суми гідроксикорічних кислот в листі зеленого чаю. *Інтеграція освіти, науки, та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути: III міжнародна дистанційна науково-практична конференція*, м. Дніпро, 11-12 серпня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 391.
12. Маслов О. Ю. Вивчення сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 10 вересня 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 287-288.
13. Маслов О. Ю., Комісаренко М. А., Упир Т. В. Визначення антиоксидантної активності спиртового екстракту листя зеленого чаю. *Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії*: матеріали науково-практичної *ON-LINE* конференції з міжнародною участю, м. Харків, 01 жовтня 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 267-268.
14. Maslov O. Yu. Development and validation titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. *Youth pharmacy science*: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, Україна, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 172.

## РОЗДІЛ 5

### СТАНДАРТИЗАЦІЯ РІДКОГО ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ЗЕЛЕНОГО ЧАЮ ТА ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ НА ЙОГО ОСНОВІ

#### 5.1 Стандартизація рідкого екстракту листя зеленого чаю

Для одержання рідкого екстракту листя зеленого чаю 100,0 г сировини, яка була подрібнена і просіяна до розміру частинок 1 – 2 мм, поміщали в колбу зі шліфом, додавали 2 кг хлороформу і приєднували зворотний холодильник. Екстракцію проводили за нагрівання на киплячій водяній бані протягом 1 години двічі. Після охолодження розчин фільтрували, шрот висушували у витяжній шафі до відсутності запаху хлороформу і поміщали його в колбу зі шліфом, додавали 60 % етанол. Екстракцію проводили двічі на водяній бані протягом 1 години при співвідношенні «сировина : екстрагент» 1:20. Після охолодження розчини фільтрували, об'єднували витяги і упарювали до 100,0 г.

Нами було проведено дослідження п'яти серій рідкого екстракту листя зеленого чаю на відповідність розробленим раніше параметрам стандартизації (розділ 4). Методики стандартизації отриманих екстрактів розроблені відповідно до загальних статей та методик кількісного визначення БАР, зазначених у ДФУ (табл. 5.1).

*Опис.* Рідина темно-коричневого кольору з характерним запахом.

*Ідентифікація.*

*А. Вихідний розчин.* 0,1 мл рідкого екстракту листя зеленого чаю розчиняють в 10 мл етанолу (60 % об/об) Р. Отриманий розчин використовують для проведення якісних реакцій.

До 1,0 мл вихідного розчину додають 1,0 мл 10 г/л заліза (III) хлориду Р; з'являється зелене забарвлення (фенольні сполуки).

*В. Тонкошарова хроматографія* (ДФУ, 1 вид., 2.2.27)

*Випробуваний розчин.* 1,0 мл рідкого екстракту розчиняють в 10 мл етанолу (96 %) Р, фільтрують через паперовий фільтр, розчинник видаляють і залишок розчиняють в 1 мл метанолу.

*Розчин порівняння.* 5 мг епікатехіну і 5 мг епігалокатехін-3-О-галату розчиняють в 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка з шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* толуол Р : ацетон Р : мурашина кислота безводна Р (9 : 9 : 2).

*Об'єм проби, що наноситься:* 30 мкл, смугами.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* пластинку обприскують розчином 10 г/л ваніліну Р в хлористоводневій кислоті розведеної Р, висушують на повітрі протягом 5 хвилин і переглядають при денному світлі.

*Результати А.:* нижче (рис. 5.1) наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі розчину порівняння мають проявлятися у вигляді двох червоних зон: вище середини – зона (-)-епікатехіну; у нижній третині хроматограми – зона (-)-епігалокатехін-3-О-галату. На хроматограмі випробуваного розчину повинні виявлятися червона зона на рівні зони (-)-епігалокатехін-3-О-галлату та червона зона на рівні зони (-)-епікатехіну. На хроматограмі випробуваного розчину можуть виявлятися також інші червоні зони.

Верхня частина пластинки	
(-)-епікатехін (червона зона)	червона зона
(-)-епігалокатехін-3-О-галат (червона зона)	червона зона
Розчин порівняння	Випробуваний розчин

Рис. 5.1 Схема хроматограм випробуваного розчину і розчину порівняння

### Випробування

*Сухий залишок:* не менше 20,00 % (ДФУ, доп. 1, 2.8.16).

*Вміст етанолу:* не менше 60,0 % (об/об) (ДФУ, доп. 1, 2.9.10, N, 5.5).

*Вміст метанолу і 2-пропанолу:* Не більше 0,05 % (об/об) метанолу і не більше 0,05 % 2-пропанолу (ДФУ, 2.9.11).

*Важкі метали.* Виявлення проводять із 5 мл препарату. Вміст важких металів має бути не більше 100 ppm (ДФУ, доп. 3, 2.4.8, метод А).

*Мікробіологічна чистота.* Для фітохімічних засобів характерне мікробне обсіменіння, тому слід контролювати кількість життєздатних бактерій та грибів в екстракті. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12.

Для визначення загальної кількості життєздатних аеробних бактерій 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату. По 1 мл підготованого зразка сіяли двошаровим методом на кожну з п'яти чашок Петрі з густим живильним середовищем № 1.

Для визначення загальної кількості життєздатних грибів 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату.

По 1 мл підготовленого зразка сіяли двошаровим методом на кожну з п'яти чашок Петрі з густим живильним середовищем № 2.

Для випробування на наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату. По 50 мл підготовленого зразка вносили в 500 мл поживних середовищ № 3 і 8.

Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до вимог ДФУ, 5.1.4, категорія 2. У препараті допускається загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 100 мікроорганізмів (бактерій та гри-

бів сумарно) в 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій та інших грам-негативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

*Кількісне визначення*

*Сума фенольних сполук*

*Вихідний розчин.* 1,0 мл екстракту розчиняють в 100,0 мл етанолу (96 %) Р, фільтрують через паперовий фільтр у мірну колбу на 100,0 мл, доводять тим же розчинником до позначки та перемішують (розчин 1).

*Випробовуваний розчин.* 1 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, додають 1,0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р, 10,0 води Р і доводять розчином 290 г/л натрій карбонату Р до мітки, перемішують (розчин 2).

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.

*Стандартний розчин.* Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг галової кислоти Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 100,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100,0 мл, перемішують.

Через 30 хв після приготування вимірюють оптичну густина розчину 2 за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Суму фенольних сполук (X, %), у перерахунку на галову кислоту обчислюють за формулою (5.1):

$$X(\%) = \frac{62,5 \cdot A_1 \cdot m_2}{A_2 \cdot m_1}, \quad (5.1)$$

де:

$A_1$  – оптична густина досліджуваного розчину;

$A_2$  – оптична густина стандартного розчину галової кислоти;

$m_1$  – маса досліджуваного зразка, у грамах;

$m_2$  – маса галової кислоти, у грамах.

Сума фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту має бути не менше 17,00 %.

*Вміст гідроксикоричних кислот.*

*Вихідний розчин.* 1,0 мл екстракту розчиняють в 100,0 мл *етанолу (96 %) P*, фільтрують через паперовий фільтр у мірну колбу на 100,0 мл, доводять тим же розчинником до позначки та перемішують (розчин 1).

*Випробовуваний розчин.* До 1,0 мл вихідного розчину додають 2 мл *0,5 M розчину хлористоводневої кислоти*, 2 мл розчину, приготованого розчиненням 10 г *натрію нітриту P* і 10 г *натрію молібдату P* в 100 мл *води P*, потім додають 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного P*, доводять об'єм *водою P* до 10,0 мл і перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл випробуваного розчину, 2 мл *0,5 M розчину хлористоводневої кислоти*, 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного P* змішують та доводять об'єм розчину *водою P* до об'єму 10,0 мл.

Оптичну густина випробуваного розчину одразу після приготування вимірюють за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст гідроксикоричних кислот ( $X$ , %) у перерахунку на хлорогенову кислоту обчислюють за формулою (5.2):

$$X(\%) = \frac{A \cdot 5,3}{V}, \quad (5.2)$$

де:

$A$  – оптична густина досліджуваного розчину при довжині хвилі 525 нм.

$V$  – об'єм екстракту, мл.

Сума гідроксикоричних кислот у перерахунку на кислоту хлорогенову має бути не менше 1,00 %.

*Антиоксидантна активність*

Антиоксидантну активність рідкого екстракту з листя зеленого чаю визначали потенціометричним методом.

1,0 мл екстракту поміщають у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, доводять до мітки етанолом 60 (% об/об.) Р. 1,0 мл приготованого розчину поміщають в електрохімічну комірку. Вимірюють зміну потенціалу медіаторного розчину. Рівень антиоксидантної активності, ммоль-екв./ $m_{\text{сух зал}}$ , обчислюють за формулою (5.3):

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_2}, \quad (5.3)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF / 2.3RT};$$

$C_{ox}$  – концентрація  $K_3[Fe(CN)_6]$ , М;

$C_{red}$  – концентрація  $K_4[Fe(CN)_6]$ , М;

$\Delta E$  – різниця потенціалів до та після взаємодії з антиоксидантом;

$E_{стан} = 0,0546 \cdot C_{\%} - 0,0091$ ;  $C_{\%}$  – концентрація спирту;

$F = 96485,333$  Кл/моль – стала Фарадея;

$n = 1$  – кількість електронів в електродній реакції;

$R = 8,314$  Дж/моль·К – універсальна газова стала;

$T = 298$  °К;

$K_{dil}$  – коефіцієнт розведення;

$m_1$  – маса сухого залишку екстракту, г;

$m_2$  – маса сухого залишку в 1 мл екстракту, г.

Антиоксидантна активність повинна становити не менше 529 ммоль-екв./ $m_{\text{сух зал}}$ .

Таблиця 5.1

### Відповідність серій рідкого екстракту листа зеленого чаю параметрам його стандартизації

Показники якості	Параметри стандартизації	Результати аналізу серії				
		3	4	5	6	7
Опис	Рідина темно-коричневого кольору з характерним запахом	✓	✓	✓	✓	✓



1	2	3	4	5	6	7
Ідентифікація						
Якісні реакції	1 мл рідкого екстракту розчиняють у 10 мл <i>етанолу</i> (60 % об/об) <i>P</i> . Отриманий розчин використовують для проведення якісних реакцій. До 1,0 мл вихідного розчину додають 1,0 мл 10 г/л розчину <i>заліза (III) хлориду P</i> ; з'являється зелене забарвлення (фенольні сполуки)	✓	✓	✓	✓	✓
Метод ТШХ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– пластинка з шаром <i>силікагелю P</i></li> <li>– розчин порівняння: <i>епікатехін</i>, <i>епігалокатехін-3-О-галат</i></li> <li>– рухома фаза: <i>толуол P</i> : <i>ацетон P</i> : <i>мурашина кислота безводна P</i> (9 : 9 : 2)</li> <li>– відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см</li> <li>– розчинник: <i>метанол P</i></li> <li>– проявлення: 10 г/л <i>ваніліну P</i> в <i>хлористоводневій кислоті розведеної P</i>.</li> <li>– перегляд при денному світлі</li> </ul>	✓	✓	✓	✓	✓
Випробування						
Вміст етанолу	Не менше 60,00 %	✓ (65)	✓ (68)	✓ (65)	✓ (64)	✓ (65)
Метанол і 2-пропанол	Не більше 0,05 % (об/об) метанолу і 0,05 % 2-пропанолу	✓ (0,02)	✓ (0,03)	✓ (0,03)	✓ (0,02)	✓ (0,02)
Сухий залишок	Не менше 20,00 %	✓ (22,1)	✓ (23,2)	✓ (24,5)	✓ (23,5)	✓ (24,0)
Важкі метали	Не більше 100 ppm	✓	✓	✓	✓	✓
Мікробіологічна чистота	В 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій та грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій в 1 г; не допускається наявність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	✓	✓	✓	✓	✓

Закінчення табл. 5.1

1	2	3	4	5	6	7
Кількісне визначення						
Вміст суми фенольних сполук	Вміст суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту – не менше 17,00 %	✓ (17,11)	✓ (18,10)	✓ (18,21)	✓ (17,30)	✓ (17,50)
Вміст гідроксикоричних кислот	Вміст суми гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту – не менше 1,00 %	✓ (1,20)	✓ (1,34)	✓ (1,40)	✓ (1,32)	✓ (1,35)
Антиоксидантна активність	Антиоксидантна активність повинна бути не менше 529 ммоль-екв./m <sub>сух. зал.</sub>	✓ (548,79)	✓ (553,11)	✓ (560,11)	✓ (550,15)	✓ (555,60)

Примітки: «✓» - відповідає параметру, «-» - не відповідає параметру

Встановлено, що вони відповідають розробленим параметрам.

## 5.2 Розробка технології одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю

Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 19.12.2013 №1114 затверджені «Гігієнічні вимоги до дієтичних добавок» [48], де надається перелік вітамінів та мінеральних речовин, які можуть входити до складу дієтичних добавок. Такий перелік наводиться і в статті «Дієтичні добавки» ДФУ. Згідно зазначених вимог мінімальний вміст кожного вітаміну та/або мінеральної речовини в рекомендованій добовій кількості (порцій) дієтичної добавки повинен становити не менше 15% від рекомендованої добової кількості споживання (добова потреба) вітаміну та/або мінеральної речовини.

Рекомендована добова кількість споживання вітамінів, мінеральних речовин, вуглеводів, білків, жирів вказана в «Нормах фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії», що затверджені Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 03.09.2017 №1073 [49]. Цей законодавчий акт можна використовувати для обґрунтування складу дієтичної добавки.

Максимальний вміст окремих речовин, які характеризують продукт або які вказують на походження, науково обґрунтовуються та встановлюються на підставах [154].

Для розробки лікарської форми на основі рідкого екстракту листя зеленого чаю нами було розглянуто такі варіанти лікарської форми: порошки, гранули та таблетки. Порошки досить незручні, при тривалому зберіганні вони можуть відволочуватись і розшаровуватись. Таблетки вважаються більш зручною лікарською формою для зберігання та прийому. Однак внаслідок сильного механічного впливу в процесі пресування відбувається зниження розпадання таблетки та зменшення біодоступності. Таким чином, оптимальною лікарською формою на нашу думку є гранули, які мають ряд переваг у порівнянні з таблеткою. По-перше, швидкість розпадання гранул дуже висока, що збільшує біодоступність діючих речовин. По-друге, гранули зручні тим, що дозволяють екстемпорально готувати розчини.

Як наповнювач використовували міо-інозитол. Вибір на цей наповнювач припав з низки причин. Порівняно з іншими наповнювачами, такими як глюкоза, лактоза, сахароза, міо-інозитол підвищує чутливість до інсуліну і збільшує поглинання глюкози клітини, таким чином міо-інозитол може бути застосований хворими, які страждають на цукровий діабет I і II типу [33]. Відповідно до останніх наукових досліджень міо-інозитол впливає на функціонування сперматозоїдів, регулюючи осмолярність та об'єм насінневої плазми, експресію білків, необхідних для ембріонального розвитку та рухливості сперматозоїдів. Також було встановлено, що міо-інозитол потенціює овуляцію, для лікування полікістозу яєчників і безпліддя [56].

Основною діючою біологічно активною речовиною зеленого чаю є катехіни, які мають один з найвищих рівнів антиоксидантної активності серед фенольних сполук [181, 88].

На наш погляд комбінація катехінів зеленого чаю і міо-інозитулу є найбільш оптимальною не тільки при застосуванні як антиоксидантного засобу, але і як засобу для профілактики лікування простатиту, полікістозу яєчників, онкологічних захворювань, безпліддя, підвищення фертильності.

Гранули отримували шляхом вологого гранулювання. До розрахованої кількості міо-інозитулу (900,0 г) додавали свіжоодержаний рідкий екстракт листя зеленого чаю в кількості 100,0 г. Додавати його потрібно невеликими порціями до отримання однорідної вологої маси, яка, не прилипаючи до пальців, зминається в «снігову» грудку (досить зволожена маса), додавали 70 % етанол. Зволожену масу переносили на перфоровану пластинку (гранулятор) з діаметром отворів 3 мм і протирали. Гранулят сушили у вакуумній сушильній шафі. Висушений гранулят протирали крізь сито з діаметром отворів 3 мм, відсівали від пилу крізь сито з діаметром отворів 1 мм. Отриманий гранулят опудрювали магнію стеаратом, фасували в саше по 5,0 г. Пакували саше і інструкцію до застосування у пачки та упаковували пачки у коробки, наносили групові етикетки.

Схема одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю наведена на рис. 5.2.

Були визначені такі технологічні параметри гранул з екстрактом листя зеленого чаю: фракційний склад, вологість, насипна маса, плинність, кут природного нахилу, розпадання (табл. 5.2.).

Таблиця 5.2

## Технологічні параметри гранул з екстрактом листя зеленого чаю

№ серії	Фракційний склад, %					Вологість, %	Щільність до усадки, г/см <sup>3</sup>	Щільність після усадки, г/см <sup>3</sup>	Плинність, г/с	Кут природного нахилу, °	Розпадання, с
	3–2 мм	2–1 мм	1–0,5 мм	0,5–0,25 мм	<0,25 мм						
1	21,50	48,7	14,1	11,1	4,6	2,80	0,49	0,54	8,10	31	42
2	17,9	44,3	23,2	12,4	3,5	3,10	0,51	0,56	8,00	30	45
3	23,2	44,2	20,1	8,1	4,4	2,95	0,52	0,58	8,25	33	41
4	18,2	46,1	22,3	10,5	3,7	3,00	0,51	0,57	8,00	32	42
5	20,1	47,5	16,1	9,4	4,0	3,12	0,49	0,56	8,25	31	43

Отримані гранули - крупинки неправильної форми, коричневого кольору. Було встановлено, що фракційний склад становить від 17,9 до 23,2 % для гранул 3 – 2 мм, від 44,2 до 48,7 % для гранул 2 – 1 мм, від 20,1 до 23,2 % для гранул 1 – 0,5 мм, 8,1 – 12,4 % для гранул 0,5 – 0,25 мм, 3,5 – 4,6 % для гранул < 0,25 мм. Вологість гранул визначена в межах 2,80 – 3,10 %; щільність до усадки становить від 0,49 до

0,52 г/см<sup>3</sup>, щільність гранул після усадки - від 0,54 до 0,58 г/см<sup>3</sup>, плинність була встановлена в інтервалі 8,00 – 8,25 г/с, кут природного нахилу становить від 30 до 33°, розпадання – від 41 до 45 с.

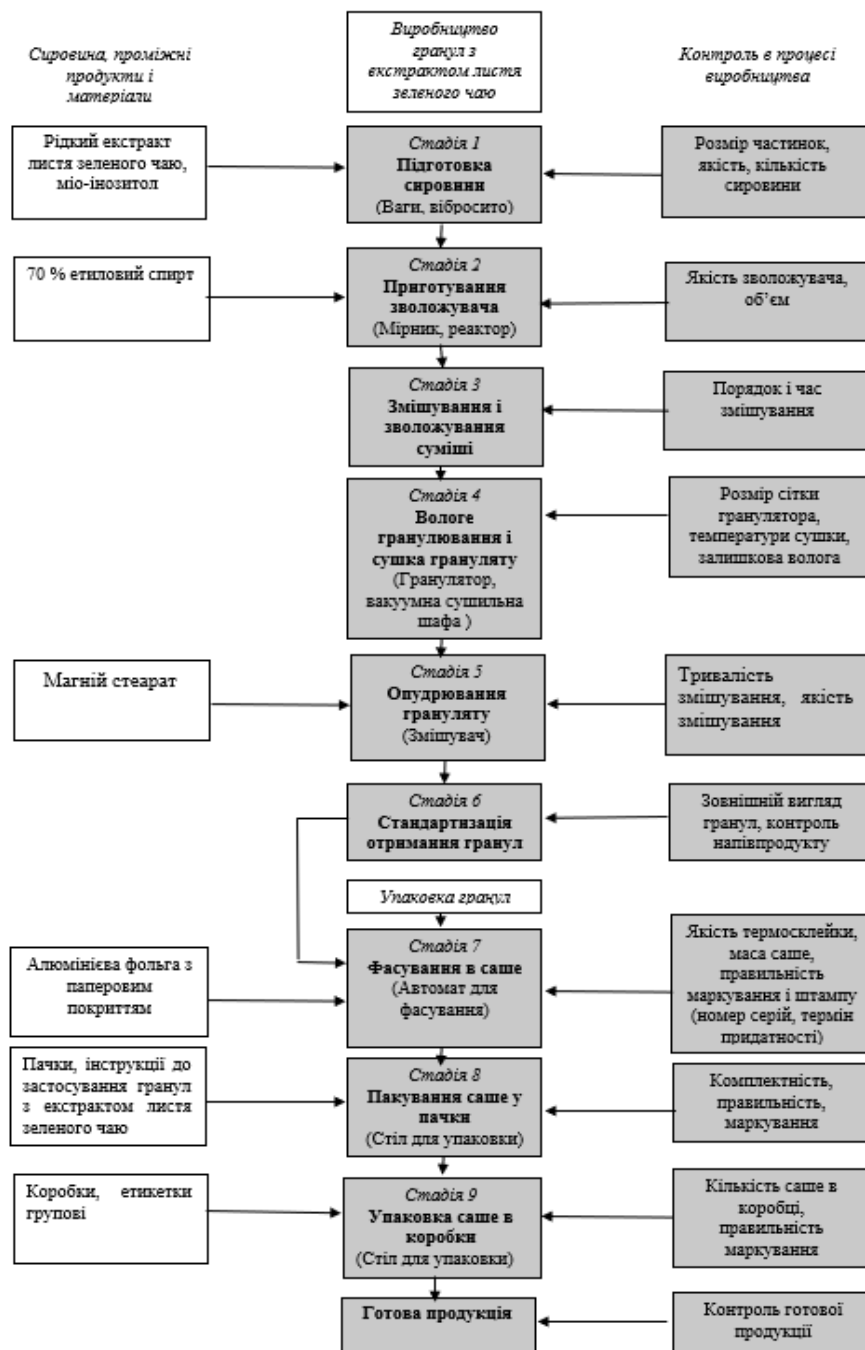


Рис. 5.2 Технологічна схема одержання гранул з екстрактом листя зеленого

чаю

### 5.3 Розробка специфікації та стандартизація гранул з екстрактом листя зеленого чаю

Стандартизацію гранул з екстрактом листя зеленого чаю проводили на п'яти серіях, методики стандартизації розроблені відповідно до загальних статей та методик кількісного визначення БАР, які вказані в ДФУ 2.0 (табл. 5.3) [12].

*Опис.* Крупинки неправильної форми коричневого кольору зі слабким запахом.

*Ідентифікація*

*А. Вихідний розчин.* 1 г розтертих гранул розчиняють в 10 мл води Р. Отриманий розчин використовують для проведення якісних реакцій.

До 1,0 мл вихідного розчину додають 1,0 мл 10 г/л розчину заліза (III) хлориду Р; з'являється зелене забарвлення (фенольні сполуки).

*В. Тонкошарова хроматографія* (ДФУ, 1 вид., 2.2.27).

*Досліджуваний розчин.* 1,0 г розтертих гранул розчиняють в 10 мл води Р, фільтрують через паперовий фільтр, розчинник видаляють, залишок розчиняють в 1 мл метанолу Р.

*Розчин порівняння.* 5 мг епікатехіну і 5 мг епігалокатехін-3-О-галату розчиняють в 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка з шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза:* толуол Р : ацетон Р : мурашина кислота безводна Р (9 : 9 : 2).

*Об'єм проби, який наноситься:* 30 мкл, смугами.

*Відстань, яку має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі.

*Виявлення:* пластинку обприскують розчином 10 г/л ваніліну Р в хлористоводневій кислоті розведеної Р, висушують на повітрі протягом 5 хвилин і переглядають при денному світлі.

*Результати А.:* нижче (рис. 5.3) наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння. На хроматограмі розчину порівняння мають проявлятися у вигляді двох червоних зон: вище середини – зона (-)-епікатехіну; у нижній третині хроматограми – зона (-)-епігалокатехін-3-О-галату.

На хроматограмі випробуваного розчину повинні виявлятися червона зона на рівні зони (-)-епігалокатехін-3-О-галлату та червона зона на рівні зони (-)-епікатехіну. На хроматограмі випробуваного розчину можуть виявлятися також інші червоні зони.

Верхня частина пластинки	
(-)-епікатехін (червона зона)	червона зона
(-)-епігалокатехін-3-О-галлат (червона зона)	червона зона
Розчин порівняння	Випробуваний розчин

Рис. 5.3 Схема хроматограм випробуваного розчину і розчину порівняння

*Втрата в масі при висушуванні:* не більше 5,0 % (ДФУ, 2.8.17).

*Розпадання.* Протягом не більше 15 хвилин (ДФУ, 2.9.1).

*Розмір гранул.* від 3,0 до 0,2 мм (ДФУ, 2.9.12).

*Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу.* Препарат витримує випробування, якщо вміст у кожній його однодозованій одиниці знаходиться в межах 85 – 115 % від середнього вмісту (ДФУ, 2.9.6).

*Мікробіологічна чистота.* Для фітохімічних засобів характерне мікробне обсіменіння, тому слід контролювати кількість життєздатних бактерій та грибів в препараті. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12.

Для визначення загальної кількості життєздатних аеробних бактерій 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату.

По 1 мл підготовленого зразка сіяли двошаровим методом на кожну з п'яти чашок Петрі з густим живильним середовищем № 1.

Для визначення загальної кількості життєздатних грибів 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату.

По 1 мл підготовленого зразка сіяли двошаровим методом на кожну з п'яти чашок Петрі з густим живильним середовищем № 2.

Для випробування на наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* 10 г препарату поміщали в стерильний мірний посуд, доводили до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містить 10 % полісорбату-80 і 20 % ізопропілміристату. По 50 мл підготовленого зразка вносили в 500 мл поживних середовищ № 3 і 8.

Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до вимог ДФУ, 5.1.4, категорія 2. У препараті допускається загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 100 мікроорганізмів (бактерій та грибів сумарно) в 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій та інших грам-негативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

#### *Кількісне визначення*

*Сума фенольних сполук* у гранулах з екстрактом зеленого чаю визначалась спектрофотометричним методом у перерахунку на галову кислоту за ДФУ 2.2.25.

*Вихідний розчин.* 10,0 г розтертих гранул розчиняють в 100,0 мл води Р, фільтрують через паперовий фільтр у мірну колбу на 200,0 мл і доводять об'єм до мітки тим же розчинником (розчин 1).

*Випробовуваний розчин.* 1 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, додають 1,0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактива Р, 10,0 води Р і доводять розчином 290 г/л натрій карбонату Р до мітки, перемішують (розчин 2).

*Компенсаційний розчин.* Вода Р.



*Стандартний розчин.* 50 мг (точна наважка) галової кислоти *P* кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 200 мл, розчиняють в етанолі 70 (% об/об) *P* і доводять до мітки тим самим розчинником. 5 мл приготованого розчину поміщають в мірну колбу об'ємом 25 мл і доводять до мітки етанолом 70 (% об/об) *P*.

Через 30 хв після приготування вимірюють оптичну густина розчину 2 за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст суми фенольних сполук (*X*) у перерахунку на галову кислоту, в грамах в одній дозі обчислюють за формулою (5.4):

$$X(\%) = \frac{62,5 \cdot A_1 \cdot m_2 \cdot m_3}{A_2 \cdot m_1}, \quad (5.4)$$

де:

$A_1$  – оптична густина досліджуваного розчину;

$A_2$  – оптична густина стандартного розчину галової кислоти;

$m_1$  – маса досліджуваного зразка, г;

$m_2$  – маса галової кислоти, г;

$m_3$  – середня маса однієї дози гранул, г.

Вміст суми фенольних сполук має становити від 315 мг/5г до 385 мг/5г.

*Вміст гідроксикоричних кислот.*

*Вихідний розчин.* 10,0 г розтертих гранул розчиняють в 100,0 мл води *P*, фільтрують через паперовий фільтр у мірну колбу на 200,0 мл і доводять об'єм до мітки тим же розчинником (розчин 1).

*Випробовуваний розчин.* До 4,0 мл вихідного розчину додають 2 мл 0,5 *M* розчину хлористоводневої кислоти, 2 мл розчину, приготованого розчиненням 10 г натрію нітриту *P* і 10 г натрію молібдату *P* в 100 мл води *P*, потім додають 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного *P*, доводять об'єм водою *P* до 10,0 мл і перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 4,0 мл випробовуваного розчину, 2 мл 0,5 *M* розчину хлористоводневої кислоти, 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного *P* змішують та доводять об'єм розчину водою *P* до об'єму 10,0 мл.

Оптичну густина випробуваного розчину одразу після приготування вимірюють за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту в грамах в одній дозі обчислюють за формулою (5.5):

$$X(\%) = \frac{A \cdot 3,3 \cdot m_2}{m_1}, \quad (5.5)$$

де:

A – оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 525 нм;

$m_1$  – маса досліджуваного зразка, г;

$m_2$  – середня маса однієї дози гранул, г.

Вміст суми гідроксикоричних кислот має становити від 20,25 мг/5г до 24,75 мг/5г.

#### *Антиоксидантна активність*

Антиоксидантну активність гранул з екстрактом листя зеленого чаю визначали потенціометричним методом.

1,0 мл розчину А поміщають у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, доводять до мітки етанолом 60 (% об/об.) Р. 1,0 мл приготованого розчину поміщають в електрохімічну комірку. Вимірюють зміну потенціалу медіаторного розчину. Рівень АОА дієтичної добавки розраховували в ммоль-екв./ $m_{\text{сух.зал}}$  за формулою (5.6):

$$AOA = \frac{C_{ox} - \alpha \cdot C_{red}}{1 + \alpha} \cdot K_{dil} \cdot 10^3 \cdot V, \quad (5.6)$$

де:

$$\alpha = C_{ox}/C_{red} \cdot 10^{(\Delta E - E_{стан})nF / 2.3RT},$$

$C_{ox}$  – концентрація  $K_3[Fe(CN)_6]$ , М ;

$C_{red}$  – концентрація  $K_4[Fe(CN)_6]$ , М;

$\Delta E$  – різниця потенціалів до та після взаємодії з антиоксидантом;

$E_{стан} = 0,0546 \cdot C_{\%} - 0,0091$ ;  $C_{\%}$  – концентрація спирту;

F = 96485,333 Кл/моль - стала Фарадея;

n = 1 – кількість електронів в електродній реакції;

$R = 8,314 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}$  - універсальна газова стала;

$T = 298 \text{ }^\circ\text{К}$ ;

$K_{\text{dil}}$  – коефіцієнт розведення;

$V$  – об'єм, в якому розчиняли таблетку дієтичної добавки, мл.

Антиоксидантна активність повинна становити 234,90 до 298,10 ммоль-екв./ $m_{\text{сух.зал.}}$ .

Таблиця 5.3

### Відповідність серій гранул з екстрактом листа зеленого чаю параметрам його стандартизації

Показники якості	Параметри якості	Результати аналізу серій				
		3	4	5	6	7
1	2					
Опис	Крупинки неправильної форми коричневого кольору зі слабким запахом	✓	✓	✓	✓	✓
Ідентифікація						
Якісні реакції	1 г розтертих гранул розчиняють в 10 мл води <i>P</i> . Отриманий розчин використовують для проведення якісних реакцій. До 1,0 мл вихідного розчину додають 1,0 мл 10 г/л розчину заліза (III) хлориду <i>P</i> ; з'являється зелене забарвлення (фенольні сполуки)	✓	✓	✓	✓	✓
Метод ТШХ	<ul style="list-style-type: none"> <li>– пластинка з шаром <i>силікагелю P</i></li> <li>– розчин порівняння: епікатехін, епігалокатехін-3-О-галат</li> <li>– рухома фаза: <i>толуол P</i> : <i>ацетон P</i> : <i>мурашина кислота безводна P</i> (9 : 9 : 2)</li> <li>– відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см</li> <li>– розчинник: <i>метанол P</i></li> <li>– проявлення: 10 г/л <i>ваніліну P</i> в <i>хлористоводневій кислоті розведеної P</i></li> <li>– перегляд при денному світлі</li> </ul>	✓	✓	✓	✓	✓
Випробування						
Втрата в масі при висуванні	не більше 5,0 %	✓ (3,2)	✓ (2,8)	✓ (3,1)	✓ (3,0)	✓ (3,1)
Розпадання	протягом не більше 15 хвилин	✓ (40 с)	✓ (45 с)	✓ (43 с)	✓ (42 с)	✓ (43 с)

1	2	3	4	5	6	7
Розмір гра- нул	від 3,0 до 0,2 мм	✓	✓	✓	✓	✓
Однорід- ність вмісту дію- чої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу	від 85 до 115 % від середнього вмісту	✓	✓	✓	✓	✓
Мікробіоло- гічна чистота	В 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій та грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій в 1 г; не допускається наявність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	✓	✓	✓	✓	✓
Кількісне визначення						
Вміст суми фенольних сполук	Вміст суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту від 315 мг/5г до 385 мг/5г	✓ (346)	✓ (342)	✓ (338)	✓ (340)	✓ (345)
Вміст гідро- кислоричних кислот	Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту від 20,25 мг/5г до 24,75 мг/5г	✓ (23,10)	✓ (22,50)	✓ (21,00)	✓ (22,30)	✓ (23,00)
Антиоксида- нтна актив- ність	Антиоксидантна активність від 234,90 до 298,10 ммоль-екв./ м <sub>сух.зал.</sub>	✓ (275,20)	✓ (273,35)	✓ (267,00)	✓ (268,40)	✓ (275,40)

Примітки: «✓» - відповідає параметру, «-» - не відповідає параметру

Встановлено, що вони відповідають розробленим параметрам.

#### 5.4 Стандартизація дієтичної добавки «Кахінол» на основі екстракту листя зеленого чаю згідно вимогам ДФУ

Дієтична добавка «Кахінол» на основі екстракту листя зеленого чаю була стандартизована за наступними параметрами: ідентифікація, важкі метали, афлотоксин, мікробіологічна чистота, залишкова кількість пестицидів, радіонукліди, кількісний вміст та антиоксидантна активність (табл. 5.4). У розділі 4 наведені розроблені параметри щодо вмісту катехинів та антиоксидантної активності.

## Відповідність дієтичної добавки «Кахінол» показникам якості

Показник	Вимоги	Результати аналізу серій ДД «Кахінол»				
Ідентифікація						
Катехіни	При хроматографуванні дослідженого розчину дієтичної добавки у системі: <i>толуол</i> : <i>ацетон</i> : <i>мурашина кислота</i> (9 : 9 : 2) повинно спостерігатися розділення катехінів на 4 смуги, які при проявленні 1 % розчином ваніліну забарвлюються у червоний колір	✓	✓	✓	✓	✓
Кофеїн	≤0,1%	✓	✓	✓	✓	✓
Важкі метали	Pb ≤ 6,0 мг/кг As ≤ 0,5 мг/кг Cd ≤ 1,0 мг/кг Hg ≤ 0,1 мг/кг	✓	✓	✓	✓	✓
Афлотоксин	Афлотоксин В <sub>1</sub> ≤ 2 мкг/кг	✓	✓	✓	✓	✓
Мікробіологічна чистота	В 1 г препарату допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10 <sup>4</sup> бактерій і не більше 10 <sup>2</sup> грибів у грамі. Не допускається наявність бактерій род. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г.	✓	✓	✓	✓	✓
Залишкова кількість пестицидів	Гексахлорциклогексан ≤ 0,1 мг/кг Гептахлор, алдрин – не допускається	✓	✓	✓	✓	✓
Радіонукліди	Cs-132 ≤ 600 Бк/кг Sr-90 ≤ 200 Бк/кг	✓	✓	✓	✓	✓
Кількісний вміст						
Сума фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту	не менше 45 мг (кільк. добова)	✓ (700 мг)	✓ (705 мг)	✓ (703 мг)	✓ (700 мг)	✓ (702 мг)
АОА	не менше 84,30 ммоль-екв./г (кільк. добова)	✓ (536,20 ммоль-екв./г)	✓ (540,01 ммоль-екв./г)	✓ (538,01 ммоль-екв./г)	✓ (536,01 ммоль-екв./г)	✓ (537,01 ммоль-екв./г)

Примітка. «✓» - відповідає параметру, «-» - не відповідає параметру

За результатами було визначено, що досліджені серії дієтичної добавки «Кахінол» відповідають висунутим ДФУ вимогам. «Кахінол» є якісною та безпечною дієтичною добавкою, що виявляє антиоксидантну дію і може бути застосована при СПЯ та недостатності репродуктивної активності.

### **Висновки до розділу 5.**

1. Вперше розроблено параметри стандартизації рідкого екстракту листя зеленого чаю, досліджено 5 серій на відповідність розробленим вимогам та розроблено проект МКЯ «Екстракт зеленого чаю рідкий».
2. Обґрунтовано склад і технологію одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю; розроблено параметри їх стандартизації досліджено 5 серій на відповідність розробленим вимогам.
3. Проведена стандартизація дієтичної добавки «Кахінол» за вимогами ДФУ і параметром антиоксидантної активності.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Development the composition and technology for obtaining a dietary supplement “Cachinol” with the antioxidant activity in the form of granules used in the polycystic ovary syndrome / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, T.A. Kostina, K.V. Dynnyk. *News of Pharmacy*. 2022. Vol. 103, №. 1. P. 42–47. DOI: 10.24959/nphj.22.77
2. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Шовкова З.В., Ахмедов Е.Ю., Полуян С.М., Мороз В.П., Погосян О.Г., Костіна Т.А., Бризицький О.А. Спосіб одержання засобу з антиоксидантною дією з листя зеленого чаю : пат. 150496 Україна : А61К 127/00, А61Р 39/06, А61К 36/82. № u202105657 ; заявл. 07.10.2021 ; опубл. 23.02.2022, Бюл. № 8. 3 с.
3. Маслов О. Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Кошовий О.М., Пономаренко С.В., Осолодченко Т.П., Голік М.Ю., Колісник Ю.С., Костіна Т.А., Алтухов О.О., Ахмедов Е.Ю. Спосіб одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю з антиоксидантною дією : пат. 151690 Україна : А61К 36/82; А61К 31/7004; А61Р 39/06. № u 2021 07135 ; заявл. 10.12.2021 ; опубл. 31.08.2022, Бюл. № 35. 3 с.
4. Маслов О. Ю., Комісаренко М. А., Колісник С. В. Дослідження антиоксидантної активності дієтичної добавки «Кахінол» з екстрактом листя зеленого

- чаю. «Запорізький фармацевтичний форум - 2021»: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р., Запоріжжя: ЗДМУ, 2021. С. 68.
5. Маслов О. Ю., Комісаренко М. А. Дослідження технологічних властивостей гранул з екстрактом листя зеленого чаю. *Youth pharmacy science*: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, Україна, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 174.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено результати експериментального вирішення наукової задачі, яка полягає у фітохімічному вивченні екстрактів листя зеленого чаю та розробці методів аналізу лікарських засобів з антиоксидантною дією, створених на їх основі.

1. Обґрунтовано доцільність визначення антиоксидантної активності потенціометричним методом; обрані оптимальний робочий електрод, електроліт і склад медіаторної системи. Розроблено підхід і запропоновано рівняння для розрахунку сумарної АОА з урахуванням впливу концентрації етанолу.

2. Розроблена потенціометрична методика визначення антиоксидантної активності епігалокатехін-3-О-галату, проведена її валідація за показниками: лінійність, правильність, збіжність і проміжна прецизійність. Встановлено АОА максимальної допустимої рекомендованої добової дози ЕГКГ (562 ммоль-екв./г) і дієтичних добавок «Green Tea Extract» (Source Naturals, США) – 205,00 ммоль-екв./г, «Екстракт зеленого чаю» (Еліт-фарм, Україна) – 104,10 ммоль-екв./г, «Зелений чай» (Pharmacom, Україна) – 60,05 ммоль-екв./г. Запропоновані терміни, що виражають рівень антиоксидантної активності.

3. Проведено стандартизацію листя зеленого чаю відповідно вимог ЄФ 9.0 за параметрами: опис, макроскопія, мікроскопія, ідентифікація (тонкошарова хроматографія), втрата в масі при висушуванні (не більше 8,0 %), загальна зола (не більше 9,0 %), вміст катехінів (не менше 8,5 %) і кофеїну (не менше 1,5 %). Фітохімічний скринінг основних груп БАР листя зеленого чаю показав наявність катехінів, флавоноїдів, алкалоїдів, гідроксикоричних та органічних кислот. ТШХ-аналізом ідентифіковані епікатехін, епігалокатехін-3-О-галат, рутин, кофеїн, хлорогенова, лимона, бурштинова і оксалатна кислоти в досліджуваних дієтичних добавках - епігалокатехін-3-О-галат, епікатехін і слідові кількості кофеїну.

4. Спектрофотометричним методом встановлено, що в листі зеленого чаю сумарний вміст фенольних сполук становить 24,12 %, катехінів – 20,79 %, флавоноїдів – 1,27 %, гідроксикоричних кислот – 0,67 % і кофеїну – 2,56 %. Методом ВЕРХ в сировині було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 4 флавонолів (1,34



%), 3 флавононів (0,25 %), 2 флавонів (0,64 %), 4 фенолкарбонових кислот (1,39 %) і домінуючих флаван-3-олів (20,56 %).

5. Визначені оптимальні умови екстракції органічних кислот і за розробленою потенціометричною методикою встановлено сумарний вміст вільних органічних кислот в сировині (1,83 %). Для визначення кількісного вмісту катехінів у дієтичних добавках розроблена спектрофотометрична методика, відповідно якої встановлено, що сумарний вміст катехінів у «Green Tea Extract» складає  $156,80 \pm 1,36$  мг, «Екстракт зеленого чаю» –  $89,00 \pm 0,88$  мг, «Зеленому чаї» –  $38,00 \pm 0,75$  мг. Дієтичні добавки «Green Tea Extract» і «Екстракт зеленого чаю» відповідають вимогам Фармакопеї США 38 щодо вмісту катехінів; три досліджувані ДД за всіма критеріями також відповідають вимогам ДФУ 2.3.

6. Відповідно до розробленої методики визначено сумарну антиоксидантну активність листя, спиртових настоянок і настою зеленого чаю. Максимальна сумарна антиоксидантна активність листя зеленого чаю становить  $660,75$  ммоль-екв./ $m_{\text{сук.зал.}}$ ; настоянка на 60 % етанолі виявляє активність на рівні  $48,27 \pm 1,44$  ммоль/ $m_{\text{сук. зал.}}$ , 96 % настоянка дещо їй поступається ( $47,49 \pm 1,42$  ммоль/ $m_{\text{сук. зал.}}$ ), а активність настою - в 2,7 разів менша.

7. Результати досліджень кількісного вмісту основних груп БАР показали, що з листя зеленого чаю 60 % етанолом забезпечується найкраще вилучення катехінів; оптимальна кратність екстракції складає два рази, що використано при розробці технології одержання нових екстрактів з цієї сировини.

8. Встановлені параметри стандартизації рідкого екстракту листя зеленого чаю. Досліджено 5 серій на відповідність розробленим вимогам та розроблено проєкт МКЯ «Екстракт зеленого чаю рідкий». Обґрунтовано склад, технологію і розроблено параметри стандартизації гранул з екстрактом листя зеленого чаю. Проведена стандартизація дієтичної добавки «Кахінол».

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Аналіз ринку дієтичних добавок, що впливають на органи дихання / А.С. Гоцуля и др. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*. 2019. Т. 12, № 3(13). С. 329-333.
2. Антивирусные полифенолы-антиоксиданты: структура, пищевые источники и механизм действия / А.Я. Яшин и др. *Лаборатория и производство*. 2020. № 5. С. 76-86.
3. Антиоксиданты: ® Интернет-магазин «SportShop». URL: <https://sportshop.com.ua/myprotein-green-tea-extract-plus-90-caps> (дата обращения: 19.10.2021).
4. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине / С. А. Шахмарданова и др. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016. № 3. С. 1-15.
5. Бады для снижения веса: аптека «АНЦ». URL: <https://anc.ua/ru/item/zelenyyu-chay-ekstrakt-osokor-kaps-60-krasota-i-zdorove-ukraina-1060004> (дата обращения: 19.10.2021).
6. Барабой В.А. Катехины чайного растения: структура, активность, применение. *Біотехнологія*. 2008. Т. 1, № 3. С. 25-36.
7. Ваваев А.В., Максименко А.В. Ферментные антиоксиданты на пути к практической медицине. *Кардиологический вестник*. 2009. Т. 4, № 2. С. 66-70.
8. Витамины и минералы: ® Интернет-магазин «Алло». URL: <https://allo.ua/ru/vitaminy-i-mineraly-dlja-sportsmenov/vitaminy-bluebonnet-nutrition-egcg-green-tea-60vegkaps-71393008.html> (дата обращения: 19.10.2021).
9. Вяткин А.В., Пастушкова Е.В., Феофилактова О.В. Обзор методов определения общей антиоксидантной активности. *Современная наука и инновации*. 2018. № 1. С. 58-66.
10. Газизуллина Е.Р. Новый потенциометрический способ оценки антирадикальной емкости. : дис.... канд. : 02.00.02 / Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. Екатеринбург, 2019. 154 с.

11. Гоцуля Т.С., Самко А.В., Галиця В.В. Дієтичні добавки у фармації. *Запорозький медичинський журнал*. 2011. Т. 13, № 2. С. 33-37.
12. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
13. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
14. Диетическая добавка "Green Tea" Jarrow Formulas: ® Интернет-магазин «Makeup». URL: <https://makeup.com.ua/product/874061/> (дата обращения: 19.10.2021).
15. Диетическая добавка "Green Tea" Now foods: ® Интернет-магазин спортивного питания «BCAA». URL: [https://bcaa.ua/zhiroszhigateli/ekstrakt\\_zelenogo\\_chaya/green\\_tea\\_extract\\_400\\_mg\\_100\\_veg\\_capsules](https://bcaa.ua/zhiroszhigateli/ekstrakt_zelenogo_chaya/green_tea_extract_400_mg_100_veg_capsules) (дата обращения: 19.10.2021).
16. Диетические добавки: ® Интернет-магазин «Prymaflora». URL: <https://prymaflora.com/ru/product/amber-with-green-tea-extract> (дата обращения: 19.10.2021).
17. Диетические добавки: ® Интернет-магазин «SVITOVODREVO». URL: <https://svitovederevo.com.ua/tulsi-green-tea-organic-india-100g.html> (дата обращения: 19.10.2021).
18. Диетические добавки: ® Интернет-магазин «Зелена аптека». URL: [https://zt-zelenaapteka.com.ua/index.php?route=product/manufacturer/info&manufacturer\\_id=17](https://zt-zelenaapteka.com.ua/index.php?route=product/manufacturer/info&manufacturer_id=17) (дата обращения: 19.10.2021).
19. Диетические добавки: сайт производителя «МЕДАГОПРОМ» URL: <https://medagroprom.prom.ua/p687611741-gel-zelenyj-chaj.html> (дата обращения: 19.10.2021).

20. Дієтичні добавки: доцільність вивчення питань щодо їх аналізу та контролю якості на додипломному етапі підготовки провізорів / І.І. Геращенко и др. *Фітотерапія*. 2013. № 1. С. 80-82.
21. Дослідження якісного складу та кількісного вмісту деяких груп біологічно активних речовин у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю / О.Ю Маслов та ін.. *Запорожский медицинский журнал*. 2020. Том 23, № 1(124). С. 132-137.
22. Евлащенко И.В., Аскалепова О.И., Алешина И.Г. Определение содержания кофеина в чае и кофе классическими аналитическими методами. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2000. № 2-3. С. 88-90.
23. Жиросжигатели: ® Интернет-магазин «Bio.org.ua». URL: [https://bio.org.ua/ru/item/16519zenwise\\_health\\_green\\_tea\\_extract\\_with\\_egcg\\_vitamin\\_120\\_vegetarian\\_capsules](https://bio.org.ua/ru/item/16519zenwise_health_green_tea_extract_with_egcg_vitamin_120_vegetarian_capsules) (дата обращения: 19.10.2021).
24. Жиросжигатели: ® Интернет-магазин «GymBeam». URL: <https://gymbeam.ua/ru/zhiriszigatel-green-tea-gymbeam.html> (дата обращения: 19.10.2021).
25. Жиросжигатели: ® Интернет-магазин «Nosorog». URL: <https://nosorog.ua/zhiroszhigateli/nosorog-green-tea-extract> (дата обращения: 19.10.2021).
26. Закон України № 2042-19 «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин». *Відомості Верховної Ради*. 2017. № 31. С. 343. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/2042-19> (дата звернення 18.07.2018).
27. Закон України № 771/97-ВР «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів». *Відомості Верховної Ради України*. 1998. № 19. С. 98. URL: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/771/97-%D0%B2%D1%80> (дата звернення 24.06.2018).
28. Закон України №1602-VII «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів». *Відомості Верховної Ради*. 2014. № 41-42.

- С. 20-24. URL: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/1602-18>, (дата звернення 24.06.2018).
29. Здоровье: ® Интернет-магазин «Amway». URL: <https://www.amway.ua/ru/xs-rodyola-plus-xs/p/101593> (дата обращения: 19.10.2021).
30. Зеленый чай для похудения: ® Интернет-магазин «Bigl». URL: <https://bigl.ua/p1121850665-zelenyj-chaj-dlya> (дата обращения: 19.10.2021).
31. Зеленый чай экстракт: ® Интернет-магазин «Pharmakom». URL: <https://shop.farmakom.com.ua/zelenyy-chay-ekstrakt.html> (дата обращения: 19.10.2021).
32. Иванова А.В. Потенциометрия в исследовании антиоксидантных и антирадикальных свойств веществ: докторская диссертация. : дис.... д-ра хим. наук : 02.00.02 / Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. Екатеринбург, 2019. 350 с.
33. Калугина Л.В., Калугина Л.В., Юско Т.И. Мио-инозитол: терапевтические возможности и преграви-дарная подготовка при синдроме поликистозных яичников. *Репродуктивная эндокринология*. 2018. № 4. С. 31-32.
34. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н.В. Безручко и др. *Вестник Томского государственного педагогического университета*. 2012. Т. 7, № 122. 94-98.
35. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Физиологические функции неэнзиматических антиоксидантов растений. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*. 2015. № 2. С. 6-25.
36. Контроль веса: ® Интернет-магазин «Vitaminka». URL: <https://vitaminka.com.ua/zelenyy-chay-ekstrakt-green-tea-extract-swanson-500-mg-60-kapsul> (дата обращения: 19.10.2021).
37. Коррекция веса: ® Интернет-магазин «STYLUS». URL: <https://stylus.ua/puritans-pride-green-tea-standardized-extract-315-mg-200-caps-p442733c12827.html> (дата обращения: 19.10.2021).

38. Кузнецова О.М., Останіна Н.В. Вивчення та аналіз ситуації щодо споживання дієтичних добавок населенням України. *Довкілля та здоров'я*. 2020. Т. 3, № 96. С. 25 – 32
39. Максименко А.В., Ваваев А.В. Ферментные антиоксиданты следующий этап фармакологического противостояния окислительному стрессу. *Молекулярная медицина*. 2010. № 2. С. 9-14.
40. Маслов О.Ю. Вивчення сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 10 вересня 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 287-288.
41. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology*: матеріали міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 131.
42. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах*: матеріали II міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 3-4 червня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 355.
43. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кофеїну в листі зеленого чаю. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин теоретические и практические аспекты исследования лекарственных растений*: матеріали IV Міжнародної науково-практичної internet-конференції НФаУ, м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 166.
44. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення якісного складу катехінів в листі зеленого чаю. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали V міжнародної науково-практичної інтернет конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 308-309.

45. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А. Визначення кількісного вмісту суми гідроксикорічних кислот в листі зеленого чаю. *Інтеграція освіти, науки, науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути: III міжнародна дистанційна науково-практична конференція*, м. Дніпро, 11-12 серпня 2021 р., Дніпро: Wauscience, 2021. С. 391.
46. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А. Дослідження технологічних властивостей гранул з екстрактом листя зеленого чаю. *Youth pharmacy science: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*, НФаУ, м. Харків, Україна, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 174.
47. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А., Колісник С.В. Дослідження антиоксидантної активності дієтичної добавки «Кахінол» з екстрактом листя зеленого чаю. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2021»*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р., Запоріжжя: ЗДМУ, 2021. С. 68
48. Міністерство охорони здоров'я України. Наказ № 1114 від 19.12.2013 «Про затвердження Гігієнічних вимог до дієтичних добавок» URL: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/z2231-13> (дата звернення 28.06.2018).
49. Наказ МОЗ України від 03.09.2017 № 1073 «Про затвердження Норм фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії». URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1206-17> (дата звернення 25.11.2018).
50. Натуральная косметика: ® Интернет-магазин косметологических средств «Beurre». URL: <https://beurre.ua/so2-ekstrakt-zelenogo-chaya> (дата обращения: 19.10.2021).
51. Натуральные добавки и экстракты: ® Интернет-магазин «Rozetka». URL: <https://rozetka.com.ua/291235608/p291235608/> (дата обращения: 19.10.2021).
52. Натуральные добавки: ® Интернет-магазин «Эликсир». URL: <https://apteka-elixir.com.ua/garciniya-s-zelenym-chaem> (дата обращения: 19.10.2021).

53. Определение антиоксидантной емкости объектов фармации потенциометрическим методом. Показатели точности измерений / А. В. Иванова и др. *Журнал аналитической химии*. 2020. Т. 75, № 3. С. 259-265.
54. Останіна Н. Створення додаткового розділу Дієтичні добавки Державної Фармакопеї України—шлях до забезпечення населення України якісною продукцією. *Фармацевтичний журнал*. 2013. № 1. С. 16.
55. Офіційний сайт Держпродспоживслужби URL: <https://dpss.gov.ua/> (дата звернення 24.06.2018).
56. Перспективы использования мио-инозитола в предгравидарной подготовке женщин с поликистозом яичников и инсулинорезистентностью / О.А. Громова и др. *Гинекология*. 2014. Т. 16, № 1. С. 58-65.
57. Природные экстракты: ® Интернет-магазин спортивного питания «Foods-body, все для спорта». URL: <https://foods-body.ua/> (дата обращения: 19.10.2021).
58. Сейфулла Р.Д., Рожкова Е.А., Ким Е. К. Антиоксиданты. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. Т. 72, № 3. С. 60-64.
59. Сметаніна К. Фармацевтичні аспекти профілактичного використання біологічно активних добавок рослинного походження. *Запорозький медичинський журнал*. 2011. Т. 13, № 4. С. 72-75.
60. Снижение веса: ® Интернет-магазин «Bodybuilders». URL: <https://bodybuilders.com.ua/snizhenie-vesa-ru/ironflex-l-carnitine-green-tea-cla-90-caps-if-0043-ru> (дата обращения: 19.10.2021).
61. Соловьева А.Г., Крылова Е.В., Канцерова Л.Н. Изменение показателей про- и антиоксидантной систем печени под влиянием убихинона-10 при экспериментальной термической травме. *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2016. Т. 3, № 3. С. 92 – 94.
62. Спортивное питание: ® Интернет-магазин URL: «Многолет». <https://mnogolet.com.ua/product/cyto-greens-535-gramm-ot-allmax-nutrition/>(дата обращения: 19.10.2021).



63. Спортивное питание: ® Интернет-магазин спортивного питания «Kasta». URL: <https://kasta.ua/product/12078341:621/> (дата обращения: 19.10.2021).
64. Спосіб одержання засобу з антиоксидантною дією з листя зеленого чаю : пат. 150496 Україна : А61К 127/00, А61Р 39/06, А61К 36/82. № u202105657 ; заявл. 07.10.2021 ; опубл. 23.02.2022, Бюл. № 8. 3 с.
65. Схуднення: ® Интернет-магазин «Еліт-фарм». URL: <https://Еліт-фарм.com.ua/ua-uk/products/weightlosing/greentea40> (дата обращения: 19.10.2021).
66. Сычев С., Гаврилина В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем. Учебное пособие. Санкт-Петербург: Лань, 2013. 256 с.
67. Тимченко О.В., Котов А.Г. Огляд законодавчих змін у сфері забезпечення якості дієтичних добавок в Україні. *Pharmacom*. 2018. № 4. С. 15-17.
68. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы. *Успехи физиологических наук*. 2012. Т. 43, № 1. С. 75-94.
69. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017. № 4. С. 180-197.
70. Умаров У., Колесник С.В., Гриценко И.С. Количественное определение содержания флавоноидов в траве аниса обыкновенного. *Modern achievements of pharmaceutical technology and biotechnology : proceedings papers Issue 6 collection of scientific works*, с. Kharkiv, 7-8 November 2019. Kharkiv: NUPh publishing house, 2019. С. 469.
71. Чанчаева Е.А., Айзман Р.И., Герасев А.Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека. *Экология человека*. 2013. № 7. С. 50–58.
72. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010. Т. 9, № 1. С. 1-14.

73. Экстракт зеленого чая: ® Интернет-магазин «BIOTUS». URL: <https://biotus.ua/protivovospalitel-nyj-kompleks-advanced-inflammation-klaire-labs-120-kapsul.html> (дата обращения: 19.10.2021).
74. Экстракт растений: ® Интернет-магазин «BIOVIT». URL: <https://biovit.ua/ekstrakty-rasteniy> (дата обращения: 19.10.2021).
75. A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: A kinetic approach / J. Anissi et al. *Food Chemistry*. 2014. Vol. 150. P. 438-447. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.009 (Date of access: 07.12.2021).
76. A New Test Method for the Evaluation of Total Antioxidant Activity of Herbal Products / O.A. Zaporozhets et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 52, № 1. P. 21-25. DOI: 10.1021/jf0343480 (Date of access: 07.12.2021).
77. Abourashed E.A., Roberson C., Elsharkawy N. Content Variation of Catechin Markers, Total Phenolics and Caffeine in Green Tea Dietary Supplements. *Journal of Dietary Supplements*. 2014. Vol. 13, № 2. P. 171-184. DOI: 10.3109/19390211.2014.965868 (Date of access: 07.12.2021).
78. Activities of Epigallocatechin Gallate in Signaling Pathways in Cancer / M. Sharifi-Rad et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 3. P. 467.
79. Antidiabetic Effects of Tea / Q. Fu et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 5. P. 849.
80. Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils / C. Proestos et al. *Antioxidants*. 2013. Vol. 2, № 1. P. 11-22. DOI: 10.3390/antiox2010011 (Date of access: 07.12.2021).
81. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: A review / S. Mhatre et al. *Phytomedicine*. 2021. Vol. 85. P. 153286. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153286 (Date of access: 07.12.2021).
82. Aqueous Extracts Antioxidant Activity Determination of Some Plants from the Ural Region / A.V. Tarasov et al. *Food Industry*. 2018. Vol. 3, № 2. P. 31-38.
83. Aryee N.A., Agyei D., Akanbi T.O. Food for Oxidative Stress Relief: Polyphenols. *Encyclopedia of Food Chemistry*. 2019. P. 392-398.

84. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties / D. Njus et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020. Vol. 159. P. 37-43.
85. Ashraf N.U., Sheikh T.A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Research*. 2015. Vol. 49, № 12. P. 1405-1418.
86. Assessment of antioxidant activities of some medicinal fungal extracts / V.S. Gevorgyan et al. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology*. 2017. Vol. 51, № 3. P. 163-165.
87. Association between chemistry and taste of tea: A review / L. Zhang et al. *Trends in Food Science & Technology*. 2020. Vol. 101. P. 139-149. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.05.015 (Date of access: 07.12.2021).
88. Azizi A., Mumin N.H., Shafqat N. Phytochemicals with Anti 5-alpha-reductase Activity: A Prospective For Prostate Cancer Treatment. *F1000Research*. 2021. Vol. 10, № 221. P. 221.
89. Banerje S., Ghoshal S., Porter T. D. Phosphorylation of hepatic AMP-activated protein kinase and liver kinase B1 is increased after a single oral dose of green tea extract to mice. *Nutr Res*. 2012. Vol. 2012. P. 985-990.
90. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Female Reproductive Disorders: A Review / D. A. Kamal et al. *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 9. P. 2675.
91. Beneficial effects of green tea: a literature review / S.M. Chacko et al. *Chinese medicine*. 2010. Vol. 5, № 1. P. 1-9.
92. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis / R.J. Widmer et al. *European Journal of Nutrition*. 2012. Vol. 52, № 3. P.
93. Brainina Z. Potentiometric Method for Evaluating the Oxidant/Antioxidant Activity of Seminal and Follicular Fluids and Clinical Significance of this Parameter for Human Reproductive Function. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 1-7. DOI: 10.2174/1875038901205010001.
94. Calibration of Burets and Pipettes. Chemistry 321: Laboratory Manual. California State University. 2014. P. 13 – 15.

95. Cardiovascular biology of interleukin-6 / M.Y. Abeywardena et al. *Current pharmaceutical design*. 2009. Vol. 15, № 15. P. 1809-1821.
96. Catechin and Caffeine Content of Green Tea Dietary Supplements and Correlation with Antioxidant Capacity / N.P. Seeram et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54, № 5. P. 1599-1603. DOI: 10.1021/jf052857r (Date of access: 07.12.2021).
97. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions / P. Iacopini et al. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008. Vol. 21, № 8. P. 589-598.
98. Cheng K., Hagiopol C. *Natural Polyphenols from Wood*. New York: Elsevier, 2021.
99. Cioffi F., Adam R.H., Broersen K. Molecular mechanisms and genetics of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019. Vol. 72, № 4. P. 981-1017.
100. Danzer K. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 2. Multispecies calibration. *Pure Appl. Chem*. 2004. Vol. 76, № 6. P. 1215-1225.
101. Determination of C1-C6 organic acids in the products from syngas to olefins by ion chromatography / Y. GU et al. *Chinese Journal of Chromatography*. 2014. Vol. 32, № 2. P. 204. DOI: 10.3724/sp.j.1123.2013.09038 (Date of access: 07.12.2021).
102. Determination of catechins in green tea leaves by HPLC compared to spectrophotometry / O.Yu. Maslov et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 3(75). P. 28-33. DOI: 10.24959/ophcj.21.238177 (Date of access: 07.12.2021).
103. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC / H. Jiang et al. *Food Chemistry*. 2015. Vol. 183. P. 30-35. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.024 (Date of access: 07.12.2021).
104. Determination of the Chemical Composition of Tea by Chromatographic Methods: A Review / A.Y. Yashin et al. *Journal of Food Research*. 2015. Vol. 4, № 3. P. 56. DOI: 10.5539/jfr.v4n3p56 (Date of access: 07.12.2021).

105. Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry / Q. He et al. *Natural Product Research*. 2009. Vol. 23, № 1. P. 93-100. DOI: 10.1080/14786410801886682 (Date of access: 07.12.2021).
106. Development And Validation Of The Conductometric Titration Method Of Quantitative Determination Of Free Organic Acids In The Anise Fruits / U.A. Umarov et al. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 2020. Vol. 7, № 3. P. 3874-3883.
107. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate / O.Yu. Maslov et. al *PharmacologyOnline*. 2021. Vol. 2. P. 35-42.
108. Development and Validation of a Titrimetric Method for Quantitative Determination of Free Organic Acids in Green Tea Leaves / O.Yu. Maslov et al. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, no. 4. P. 304–311.
109. Development the composition and technology for obtaining a dietary supplement “Cachinol” with the antioxidant activity in the form of granules used in the polycystic ovary syndrome / O.Yu. Maslov et al. *News of Pharmacy*. 2022. Vol. 103, №. 1. P. 42–47. DOI: 10.24959/nphj.22.77 (Date of access: 07.03.2022).
110. Diabetes and Alzheimer’s Disease: Can Tea Phytochemicals Play a Role in Prevention? / W. Fernando et al. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017. Vol. 59, № 2. P. 481-501.
111. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies / L. Rochette et al.. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014. Vol. 1840, № 9. P. 2709-2729.
112. Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. *Official Journal of the European Communities*. 2002. L183. P. 51-57. URL: [https:// www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol2002\\_46.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol2002_46.pdf) (Date of access: 07.06.2018).
113. Docosahexaenoic acid–derived fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs) with anti-inflammatory properties / O. Kuda et al. *Diabetes*. 2016. Vol. 65, № 9. P. 2580-2590.

114. Effect of green tea extract on obese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / H. CH et al. *Clin Nutr trial*. 2008. Vol. 27. P. 363-370.
115. Effect of green tea extract on obese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / C.H. Hsu et al. *Clinical nutrition*. 2008. Vol. 27, № 3. P. 363-370.
116. Effect of green tea on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials / K. Liu et al. *The American journal of clinical nutrition*. 2013. Vol. 98, № 2. P. 340-348.
117. Effects of Chinese green tea on weight, and hormonal and biochemical profiles in obese patients with polycystic ovary syndrome—a randomized placebo-controlled trial / C.C. Chan et al. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2006. Vol. 13. P. 63-68.
118. Effects of Green Tea on Urinary Stone Formation: An in Vivo and in Vitro Study / B.C. Jeong et al. *Journal of Endourology*. 2006. Vol. 20, № 5. P. 356-361. DOI: 10.1089/end.2006.20.356 (Date of access: 07.12.2021).
119. Efficient procedure for isolating methylated catechins from green tea and effective simultaneous analysis of ten catechins, three purine alkaloids, and gallic acid in tea by high-performance liquid chromatography with diode array detection / B. Hu et al. *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216, № 15. P. 3223-3231. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.020 (Date of access: 07.12.2021).
120. Ehling S., Cole S. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. Vol. 59, № 6. P. 2229-2234. DOI: 10.1021/jf104527e (Date of access: 07.12.2021).
121. Elahi M.M., Kong Y.X., Matata B.M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009. Vol. 2, № 5. P. 259-269.
122. Eng Q.Y., Thanikachalam P.V., Ramamurthy S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018. Vol. 210. P. 296-310.

123. Engelhardt U.H. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Amsterdam: Elsevier; 2013. P. 1032.
124. Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo / M.W. Laschke et al. *Human Reproduction*. 2008. Vol. 23, № 10. P. 2308-2318. DOI: 10.1093/hum-rep/den245 (Date of access: 07.12.2021).
125. Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Myometrial Infiltration, Uterine Hyperactivity, and Stress Levels and Alleviates Generalized Hyperalgesia in Mice Induced With Adenomyosis / Y. Chen et al. *Reproductive Sciences*. 2013. Vol. 20, № 12. P. 1478-1491.
126. Epigallocatechin-3-gallate targets cancer stem-like cells and enhances 5-fluorouracil chemosensitivity in colorectal cancer / S. Toden et al. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 16158-16170.
127. European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 9<sup>th</sup> ed. Strasbourg, 2016. P. 1124.
128. Farris P.K. Cosmeceuticals and Cosmetic Practice. New York: Wiley & Sons, Limited, John, 2013.
129. Flavonoids Regulate Inflammation and Oxidative Stress in Cancer / G. Li et al *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 23. P. 5628.
130. Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts / L.K. Shpigun et al. *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 573-574. P. 419-426. DOI: 10.1016/j.aca.2006.03.094 (Date of access: 07.12.2021).
131. Genetic Variants and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease / M. Kowalska et al. *Current Alzheimer Research*. 2020. Vol. 17, № 3. P. 208-223.
132. Genetic Variation of Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in the Sri Lankan Tea (*Camellia sinensis* L.) and Their Health-Promoting Aspects / B. Jegathan et al. *International Journal of Food Science*. 2016. Vol. 2016. P. 1-9. DOI: 10.1155/2016/6057434 (Date of access: 07.12.2021).

133. Gerber P.A., Rutter G.A. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxidants & redox signaling*. 2017. Vol. 26, № 10. P. 501-518.
134. Gill J.G., Piskounova E., Morrison S.J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2016. Vol. 81. P. 163-175.
135. Green Tea and Its Extracts in Cancer Prevention and Treatment / J. Schulze et al. *Beverages*. 2017. Vol. 3. P. 17.
136. Green tea and type 2 diabetes / J.H. Park et al. *Integrative medicine research*. 2014. Vol. 3, № 1. P. 4-10.
137. Green tea extract improves high fat diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system / M.H. Okuda et al. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014. Vol. 25, № 10. P. 1084-1089.
138. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients / P. Bogdanski et al. *Nutrition Research*. 2012. Vol. 32, № 6. P. 421-427.
139. Green Tea Extract Supplementation Induces the Lipolytic Pathway, Attenuates Obesity, and Reduces Low-Grade Inflammation in Mice Fed a High-Fat Diet / C.A. Cunha et al. *Mediators of Inflammation*. 2013. Vol. 2013. P. 1-8.
140. Green tea phytochemicals as anticancer: A review / N. Ullah et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2016. Vol. 6, № 4. P. 330-336. DOI: 10.1016/s2222-1808(15)61040-4 (Date of access: 07.12.2021).
141. Ighodaro O.M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. Vol. 108. P. 656-662.
142. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases / S. Li et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016.
143. Interaction of Vitamin K1 and Vitamin K2 with Dimyristoylphosphatidylcholine and Their Location in the Membrane / A. Ausili et al. *Langmuir*. 2020. Vol. 36, № 4. P. 1062-1073.



144. Ioannides C., Yoxall V. Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2003. Vol. 6, № 6. P. 649-656.
145. IS/ISO 4787: Laboratory Glassware – Volumetric Instruments – Methods for Testing of Capacity and for Use. New Delhi: Bureau of Indian Standards. 2012. P. 29.
146. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Brainina H.Z. Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and Prospects. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 45, № 4. P. 311-322. DOI: 10.1080/10408347.2014.910443 (Date of access: 07.12.2021).
147. Jeszka-Skowron M., Krawczyk M., Zgoła-Grześkowiak A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015. Vol. 40. P. 70-77. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.12.015 (Date of access: 07.12.2021).
148. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011. Vol. 283, № 2-3. P. 65-87.
149. Kaur A., Farooq S., Sehgal A. A comparative study of antioxidant potential and phenolic content in white (Silver needle), green and black tea. *Current Nutrition & Food Science*. 2019. Vol. 15, № 4. P. 415-420.
150. Khan N., Mukhtar H. Tea and health: Studies in humans. *Curr. Pharm. Des.*. 2013. Vol. 19. P. 6141-6147.
151. Khodakov I.V. The HPLC Method of Identification of Polyphenols in Plant Extracts by Example of Determination of Isoflavone Composition in Soy Seeds. *Methods and objects of chemical analysis*. 2013. Vol. 8, № 3. P. 132.
152. Kosińska A., Andlauer W. Antioxidant Capacity of Tea. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. 2014. P. 109-120. DOI: 10.1016/b978-0-12-404738-9.00012-x (Date of access: 07.12.2021).
153. Kumar G., Kumar D., Singh N. P. Therapeutic Approach against 2019-nCoV by Inhibition of ACE-2 Receptor. *Drug Research*. 2020. Vol. 71, № 04. P. 213-218.

154. Kunetsova O.M., Ostanina N.V. Research and analysis of the level of dietary supplement consumption by the population of Ukraine. *Environment & Health*. 2020. № 3 (96). P. 25-32.
155. Lambert J.D., Elias R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in a cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.*. 2010. Vol. 501. P. 65-72.
156. Lamprecht M. *Antioxidants in Sport Nutrition*. New York: Taylor & Francis Group, 2014. 301 p.
157. Law K.H., Das N.P. Dual-wavelength absorbance ratio and spectrum scanning techniques for identification of flavonoids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1987. Vol. 388. P. 225-233. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94482-6 (Date of access: 07.12.2021).
158. Liu S.M., Ou S.Y., Huang H.H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *Univ. Sci.*. 2017. Vol. 18. P. 89-98.
159. Lung cancer inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate is dependent on its presence in a complex mixture (polyphenon E) / H. Fu et al. *Cancer Prev. Res. Phila.* 2009. Vol. 2. P. 531-537.
160. Lupak O., Kovalchuk H., Antonyak H. Potentiometric determination of antioxidant activity of extracts of *Calendula Officinalis* L. plants under the influence of growth biostimulants. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 6 (9). P. 10-13. DOI: 10.15587/2519-8025.2017.119086 (Date of access: 07.12.2021).
161. Lurie, J. *Handbook of Analytical Chemistry*; Mir Publishers: Moscow, 1975.
162. Maeda-Yamamoto M., Tachibana H. Anti-allergic action of O-methylated EGCG in green tea cultivar Benifuuki. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2020. Vol. 20, № 1. P. 313-317. DOI: 10.38212/2224-6614.2116 (Date of access: 07.12.2021).
163. Maiese K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015. Vol. 2015. P. 1-17.

164. Maiti S., Banerjee A. Epigallocatechin gallate and theaflavin gallate interaction in SARS-CoV-2 spike-protein central channel with reference to the hydroxychloroquine interaction: Bioinformatics and molecular docking study. *Drug Development Research*. 2020. Vol. 82, № 1. P. 86-96.
165. Maslov O.Yu. Development and validation titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. *Youth pharmacy science: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, Україна, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 172.*
166. Maslov O.Yu., Kovalenko V.S. Grechana O.V. UV-spectrophotometric determination of caffeine in green tea leaf. Topical issues of new medicines development: матеріали XXVII міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів, м. Харків, 9-10 квітня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020, С. 96-97.
167. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Kolisnyk Y.S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. 3rd International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects», Tallinn, 25-26 June 2021, Tallinn: Interconf, 2021. P. 232-233.
168. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies / P.K. Kamat et al. *Molecular Neurobiology*. 2014. Vol. 53, № 1. P. 648-661.
169. Mechanotransduction in Cardiac Hypertrophy and Failure / R.C. Lyon et al. *Circulation Research*. 2015. Vol. 116, № 8. P. 1462-1476.
170. Miean K.H., Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. Vol. 49, № 6. P. 3106-3112. DOI: 10.1021/jf000892m (Date of access: 07.12.2021).
171. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer / A.V. Kudryavtseva et al. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 29. P. 44879-44905.

172. Molan A.L., De S., Meagher L. Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *International journal of food sciences and nutrition*. 2009. Vol. 60, № 6. P. 497-506.
173. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus / Yaribeygi H. et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020. Vol. 2020.
174. Mukaka M.M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal*. 2012. Vol. 24, № 3. P. 69-71.
175. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data / P. Mortera et al. *Talanta*. 2018. Vol. 178. P. 15-23. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.09.005 (Date of access: 07.12.2021).
176. Musial C., Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 5. P. 1744.
177. Nam N.H. Naturally occurring NF- $\kappa$ B inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2006. Vol. 6, № 8. P. 945-951.
178. Namal S. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*. 2013. Vol. 5, № 4. P. 1529-1541. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.011 (Date of access: 07.12.2021).
179. Nikoo M., Regenstein J. M., Ahmadi Gavlighi H. Antioxidant and Antimicrobial Activities of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its Potential to Preserve the Quality and Safety of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018. Vol. 17, № 3. P. 732-753. DOI: 10.1111/1541-4337.12346 (Date of access: 07.12.2021).
180. Nogueira T., Lago C.L. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Microchemical Journal*. 2011. Vol. 99, № 2. P. 267-272. DOI: 10.1016/j.microc.2011.05.014 (Date of access: 07.12.2021).
181. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content / M.K. Roy

- et al. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2010. Vol. 61, № 2. P. 109-124. DOI: 10.3109/09637480903292601 (Date of access: 07.12.2021).
182. Osteoprotective Roles of Green Tea Catechins / H. Huang et al. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, № 11. P. 1136. DOI: 10.3390/antiox9111136 (Date of access: 07.12.2021).
183. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review / R.K. Gupta et al. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014. Vol. 15, № 11. P. 4405-4409.
184. Oxidative stress and cancer: An overview / V. Sosa et al. *Ageing Research Reviews*. 2013. Vol. 12, № 1. P. 376-390.
185. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights / P. Pignatelli et al. *Kardiologia Polska*. 2018. Vol. 76, № 4. P. 713-722.
186. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease / X. Wang et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014. Vol. 1842, № 8. P. 1240-1247.
187. Oxidative Stress Biomarkers, Nut-Related Antioxidants, and Cardiovascular Disease / J. Lorenzon dos Santos et al. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 3. P. 682.
188. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation / B.M. Hybertson et al. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011. Vol. 32, № 4-6. P. 234-246.
189. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? / S. Reuter et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. Vol. 49, № 11. P. 1603-1616.
190. Phytochemical profiles and antioxidant activity of 27 cultivars of tea / L. Zeng et al. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2016. Vol. 68, № 5. P. 525-537. DOI: 10.1080/09637486.2016.1263834 (Date of access: 07.12.2021).
191. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications / D.J. Cherubim et al. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019. Vol. 19, № 1. P. 33-37.
192. Priecina L., Karklina D. Composition of major organic acids in vegetables and spices. In *CBU International Conference Proceedings*. 2015. Vol. 3. P. 447-454.
193. Procedure 40 Potentiometric determination of antioxidant activity of food and herbal extracts / K.Z. Brainina et al. *Electrochemical Sensor Analysis*. 2007. P. e277-e283. DOI: 10.1016/s0166-526x(06)49083-8 (Date of access: 07.12.2021).

194. Protective Effect of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in Diseases with Uncontrolled Immune Activation: Could Such a Scenario Be Helpful to Counteract COVID-19? / M. Menegazzi et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 14. P. 5171.
195. Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity / L.S. Lee et al. *Molecules*. 2014. Vol. 19, № 7. P. 9173-9186.
196. Quiroga P.R., Nepote V., Baumgartner M.T. Contribution of organic acids to  $\alpha$ -terpinene antioxidant activity. *Food chemistry*. 2019. Vol. 277. P. 267-272.
197. Regulation (EU) 2017/2470 of the European Parliament and of the Council of 20 November 2017 establishing the Union list of novel foods in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Official Journal of the European Union*. 2017. Vol. 351, № 72. P. 1-121.
198. Rehman K., Akash M. S. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017. Vol. 118, № 11. P. 3577-3585.
199. Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder / G. Z. Réus et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. 1-6.
200. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease / Z. Chen et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020. Vol. 152. P. 116-141.
201. Shahidi F., Apak R., Capanoglu E. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity. New York: Wiley & Sons, Limited, John, 2017. 337 p.
202. Sheng R., Gu Z., Xie M. Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy. *International Journal of Cardiology*. 2013. Vol. 162, № 3. P. 199-209.
203. Shirai N. Gas chromatographic Analysis of Organic Acids in Japanese Green Tea Leaves. *Journal of Oleo Science*. 2019. Vol. 68, № 12. P. 1271-1277. DOI: 10.5650/jos.ess19208 (Date of access: 07.12.2021).

204. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer / L. Andrisic et al. *Redox biology*. 2018. Vol. 14. P. 47-58.
205. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015. Vol. 4. P. 180-183.
206. Siti H.N., Kamisah Y., Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*. 2015. Vol. 71. P. 40-56.
207. Skřivanová E., Marounek M. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of Escherichia coli. *Folia Microbiologica*. 2007. Vol. 52, № 1. P. 70-72. DOI: 10.1007/bf02932141 (Date of access: 07.12.2021).
208. Spectrophotometric Determination of Polyphenols in Green Teas with 18-Molybdodiphosphate / M. Al-Shwaiyat et al. *Chemistry & Chemical Technology*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 135-142.
209. Strömberg N., Sahlin E. Determination of the short-chain fatty acid pattern in biodiesel using high throughput syringe solvent extraction and ion exclusion chromatography. *Fuel*. 2012. Vol. 97. P. 531-535. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.01.032 (Date of access: 07.12.2021).
210. Study and evaluation antioxidant activity of dietary supplements with green tea extract / O.Yu. Maslov et al. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 2. P. 215-219. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306 (Date of access: 07.12.2021).
211. Study of flavonoids and phenolic acids in green tea leaves / O.Yu. Maslov et al. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 3. P. 287-291. DOI:10.14739/2409-2932.2021.3.240287 (Date of access: 30.07.2022).
212. Sultana N., Ata A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2008. Vol. 23, № 6. P. 739-756.

213. Tea and coffee consumption and the risk of urinary stones—a systematic review of the epidemiological data / Y. Barghouthy et al. *World Journal of Urology*. 2021. Vol. 39, № 8. P. 2895-2901. DOI: 10.1007/s00345-020-03561-w (Date of access: 07.12.2021).
214. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds / A.S. Costa et al. *LWT - Food Science and Technology*. 2012. Vol. 49, № 2. P. 324-328. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.02.030 (Date of access: 07.12.2021).
215. The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts / V. Armoskaite et al. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. Vol. 5, № 5. P. 811-816.
216. The study of the effect of ethyl alcohol concentrations on the antioxidant activity of ascorbic acid solutions / O. Y. Maslov et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 74. P. 44-47.
217. The United States Pharmacopeia 38: The National Formulary 33. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015. P. 1278.
218. The Vitamin K Oxidoreductase Is a Multimer That Efficiently Reduces Vitamin K Epoxide to Hydroquinone to Allow Vitamin K-dependent Protein Carboxylation / M.A. Rishavy et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, № 44. P. 31556-31566.
219. Therapeutic potential of green tea on risk factors for type 2 diabetes in obese adults - a review / M.A. Ferreira. et al. *Obesity Reviews*. 2016. Vol. 17, № 12. P. 1316-1328.
220. Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent / J. Kaźmierczak-Barańska et al. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 5. P. 1501.
221. UHPLC determination of catechins for the quality control of green tea / M. Naldi et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014. Vol. 88. P. 307-314. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.054 (Date of access: 07.12.2021).
222. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Quality Guidelines / The International Council for Harmonisation. URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (Date of access: 07.12.2021).



223. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease / S. Steven et al.. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. 1-26.
224. Xu X., Pan J., Zhou X. Amelioration of Lipid Profile and Level of Antioxidant Activities by Epigallocatechin-gallate in a Rat Model of Atherogenesis. *Heart, Lung and Circulation*. 2014. Vol. 23, № 12. P. 1194-1201.
225. Xu Z., Howard L. R. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals. New York: Wiley & Sons, Incorporated, John, 2012.
226. Yang C.S., Chen G., Wu Q. Recent scientific studies of a traditional Chinese medicine, tea, on prevention of chronic diseases. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2014. Vol. 4, № 1. P. 17-23.
227. Yoshida G.J., Saya H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2016. Vol. 107. P. 5-11.

# ДОДАТКИ

## Додаток А

## Список публікації здобувача

1. Дослідження якісного складу та кількісного вмісту деяких груп біологічно активних речовин у дієтичних добавках з екстрактом листя зеленого чаю / О.Ю. Маслов, С.В. Колісник, О.В. Гречана, А.Г. Сербін. *Запорізький медичний журнал*. 2020. Том 23, № 1(124). С. 132-137. (**Web of Science Core Collection**) DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
2. The study of the effect of ethyl alcohol concentrations on the antioxidant activity of ascorbic acid solutions / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, S.V. Ponomarenko, E.Y. Akhmedov, Z.V. Shovkova. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 74. P. 44-47. DOI: 10.24959/ophcj.21.231947 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Study and evaluation antioxidant activity of dietary supplements with green tea extract / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, V. I. Stepanenko. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 2. P. 215-219. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.2.233306 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Determination of catechins in green tea leaves by HPLC compared to spectrophotometry / O.Yu. Maslov, M.A. Komisarenko, Y.S. Kolisnyk, T.A. Kostina. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 3(75). P. 28-33. DOI: 10.24959/ophcj.21.238177 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
5. Study of flavonoids and phenolic acids in green tea leaves / O.Y. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, E.Yu. Akhmedov, S.M. Poluian, Z.V. Shovkova. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2021. Vol. 14, № 3. P. 287–291. DOI: 10.14739/2409-2932.2021.3.240287 (Особистий

- внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
6. Development and Validation of a Titrimetric Method for Quantitative Determination of Free Organic Acids in Green Tea Leaves / O.Y. Maslov, S.V. Kolesnik, M.A. Komisarenko, O.O. Altukhov, K.V. Dynnyk, T.A. Kostina. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, №. 4. P. 304–311. (**Scopus**) (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
  7. Development the composition and technology for obtaining a dietary supplement “Cachinol” with the antioxidant activity in the form of granules used in the polycystic ovary syndrome / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, T.A. Kostina, K.V. Dynnyk. *News of Pharmacy*. 2022. Vol. 103, №. 1. P. 42–47. DOI: 10.24959/nphj.22.77 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
  8. Study of total antioxidant activity of green tea leaves (*Camellia sinensis* L.) / O.Yu. Maslov, S.V. Kolisnyk, M.A. Komisarenko, M.Yu. Golik. *Herba Polonica*. 2022. Vol. 68, №. 1. P. 1–9. (**Scopus**) DOI: 10.2478/herp-2022-0003. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
  9. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Шовкова З.В., Ахмедов Е.Ю., Полуян С.М., Мороз В.П., Погосян О.Г., Костіна Т.А., Бризицький О.А. Спосіб одержання засобу з антиоксидантною дією з листя зеленого чаю : пат. 150496 Україна : А61К 127/00, А61Р 39/06, А61К 36/82. № u202105657 ; заявл. 07.10.2021 ; опубл. 23.02.2022, Бюл. № 8. 3 с (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, проведені експериментальних досліджень та оформленні патенту).
  10. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А., Кошовий О.М., Пономаренко С.В., Осолодченко Т.П., Голік М.Ю., Колісник Ю.С., Костіна Т.А., Алтухов О.О., Ахмедов Е.Ю. Спосіб одержання гранул з екстрактом листя зеленого чаю з антиоксидантною дією : пат. 151690 Україна : А61К 36/82; А61К 31/7004; А61Р 39/06. № u 2021 07135 ; заявл. 10.12.2021 ; опубл. 01.09.2022, Бюл. № 35.

3 с. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, проведені експериментальних досліджень та оформленні патенту).

11. Maslov O.Yu., Kovalenko V.S. Grechana O.V. UV-spectrophotometric determination of caffeine in green tea leaf. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVII міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів, м. Харків, 9-10 квітня 2020 р., Харків: НФаУ, 2020, С. 96-97.
12. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кофеїну в листі зеленого чаю. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матеріали IV Міжнародної науково-практичної internet-конференції НФаУ, м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 166.
13. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення якісного складу катехінів в листі зеленого чаю. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали V міжнародної науково-практичної інтернет конференції, м. Харків, 26 листопада 2020 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 308-309.
14. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology*: матеріали міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 131.
15. Маслов О.Ю., Колісник С.В. Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів в листі зеленого чаю. *Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах*: матеріали II міжнародної науково-практичної конференції, м. Дніпро, 3-4 червня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 355.
16. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Kolisnyk Y.S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. *3<sup>rd</sup> International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects*», Tallin, 25-26 June 2021, Tallin: Interconf, 2021. P. 232-233.
17. Маслов О.Ю., Колісник С.В., Комісаренко М.А. Визначення кількісного вмісту суми гідроксикорічних кислот в листі зеленого чаю. *Інтеграція освіти, науки,*

науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути: III міжнародна дистанційна науково-практична конференція, м. Дніпро, 11-12 серпня 2021 р., Дніпро: Wayscience, 2021. С. 391.

18. Маслов О.Ю. Вивчення сумарної антиоксидантної активності листя зеленого чаю. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету м. Харків, 10 вересня 2021 р., Харків: НФаУ, 2021. С. 287-288.
19. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А., Колісник С.В. Дослідження антиоксидантної активності дієтичної добавки «Кахінол» з екстрактом листя зеленого чаю. «Запорізький фармацевтичний форум - 2021»: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р., Запоріжжя: ЗДМУ, 2021. С. 68.
20. Maslov O.Yu. Development and validation titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. *Youth pharmacy science*: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 172.
21. Маслов О.Ю., Комісаренко М.А. Дослідження технологічних властивостей гранул з екстрактом листя зеленого чаю. *Youth pharmacy science*: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 174.
22. Maslov O.Yu., Kolisnyk S.V., Komisarenko M.A., Kolisnyk Y.S. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate. *Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates* : 4th International Scientific and Practical Internet Conference, Dnipro, 15–16 August 2022. Dnipro: Way of Science, 2022. P. 33–34.

Продовж. дод. А

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. XXVII Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (м. Харків, 9-10 квітня 2020 р., форма участі – публікація тез);
2. IV Міжнародна науково-практична internet-конференції НФаУ «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., форма участі – публікація тез);
3. V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 26 листопада 2020 р., форма участі – публікація тез);
4. Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (м. Харків, 19 лютого 2021 р., форма участі – публікація тез і усна доповідь);
5. II Міжнародна науково-практична конференція «Шляхи розвитку науки в сучасних кризових умовах» (м. Дніпро, 3-4 червня 2021 р., форма участі – публікація тез);
6. 3rd International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: «Topical Issues and modern Aspects» (м. Таллін, 25-26 червня 2021, форма участі – публікація тез);
7. III міжнародна дистанційна науково-практична конференція: «Інтеграція освіти, науки, науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути» (м. Дніпро, 11-12 серпня 2021 р., форма участі – публікація тез);
8. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету» (м. Харків, 10 вересня 2021 р., форма участі – публікація тез і усна доповідь);

9. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2021» (м. Запоріжжя, 25 – 26 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез).
10. II всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth pharmacy science» (м. Харків, 7 – 8 грудня 2021 р., форма участі – публікація тез).
11. 4th International Scientific and Practical Internet Conference: «Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates» (м. Дніпро, 15 – 16 серпня 2022 р., форма участі – публікація тез)..



## Додаток Б



Продовж. дод. Б



Продовж. дод. Б

ЗАТВЕРДЖЕНО

Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України

№ \_\_\_\_\_

Реєстраційне посвідчення

№ \_\_\_\_\_

Виробник ТОВ «ЗДРАВОФАРМ»  
країна: УКРАЇНА

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

---

Extract of viridi tea liquid

Екстракт зеленого чаю рідкий,

екстракт густий (субстанція)

у банках із скломаси для виробництва нестерильних лікарських  
форм

---

## Продовж. дод. Б

**МАРКУВАННЯ**

На етикетці українською та російською мовами вказують: назву заявника та виробника, їх адреси, назву препарату українською, російською та англійською мовами, масу препарату в кілограмах, умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності.

**УПАКОВКА**

По 1 кг у банки зі скломаси з гвинтовою горловиною з пластмасовими кришками, що нагвинчуються і прокладками з картону прокладочного. Горловину банки з кришкою обертають подпергаментом, об'язують ниткою поліпропіленовою фибрильованою або шпагатом з луб'яних волокон, армованим хімічною ниткою, на кінці якої наклеюють етикетку з паперу, що самоклеїться.

**УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ**

Зберігають у захищеному від світла місці при температурі не вище + 25 °С.

**ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ**

2 роки.

*Копія вірна*

Директор  
ТОВ ЗДРАВФАРМ

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор



Бронін О.В.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "S.V. Kolisnik".

Колісник С.В.

Продовж. дод. Б

ЗАТВЕРДЖЕНО  
Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України  
№ \_\_\_\_\_  
Реєстраційне посвідчення  
№ \_\_\_\_\_

Виробник ТОВ «ЗДРАВФАРМ»  
країна: УКРАЇНА

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

---

Сahinol

Кахінол

гранули  
по 5,0 г у саше, по 5 саше в пачці

---

## Продовж. дод. Б

### МАРКУВАННЯ

На етикетці українською та російською мовами вказують: назву заявника та виробника, їх адреси, назву препарату українською, російською та англійською мовами, масу препарату в кілограмах, умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності.

### УПАКОВКА

По 1 кг у банки зі скломаси з гвинтовою горловиною з пластмасовими кришками, що нагвинчуються і прокладками з картону прокладочного. Горловину банки з кришкою обертають подпергаментом, об'язують ниткою поліпропіленою фибрильованою або шпагатом з луб'яних волокон, армованим хімічною ниткою, на кінці якої наклеюють етикетку з паперу, що самоклеїться.

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігають у захищеному від світла місці при температурі не вище + 25 °С.

### ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

*Копія вірна*

Директор  
ТОВ ЗДРАВФАРМ

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор



Бронін О.В.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "S.V. Kolesnik".

Колісник С.В

Продовж. дод. Б

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»Бронін О.В.  
«18» жовтня 2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результати наукових досліджень аспіранта кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету **Маслова Олександра Юрійовича** були використані при опрацюванні технології виробництва рідких екстрактів з листя зеленого чаю на промислових потужностях ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» згідно проекту технологічної документації. Запропонована технологія повністю відтворюється у промислових умовах.

Було отримано три серії екстрактів, по 2,5, 2,41 та 2,67 кг, які відповідали показникам якості розроблених проектів методик контролю якості. Одержані екстракти передані для аналізу на стабільність, визначення терміну зберігання та розробки лікарських форм.

Запропонована технологія, отримана в результаті науково-технічної співпраці ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор

Колісник С.В.

Продовж. дод. Б

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор

ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

«18» жовтня 2021 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результати наукових досліджень аспіранта кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету **Маслова Олександра Юрійовича** були використані при опрацюванні технології виробництва гранул з екстрактом листя зеленого чаю на промислових потужностях ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» згідно проекту технологічної документації. Запропонована технологія повністю відтворюється у промислових умовах.

Було отримано три серії гранул, по 3,7 3,5 та 3,4 кг, які відповідали показникам якості розроблених проектів методик контролю якості. Одержані гранули передані для аналізу на стабільність, визначення терміну зберігання та розробки лікарських форм.

Запропонована технологія, отримана в результаті науково-технічної співпраці ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»



Бронін О.В.

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор

Колісник С.В.



Продовж. дод. Б

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор

ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

«18» жовтня 2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Розроблений проект методик контролю якості на рідкий екстракт листя зеленого чаю, який був апробований в лабораторних умовах ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та використаний при аналізі якості екстрактів, які отримані на промисловому обладнанні. При розробці документації були використані матеріали науково-дослідної роботи аспіранта Маслова О.Ю.

Запропоновані методики, отримані в результаті науково-технічної співпраці ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

Отримані екстракти відповідали показникам якості розроблених проектів МКЯ та були передані для дослідження строків придатності.

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор

Колісник С.В.

Продовж. дод. Б

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»Бронін О.В.  
«18» жовтня 2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Розроблений проект методик контролю якості на сухий екстракт листя зеленого чаю, який був апробований в лабораторних умовах ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та використаний при аналізі якості екстрактів, які отримані на промисловому обладнанні. При розробці документації були використані матеріали науково-дослідної роботи аспіранта Маслова О.Ю.

Запропоновані методики, отримані в результаті науково-технічної співпраці ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

Отримані екстракти відповідали показникам якості розроблених проектів МКЯ та були передані для дослідження строків придатності.

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор

Колісник С.В.

Продовж. дод. Б

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

«18» жовтня 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

Розроблений проект методик контролю якості на гранули з екстрактом листя зеленого чаю, який був апробований в лабораторних умовах ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та використаний при аналізі якості гранул, які отримані на промислового обладнанні. При розробці документації були використані матеріали науково-дослідної роботи аспіранта Маслова О.Ю.

Запропоновані методики, отримані в результаті науково-технічної співпраці ТОВ «ЗДРАВООФАРМ» та кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

Отримані гранули з екстрактом листя зеленого чаю відповідали показникам якості розроблених проектів МКЯ та були передані для дослідження строків придатності.

Директор  
ТОВ «ЗДРАВООФАРМ»

Бронін О.В.

Завідувач кафедри аналітичної хімії та  
аналітичної токсикології  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фарм. наук, професор

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'СВ'.

Колісник С.В.

## Додаток В

«УТВЕРЖДАЮ»  
 Проректор по научной работе  
 Ташкентского фармацевтического  
 института, доктор химических наук,  
 доцент Н.С. Норматаматов  
 «10» сентября 2021 г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Наименование внедрения:** Разработка и валидация методов определения катехинов в листе зеленого чая
2. **Организация, авторы:** Украина, Национальный фармацевтический университет, кафедра аналитической химии и аналитической токсикологии, Маслов А.Ю., Колесник С.В.
3. **Источники информации:**
  - Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V., Komisarenko M. A., Kostina T. A. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate. PharmacologyOnline. 2021. 2, P. 35-42.
  - Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V., Kolisnyk Y. S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. 3rd International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects», м. Таллин, 25-26 июня 2021, Таллин: Interconf, 2021. С. 232-233.
4. **Где внедряется:** кафедра аналитической химии Ташкентского фармацевтического института.
5. **Форма внедрения:** учебный процесс, научно-исследовательская работа.
6. **Эффект от внедрения:** углубление знаний студентов по использованию электрохимических и спектрофотометрических методов при определении БАВ в растительных объектах.
7. **Сроки внедрения:** 2021-2022 учебный год.

Заведующая кафедры  
 аналитической химии  
 Ташкентского фармацевтического  
 института, к.хим.н., доц.



М. Фатхуллаева

## Продовж. дод. В

«УТВЕРЖДАЮ»

Декан Школы фармации  
 Казахского Национального  
 медицинского университета  
 имени С.Д. Асфендиярова,  
 доктор фармацевтических наук,  
 профессор Сақпұва З.Б.



«10» 08/2021 г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Наименование предложения для внедрения:**  
 Разработка и валидация методики определения суммы органических кислот в листе зеленого чая
2. **Учреждение, ее адрес, исполнители:**  
 Украина, Национальный фармацевтический университет, кафедра аналитической химии и аналитической токсикологии, Маслов А.Ю., Колесник С.В.
3. **Источники информации:**
  - Development and validation titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves / Maslov O. Yu. et al. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 4. P. 30-40.
  - Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V. Development and validation method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. Youth pharmacy science: матеріали II всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, НФаУ, м. Харків, Україна, 7-8 грудня. 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 50.
4. **Введено:**  
 В учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники.
5. **Срок внедрения:** 2021-2022 учебный год.
6. **Эффективность применения:**  
 Углубление знаний студентов по использованию электрохимических при определении органических кислот в растительных объектах.
7. **Замечания и предложения:** не вносились.

Ответственный за внедрение: и.о. зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники Жумашова Г.Т.

## Продовж. дод. В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

проректор з наукової роботи Запорізького  
Державного медичного університету  
проф. В. О. Туманський

«05 жовтня» 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Вивчення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом листя зеленого чаю з використанням потенціометричного методу.
2. **Установа, автор:** Національного фармацевтичний університет, кафедра аналітичної хімії та аналітичної токсикології, Маслов О. Ю., Колісник С. В.
3. **Джерела інформації:**
  - Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V., Komisarenko M. A., Altukhov O. O., Dyrnyk K. V., Stepanenko V. I. Study and evaluation antioxidant activity of dietary supplements with green tea extract. Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2021. T. 14, 2 (36). С. 215-219
  - Маслов О. Ю., Колісник С. В. Визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом зеленого чаю. Modern approach of experimental and preclinical pharmacology: матеріали міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 р., Харків: НФаУ, 2020. С. 131.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** початковий процес, лекційний курс.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань визначення антиоксидантної активності дієтичних добавок з екстрактом листя зеленого чаю
7. **Строки впровадження:** 2021 – 2022 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії,  
фармакології та ботаніки Запорізького  
державного медичного університету,  
д.біол.н., проф.



С. Д. Тржецинський

## Продовж. дод. В



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції до впровадження:** Результати вивчення хімічного складу листа зеленого чаю, визначення антиоксидантної активності нових дієтичних добавок на його основі.
2. **Установа, автор:** Національного фармацевтичний університет, кафедра аналітичної хімії та аналітичної токсикології, Маслов О.Ю., Колісник С.В.
3. **Джерела інформації:**
  1. Дослідження якісного складу та кількісного вмісту деяких груп біологічно активних речовин у дієтичних добавках з екстрактом листа зеленого чаю / О. Ю Маслов й ін.. *Запорожский медицинский журнал*. 2020. Том 23, № 1(124). С. 132-137.
  2. Maslov O. Yu., Komisarenko M. A., Kolisnyk Y. S., Kostina T.A. Determination of catechins in green tea leaves by HPLC compared to spectrophotometry. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, № 75. P. 28-33.
  3. Development and validation potentiometric method for determination of antioxidant activity of epigallocatechin-3-O-gallate / O. Yu. Maslov et. al *PharmacologyOnline*. 2021. Vol. 2. P. 35-42.
  4. Maslov O. Yu., Kolisnyk S. V., Kolisnyk Y. S. Determination the total content of catechins in green tea leaves. 3rd International Scientific and Practical Conference in Science, Education, Innovation: Topical Issues and modern Aspects», с. Tallin, 25-26 June 2021, Tallin: Interconf. 2021, P. 232-233.
4. **Де впроваджено:** кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».
5. **Форма впровадження:** навчальний процес при вивченні навчальної дисципліни «Технологія препаратів з природної сировини та фітотерапія» для студентів спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація».
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань отримання нових біологічно активних субстанцій на основі листа зеленого чаю, а також розробки нових дієтичних добавок на його основі.
7. **Строки впровадження:** 2021 – 2022 навчальний рік.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.  
Відповідальний за впровадження –

Завідувачка кафедри  
технології біологічно активних сполук,  
фармації та біотехнології,  
д.х.в., проф.

В.І. Лубенець