

На правах рукописи



**Ермаченков
Роман Энверович**

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ
ЛОКАЛЬНЫХ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ РОССИЙСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург
2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Тернинко Инна Ивановна

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Куркин Владимир

Александрович

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Зилфикаров Ифрат Назимович

доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», главный научный сотрудник отдела химии природных соединений

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «15» декабря 2026 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте диссертационного совета (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Эфирные масла являются объектами полифункционального назначения, находящими широкое применение в пищевой, косметической, парфюмерной и фармацевтической отраслях промышленности. В фармацевтической промышленности эфирные масла применяются и как действующие вещества (капли назальные «Пиносол» - эфирные масла мяты перечной и сосны обыкновенной; спрей для местного применения «Каметон» - эфирное масло листьев эвкалипта; капсулы «Уролесан» - эфирные масла мяты перечной и пихты сибирской и др.), так и как вспомогательные вещества (корригенты вкуса и запаха). Независимые исследования рынка эфирных масел расходятся в оценке потребности между различными сферами промышленности, однако, все однозначно свидетельствуют об ожидаемом кратном росте объема их суммарного потребления. Столь высокая востребованность в различных сферах применения, во многом объясняется многообразием их органолептических характеристик и фармакологических свойств, которые, в свою очередь, обусловлены синергетическим действием каждого из соединений, входящих в многокомпонентный состав эфирных масел.

Вместе с возрастающим спросом на эфирные масла наблюдается закономерное ужесточение требований к методам их контроля качества. На текущий момент наиболее совершенным подходом к определению однозначной идентичности эфирных масел является метод хроматографического профилирования, который регламентирован к применению Международной организацией по стандартизации (ИСО / ISO) и Европейской Фармакопеей. Однако рассмотрение опубликованных ISO позволяет судить о наличии ограниченного количества регуляторных документов, характеризующих профиль конкретных эфирных масел. Детальное же рассмотрение стандартов качества позволяет сделать вывод об отсутствии учета региональных особенностей эфиромасличного сырья, что свидетельствует о невозможности применения метода хроматографического профилирования, разработанного для эфирных масел конкретной локации, для контроля качества эфирных масел российского происхождения.

Следовательно, потребность промышленности в стандартных эфирных маслах, наличие ресурсных запасов эфиромасличных растений на территории Российской Федерации в совокупности с развитием способа хроматографического профилирования и отсутствием профилей эфирных масел российского происхождения, создает предпосылки для формирования массивов хроматографических данных и формулирования профилей с учетом региональных компонентных особенностей.

Степень разработанности темы исследования. Эфирные масла традиционно являются популярным научным направлением, большинство актуальных научных исследований сконцентрированы на изучении компонентного состава определенного эфирного масла с последующим установлением совокупности его фармакологических характеристик. Огромный вклад в развитие методологии анализа эфирных масел внесли труды отечественных (А.В. Ткачев, И.Г. Зенкевич) и иностранных (R. P. Adams, W. A. König) ученых, заложивших основы хромато-масс-спектрометрической идентификации и энантиоселективного анализа отдельных компонентов.

Вопросам стандартизации, изучению стабильности и установлению сроков годности эфирных масел и эфиромасличного лекарственного растительного сырья (ЛРС) традиционно уделяется большое внимание в отечественной фармацевтической науке. Значительный вклад в формулирование методологических подходов стандартизации внесли фундаментальные труды В. А. Куркина, И. А. Самылиной, И. Н. Зилфикарова. Среди иностранных ученых

большое влияние на развитие основных методологических подходов оказали работы К.Н.С. Başer и G. Buchbauer. Концепция исследования стабильности и установления сроков годности широко освещена в работах научного коллектива С.Турек и F.C. Stintzing.

Наиболее актуальным подходом в стандартизации эфирных масел является применение метода хроматографического профилирования, который активно применяется в европейском научном сообществе, что находит отражения в работах научных групп под руководством С. Bicchì, Р. Rubiolo и L. Mondello и напрямую интегрирован в стандарты ISO и монографии Европейской Фармакопеи. В Российской Федерации работы в данном направлении находятся на стадии формирования. Ввиду того, что метод хроматографического профилирования является единственным методом однозначной идентификации эфирных масел, то для контроля качества эфирных масел российского происхождения необходимым является формулирование устойчивых хроматографических профилей с учетом их региональных особенностей.

В отечественной и зарубежной науке заложена фундаментальная теоретическая и экспериментальная базы в области изучения стабильности эфирных масел. Детально охарактеризованы ключевые внешние и внутренние факторы деструкции и глубоко изучены механизмы основных химических превращений компонентного состава. Анализ актуальных экспериментальных публикаций, посвященных исследованию стабильности эфирных масел, позволяет утверждать об отсутствии системного подхода к дизайну эксперимента и единой программы исследования.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего диссертационного исследования является хроматографическое профилирование эфирных масел ряда эфиромасличных растений, произрастающих на территории РФ для унификации процесса подтверждения их соответствия и однозначной идентификации.

Для достижения цели исследования поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать и провести валидацию унифицированной методики газохроматографического анализа эфирных масел, пригодную для проведения скрининговых исследований.
2. Сформулировать хроматографические профили локальных эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана российского происхождения с учетом региональных особенностей их компонентного состава и подготовить проекты ГОСТов.
3. Исследовать вариабельность хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного в зависимости от фазы вегетации при заготовке лекарственного растительного сырья.
4. Разработать унифицированную мультифакторную программу изучения стабильности эфирных масел - объектов исследования для обоснования оптимальных условий хранения и установления возможных границ вариабельности компонентного состава.
5. Разработать и валидировать методику количественного определения содержания воды в эфирных маслах.

Научная новизна исследования. Впервые были сформулированы хроматографические профили эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана российского происхождения. При анализе эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения установлено статистически значимое отличие компонентного состава масел, полученных из ЛРС, произрастающего на территориях Южного берега Крыма и Степного Крыма. Впервые был охарактеризован

компонентный состав эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения, установлено, что для него характерен вербеноновый хемотип. В результате исследований для эфирного масла розмарина лекарственного сформулировано три хроматографических профиля, характеризующих локацию его происхождения: Южный берег Крыма, Степной Крым и территория Республики Дагестан.

Для целей изучения стабильности эфирных масел была разработана мультифакторная программа исследования. Анализ современной научной литературы позволяет рассматривать разработанную программу как первый систематизированный подход к изучению стабильности эфирных масел.

Впервые были проведены исследования вариабельности хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного, произрастающего на территории Республики Дагестан, в зависимости от фазы вегетации при заготовке лекарственного растительного сырья. Результаты исследования и степень вариабельности компонентного состава были учтены при формулировании итогового хроматографического профиля.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные хроматографические профили локальных эфирных масел шалфея мускатного, розмарина лекарственного, чабера горного, майорана российского происхождения легли в основу проектов ГОСТов. Предложенные хроматографические профили позволяют однозначно идентифицировать эфирные масла российского происхождения, что позволяет рекомендовать их к применению в контроле качества в различных сферах использования эфирных масел.

Разработана и валидирована методика анализа эфирных масел с использованием метода газовой хроматографии. Ключевой особенностью разработанной методики является необходимость проведения ортогонального разделения – последовательного анализа пробы на колонках различной полярности с последующей идентификацией компонентов с помощью линейных индексов удерживания. В сравнении с другими общепринятыми подходами к анализу эфирных масел (ГХ-МС) описанная методика характеризуется универсальным характером, простотой аппаратного оформления при сопоставимой точности идентификации компонентов.

Проведены исследования стабильности эфирных масел шалфея мускатного (12 месяцев), чабера горного (12 месяцев), майорана (12 месяцев) и розмарина лекарственного (18 месяцев), в результате которых установлены оптимальные условия хранения до первого вскрытия и после него. Разработано «дерево принятия решений», позволяющее унифицировать процесс исследования стабильности эфирных масел. Разработанная программа и результаты изучения стабильности могут быть рекомендованы производителям эфирных масел с целью унификации мультифакторных подходов к установлению достоверных сроков годности. На основании проведенных исследований оформлен проект ОФС «Стабильность и сроки годности эфирных масел».

Разработана и валидирована унифицированная методика определения воды в эфирных маслах методом кулонометрического титрования по Карлу Фишеру. Впервые произведена систематизация различных эфирных масел в зависимости от процессов, происходящих при титровании, которая позволила выделить 3 группы масел в зависимости от комбинации присутствующих терпенов. Для каждой группы эфирных масел определены оптимальные условия титрования для нивелирования возможных побочных процессов. На основании проведенных исследований было разработано «дерево принятия решений», позволяющее

сделать выбор условий кулонометрического титрования направленным. Разработанная методика включена в проект ГОСТа.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность Школы фармации Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (акт внедрения от 12 февраля 2026 г.), Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (акт внедрения от 16 декабря 2025 г.) и нашли практическое применение в лабораториях Дагестанского федерального исследовательского центра РАН (акт внедрения от 19 декабря 2025 г.), ООО «Агрофирма «Тургеневская» (акт внедрения от 16 декабря 2025 г.), ООО «БХС» (акт внедрения от 16 декабря 2025 г.) и ООО «Фитолеум» (акт внедрения от 12 февраля 2026 г.).

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в период с 2023 по 2026 г. с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа, которые соотносятся с поставленными задачами. Компонентный состав эфирных масел анализировался с использованием метода газовой хроматографии и газовой хроматографии-масс-спектрометрии. Идентификация ЛРС проводилась по комплексу морфологических признаков с использованием коллекции гербариев Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН и Гарвардского университета. Содержание воды в эфирных маслах определялось с помощью кулонометрического титрования по методу Карла Фишера. Формулирование хроматографических профилей локальных эфирных масел российского происхождения производилось в соответствии с требованиями и методологией, описанными в ISO 11024-1:1998. Для формирования итоговой выборки из общего массива данных исключались коммерческие образцы, характеризующиеся нетипичным компонентным составом и содержащие в своем составе разбавители. Предварительная обработка данных для хроматографического профилирования эфирных масел проводилась с использованием методов хемометрического анализа (HCA, PCA, PLS-DA).

Валидацию аналитических методик проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» и ICH Q2(R2) «Validation of analytical procedures». Статистическая обработка результатов проводилась с использованием Microsoft Excel и языка программирования R (ver. 4.3.3.) в среде RStudio (ver. 2024.12.1+563).

Положения, выносимые на защиту.

1. Валидная методика анализа эфирных масел с использованием метода газовой хроматографии.
2. Хроматографические профили локальных эфирных масел шалфея мускатного, чабера горного, майорана и розмарина лекарственного российского происхождения.
3. Результаты исследования вариабельности хроматографического профиля в зависимости от фазы вегетации при заготовке ЛРС розмарина лекарственного.
4. Программа и результаты исследования стабильности эфирных масел шалфея мускатного, чабера горного, розмарина лекарственного и майорана.
5. Валидная унифицированная методика определения содержания воды в эфирных маслах путем кулонометрического титрования по методу Карла Фишера.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных форумах различного уровня: XIV, XV, XVI Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2024-2026); XXV, XXVI Международном съезде

«Фитофарм» (г. Санкт-Петербург, 2024-2025), II-III Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 2023-2024), XIII Международной научной конференции молодых ученых "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения (г. Москва, 2025), V Научно-методической конференции "Гаммермановские чтения" (г. Пермь, 2023), третьем крымском международном инновационном форуме (г. Симферополь, 2024), седьмой международной конференции «The 7th 'The Belt And Road' International Conference On Traditional Medicine» (г. Ухань, 2024).

Публикации материалов исследования. Результаты основных этапов проведенного исследования опубликованы в ведущих научных изданиях. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, включенных в международную базу Scopus, среди которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках инициативной темы «Фитохимическая и биоаналитическая составляющая стандартизации БАВ полисахаридной, фенольной и терпеноидной структуры» (номер гос. регистрации: 126052021064-9, зарегистрирована 20.05.2026)

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автором совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. Тернинко И.И. были определены тема, основные направления и цель исследовательской работы, а также сформулированы задачи для ее реализации. Поиск, анализ и систематизацию данных научных исследований Ермаченков Р.Э. проводил самостоятельно. Автор лично проводил все этапы экспериментальной работы: от планирования эксперимента до их проведения с последующими интерпретацией и обработкой полученных результатов, а также их публикацией.

Экспериментальные исследования (ГХ, ГХ-МС, кулонометрия) проводились с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» и кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Личный вклад автора составляет не менее 90 %.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 6 - Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; и пункту 7 - Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

Объем и структура диссертации.

Работа изложена на 269 страницах компьютерного набора, содержит 65 рисунков, 71 таблицу. Структура работы представлена введением, обзором литературы, главой «Материалы и методы», 4 экспериментальными главами, заключением, списком сокращений

и условных обозначений, списком литературы. Справочный и иллюстрационный материал, а также проекты разработанных нормативных документов приведены в Приложениях (А-Д). Список литературы представлен 284 источниками, 258 из которых являются зарубежными публикациями.

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлена детальная характеристика эфирных масел как класса БАВ, рассмотрены методы их контроля качества. Детально охарактеризованы методы анализа эфирных масел, показана безальтернативность применения метода хроматографического профилирования для их исчерпывающего контроля качества. В качестве оптимального решения в развитии метода обоснована необходимость дальнейшего накопления массивов сформулированных хроматографических профилей эфирных масел, а также возможное проведение дифференциации профилей в зависимости от региона их происхождения. При рассмотрении современных подходов к изучению стабильности эфирных масел показано отсутствие единого исследовательского протокола, что не позволяет унифицировать методологию и однозначно интерпретировать экспериментальные данные. На основании анализа актуальной научной литературы установлены критические показатели качества, необходимые для контроля, в процессе изучения стабильности эфирных масел.

Охарактеризованы объекты исследования – эфирные масла шалфея мускатного, чабера горного, розмарина лекарственного, майорана - проведен анализ ареалов обитания эфиромасличного сырья, выделены локации на территории Российской Федерации. Для каждого из эфирных масел рассмотрена вариабельность компонентного состава на основании имеющихся литературных данных, определены характеристические компоненты для дифференциации эфирных масел близкородственных растений.

Глава 2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования выступили коммерчески доступные и лабораторно полученные образцы эфирного масла розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn.), чабера горного (*Satureja montana* L.), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и майорана (*Origanum majorana* L.). Коммерчески доступные образцы эфирного масла анализировались без предварительной обработки.

Для получения лабораторных образцов эфирных масел использовали растительное сырье, собранное в период массового цветения и высушенное воздушно-теньевым методом. Эфирные масла из растительного сырья были получены путем гидродистиляции в аппарате типа Клевенджера в соответствии с рекомендациями ОФС.1.5.3.0010 (методика 2). Полученные образцы эфирных масел высушивались над безводным сульфатом натрия и хранились в таре из темного стекла при температуре от (2 до 8) °С.

Получение эфирного масла розмарина проводили из веток и соцветий растения, шалфея мускатного, майорана и чабера горного – из надземной части растения. Идентификацию образцов растительного сырья проводили по комплексу морфологических признаков с использованием коллекций LE 01062579, LE 01179330, LE 01179312 виртуального гербария Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН и коллекции 00655977 виртуального гербария Гарвардского университета.

В исследовании использованы 97 коммерчески доступных и 76 лабораторно полученных образцов эфирных масел, из которых 40 / 27 относятся к розмарину лекарственному, 40 / 2 – шалфею мускатному, 10 / 22 – образцы эфирного масла майорана и 7 / 25 – чабера горного.

Скрининговый газохроматографический анализ эфирных масел проводился с использованием газовых хроматографов Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) и GC-2010Pro (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенных пламенно-ионизационным детектором. Эфирные масла в условиях эксперимента анализировались в чистом виде без дополнительной пробоподготовки. Анализ проводился в условиях ортогонального разделения – проведение параллельных экспериментов на двух колонках различной полярности: HP-5MS UI с неподвижной жидкой фазой (НЖФ) (5%-фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (Agilent Technologies, США) и на капиллярной колонке DB-WAX с НЖФ в виде полиэтиленгликоля. Обработка хроматограмм осуществлялась с использованием программного обеспечения «Хроматэк Аналитик 3.1» (версия 3.0.0.2, сборка 3.1.2602.05, ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия).

Идентификацию компонентов эфирных масел проводили путем сравнения экспериментальных индексов, полученных на колонках различной полярности, с теоретическими. Справочные линейные индексы удерживания (LRI) взяты из базы Адамса, NIST (National Institute of Standards and Technology, США) и из справочной литературы. Для расчета индексов удерживания использовался раствор *n*-алканов состава C₇-C₂₂ (гептан-докозан) с концентрацией 0,25 мг/мл в гексане. Для их приготовления использовались нормальные алканы (ХромЛаб, Россия; квалификация «стх» - стандарт хроматографический). В соответствии с последними требованиями идентификация компонентов считалась достоверной, если разница между справочными индексами и расчетными, для колонки с неполярной НЖФ составляет не больше 5 единиц, а для колонки с полярной НЖФ - не более 10. Количественную оценку содержания отдельных компонентов проводили с использованием метода внутренней нормализации без оценки коэффициента отклика детектора.

Скрининговый ГХ-МС анализ эфирных масел проводился с использованием газовых хроматографов Clarus 600 (PerkinElmer, США) и Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенных масс-селективным детектором. Анализ проводился с использованием капиллярной колонки из плавленого кварца HP-5MS UI с НЖФ (5%-фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (Agilent Technologies, США). Интерпретацию масс-спектров осуществляли с помощью библиотеки NIST-20 и NIST-25 с помощью программного обеспечения NIST MS Search (версия 3.0., NIST, США).

Выбор ключевых показателей качества проводился на основании анализа текущих требований к эфирным маслам, изложенным в нормативной документации ISO, а также фармакопейных требований – общих и частных фармакопейных статьях ГФ РФ и Ph.Eur 11. Для оценки качества эфирных масел были выбраны следующие ключевые показатели, требующие нормирования: «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость», «Кислотное число», «Перекисное число», «Хроматографический профиль» и «Вода».

Обработка массивов хроматографических данных проводилась с применением методов многомерного статистического анализа. В процессе исследования исходная матрица данных (содержащая процентное содержание компонентов эфирных масел) подвергалась предварительной трансформации по методу Парето (*Pareto scaling*). В ходе исследования были использованы *иерархический кластерный анализ (HCA)*, *метод главных компонент (PCA)* и *PLS дискриминация (PLS-DA)*.

Составление хроматографического профиля эфирных масел проводилось в соответствии с требованиями ISO 11024-1:1998 и включало следующие этапы:

предварительное формулирование массива проб, отбраковка фальсифицированных проб (только для коммерчески доступных образцов) и расчет содержания репрезентативных и характеристических компонентов итеративным методом.

При проведении стандартизации было реализовано количественное определение воды в эфирных маслах с помощью кулонометрического титрования по методу Карла Фишера. Титрование проводилось с использованием кулонометра Metrohm 899 (Metrohm, Швейцария), снабженного двойным платиновым электродом и генераторным электродом без диафрагмы. Кулонометрическое титрование проводили в следующих условиях: ток генераторного электрода – 400 мА, ток поляризации – 10 мкА, начальный дрейф – 20 мкг/мин, критерий окончания титрования – относительный дрейф 5 мкг/мин. В качестве анолитов использовались реактивы Hydranal Coulomat AG (Honeywell, США) и Hydranal Coulomat AK (Honeywell, США).

Статистическая обработка проводилась с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Экспериментальные данные обрабатывались с использованием Microsoft Excel и языка программирования R (ver.4.3.3) в среде RStudio (ver.2024.12.1+563). Валидацию аналитической методики определения содержания воды проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» и ICH Q2(R2) «Validation of analytical procedures».

Изучение стабильности эфирных масел проводилось путем факторного эксперимента. Варьировались три основных фактора: температура (3 уровня), наличие кислорода (2 уровня) и наличие УФ-излучения (2 уровня) при общей комбинации факторов – 8 – которые легли в основу экспериментальных программ изучения стабильности. Число контрольных точек в ходе эксперимента составило 5: начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев.

В каждой из пяти точек контроля для каждого исследуемого эфирного масла контролировался хроматографический профиль методом газовой хроматографии и показатель «Перекисное число» методом йодометрического титрования. В начальной и конечной точке исследования были проведены анализы по всем ключевым показателям качества эфирного масла, перечисленным выше, а также дополнительно «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла». Эфирные масла, отобранные для исследования стабильности, хранились во флаконах из темного стекла, соответствующих требованиям ISO 210:2023.

Глава 3. Хроматографическое профилирование эфирных масел локального происхождения

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного сформулирован на основании анализа 58 образцов из 7 стран в т.ч.: Российская Федерация – 24 образца, Марокко – 13 образцов, Испания – 10 образцов, Египет – 4 образца, Таджикистан и Греция – по 3 образца и Италия – 1 образец. Среди 24 образцов российского происхождения 20 получены из сырья, локализованного на территории Республики Крым, а 4 на территории Республики Дагестан. Среди 20 образцов крымского происхождения 11 относятся к локации территории Южного берега Крыма (г. Алушта, пгт. Гурзуф, г. Судак, п. Никита) и 9 из Степного Крыма (Нижнегорский, Бахчисарайский, Джанкойский, Красногвардейский, Сакский и Симферопольский районы). 4 образца из Республики Дагестан получены из сырья, произрастающего в окрестностях города Махачкала. Результаты проведенного хеометрического анализа выборки образцов эфирного масла розмарина лекарственного представлены на рисунке 1.

Проведенный хеометрический анализ (рисунок 1) всего массива данных свидетельствует о наличии особенностей компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения. Для соответствующих доверительных областей на графиках PCA (рисунок 1а) и PLS-DA (рисунок 1б) характерно лишь частичное перекрывание с другими доверительными областями. С учетом результатов проведенного хеометрического анализа и общей географической отдаленности регионов Республики Крым и Республики Дагестан дальнейший анализ компонентных особенностей эфирных масел этих регионов проводился отдельно.

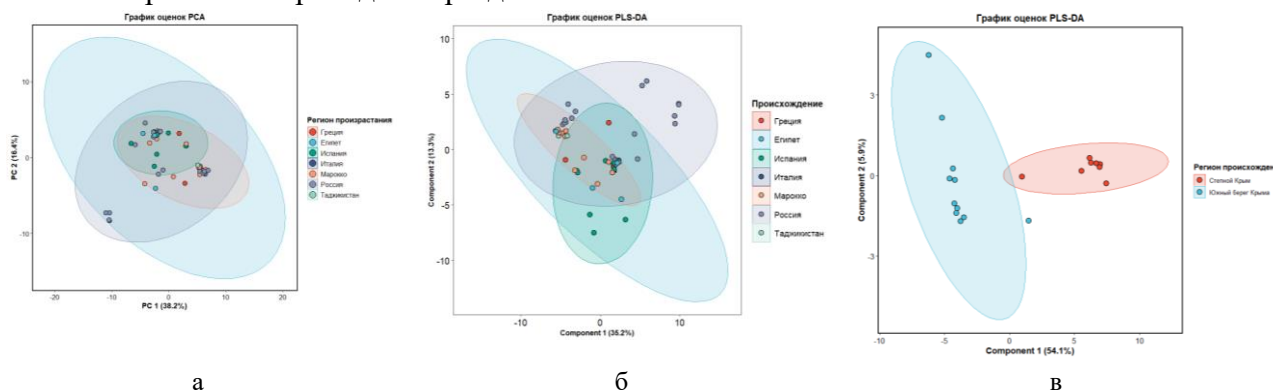


Рисунок 1 – График оценок PCA (а) и PLS-DA (б) итоговой выборки образцов эфирного масла розмарина лекарственного; (в) график оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения

Для выявления региональной специфичности образцов эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения был проведен повторный хеометрический анализ. На основании данных географического происхождения все образцы были разделены на две зоны произрастания в зависимости от происхождения: Южный берег Крыма и Степной Крым. На рисунке 1в представлен график оценок PLS-DA исследуемых эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения. При рассмотрении результатов PLS-DA (рисунок 1в) наблюдается четкая пространственная дискриминация образцов – эфирные масла формируют два изолированных кластера, соответствующих их региону происхождения. Важным доказательством наличия выраженной дифференциации является практически полное отсутствие перекрывающихся доверительных областей соответствующих кластеров.

Анализ массива хроматографических данных показал, что наибольшую важность для географической классификации эфирного масла розмарина лекарственного представляют 1,8-цинеол и α -пинен. Другими важными компонентами, необходимыми для классификации являются камфен, β -пинен, камфора, борнеол, α -терпинеол и лимонен. Примечательно, что все перечисленные компоненты входят в состав регламентированного хроматографического профиля в ISO 1342:2012 и Ph.Eur 11. Каждый из перечисленных компонентов был использован для построения хроматографического профиля, дополнительно в модель профиля были включены линалоол, β -мирцен и вербенон, содержание которых также регламентировано в ISO.

Сравнительная характеристика сформулированных хроматографических профилей эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения в сравнении с профилями, рекомендованными ISO 1342:2012, представлена в таблице 1.

Строго говоря, регламентируемые в ISO 1342:2012 хроматографические профили эфирного масла розмарина испанского и тунисского/марокканского видов специфицируют особенности камфорного и цинеольного хемотипов эфирного масла розмарина

лекарственного, соответственно. Установленные хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения в целом схожи с регламентируемыми в ISO 1342:2012. Однако каждый из сформулированных хроматографических профилей объясняет специфику компонентного состава эфирного масла крымского происхождения различной локализации.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика разработанного хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения

Компонент	Нормированное содержание, %			
	Розмарин лекарственный (Тунисский или марокканский вид)	Розмарин лекарственный (Испанский вид)	Разработанные хроматографические профили розмарина лекарственного крымского происхождения	
	ISO 1342:2012	ISO 1342:2012	Южный берег Крыма	Степной Крым
α -пинен	(9,0...14,0) %	(18,0...26,0) %	(15,0...28,0) %	(4,0...12,5) %
1,8-цинеол	(38,0...55,0) %	(16,0...23,0) %	(13,0...31,0) %	(38,0...50,0) %
камфора	(5,0...15,0) %	(12,5...22,0) %	(15,0...22,0) %	(10,5...17,0) %
линалоол	(0,3...2,0) %	(0,5...2,5) %	(0,5...1,5) %	Не более 1,5 %
лимонен	(1,5...4,0) %	(2,5...5,5) %	(3,5...5,0) %	(2,0...3,5) %
β -пинен	(4,0...9,0) %	(2,0...5,0) %	(4,0...7,5) %	Не более 1,0 %
камфен	(2,5...6,0) %	(7,0...13,0) %	(7,0...11,0) %	(10,0...17,0) %
<i>n</i> -цимол	(0,5...2,5) %	(1,0...2,0) %	(2,5...5,5) %	(1,5...2,5) %
борнеол	(1,0...5,0) %	(1,0...4,5) %	(1,5...3,5) %	(6,5...10,0) %
β -мирцен	(1,0...2,0) %	(2,5...4,5) %	Не более 2,0 %	(0,5...1,5) %
α -терпинеол	(1,0...2,5) %	(1,0...4,0) %	Не более 3,0 %	(3,0...5,5) %
борнил ацетат	(0,1...1,6) %	(0,5...2,5) %	(1,0...2,5) %	Не более 1,5 %
вербенон	не более 0,4 %	(0,7...2,5) %	Не более 0,5 %	Не более 0,1 %

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного, локализованного на территории Южного берега Крыма, выделяется более широким диапазоном содержания 1,8-цинеола (13,0...31,0) % в сравнении с эфирным маслом розмарина испанского вида, более высоким содержанием β -пинена и *n*-цимола и меньшим содержанием β -мирцена и α -терпинеола. Содержание же вербенена существенно ниже регламентированного и не превышает 0,5 %. Диапазоны концентраций остальных компонентов сопоставимы с регламентированными в ISO 1342:2012 для эфирного масла розмарина лекарственного испанского вида.

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного, локализованного на территории Степного Крыма, при сравнении с регламентированным в ISO 1342:2012 для эфирного масла розмарина лекарственного тунисского/марокканского вида характеризуется достаточно высоким содержанием борнеола (6,5...10,0) % и камфена (10,0...17,0) %, меньшим содержанием α -пинена и более узким диапазоном концентраций камфоры. Содержание главного компонента хроматографического профиля – 1,8-цинеола (38,0...50,0) % сопоставимо с регламентируемым в ISO.

В общей выборке анализируемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного 4 лабораторно полученных образца имеют происхождение из Республики Дагестан. Анализ образцов, заготовленных в период с марта 2024 года по февраль 2025 года, позволяет оценить сезонную вариабельность компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного, что, в свою очередь, позволяет провести профилирование при малом количестве образцов.

Для формулирования хроматографического профиля эфирного масла розмарина дагестанского происхождения были взяты аналогичные компоненты, характерные эфирному маслу крымского происхождения и регламентированные в ISO 1342:2012. В таблице 2

представлен хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения, в соответствии с требованиями ISO.

Таблица 2 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения, локализованного на территории Республики Дагестан, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Пределы концентрации	Компонент	Пределы концентрации
α -пинен	(37,0...50,0) %	<i>n</i> -цимол	(0,5...2,5) %
1,8-цинеол	(7,5...10,0) %	борнеол	(0,1...2,5) %
камфора	(3,0...5,0) %	β -мирцен	(2,5...4,5) %
линалоол	(1,5...2,5) %	α -терпинеол	(1,0...2,5) %
лимонен	(3,5...4,5) %	борнил ацетат	(1,0...3,0) %
β -пинен	(0,5...2,0) %	вербенон	(5,0...20,0) %
камфен	(2,0...4,0) %	-	-

Преобладающими компонентами в составе эфирного масла розмарина дагестанского происхождения являются α -пинен (37,0...50,0) % и вербенон (5,0...20,0) %, при этом для 1,8-цинеола (7,5...10,0) % и камфоры (3,0...5,0) % характерны меньшие допустимые содержания. Перечисленные особенности компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения позволяет отнести его к вербеноновому хемотипу и однозначно отличают его компонентный состав от компонентного состава эфирных масел крымского происхождения и от регламентированных в ISO 1342:2012.

Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного проводилось на основании анализа 34 образцов из 5 стран: Российская Федерация – 21 образец, Марокко – 5 образцов, Испания – 4 образца, Франция – 4 образца и Греция – 1 образец. Среди 21 образца крымского происхождения 13 образцов получены из сырья, локализованного на территории Южного берега Крыма: г. Алушта, пгт. Гурзуф, муниципальный округ Ялта, г. Судак; 2 образца приурочены к Белогорскому району и 6 - к Бахчисарайскому району. Результаты проведенного хеометрического анализа выборки образцов эфирного масла шалфея мускатного представлены на рисунке 2.

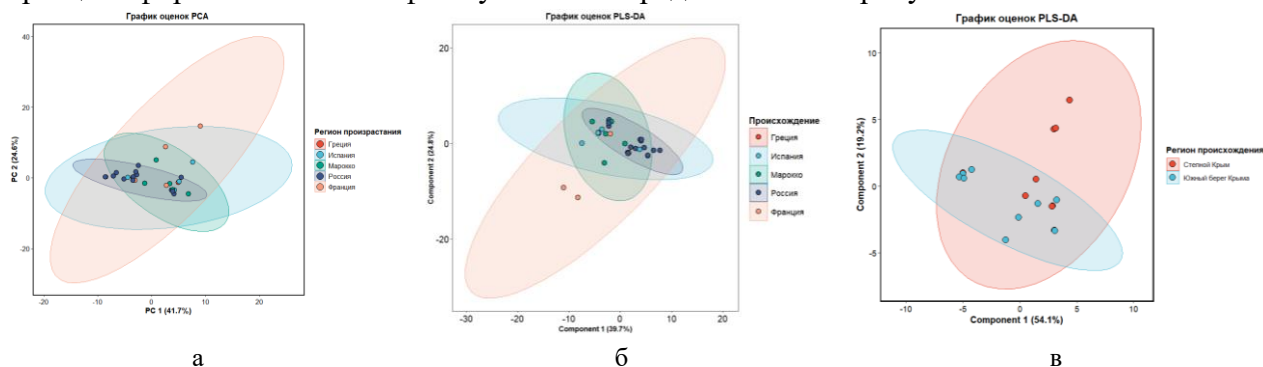


Рисунок 2 – График оценок PCA (а) и PLS-DA (б) итоговой выборки образцов эфирного масла шалфея мускатного; (в) график оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения

В результате хеометрического анализа (рисунок 2а и 2б) установлено, что для эфирного масла шалфея мускатного в целом географическая вариабельность компонентного состава не является значимой. Лишь частичное перекрывание доверительных областей для эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения позволяет предполагать наличие ряда особенностей компонентного состава, уточнение которых позволит установить его хроматографический профиль. Дополнительная дифференциация хроматографического профиля в зависимости от региона произрастания продуцирующего сырья на территории Республики Крым является нерациональной ввиду значительного перекрытия доверительных областей кластеров (рисунок 2в).

На основании данных проведенного анализа были выбраны характерные компоненты хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного: линалил ацетат, линалоол, β -мирцен, β -кариофиллен, лимонен и транс- β -оцимен. Дополнительно в хроматографический профиль были включены α -терпинеол, склареол и гермакрен Д, которые имеют меньшую значимость для географической классификации, но являются характерными и необходимыми для подтверждения идентичности эфирного масла. Компоненты, необходимые для однозначной идентификации исследуемого эфирного масла в ряду масел близкородственных растений - α - и β -туйон (эфирное масло шалфея лекарственного), камфора и 1,8-цинеол (эфирное масло шалфея испанского) - в итоговый хроматографический профиль не включены, поскольку за счет увеличения числа нормируемых компонентов хроматографический профиль признан достаточно специфичным.

Сравнительная характеристика разработанного хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения в сравнении с регламентированными хроматографическими профилями представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика разработанного хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения в сравнении с регламентированными хроматографическими профилями

Компонент	Содержание, %			
	Нормативный документ			Разработанный хроматографический профиль
	Ph. Eur	ISO 24255:2025		
		Тип 1	Тип 2	
Линалил ацетат	(56,0...78,0)	(62,0...78,0)	(54,0...71,0)	(28,0...67,0)
Линалоол	(6,5...24,0)	(6,5...15,0)	(13,0...24,0)	(13,5...26,0)
Гермакрен Д	(1,0...12,0)	(1,5...12,0)	(1,2...8,0)	(1,0...7,0)
Склареол	(0,4...2,6)	(0,3...2,5)	(0,3...2,5)	(0...0,5)
α -Терпинеол	Не нормируется	(0,1...1,2)	(1,0...5,0)	(0,4...4,0)
α - и β -Туйон	Не более 0,2 %	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется
β -Мирцен	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется	(0,5...16,0)
транс- β -Оцимен	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется	(0,5...10)
β -Кариофиллен	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется	(0,4...3,5)
Лимонен	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется	(0,2...6,5)

Одной из ключевых особенностей разработанного хроматографического профиля является расширение числа нормируемых компонентов – в хроматографическом профиле эфирного масла шалфея мускатного нормируется содержание 9 компонентов, тогда как Ph.Eur 11 и ISO 24255:2025 предлагает нормирование 6 и 5 компонентов, соответственно. Наличие 9 компонентов в хроматографическом профиле с определенными диапазонами концентрации позволяет рассматривать разработанный хроматографический профиль как достаточно специфичный.

Выборка эфирного масла чабера горного для составления хроматографического профиля составила 29 образцов из 8 стран: Российская Федерация – 10 образцов, Грузия – 6 образцов, Египет – 7 образцов, Армения – 2 образца, Сербия, Греция, Марокко, Узбекистан по 1 образцу. Все образцы российского происхождения получены из сырья, произрастающего на территории Республики Крым. Результаты проведенного хеометрического анализа выборки образцов эфирного масла чабера горного представлены на рисунке 3.

Характер перекрывания доверительных областей кластеров (рисунок 3а и 3б) позволяет предположить наличие особенностей компонентного состава у эфирного масла российского происхождения. При проведении анализа образцов крымского происхождения (рисунок 3в) отмечается высокая степень перекрывания двух кластеров, характеризующих

локацию происхождения, что не позволяет провести дополнительную дифференциацию для образцов крымского происхождения.

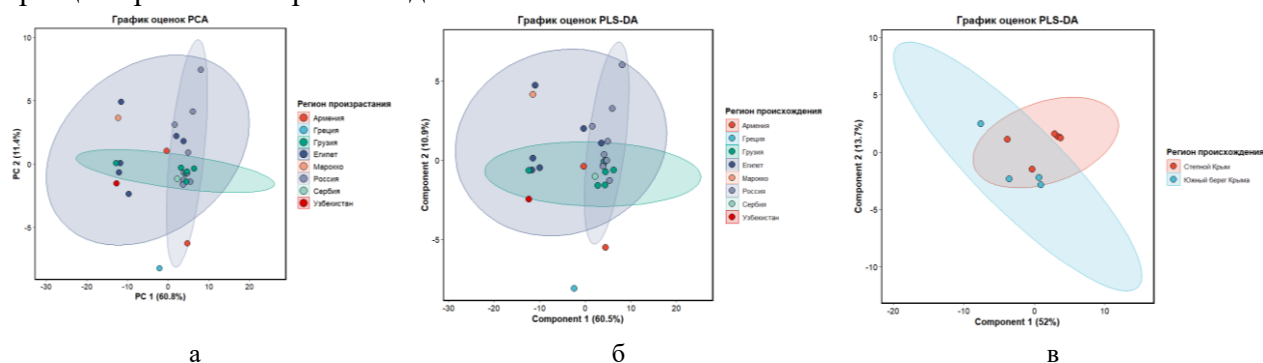


Рисунок 3 – График оценок PCA (а) и PLS-DA (б) итоговой выборки образцов эфирного масла чабера горного; (в) график оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла чабера горного российского происхождения

На основании анализа пула хроматографических данных исследуемых образцов и его хемометрической обработки для формулирования хроматографического профиля были отобраны наиболее значимые для географической дифференциации эфирного масла компоненты: карвакрол, тимол, γ -терпинен, n -цимол и β -кариофиллен. Хроматографический профиль эфирного масла чабера горного не является нормативно закрепленным и отсутствует в стандартах ISO. В таблице 4 представлен хроматографический профиль эфирного масла чабера горного российского происхождения.

Таблица 4 – Хроматографический профиль эфирного масла чабера горного российского происхождения

Компонент	Пределы концентрации
Карвакрол	(40,0...71,0) %
γ -Терпинен	(8,5...27,0) %
n -Цимол	(0...10,5) %
β -Кариофиллен	(0...5,5) %
Тимол	Не более 0,5 %

В сформулированном хроматографическом профиле эфирного масла чабера горного российского происхождения (таблица 4) примечательно значительное преобладание в образцах крымской локализации карвакрольного хемотипа. Карвакрол является основным компонентом хроматографического профиля (40,0...71,0) %, тогда как изомерный ему тимол находится в незначительных количествах с пределом содержания – не более 0,5 %. Отличительной чертой хроматографического профиля эфирного масла чабера горного российского происхождения также является преобладание γ -терпинена (8,5...27,0) % над n -цимол (0...10,5) %, в то время как образцы, происходящие из других локаций, характеризуются обратной зависимостью. Сформулированный в рамках исследования хроматографический профиль эфирного масла чабера горного российского происхождения является первым описанным хроматографическим профилем эфирного масла для данного вида растения.

Хроматографический профиль эфирного масла майорана так же, как и профиль чабера горного, не закреплен в нормативной документации и составлен впервые на основании анализа 30 образцов из 5 стран: Российская Федерация (11), Египет (13), Испания (3), Марокко (2) и Греция (1). Все российские образцы получены из сырья, произрастающего в различных регионах Крыма. Результаты проведенного хемометрического анализа выборки образцов эфирного масла майорана представлены на рисунке 4.

На представленных графиках PCA (рисунок 4а) и PLS-DA (рисунок 4б) итоговой выборки образцов характер степени пересечения доверительных областей кластеров, а также

гетерогенность расположения точек образцов внутри кластеров не позволяет однозначно подтвердить гипотезу о выраженной географической вариабельности компонентного состава эфирного масла майорана. Тем не менее, лишь частичное перекрывание доверительных областей на графике PLS-DA (рисунок 4б) позволяет предполагать наличие компонентных особенностей у эфирного масла майорана российского происхождения.

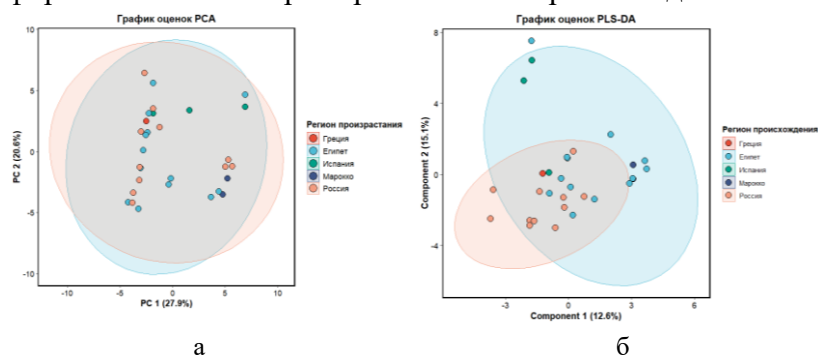


Рисунок 4 – График оценок PCA (а) и PLS-DA (б) итоговой выборки образцов эфирного масла майорана

В таблице 5 представлен сформулированный хроматографический профиль эфирного масла майорана российского происхождения.

Таблица 5 – Хроматографический профиль эфирного масла майорана российского происхождения, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Пределы концентрации	Компонент	Пределы концентрации
Терпинен-4-ол	(22,0...37,0) %	<i>n</i> -Цимол	(1,0...4,0) %
γ -Терпинен	(11,0...21,5) %	<i>цис</i> -Сабинен гидрат	Не более 3,0 %
α -Терпинен	(5,0...14,5) %	Сабинен	Не более 6,0 %
β -Кариофиллен	(0...8,5) %	1,8-Цинеол	Не более 4,5 %
Изотерпинолен	(2,5...5,0) %	Карвакрол и Тимол	Не более 1,5 %

Ключевыми компонентами разработанного хроматографического профиля эфирного масла майорана российского происхождения (таблица 5) являются производные терпинена: терпинен-4-ол (22,0...37,0) %, γ -терпинен (11,0...21,5) % и α -терпинен (5,0...14,5) %. Отмечается достаточно высокая доля β -кариофиллена, что является важным специфическим маркером локации происхождения эфирного масла. К минорным компонентам хроматографического профиля относятся изотерпинолен (2,5...5,0) %, *n*-цимол (1,0...4,0) %, *цис*-сабинен гидрат с содержанием не более 3,0 % и сабинен с содержанием не более 6,0 %. Каждый из перечисленных компонентов содержится в большинстве испытуемых проб эфирного масла и является специфическим для характеристики локации происхождения. Для возможности отличия эфирного масла майорана от масел близкородственных растений – душицы обыкновенной, тимьяна обыкновенного и испанского майорана - в хроматографический профиль были включены 1,8-цинеол и суммарное содержание карвакрола и тимола. Сформулированный в рамках исследования хроматографический профиль эфирного масла майорана российского происхождения является первым описанным хроматографическим профилем эфирного масла для данного вида растения.

Глава 4. Разработка методики газохроматографического анализа эфирных масел объектов исследования

Для проведения скринингового анализа эфирных масел объектов исследования разработана газохроматографическая методика, которая основана на проведении ортогонального разделения – последовательного анализа объекта на колонках с НЖФ различной полярности с последующей идентификацией компонентов пробы с использованием линейных индексов удерживания. Разработанная методика была апробирована на выборке большого объема эфирных масел - объектов исследования

различного происхождения. В ходе разработки для каждого из эфирных масел - объектов исследования были определены критические пары пиков и установлены соответствующие критерии пригодности хроматографической системы в зависимости от типа используемой НЖФ (таблица 6).

Таблица 6 – Критерии пригодности хроматографической системы при анализе эфирных масел - объектов исследования

Эфирное масло	Критерий пригодности
Розмарин лекарственный	Число теоретических тарелок, рассчитанное по пику α -пинена, на хроматограмме, записанной с использованием колонки с неполярной НЖФ должно составлять не менее 90000; при использовании колонки с полярной НЖФ – не менее 50000
	При использовании колонки с неполярной НЖФ разрешение между пиками лимонена и 1,8-цинеола должно составлять не менее 1,5
	При использовании колонки с полярной НЖФ разрешение между пиками камфоры и линалоола должно составлять не менее 1,5
	Фактор асимметрии пиков α -пинена, 1,8-цинеола и камфоры при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,7 до 1,4. При использовании колонки с полярной НЖФ фактор асимметрии должен находиться в диапазоне от 0,8 до 1,3
Шалфей мускатный	Число теоретических тарелок, рассчитанное по пику линалил ацетата, на хроматограмме, записанной с использованием колонки с неполярной НЖФ должно составлять не менее 150000; при использовании колонки с полярной НЖФ – не менее 400000
	При использовании колонки с полярной НЖФ разрешение между пиками линалил ацетата и линалоола должно составлять не менее 2,5
	Фактор асимметрии пиков линалоола и линалил ацетата при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,7 до 1,4. При использовании колонки с полярной НЖФ фактор асимметрии должен находиться в диапазоне от 0,8 до 1,3
Чабер горный	Число теоретических тарелок, рассчитанное по пику карвакрола, на хроматограмме, записанной с использованием колонки с неполярной НЖФ должно составлять не менее 100000; при использовании колонки с полярной НЖФ – не менее 120000
	При использовании колонки с неполярной НЖФ разрешение между пиками п-цимола и лимонена должно составлять не менее 1,5.
	Фактор асимметрии пика карвакрола при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,7 до 1,4.
Майоран	Число теоретических тарелок, рассчитанное по пику терпинен-4-ола, на хроматограмме, записанной с использованием колонки с неполярной НЖФ должно составлять не менее 150000; при использовании колонки с полярной НЖФ – не менее 400000
	При использовании колонки с неполярной НЖФ разрешение между пиками п-цимола и лимонена, и между пиками лимонена и 1,8-цинеола должно составлять не менее 1,5
	Фактор асимметрии пика терпинен-4-ола при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,8 до 1,25.

Преимуществами разработанной методики является простота пробоподготовки, высокая эффективность разделения и большая разделительная способность – разрешение между пиками каждой критической пары при анализе по предлагаемой методике составило более 1,5. Методика была успешно апробирована для решения задач скринингового анализа эфирных масел.

В результате апробации установлено, что разработанная методика позволяет проводить анализ эфирных масел объектов исследования при добавлении фиксаторов запаха, которые часто используются при фальсификации: диэтилфталат, изопропилмирилат, бензилсалицилат, триэтилцитрат, ионол. Установлено, что наличие в пробе фиксаторов запаха из-за их большого времени удерживания (от 23,74 минут до 31,01 минуты на колонке HP-5MS UI и от 27,87 минут до 52,57 минут на колонке DB-WAX) не искажает результаты определения целевых компонентов эфирных масел.

Разработанная методика была валидирована по показателям «Специфичность» и «Робастность». Результаты проведенных экспериментов однозначно свидетельствуют о пригодности использования методики для анализа эфирных масел с целью подтверждения их идентичности.

Глава 5. Разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах

Актуальные фармакопейные подходы к определению содержания воды в эфирных маслах носят качественный характер. С учетом информации о негативном влиянии воды на стабильность эфирных масел в диссертационное исследование была включена разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах. В качестве оптимального метода анализа выбрано кулонометрическое титрование по методу Карла Фишера, поскольку оно позволяет определять малые количества воды (от 10 мкг до 10 мг), что дает возможность снизить требуемый объем пробы для проведения серии параллельных измерений. Для оценки возможности применения разрабатываемой методики выборка была расширена за счет включения эфирных масел других видов растений, отличающихся по компонентному составу от основных объектов исследования: кориандра посевного, душицы обыкновенной, тимьяна обыкновенного, полыни таврической, иссопа лекарственного и шалфея лекарственного.

На основании апробации методики количественного определения воды по методу Карла Фишера на 10 различных по компонентному составу эфирных маслах, было выделено три группы масел (таблица 7) в зависимости от процессов, происходящих при титровании и, как следствие, предложены оптимальные условия проведения испытания.

Таблица 7 – Дифференциация эфирных масел в зависимости от условий титрования по методу Карла Фишера

№	Группа	Оптимальные условия титрования	Примеры эфирных масел
1	Без протекания побочных реакций	Анолит: метанольный (Hydranal Coulomat AG или аналогичный); Способ ввода пробы: в виде раствора Растворитель: Метанол	Чабер горный, Кориандр, Душица обыкновенная, Тимьян обыкновенный
2	Без протекания побочных реакций, но с появлением опалесценции при растворении	Анолит: метанольный (Hydranal Coulomat AG или аналогичный); Способ ввода пробы: в виде раствора; Растворитель: метанол:октан-1-ол, (1:1, v/v)	Шалфей мускатный, Майоран, Розмарин лекарственный
3	С протеканием побочных реакций	Анолит: безметанольный (Hydranal Coulomat AK или аналогичный); Способ ввода пробы: в чистом виде без растворения	Иссоп лекарственный, Полынь таврическая, Шалфей лекарственный

Необходимость дифференциации условий напрямую объясняется компонентным составом эфирных масел. Основными компонентами эфирных масел первой группы являются спирты и фенолы: линалоол (эфирное масло кориандра), карвакрол (эфирное масло чабера горного и душицы обыкновенной) и тимол (тимьян обыкновенный). Преобладание подобных соединений обуславливает его хорошую растворимость в метаноле и отсутствие побочных реакций.

Основу компонентного состава эфирных масел второй группы составляет линалил ацетат (эфирное масло шалфея мускатного), терпинен-4-ол (эфирное масло майорана) и 1,8-цинеол (эфирное масло розмарина). Эфирные масла этой группы также не склонны вступать в побочные реакции в процессе титрования, но для их титрования необходимо использование смешанного растворителя, состоящего из метанола и октан-1-ола для предотвращения опалесценции при растворении эфирного масла.

В эфирных маслах третьей группы преобладают кетоны: α - и β -туйон в эфирном масле шалфея лекарственного и полыни таврической, изопинокамфон в эфирном масле иссопа лекарственного. Титрование этих эфирных масел в среде метанола, однозначно, сопровождается побочной реакцией образования кеталей и приводит к завышенным результатам. Оптимальным в данном случае является применение безметанольной среды для титрования с вводом эфирных масел в чистом виде в электрохимическую ячейку.

Однако с учетом большого разнообразия эфирных масел и variability их компонентного состава нельзя однозначно отнести известные эфирные масла к одной из выделенных групп без проведения предварительных испытаний. С целью унификации подхода и подбора оптимальных условий кулонометрического титрования эфирных масел разработано «дерево решений», в соответствии с которым для определения оптимальных условий титрования необходимо проведение предварительных испытаний, основанных на оценке растворимости и повышении дрейфа.

Для разработанной методики количественного определения воды в эфирных маслах проведена валидация по параметрам «Специфичность», «Повторяемость», «Линейность», «Промежуточная прецизионность», «Правильность» и «Робастность». Валидация аналитической методики проведена на эфирных маслах, представителях каждой из трех групп: чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о пригодности использования методики для количественного определения воды в эфирных маслах трех основных групп в реакции кулонометрического титрования.

Глава 6. Разработка алгоритма изучения стабильности эфирных масел

Дизайн большинства описанных в литературе экспериментов по изучению стабильности предполагает целенаправленное варьирование лишь одного параметра: температуры хранения эфирного масла, тогда как воздействие кислорода и УФ-излучения изучается опосредованно. Наиболее комплексным подходом в данном случае является проведение мультифакторного эксперимента.

В предлагаемом нами алгоритме изучения стабильности основной упор сделан именно на моделирование реальных условий хранения при варьировании всех трех факторов: температуры хранения, наличия кислорода и воздействия солнечного излучения. Описание экспериментов и параметры переменных факторов представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Описание экспериментов и параметры переменных факторов

Номер эксперимента	Условия хранения		
	УФ-излучение	Атмосфера	Температура
1	Темнота	Инертная	-(25...18)
2		Нормальная	
3	Темнота	Нормальная	+(2...8)
4		Инертная	
5	Темнота	Инертная	+(15...25)
6		Нормальная	
7	Рассеянный свет	Нормальная	
8		Инертная	

Эксперименты № 1, 4 и 5 в таблице 8 моделируют возможные сценарии идеальных условий хранения эфирного масла в различных температурных зонах, а также сценарий хранения в условиях инертной атмосферы до первого вскрытия флакона. Реальные сценарии хранения эфирного масла моделируются в экспериментах № 2, 3, 6, 7 и 8.

Для унификации исследовательского алгоритма разработано «дерево решений», в соответствии с которым в случае значимых изменений в компонентном составе в ходе

экспериментов № 5, 6, 7 и 8 предлагается окончить исследование стабильности, но продолжить исследование в соответствии с разработанной программой только для экспериментов № 1-4. При наличии значимых изменений в компонентном составе в ходе экспериментов № 1-4 предлагается провести повторные исследования на более коротком периоде и/или обеспечить более жесткие условия хранения.

Программа предполагает изучение стабильности эфирных масел в течение 12 месяцев с пятью точками контроля: начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев с возможностью дальнейшего продления. В случае подтверждения факта стабильности эфирного масла в конечной точке исследования в различных условиях рекомендация по выбору условий хранения остается за производителем. Срок годности устанавливается в соответствии со сроком проведенных испытаний без проведения экстраполяции.

Разработанный алгоритм исследования стабильности апробирован на эфирных маслах розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана. На основании проведенных исследований стабильности эфирных масел определены основные химические процессы, протекающие при хранении (рисунок 5), и установлены оптимальные условия хранения до и после первого вскрытия для каждого эфирного масла.

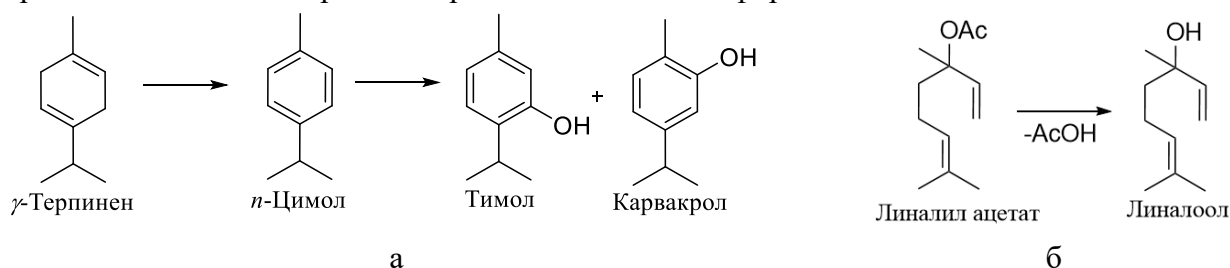


Рисунок 5 – Основные химические процессы, протекающие при хранении эфирных масел чабера горного и майорана (а) и шалфея мускатного (б)

Основной химический процесс, протекающий при хранении эфирного масла розмарина лекарственного носит комплексный характер, и связан с накоплением (камфора, 1,8-цинеол) и образованием новых кислородосодержащих соединений (*цис*- и *транс*-пинокарвил ацетат). При хранении эфирных масел чабера горного и майорана наблюдается процесс ароматизации γ -терпинена, однако, в случае эфирного масла чабера горного процесс ароматизации сопряжен с дальнейшим получением изомеров карвакрола и тимола (рисунок 5а). В случае же эфирного масла майорана процесс ароматизации приводит к накоплению п-цимола, а дальнейшее образование смеси карвакрола и тимола выражено слабо (рисунок 5а). Ключевым процессом, происходящим при хранении эфирного масла шалфея является гидролиз линалил ацетата с получением линалоола (рисунок 5б), кроме того, отмечается значительное снижение содержания специфического сесквитерпенового соединения гермакрена Д.

Для всех исследованных эфирных масел оптимальным с точки зрения практической реализации и сохранения показателей качества является хранение до первого вскрытия при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения (эксперимент № 3). Оптимальными условиями хранения после первого вскрытия является хранение в условиях нормальной атмосферы без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ (эксперимент № 4). Для эфирных масел розмарина лекарственного, чабера горного и майорана допустимым является также хранение при температуре $+(15...25)^\circ\text{C}$ (эксперимент № 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ научных данных свидетельствует о безальтернативности метода хроматографического профилирования для контроля качества эфирных масел. Дальнейшее

развитие метода однозначно связано с формулированием массива хроматографических профилей, что особенно актуально для эфирных масел локального происхождения.

1. Для эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана разработана унифицированная методика газохроматографического анализа, которая основана на проведении ортогонального эксперимента – параллельном разделении компонентов пробы на хроматографических колонках различной полярности с последующей идентификацией с помощью линейных индексов удерживания. Разработанная методика валидирована по показателям «Специфичность» и «Робастность». Методика характеризуется простотой аппаратного оформления и самой процедуры анализа. Проведенные исследования позволяют рассматривать методику как унифицированную для контроля качества эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана.
2. В результате проведенного исследования сформулированы специфические хроматографические профили эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана российского происхождения. Каждый из сформулированных хроматографических профилей однозначно характеризует локацию происхождения эфирного масла. Сформулированный хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения имеет значимые отличия от регламентированных в ISO 24255:2025 и монографии Ph.Eur 11 как по числу нормируемых компонентов, так и по их специфическим диапазонам. Профиль, который включает 9 компонентов (линалил ацетат, линалоол, гермакрен Д, склареол, α -терпинеол, β -мирцен, *транс*- β -оцимен, β -кариофиллен, лимонен), может быть рекомендован для контроля качества эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения. Для эфирных масел чабера горного и майорана российского происхождения сформулировано по одному хроматографическому профилю. Полученные результаты являются первой, в научном фитохимическом сообществе, попыткой применения метода хроматографического профилирования к указанным эфирным маслам. Сформулированные хроматографические профили являются специфическими к локации происхождения эфирных масел чабера горного (карвакрол, γ -терпинен, *p*-цимол, β -кариофиллен, тимол) и майорана (терпинен-4-ол, γ -терпинен, α -терпинен, β -кариофиллен, изотерпинолен, *n*-цимол, *цис*-сабинен гидрат, сабинен, 1,8-цинеол, карвакрол, тимол) и могут быть рекомендованы для контроля качества указанных эфирных масел. Статистически значимые отличия в компонентном составе эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения позволили сформулировать два хроматографических профиля, характеризующих локацию происхождения: территория Южного берега Крыма и территория Степного Крыма. Оба профиля включают 13 компонентов (α -пинен, 1,8-цинеол, камфора, линалоол, лимонен, β -пинен, камфен, *n*-цимол, борнеол, β -мирцен, α -терпинеол, борнил ацетат, вербенон), но существенно отличаются диапазоном количественного содержания. Сформулированные хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения имеют значимые отличия от регламентированных в ISO 1342:2012 и могут быть рекомендованы для контроля качества масла розмарина крымского происхождения. Установлено, что для эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения характерен вербеноновый хемотип. На основании полученных данных был сформулирован хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения, который также включает

аналогичные 13 компонентов, но отличается повышенным содержанием вербенон (от 9,48 % до 15,32 %).

3. На примере эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения была проведена оценка вариабельности его хроматографического профиля в зависимости от фазы вегетации. Для проведения исследования использовалось растительное сырье различных дат заготовки (март 2024 г., май 2024 г., ноябрь 2024 г., февраль 2025 г.). Установлен умеренный характер вариабельности всех основных компонентов хроматографического профиля и содержания эфирного масла в растительном сырье. Результаты проведенного исследования использованы при формулировании хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения.
4. На основании критического анализа актуальных подходов разработан унифицированный алгоритм исследования стабильности эфирных масел, предусматривающий мультифакторное параллельное изучение идентичных образцов в течение срока наблюдения с систематическим варьированием трех ключевых факторов: температуры, воздействия атмосферы и УФ-излучения. Для разработанного алгоритма было создано «дерево принятия решений», которое позволяет унифицировать исследовательский подход установления оптимальных условий хранения эфирных масел. Одной из ключевых особенностей разработанного исследовательского алгоритма является моделирование реальных сценариев хранения до первого вскрытия упаковки и после него, что позволяет получить исчерпывающие данные о стабильности продукции и обоснованно выбрать оптимальные условия хранения и срок годности. Апробация разработанного алгоритма изучения стабильности на эфирных маслах розмарина лекарственного, шалфея мускатного, майорана и чабера горного показала положительные результаты. Для каждого из исследуемых эфирных масел установлены оптимальные условия хранения до первого открытия флакона и после него: для эфирных масел розмарина лекарственного, чабера горного и майорана хранение при температуре $+(2...8)$ °C в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения и в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8)$ °C и $+(15...25)$ °C до и после вскрытия, соответственно; для эфирного масла шалфея мускатного хранение при температуре $+(2...8)$ °C в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения и в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8)$ °C до и после вскрытия, соответственно.
5. Разработана и валидирована методика количественного определения воды в эфирных маслах методом кулонометрического титрования по К. Фишеру. На основании апробации методики выделено три основные группы эфирных масел в зависимости от процессов, происходящих при титровании и, как следствие, оптимальных условий пробоподготовки. Для разработанной методики предложено «дерево принятия решений» по выбору оптимальных условий титрования эфирных масел. Проведенные работы позволяют рассматривать методику как унифицированную для определения воды в эфирных маслах. Для разработанной методики проведена валидация по показателям «Специфичность», «Линейность», «Правильность», «Промежуточная прецизионность» и «Робастность». Полученные результаты статистически достоверны и свидетельствуют о пригодности методики для определения содержания воды в эфирных маслах методом кулонометрического титрования по Карлу Фишеру.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах Перечня ВАК:

1. **Ермаченков, Р. Э.** Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения / **Р. Э. Ермаченков, А. Л. Марков, М. М. Агаев, Е. В. Бурцева, И. И. Тернинко** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – № 4. – С. 161-179.

2. **Ермаченков, Р. Э.** Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) российского происхождения / **Р. Э. Ермаченков, Н. Ю. Сипкина, Е. В. Вишняков, А. Л. Марков, М. М. Агаев, И. И. Тернинко** // Химия растительного сырья. – 2025. – № 3. – С. 199-209.

3. **Ермаченков, Р. Э.** Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения / **Р. Э. Ермаченков, А. Л. Марков, М. М. Агаев, А. М. Алиев, М. Н. Пovyдыш, И. И. Тернинко** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – № 3. – С. 124-136.

Прочие публикации:

4. **Ermachenkov, R. E.** Review of Approaches to Studying the Stability of Essential Oils and Development of a New Research Algorithm / **R. E. Ermachenkov, M. M. Agaev, A. L. Markov, I. I. Terninko** // Flavour and Fragrance Journal. – 2026. – Vol. 41, No. 5. – P. 1060-1075.

5. **Ермаченков, Р. Э.** Хроматографическое профилирование эфирных масел / **Р. Э. Ермаченков, И. И. Тернинко** // Сборник материалов II Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы», Томск, 04.10.2023 – 06.10.2023 / Сибирский государственный медицинский университет. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2023. – С. 79-82.

6. **Ермаченков, Р. Э.** Подход стандартов ISO к оценке идентичности эфирных масел / **Р. Э. Ермаченков, И. И. Тернинко** // Сборник научных трудов по материалам научно-методической конференции «V Гаммермановские чтения», Пермь, 09.11.2023 – 10.11.2023 / Пермская государственная фармацевтическая академия. – Москва : РУСАЙНС, 2023. – С. 116-119.

7. **Ермаченков, Р. Э.** Хроматографическое профилирование эфирных масел: практическое приложение метода на примере розмарина лекарственного / **Р. Э. Ермаченков, А. Л. Марков, И. И. Тернинко** // Сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 28.03.2024 – 02.04.2024 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 637-642.

8. **Ермаченков, Р. Э.** Изучение компонентного состава эфирного масла чабера горного / **Р. Э. Ермаченков, М. М. Агаев, И. И. Тернинко** // Сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 28.03.2024 – 02.04.2024 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 542-547.

9. **Ермаченков, Р. Э.** Количественное определение воды в эфирном масле чабера горного (*Satureja montana* L.) / **Р. Э. Ермаченков, И. И. Тернинко** // Материалы III Крымского международного инновационного форума «Инновационное развитие экономики», Симферополь, 19.06.2024 – 20.06.2024 / Крымская академия наук. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2025. – С. 123-131.

10. **Ермаченков, Р. Э.** Подходы к количественной оценке компонентов эфирных масел / **Р. Э. Ермаченков, И. И. Тернинко** // Сборник материалов III Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы», Томск, 18.09.2024 – 20.09.2024 / Сибирский государственный медицинский университет. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2024. – С. 127-130.

11. **Ермаченков, Р. Э.** Исследование состава эфирного масла майорана (*Origanum majorana* L.) египетского происхождения / **Р. Э. Ермаченков, Н. И. Оглоблина, И. И.**

Тернинко // Сборник тезисов XXV международного съезда «Фитофарм 2024», Санкт-Петербург, 07.10.2024 – 09.10.2024 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 59-60.

12. **Ермаченков, Р. Э.** Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла майорана египетского происхождения разных сезонов заготовки / **Р. Э. Ермаченков**, М. М. Агаев, А. Л. Марков, И. И. Тернинко // Сборник материалов XV Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 07.04.2025 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2025. – С. 375-378.

13. **Ermachenkov, R. E.** Identification of essential oil components using retention indices and partition coefficients in a system of two immiscible solvents / **R. E. Ermachenkov**, I. I. Terninko // The 7th “The Belt and Road” International Conference on Traditional Medicine – Conference Handbook, Wuhan, 18.12.2024 – 20.12.2024 / Huazhong Agricultural University. – Wuhan : Huazhong Agricultural University, 2024. – P. 99-102.

14. **Ермаченков, Р. Э.** Апробация методики количественного определения воды в эфирных маслах душицы обыкновенной и тимьяна обыкновенного / **Р. Э. Ермаченков**, И. И. Тернинко // Сборник материалов XIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», Москва, 04.12.2025 – 05.12.2025 / Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений. – Москва : Изд-во Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений, 2025. – С. 212-216.

15. **Ермаченков, Р. Э.** Оценка стабильности хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного при различных способах получения / **Р. Э. Ермаченков**, И. И. Тернинко // Сборник тезисов XXVI международного съезда «Фитофарм 2025», Санкт-Петербург, 08.10.2025 – 09.10.2025 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2025. – С. 120-121.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ	- Биологически активное вещество
ГФ РФ	- Государственная Фармакопея Российской Федерации (действующая версия)
ГХ	- Газовая хроматография
ГХ-МС	- Газовая хроматография-масс-спектрометрия
МС	- Масс-спектрометрия
НЖФ	- Неподвижная жидкая фаза
УФ	- Ультрафиолетовый
ANOVA	- Analysis of Variance – Дисперсионный анализ
EMA	- European Medicines Agency - Европейское агентство лекарственных средств
HCA	- Hierarchical cluster analysis - Иерархический кластерный анализ
ICH	- International Council on Harmonisation - Международный совет по гармонизации
ISO	- International Organization for Standardization - Международная организация по стандартизации
LRI	- Linear retention index - Линейный индекс удерживания
NIST	- National Institute of Standards and Technology - Национальный институт стандартов и технологий
PCA	- Principal component analysis - Метод главных компонент
PLS-DA	- Partial Least Squares Discriminant Analysis — дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов
Ph.Eur	- Европейская Фармакопея
RSD	- Относительное стандартное отклонение
SD	- Стандартное отклонение