

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ЕРМАЧЕНКОВ РОМАН ЭНВЕРОВИЧ

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ
ЛОКАЛЬНЫХ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ РОССИЙСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук, доцент
Тернинко Инна Ивановна

Санкт-Петербург
2026

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	12
1.1. Эфирные масла: характеристика класса БАВ	12
1.1.1. Особенности химического состава эфирных масел.....	12
1.1.2. Вариабельность компонентного состава эфирных масел	14
1.1.3. Особенности применения эфирных масел.....	16
1.2. Подходы к стандартизации эфирных масел	17
1.2.1. Характеристика основных показателей качества эфирных масел	17
1.2.2. Подходы к стандартизации компонентного состава эфирных масел	19
1.2.3. Методы анализа эфирных масел.....	20
1.2.4. Фальсификация эфирных масел	23
1.3. Методы хроматографического профилирования растительных объектов.....	25
1.3.1. Хроматографическое профилирование эфирных масел.....	28
1.3.2. Методы хроматографического «фингерпринтинга»	30
1.4. Обзор современных подходов к изучению стабильности эфирных масел	32
1.4.1. Химические процессы, протекающие при хранении эфирных масел	33
1.4.2. Аналитическое сопровождение изучения стабильности эфирных масел.....	35
1.4.3. Обзор существующих дизайнов эксперимента по изучению стабильности эфирных масел.....	36
1.5. Эфирные масла растений объектов исследования.....	40
1.5.1. Эфирное масло шалфея мускатного.....	40
1.5.2. Эфирное масло розмарина лекарственного	44
1.5.3. Эфирное масло чабера горного.....	48
1.5.4. Эфирное масло майорана	52
Выводы к главе 1	57
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	59
2.1. Объекты исследования	59
2.2. Скрининговый анализ эфирных масел.....	65
2.2.1. ГХ-анализ эфирных масел.....	65
2.2.2. ГХ-МС-анализ эфирных масел	66
2.2.3. Определение ключевых показателей качества эфирных масел.....	67
2.3. Составление хроматографических профилей эфирных масел	67
2.3.1. Применение подхода ISO	67
2.3.2. Применение хемометрических моделей	68
2.4. Разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах.....	69
2.5. Методы статистической обработки результатов экспериментов.....	71
2.6. Изучение стабильности эфирных масел	71
Выводы к главе 2	73
ГЛАВА 3. Хроматографическое профилирование эфирных масел локального происхождения	74
3.1. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного	74
3.1.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов	74

эфирного масла розмарина лекарственного	74
3.1.2. Хемометрический анализ данных	75
3.1.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения	79
3.1.4. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения	84
3.2. Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного	89
3.2.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла шалфея мускатного	89
3.2.2. Хемометрический анализ данных	90
3.2.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения	93
3.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла чабера горного	97
3.3.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла чабера горного	97
3.3.2. Хемометрический анализ данных	98
3.3.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла чабера горного российского происхождения	102
3.4. Хроматографическое профилирование эфирного масла майорана	105
3.4.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла майорана	105
3.4.2. Хемометрический анализ данных	107
3.4.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла майорана российского происхождения	110
Выводы к главе 3	112
ГЛАВА 4. Разработка методики газохроматографического анализа эфирных масел объектов исследования.	115
4.1. Выбор способа проведения газохроматографического анализа и идентификации компонентов	115
4.2. Подбор и апробация условий газохроматографического анализа эфирных масел – объектов исследования	116
4.3. Установление критериев пригодности хроматографической системы	127
4.4. Апробация методики анализа для анализа фальсифицированных объектов	128
4.5. Валидация методики газохроматографического анализа эфирных масел	130
Выводы к главе 4	134
ГЛАВА 5. Разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах	135
5.1. Выбор метода титрования и оптимизация условий количественного определения	135
5.2. Валидация методики количественного определения воды в эфирных маслах	142
Выводы к главе 5	153
ГЛАВА 6. Разработка алгоритма изучения стабильности эфирных масел	155
6.1. Разработка алгоритма исследования стабильности	155
6.2. Исследование стабильности эфирных масел объектов исследования	158

6.2.1. Исследование стабильности эфирного масла розмарина лекарственного	158
6.2.2. Исследование стабильности эфирного масла шалфея мускатного	165
6.2.3. Исследование стабильности эфирного масла майорана.....	170
6.2.4. Исследование стабильности эфирного масла чабера горного	176
Выводы к главе 6	181
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	183
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	187
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	188
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акты внедрения и апробации результатов исследования	218
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Линейные индексы удерживания и стандартные масс- спектры репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел объектов исследования.....	228
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Проекты ГОСТ на эфирные масла российского происхождения	231
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Проект ГОСТ на методику кулонометрического определения содержания воды в эфирных маслах	255
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Проект ОФС «Стабильность эфирных масел».....	262

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 вспомогательные вещества (корригенты вкуса и запаха) [1]. 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 [2-4]. 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. Turek 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. Bicchi, 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 (на примере сырья розмарина лекарственного).
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 (Приложение В). 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. Ключевыми особенностями разработанной методики являются 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» (Приложение Д).

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 набора 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 ГОСТ (Приложение Г).

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.) (акты представлены в Приложении А).

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

1.1. Эфирные масла: характеристика класса БАВ

Эфирные масла представляют собой смесь летучих природных соединений, синтезируемых эфиромасличными растениями в качестве вторичных метаболитов и обладающих характерным интенсивным запахом и вкусом [5].

Более строгое определение эфирным маслам дано в ISO 9235:2021 [6]: «Эфирное масло представляет собой объект, полученный из растительного сырья путем дистилляции (паровой, сухой и гидродистилляции) и механического прессования эпикарпия citrusовых фруктов после отделения водной фазы (если таковая имеется) с помощью физических процессов».

1.1.1. Особенности химического состава эфирных масел

Для эфирных масел характерен сложный компонентный состав, включающий различные по своей природе вещества, самыми распространенными из которых являются соединения терпенового и фенилпропаноидного характера [7].

Терпеновые соединения являются самыми распространенными компонентами эфирных масел [8] и представляют собой достаточно обширную группу химических соединений. Терпеновые соединения, согласно изопреновому правилу Ружечки, рассматриваются как производные от кратного числа изопреновых единиц (C_5), соединяющихся по принципу «голова к хвосту» [8,9]. Изопреновое правило является биогенетическим, таким образом, оно описывает не только классификацию молекул по числу изопреновых звеньев, но и их происхождение в ходе биосинтеза [8,9].

Среди терпеновых соединений в состав эфирных масел входят монотерпеновые, сесквитерпеновые и дитерпеновые (в значительно меньшем количестве), а также их кислородосодержащие производные (спирты, альдегиды, кетоны, простые эфиры и др.) [10]. В общем случае монотерпеновые соединения и их кислородосодержащие производные являются доминирующей группой в составе эфирных масел, их доля достигает до 90 % [11]. Второй по распространенности остается группа сесквитерпеновых соединений. Соединения остальных групп встречаются в эфирных маслах, зачастую, в незначительных количествах [11].

Группа нетерпеновых соединений в составе эфирных масел, в основном, представлена соединениями фенилпропаноидной природы, соединения иной природы в составе эфирных масел встречаются достаточно редко и могут быть представлены тиопроизводными, изотиоцианатами и др. [7].

Представители основных классов соединений, входящих в состав эфирных масел, представлены на рисунке 1. Преобладание групп терпеновых и фенилпропаноидных соединений, а также необходимость в самой групповой дифференциации соединений заключается в преобладании трех основных путей биосинтеза: мевалонатного, немевалонатного (метилэритритфосфатного) и шикиматного [7].

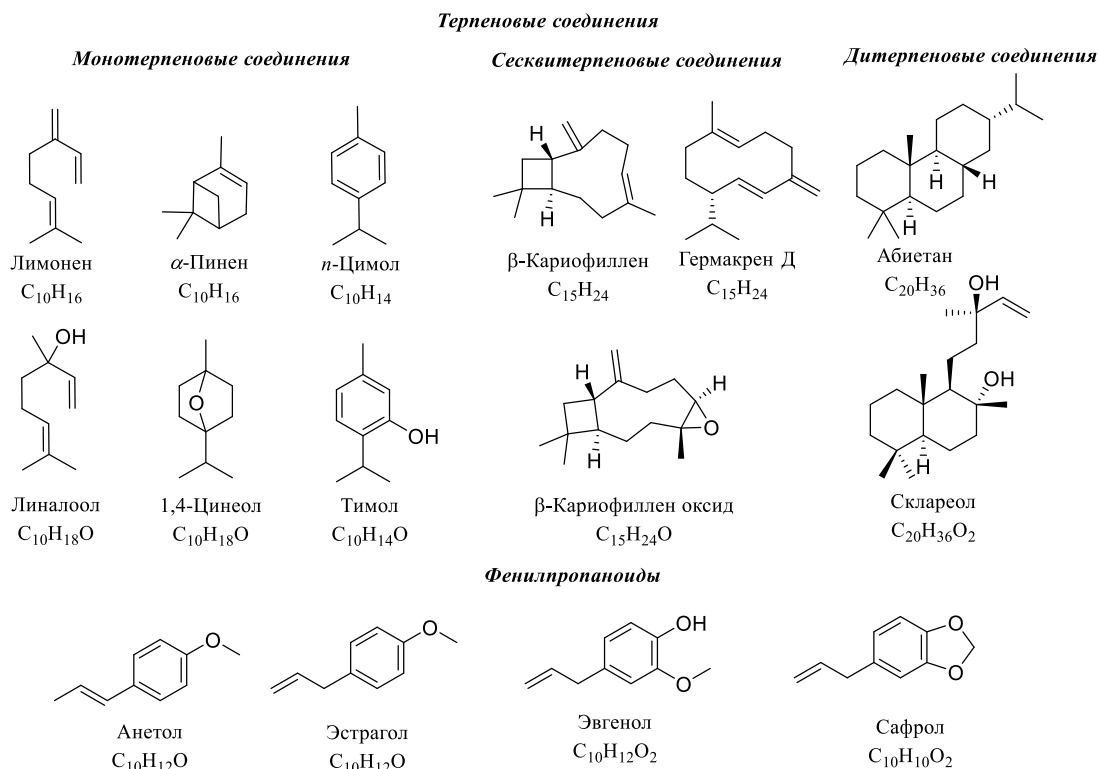


Рисунок 1 – Представители основных классов соединений, входящих в состав эфирных масел. Рисунок подготовлен автором

Описанные биосинтетические пути локализованы в различных компартментах клетки. Мевалонатный путь локализован в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме, немевалонатный – в пластидах, шикиматный – в пластидах и цитозоле. Основными продуктами мевалонатного пути являются сесквитерпены, стеролы и тритерпены; немевалонатного – монотерпены, дитерпены и тетратерпены, а шикиматного – фенилпропаноиды [7, 12]. Схема взаимосвязи основных классов химических соединений эфирных масел и путей их биосинтеза представлена на рисунке 2.

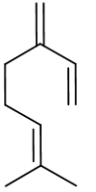
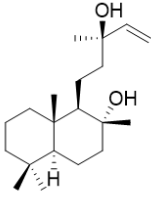
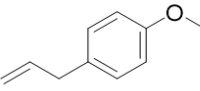
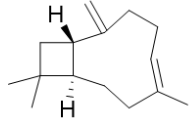
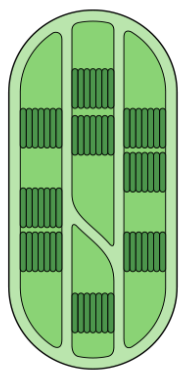
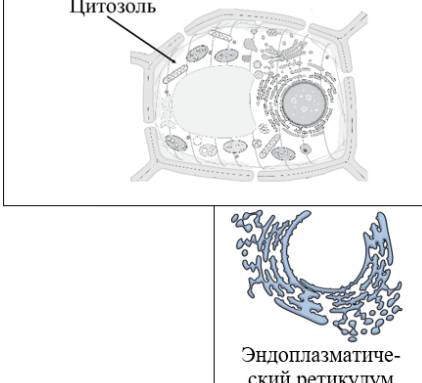
Класс соединений	Монотерпены	Дитерпены	Фенилпропаноиды	Сесквитерпены
Представитель				
	Лимонен	Склареол	Эстрагол	β -Карофиллен
Биосинтетический путь	Немевалонатный		Шикиматный	Мевалонатный
Локализация биосинтеза	 Пластиды		 Цитозоль Эндоплазматический ретикулум	

Рисунок 2 – Схема взаимосвязи основных классов химических соединений эфирных масел и путей их биосинтеза. Рисунок подготовлен автором

1.1.2. Вариабельность компонентного состава эфирных масел

Для эфирных масел характерно значительное химическое разнообразие. Общее количество видов эфиромасличных растений, по ориентировочной оценке, составляет около 3000, однако, только 10 % из них являются коммерчески востребованными [13].

Для всех эфирных масел характерна вариабельность компонентного состава, основные причины которой можно подразделить на эндогенные и экзогенные [14]. Эндогенные факторы определяют набор основных компонентов и их типичные соотношения, а экзогенные обуславливают количественную и качественную вариабельность внутри генетически определенного предела.

Среди основных эндогенных факторов вариабельности компонентного состава выделяют генетический, вегетационный и морфологический фактор. Генетически обусловленная вариабельность компонентного состава ведет к выделению отдельных хемотипов эфирного масла. В группе исследований [15, 16] отмечается прямая корреляция между результатами анализа ДНК растений и составом их эфирных масел. Влияние вегетационного фактора связано с различием в качественном и количественном составе в зависимости от фазы вегетации растения [14, 17, 18]. С учетом этих особенностей, вегетационный фактор имеет ключевое значение при определении сроков заготовки эфиромасличного сырья [17]. Влияние морфологического фактора связано с особенностью

биосинтеза и накопления компонентов эфирных масел в разных тканях растения [14]. Естественным следствием подобных явлений является значительное различие в компонентных составах эфирных масел, полученных из различных частей растения [19, 20, 21].

К основным экзогенным факторам относят климатический, географический и антропогенный. Под климатическими факторами, в первую очередь, подразумевают температуру окружающей среды, уровень осадков, уровень светового воздействия [14, 22]. Географический фактор описывает влияние расположения произрастания эфиромасличного растения: широта и долгота, высота над уровнем моря, а также тип почвы [14, 23, 24]. Антропогенный фактор учитывает человеческое влияние на компонентный состав эфирных масел и зависит от способов культивирования, условий хранения (как сырья, так и эфирного масла), а также технологии получения эфирного масла [14, 25].

В ряде исследований выделяют еще и сезонный фактор варибельности компонентного состава эфирных масел [26-28]. Однако он является лишь сочетанием климатического и вегетационного фактора и отражает их суммарное проявление.

Несмотря на возможность доминирующего влияния каждого из основных факторов варибельности компонентного состава эфирного масла, в большинстве случаев варибельность обусловлена синергетическим влиянием каждого из факторов [14, 18, 24, 28].

Одним из важных факторов варибельности антропогенного характера является непосредственно сам процесс получения эфирного масла. Классически выделяют несколько способов получения эфирных масел: дистилляционные (паровой, сухой, гидродистилляция и гидропародистилляция), прессования и анфлераж (холодный и горячий) [29]. Современные исследования предлагают также способы получения эфирных масел с применением методов экстракции растворителем и с интенсификацией процесса: СВЧ- и УЗ-экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция [30].

Тем не менее, на текущий момент актуальными способами производства эфирных масел признаются методы дистилляционные и прессования для цитрусовых растений, что вытекает из самого определения эфирных масел, данного в ISO 9235 [6]. Несмотря на большую строгость и значительное сужение способов получения данная трактовка является наиболее актуальной, поскольку включает в себя способы получения всех востребованных коммерчески доступных эфирных масел и детерминированность состава эфирного масла от способа его получения [14, 25].

При детальном рассмотрении очевидно, что все иные способы получения, несмотря на больший выход готового продукта, лишены достаточной селективности экстракции для

получения эфирных масел. Иначе говоря, при использовании методов, отличных от регламентированных, получаемый готовый продукт нельзя будет охарактеризовать как эфирное масло. Так при использовании экстракционных методов (экстракция растворителем, СВЧ-, УЗ-экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция) готовый продукт характеризуется как экстракт, а при использовании методов анфлеража – помада.

1.1.3. Особенности применения эфирных масел

Наличие сложного компонентного состава, во многом, обуславливает многообразие фармакологических свойств эфирных масел: антиоксидантных, противовоспалительных, противоопухолевых и антимикробных [14, 17, 24, 25]. Многообразие терапевтических свойств, в свою очередь, в совокупности с набором органолептических характеристик является одной из главных отличительных характеристик эфирных масел как класса БАВ и обуславливает их широкое распространение.

По своему назначению они являются полифункциональными объектами, поскольку находят применение в различных отраслях промышленности. Согласно данным на 2018 год, ключевой объем потребления эфирных масел приходится на пищевую промышленность (35 % от общего объема), долю косметической и парфюмерной промышленности составляет 29 %, производство бытовой химии – 16 %, а фармацевтическая промышленность использует 15 % от общего объема потребления [2]. Данные открытых частей актуальных анализов рынка эфиромасличной продукции прогнозируют рост общего объема потребления эфиромасличной продукции с сохранением пропорций по отдельным отраслям промышленности [3, 4]. Подобный тренд также справедлив и для других продуктов эфиромасличного производства: экстрактов, гидролатов и др.

Основной спрос на эфирные масла в пищевой промышленности связан с их использованием в качестве корригентов вкуса и запаха [31]. Так, FDA относит эфирные масла к категории «в целом признано безопасным» (GRAS, Generally recognized as safe), что позволяет использовать их без проведения токсикологических исследований [32]. Современный подход к их применению основан на использовании выраженных антимикробных и антиоксидантных свойств и предлагает использование эфирных масел как природных добавок («green additives») в пищевые продукты в качестве консервантов [31, 33, 34]. Иные применения эфирных масел связаны с использованием их в качестве биопестицидов при выращивании растений [35, 36].

Историческое применение эфирных масел в парфюмерной промышленности обуславливается исключительно их органолептическими свойствами, однако, текущий

спрос связан ещё и с выраженными антиоксидантными свойствами эфирных масел, что позволяет, повысить стабильность готового косметического продукта [37, 38] и возрастающим спросом на продукты содержащие натуральные компоненты, заменяющие синтетические аналоги [39].

В фармацевтике эфирные масла используются и как коррегенты органолептических свойств, и как действующие компоненты лекарственных средств [1, 40-42]. Помимо коррекции вкуса и запаха в фармацевтической промышленности эфирные масла используются для усиления проникновения через кожу и, как следствие, увеличение биодоступности [43, 44], а также как натуральные антиоксиданты для увеличения стабильности лекарственного препарата [44].

Таким образом, для эфирных масел, как класса БАВ, характерно большое биологическое разнообразие, наличие естественных органолептических свойств и значительного спектра фармакологической активности, что обуславливает их широкое распространение и полифункциональность. Вместе с этим, большое биологическое разнообразие, естественная многокомпонентность, сложность и вариабельность их химического состава позволяет судить о сложности их стандартизации.

1.2. Подходы к стандартизации эфирных масел

1.2.1. Характеристика основных показателей качества эфирных масел

Для сопоставления современных подходов к оценке качества эфирных масел были проанализированы требования общих фармакопейных статей ГФ РФ, Ph. Eur 11 и частных стандартов ISO. Сравнительная характеристика требований к показателям качества эфирных масел представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика требований к показателям качества эфирных масел

№	Показатель	Наличие показателя		
		ГФ РФ	Ph.Eur 11	ISO
1	Описание	Да ¹	Да	Да
2	Растворимость в спирте	Да	Да	Да
3	Относительная плотность	Да	Да	Да
4	Показатель преломления	Да	Да	Да
5	Угол вращения	Да	Да	Да
6	Кислотное число	Да	Да	Да

¹ Полужирным шрифтом выделены показатели качества, наиболее часто встречающиеся в монографиях

7	Пероксидное число	Да	Да	Да
8	Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Да	Да	Нет
9	Остаток после выпаривания эфирного масла	Да	Да	Нет
10	Вода	Да	Да	Да
11	Спирт этиловый	Да	Да	Да
12	Посторонние эфиры	Нет	Да	Нет
13	Энантиомерная чистота	Да	Да	Да
14	Температура затвердевания	Да	Да	Нет
15	Хроматографический профиль/ Количественное определение	Да	Да	Да
16	Температура воспламенения	Нет	Нет	Да

Общие регламентированные показатели качества эфирных масел в ГФ РФ и Ph.Eur являются практически идентичными, что обусловлено парадигмой гармонизации фармакопейных требований в Российской Федерации и приоритетным статусом Европейской фармакопеи. Показатели «Хроматографический профиль» и «Количественное определение» по методологии анализа являются также идентичными, но имеют разное название. Ключевыми отличиями в подходах является наличие в Ph.Eur показателей «Посторонние эфиры» и «Энантиомерная чистота», которые направлены на выявление фальсифицированной продукции. В таблице 1 отсутствует показатель «Подлинность», однако, для его определения в обеих Фармакопеях обычно используют методы ГХ (совместно с определением показателя «Хроматографический профиль») и ТСХ (определение 1 - 2 компонентов). Показатель «Температура воспламенения», регламентируемый ISO, в большей степени отражает не качество эфирного масла, а необходим для определения условий его транспортировки.

Представленный в таблице 1 список основных показателей качества включает 16 показателей и является избыточным. В актуальных монографиях, посвященных качеству определенных эфирных масел, как правило, приводится меньшее число показателей качества – 7 в Ph.Eur и 9 в ГФ РФ.

Стандарт ISO, устанавливающий общие требования к качеству эфирных масел, отсутствует и актуальный перечень показателей можно установить только путем анализа частных стандартов качества эфирных масел. В большинстве частных стандартов число показателей качества не превышает 7.

Таким образом, с учётом анализа фармакопейных требований и требований стандартов ISO основными показателями качества эфирных масел являются показатели «Подлинность», «Растворимость в спирте», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Кислотное число», «Жирные и минеральные масла, в

том числе осмолвившиеся вещества» и «Хроматографический профиль». При этом важно отметить, что список показателей не является статичным, при необходимости, может быть расширен. Так, например, для эфирного масла лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) необходимо определение показателя «Эфирное число», согласно ISO 3512:2012 [45], согласно же Ph.Eur 11 – определение показателя «Энантиомерная чистота» [46].

1.2.2. Подходы к стандартизации компонентного состава эфирных масел

На текущий момент существует два основных регламентированных подхода к стандартизации компонентного состава эфирных масел: ключевое отличие заключается в методологии определения – определяется один/два компонента или их определенный набор. Таким образом, рассматриваемые подходы можно определить как однокомпонентный и многокомпонентный.

Однокомпонентный подход используется в Китайской Фармакопее, он основан на проведении идентификации эфирного масла на основании количественного определения одного или двух-трех маркерных компонентов [47]. Так, например, Китайская Фармакопея регламентирует для эфирного масла аниса звездчатого (*Illicium verum* Hook.f.) определение содержания только транс-анетол (норма – не менее 80 %), а для масла коричника китайского (*Cinnamomum cassia* L. (J.Presl)) – коричневого альдегида (норма – не менее 75 %). В Индийской Фармакопее используется похожий подход, однако, контролируется содержание не менее 3 компонентов: для эфирного масла аниса звездчатого – 3 компонента, а для эфирного масла коричника китайского – 5 компонентов [48]. Неоспоримое преимущество описываемого подхода – легкость его применения и точность интерпретации полученных данных, но в то же время отмечается и недостаточная информативность, когда вывод о качестве делается на основании ограниченного числа компонентов.

Многокомпонентный подход является более комплексной оценкой качества эфирных масел и описан в соответствующих стандартах ISO [49, 50], а также имплементирован Европейской Фармакопеей и Государственной Фармакопеей Российской Федерации [51]. В описанной методологии ключевым показателем качества является хроматографический профиль, позволяющий провести идентификацию самого эфирного масла и определить содержание компонентов профиля. Хроматографический профиль представляет собой перечень репрезентативных и характерных компонентов эфирного масла и предельные значения концентрации каждого из них, и возможно, отношения этих концентраций [49, 50]. В соответствии с действующими стандартами для ранее упомянутых в качестве примера масел аниса звездчатого ISO нормирует содержание тринадцати компонентов [52], а для коричника китайского – четырнадцати [53]. Подход, основанный

на использовании хроматографических профилей, характеризуется намного большей информативностью анализа, позволяя однозначно идентифицировать эфирные масла и продукты их переработки. Естественное ограничение использования метода хроматографического профилирования – отсутствие достаточного количества разработанных хроматографических профилей эфирных масел.

1.2.3. Методы анализа эфирных масел

Для анализа эфирных масел по широкому перечню их показателей качества используются органолептический анализ, методы физического, химического и физико-химического анализа. Сводная схема методов анализа эфирных масел по основным показателям качества представлена на рисунке 3.

Для показателей, определяемых органолептическими, физическими и химическими методами анализа характерна простота выполнения анализа и интерпретации данных при этом, как правило, аналитические процедуры являются стандартизованными и закреплёнными в соответствующей документации.

Наибольший интерес представляют физико-химические методы анализа эфирных масел. Наибольшее распространение получили хроматографические методы, а именно капиллярная газовая хроматография [53]. Метод обладает достаточно большим спектром доступных хроматографических колонок, отличающихся различной геометрией и типом неподвижных фаз, многообразием систем детектирования, что в совокупности способствует точной идентификации и является оптимальным для многокомпонентных смесей, а также является регламентированным ISO для анализа эфирных масел [49]. Однако, наибольшую популярность нашли системы, использующие колонки с неполярной НЖФ (диметилполисилоксан и (5%-фенил)-метилполисилоксан) и полярной НЖФ (полиэтиленгликоль) с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием (МС) [54]. Применение пламенно-ионизационного детектора оправдано его большим линейным динамическим диапазоном и высокой чувствительностью к компонентам эфирных масел [54, 55], использование же масс-спектрометрического детектора обосновано возможностью проведения масс-спектрометрического разделения и идентификации компонентов эфирных масел [53].

Строго говоря, комбинация колонок с этими двумя типами НЖФ и двумя системами детектирования является регламентированной ISO к использованию. При этом современный подход к выбору системы детектирования предполагает использование масс-спектрометрического детектора для проведения идентификации, а для получения количественного результата – пламенно-ионизационного детектора [57].

Непосредственно идентификация компонентов также может быть реализована без использования масс-спектрометрического детектора. Стандарт ISO 7609:1985 предполагает проведение идентификации с использованием внешнего стандартного раствора или путем расчета индексов удерживания [56]. Индекс удерживания является безразмерной характеристикой удерживания определяемого вещества относительно определенного ряда стандартных веществ [58, 59].



Рисунок 3 – Сводная схема методов анализа эфирных масел по основным показателям качества. Рисунок подготовлен автором

Использование индексов удерживания обосновано дрейфом времен удерживания определяемых компонентов в процессе анализа и их зависимостью от ряда параметров (температурная программа, геометрические параметры колонки, толщина пленки НЖФ, поток газа) [60]. Индексы удерживания, в отличие от времен удерживания, являются независимыми от перечисленных параметров, а значит должны быть постоянными при соблюдении постоянства типа НЖФ [60].

Среди возможных индексов удерживания на текущий момент находят применение: индексы удерживания Ковача, линейные индексы удерживания и индексы Ли.

Индексы удерживания Ковача (I) – исторически первые введенные индексы удерживания компонентов в условиях ГХ анализа [58, 59], определяются по следующей формуле:

$$I = 100 * \left[\frac{\lg(t'_r(x)) - \lg(t'_r(z))}{\lg(t'_r(z+1)) - \lg(t'_r(z))} \right], \quad (1)$$

где $t'_r(x)$ – исправленное время удерживания определяемого компонента, мин;
 $t'_r(z)$ – исправленное время удерживания n -алкана с числом атомов углерода z , мин;
 $t'_r(z+1)$ – исправленное время удерживания n -алкана с числом атомов углерода $z+1$, мин;

Индексы удерживания Ковача (1) основаны на использовании логарифмов исправленных времен удерживания испытуемого вещества и нормальных алканов. Индексы Ковача справедливы для изотермических условий и в настоящее время применяются редко [58, 59].

Наиболее распространенными на текущий момент являются линейные индексы удерживания (LRI), введенные Ван ден Дулом и Кратцем в 1963 году [59, 61]. Линейные индексы удерживания (LRI) рассчитываются по следующей формуле:

$$LRI = 100 * \left[\frac{t_r(x) - t_r(z)}{t_r(z+1) - t_r(z)} \right], \quad (2)$$

где $t_r(x)$ – время удерживания определяемого компонента, мин;
 $t_r(z)$ – время удерживания n -алкана с числом атомов углерода z , мин;
 $t_r(z+1)$ – время удерживания n -алкана с числом атомов углерода $z+1$, мин;

Линейные индексы удерживания (2) являются модификацией индексов Ковача (1) и основаны на линейной зависимости времени удерживания от числа атомов углерода. В качестве стандартной шкалы используются времена удерживания n -алканов.

Значимыми преимуществами линейных индексов удерживания в сравнении с индексами Ковача является возможность их использования в режиме программирования температуры термостата и упрощенный расчет.

Индексы Ли используются значительно реже в качестве стандартной шкалы времен удерживания полиароматических углеводородов (нафталин, фенантрен и т.д.). Они рассчитываются аналогично линейным индексам удерживания (2) [62].

Несмотря на формальную независимость от множества параметров газохроматографического анализа для линейных индексов удерживания сообщается о наличии проблем с воспроизводимостью [60, 63, 64]. Поскольку индексы удерживания не воспроизводятся идеально для них принято использование допустимых отклонений измеренных значений от справочных (ΔRI). В научной литературе зачастую для колонок с неполярной НЖФ ΔRI не должен превышать 10 единиц, для колонки с полярной НЖФ – 50 единиц [60, 65, 66]. Тем не менее, в рекомендациях по идентификации компонентов с использованием линейных индексов удерживания приводятся значительно более строгие

нормы: не более 5 единиц для колонок с неполярной НЖФ и не более 10 единиц для колонок с полярной [67].

Современный подход к итоговой идентификации возможен только на основании ортогонального эксперимента: либо на основании данных ГХ-МС и совпадения индексов удерживания, либо на основании совпадения индексов удерживания на двух колонках различной полярности [67].

Развитие метода газовой хроматографии позволяет применять новые техники к анализу эфирных масел, наиболее востребованными из которых могут быть методы быстрой хроматографии (*Fast-GC*, *F-GC*), метод многомерной хроматографии (*GC x GC*), метод газовой хроматографии-ольфактометрии (*GC-O*) и газовой хроматографии с «электронным носом» (*E-nose*).

Метод быстрой хроматографии (*Fast-GC*, *F-GC*) основан использовании коротких капиллярных колонок, что позволяет сократить время анализа в несколько раз [68]. Метод многомерной хроматографии (*GC x GC*) за счет проведения последовательного ортогонального разделения позволяет обеспечить высокую эффективность разделения, что может быть актуально при анализе сложных смесей [69]. Газовая хроматография-ольфактометрия (*GC-O*) позволяет определить аромат конкретных компонентов и построить профиль аромата [70, 71], применение «электронного носа» позволяет проводить экспрессную классификацию эфирных масел и определять фальсифицированную продукцию [72, 73]

Несмотря на то, что подобные варианты анализа способны как значительно сократить время анализа, так и обладают колоссальной информативностью, они достаточно сложны, не являются регламентированными и не могут рассматриваться как приоритетные при контроле качества эфирных масел.

1.2.4. Фальсификация эфирных масел

Логичным следствием высокого спроса на эфирные масла является наличие большого числа поддельной продукции. Анализ актуальных способов фальсификации позволяет определить достаточный объем стандартизуемых показателей, необходимых для однозначного определения фальсифицированной продукции.

В практике наиболее часто встречаются 4 способа фальсификации эфирных масел: добавление более дешевых эфирных масел [74, 75], разбавление жирными растительными маслами [74, 75], добавление фиксаторов запаха [76, 77] и добавление синтетических компонентов [75] или составление синтетической композиции [75].

Фальсификация путем добавления более дешевых эфирных масел и синтетических компонентов способна привести к значительному искажению органолептических свойств эфирного масла. Однако данный вид фальсификации является наиболее простым с точки зрения обнаружения [74]. Фактически, добавление иного эфирного масла или компонента, изначально отсутствовавшего в составе, приведет к несоответствию в хроматографическом профиле испытуемого образца. Однако, добавление синтетического компонента, который изначально присутствовал в составе эфирного масла является одним из самым труднодетектируемых способов фальсификации, поскольку предполагает использование нестандартного метода анализа – хиральной газовой хроматографии [78, 79]. Сложность детектирования заключается в необходимости определения содержания изомера определенного маркерного компонента. Практическое ограничение в данном случае – для большинства эфирных масел отсутствуют регламентированные содержания энантиомеров маркерных изомеров, неизвестна степень и возможные причины вариабельности содержания определенных энантиомеров [79, 80]. На текущий момент достаточно исследована хиральная чистота эфирных масел: мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.) [79, 80], бергамота (*Citrus limon* L.) [79, 81], розы (*Rosa × damascena* Herzm.) [80] и лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) [79, 82-84]. Большинство же эфирных масел являются недостаточно изученными для стандартизации по содержанию определенного энантиомера. Аналогичная сложность детектирования характерна и для фальсификации путем составления полностью синтетических композиций.

Разбавление эфирных масел растительными маслами приводит к уменьшению или полной потере их биологических свойств и снижению степени выраженности органолептических характеристик [78]. Определить подобный способ фальсификации методами газовой хроматографии в условиях обычного анализа невозможно, поскольку относительное содержание компонентов не изменится, а вносимые добавки не детектируются. Определение плотности, угла вращения и показателя преломления также не способно однозначно подтвердить фальсификацию из-за близости значений по этим показателям большинства эфирных масел с маслами растительными [78]. Однако наличие растительных масел можно подтвердить путем анализа по показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества».

Добавление фиксаторов запаха, напротив, не вызывает значимого изменения запаха, однако, ведет к изменению физических и химических свойств эфирного масла, и может быть достаточно легко определено при анализе по косвенным показателям качества и при определении хроматографического профиля [74, 81]. Фиксаторы запаха подразделяют на три основные группы: фталаты (диэтилфталат, дибутилфталат и др.), гликоли

(дипропиленгликоль, диэтиленгликоль и др.) и эфиры жирных кислот (изопропилмиристат и др.) [74, 81, 85].

Ключевым показателем для определения фальсифицированной продукции является хроматографический профиль и косвенные показатели качества (плотность, угол вращения, показатель преломления и содержание жирных масел). Анализ по этим показателям в совокупности способен выявить большинство способов фальсификации.

1.3. Методы хроматографического профилирования растительных объектов

Современный подход к контролю качества растительных объектов основан на определении «маркерных соединений». Европейское агентство лекарственных средств (ЕМА) регламентирует определение «маркерных соединений» в случае невозможности оценки веществ с известной терапевтической активностью [86]. ЕМА определяет «маркерные соединения» как отдельные химические вещества или группу веществ, используемую для контроля качества, вне зависимости от их терапевтической активности. В свою очередь «маркерные соединения» ЕМА подразделяют на две группы: активных маркеров – обладающих терапевтической активностью и аналитических маркеров – используемых для решения аналитических задач. Представленная классификация химических маркеров не является исчерпывающей, в зависимости от свойств маркерных соединений применяются и другие подходы к классификации [87, 88].

Применение аналитических маркеров для контроля растительных объектов представляется одной из наиболее выгодных стратегий, поскольку определение действующих веществ и установление терапевтического эффекта каждого из них задача крайне трудная, а терапевтический эффект таких многокомпонентных смесей зачастую обусловлен совокупностью компонентов [89].

Естественная сложность химического состава может затруднить или ограничить выбор специфического маркера, а однозначная идентификация растений зачастую невозможна, поскольку выбранный специфический маркер может содержаться в большом количестве объектов [89]. Таким образом, ключевое требование к выбранному химическому маркеру или к их группе заключается в способности с их помощью однозначно идентифицировать растительный объект.

Наиболее комплексным подходом к оценке качества растительных объектов является метод хроматографического профилирования и хроматографического «фингерпринтинга» [90], основанные на использовании всех современных хроматографических методов анализа. Для данных методов характерна высокая

универсальность, сообщается об их использовании для анализа вин [91], нефти [92] и других комплексных объектов [93].

Однако наибольшее количество исследований, и наиболее оптимальные и гибкие подходы к применению методов хроматографического профилирования были произведены в сфере лекарственных растений. Так, они рекомендованы к использованию руководством ВОЗ для контроля качества лекарственных растений, в случаях если определение действующих веществ невозможно – определение характеристичного вещества или характеристичной смеси веществ (“chromatographic fingerprint”) [94].

Иным случаем применения методов хроматографического профилирования для контроля качества лекарственных растений является их применение в анализе объектов китайской традиционной медицины [95, 96].

В данном случае, методы применяются как в исследовательских целях, так и в целях контроля качества – эталонные хроматографические профили с хроматограммами закреплены в Китайской Фармакопее [47].

На текущий момент в научной литературе существует некоторое разночтение терминов «профилирование» и «фингерпринтинг» [94-97].

Наиболее корректная дифференциация методов приведена в статье, где даны следующие трактовки: «профилирование» (targeted analysis – направленный анализ) понимается как анализ определенного набора заранее известных компонентов (например, метаболическое профилирование), а под «фингерпринтингом» (untargeted analysis – ненаправленный анализ) понимается неспецифический анализ тестового образца [97].

Тем не менее, в публикациях, посвященных фитохимическим исследованиям, под термином “fingerprinting” зачастую понимается и специфический анализ заранее известных компонентов [89, 98], и неспецифический анализ растительных объектов [90]. В русскоязычной научной среде, напротив, термин «фингерпринтинг» не нашел большого распространения. Различие рассматриваемых подходов показано в виде схемы на рисунке 4.

Схема, представленная на рисунке 4, иллюстрирует различие в терминах «профилирование» и «фингерпринтинг» с позиции их областей применения. Так, профилирование предоставляет информацию о состоянии исследуемого образца путем определения заранее известных химических веществ. «Фингерпринтинг» позволяет сравнивать исследуемые образцы с целью их классификации по различным признакам (регион произрастания, сортовые и видовые особенности и т.д.) и построения моделей. Поскольку фингерпринтинг представляет собой неспецифический анализ, то получение

информации об образце возможно исключительно с применением хеометрической обработки результатов.

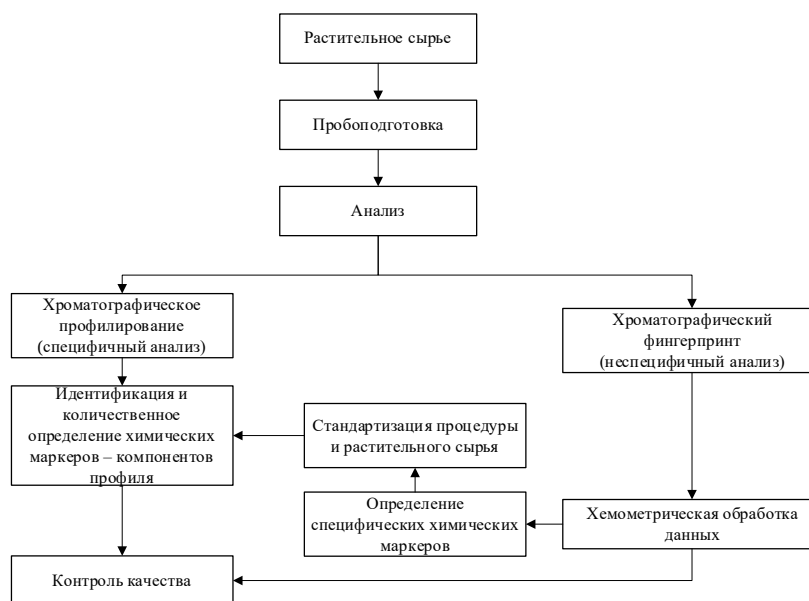


Рисунок 4 – Дифференциация методов хроматографического профилирования и фингерпринтинга. Рисунок подготовлен автором

Тем не менее, очевидна и взаимосвязь рассматриваемых подходов. «Фингерпринтинг» может быть использован при анализе больших массивов информации с целью классификации образцов и определения специфических химических маркеров, т.е. хроматографического профилирования образца. Проведенная на данном этапе работа позволяет в дальнейшем формализовать анализ – производить контроль качества и классификацию на основании контроля содержания компонентов хроматографического профиля объектов исследования.

Отмеченная взаимосвязь двух подходов продемонстрирована в серии статей Qian et al [98, 99], посвященных анализу корней рейнутрии японской (*Reynoutria japonica* Houtt.). В первой статье [98] авторами был определен ВЭЖХ-фингерпринт исследуемого объекта (24 образца) и фингерпринт близкородственных растений. Авторами был определен хроматографический профиль, состоящий из 6 специфических маркерных соединений, позволяющих однозначно идентифицировать растение от близкородственных. В следующей работе [99] авторы применяли разработанный хроматографический профиль для контроля качества 24 образцов рейнутрии японской различного происхождения.

Из-за своих особенностей профилирование применимо к сферам контроля качества, тогда как фингерпринтинг в большей степени применим к исследовательским задачам, например, к установлению хроматографического профиля испытуемого объекта для целей

его дальнейшего контроля. Тем не менее, метод фингерпринтинга однозначно применим и для целей контроля качества растительных объектов [100-102].

Результаты, получаемые с помощью методов хроматографического профилирования и «фингерпринтинга» находятся в значительной зависимости от процедуры пробоподготовки, поскольку она напрямую влияет на химический состав получаемого образца. За последнее время было успешно применено множество разнообразных техник экстракции для анализа растений, что отмечено в следующих обзорных статьях [103, 105]. Классическая жидкостная экстракция, не смотря на свои недостатки, остается наиболее распространенным способом извлечения веществ из растительного объекта [106].

С учетом большого влияния на итоговый результат выбранный метод и процедура экстракции должна обеспечивать хорошее извлечение химических веществ и, что самое главное, должны быть воспроизводимыми для применения методов хроматографического профилирования и «фингерпринтинга».

1.3.1. Хроматографическое профилирование эфирных масел.

Метод хроматографического профилирования является регламентированным при контроле качества эфирных масел в соответствии с требованиями ISO и Ph.Eur.

Регламентированный характер означает наличие четких требований к процедуре разработки профилей и к их применению. Подготовка хроматографических профилей для представления в стандартах и их применение закреплены в действующих стандартах ISO 11024-1:1998 [49] и ISO 11024-2:1998 [50].

В основе метода заложен анализ большого числа предварительно отобранных проб эфирного масла с последующим итеративным составлением хроматографического профиля из его репрезентативных и характерных компонентов.

Компонентный состав эфирных масел зависит от большого числа факторов, в совокупности обуславливающих его вариабельность [14-18]. Для составления хроматографического профиля используются только предварительно отобранные пробы эфирных масел с известным ботаническим происхождением и известным способом получения. Сезонные вариации компонентного состава эфирного масла учитываются за счет отбора проб для анализа разных лет произрастания.

Дополнительным критерием при отборе может быть информация о географическом происхождении растения. Несмотря на колоссальное влияние географического происхождения растения на хроматографический профиль эфирного масла [14], анализ действующей нормативной документации показывает, что зачастую географическая дифференциация в разработанных хроматографических профилях отсутствует.

При учете необходимой информации о происхождении разработанный хроматографический профиль будет справедлив исключительно для эфирного масла, полученного из растения с определенным ботаническим и географическим происхождением (при наличии установленных закономерностей изменчивости компонентного состава) и определенным способом.

При этом хроматографический профиль не является всеобъемлющей характеристикой всех эфирных масел, полученных из определенных растений. Например, для эфирного масла розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn., seu *Rosmarinus officinalis* L.) в ISO 1342-2012 закреплено два хроматографических профиля, соответствующих определенному хемотипу: испанский вид (камфорный хемотип) и тунисский/марокканский вид (цинеольный хемотип) [107]. При этом третий из наиболее распространенных хемотипов – вербеноновый [108] не является нормативно закрепленным. Таким образом, очевидно, что на этапе подготовки хроматографического профиля следует уделять значимое внимание отбору большого числа проб для учета естественного разнообразия эфирных масел. При использовании хроматографических профилей, в свою очередь, следует понимать, что они справедливы только для эфирных масел с определенными характеристиками: ботаническими, географическими и с определенным способом получения. Несоответствие хроматографического профиля эфирного масла с иными характеристиками от заявляемых является ожидаемым и допустимым.

После проведения анализа большого числа проб и этапа отбраковки сильно выпадающих результатов в компонентном составе эфирного масла выделяют репрезентативные и характерные компоненты. В данной трактовке репрезентативными компонентами являются те, что присутствуют во всех пробах эфирного масла в любой концентрации, а характерными – те репрезентативные компоненты, концентрация которых является специфичной для определенного эфирного масла.

Выбор характерных компонентов зачастую основан на необходимости однозначной идентификации определенного эфирного масла в ряду масел близкородственных растений. Так, в составе эфирного масла шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) контролируется суммарное содержание линалоола и линалилацетата, что позволяет его отличать от эфирного масла шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) [49], а содержание 1,8-цинеола позволяет отличать от масла шалфея испанского (*Salvia officinalis* subsp. *lavandulifolia* (Vahl) Gams).

Другой причиной для включения в хроматографический профиль являются токсические свойства компонентов. В составе эфирного масла шалфея мускатного к

характерным компонентам отнесли α - и β -туйон из-за необходимости их тщательного контроля.

Ключевым моментом в данном случае является наличие апостериорной информации (до составления хроматографического профиля) не только о токсических свойствах его компонентов, о компонентном составе исследуемого эфирного масла, но и о компонентных составах эфирных масел близкородственных растений.

Определение пределов концентрации компонентов основано на предположении, что в полученной выборке эфирных масел концентрации репрезентативных и характерных компонентов подчиняются нормальному распределению. Расчет пределов концентрации ведут итеративно путем расчета доверительного интервала концентрации для доверительной вероятности 95 %:

$$x \pm 1,96 * \sigma \quad (3)$$

где x - среднеарифметическое значение концентрации, %

σ - среднеквадратическое отклонение концентрации, %.

1,96 – коэффициент функции распределения Гаусса-Лапласа для доверительной вероятности 95 %.

Концентрации компонентов, не входящие в границы рассматриваемого доверительного интервала, признаются выбросами, и дальнейшие расчеты ведут без их учета. Итерации проводят до тех пор, пока все исследуемые значения не будут входить в рассматриваемый интервал. После окончания расчета полученные граничные значения концентраций округляют для представления в хроматографическом профиле.

1.3.2. Методы хроматографического «фингерпринтинга»

Ввиду того, что фингерпринтинг является неспецифическим методом, то возможности применения этого метода целиком зависят от целей исследования и применяемых хеометрических техник.

Хроматограмма в данном методе представляет собой вектор [109]. Существует несколько подходов, согласно которым, элементами могут быть как вся хроматограмма или же её часть, так и значения площадей и высот пиков [110].

Начальный этап хеометрической обработки – предварительная обработка данных. При использовании хроматографических методов анализа используются как классические хеометрические процедуры нормализации и центрирования матрицы, так и специфические: *peak alignment techniques* для нивелирования сдвига времени удерживания. В статьях, посвященных сравнению используемых техник, отмечается, что, несмотря на

индивидуальные ограничения техник, все они позволяют получить сопоставимый результат [111, 112].

Дальнейшая хемометрическая обработка зависит от целей исследования для чего могут быть использованы: неконтролируемые (*unsupervised techniques*) и контролируемые методы (*supervised techniques*).

Применение *unsupervised techniques* для анализа растительных объектов позволяет провести скрининговый анализ, анализ схожести и кластерный анализ. Особенность *unsupervised techniques* связана с отсутствием априорной информации о свойствах объекта (регион заготовки, время созревания, ботаническое происхождение и т.д.). Наиболее востребованными методами неконтролируемых техник для анализа растительных объектов являются методы главных компонент (PCA) и иерархический кластерный анализ (HCA).

Ключевое отличие *supervised techniques* заключается в необходимости наличия априорной информации об объекте. На основании этой информации и свойств объекта возможно решение задач распознавания образцов, их классификации и многокомпонентной калибровки. Принцип использования контролируемых методов основан на создании определенной модели с помощью данных с известными параметрами для анализа данных с неизвестными параметрами. Ключевыми техниками являются линейный и квадратичный дискриминантный анализ (LDA), метод k-ближайших соседей (kNN), PLS дискриминация (PLS-DA), OPLS дискриминация (OPLS-DA), формальное независимое моделирование аналогии классов (SIMCA) и искусственные нейронные сети (ANN) [113, 114].

На текущий момент опубликовано большое количество научных статей с приложением метода хроматографического «фингерпринтинга» к изучению эфирных масел [115-118]. Основные цели опубликованных статей – исследование различий в составе у эфирных масел одного ботанического различного происхождения, разработка характеристичного «фингерпринта» объекта с целью его дальнейшего применения в контроле качества.

Если при проведении хроматографического профилирования эфирных масел обязательным условием является наличие информации о географическом, ботаническом происхождении и способе получения эфирного масла, то методы «фингерпринтинга» могут использоваться и при ее отсутствии. Кроме того, наличие априорной информации необходимо при выборе характеристичных компонентов эфирного масла в случае метода хроматографического профилирования, в основе методов «фингерпринтинга» же лежит исключительно информация, полученная в ходе обработки данных.

Другим важнейшим отличием методов является отсутствие утвержденной нормативной документации. Её отсутствие затрудняет интерпретацию данных, поскольку

в многообразии исследований используются различные техники обработки данных, как следствие, построенные модели не являются унифицированными. В то же время отсутствие жестких ограничений значительно ускоряет процесс разработки итогового «фингерпринта».

1.4. Обзор современных подходов к изучению стабильности эфирных масел

Определение стабильности является одним из важнейших этапов разработки различных продуктов. Под стабильностью, в данном случае, подразумевают соответствие продукции по основополагающим параметрам качества в течение всего заявленного периода хранения. Деятельность производителей по определению стабильности продукции опирается на регуляторные требования соответствующих нормативных документов в конкретной сфере деятельности. Для исследования стабильности фармацевтических продуктов следует опираться на действующие фармакопейные статьи [51, 115] и актуальные требования к исследованию стабильности [119-121]. Процесс изучения стабильности эфирных масел характеризуется идентичной целью - определение условий хранения и срока годности, в рамках которых эфирное масло сохраняет соответствие критериям приемлемости основных параметров качества.

Ключевыми отличиями эфирных масел от пищевых продуктов и лекарственных средств является отсутствие нормативной документации, не только регламентирующей проведение исследований стабильности, но и устанавливающей требования к качеству для подавляющего большинства эфирных масел. Исходя из этого, очевидна сложность в установлении универсальных требований к проведению исследований стабильности, что усложняется комплексным составом эфирных масел.

Комплекс основных характеристик эфирных масел (физико-химические, органолептические, фармакологические свойства) определяется смесью отдельных органических веществ – компонентов масла, однако исследование изменений в содержании ряда компонентов не позволяет сделать однозначное заключение о стабильности самого эфирного масла. Таким образом, очевидно, что основная трудность при определении стабильности эфирных масел заключается в необходимости проведения комплексного исследования и вынесения заключения о стабильности эфирного масла как сложного многокомпонентного объекта.

В аспекте составления хроматографического профиля эфирного масла задача изучения стабильности является обязательной, поскольку позволяет оценить пригодность разработанного хроматографического профиля для однозначной идентификации эфирного масла в рамках его срока годности.

Следует учитывать, что изменения в составе эфирного масла могут приводить не только к утрате идентичности, но и непосредственно к образованию нежелательных соединений, потенциально способных обладать аллергическими и токсическими свойствами. Таким образом, вопросы изучения стабильности и безопасности являются непосредственно взаимосвязанными.

1.4.1. Химические процессы, протекающие при хранении эфирных масел

Основная доля от компонентного состава большинства эфирных масел приходится на терпеновые соединения, характеризующиеся термолабильностью и склонностью к окислению [122]. В процессе хранения эфирные масла естественным образом подвержены влиянию следующих факторов: температура, кислород воздуха и световое излучение.

Воздействие данных факторов напрямую связано с возможными химическими превращениями компонентов эфирных масел, к которым относятся процессы окисления [123], в том числе УФ-индуцированного [124], изомеризации [125], дегидрогенирования [125] и полимеризации [126] (рисунок 5).

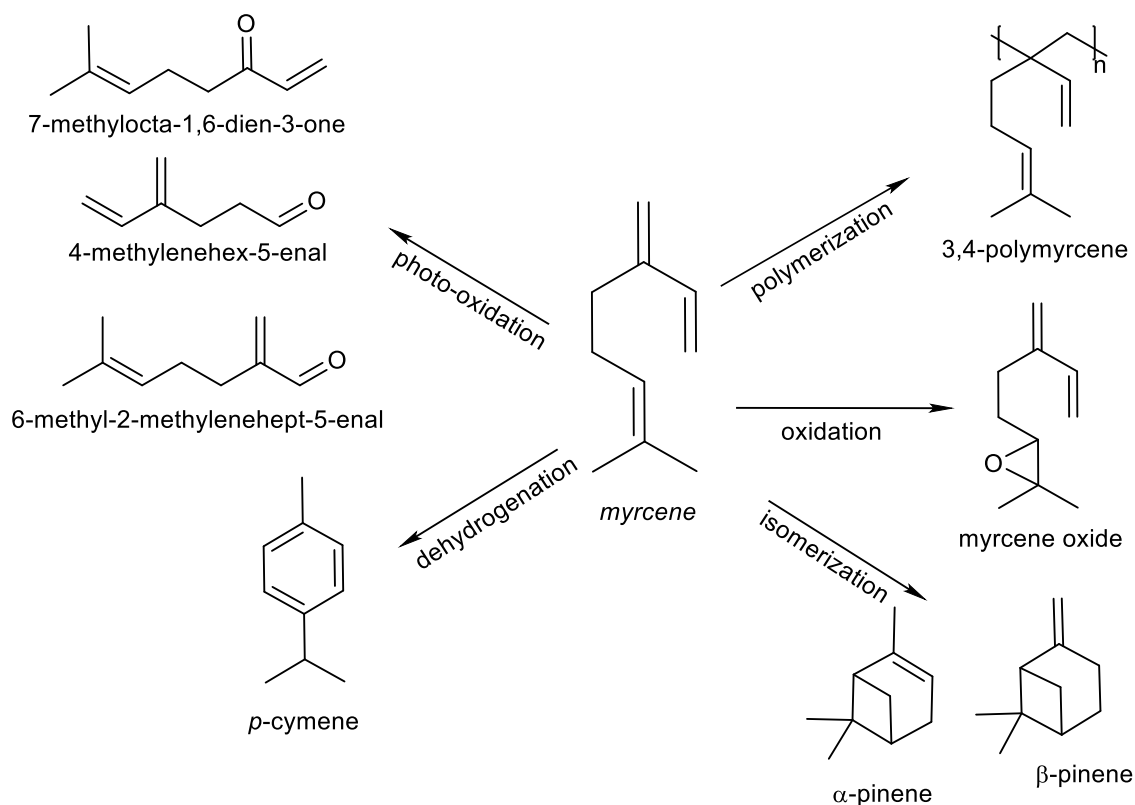


Рисунок 5 – Возможные реакции изменения компонентов эфирных масел под воздействием факторов внешней среды на примере β -мирцена. Рисунок подготовлен автором

По этой причине дизайн экспериментов по изучению стабильности должен учитывать взаимное влияние на эфирное масло с течением времени совокупности

факторов: светового воздействия, температуры и доступа кислорода. Кроме перечисленных основных факторов дополнительно может изучаться влияние воды и других контаминатов, например, металлов [126].

Образующиеся в процессе хранения гидропероксиды более вероятно скажутся на возможных аллергических реакциях эфирного масла, чем его нативные компоненты [127]. Этот факт делает обязательным контроль их содержания в рамках изучения стабильности эфирного масла.

В зависимости от положения пероксидной группы для одного монотерпена может существовать несколько изомерных друг другу гидропероксидов, например, для линалоола и гераниола сообщается о двух наиболее распространенных гидропероксидах с пероксидной группой в положениях 6 и 7 [128, 129] (рисунок 6). Для линалоола и гераниола также возможно образование гидроксигидропероксида, однако, он значительно более нестабильный и разрушается с образованием кетона и альдегида, соответственно [129].

В 1999 году путем термического разложения камфена, 3-карена, лимонена и α -терпинена были определены 4 основные реакции термического разложения: дегидрогенирование, окислительное расщепление кратных углерод-углеродных связей, образование эпоксидов и аллильное окисление [130].

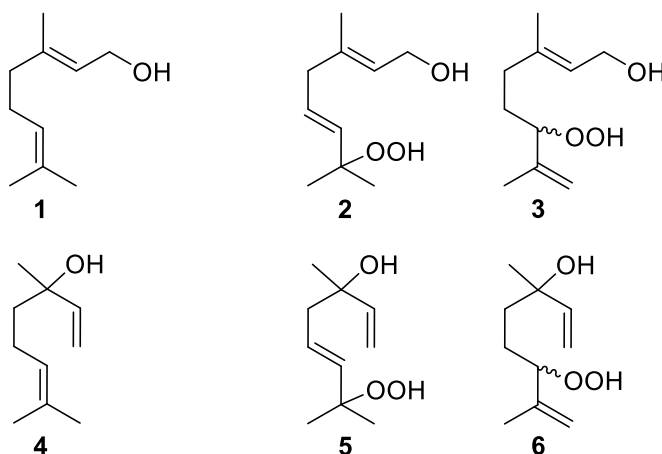


Рисунок 6 – Химические структуры линалола, гераниола и их пероксидов.

Гераниол **1**, 7-гидроперокси-3,7-диметилокта-2,5-диен-1-ол **2**, 6-гидроперокси-3,7-диметилокта-2,7-диен-1-ол **3**, линалоол **4**, 7-гидроперокси-3,7-диметилокта-1,5-диен-3-ол **5**, 6-гидроперокси-3,7-диметилокта-1,7-диен-3-ол. Рисунок подготовлен автором

В литературе описано проведение стресс-испытаний для непосредственно эфирных масел в условиях повышенной температуры, принудительного УФ-облучения в нормальной и инертной атмосфере [131-134]. Определенные изменения в компонентном составе в условиях стресс-испытаний невозможно использовать для прогнозирования и установления срока годности ввиду возможной нестабильности как самих компонентов

эфирных масел, так и их продуктов деградации. В свою очередь, стресс-испытания полезны для изучения возможных путей протекания химических реакций с компонентами эфирных масел.

1.4.2. Аналитическое сопровождение изучения стабильности эфирных масел

Методология анализа при исследовании изменений в компонентном составе в рамках изучения стабильности не должна отличаться от используемой для анализа эфирных масел с целью их контроля качества. Это позволяет помимо изучения характера изменений параметров качества эфирного масла, однозначно оценить степень изменений и возможность проведения идентификации в процессе хранения в рамках срока годности.

Регламентированные к использованию ISO и рекомендуемые руководства по анализу эфирных масел методы газовой хроматографии и газовой хроматографии-масс-спектрометрии остаются наиболее применимым и при изучении стабильности эфирных масел, позволяя однозначно определять вариации в компонентном составе [49, 50, 134].

Определение гидропероксидов, образующихся в процессе хранения, также возможно с помощью газохроматографического анализа [134-140]. Тем не менее, гидропероксиды нестабильны и склонны к деградации при высоких температурах в узле ввода пробы и даже в случае ввода образца напрямую в колонку (on-column injection) [137, 138]. Процедура дериватизации с получением ТМС-производных позволяет устранить деградацию аналитов в процессе ввода пробы, однако, характеризуется неоднозначной стехиометрией реакции, которая не поддается контролю и валидации [137, 138].

Сообщается о применении метода ВЭЖХ для контроля содержания гидропероксидов и мониторинга изменений в компонентном составе эфирного масла [137, 138]. Метод позволяет нивелировать деградацию анализируемых соединений, однако, характеризуется низкой чувствительностью в сравнении с методом ГХ [138].

Использование tandemного масс-спектрометрического детектирования способно увеличить чувствительность определения гидропероксидов [139, 140]. Однако, описанные подходы достаточно сложны в реализации и интерпретации данных.

Подходы, основанные на суммарном определении содержания гидропероксидов, несмотря на значительно меньшую специфичность при сравнении с хроматографическими методами, остаются наиболее применимыми.

Для большого числа эфирных масел имеются данные с регламентированным значениям пероксидного числа, определяемого путем окислительно-восстановительного титрования. Это является значительным аргументом к использованию метода анализа для целей контроля качества в соответствии с фармакопейными требованиями или стандартами ISO [141].

В качестве альтернативы определения пероксидного числа могут быть рассмотрены методики, основанные на определении pH и электропроводности [137]. Описанные методики являются наиболее простыми в реализации, а результаты полученные таким путем коррелируют с результатами хроматографического анализа и определения пероксидного числа.

1.4.3. Обзор существующих дизайнов эксперимента по изучению стабильности эфирных масел

Процесс исследования стабильности эфирных масел не является регламентированным, поэтому в литературе используются различные протоколы исследования.

Помимо обзора современных подходов к исследованию эфирных масел особый интерес представляют паттерны изменения концентраций наиболее распространенных и лабильных компонентов эфирных масел и условия хранения, в которых описанные изменения могут быть нивелированы. Сравнительная характеристика наиболее значимых исследований стабильности эфирных масел представлена в таблице 2.

При рассмотрении каждого исследования нами были определены основные компоненты эфирного масла, на основании изменения их концентрации была рассчитана степень изменения компонентного состава (DC), в %:

$$DC = \sum_{i=1}^n (dC_i * x_i),$$

где, dC_i – изменение концентрации i -ого компонента эфирного масла, %; x_i – начальная концентрация i -ого компонента в эфирном масле.

В исследованиях [142-157] прослеживается четкая закономерность, связанная с тем, что хранение эфирных масел при комнатной температуре в условиях доступа УФ-излучения достаточно сильно затрагивает их монотерпеновый состав. Одними из самых лабильных компонентов большинства изученных эфирных масел являются γ - и α -терпинен, которые при хранении зачастую ароматизируются до n -цимола. Несмотря на высокую лабильность γ -терпинена его ароматизация до n -цимола происходит менее активно при наличии в компонентном составе продуктов окисления n -цимола: карвакрола и тимола. Описанные процессы – окисление γ -терпинена до n -цимола и дальнейшее гидроксилирование – являются одним из основных путей биосинтеза тимола [158, 159].

Большая лабильность характерна и для других монотерпеновых соединений. Из состава эфирного масла мирта обыкновенного (*Myrtus communis* L.) при хранении в течение 3-х месяцев при температуре +25 °C лимонен и α -пинен практически исчезли (при изначальном их содержании более 30 %), содержание 1,8-цинеола уменьшилось с 22,3 % до

1,2 % со значительным увеличением доли α -терпинеола и геранил ацетата. При хранении в морозильной камере наоборот наблюдалось накопление лимонена при сопоставимом уменьшении содержания α -пинена и 1,8-цинеола. Подобный феномен можно объяснить возможными реакциями перегруппировки через α -терпинильный катион [160], таким образом, при пониженной температуре основным продуктом реакции является лимонен, а в случае повышенной температуры – α -терпинеол. Предполагаемая схема превращений представлена на рисунке 7.

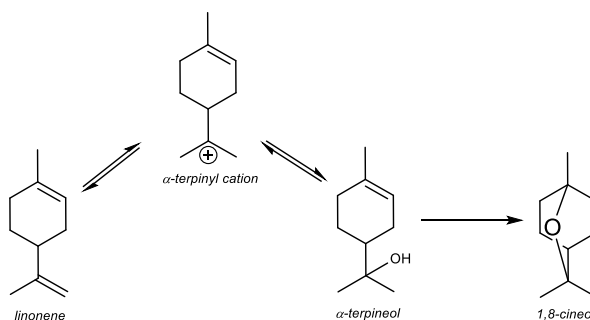


Рисунок 7 – Предполагаемая схема превращений лимонена, α -терпинеола и 1,8-цинеола.

Рисунок подготовлен автором

Результаты изучения стабильности эфирных масел кунцеи (*Kunzea ambigua* (Sm.) Druce) [150] и лавандина (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel) [151] имеют достаточно парадоксальный характер, поскольку по итогам исследования оба характеризуются достаточно высокой стабильностью компонентного состава. При этом по итогам исследований стабильности эфирных масел с близким компонентным составом сообщалось о значительно большей изменчивости в процессе хранения.

Другой примечательный результат – отсутствие различий в изменениях в компонентном составе при различных температурах хранения. О подобном феномене также сообщается по итогам исследования стабильности эфирных масел мяты колосистой (*Mentha spicata* L.) и мяты перечной (*Mentha x piperita* L.) [157].

Крайняя высокая лабильность компонентного состава отмечена для эфирных масел лавра благородного (*Laurus nobilis* L.) [144] и мелиссы (*Melissa officinalis* L.) [146]. При хранении на свету эфирного масла лавра благородного отмечается наличие большого количества неидентифицированных высококипящих соединений, тогда как, при хранении в темноте, характерно преимущественное накопление лишь четырех таких соединений. Подобная закономерность, позволяет предположить наличие двух параллельных путей деградации компонентов эфирного масла в зависимости от наличия УФ-излучения при хранении эфирного масла.

При детальном рассмотрении описанных исследований очевидна неоднозначность результатов – эфирные масла, обладающие схожим компонентным составом,

демонстрируют различный характер изменений при хранении в идентичных условиях. Подобный феномен хорошо прослеживается при сопоставлении трех эфирных масел цитрусовых растений – померанца, юдзу и хюганацу [147-149]. Эфирные масла померанца и юдзу характеризуются схожим характером изменений компонентного состава при различной степени изменений. В то время как для эфирного масла хюганацу при идентичных экспериментальных условиях отмеченные изменения компонентного состава не характерны.

Подобная вариабельность изменений компонентного состава не позволяет однозначно определить степень стабильности эфирного масла на основании его состава. Тем не менее, некоторые изменения являются типичными и характерными для эфирных масел в процессе хранения: например, ароматизация γ -терпинена до *l*-цимола или превращение лимонена в α -терпинеол и 1,8-цинеол. Ожидаемым является и наблюдаемая нестабильность альдегидов: нераль, гераниаль, цитронеллаль и куминовый альдегид. В случае альдегидов при этом нельзя однозначно определить ни путь окисления, ни продукты окисления, что объясняется их высокой реакционной способностью.

Одной из возможных причин изменений компонентного состава в нескольких исследованиях называется испарение компонентов [152, 154, 161]. Однако данный процесс при проведении экспериментов в закрытых сосудах маловероятен. Данная причина является действительной только при включении в экспериментальную программу образцов с экспозицией в открытых флаконах. Тем не менее, проведение таких экспериментов в рамках исследования стабильности является малоинформативным и приводит к логичным изменениям в компонентном составе – испарении низкокипящих компонентов.

Важным аспектом при изучении стабильности является постоянство состава в каждой из контрольных точек. При исследовании стабильности эфирного масла базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) по прошествии 12 месяцев отмечены незначительные вариации компонентного состава по сравнению с начальной точкой [156]. Однако при рассмотрении промежуточных точек очевидны вариации состава: например, уменьшение содержания гераниола в точке 4 месяца почти в два раза. Несмотря на то, что в конечной точке исследования отмечены лишь незначительные вариации состава, очевидно, что подобные изменения в промежуточных точках свидетельствуют о недостаточной стабильности эфирного масла. Наиболее распространенный подход при исследовании стабильности эфирных масел – проведение эксперимента в трех температурных зонах: при комнатной температуре $+(20...25)^\circ\text{C}$, при хранении в условиях холодильника $+(2...8)^\circ\text{C}$ и в условиях морозильной камеры $-(25...18)^\circ\text{C}$.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика наиболее значимых исследований стабильности эфирных масел

№	Эфирное масло	Срок хранения	Т хранения	Наиболее значимые изменения содержания компонентов	Степень изменения (DC), %	Источник
1	<i>Coriandrum Sativum</i> L.	12 месяцев	+25°C	γ-терпинен – 6,1 % - н.о.; п-цимол – (4,0 – 13,0) %; линалоол – (69,8 – 23,5) %; линалоол оксиды – (1,0 – 26,7) %	87,1	[142]
2	<i>Majorana hortensis</i> Moench	12 месяцев	+25°C	α-терпинен – 8,3 % - н.о.; цис-сабинен гидрат – 14,6 – сл.; п-цимол – (3,7 – 28) %	47,2	[143]
3	<i>Laurus nobilis</i> L.	4 месяца	+25°C	транс-анетол – (69,9 – 0,1) %; анисовый альдегид – (0,64 – 12,10)%; эвгенол – (0,34 – 15,40) %	96,3	[144]
			+25°C	транс-анетол – (69,9 – 32,3) %; анисовый альдегид – (0,64 – 4,43) %; эвгенол – (0,34 – 5,77) %	46,8	
4	<i>Thymus daenensis</i> Čelak.	3 месяца	+25°C	γ-терпинен – (10,1 – 4,7) %; п-цимол – (8,3 → 4,7) %; α-пинен – (4,3 – 0,5) %	12,8	[145]
			-20°C	γ-терпинен – (10,1 – 10,6) %; п-цимол – (8,3 → 8,6) %; α-пинен – (4,3 – 4,2) %	0,9	
5	<i>Melissa officinalis</i> L.	4 месяца	+25°C	сумма альдегидов – (71,7 – 21,2) %; карьофиллен – (6,6 → 1,6) %; карьофиллен оксид – (6,2 → 19,5) %	68,8	[146]
			-20°C	сумма альдегидов – (71,7 – 64,7) %; карьофиллен – (6,6 → 6,2) %; карьофиллен оксид – (1,6 → 1,9) %	7,7	
6	<i>Citrus junos</i> Siebold ex Yu.Tanaka	12 месяцев	+20°C	лимонен – (78,1 → 31,5) %; γ-терпинен – (9,3 → 1,5) %; спатуленол – (0 → 28,3) %; Сумма монотерпенов – (93,3 → 37,7) %	84,0	[147]
			-21°C	лимонен – (78,1 → 76,7) %; γ-терпинен – (9,3 → 9,6) %; спатуленол – 0 % → сл; Сумма монотерпенов – (93,3 → 92,0) %	1,1	
7	<i>Citrus aurantium</i> var. daidai Makino	12 месяцев	+20°C	лимонен – (94,7 – 65,1) %; цис-карвеол – не обнаружен	5,4	[148]
			-21°C	лимонен – (94,7 – 94,9) %; цис-карвеол – (0 → 5,2) %	29,6	
8	<i>Citrus tamurana</i> hort. ex Tanaka	9 месяцев	+30°C	лимонен – (84,8 – 84,9) %; п-цимол – (0,03 – 5,9); γ-терпинен – (6,5 – сл.) %	12,5	[149]
			-21 °C	лимонен – (84,8 – 84,9) %; п-цимол – (0,03 – 0,09) %; γ-терпинен – (6,5 – 6,3) %	0,4	
9	<i>Kunzea ambigua</i> (Sm.) Druce	8 месяцев	+20°C	α-пинен – (24,5 – 24,3) %; 1,8 – цинеол – (8,4 – 8,1) %	0,5	[150]
			-20 °C	α-пинен – (24,5 – 25,4) %; 1,8 – цинеол – (8,4 – 8,1) %	1,2	
10	<i>Lavandula x intermedia</i> Emeric ex Loisel	200 дней	+24°C	линалоол – (45,8 – 41,0) %; 4-терпинеол – (9,51 – 6,9) %; борнеол – (8,8 – 10,1) %	8,7	[151]
			-18 °C	линалоол – (45,8 – 40,6) %; 4-терпинеол – (9,51 – 6,8) %; борнеол – (8,8 – 9,8) %	9,03	
11	<i>Lavandula angustifolia</i> subsp. <i>angustifolia</i>	4 месяца	+25°C	1,8-цинеол – (24,7 – 16,2) %; камфора – (15,7 → 18,7) %; борнеол – (20,2 – 27,2) %	18,5	[152]
			-20 °C	1,8-цинеол – (24,7 – 30,5) %; камфора – (15,7 – 15,4) %; борнеол – (20,2 – 20,7) %	6,6	
12	<i>Cuminum cyminum</i> L.	6 месяцев	+25°C	куминовый альдегид – (46,1 – 63,3) %; п-цимол – (26,3 – 14,9) %; β-пинен – (10,9 – 1,6) %	37,9	[153]
			-20 °C	куминовый альдегид – (46,1 – 51,2) %; п-цимол – (26,3 – 21,3) %; β-пинен – (10,9 – 7,6) %	13,4	
13	<i>Salvia majdae</i> (Rech.f. & Wendelbo) Sytsma	9 месяцев	+20°C	линалоол – (39,4 – 34,9) %; камфора – (30,9 – 27,1) %	8,3	[154]
			-20°C	линалоол – (39,4 – 48,2) %; камфора – (30,9 → 36,0) %	13,9	
14	<i>Myrtus communis</i> L.	3 месяца	+25°C	лимонен – (31,4 – 0,1) %; α-пинен – (30,8 – н.д.) %; 1,8 – цинеол – (22,3 – 1,2) %	83,2	[155]
			-20°C	лимонен – (31,4 – 46,9) %; α-пинен – (30,8 – 25,8) %; 1,8 – цинеол – (22,3 – 10,0) %	32,8	
15	<i>Ocimum basilicum</i> L.	12 месяцев	+25°C	линалоол – (75,0 – 76,8) %; гераниол – (16,8 – 16,6) %	2,0	[156]
			-20°C	линалоол – (75,0 – 77,5) %; гераниол – (16,8 – 16,1) %	3,2	
16	<i>Thymus vulgaris</i> L.	6 месяцев	+23°C	тимол – (55,8→68,03) %, п-цимол – (16,8→18,9) %, γ-терпинен (6,3→3,6) %	17,0	[157]
			-20°C	тимол – (55,8→59,80) %, п-цимол – (16,8→23,0) %, γ-терпинен (6,3→5,1) %	11,4	
17	<i>Origanum vulgare</i> L.	6 месяцев	+23°C	карвакрол - (68,0→79,0) %, п-цимол – (12,3→12,3) %, γ-терпинен (4,0→2,1) %	12,9	
			-20°C	карвакрол - (68,0→79,4) %, п-цимол – (12,3→12,0) %, γ-терпинен (4,0→2,2) %	13,5	
18	<i>Mentha spicata</i> L.	6 месяцев	+23°C	карвон - (73,7→88,9) %, лимонен – (10,1→7,1) %, ментол (н.о.→1,0) %	19,2	
			-20°C	карвон - (73,7→88,4) %, лимонен – (10,1→7,4) %, ментол (н.о.→1,0) %	18,4	
19	<i>Mentha × piperita</i> L.	6 месяцев	+23°C	изоментол - (36,6→52,3) %, ментон – (21,7→22,7) %, ментол (10,2→8,8) %	18,1	
			-20°C	изоментол - (36,6→49,0) %, ментон – (21,7→23,1) %, ментол (10,2→8,7) %	15,3	

Наличие трех температурных зон является в достаточной степени обоснованным, поскольку соответствует возможным сценариям хранения эфирного масла.

В тоже время очевидно, что отсутствует общий экспериментальный протокол исследования стабильности эфирных масел, что заметно при сравнении сроков исследований и числа контролируемых параметров. Основными недостатками актуальных исследовательских протоколов являются недостаточная продолжительность исследований (менее 12 месяцев), ограниченное варьирование факторов воздействия (преимущественно только температуры) и, как следствие, отсутствие комплексной оценки синергетического эффекта внешних факторов.

1.5. Эфирные масла растений объектов исследования

1.5.1. Эфирное масло шалфея мускатного

1.5.1.1. Характеристика шалфея мускатного

Шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) является однолетней или двулетней травянистой культурой семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [162, 163]. Карта мирового распределения шалфея мускатного представлена на рисунке 8. В таблице 3 представлено описание ареалов обитания шалфея мускатного.

Таблица 3 – Описание ареалов обитания шалфея мускатного

Тип ареала	Регион
Естественный	<i>Северная Африка:</i> Алжир, Марокко, Тунис. <i>Западная Азия:</i> Россия (Кавказ), страны Закавказья. <i>Центральная Азия:</i> Казахстан, Киргизстан, Таджикистан, Узбекистан. <i>Западная Азия:</i> Афганистан, Кипр, Иран, Турция. <i>Восточная Европа:</i> Россия (Республика Крым), Украина. <i>Юго-восточная Европа:</i> Албания, Болгария, Греция, Италия, Турция <i>Юго-западная Европа:</i> Корсика, Франция, Португалия, Сардиния, Испания
Интродуцированный	<i>Южная Африка:</i> ЮАР <i>Северная Америка:</i> Восточные, северо-восточные, юго-восточные, юго-западные штаты

Естественным ареалом обитания Шалфея мускатного является значительная часть Евразии и Северная Африка, на территории же Северной Америки растение является интродуцированным. На территории Российской Федерации основными сырьевыми базами являются регионы Республики Крым и Северного Кавказа [162, 163].

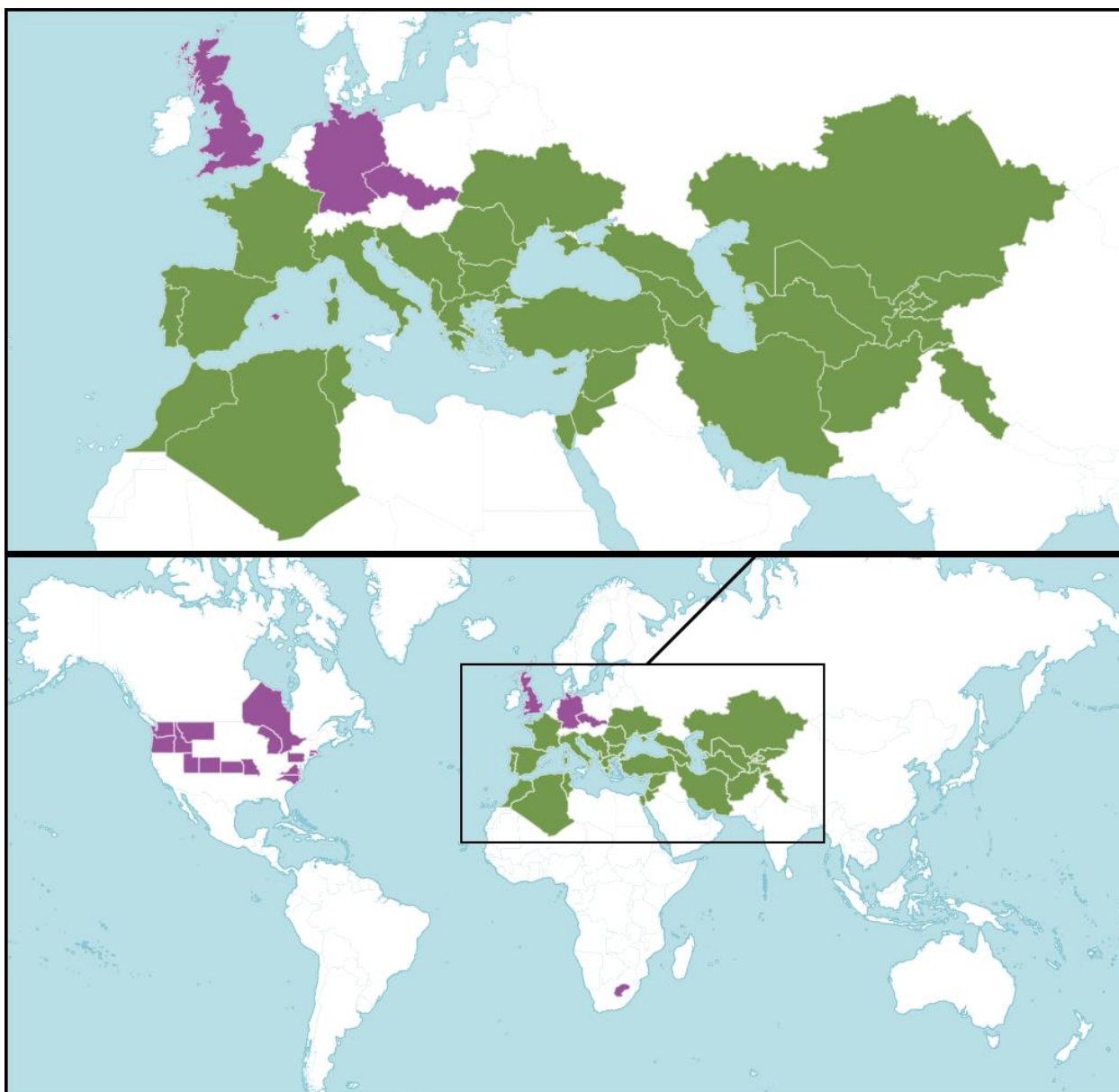


Рисунок 8 – Карта мирового распределения шалфея мускатного. Зеленым отмечены регионы естественного ареала, фиолетовым – регионы интродуцированного ареала.

Рисунок подготовлен автором на основании карты KEW [163]

1.5.1.2. Характеристика эфирного масла шалфея мускатного

Эфирное масло шалфея мускатного представляет собой прозрачную маслянистую жидкость от бесцветного до коричневатого-желтого цвета [163]. Сообщается о наличии у эфирного масла шалфея мускатного выраженных антимикробных [164, 165], антиоксидантных [166, 167] и противовоспалительных [168] свойств. Эфирное масло шалфея мускатного локализовано, преимущественно, в железках надземных органов, главным образом соцветий, поэтому источником для получения эфирного масла шалфея мускатного служат надземные части растения [169, 170].

Хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного закреплен в Европейской Фармакопее. В 2025 году был опубликован стандарт ISO 24255:2025 [171], определяющий нормы к качеству эфирного масла шалфея мускатного французского типа. Иных действующих стандартов, посвященных качеству эфирного масла шалфея мускатного, нет. Регламентированные хроматографические профили эфирного масла шалфея мускатного в сравнительном аспекте различных регуляторных документов, приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Регламентированные хроматографические профили эфирного масла шалфея мускатного

Компонент	Содержание, %		
	Нормативный документ		
	Ph. Eur	ISO 24255:2025, Тип 1	ISO 24255:2025, Тип 2
Линалил ацетат	(56,0...78,0)	(62,0...78,0)	(54,0...71,0)
Линалоол	(6,5...24,0)	(6,5...15,0)	(13,0...24,0)
Гермакрен Д	(1,0...12,0)	(1,5...12,0)	(1,2...8,0)
Склареол	(0,4...2,6)	(0,3...2,5)	(0,3...2,5)
α -Терпинеол	Не нормируется	(0,1...1,2)	(1,0...5,0)
α - и β -туйон	Не более 0,2 %	Не нормируется	Не нормируется

Хроматографический профиль, закрепленный в Европейской фармакопее географически не дифференцирован, тогда как в стандарте ISO 24255:2025 однозначно определяется, что стандарт устанавливает требования к качеству эфирного масла французского типа. Разделение на два разных типа в стандарте ISO объясняется различным типом сырья: тип 1 – эфирное масло, полученное из сухого сырья; тип 2 – из свежего.

Для определения границ вариабельности компонентного состава (в особенности географической) необходим анализ актуальных исследований. В таблице 5 представлена сравнительная характеристика актуальных научных исследований компонентного состава эфирного масла шалфея мускатного.

Согласно, данным исследований, представленным в таблице 5, для эфирного масла шалфея мускатного характерен достаточно небольшой относительный выход, находящийся в среднем в пределах от 0,2 до 0,5 %.

Для эфирного масла наблюдается достаточно высокая вариабельность содержания двух основных компонентов профиля: линалилацетата и линалоола. Его содержание в большинстве рассматриваемых исследований не соответствует установленным нормам (таблица 4). Примечательно, что в подавляющем количестве исследований не был обнаружен склареол – высококипящий дитерпеновый спирт, что, однако, может быть вызвано и особенностями как самого эфирного масла, так и пробоподготовки.

Таблица 5 – Сравнительная характеристика актуальных научных исследований компонентного состава эфирного масла шалфея мускатного

Регион происхождения	Содержание основных компонентов эфирных масел, %	Выход, %	Источник
Россия	Линалилацетат (54,9-71,0), линалоол (7,8-28,8)	0,39-0,44	[172]
Беларусь	Линалилацетат (32), линалоол (25), геранилацетат (5), α -терпинеол (3,5)	0,3-0,6	[173]
Азербайджан	Линалилацетат (41,2), линалоол (18,9), гермакрен-д (9,4), α -терпинеол (7,3), геранилацетат (5,3)	0,6	[174]
Словакия	Линалоол (18,9), линалил ацетат (13,7), склареол (15,7), гермакрен Д (5,0), α -терпинеол (6,5)	0,11-0,27	[175]
Южный Узбекистан	Линалил ацетат (32-44), линалол (17-30), α -терпинеол (11-15), геранилацетат (4,7-6,7)	0,4-0,7	[176]
Индия	Линалил ацетат (43), линалоол (27,1), β -мирцен (7,3), (<i>E</i>)- β -оцимен (4,8)	0,3	[177]
Австрия	Линалил ацетат (45,5), линалоол (39,0), α -терпинеол (5,9), геранилацетат (3,1)	-	[178]
Украина	Линалил ацетат (63,3), линалоол (17,9), склареол (5,9)	-	[179]
Италия	Линалил ацетат (62,6), линалоол (11,1), β -пинен (3,1), β -копаен (6,7), β -кариофиллен (3,4)	-	[180]
Италия	Метил хавикол (49,02), линалоол (19,20), Линалоол (9,93), α -терпинеол (7,51), α -терпенил ацетат (4,30), 1,8-цинеол (3,23)	0,15	[181]
Германия	Склареол (33,9), линалил ацетат (10,6), манол оксид (9,6), линалоол (6,5)	0,1-0,2	[182]
Италия	Линалил ацетат (55,72), линалоол (10,06), гермакрен Д (7,58), мирцен (3,29), цис-оцимен (1,71), транс-оцимен (2,96), α -терпинеол (1,64)	-	[183]
Россия	Линалил ацетат (42,75), линалоол (11,97), гермакрен Д (4,35), мирцен (0,68), цис-оцимен (0,37), транс-оцимен (0,78), α -терпинеол (3,5)	-	
Сицилия	Линалилацетат (52,7), линалоол (25,65), гермакрен-Д (3,92), α -терпинеол (3,49)	0,19-0,52	[184]
Центральная Греция	Линалилацетат (19,75), линалоол (30,43), гермакрен Д (2,57), геранил ацетат (12,1), нерил ацетат (7,78), склареол (3,53)	0,68	[185]
Северо-восточная Греция	Линалилацетат (31,05), линалоол (18,46), гермакрен-д (-), геранил ацетат (4,45), нерил ацетат (2,01), склареол (5,55)	0,42	
Израиль	Линалилацетат (0,3), линалоол (1,7), гермакрен-д (0,8), α -терпинеол (0,3), гераниль (10,9), геранил ацетат (38,3), нерол (9,4), гераниол (24,3)	0,04-0,06	[186]
Россия	Линалилацетат (35,0), линалоол (31,0), гермакрен-д (2,7), α -терпинеол (10,3), гераниль (0,2), геранил ацетат (5,4), нерол (1,9), гераниол (5,7)	0,22-0,33	
Словакия	Линалилацетат (49,1), линалоол (20,6), α -терпинеол (4,9), геранил ацетат (4,4), нерол (1,1), нерил ацетат (1,7), (<i>E</i>)-кариофиллен (5,1)	н/п	[166]

Для эфирных масел российского происхождения справедливыми являются все озвученные феномены: большая вариабельность содержания линалилацетата и линалоола, отсутствие склареола, а также достаточно высокое относительное содержание α -терпинеола.

1.5.2. Эфирное масло розмарина лекарственного

1.5.2.1. Характеристика розмарина лекарственного

Розмарин лекарственный (*Salvia rosmarinus* Spenn., (= *Rosmarinus officinalis* L.) является многолетним кустарником семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [187, 188]. Карта мирового распределения розмарина лекарственного представлена на рисунке 9. В таблице 6 представлено описание ареалов обитания розмарина лекарственного.

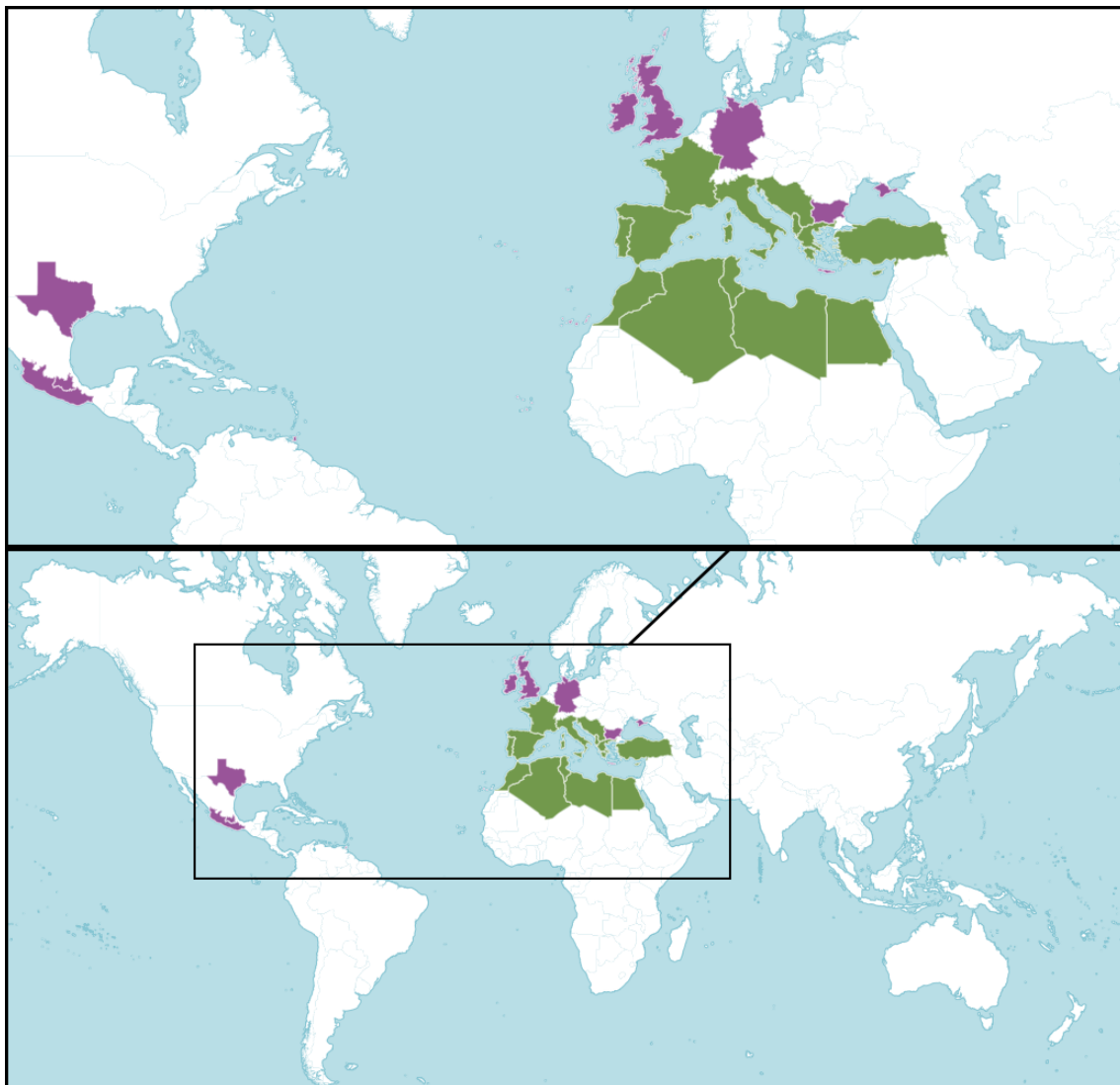


Рисунок 9 – Карта мирового распределения розмарина лекарственного. Зеленым отмечены регионы естественного ареала, фиолетовым – регионы интродуцированного ареала.

Рисунок подготовлен автором на основании карты KEW [188]

Данные ботанического распределения розмарина лекарственного (рисунок 9, таблица 6) свидетельствуют, что его естественным ареалом обитания являются страны Средиземноморья, Южной Европы и Северной Африки. Примечательно, что районы интродукции розмарина расположен в различных географических и климатических зонах.

В Российской Федерации розмарин лекарственный считается интродуцированным на территории Республики Крым видом. Произрастание розмарина лекарственного на

территории других регионов не упоминается, несмотря на наличие сообщений о его произрастании на территориях Северного Кавказа [189].

Таблица 6 – Описание ареалов обитания розмарина лекарственного

Тип ареала	Регион
Естественный	<i>Северная Африка:</i> Алжир, Марокко, Тунис, Египт. <i>Западная Азия:</i> острова Эгейского моря, Кипр, Турция. <i>Юго-восточная Европа:</i> Албания, Греция, Италия. <i>Юго-западная Европа:</i> Франция, Португалия, Сардиния, Испания.
Интродуцированный	<i>Макаронезия:</i> Азорские и Канарские острова, Кабо-Верде. <i>Восточная Европа:</i> Россия (Республика Крым), Украина. <i>Центральная Европа:</i> Германия. <i>Северная Европа:</i> Великобритания. <i>Юго-восточная Европа:</i> Болгария, остров Крит. <i>Северная Америка:</i> Мексика, Южные штаты США. <i>Южная Америка:</i> Карибы, Тринидад и Тобаго.

1.5.2.2. Характеристика эфирного масла розмарина лекарственного

Эфирное масло розмарина лекарственного представляет собой прозрачную маслянистую жидкость от бесцветного до бледно-желтого или зелёно-желтого цвета [190]. Сообщается о наличии у эфирного масла выраженных антиоксидантных [191-193], противовоспалительных [192, 194], антимикробных [195], противогрибковых [195] и радиопротекторных [193] свойств.

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного закреплён в Европейской Фармакопее и стандарте ISO 1342:2012 [190]. Регламентированные хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Регламентированные хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного

Компонент	Нормированное содержание, %			
	Розмарин лекарственный (Тунисский или марокканский вид)		Розмарин лекарственный (Испанский вид)	
	ISO 1342:2012	Ph.Eur 11	ISO 1342:2012	Ph.Eur 11
α -пинен	(9,0...14,0) %	(9,0...14,0) %	(18,0...26,0) %	(18,0...26,0) %
цинеол	(38,0...55,0) %	(38,0...55,0) %	(16,0...23,0) %	(16,0...25,0) %
камфора	(5,0...15,0) %	(5,0...15,0) %	(12,5...22,0) %	(13,0...21,0) %
линалоол	(0,3...2,0) %	-	(0,5...2,5) %	-
лимонен	(1,5...4,0) %	(1,5...4,0) %	(2,5...5,5) %	(2,5...5,0) %
β -пинен	(4,0...9,0) %	(4,0...9,0) %	(2,0...5,0) %	(2,0...6,0) %
камфен	(2,5...6,0) %	(2,5...6,0) %	(7,0...13,0) %	(8,0...12,0) %
<i>n</i> -цимол	(0,5...2,5) %	(0,8...2,5) %	(1,0...2,0) %	(1,0...2,2) %
борнеол	(1,0...5,0) %	(1,5...5,0) %	(1,0...4,5) %	(2,0...4,5) %
β -мирцен	(1,0...2,0) %	(1,0...2,0) %	(2,5...4,5) %	(1,5...5,0) %
α -терпинеол	(1,0...2,5) %	(1,0...2,6) %	(1,0...4,0) %	(1,0...3,5) %
борнил ацетат	(0,1...1,6) %	(0,1...1,5) %	(0,5...2,5) %	(0,5...2,5) %
вербенон	не более 0,4 %	не более 0,4 %	(0,7...2,5) %	(0,7...2,5) %

Примечательно выделение в ISO 1342:2012 и Ph.Eur 11 двух хроматографических профилей розмарина лекарственного: тунисского/марокканского (преобладание цинеола) и испанского вида (преобладание α -пинена, цинеола и камфоры). Современные исследования выделяют три основных хемотипа эфирного масла розмарина [108, 196]:

1. Цинеольный (*cineoliferum*, преобладание цинеола).
2. Камфорный (*camphoriferum*, преобладание α -пинена, цинеола и камфоры).
3. Вербеноновый (*verbenoniferum*, повышенное содержание вербенона, преобладание цинеола, камфоры и α -пинена).

Таким образом, дифференциация хроматографических профилей эфирного масла розмарина лекарственного обусловлена наличием естественной генетической вариабельности компонентного состава. Закрепленные хроматографические профили характеризуют два хемотипа эфирного масла розмарина лекарственного: цинеоловый и камфорный. Тогда как суммарное количество устоявшихся хемотипов эфирного масла розмарина составляет три [108, 196]. Помимо них встречаются и менее распространенные хемотипы, например, мирценовый [108, 197], α -, β -пинен/камфеновый [196], α -пинен/цинеольный [108, 197, 198], α -пинен/камфора/цинеольный (*cineoliferum* type VIA) [108] и *n*-цимоловый [199].

С учетом высокого хемотипического разнообразия необходимо понимать степень вариации содержания ключевых компонентов в эфирных маслах различных хемотипов. Сводная характеристика вариабельности компонентного состава эфирного масла трех основных хемотипов розмарина лекарственного представлена в таблице 8.

Вариации содержания каждого из характерных компонентов внутри определенного хемотипа представляют умеренный характер, позволяющий произвести идентификацию эфирного масла (таблица 8). Внутри каждого из хемотипов наблюдается близость компонентных составов эфирных масел вне зависимости от региона происхождения. Эта закономерность может свидетельствовать о незначительном влиянии географического фактора на вариабельность компонентного состава.

Подобные результаты были получены в результате анализа эфирного масла розмарина лекарственного 18 популяций, произрастающих на побережье Средиземного моря [197]. Авторами отмечается существенное влияние генетического фактора на вариабельность компонентного состава, в то время как степень влияния географического фактора отмечена как незначительная.

Таблица 8 – Сводная характеристика вариабельности компонентного состава эфирного масла трех основных хемотипов розмарина лекарственного

Хемотип	Регион	Содержание основных компонентов, %	И.
Вербеноновый <i>verbenoniferum</i>	Сицилия, Италия	α -пинен – (12...46), 1,8-цинеол – (6...16), камфора – (4...15), вербенон – (12...23), борнил ацетат – (сл...8)	200
	Алжир	камфора – (17,1...23,2), 1,8-цинеол – (9,7...14,7), α -пинен – (8,9...13,6), вербенон – (7,6...11,1), борнил ацетат – (0,5...1,3)	201
	Сербия	камфора – (23,3...28,1), 1,8-цинеол – (12,7...18,0), α -пинен – (10...13,5), камфен – (5,1...7,4), вербенон – (5,1...7,4), борнил ацетат – (0,2...4,9)	202
	Турция	1,8-цинеол – (12,1...34,3), α -пинен – (6,7...14,2), камфора – (10,2...14,1), вербенон – (4,4...12,2), камфен – (1,6...3,4), борнил ацетат – (0,2...2,3)	203
	Бразилия	камфора – 24,68, 1,8-цинеол – 22,68, α -пинен – 8,8, камфен – 5,95, вербенон – 4,50, борнил ацетат – 0,25	204
Цинеольный <i>cineoliferum</i>	Сицилия, Италия	1,8-цинеол – (34,0...67,0), α -пинен – (10,0...23,0), камфора – (сл...27,0), борнил ацетат – (сл...6,0), вербенон – (сл...)	200
	Алжир	1,8-цинеол – (42,4...53,1), α -пинен – (6,0...14,5), камфора – (2,6...15,6), борнил ацетат – (0,3...2,3), вербенон – н.о.	201
	Марокко	1,8-цинеол – (41,9...49,7), камфора – (11,9...15,2), α -пинен – (4,0...7,8), камфен – (3,3...7,1), борнил ацетат – (0,3...1,9), вербенон – н.о.,	205
	Турция	1,8-цинеол – (50,7...61,4), α -пинен – (7,8...10,2), камфора – (5,8...12,6), камфен – (2,9...4,2), борнил ацетат – (0,2...4,2), вербенон – (0...сл.)	203
	Марокко	α -пинен – (9,56...12,72), камфен – (3,21...3,98), 1,8-цинеол – (43,53...57,74), камфора – (7,42...10,80), вербенон – (0...0,46), борнил ацетат – (0,12...0,86)	206
	Греция	1,8-цинеол – 40,10, α -пинен – 12,94, камфора – 12,40, камфен – 6,38, вербенон – н.о., борнил ацетат – н.о.	207
Камфорный <i>camphoriferum</i>	Испания	камфора – (24,3...34,3) %, α -пинен – (11,8...19,8) %, 1,8-цинеол – (12,1...13,6) %, борнеол – (3,3...5,0) %, вербенон – н.о.	208
	Китай	1,8-цинеол – 26,54, α -пинен – 20,14, камфора – 12,88, камфен – 11,38, вербенон – 1,36, борнил ацетат – 0,92	209
	Испания	α -пинен – (19,0...24,0), 1,8-цинеол – (19,0...22,0), камфора – (10,0...19,0), камфен – (8,9...11,5), борнил ацетат – (0,9...1,5), вербенон н.о.,	206
	Россия	1,8-цинеол – 23,40, α -пинен – 17,76, камфора – 17,17, камфен – 8,36, борнил ацетат – 3,31, вербенон – 0,30,	210
	Россия	камфора – (22,2...24,3), 1,8-цинеол – (16,4...22,4), α -пинен – (9,6...11,9), камфен – (4,4...7,5), вербенон – н.о, борнил ацетат – н.о	211
	Россия	камфора – 25,8, 1,8-цинеол – 18,9, α -пинен – 11,9, камфен – 10,1, борнил ацетат – 2,2, вербенон – сл.,	

На текущий момент эфирное масло розмарина лекарственного российского происхождения мало изучено, несмотря на его активное культивирование в Республике Крым и регионах Северного Кавказа [212]. Анализ эфирного масла розмарина лекарственного, выращенного в Никитском ботаническом саду, позволяет охарактеризовать его хемотип как камфорный. Однако, следует учитывать, что публикация посвящена анализу определенного сорта - «Горизонт», таким образом, сделать вывод о преобладании камфорного хемотипа эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения на основании литературных данных невозможно [188].

1.5.3. Эфирное масло чабера горного

1.5.3.1. Характеристика чабера горного

Чабер горный (*Satureja montana* L.) является многолетним полукустарником семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [213]. Карта мирового распределения чабера горного представлена на рисунке 10 [213]. В таблице 9 представлено описание ареалов обитания чабера горного.

Данные мирового распределения чабера горного (рисунок 10, таблица 9) свидетельствуют, что естественным ареалом его обитания являются Европейские страны. Территория Российской Федерации не выделена в отдельный регион произрастания из-за относительно небольшой площади культивирования, однако факт произрастания на территории Республики Крым и других территории Южного Федерального округа, а также на территории Северного Кавказа официально признается.

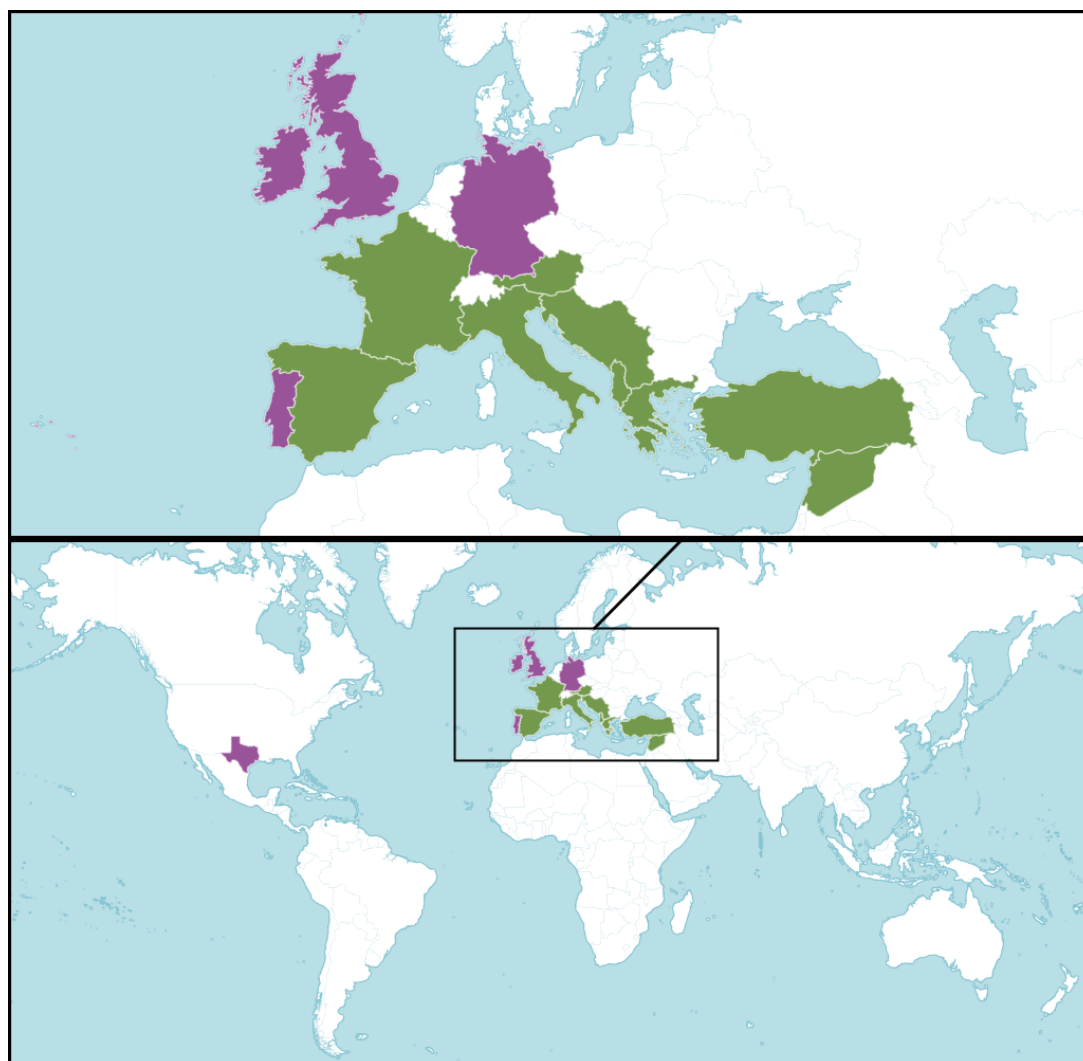


Рисунок 10 – Карта мирового распределения чабера горного. Зеленым отмечены регионы естественного ареала, фиолетовым – регионы интродуцированного ареала. Рисунок подготовлен автором на основании карты KEW [213]

Таблица 9 – Описание ареалов обитания чабера горного

Тип ареала	Регион
Естественный	<i>Западная Азия:</i> Сирия, Турция. <i>Центральная Европа:</i> Австрия. <i>Юго-восточная Европа:</i> Албания, Греция, Италия. <i>Юго-западная Европа:</i> Франция, Испания.
Интродуцированный	<i>Макаронезия:</i> Азорские острова. <i>Юго-западная Европа:</i> Португалия. <i>Северная Америка:</i> Южные штаты США.

1.5.3.2. Характеристика эфирного масла чабера горного

Эфирное масло чабера горного представляет собой прозрачную маслянистую жидкость от бесцветного до жёлто-оранжевого или зелёно-желтого цвета [214, 215]. Фармакологические исследования свидетельствуют о наличии у эфирного масла чабера горного выраженных антимикробных [216-218], антиоксидантных [217, 218] и противовоспалительных свойствах [219, 220].

Для эфирного масла чабера горного отсутствуют изданные стандарты, что означает отсутствие закрепленных показателей качества и их норм, а также отсутствие регламентированного хроматографического профиля. Отсутствие стандарта качества свидетельствует о невозможности проведения контроля качества и однозначной идентификации эфирного масла. Таким образом, сведения о компонентном составе эфирного масла чабера горного возможно получить только на основании анализа литературных данных. Сравнительная характеристика (по литературным данным) компонентного состава эфирного масла чабера горного представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Сравнительная характеристика компонентного состава эфирного масла чабера горного (по литературным данным)

№	Содержание мажоритарного компонента, %	Содержание других компонентов профиля, %	Содержание эфирного масла, %	Регион происхождения	Источник
1	Карвакрол – (59,9–67,7)	γ -терпинен – (1,56–5,03); n -цимол – (8,71–19,06); тимол – (0,32–0,26); β -кариофиллен – (0,50–0,66)	(0,35–0,70)	Россия	[221]
2	Карвакрол – 52,06	γ -терпинен – 9,78; n -цимол – 17,05; тимол – 0,21; β -кариофиллен – 1,06	0,40	Россия	
3	Карвакрол – 53,4	γ -терпинен – 13,5; n -цимол – 13,0; тимол – 0,89; β -кариофиллен – 2,23	1,56	Франция	[222]
4	Тимол – 45,2	Карвакрол – 5,3; γ -терпинен – 5,9; n -цимол – 6,4; β -кариофиллен – 2,3	1,40	Хорватия	[223]
5	Карвакрол – 63,4	Тимол – 19,4; γ -терпинен – следовые количества; n -цимол – не обнаружен; β -кариофиллен – 0,1	0,97	Хорватия	[224]
6	Карвакрол – 44,5	Тимол – 3,5; γ -терпинен – 8,7; n -цимол – 16,9; β -кариофиллен – 1,5	0,58	Хорватия	[218]
7	Карвакрол – 58,32	Тимол – 4,80; γ -терпинен – 9,24; n -цимол – 18,27; β -кариофиллен – 0,58	(0,39–0,54)	Испания	[225]

Данные, представленные в таблице 10, позволяют сделать заключение о выраженной вариабельности компонентного состава эфирного масла чабера горного, как в части качественного и количественного содержания мажоритарного компонента, так и в соотношении других компонентов профиля. Так, можно говорить о присутствии двух хемотипов чабера горного – карвакрольного [218, 221, 222, 224, 225] и тимольного [223], которые имеют выраженную географическую приуроченность. При этом большая часть образцов (в т.ч. и российской локации) относится к карвакрольному типу. Кроме того, данные таблицы 10 показывают значительную вариабельность состава масла в части соотношения основных составляющих профиля (при его компонентой стабильности), что не позволяет установить универсальные требования к составу эфирного масла чабера горного. Наиболее примечательны исследования состава эфирного масла чабера горного, полученного из растений, произрастающих в пределах одного региона Далмация в Хорватии [218, 223-225]. Согласно этим данным, наблюдается значительная вариабельность компонентного состава даже в пределах достаточно небольшого географического региона.

Большая вариабельность как по выходу, так и по компонентному составу отмечена также в исследовании эфирного масла чабера горного, полученного из растений, культивируемых на 6 различных плантациях в пределах Албании [226]. Отмечено, что содержание эфирного масла варьируется в диапазоне от 0,22 до 1,61%, а компонентный состав для 4 из 6 исследуемых образцов имел схожие черты, но различия в составе также представляются значительными для унификации.

Помимо наиболее распространенных хемотипов выделяют также и другие. При исследовании состава эфирных масел, произведенных из растений, произрастающих в Северной Македонии, Боснии и Герцеговине, было отмечено наличие еще 5 хемотипов: *n*-цимольный, *транс*-сабинен гидратный, линалоольный, борнеольный и *n*-цименольный [227]. На основании большого исследования состава эфирных масел, полученных из 14 популяций растений, произрастающих на территории 5 стран Балканского полуострова (Сербия, Словения, Хорватия, Босния и Герцеговина, Северная Македония), было сделано заключение о присущей высокой меж- и внутривидовой изменчивости компонентного состава [228]. В рамках исследования выделено 5 хемотипов: карвакрольный, тимольный, два различных *n*-цимольных и два нефенольных, основу которых составляют *цис*-сабинен гидрат и линалоол. При этом отмечается прослеживаемая географическая детерминированность приуроченности определенного хемотипа: фенольные хемотипы растений произрастают ближе к прибрежной части, а нефенольные – к континентальной.

Таким образом, можно судить о свойственной для эфирного масла чабера горного выраженной географической вариабельности, а также о наличии большого хемотипического разнообразия. На текущий момент, вопрос о границах вариабельности компонентного состава эфирного масла чабера горного остается дискуссионным. Определение границ вариабельности, а также учет факторов вариабельности, являются важными процессами при разработке хроматографического профиля, в отсутствие которого контроль качества эфирного масла попросту невозможен.

Одним из требований ISO к разрабатываемому хроматографическому профилю эфирного масла является возможность различия масел близкородственных растений. Таким образом, при составлении хроматографического профиля определенного эфирного масла необходимо оценивать особенности компонентного состава представителей одного рода.

Выделяют около 6 близкородственных растений чаберу горному. Большая часть из них являются эндемиками и малораспространенными растениями, поэтому сравнительная оценка компонентного состава для определения характерных компонентов эфирного масла чабера горного для них не требуется. Особый интерес среди видов эндемиков представляет вид чабер крымский (*Satureja taurica* Velen.), долгое время считавшийся подвидом чабера горного [229-231]. Растение является эндемиком Республики Крым, однако, эфирное масло данного растения является неизученным.

Наиболее распространенным близкородственным растением чабера горного является чабер садовый (*Satureja hortensis* L.) [232]. Сравнительная характеристика (по литературным данным) компонентного состава эфирного масла чабера садового представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнительная характеристика компонентного состава эфирного масла чабера садового

№	Содержание мажоритарного компонента, %	Содержание других компонентов профиля, %	Регион происхождения	Источник
1	Тимол – 28,2	Карвакрол – 11,0; γ -терпинен – 16,0; n -цимол – 19,6; β -кариофиллен – н.о.	Иран	[233]
2	Карвакрол – (41,1...50,5)	γ -терпинен – (32,7...38,7); n -цимол – (3,4...5,0); тимол – н.о.; β -кариофиллен – н.о.	Турция	[234]
3	Карвакрол – 50,69	γ -терпинен – 35,40; n -цимол – (2,53); тимол – н.о.; β -кариофиллен – н.о.	Иран	[235]
4	Карвакрол – (53,2...48,7)	γ -терпинен – (32,7...36,8); n -цимол – (3,2...3,4); тимол – н.о.; β -кариофиллен – 0,4.	Сербия	[236]
5	Карвакрол – 66,08	γ -терпинен – 22,8; n -цимол – 5,80; тимол – 1,15.; β -кариофиллен – 0,54.	Россия, Ленинградская область	[237]
6	Карвакрол – (32,1...59,4)	γ -терпинен – (28,03...51,26); n -цимол – (3,05...7,06); тимол – (0...0,10).; β -кариофиллен – (0,24...0,54)	Россия, Москва	[238]

При сравнении особенностей компонентного состава эфирного масла чабера садового (таблица 11) и чабера горного (таблица 10) очевидна общая близость компонентного состава – основу эфирного масла составляют идентичные компоненты. Основная доля приходится на карвакрол или изомерный ему тимол. При этом характерно, что распространенность тимольного хемотипа для обоих видов эфирного масла остается достаточно низкой. Содержание карвакрола в обоих эфирных маслах практически идентично и находится в близком диапазоне от 40 до 70 %. По этой причине различение этих эфирных масел на основании содержания мажоритарного компонента является невозможным.

Однако, при сопоставлении содержания других основных компонентов очевидны характерные для каждого из эфирных масел особенности. Для эфирного масла чабера горного характерно преобладание содержания *n*-цимола (от 6,4 % до 19,1 %) над содержанием γ -терпинена (от 5,0 % до 13,5 %). Отношение содержаний γ -терпинена и *n*-цимола изменяется в диапазоне от 0,27 до 1,04. Для эфирного масла чабера садового, напротив, характерно преобладание содержания γ -терпинена (от 22,8 % до 35,4 %) над содержанием *n*-цимола (от 2,5 % до 5,8 %). Отношение содержаний γ -терпинена и *n*-цимола изменяется в диапазоне от 3,9 до 14,0. Таким образом, сами диапазоны концентраций γ -терпинена и *n*-цимола, а также отношение этих концентраций является достаточно характерным и может рассматриваться, как потенциальный идентификационный критерий.

1.5.4. Эфирное масло майорана

1.5.4.1. Характеристика майорана

Майоран (*Origanum majorana* L.) в зависимости от климатических условий является многолетним полукустарником или травянистой культурой семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [239-241]. Карта мирового распределения майорана представлена на рисунке 11. В таблице 12 представлено описание ареалов обитания майорана.

Таблица 12 – Описание ареалов обитания майорана

Тип ареала	Регион
Естественный	Западная Азия: Кипр, Турция.
Интродуцированный	Макаронезия: Азорские острова и Мадейра. Северная Африка: Алжир, Ливия, Марокко и Тунис. Индийский субконтинент: Индия. Восточная Европа: Страны Балтии, Россия (Республика Крым), Украина. Северная Европа: Великобритания Юго-восточная Европа: Греция, Италия. Юго-западная Европа: Франция, Испания. Южная Америка: Венесуэла.

Данные мирового распределения майорана (рисунок 11, таблица 12) свидетельствуют, что для майорана характерно лишь два естественных ареала обитания: Турция и Кипр. Остальные регионы являются регионами интродукции майорана. На территории Российской Федерации важнейшим регионом культивирования является Республика Крым.

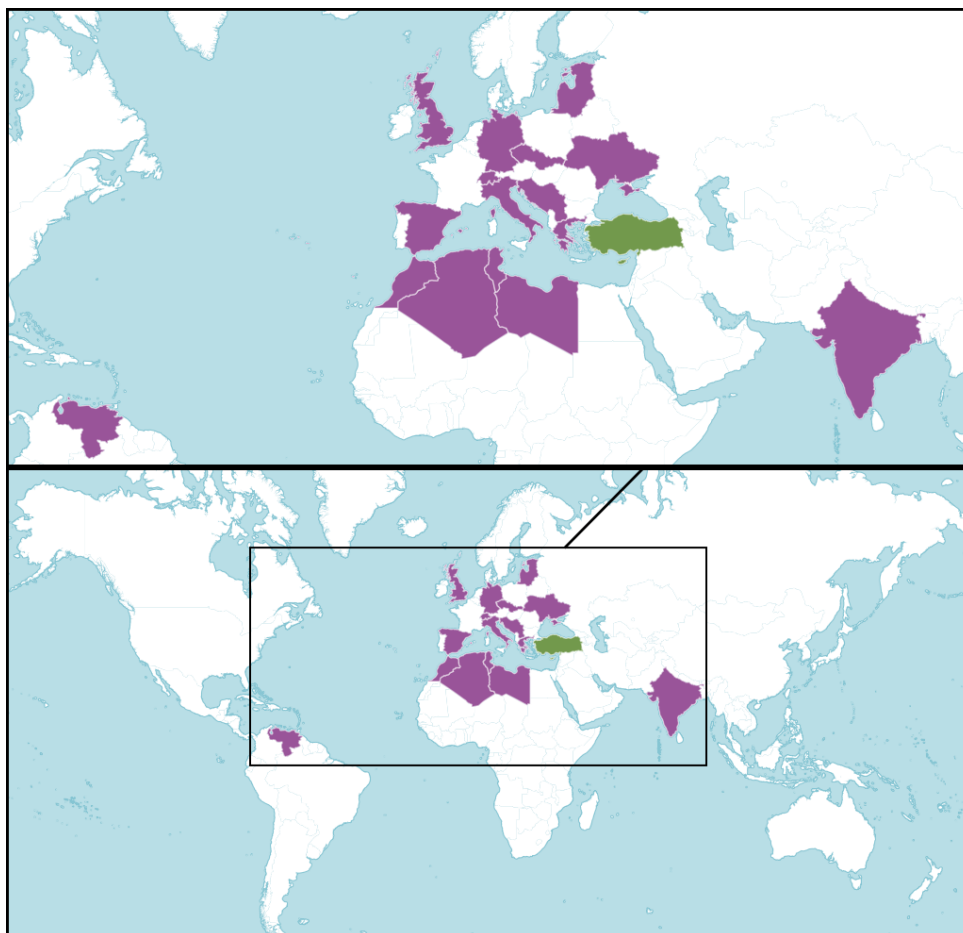


Рисунок 11 – Карта мирового распределения майорана. Зеленым отмечены регионы естественного ареала, коричневым – регионы интродуцированного ареала. Рисунок подготовлен автором на основании карты KEW [239]

1.5.4.2. Характеристика эфирного масла майорана

Эфирное масло майорана представляет собой прозрачную маслянистую жидкость от бесцветного до жёлто-зеленого цвета [241]. Эфирное масло обладает широким спектром фармакологической активности: антиоксидантной [242-244], противовоспалительной [245-247], антимикробной [244, 248].

Для эфирного масла майорана отсутствуют утвержденные стандарты качества, несмотря на достаточно хорошую изученность этого эфирного масла. В таблице 13

представлена сравнительная характеристика (по литературным данным) компонентного состава эфирного масла майорана.

Таблица 13 – Сравнительная характеристика компонентного состава эфирного масла майорана

№	Содержание мажоритарного компонента, %	Содержание других компонентов профиля, %	Регион происхождения	Источник
1	Терпинен-4-ол – (28,11...36,0)	линалоол – (8,4...16,3); α -терпинеол – (4,3...8,3)	Россия, Республика Крым	[172]
2	Терпинен-4-ол – 25,11	γ -терпинеол – 14,07; α -терпинеол – 1,68; γ -терпинен – 6,06; β -терпинеол – 7,37; гидрохинон – 16,07		
3	Терпинен-4-ол – 38,40	γ -терпинеол – 14,07; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 14,95; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 3,49; α -терпинеол – 4,88; γ -терпинен – 6,89; <i>n</i> -цимол – 7,01; сабинен – 4,94	Остров Реюнион	[249]
4	Терпинен-4-ол – 21,33	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 14,00; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 3,80; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 15,53; сабинен – 8,27; α -терпинеол – 3,26; α -терпинен – 8,88; <i>n</i> -цимол – 1,29	Албания	[250]
5	Терпинен-4-ол – 32,1	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 9,5; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 4,4; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 1,6; сабинен – 3,6; α -терпинеол – 3,7; α -терпинен – 5,0; <i>n</i> -цимол – 6,90	Непал	[251]
6	Терпинен-4-ол – 30,41	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 13,94; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 9,64; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 2,79; сабинен – 5,11; α -терпинеол – 4,47; α -терпинен – 7,70; <i>n</i> -цимол – 2,75	Египет	[252]
7	Терпинен-4-ол – 23,2	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 10,5; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 17,5; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 4,0; сабинен – 7,5; α -терпинеол – 4,7; α -терпинен – 5,6; <i>n</i> -цимол – 9,0	Тунис	[253]
8	Терпинен-4-ол – 33,0	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – н.о.; <i>цис</i> -сабинен гидрат – н.о.; <i>транс</i> -сабинен гидрат – н.о.; сабинен – н.о.; α -терпинеол – 6,7; α -терпинен – н.о.; <i>n</i> -цимол – 6,8	Китай	[254]
9	Терпинен-4-ол – 22,42	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 14,69; <i>цис</i> -сабинен гидрат – н.о.; <i>транс</i> -сабинен гидрат – н.о.; сабинен – 1,89; α -терпинеол – 7,02; α -терпинен – 6,21; <i>n</i> -цимол – 8,91	Непал	[255]
10	Терпинен-4-ол – 28,96	γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 18,57; <i>цис</i> -сабинен гидрат – 0,47; <i>транс</i> -сабинен гидрат – 0,44; сабинен – 8,02; α -терпинеол – 1,42; α -терпинен – 12,72; <i>n</i> -цимол – 0,80	Марокко	[256]
11	Линалоол – 32,68	Терпинен-4-ол – 22,30; γ -терпинеол – н.о.; γ -терпинен – 1,21; <i>цис</i> -сабинен гидрат – н.о.; <i>транс</i> -сабинен гидрат – н.о.; сабинен – 4,57; α -терпинеол – 3,26; α -терпинен – н.о.; <i>n</i> -цимол – 8,07	Марокко	[257]
12	Карвакрол – 57,86	Тимол – 13,54; β -кариофиллен – 11,52; <i>n</i> -цимол – 6,78	Иран	[258]

Обзор экспериментальных исследований (таблица 13), посвященных изучению компонентного состава эфирного масла майорана, позволяет говорить об относительном

постоянстве содержания мажоритарного компонента – терпинен-4-ола, что подтверждается также обзорными работами.

Подобное явление обусловлено большим распространением определенного хемотипа эфирного масла майорана [241]. Для эфирного масла майорана выделяют два основных хемотипа: терпинен-4-ол/*цис*-сабинен гидратный и карвакрол/тимольный, значительно менее распространенный [241, 258]. Преобладающим хемотипом эфирного масла является именно терпинен-4-ол/*цис*-сабинен гидратный. Сообщается о наличии менее распространенных хемотипов [251] - *цис*-сабинен гидратного, *транс*-сабинен гидратного и линалоольного - наибольший интерес из которых представляет линалоольный.

Содержание основного компонента наиболее популярного хемотипа терпинен-4-ол/*цис*-сабинен гидратного – терпинен-4-ола достаточно стабильно и позволяет использовать его концентрацию, как достаточно точный идентификационный маркер эфирного масла майорана. Остальные основные компоненты являются производными терпинена (γ - и α -терпинен, их спирты: γ - и α -терпинеол, а также *n*-цимол) и сабинена (сабинен, *цис*- и *транс*-сабинен гидрат). Для каждого из описанных компонентов отмечается достаточно сильная вариабельность.

В ключевых научных работах по исследованию факторов вариабельности эфирных масел растений рода *Origanum* отмечается влияние фазы вегетации и сезона заготовки: основной компонент на стадии бутонизации – *цис*-сабинен гидрат, цветения – тимол, на стадии плодоношения – терпинен-4-ол [259]. Степень изменений настолько велика, что одно эфирное масло одного растения в различные периоды вегетации может соответствовать трем различным хемотипам. Подобные изменения в составе эфирного масла объясняются тем, что почти все его основные компоненты принадлежат к одному биогенетическому ряду: терпинен→*n*-цимол→тимол/карвакрол [158, 159].

Исследование влияния климатических факторов на компонентный состав эфирного масла майорана показывает, что совокупное действие степени освещенности, температуры, влажности и степени минерализации почвы связано с изменением баланса между основными монотерпенами: сабинином и γ -терпиненом, а также между их спиртами [241].

С учетом сильного влияния фазы вегетации, сезона заготовки и климатических факторов можно предположить значимую географическую зависимость содержания основных компонентов эфирного масла майорана. В свою очередь подобная закономерность позволяет ввести достаточно четкие идентификационные критерии эфирного масла, характеризующие локацию его происхождения.

Среди ключевых близкородственных растений майорана следует выделить душицу обыкновенную (*Origanum vulgare* L.) [260], испанскую душицу (*Thymbra capitata* (L.) Cav.) [261] и испанский майоран (*Thymus mastichina* L.) [262] в виду их наибольшей распространенности. Хроматографические профили эфирных масел душицы обыкновенной, испанской душицы и испанского майорана, закрепленные ISO, представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Хроматографические профили эфирных масел душицы обыкновенной, испанской душицы и испанского майорана, закрепленные ISO

Компонент	Нормированное содержание, %		
	Душица обыкновенная	Душица испанская	Испанский майоран
	ISO 13171:2016	ISO 14717:2008	ISO 4728:2003
α -Туйен	(0,2...1,5) %	(0,5...2,0) %	-
α -Пинен	(0,2...2,5) %	(0,5...2,0) %	(1,0...4,5) %
Мирцен	(0,5...3,0) %	(1,0...3,0) %	-
α -Терпинен	(0,5...2,0) %	(0,5...2,5) %	-
<i>n</i> -Цимол	(4,0...10,0) %	(5,5...9,0) %	-
γ -Терпинен	(3,0...9,0) %	(3,5...10,0) %	-
Линалоол	(сл...3,0) %	(0,5...3,0) %	(3...48) %
Терпинен-4-ол	(0,5...2,0) %	(0,5...2,0) %	-
Тимол	(0,5...5,0) %	(сл...5,0) %	-
Карвакрол	(60,0...80,0) %	(60,0...75,0) %	-
β -Кариофиллен	(0,5...4,0) %	(2,0...5,0) %	(0,5...1,5) %
β -Пинен	-	-	(2,0...5,0) %
Лимонен	-	-	(1,0...6,0) %
1,8-Цинеол	-	-	(30...68) %
Камфора	-	-	(0,1...2) %
δ -Терпинеол	-	-	(0,2...1,2) %
Борнеол	-	-	(0,2...2) %
Линалил ацетат	-	-	(0,2...4) %

На основании анализа хроматографических профилей эфирных масел близкородственных растений (таблица 14) в качестве характерных компонентов эфирного масла майорана может рассматриваться карвакрол и 1,8-Цинеол. Поскольку карвакрол может содержаться в эфирном масле майорана в повышенном количестве в зависимости от совокупного влияния большого числа факторов, то его контроль является обязательным, что также позволит отличить эфирное масло майорана от эфирных масел душицы обыкновенной и душицы испанской. 1,8-Цинеол же не является типичным компонентом эфирного масла майорана, поэтому его включение в хроматографический профиль позволит однозначно отличать эфирное масло майорана от эфирного масла испанского майорана.

Выводы к главе 1

1. Эфирные масла представляют собой многокомпонентные смеси летучих природных соединений терпенового и/или фенилпропаноидного происхождения. Компонентный состав эфирных масел подвержен высокой вариабельности, что обусловлено синергетическим влиянием эндогенных и экзогенных факторов. Биологическое разнообразие эфирных масел и их многокомпонентный состав обуславливают разнообразие их фармакологических и органолептических свойств, которые, в свою очередь, обуславливают их широкое применение, позволяющее судить об эфирных маслах как о продуктах полифункционального назначения.
2. Анализ современных регуляторных требований к качеству эфирных масел позволил определить основные показатели качества эфирных масел. Среди существующих подходов к оценке качества эфирных масел метод хроматографического профилирования является наиболее достоверным способом и является регламентированным для анализа стандартами ISO, Европейской Фармакопей и Государственной Фармакопей Российской Федерации.
3. Проведенный систематический анализ научной литературы, посвященной изучению стабильности эфирных масел, выявил существенные пробелы в методологических подходах и отсутствие унифицированных протоколов исследований. Критический обзор существующих дизайнов экспериментов показал их основные «слепые зоны»: недостаточную продолжительность исследований (менее 12 месяцев), ограниченное варьирование факторов воздействия (преимущественно только температуры), отсутствие комплексной оценки синергетического эффекта внешних факторов и ограниченность аналитического контроля образующихся продуктов деградации, например гидропероксидов. Это обуславливает необходимость унификации подходов к изучению стабильности и актуализирует разработку нормативной документации.
4. Анализ актуальных исследований компонентного состава эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного позволяет утверждать о недостаточной изученности характеристических особенностей масел российского происхождения. Для эфирных масел чабера горного и майорана на текущий момент отсутствуют регламентированные стандарты качества, что значительно затрудняет их контроль качества. Это создает научную нишу для исследований и последующей характеристики эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана российской локации с разработкой стандартов качества.
5. Результаты литературного обзора позволяют говорить о научном теоретическом базисе для целенаправленного изучения востребованных эфирных масел российского

происхождения с целью формулирования их специфического хроматографического профиля.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования

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 эфирных масел использовали растительное сырье, собранное в период массового цветения и высушенное воздушно-теневым методом. Эфирные масла из растительного сырья были получены путем гидродистилляции в аппарате типа Клевенджера в соответствии с рекомендациями ОФС.1.5.3.0010 (методика 2) [263] и требованиями Европейской Фармакопеи 11 издания [46]. Полученные образцы эфирных масел высушивались над безводным сульфатом натрия и хранились в таре из темного стекла при температуре от 2 до 8 °C до анализа.

Получение эфирного масла розмарина проводили из неодревесневевших побегов 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 [264], LE 01179330 [265], LE 01179312 [266], виртуального гербария Ботанического института им.В. Л. Комарова РАН и коллекции 00655977 виртуального гербария Гарвардского университета [267].

В таблице 15 представлено географическое распределение коммерчески доступных образцов эфирных масел, использованных в исследовании.

Таблица 15 – Географическое распределение коммерчески доступных образцов эфирных масел, использованных в исследовании

№	Растение	Страна происхождения	Регион происхождения	Координаты	Дата производства
1	Розмарин	н/пр*	н/пр	н/пр	октябрь 2023
2	Розмарин	н/пр	н/пр	н/пр	октябрь 2024
3	Розмарин	Марокко	Бени-Меллаль-Хенифра	32.33, -6.35	октябрь 2023
4	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	ноябрь 2023
5	Розмарин	н/пр	н/пр	н/пр	н/пр
6	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	январь 2024
7	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	октябрь 2024
8	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	декабрь 2023
9	Розмарин	н/пр	н/пр	н/пр	январь 2024
10	Розмарин	Испания	Кастилия-ла-Манча	39.86, 4.03	апрель 2023
11	Розмарин	Тунис	Кайруан	35.86, 10.10	сентябрь 2023
12	Розмарин	Марокко	Драва-Тафилалет	31.93, -4.42	май 2023

13	Розмарин	Испания	Андалусия	37.39, 5.99	май 2023
14	Розмарин	Египет	Мухафаза Эль-Гиза	29.71, 31.24	октябрь 2023
15	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	декабрь 2023
16	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	февраль 2024
17	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	июнь 2024
18	Розмарин	Египет	Мухафаза Эль-Гиза	29.71, 31.24	июнь 2024
19	Розмарин	Испания	Валенсия	39.47, 0.38	октябрь 2024
20	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	октябрь 2023
21	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	декабрь 2023
22	Розмарин	Италия	Лигурия	44.41, 8.93	февраль 2024
23	Розмарин	Марокко	Бени-Меллаль-Хенифра	32.33, -6.35	октябрь 2023
24	Розмарин	Греция	Ираклион	35.33, 25.14	май 2024
25	Розмарин	н/пр	н/пр	н/пр	июнь 2024
26	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.56, 34.31	август 2023
27	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.5111, 34.2324	март 2023
28	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.5111, 34.2324	август 2023
29	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.85, 34.97	сентябрь 2023
30	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	сентябрь 2023
31	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	сентябрь 2023
32	Розмарин	Марокко	Драра-Тафилалет	31.93, -4.42	март 2024
33	Розмарин	Испания	Кастилия-ла-Манча	39.86, 4.03	сентябрь 2024
34	Розмарин	Германия	Бавария	49.43, 11.07	август 2024
35	Розмарин	Греция	Ираклион	35.33, 25.14	май 2024
36	Розмарин	Марокко	Драра-Тафилалет	31.93, -4.42	октябрь 2023
37	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.50, 34.17	сентябрь 2024
38	Розмарин	Россия	Республика Крым	44.50, 34.17	сентябрь 2024
39	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	октябрь 2023
40	Розмарин	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	октябрь 2024
41	Майоран	Франция	Окситания	44.06, 2.16	октябрь 2024
42	Майоран	Испания	Мурсия	37.99, -1.13	февраль 2024
43	Майоран	Россия	Республика Крым	45.47, 34.75	октябрь 2024
44	Майоран	Испания	Кастилия-и-Леон	41.65, -4.72	февраль 2023
45	Майоран	Испания	Эстремадура	38.92, -6.34	ноябрь 2024
46	Майоран	Россия	Республика Крым	45.47, 34.75	октябрь 2024
47	Майоран	Россия	Республика Крым	44.75, 33.82	октябрь 2024
48	Майоран	Россия	Республика Крым	44.75, 33.82	октябрь 2023
49	Майоран	Испания	Кастилия-и-леон	41.65, -4.72	сентябрь 2023
50	Майоран	Египет	Асьют	27.24, 31.09	сентябрь 2023
51	Чабер	Египет	Гиза	30.02, 31.20	октябрь 2023
52	Чабер	Россия	Республика Крым	45.06, 34.36	декабрь 2024
53	Чабер	Россия	Республика Крым	45.06, 34.36	октябрь 2023
54	Чабер	Россия	Республика Крым	45.06, 34.36	декабрь 2023
55	Чабер	Россия	Республика Крым	45.06, 34.36	н/пр
56	Чабер	Сербия	Либине	43.97, 19.25	февраль 2024
57	Чабер	Греция	Ираклион	35.33, 25.14	май 2024
58	Шалфей мускатный	Марокко	Касабланка-Сеттат	33.54, -7.58	сентябрь 2023
59	Шалфей мускатный	н/пр	н/пр	н/пр	сентябрь 2023
60	Шалфей мускатный	Марокко	Бени-Меллаль-Хенифра	32.33, -6.35	январь 2023
61	Шалфей мускатный	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	октябрь 2023
62	Шалфей мускатный	Франция	Корсика	42.30, 9.15	декабрь 2023

63	Шалфей мускатный	Греция	Ираклион	35.33, 25.14	сентябрь 2023
64	Шалфей мускатный	Марокко	Фес-Мекнес	34.03, -4.98	июнь 2022
65	Шалфей мускатный	Марокко	Фес-Мекнес	34.03, -4.98	август 2023
66	Шалфей мускатный	Испания	Кастилия-ла-Манча	39.86, 4.03	январь 2023
67	Шалфей мускатный	Испания	Кастилия-ла-Манча	39.86, 4.03	сентябрь 2023
68	Шалфей мускатный	Франция	Окситания	44.45, 1.44	июль 2023
69	Шалфей мускатный	Испания	Андалусия	37.39, 5.99	январь 2024
70	Шалфей мускатный	Индия	Кашмир	33.75, 74.83	июнь 2024
71	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	май 2023
72	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	апрель 2023
73	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	апрель 2023
74	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	февраль 2023
75	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.70, 33.83	февраль 2023
76	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	ноябрь 2023
77	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	ноябрь 2023
78	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	ноябрь 2023
79	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.68, 34.41	октябрь 2023
80	Шалфей мускатный	Франция	Окситания	44.45, 1.44	май 2024
81	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	август 2022
82	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	октябрь 2024
83	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.50, 34.17	июнь 2024
84	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.50, 34.17	октябрь 2024
85	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.50, 34.17	сентябрь 2024
86	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	май 2022
87	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.55, 34.28	декабрь 2023
88	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	45.08, 33.67	февраль 2024
89	Шалфей мускатный	Марокко	Касабланка-Сеттат	33.57, -7.58	июль 2024
90	Шалфей мускатный	н/пр	н/пр	н/пр	октябрь 2023
91	Шалфей мускатный	н/пр	н/пр	н/пр	октябрь 2023
92	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.85, 34.97	август 2023
93	Шалфей мускатный	Россия	Республика Крым	44.85, 34.97	май 2022
94	Шалфей мускатный	н/пр	н/пр	н/пр	октябрь 2023
95	Шалфей мускатный	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	октябрь 2024
96	Шалфей мускатный	н/пр	н/пр	н/пр	октябрь 2023
97	Шалфей мускатный	Испания	Мурсия	37.99, 1.13	ноябрь 2023
Примечание: н/пр – не применимо, заполняется в случае отсутствия информации					

В исследовании использовано всего 97 коммерчески доступных образцов эфирных масел, из которых 40 относятся к образцам эфирного масла розмарина лекарственного, 40 – к образцам эфирного масла шалфея мускатного, 10 – к образцам эфирного масла майорана и 7 – к образцам эфирного масла чабера горного.

В таблице 16 представлено географическое распределение образцов эфирных масел, полученных из растительного сырья в лабораторных условиях и использованных в исследовании.

Таблица 16 – Географическое распределение образцов эфирных масел, полученных из растительного сырья и использованных в исследовании

№	Растение	Страна происхождения	Регион происхождения	Координаты	Дата заготовки
98	Розмарин	Марокко	Танжер-Тетуан-Аль Хосейма, провинция Аль-Хосейма	35.01716, -3.98288	май 2023
99	Розмарин	Марокко	Танжер-Тетуан-Аль Хосейма, провинция Аль-Хосейма	35.01716, -3.98288	июнь 2023
100	Розмарин	Марокко	Фес-Мекнес, г. Фес	35.12046, -4.31554	апрель 2023
101	Розмарин	Таджикистан	Согдийская область, г. Худжанд	40.24944, 69.60342	май 2024
102	Розмарин	Марокко	Касабланка-Сеттат, г. Касабланка	33.39413, -7.65610	май 2024
103	Розмарин	Россия	Республика Крым, Нижегородский р-н, пгт. Нижегородский	45.46923, 34.74851	октябрь 2023
104	Розмарин	Марокко	Рабат-Сале-Кенитра	34.38588, -6.47768	июнь 2023
105	Розмарин	Марокко	Марракеш-Сафи, Марракеш	31.58043, -8.10772	октябрь 2023
106	Розмарин	Таджикистан	г. Душанбе	38.56842, 68.66725	сентябрь 2023
107	Розмарин	Россия	Джанкойский р-н, пос. Ивановка	45.07623, 33.66366	апрель 2024
108	Розмарин	Марокко	Касабланка-Сеттат	33.39413, -7.65610	октябрь 2024
109	Розмарин	Марокко	Фес-Мекнес, г. Фес	35.12046, -4.31554	январь 2024
110	Розмарин	Россия	Республика Крым, Нижегородский р-н, с. Зелёное	45.469944, 34.73416	апрель 2024
111	Розмарин	Россия	Республика Крым, Нижегородский р-н, с. Овощное	45.77068, 34.33505	август 2024
112	Розмарин	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	апрель 2023
113	Розмарин	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	октябрь 2023
114	Розмарин	Таджикистан	Согдийская область, г. Худжанд	40.24944, 69.60342	сентябрь 2023
115	Розмарин	Греция	О. Крит, Сфакион	35.23735, 24.25729	сентябрь 2023
116	Розмарин	Россия	Республика Крым, Красногвардейский р-н, пгт. Красногвардейское	45.50977, 34.25719	апрель 2024
117	Розмарин	Россия	Республика Крым, Сакский р-н, с. Дубки	44.93728, 34.01687	сентябрь 2023
118	Розмарин	Россия	Республика Крым, Симферопольский р-н, с. Малореченское	44.76124, 34.55427	сентябрь 2023
119	Розмарин	Россия	Республика Крым, Бахчисарайский р-н, г. Бахчисарай	44.75272, 33.81779	сентябрь 2024
120	Розмарин	Россия	Республика Дагестан, г. Махачкала	42.940360, 47.543060	март 2024
121	Розмарин	Россия	Республика Дагестан, г. Махачкала	42.940360, 47.543060	май 2024

122	Розмарин	Россия	Республика Дагестан, г. Махачкала	42.940360, 47.543060	ноябрь 2024
123	Розмарин	Россия	Республика Дагестан, г. Махачкала	42.940360, 47.543060	февраль 2024
124	Розмарин	Россия	Республика Крым, Ялтинский городской округ, г. Гурзуф	44.55276, 34.28181	сентябрь 2024
125	Чабер	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.97292, 30.89795	апрель 2023
126	Чабер	Грузия	Загудиди	42.52532, 41.84073	сентябрь 2023
127	Чабер	Египет	Асьютская мухафаза, г. Асьют	27.23861, 31.09140	май 2024
128	Чабер	Армения	Аракатская область, г. Армавир	40.15180, 44.008026	май 2024
129	Чабер	Россия	Республика Крым, Симферопольский р-н, с. Приветное	44.81209, 34.68939	сентябрь 2023
130	Чабер	Грузия	Загудиди	42.52532, 41.84073	май 2023
131	Чабер	Грузия	Загудиди	42.52532, 41.84073	сентябрь 2023
132	Чабер	Грузия	Сванетти	42.39405, 42.32318	май 2024
133	Чабер	Египет	Бени-Суэйфская мухафаза, Бени-суэйф	28.56153, 30.75597	сентябрь 2023
134	Чабер	Грузия	Сванетти	42.39405, 42.32318	сентябрь 2024
135	Чабер	Россия	Нижегородский район	45.44510, 34.77239	май 2024
136	Чабер	Грузия	Гальский район, с. Загудиди	42.52532, 41.84073	май 2024
137	Чабер	Марокко	Фес-Мекнес, г. Фес	35.12481, -4.31221	май 2024
138	Чабер	Египет	Минья мухафаза, Миниа	28.07449, 30.70902	май 2023
139	Чабер	Россия	Нижегородский район	45.44510, 34.77239	сентябрь 2024
140	Чабер	Египет	Асьютская мухафаза, г. Асьют	27.23861, 31.09140	август 2024
141	Чабер	Россия	Республика Крым, Ялтинский городской округ, г. Гурзуф	44.55203, 34.25655	май 2024
142	Чабер	Армения	Аракатская область, г. Армавир	40.15180, 44.00803	сентябрь 2024
143	Чабер	Грузия	Гальский район, с. Загудиди	42.52532, 41.84073	май 2023
144	Чабер	Узбекистан	Сурхадарьинская область, г. Сурхандарья	38.02937, 67.84806	сентябрь 2024
145	Чабер	Россия	Республика Крым, Ялтинский городской округ, г. Гурзуф	44.55203, 34.25655	сентябрь 2024
146	Чабер	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.97292, 30.89795	сентябрь 2024
147	Чабер	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	май 2024
148	Чабер	Египет	Мухафаза Кина, Кина	26.16062, 32.59283	сентябрь 2024
149	Чабер	Россия	Республика Крым, Симферопольский р-н, с. Приветное	44.81209, 34.68939	сентябрь 2024
150	Майоран	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	январь 2022
151	Майоран	Россия	Республика Крым, Красногвардейский р-н, с. Рожино	45.61493, 34.38370	сентябрь 2024

152	Майоран	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	октябрь 2023
153	Майоран	Марокко	Фес-Мекнес, г. Фес	35.12251, -4.31719	март 2024
154	Майоран	Египет	Асьютская мухафаза, г. Асьют	27.23861, 31.09140	апрель 2023
155	Майоран	Египет	Мухафаза Каир, г. Каир	30.08839, 31.16395	октябрь 2023
156	Майоран	Египет	Минья мухафаза, Миниа	28.11183, 30.73520	сентябрь 2024
157	Майоран	Марокко	Фес-Мекнес, г. Фес	35.12251, -4.31719	октябрь 2023
158	Майоран	Греция	О. Крит, Сфакион	35.23735, 24.25729	апрель 2023
159	Майоран	Египет	Мухафаза Каир, г. Каир	30.08839, 31.16395	январь 2024
160	Майоран	Россия	Джанкойский р-н, пос. Ивановка	45.06411, 33.66941	сентябрь 2024
161	Майоран	Египет	Мухафаза Каир, г. Каир	30.08839, 31.16395	октябрь 2024
162	Майоран	Египет	Минья мухафаза, Миниа	28.11183, 30.73520	апрель 2024
163	Майоран	Россия	Республика Крым, Красногвардейский р-н, пгт. Красногвардейское	45.47259, 34.25921	апрель 2024
164	Майоран	Египет	Асьютская мухафаза, г. Асьют	27.23861, 31.09140	сентябрь 2023
165	Майоран	Египет	Фйюмская мухафаза, г. Эль-Файюм	29.31858, 30.79662	октябрь 2024
166	Майоран	Россия	Джанкойский р-н, пос. Ивановка	45.06411, 33.66941	май 2024
167	Майоран	Египет	Фйюмская мухафаза, г. Эль-Файюм	29.31858, 30.79662	май 2024
168	Майоран	Россия	Республика Крым, Красногвардейский р-н, пгт. Красногвардейское	45.47259, 34.25921	сентябрь 2024
169	Майоран	Египет	Асьютская мухафаза, Миньшат абу Милих	28.96362; 30.90489	май 2023
170	Майоран	Россия	Республика Крым, Ялтинский городской округ, пгт. Партенит	44.56323, 34.31201	сентябрь 2024
171	Майоран	Россия	Республика Крым, Ялтинский городской округ, пгт. Партенит	44.56323, 34.31201	сентябрь 2023
172	Шалфей	Россия	Республика Крым, Белогорский р-н	45.01950, 34.88430	сентябрь 2023
173	Шалфей	Россия	Республика Крым, Белогорский р-н	45.01950, 34.88430	сентябрь 2024

В исследовании использованы 76 лабораторно полученных образцов эфирных масел, из которых 27 относятся к образцам эфирного масла розмарина лекарственного, 2 – к образцам эфирного масла шалфея мускатного, 22 – к образцам эфирного масла майорана и 25 – к образцам эфирного масла чабера горного.

Итого общий объем выборки образцов эфирного масла розмарина лекарственного составил 67 образцов, из них 40 образцов являются коммерческими, а 27 получены лабораторно. Общий объем выборки образцов эфирного масла шалфея мускатного составил 42 образца, из которых 40 являются коммерческими, а 2 получены лабораторно. Общий объем выборки образцов эфирных масел майорана составляет 32 образца, из которых 10 образцов являются коммерческими, а 22 – получены лабораторно. Общий объем выборки образцов эфирного масла чабера горного составил 32 образца, из которых 7 являются коммерческими, а 25 полученными лабораторно.

2.2. Скрининговый анализ эфирных масел

2.2.1. ГХ-анализ эфирных масел

Скрининговый газохроматографический анализ эфирных масел проводился с использованием газового хроматографа Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенного пламенно-ионизационным детектором и газового хроматографа GC-2010Pro (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенного пламенно-ионизационным детектором. Эфирные масла в условиях эксперимента анализировались в чистом виде без дополнительной пробоподготовки. 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)

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. Условия хроматографического анализа представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Хроматографические условия скринингового ГХ-анализа эфирных масел

Параметр	Значение	
Температура испарителя, °C	250	
Газ-носитель	Гелий	
Деление потока	200	
Режим газа носителя	Постоянный поток	
Поток газа носителя, мл/мин	1	
Хроматографическая колонка	HP-5MS UI 30 м*0,25 мм, 0,25 мкм	DB-WAX 30 м*0,32 мм, 0,50 мкм
Детектор	Пламенно-ионизационный	
Температура детектора, °C	300	250
Расход водорода, мл/мин	30	
Расход воздуха, мл/мин	300	
Расхода поддувочного газа, мл/мин	30	
Температурная программа термостата	75 °C (1 мин) => 4 °C/мин => 240 °C (20 мин)	75 °C (1 мин) => 4 °C/мин => 225 °C (35 мин)
Объем пробы, мкл	0,1	
Время анализа, мин	62,3	73,5

Идентификацию компонентов эфирных масел проводили путем сравнения экспериментальных индексов, полученных на колонках различной полярности, с теоретическими. Справочные линейные индексы удерживания (LRI) брали из базы Адамса [268], NIST (National Institute of Standards and Technology, США) [269, 270] и из справочной литературы [66]. Для расчета индексов удерживания использовался раствор *n*-алканов состава C_7 - C_{22} (гептан-докозан) с концентрацией 0,25 мг/мл в гексане. Для приготовления использовались нормальные алканы. (ХромЛаб, Россия; квалификация «стх» - стандарт хроматографический).

Количественную оценку содержания проводили с использованием метода внутренней нормализации без оценки коэффициента отклика детектора. Расчет индексов удерживания проводился по формуле 2.

В соответствии с последними требованиями [67], 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.

2.2.2. ГХ-МС-анализ эфирных масел

Скрининговый анализ эфирных масел проводился с использованием газового хроматографа Clarus 600 (PerkinElmer, США), оснащенного масс-селективным детектором (МСД) Clarus 600T (PerkinElmer, США) и газового хроматографа Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенного МСД Хроматэк (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия). Эфирные масла в условиях эксперимента анализировались в чистом виде без дополнительной пробоподготовки.

Анализ проводился с использованием капиллярной колонки из плавленого кварца HP-5MS UI с НЖФ (5%-фенил)-метилполисилоксан ($30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм} \times 0,25 \text{ мкм}$) (Agilent Technologies, США). Условия анализа представлены в таблице 18.

Интерпретацию масс-спектров осуществляли с помощью библиотеки NIST-20 и NIST-25 с помощью программного обеспечения NIST MS Search (версия 3.0., NIST, США).

Идентификация компонентов проводилась по совпадению спектра испытуемого вещества (показатели «Math» и «RMatch» не менее 850) со спектром вещества-кандидата и по совпадению индекса удерживания испытуемого вещества с индексом удерживания вещества кандидата.

Количественная оценка содержания компонентов в случае масс-спектрометрического детектирования не проводилась ввиду получения нерепрезентативных данных.

Таблица 18 – Хроматомасс-спектрометрические условия анализа эфирных масел

Параметр	Значение
<i>Хроматографические условия:</i>	
Температура испарителя, °C	250
Газ-носитель	Гелий
Деление потока	200
Режим газа носителя	Постоянный поток
Поток газа носителя, мл/мин	1
Хроматографическая колонка	HP-5MS UI 30м*0,25мм, 0,25 мкм
Температурная программа термостата	75 °C (1 мин) => 4 °C/мин => 240 °C (20 мин)
Объем пробы, мкл	0,1
Время анализа, мин	62,3
Детектор	Масс-селективный
<i>Масс-спектрометрические условия:</i>	
Тип ионизации	Электронный удар
Энергия ионизации, эВ	70
Температура источника ионов, °C	270
Температура переходной линии, °C	270
Масс-анализатор	Квадрупольный
Режим работы масс-анализатора	Сканирование
Диапазон масс	29-350

2.2.3. Определение ключевых показателей качества эфирных масел

Выбор ключевых показателей качества эфирных масел 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 [271] и Ph.Eur 11 [46].

Для оценки качества эфирных масел были выбраны следующие ключевые показатели, требующие нормирования: «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость», «Кислотное число», «Пероксидное число», «Хроматографический профиль» и «Вода».

В ходе данного исследования, образцы эфирных масел были проанализированы по всем указанным показателям качества. В качестве дополнительных испытаний в тексты проектов нормативных документов были введены анализы по показателям, не требующим нормирования, «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла».

2.3. Составление хроматографических профилей эфирных масел

2.3.1. Применение подхода ISO

В соответствии с требованиями ISO 11024:1-1998 [49], перед составлением хроматографического профиля необходимо произвести отбор проб, подходящих для

дальнейшей обработки. В процессе отбора в т.ч. и по совокупным результатам ГХ и ГХ-МС анализа, отбраковываются пробы с нетипичным содержанием ряда компонентов эфирного масла, выбивающихся из общего массива данных. Данная процедура позволяет исключить коммерчески доступные пробы эфирного масла, полученные из растения отличного от заявленного ботанического вида, а также фальсифицированные путем добавления разбавителей.

После проведения процедуры отбора пробы необходимо определение числа репрезентативных и характерных компонентов эфирного масла для установления пределов их концентраций. Определение перечня репрезентативных и характерных компонентов проводится на основании совокупного анализа известной информации о компонентном составе эфирного масла исследуемого растения, о компонентном составе эфирных маслах растений близких видов и результатов имеющегося экспериментального массива данных, для которого была проведена процедура отбора проб.

Пределы концентраций выбранных репрезентативных и характерных компонентов устанавливаются путем расчета доверительного интервала среднего значения итеративным способом по следующей формуле 3 с отбраковкой концентраций компонентов, не входящих в доверительный интервал.

2.3.2. Применение хемометрических моделей

Для каждого образца регистрировали хроматограмму в виде зависимости сигнала детектора от времени удерживания. Интеграцию пиков и расчет площадей выполняли с помощью стандартного программного обеспечения хроматографической системы, используя автоматический и при необходимости ручной режимы обработки. Концентрации компонентов определялись методом внутренней нормализации без учета коэффициента чувствительности детектора. Предел игнорирования – 0,05 %, пики доля которых составляет менее указанного предела не интегрировались и не использовались в дальнейших расчетах.

Идентификация компонентов проводилась с использованием линейных индексов удерживания и метода ГХ-МС, как описано в разделах 2.2.1 и 2.2.2.

Хроматограмму представляли в виде набора переменных, включающих наименования компонентов и концентрацию, определенную по методу внутренней нормализации (в процентах).

Обработка массивов хроматографических данных проводилась с применением методов многомерного статистического анализа. Для устранения влияния различий в абсолютных концентрациях мажорных и минорных компонентов на результаты

моделирования, исходная матрица данных (содержащая процентное содержание компонентов эфирных масел) подвергалась предварительной трансформации по методу Парето (*Pareto scaling*).

На первом этапе для выявления естественной структуры данных и скрытых паттернов без предварительного задания классов применялись неконтролируемые методы (обучение без учителя).

Иерархический кластерный анализ (HCA):

Использовался для первичной визуализации степени химического сходства образцов. Кластеризация проводилась агломеративным методом; в качестве меры сходства применялось евклидово расстояние, алгоритм объединения — метод Уорда (*Ward's method*).

Метод главных компонент (PCA).

Применялся для снижения размерности данных, выявления главных векторов химической изменчивости, а также выявления потенциальных выбросов (*outliers*) и общих макроструктурных трендов (хемотипов) в многомерном пространстве. Оценка группировки образцов проводилась на основе графиков оценок (*Score plots*).

На втором этапе для проверки гипотезы о влиянии географического фактора на компонентный состав применялся контролируемый метод классификации (обучение с учителем) — PLS дискриминация (*PLS-DA*). Данный алгоритм использовался для максимизации ковариации между матрицей хроматографических профилей (*X*) и категориальной переменной, обозначающей регион произрастания сырья (*Y*).

Для выявления химических компонентов, вносящих наибольший статистический вклад в дифференциацию классов, рассчитывался показатель проекционной значимости переменных — *VIP* (*Variable Importance in Projection*). Компоненты со значением *VIP* > 1,0 рассматривались как потенциальные региональные или биосинтетические маркеры.

2.4. Разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах

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) для титрования в метанольной среде и Hydranal Coulomat AK (Honeywell, США) для титрования в безметанольной среде.

Титрование различных групп эфирных масел:

При проведении титрования эфирных масел группы 1 (*Без протекания побочных реакций*) в качестве анолита использовался реактив Hydranal Coulomat AG, в качестве растворителя пробы использовался метанол.

При проведении титрования эфирных масел группы 2 (*Без протекания побочных реакций, но с появлением опалесценции при растворении*) в качестве анолита использовался реактив Hydranal Coulomat AG, в качестве растворителя пробы использовалась смесь метанол:октан-1-ол (1:1, v/v). Перед проведением титрования октан-1-ол высушивался в течение 48 часов с использованием молекулярных сит 3 Å.

Перед проведением титрования раствором эфирных масел группы 1 и 2, устанавливали содержание воды в растворителе путем его трехкратного титрования. Содержание воды в растворителе определяли по следующей формуле:

$$X_{p-ль} = \frac{m_i^B}{m_i} * 100, \quad (4)$$

где m_i – масса растворителя, введенная в электрохимическую ячейку, г;

m_i^B – масса воды, определенная в результате титрования, г;

После определения содержания воды в растворителе проводили титрование растворов эфирных масел группы 1 и 2. Массовую долю воды в эфирных маслах (w_i) в процентах определяли по следующей формуле:

$$w_i = \frac{((m_{p-ль} + m_{эм}) * x_i - (m_{p-ль} * X_{p-ль}))}{m_{эм}}, \quad (5)$$

где $m_{p-ль}$ – масса растворителя (метанол, смесь метанола и октанола (1:1, v/v), ацетонитрила, использованная для приготовления испытуемого раствора, мг;

$m_{эм}$ – масса эфирного масла, использованная для приготовления испытуемого раствора, мг;

x_i – содержание воды в испытуемом растворе (по данным прибора), %;

$X_{p-ль}$ – содержание воды в растворителе, %.

При проведении титрования эфирных масел группы 3 (*С протеканием побочных реакций*) в качестве анолита использовался реактив Hydranal Coulomat AK, эфирное масло вносилось в электрохимическую ячейку без дополнительной пробоподготовки. Массовую

долю воды в эфирных маслах (w_i) группы 3 в процентах определяли по следующей формуле:

$$w_i = \frac{m_i^B}{m_{эм}} * 100, \quad (6)$$

где $m_{эм}$ – масса эфирного масла, введенная в электрохимическую ячейку, г;

m_i^B – масса воды, определенная в результате титрования, г;

2.5. Методы статистической обработки результатов экспериментов

Статистическая обработка проводилась с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [272]. Экспериментальные данные обрабатывались с использованием Microsoft Excel и языка программирования R (ver.4.3.3) в среде RStudio (ver.2024.12.1+563). Все результаты представлены в виде среднего и его доверительного интервала ($\bar{X} \pm \Delta x$), рассчитанного для доверительной вероятности 95 %. Проверку на нормальность распределения значений проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Анализ уровня статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$. В случае наличия значимых различий проводили последующее множественное сравнение по методу Тьюки (Tukey HSD).

Валидации аналитических методик проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» [273] и ICH Q2(R2) «Validation of analytical procedures» [274].

2.6. Изучение стабильности эфирных масел

Изучение стабильности эфирных масел проводили 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. Число контрольных точек в ходе эксперимента составило: начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев.

Программа изучения стабильности, основанная на факторном эксперименте, представлена в таблице 19.

В каждой из шести точек контроля для каждого исследуемого эфирного масла контролировался хроматографический профиль методом газовой хроматографии и показатель «Описание» и показатель «Пероксидное число» методом йодометрического титрования. В начальной и конечной точке исследования были проведены анализы по всем ключевым показателям качества эфирного масла: «Описание», «Относительная

плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость», «Кислотное число», «Пероксидное число», «Хроматографический профиль», «Вода», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла».

Таблица 19 – Программа изучения стабильности

№ эксперимента	УФ-излучение	Атмосфера	Температура, °C
1	Отсутствует	Инертная	-(25...18)
2		Нормальная	<i>Хранение в морозильной камере</i>
3	Отсутствует	Нормальная	+(2...8)
4		Инертная	<i>Хранение в холодильной камере</i>
5	Отсутствует	Инертная	+(15...25) <i>Хранение при комнатной температуре</i>
6		Нормальная	
7	Рассеянный свет	Нормальная	
8		Инертная	

Хранение любого эфирного масла предполагает плотно закупоренную тару [275], а наблюдаемые изменения в случае экспозиции в открытых флаконах, вероятно, будут характеризоваться очень низкой воспроизводимостью из-за большого количества протекающих конкурирующих процессов окисления и испарения компонентов, поэтому в рамках программы изучения стабильности данные эксперименты с экспозицией эфирных масел в открытых флаконах представляются излишними.

В большинстве рассмотренных исследований хранение реализовывалось в хроматографических виалах. В рамках нашего алгоритма предлагается использовать флаконы из темного стекла, соответствующие требованиям ISO 210:2023, таким образом, исследование стабильности эфирного масла будет проводится в его первичной упаковке. Для реализации хранения эфирного масла в условиях инертной атмосферы эфирное масло барботировалось азотом перед закрытием флакона в течение 2 минут.

Результаты исследования стабильности представлены в виде матриц с тепловой картой, описывающих изменения концентраций компонентов. Изменение концентрации начальных компонентов оценивалось с помощью параметра ΔC :

$$\Delta C = \frac{\sum X_i^0 - \sum X_i^n}{\sum X_i^0} * 100, \quad (7)$$

где: $\sum X_i^0$ - начальная сумма концентраций детектируемых компонентов хроматографического профиля эфирного масла, %;

$\sum X_i^n$ - сумма концентраций детектируемых компонентов хроматографического профиля эфирного масла в определенной контрольной точке, %

Численные значения параметра изменения концентраций начальных компонентов ΔC необходимы для оценки изменения исключительно нативных компонентов хроматографического профиля эфирного масла.

Суммарное изменение концентрации компонентов в эфирном масле оценивалось с помощью параметра $\sum \Delta C$:

$$\sum \Delta C = \sum |X_i^0 - X_i^n|, \quad (8)$$

где: X_i^0 - начальная концентрация детектируемого компонента эфирного масла, %;

X_i^n – концентрация детектируемого компонента эфирного масла в определенной контрольной точке, %.

Параметр $\sum \Delta C$ является кумулятивным и описывает общую динамику изменений в компонентном составе эфирного масла. Параметр применим для общей оценки изменений, поскольку учитывает изменения нативных компонентов хроматографического профиля, а также появление в компонентном составе новых соединений.

Выводы к главе 2

1. В качестве объектов исследования использовали коммерчески доступные и полученные лабораторно образцы эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана различного географического происхождения.
2. Хроматографическое профилирование проводили с использованием метода газовой хроматографии. Анализ проводили с использованием разработанной и валидированной методики, основанной на ортогональном анализе на хроматографических колонках различной полярности. Идентификацию компонентов проводили с использованием линейных индексов удерживания.
3. Формулирование хроматографического профиля осуществлялось в соответствии с положениями ISO 11024-1:1998, предварительная обработка данных осуществлялась с использованием методов хеометрической обработки (HCA, PCA, PLS-DA).
4. Разработка и валидация методики количественного определения воды в эфирных маслах проводилась путем кулонометрического титрования по методу Карла Фишера.
5. Исследование стабильности эфирных масел объектов исследования проводили в соответствии с разработанной исследовательской программой, основанной на факторном дизайне эксперимента.

ГЛАВА 3. Хроматографическое профилирование эфирных масел локального происхождения

3.1. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного

3.1.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла розмарина лекарственного

Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного проводилось на основании анализа 67 образцов, из которых 40 образцов является коммерчески доступным (таблица 15), а 27 образцов полученных лабораторно (таблица 16). Перед формулированием хроматографического профиля было отбраковано 9 образцов эфирного масла. Эфирные масла № 1; № 2; № 5; № 9 и № 25 (таблица 15) были исключены ввиду отсутствия информации о регионе происхождения эфирного масла; в образцах № 30 и № 31 установлена слишком маленькая концентрация целевых компонентов и несоответствие при положительном результате теста по показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества», что может говорить о фальсификации. Подобные несоответствия были признаны критическими, поэтому данные эфирные масла были исключены из выборки. В образце № 18 обнаружено аномальное содержание борнеола (39,89 %) и α -пинена (44,93 %), а в образце № 34 содержание линалоола составляет (90,67 %). Поскольку такие содержания перечисленных компонентов не являются типичными для эфирного масла розмарина лекарственного, и наблюдались лишь в указанных образцах, то перечисленные образцы признаны выбросами и исключены из выборки.

Итоговая выборка составила 58 образцов из 7 стран: Российская Федерация – 24 образца, Марокко – 13 образцов, Испания – 10 образцов, Египет – 4 образца, Таджикистан – 3 образца, Греция – 3 образца и Италия – 1 образец. Карта распределения образцов представлена на рисунке 12.

Анализируемые образцы эфирного масла марокканского происхождения локализованы на территории 6 регионов: Бени-Меллаль-Хенифра, Драра-Тафилалет, Касабланка-Сеттат, Фес-Мекнес, Танжер-Тетуан-Аль Хосейма и Маракеш-Сафи; испанского – на территории 4 регионов: Мурсия, Кастилия-ла-Манча, Валенсия и Андалусия, египетского – на территории регионов мухафаза Эль-Гиза и Асьютской мухафазы; греческого происхождения – в регионе Ираклион (о. Крит), итальянского – в регионе Лигурия. Образцы таджикистанского происхождения локализованы на территории Согдийской области и окрестности города Душанбе. Среди 24 образцов Российского происхождения 20 локализованы на территории Республики Крым, а 4 на территории

Республики Дагестан, карта распределения образцов российского происхождения представлена на рисунке 13.

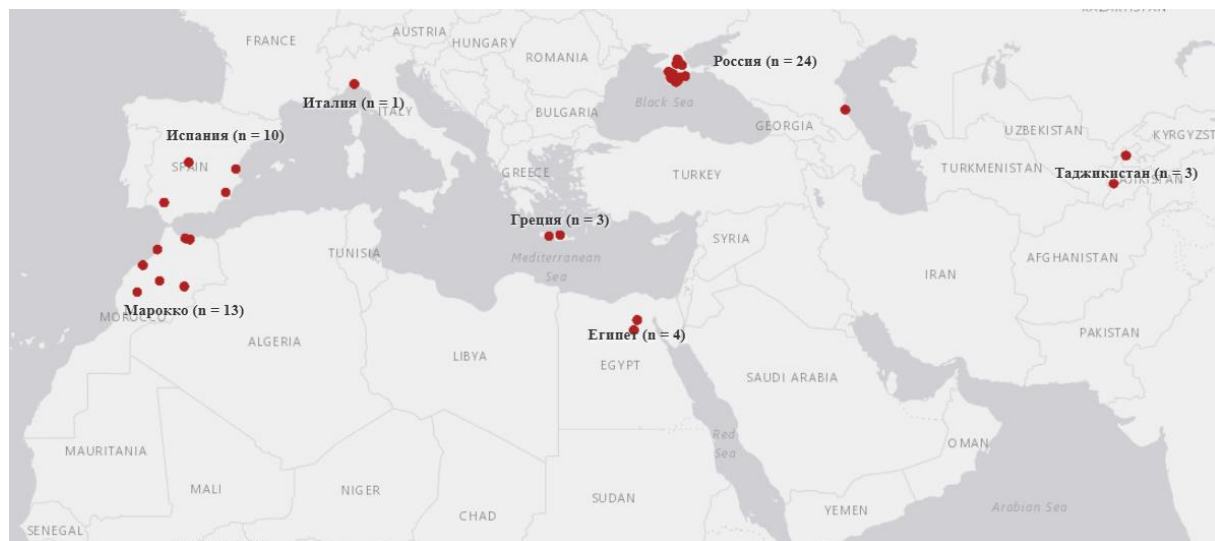


Рисунок 12 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного. Рисунок подготовлен автором



Рисунок 13 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Среди 20 образцов крымского происхождения (рисунок 13) 11 образцов локализованы на территории Южного берега Крыма: г.Алушта, пгт. Гурзуф, г.Судак, поселок Никита; 3 образца локализованы в Нижнегорском районе, 2 образца в Бахчисарайском районе и по одному образцу из Джанкойского, Красногвардейского, Сакского и Симферопольского района. 4 образца из Республики Дагестан локализованы в окрестностях города Махачкала.

3.1.2. Хемометрический анализ данных

Для установления близости компонентных составов исследуемых образцов эфирных масел без учета региона их происхождения был применен иерархический кластерный анализ (HCA), дендрограмма исследуемых образцов представлена на рисунке 14.

На полученной дендрограмме вся выборка делится на 2 больших смешанных кластера (выделены красным и зеленым цветом), один смешанный кластер (выделен фиолетовым цветом) и один монокластер (выделен голубым цветом), в котором сгруппированы образцы российского происхождения. Таким образом, при анализе топологии дендрограммы роль географического фактора вариабельности компонентного состава неочевидна.

Красный кластер группирует 23 образца из 6 стран: 9 из Марокко, 7 из России, 3 из Таджикистана, 2 из Испании и по 1 из Египта и Греции. Второй кластер (выделен зеленым) группирует 24 образца из 5 стран: 3 из Марокко, 10 из России, 7 из Испании, 3 из Египта и 1 из Греции.

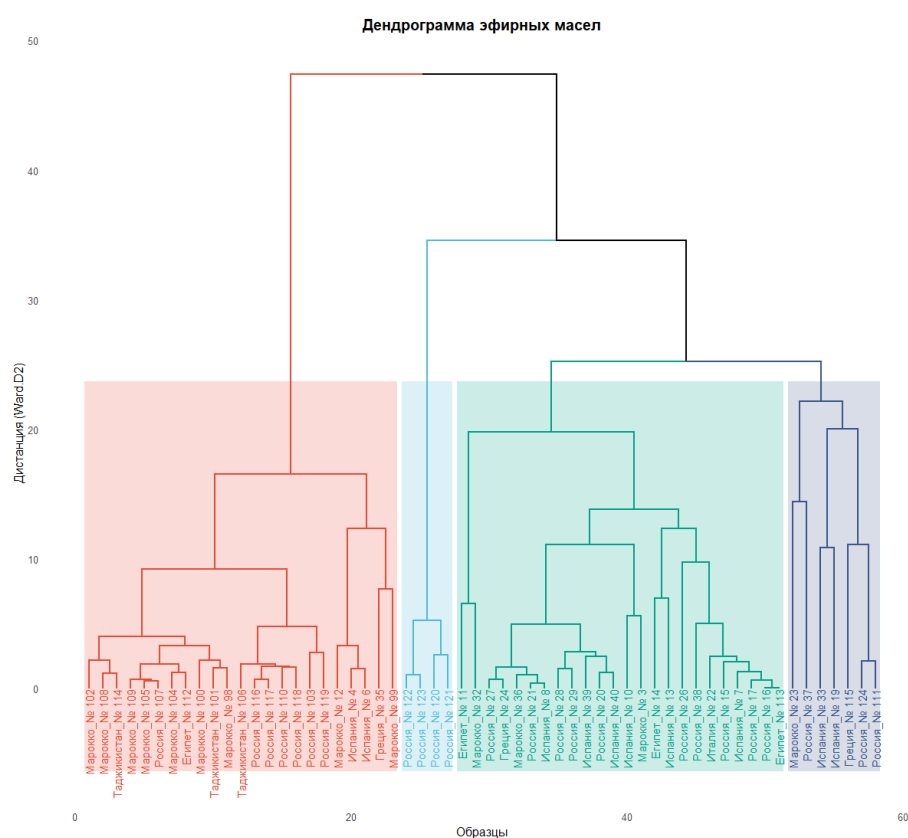


Рисунок 14 – Дендрограмма исследуемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного. Рисунок подготовлен автором

Следует отметить, что при сравнении структуры красного и зеленого кластера отмечается заметная асимметрия распределения количества образцов между кластерами для эфирных масел марокканского и испанского происхождения. Подобное наблюдение может свидетельствовать о том, что два больших кластера объединены на основании близости компонентного состава каждого из испытуемых эфирных масел к регламентированным хроматографическим профилям эфирных масел розмарина лекарственного испанского и марокканского/туниского типов в ISO 1342:2012 [107].

Дополнительным свидетельством незначительного влияния географического фактора вариабельности является достаточно высокая симметрия распределения по числу образцов между кластерами. С другой стороны, при детальном рассмотрении структуры каждого из больших кластеров очевидно образование подкластеров на основании географической близости происхождения эфирного масла: в красном кластере образцы российского происхождения № 103, № 110 и № 116-119 формируют большой подкластер с образцом № 106 таджикского происхождения; в зеленом кластере образцы российского происхождения № 20, № 28-29 формируют подкластер с образцом № 30 испанского происхождения.

Маленький смешанный кластер (выделен фиолетовым) группирует 7 образцов из 4 стран: 3 из России, 2 из Испании, по 1 из Марокко и Греции. В структуре данного кластера также отмечается тенденция к образованию подкластеров на основании географической близости образцов – такие подкластеры образуют образцы № 124 и № 111 из России и № 33 и № 19 из Испании. Общая топология дендрограммы позволяет предполагать, что данный кластер также сгруппирован на основании близости к одному из известным хемотипов. Общая распространенность хемотипов позволяет выдвинуть предложение, что третий кластер образован на основании близости к камфорному хемотипу – третьему по распространенности хемотипу эфирного масла розмарина лекарственного.

Монокластер (выделен голубым) образован исключительно образцами российского происхождения из Республики Дагестан. Наличие монокластера в общей структуре дендрограммы позволяет предположить наличие уникального хемотипа, характерного для эфирного масла, локализованного на данной территории.

Для подтверждения гипотезы о наличии географической вариабельности компонентного состава эфирных масел розмарина лекарственного был проведен анализ методом главных компонент (PCA). График оценок PCA представлен на рисунке 15.

Для эфирных масел испанского и марокканского происхождения получены достаточно узкие доверительные области, что позволяет судить о низкой внутригрупповой дисперсии, что в свою очередь, позволяет судить о стабильности компонентного состава эфирного масла. Широкая доверительная область образца египетского происхождения однозначно объясняется малой выборкой. При детальном рассмотрении структуры кластеров видно, что все 4 испытуемых образца египетского происхождения сгруппированы в центральной части графика. Расширенный характер доверительной области образцов эфирных масел российского происхождения объясняется наличием уникального кластера, выявленного на дендрограмме (рисунок 15).

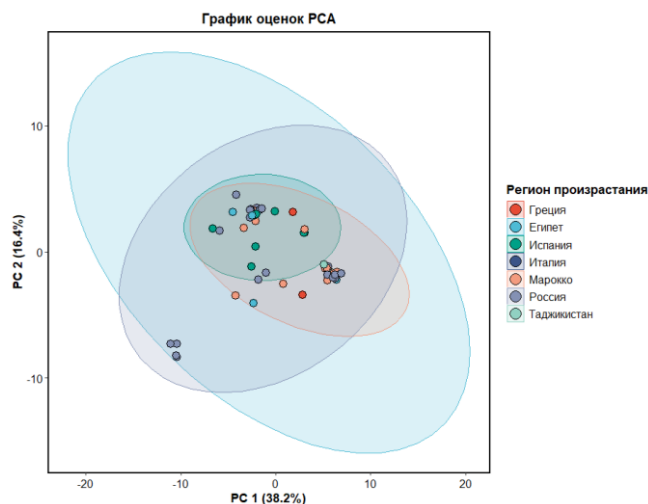


Рисунок 15 – График оценок PCA исследуемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного. Рисунок подготовлен автором

При исключении из рассмотрения 4 образцов, локализованных в Республике Дагестан, очевидно, что остальные образцы равномерно распределены внутри доверительных областей эфирных масел розмарина лекарственного марокканского и испанского происхождения.

Для подтверждения гипотезы о наличии географически выраженной вариабельности компонентного состава была проведена PLS дискриминация (PLS-DA, метод регрессии частных наименьших квадратов). График оценок PLS-DA представлен на рисунке 16.

В результате проведенного PLS-DA анализа доверительные области на графике (рисунок 16) демонстрируют схожий характер с графиком оценок PCA (рисунок 15). Ключевым отличием в данном случае является вынесение за области пересечения с другими доверительными областями дополнительно двух образцов российского происхождения. Следовательно, в целом можно заключить, что для эфирного масла розмарина лекарственного не обнаружено достаточно доказательств наличия сильно выраженного влияния географического фактора вариабельности компонентного состава. Однако наличие двух подкластеров, состоящих из образцов российского происхождения свидетельствует о наличии географически обусловленной специфики компонентного состава в пределах страны произрастания. Дополнительным свидетельством региональной специфики компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения являются наличие двух точек, выходящих за пределы доверительного интервала образцов марокканского происхождения.

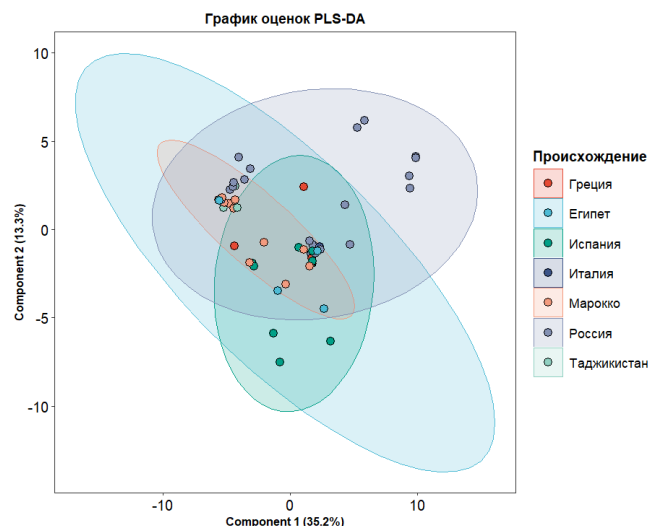


Рисунок 16 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного. Рисунок подготовлен автором

Общая структура данных свидетельствует о наличии особенностей компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения при сравнении с эфирными маслами иного происхождения. С учетом результатов проведенного кластерного анализа и общей географической отдаленности регионов Республики Крым и Республики Дагестан дальнейший анализ компонентных особенностей эфирных масел этих регионов проводился отдельно.

3.1.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения

Для выявления региональной специфичности образцов эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения был проведен повторный хеометрический анализ. В выборку, используемую для анализа, были включены только образцы крымского происхождения. На основании данных географического происхождения (рисунок 13) все образцы были разделены на две зоны произрастания в зависимости от происхождения: Южный берег Крыма и Степной Крым. На рисунке 17 представлен график оценок PLS-DA исследуемых эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения.

График оценок PLS-DA (рисунок 17) демонстрирует высокую надежность проекции – общий процент объясненной дисперсии составляет 60,0 %. При рассмотрении образцов крымского происхождения наблюдается четкая пространственная дискриминация образцов – эфирные масла формируют два изолированных кластера, соответствующие их региону происхождения. Важным доказательством наличия выраженной дифференциации является практически полное отсутствие перекрывающихся доверительных областей соответствующих кластеров.

Образцы, локализованные в Степном Крым, образуют большой кластер с узкой доверительной областью, что указывает на высокую однородность компонентного состава среди образцов данной локализации. Образцы, локализованные на территории Южного берега Крыма, характеризуются большей широтой доверительной области, что указывает на большую вариабельность компонентного состава у образцов этой группы.

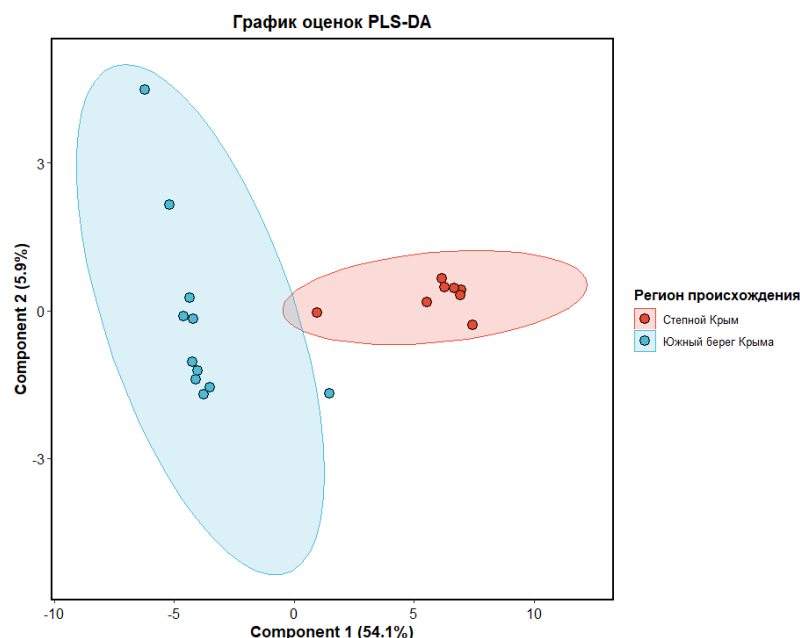


Рисунок 17 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Проведенный анализ PLS-DA однозначно указывает на наличие выраженной специфичности компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения в зависимости от его региона произрастания. Следует заметить, что подобный характер распределения не позволяет однозначно подтвердить решающее влияние географического фактора на компонентный состав, поскольку подобные различия в компонентном составе могут объясняться различной распространенностью розмарина лекарственного определенного хемотипа в различных регионах Республики Крым.

Для установления хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения был построен график важности переменной в проекции (Variable Importance in Projection, *VIP*), представленный на рисунке 18.

Наибольшую важность переменной в проекции 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 регламентировано в ISO. Все отобранные компоненты необходимы для дальнейшего формулирования хроматографического профиля.

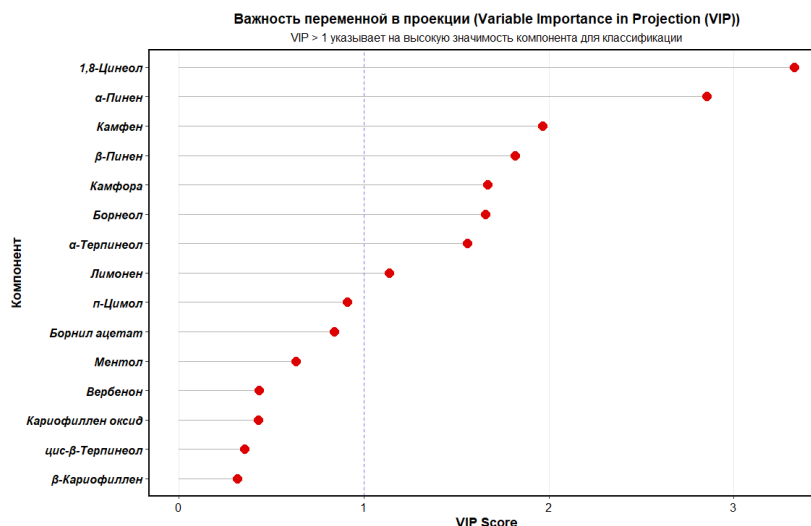


Рисунок 18 – Важность переменной в проекции для исследуемых эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения. Рисунок подготовлен автором

На основании проведенного хеометрического анализа были отобраны важнейшие компоненты хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения: 1,8-цинеол, α -пинен, камфен, β -пинен, камфора, борнеол, α -терпинеол и лимонен. Дополнительно были включены линалоол, β -мирцен и вербенон, поскольку они являются регламентированными в действующем стандарте ISO 1342:2012 на эфирное масло розмарина лекарственного.

В таблицах 20 и 21 описано формулирование хроматографических профилей эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения, в соответствии с требованиями ISO.

Таблица 20 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения, локализованного на территории Южного берега Крыма, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации
α -пинен	21,79	2,91	16,09	27,50	(15,0...28,0) %
1,8-цинеол	21,73	4,06	13,78	29,68	(13,0...31,0) %
камфора	18,47	1,47	15,59	21,35	(15,0...22,0) %
линалоол	0,88	0,29	0,70	1,05	(0,5...1,5) %
лимонен	4,37	0,60	4,03	4,71	(3,5...5,0) %
β -пинен	5,73	0,62	4,51	6,96	(4,0...7,5) %
камфен	9,02	0,73	7,58	10,46	(7,0...11,0) %
n-цимол	3,81	2,09	2,63	5,00	(2,5...5,5) %
борнеол	2,75	0,91	2,19	3,32	(1,5...3,5) %

β -мирцен	0,68	0,60	0	1,86	Не более 2,0 %
α -терпинеол	0,97	0,98	0	2,89	Не более 3,0 %
борнил ацетат	1,61	0,49	1,32	1,90	(1,0...2,5) %
вербенон	0,17	0,09	0	0,35	Не более 0,5 %

Таблица 21 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения, локализованного на территории Степного Крыма, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации
α -пинен	8,32	1,87	4,66	11,98	4,0...12,5 %
1,8-цинеол	44,19	2,75	38,80	49,57	38,0...50,0 %
камфора	13,80	1,39	11,08	16,52	10,5...17,0 %
линалоол	0,78	0,37	0,50	1,05	Не более 1,5 %
лимонен	2,63	0,46	2,31	2,96	2,0...3,5 %
β -пинен	0,33	0,20	0	0,73	Не более 1,0 %
камфен	2,55	0,56	1,45	3,64	10,0...17,0 %
<i>n</i> -цимол	2,24	0,21	2,09	2,38	1,5...2,5 %
борнеол	8,27	2,24	6,72	9,82	6,5...10,0 %
β -мирцен	1,07	0,08	0,91	1,22	0,5...1,5 %
α -терпинеол	4,49	0,41	3,67	5,30	3,0...5,5 %
борнил ацетат	0,67	0,44	0,37	0,98	Не более 1,5 %
вербенон	0,01	0,02	0	0,05	Не более 0,1 %

Сравнительная характеристика разработанных хроматографических профилей эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения в сравнении с хроматографическими профилями ISO 1342:2012 представлена в таблице 22.

Таблица 22 – 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 %

Разработанные хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения (таблица 22) очень близки к

регламентированным хроматографическим профилям в ISO 1342:2012. Строго говоря, хроматографический профиль эфирного масла испанского вида розмарина лекарственного и эфирного масла розмарина с Южного берега Крыма описывает один хемотип – камфорный. В свою очередь, хроматографический профиль масла тунисского/марокканского вида и эфирного масла с территории Степного Крыма описывает цинеольный хемотип эфирного масла розмарина.

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. Другими важными отличиями являются более высокое содержание β -пинена и *n*-цимола, отмечено меньшее содержание β -мирцена и α -терпинеола. Примечательно намного более низкое содержание вербенона: для эфирного масла розмарина, локализованного на территории Южного берега Крыма, допустимое содержание вербенона составляет не более 0,5 %. Диапазоны концентраций остальных компонентов сопоставимы с регламентированными в ISO 1342:2012 для эфирного масла розмарина лекарственного испанского типа.

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного, локализованного на территории Степного Крыма, выделяется меньшим содержанием α -пинена (4,0...12,5) % в сравнении с эфирным маслом тунисского/марокканского типа по ISO 1342:2012 (9,0...14,0) %. Примечателен также более узкий допустимый диапазон концентраций камфоры (10,5...17,0) % при сравнении с регламентируемым (5,0...15,0) %. Диапазон концентраций же главного компонента профиля – 1,8-цинеола (38,0...50,0) % сопоставим с регламентируемым в ISO – (38,0...55,0) %. К другим значимым отличиям следует отнести более высокий допустимый диапазон содержания камфена (10,0...17,0) % абсолютно нехарактерный для регламентируемого хроматографического профиля (2,5...6,0) %. Следует отметить также более высокое содержание борнеола (6,5...10,0) % в сравнении с регламентируемым (1,0...5,0) %.

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

Хроматографические профили эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения закреплены в проекте ГОСТ, представленном в приложении В (приложение В.1).

3.1.4. Хроматографическое профилирование эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения

На основании проведенного хеометрического анализа (раздел 3.1.1) можно однозначно утверждать о наличии специфического хроматографического профиля у эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения, локализованного на территории Республики Дагестан. Однако для хроматографического профилирования эфирного масла этой локализации необходимо детальное рассмотрение его компонентного состава и установление границ его вариабельности.

В общей выборке анализируемых образцов эфирного масла розмарина лекарственного 4 образца получены лабораторно из растений, локализованных на территории Республики Дагестан. Для получения эфирного масла использовались образцы розмарина лекарственного, заготовленные в период с марта 2024 года по февраль 2025 года.

Анализ образцов, заготовленных в разные периоды года, позволяет оценить сезонную вариабельность компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного, что, в свою очередь, позволяет провести профилирование при малом количестве образцов.

Значения климатических параметров и содержание (выход) эфирного масла представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Значения климатических параметров и содержания эфирного масла

Показатель	Дата заготовки образцов			
	Март 2024	Май 2024	Ноябрь 2024	Февраль 2025
Средняя температура, °C	+6,7	+16,0	+8,3	-0,4
Относительная влажность, %	82,6	72,8	77,7	79,3
Содержание эфирного масла, мл/г	2,06±0,07	2,36±0,07	2,20±0,06	2,24±0,07

Содержание эфирного масла в испытуемых образцах составило от 2,06 до 2,36 %. Наибольший выход эфирного масла был зарегистрирован в мае 2024 года, в месяце с наибольшей наблюдаемой температурой (+16,0 °C) и наименьшей относительной влажностью – 72,8 % (таблица 23). Проведенный дисперсионный анализ (*ANOVA*, *Tukey HSD*) не выявил статистически значимых отличий в содержании эфирного масла в сырье между различными датами сбора, что позволяет утверждать о постоянстве содержания эфирного масла в течение года. Результаты идентификации и определения методом газовой хроматографии основных компонентов эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Результаты идентификации и определения основных компонентов эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения

Компонент	LRI ₁	LRI ²	Дата сбора образца розмарина			
			22.03.2024	25.05.2024	09.11.2024	16.02.2025
			Концентрации компонентов, %			
<i>α</i> -туйен	929	1035	0,145±0,001	0,255±0,009	0,144±0,014	0,126±0,004
<i>α</i>-пинен	939	1029	44,209±0,548	47,514±1,490	40,929±1,404	42,347±0,806
камфен	955	1085	3,083±0,071	3,377±0,084	2,741±0,068	2,890±0,064
туйа-2,4(10)-диен	957	1132	0,649±0,030	0,715±0,008	0,642±0,011	0,656±0,033
<i>β</i>-пинен	979	1143	1,474±0,039	1,879±0,069	0,967±0,086	0,957±0,072
<i>β</i>-мирцен	988	1169	3,430±0,153	3,927±0,077	3,374±0,036	3,094±0,046
<i>α</i> -фелландрен	1012	1182	0,306±0,014	0,472±0,006	0,352±0,006	0,279±0,012
<i>α</i> -терпинен	1019	1198	0,683±0,032	0,807±0,016	0,681±0,013	0,574±0,024
<i>п</i>-цимол	1020	1289	1,618±0,088	0,915±0,05	1,359±0,129	1,694±0,015
лимонен	1024	1217	4,332±0,217	4,030±0,050	4,043±0,112	3,970±0,097
1,8-цинеол	1027	1232	8,398±0,243	9,060±0,076	8,714±0,195	8,932±0,340
<i>γ</i> -терпинен	1059	1262	1,238±0,044	1,796±0,047	1,286±0,061	0,901±0,038
терпинолен	1090	1303	1,070±0,041	1,157±0,026	1,075±0,021	0,753±0,023
линалоол	1098	1558	1,829±0,084	1,651±0,022	2,030±0,044	1,855±0,082
<i>α</i> -камфоленаль	1123	1503	0,031±0,003	0,146±0,010	0,231±0,013	0,284±0,044
хризантенон	1127	1513	0,218±0,016	0,072±0,003	0,108±0,013	0,130±0,006
<i>цис-β</i> -терпинеол	1145	1646	0,085±0,010	сл.	0,081±0,006	0,090±0,003
камфора	1149	1550	3,764±0,129	3,706±0,147	4,393±0,144	4,055±0,144
<i>транс</i> -пинокамфон	1163	1620	0,183±0,010	0,203±0,008	0,075±0,010	0,080±0,005
пинокарвон	1164	1567	0,221±0,010	0,148±0,004	0,225±0,026	0,281±0,015
борнеол	1174	1728	1,700±0,0420	0,636±0,050	1,021±0,112	1,125±0,057
ментол	1175	1657	0,807±0,054	0,535±0,020	0,558±0,012	0,559±0,021
терпинен-4-ол	1180	1623	1,707±0,054	0,795±0,036	1,080±0,046	1,056±0,036
<i>α</i>-терпинеол	1192	1717	1,692±0,046	1,284±0,050	1,839±0,110	1,849±0,089
дигидрокарвеол	1197	1703	0,656±0,015	0,387±0,029	0,626±0,031	0,592±0,034
вербенон	1210	1720	9,967±1,648	9,484±1,184	15,919±0,452	15,323±0,345
карвон	1244	1735	0,317±0,01	0,173±0,013	0,266±0,021	0,282±0,023
линалил ацетат	1252	1571	0,794±0,021	0,191±0,013	0,956±0,060	0,911±0,062
борнил ацетат	1289	1596	2,319±0,109	2,160±0,033	1,664±0,049	1,792±0,130
<i>β</i> -кариофиллен	1423	1626	0,392±0,032	0,307±0,010	0,175±0,011	0,147±0,014
Монотерпены			63,139±2,143	69,129±3,139	54,730±2,503	59,160±1,131
Монотерпеноиды			32,178±2,431	28,666±2,629	42,305±2,200	38,340±1,095
Сесквитерпены			0,453±0,055	0,292±0,0170	0,192±0,0190	0,153±0,014
Сумма			95,77±0,605	98,087±0,497	97,227±0,292	97,653±0,060
Примечания:						
Компоненты представлены в порядке элюирования на колонке HP-5MS UI. Содержание мажоритарных компонентов выделено полужирным шрифтом. сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %); LRI ¹ – Линейные индексы удерживания, полученные на колонке с неполярной НЖФ; LRI ² – Справочные линейные индексы удерживания для колонки с полярной НЖФ. Концентрации компонентов представлены в виде средних и их стандартных отклонений (X±SD)						

В результате анализа было идентифицировано 30 соединений, составляющих не менее 95 % от общего хроматографического профиля эфирного масла (таблица 24). Наибольшее содержание в каждом из исследуемых эфирных масел отмечено для *α*-пинена (от 40,93 % до 47,51 %). При рассмотрении компонентного состава следует отметить высокое содержание вербенона (от 9,48 % до 15,32 %). Наличие *α*-пинена и вербенона в указанных диапазонах концентраций позволяет однозначно отнести рассматриваемое эфирное масло к вербеноновому хемотипу. Для указанного хемотипа характерно

пониженное содержание 1,8-цинеола (от 8,40 % до 9,06 %) и камфоры (от 3,71 % до 4,39 %) в сравнении с хроматографическими профилями эфирных масел, представленными в ISO 1342:2012. Содержание камфена (от 2,74 % до 3,38 %) и *n*-цимола (от 0,91 % до 1,69 %) соответствует требованиям ISO к тунисскому/марокканскому виду эфирного масла розмарина, содержание β -мирцена (от 3,09 % до 3,93 %), лимонена (от 3,97 % до 4,33 %), линалоола (от 1,65 % до 2,03 %), терпинен-4-ола (от 0,79 % до 1,71 %), α -терпинеола (от 1,28 % до 1,85 %), борнил ацетата (от 1,66 % до 2,32 %) – к испанскому виду, содержание борнеола (от 0,64 % до 1,70 %) находится в допустимых пределах для каждого из регламентированных видов масел.

Для оценки динамики изменения концентрации основных компонентов эфирного масла был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого представлены на рисунке 19.

Наибольшую стабильность в течение года среди компонентов эфирного масла демонстрируют 1,8-цинеол и лимонен (рисунок 19). В результате дисперсионного анализа не выявлено статистически значимых отличий между содержанием этих компонентов в эфирном масле в каждой экспериментальной точке. Для содержания линалоола установлено значимое отличие между содержанием в мае 2024 ($1,65 \pm 0,10$) % и ноябре 2024 ($2,03 \pm 0,19$) %.

Значимые отличия в содержании отмечены для главного компонента эфирного масла: α -пинена, между маем 2024 ($47,514 \pm 1,490$) %, ноябрем 2024 ($40,929 \pm 1,404$) % и февралем 2025 ($42,347 \pm 0,806$) %. В идентичных точках отмечены значимые отличия также и для камфоры: май 2024 - ноябрь 2024 ($3,706 \pm 0,147$ против $4,393 \pm 0,144$) %, май 2024 - февраль 2025 ($3,706 \pm 0,147$ против $4,055 \pm 0,144$) %.

Большое отличие в содержании отмечено для вербенона: для образцов, полученных из сырья, собранного в марте и мае ($9,967 \pm 1,648$) % и ($9,484 \pm 1,184$) % соответственно) против сырья ноябрьской и февральской заготовки ($15,919 \pm 0,452$) % и ($15,323 \pm 0,345$) % соответственно). Подобная динамика концентраций может свидетельствовать, например, о сезонных особенностях его накопления в растительном сырье. Тем не менее, в рамках данного исследования можно заключить о наличии значимого отличия в содержании между рассматриваемыми периодами.

Похожая динамика характерна для терпинен-4-ола: наименьшие значения содержания соответствуют периоду заготовки с марта 2024 по май 2024, а наибольшие – с ноября 2024 по февраль 2025. Обратная динамика наблюдается для борнилацетата и камфена – наибольшие значения содержания соответствуют периоду заготовки с марта 2024 по май 2024.

Борнеол и *n*-цимол демонстрируют схожую между собой динамику: наибольшее значение содержания характерно для мартовского периода заготовки, но в мае 2024 уже наблюдается наименьшее значение концентрации с последующим накоплением каждого из компонентов. Содержание α -терпинеола изменяется схожим образом, но с максимумом содержания в ноябре 2024.

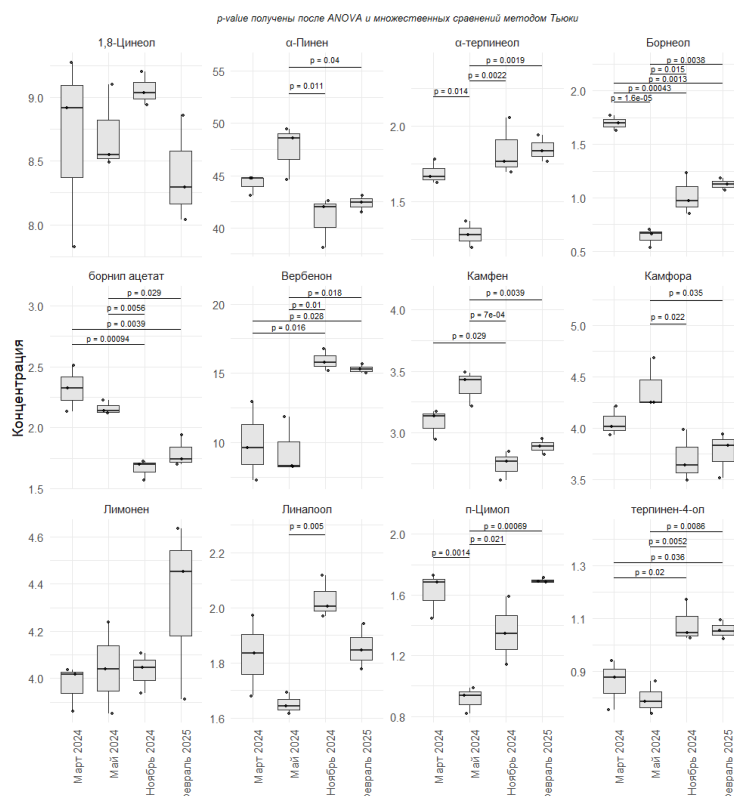


Рисунок 19 – Оценка динамики изменения содержания основных компонентов эфирного масла розмарина лекарственного. Значения *p*-value получены после проведения ANOVA и множественных сравнений методом Тьюки (*Tukey HSD*). Рисунок подготовлен автором

В результате проведенного дисперсионного анализа (one-way ANOVA с последующим *Tukey HSD*) установлено наличие статистически значимых изменений концентраций для каждого из компонентов эфирного масла, за исключением 1,8-цинеола и лимонена. Полученные результаты позволяют произвести оценку степени сезонной вариабельности компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения, что в свою очередь, необходимо для формулирования его хроматографического профиля.

Для формулирования хроматографического профиля эфирного масла розмарина дагестанского происхождения были взяты аналогичные характерные компоненты эфирному маслу крымского происхождения и регламентированные в ISO 1342:2012. В таблице 25 описано формулирование хроматографического профиля эфирного масла

розмарина лекарственного дагестанского происхождения, в соответствии с требованиями ISO.

Таблица 25 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения, локализованного на территории Республики Дагестан, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации
α -пинен	43,75	2,84	38,18	49,32	(37,0...50,0) %
1,8-цинеол	8,78	0,29	8,21	9,34	(7,5...10,0) %
камфора	3,98	0,31	3,36	4,60	(3,0...5,0) %
линалоол	1,84	0,16	1,69	2,00	(1,5...2,5) %
лимонен	4,09	0,16	3,93	4,25	(3,5...4,5) %
β -пинен	1,32	0,44	0,89	1,75	(0,5...2,0) %
камфен	3,02	0,28	2,48	3,56	(2,0...4,0) %
<i>n</i> -цимол	1,30	0,36	0,59	2,00	(0,5...2,5) %
борнеол	1,12	0,44	0,26	1,98	(0,1...2,5) %
β -мирцен	3,455	0,35	3,11	3,80	(2,5...4,5) %
α -терпинен	1,665	0,27	1,40	1,93	(1,0...2,5) %
борнил ацетат	1,98	0,31	1,38	2,59	(1,0...3,0) %
вербенон	12,67	3,42	5,97	19,37	(5,0...20,0) %

Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения характеризуется преобладанием двух основных компонентов в своем составе – α -пинена (37,0...50,0) % и вербенона (5,0...20,0) %. Так же следует отметить низкие диапазоны концентраций основных компонентов, регламентированных ISO хроматографических профилей: 1,8-цинеола (7,5...10,0) % и камфоры (3,0...5,0).

Данные особенности однозначно отличают компонентный состав эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения от компонентного состава эфирного масла крымского происхождения и от регламентированных в ISO 1342:2012. Диапазоны концентраций остальных специфицированных компонентов соотносятся с указанными в ISO. В данном случае однозначно характерными компонентами, определяющими локацию эфирного масла, являются α -пинен, вербенон, 1,8-цинеол и камфора.

Строго говоря, сформулированный хроматографический профиль эфирного масла дагестанского происхождения указывает на вербеновый хемотип эфирного масла розмарина лекарственного.

Ключевой недостаток сформулированного хроматографического профиля – недостаточность выборки. Хроматографический профиль сформулирован на основании анализа 4 лабораторно полученных образцов эфирного масла розмарина лекарственного, локализованного в окрестностях города Махачкала. С учетом недостаточного количества образцов в выборке сформулированный хроматографический профиль носит характер предварительного.

3.2. Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного

3.2.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла шалфея мускатного

Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного проводилось на основании анализа 42 образцов, из которых 40 образцов являются коммерчески доступными (таблица 15), а 2 образца получены лабораторно (таблица 16). Перед составлением хроматографического профиля было отбраковано 8 образцов эфирного масла. Эфирные масла № 59, 91 и 94 (таблица 15) были исключены ввиду отсутствия информации о регионе происхождения эфирного масла, в образцах № 90, № 95 и 96 были обнаружены разбавители: диэтилфталат (№ 90 и № 95) и изопропилмиристат (№ 96), соответственно. Компонентный состав образца № 70 является нетипичным для эфирного масла шалфея мускатного и эфирных масел его близкородственных растений, а компонентный состав образца № 84 позволяет идентифицировать его как эфирное масло шалфея лекарственного.

Итоговая выборка составила 34 образца из 5 стран: Российская Федерация – 21 образец, Марокко – 5 образцов, Испания – 4 образца, Франция – 4 образца и Греция – 1 образец. Карта распределения образцов представлена на рисунке 20.



Рисунок 20 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла шалфея мускатного. Рисунок подготовлен автором

Анализируемые образцы французского происхождения локализованы на территории 2 регионов – Окситании и острова Корсики, испанского – на территории 3 регионов – Мурсия, Андалусия, Кастилия-ла-Манча, и марокканского – на территории 3 регионов – Касабланка-Сеттат, Фес-Мекнес, Бени-Меллаль-Хенифра. Эфирное масла греческого происхождения локализовано в регионе Ираклион (о. Крит). Следует отметить, что все 18 российских образцов эфирного масла шалфея мускатного локализованы на территории

Республики Крым (рисунок 21), что коррелирует с описанными ареалами обитания растения.

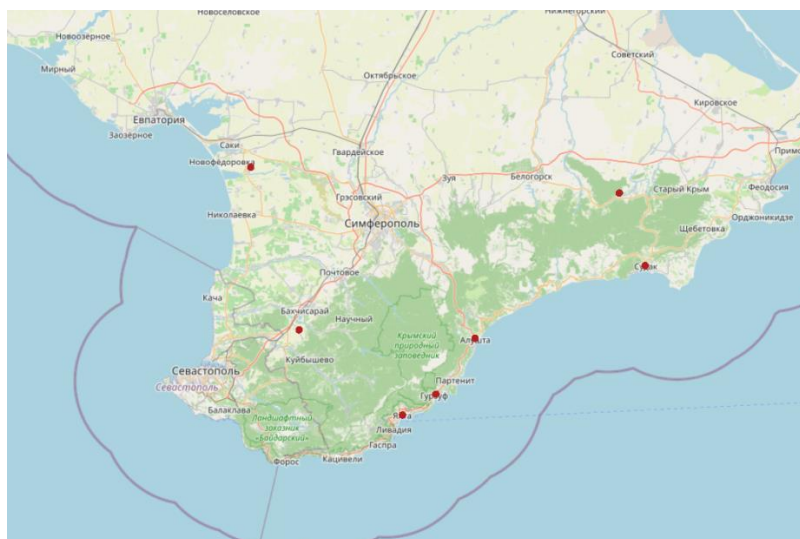


Рисунок 21 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Среди 21 образца крымского происхождения (рисунок 21) 13 образцов локализованы на территории Южного берега Крыма: г. Алушта, пгт. Гурзуф, муниципальный округ Ялта, г. Судак; 2 образца локализованы в Белогорском районе и 6 образцов в Бахчисарайском районе.

3.2.2. Хемометрический анализ данных

Для установления близости компонентных составов исследуемых образцов эфирных масел без учета региона их происхождения был применен иерархический кластерный анализ (НСА), дендрограмма исследуемых образцов представлена на рисунке 22.

На полученной дендрограмме (рисунок 22) наблюдается четкая дифференциация всей выборки на 3 больших смешанных кластера и единичный кластер (образец № 97). Основные кластеры выделены цветом: первый – красный; второй – голубой; третий – фиолетовый и единичный кластер – зеленый.

При детальном анализе топологии данной структуры очевидна слабая роль географической кластеризации. Образцы из территориально удаленных регионов демонстрируют высокую степень близости и объединяются в общие группы. Первый кластер группирует 13 образцов из России, 1 из Франции, Марокко и Испании. Второй кластер группирует 6 образцов из России, 3 из Марокко, 2 из Испании, 1 из Франции и Греции. В третьем кластере представлено по одному образцу из Франции, Испании, Марокко и России.

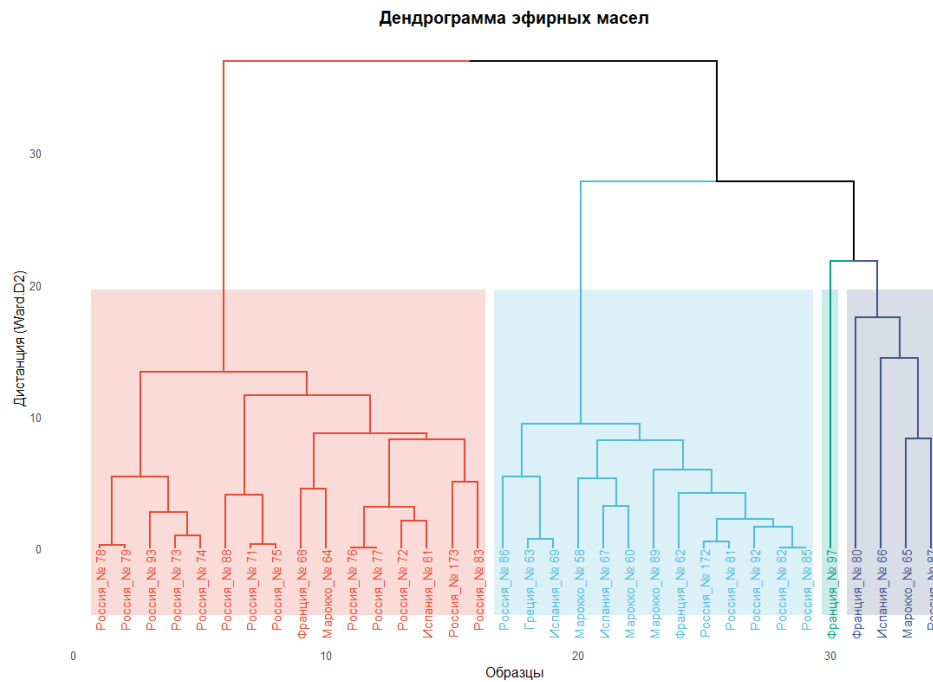


Рисунок 22 – Дендрограмма исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного.

Рисунок подготовлен автором

На представленной дендрограмме можно отметить асимметрию распределения образцов – первый кластер состоит более чем на 80 % из образцов российского происхождения, доля образцов российского происхождения во втором и третьем кластерах составляет 50 % и 25 %, соответственно. Подобный характер распределения может свидетельствовать о том, что исследуемые эфирные масла в совокупности характеризуются близким компонентным составом. Однако, несмотря на превалирование образцов российского происхождения над остальными, асимметричный характер распределения может указывать на наличие ряда особенностей компонентного состава эфирных масел российского происхождения.

Для подтверждения гипотезы о наличии географической вариабельности компонентного состава эфирных масел шалфея мускатного был проведен анализ методом главных компонент (PCA). График оценок PCA представлен на рисунке 23.

В модели PCA (рисунок 23) две главные компоненты объясняют 66,3 % общей дисперсии данных, что позволяет судить о надежности полученной проекции. График оценок PCA исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного свидетельствует об отсутствии тенденции к группировке образцов в зависимости от региона произрастания сырья – эфирные масла сформировали единый кластер в центральной части графика при взаимном перекрывании доверительных областей.

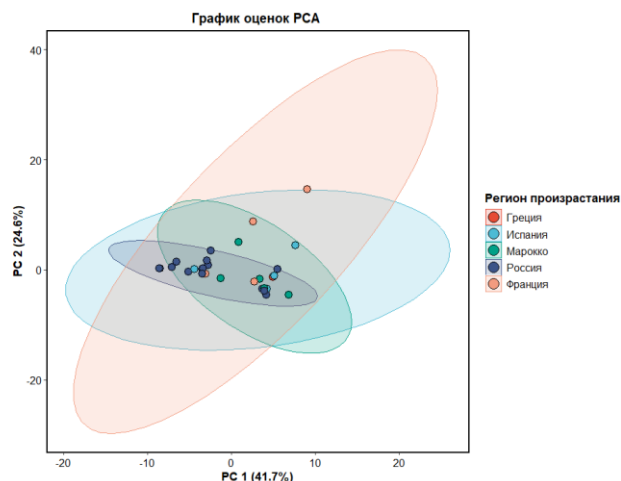


Рисунок 23 – График оценок PCA исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного. Рисунок подготовлен автором

Для эфирного масла греческого происхождения доверительная область построена не была ввиду малого количества образцов в выборке. Большая доверительная область образцов французского происхождения однозначно объясняется высокой внутригрупповой дисперсией. Несмотря на наличие взаимного перекрывания областей, следует отметить, что доверительная область для эфирных масел российского происхождения лишь частично перекрывается с доверительными областями эфирных масел марокканского и французского происхождения. Подобное явление также позволяет судить о наличии особенностей компонентного состава эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения.

Для подтверждения гипотезы о наличии географически выраженной вариабельности компонентного состава была проведена PLS дискриминация (PLS-DA, метод регрессии частных наименьших квадратов). График оценок PLS-DA представлен на рисунке 24.

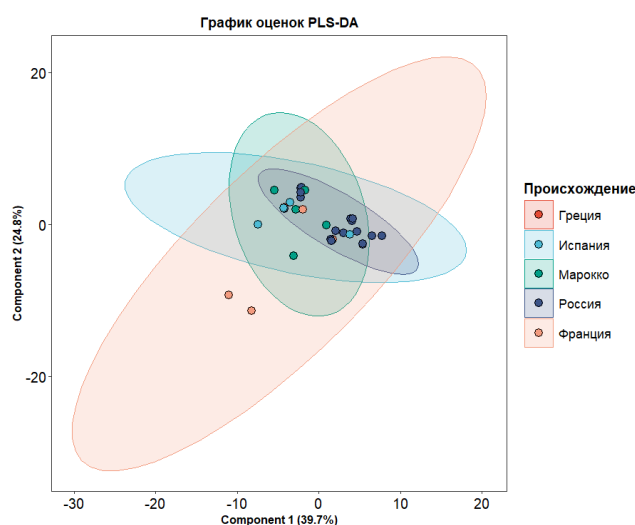


Рисунок 24 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного. Рисунок подготовлен автором

На графике оценок PLS-DA (рисунок 24) доверительные области образцов эфирных масел также перекрываются, что свидетельствует о незначительном влиянии географического фактора вариабельности на компонентный состав исследуемых эфирных масел. В данном случае также присутствует частичное перекрывание доверительных областей эфирных масел российского, марокканского и французского происхождений. Таким образом, очевидно, что для эфирного масла шалфея мускатного в целом не выражена географическая вариабельность компонентного состава.

Отсутствие четко выраженной географической вариабельности не позволяет провести географическую дифференциацию хроматографического профиля. Ввиду лишь частичного перекрывания доверительных областей для эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения возможно наличие ряда особенностей компонентного состава, уточнение которых позволит установить его хроматографический профиль.

3.2.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения

Для установления региональных особенностей компонентного состава эфирного масла шалфея мускатного был проведен повторный хеометрический анализ. В выборку были включены только образцы российского происхождения. С учетом того, что все образцы российского происхождения локализованы на территории Республики Крым, они были разделены на две зоны произрастания: Южный берег Крыма и Степной Крым, в зависимости от их происхождения (рисунок 21). На рисунке 25 представлен график оценок PLS-DA исследуемых эфирных масел шалфея мускатного крымского происхождения.

Общий процент объясненной дисперсии на графике оценок PLS-DA составляет 73,3 %, что свидетельствует о высокой надежности проекции. При рассмотрении структуры каждого из кластеров выраженная пространственная дискриминация отсутствует. Доверительные области образцов различного происхождения значительно перекрываются, при этом все образцы, локализованные на территории Южного берега Крыма, входят в доверительную область образцов, локализованных на территории Степного Крыма. Из всего набора образцов только три не входят в область взаимного перекрывания доверительных областей.

С учетом результатов хеометрической обработки проведение дифференциации образцов крымского происхождения на основании их региона произрастания на территории Республики Крым является нерациональным. Наиболее комплексный подход, в данном случае, создание единого хроматографического профиля, специфичного ко всем образцам крымского происхождения.

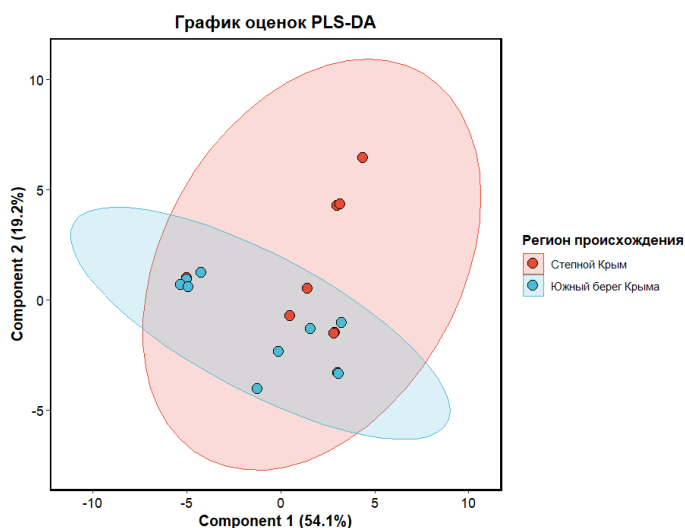


Рисунок 25 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Для оценки вклада каждого компонента в возможную географическую классификацию построен график важности переменной в проекции (Variable Importance in Projection, VIP), представленный на рисунке 26.

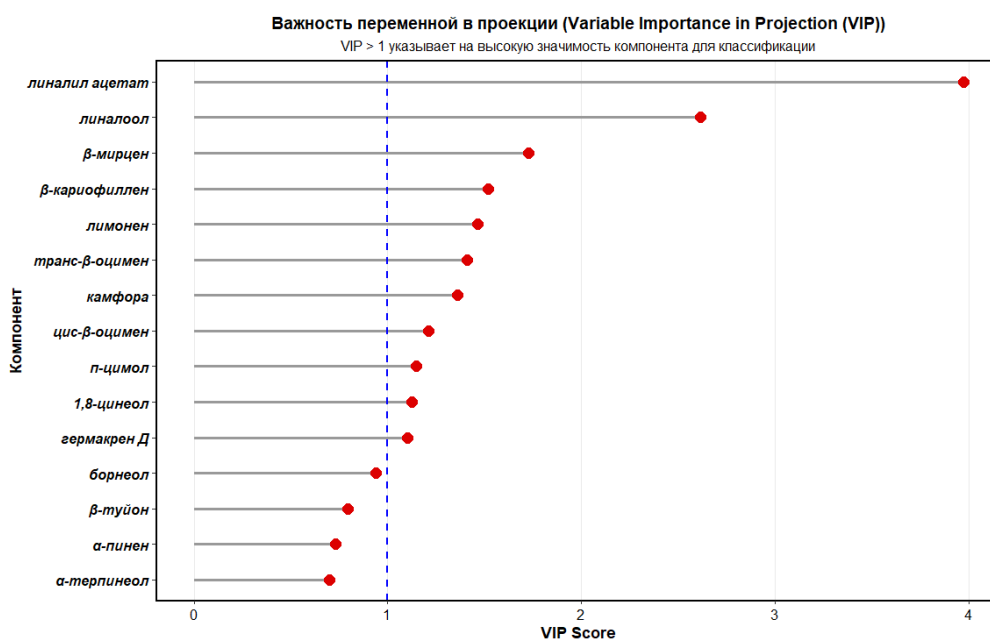


Рисунок 26 – Важность переменной в проекции для исследуемых эфирных масел шалфея мускатного. Рисунок подготовлен автором

График важности переменной в проекции (рисунок 26) позволяет оценить значимость компонентов для географической дифференциации. Поскольку, гипотеза о наличии выраженной географической вариабельности была опровергнута, он может быть полезен при попытке уточнения хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения. Суммарно высокая значимость отмечена для 11 компонентов эфирного масла, хотя в действующих стандартах ISO и монографии Ph.Eur 11 специфированы лишь 6 компонентов. Наибольшую важность с точки зрения

географической классификации представляют два основных компонента эфирного масла: линалил ацетат и линалоол. Другими важнейшими с точки зрения влияния на географическую классификацию являются β -мирцен, β -кариофиллен, лимонен, транс- β -оцимен, камфора, *n*-цимол, 1,8-цинеол и гермакрен Д. Примечательна низкая важность для географической классификации характерного для эфирного масла шалфея мускатного компонента склареола.

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. Выбор осуществлялся на основании данных проведенного PLS-DA анализа и значимости каждого из компонентов для географической классификации. Дополнительно в хроматографический профиль были включены α -терпинеол, склареол и гермакрен Д. Данные компоненты имеют меньшую значимость для географической классификации, но являются характерными и необходимыми для подтверждения идентичности эфирного масла. Компоненты, необходимые для однозначной идентификации исследуемого эфирного масла, от эфирных 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.

В таблице 26 представлено формулирование хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения в соответствии с требованиями ISO.

Сравнительная характеристика разработанного хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения в сравнении с регламентированными хроматографическими профилями представлена в таблице 26.

Таблица 26 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации, %
Линалил ацетат	44,21	13,87	17,03	71,38	(16,0...71,5)
Линалоол	18,85	4,12	10,78	26,92	(10,0...27,5)
β -Мирцен	6,78	5,80	0	18,16	(0...18,5)
транс- β -Оцимен	4,43	3,58	0	11,45	(0...12,0)
Лимонен	2,90	2,41	0	7,62	(0...8,0)
Гермакрен Д	2,40	1,69	0	5,71	(0...6,0)
α -Терпинеол	2,00	0,92	0,20	3,80	(0...4,0)
β -Кариофиллен	1,69	0,55	0,61	2,78	(0,5...3,0)
Склареол	0,26	0,09	0,08	0,45	(0...0,5)

Таблица 27 – 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	ISO 24255:2025, 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.

Важной характеристикой разработанного хроматографического профиля являются диапазоны концентраций основного компонента линалил ацетата. Для эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения характерен значительно более широкий диапазон концентраций линалил ацетата (от 28,0 % до 67,0 %) в сравнении с утвержденными хроматографическими профилями. В данном случае в разработанном хроматографическом профиле верхняя граница концентрации линалил ацетата близка к регламентируемым, однако, нижняя граница, достаточно меньше регламентированных пределов. Подобный характер диапазона концентраций коррелирует с результатами кластерного анализа (рисунок 22), где отмечена асимметрия распределения при кластеризации, и PLS-DA анализа (рисунок 24), где отмечено лишь частичное перекрывание доверительных областей эфирных масел российского, марокканского и французского происхождений.

Диапазоны концентраций линалоола (от 13,5 % до 26,0 %), α -терпинеола (от 0,4 % до 4,0 %), и гермакрена Д (от 1,0 % до 7,0 %) в целом сопоставимы с регламентируемыми для эфирного масла шалфея мускатного типа 2 по ISO 24255:2025. Отличия в диапазонах концентраций обусловлены спецификой компонентного состава эфирных масел шалфея мускатного российского происхождения. Отмечен более узкий диапазон концентраций для характерного дитерпенового спирта склареола – характерного компонента хроматографического профиля – до 0,5 %.

На основании результатов хеометрического анализа в хроматографический профиль включены β -мирцен (от 0,5 % до 16,0 %), транс- β -оцимен (от 0,5 до 10 %), β -кариофиллен (от 0,4 до 3,5 %), лимонен (от 0,2 до 6,5 %) из-за высокой значимости для географической классификации эфирного масла шалфея мускатного.

Наличие 9 компонентов в хроматографическом профиле с определенными диапазонами концентрации позволяет рассматривать разработанный хроматографический профиль как достаточно специфичный. По этой причине в разработанном хроматографическом профиле не нормируется содержание α - и β -туйона аналогично регламентированным профилям в ISO 24255:2025.

Хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения составлен с учетом особенностей компонентного состава эфирных масел российского происхождения, что однозначно увеличивает специфичность идентификации при его использовании.

Хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения закреплён в проекте ГОСТ, представленном в приложении В (приложение В.2).

3.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла чабера горного

3.3.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла чабера горного

Хроматографическое профилирование эфирного масла чабера горного проводилось на основании анализа 32 образцов, из которых 7 образцов являются коммерчески доступными (таблица 15), а 25 образцов получены лабораторно (таблица 16). Перед проведением анализа данных 2 образца были исключены из общей выборки. Эфирное масло № 51 (таблица 15) было исключено ввиду того, что оно является эфирным маслом близкородственного растения – чабера садового. Эфирные масла № 147 и № 130 (таблица 16) были исключены, поскольку используемое растительное сырьё было идентифицировано как чабер садовый.

Итоговая выборка 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. Карта распределения образцов представлена на рисунке 27.



Рисунок 27 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла чабера горного. Рисунок подготовлен автором

Анализируемые образцы египетского происхождения локализованы на территории 5 регионов – Асьютская мухафаза, Бени-Суэйфская мухафаза, мухафазы Минья, Кина и Гиза; армянского происхождения – Араратская область; узбекского происхождения – Сурхадарьинская область; грузинского – район Самегрело-Верхняя Сванеттия; марокканского происхождения – провинция Фес-Мекнес; греческого происхождения – в регионе Ираклион (о. Крит). Все образцы Российского происхождения локализованы на территории Республики Крым, карта распределения образцов российского происхождения представлена на рисунке 28.



Рисунок 28 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла чабера горного российского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Среди 10 образцов Российского происхождения (рисунок 28) 4 образца локализованы на территории Южного берега Крыма: пгт. Гурзуф, с. Приветное; 4 образца локализованы в Белогорском районе и 2 в Нижнегорском районе.

3.3.2. Хемометрический анализ данных

Для установления близости компонентных составов исследуемых образцов эфирных масел без учета региона их происхождения был применен иерархический кластерный анализ (HCA), дендрограмма исследуемых образцов представлена на рисунке 29.

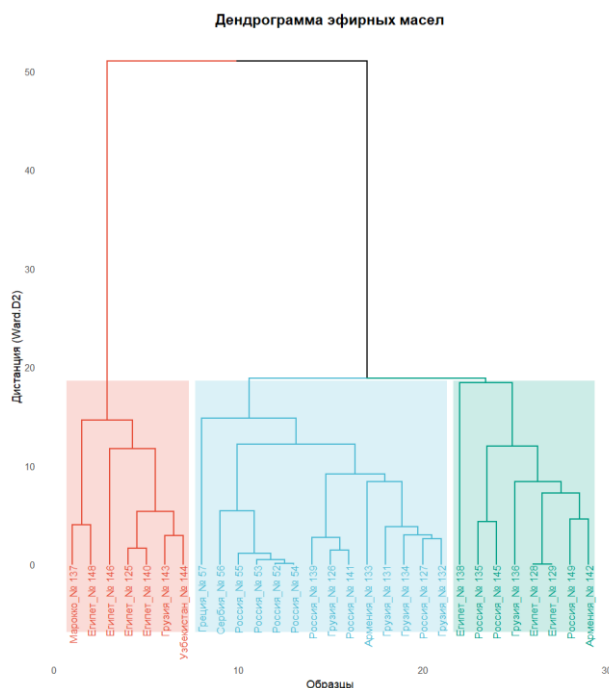


Рисунок 29 – Дендрограмма исследуемых образцов эфирного масла чабера горного.
Рисунок подготовлен автором

На полученной дендрограмме выделяется один наибольший смешанный кластер (выделен голубым) и 2 смешанных кластера меньшего размера (выделены красным и зеленым). С учетом смешанного характера всех представленных кластеров с включением в один кластер образцов различного происхождения влияние локации происхождения эфирного масла на топологию дендрограммы неочевидно. Топология дендрограммы позволяет также предположить большую вариабельность компонентного состава, что может объяснять как асимметричный характер распределения, так и исключительно смешанный характер кластеров. В общей структуре дендрограммы примечательно, что различия между вторым и третьим кластером являются несущественными в сравнении с различиями между первым и остальными кластерами, что видно при анализе расстояний между кластерами. Подобный характер распределения позволяет предположить наличие ряда важных особенностей компонентного состава у эфирных масел, составляющих первый кластер.

Первый кластер (выделен красным) группирует 7 образцов из 4 стран: 4 образца из Египта и по одному образцу из Марокко, Грузии и Узбекистана. В общей структуре данного кластера примечательно, образование подкластеров, состоящих из образцов различной локализации. Образцы египетского происхождения группируются в подкластеры с образцами марокканского, грузинского и узбекского происхождения. Ключевой особенностью компонентного состава, обособляющей эфирные масла данного кластера

является преобладание тимола в компонентном составе, тогда как у двух остальных кластеров основным компонентом является карвакрол.

Второй кластер (выделен голубым) группирует 14 образцов из 5 стран. В структуре этого кластера, наоборот, наблюдается тенденция к группировке образцов из близких регионов произрастания. Подобная тенденция наглядно видна при рассмотрении подкластера, состоящего из образцов российского (№ 139, № 141 и № 127), армянского (№ 133) и грузинского происхождений (№ 126, № 131, № 132 и № 134). Формирование подкластера из образцов, локализованных в соседних странах, может указывать как на наличие географических особенностей, присущих компонентному составу, так и на распространенность в данных областях определенного хемотипа.

Третий кластер (выделен зеленым) группирует внутри себя 8 образцов. В общей структуре этого кластера аналогично с первым кластером наблюдается тенденция к группировке образцов из отдаленных регионов произрастания. Следует отметить достаточную удаленность образцов из одной страны друг от друга, например, образец № 149 (Россия) и № 142 (Армения) образуют подкластер с образцами № 128 и № 129 египетского происхождения.

Таким образом, наличие географически обусловленной вариабельности для эфирного масла чабера горного неочевидно, поскольку наиболее весомые различия на дендрограмме обусловлены особенностями хемотипов. С другой стороны, при рассмотрении кластеров отмечена тенденция к образованию групп образцов, происходящих из соседних стран. Для подтверждения гипотезы о наличии географической вариабельности компонентного состава эфирных масел чабера горного был проведен анализ методом главных компонент (РСА). График оценок РСА представлен на рисунке 30.

В полученной модели РСА (рисунок 30) две главные компоненты объясняют 72,2 % общей дисперсии данных, что свидетельствует о высокой надежности проекции. Анализ графика оценок не позволяет подтвердить наличие однозначной пространственной кластеризации, поскольку большинство образцов различного происхождения группируются в центральной части графика, образуя таким образом наибольший кластер. Доверительные области для эфирных масел российского и египетского происхождения демонстрируют высокую степень взаимного перекрытия. Однако доверительная область эфирного масла египетского происхождения достаточно широкая, что может объясняться высокой дисперсией внутри группы эфирных масел, что, в свою очередь может быть вызвано распространением различных хемотипов. Несмотря на большую степень взаимного перекрытия доверительных областей египетского и российского эфирных масел

только 2 из 6 образцов египетского происхождения непосредственно попадают в доверительную область эфирного масла российского происхождения.

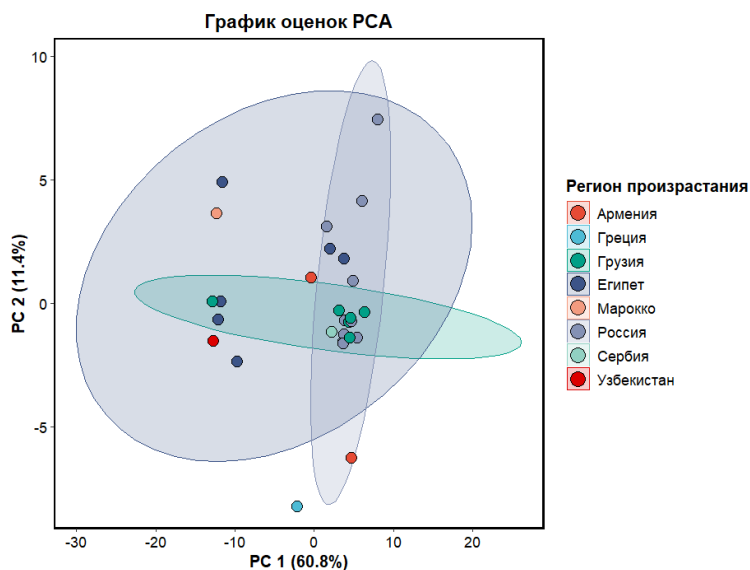


Рисунок 30 – График оценок PCA исследуемых образцов эфирного масла чабера горного.
Рисунок подготовлен автором

Для эфирных масел грузинского происхождения характерна достаточно узкая доверительная область, при этом следует отметить, что 5 из 6 образцов грузинского происхождения сгруппированы в центре графика и попадают в доверительные области эфирных масел как российского, так и египетского происхождения.

Значительные перекрытия доверительной области эфирного масла российского происхождения, их характер, а также характер расположения образцов на графике позволяет утверждать о наличии региональных особенностей компонентного состава эфирного масла чабера горного российского происхождения.

Образцы из остальных стран интегрированы в общий набор данных и сгруппированы в достаточной близости к центру графика, не образуя изолированных выбросов.

Для подтверждения гипотезы о наличии географически выраженной вариабельности компонентного состава была проведена PLS дискриминация (PLS-DA, метод регрессии частных наименьших квадратов). График оценок PLS-DA представлен на рисунке 31.

В результате проведенного PLS-DA анализа доверительные области на графике оценок PLS-DA (рисунок 31) и характер расположения образцов демонстрируют схожий характер с графиком оценок PCA (рисунок 30). Проведенный анализ свидетельствует об отсутствии четко выраженной пространственной дискриминации.

Следовательно, общий характер графиков оценок PCA и PLS-DA не позволяет подтвердить наличие выраженной вариабельности компонентного состава эфирного масла

чабера горного. В то же время графики оценок позволяют предположить наличие регионально обусловленных особенностей компонентного состава эфирных масел различного происхождения.

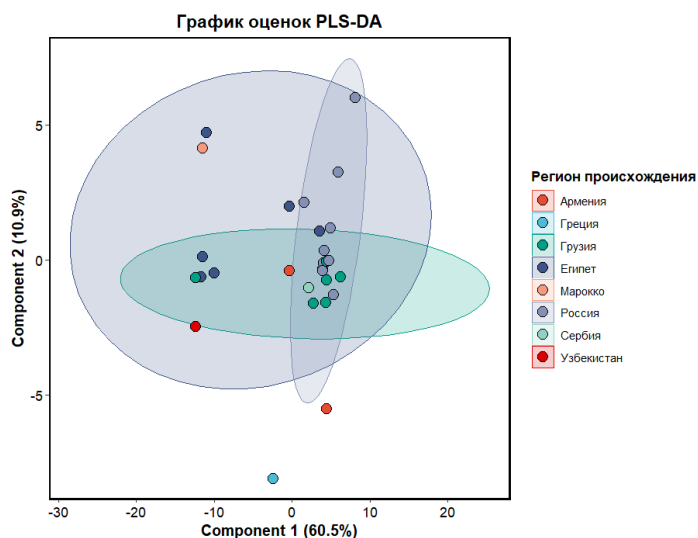


Рисунок 31 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла чабера горного. Рисунок подготовлен автором

Доверительная область образцов эфирных масел российского происхождения является достаточно узкой и вытянутой вдоль оси PC2. Подобный характер доверительной области, а также лишь частичное перекрывание доверительной области образцов грузинского и российского происхождения позволяет утверждать о наличии специфичного компонентного состава эфирного масла чабера горного российского происхождения.

3.3.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла чабера горного российского происхождения

Для выявления региональной специфичности образцов эфирных масел чабера горного крымского происхождения был проведен повторный хеометрический анализ. В выборку, используемую для анализа, были включены только образцы крымского происхождения. На основании данных географического происхождения (рисунок 28) все образцы были разделены на две зоны произрастания в зависимости от происхождения: Южный берег Крыма и Степной Крым. На рисунке 32 представлен график оценок PLS-DA исследуемых эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения.

График оценок PLS-DA (рисунок 32) свидетельствует об отсутствии четкой пространственной дискриминации между образцами крымского происхождения. Несмотря лишь на частичное перекрывание доверительных областей, следует отметить характер расположения образцов – все испытываемые образцы расположены в центральной части графика.

Четыре образца эфирного масла чабера горного, локализованные на территории Степного Крыма, расположены в достаточной близости к доверительной области эфирных масел, локализованных на территории Южного берега Крыма. В область взаимного перекрытия доверительных областей также не попадает один образец, локализованный на территории Южного берега Крыма.

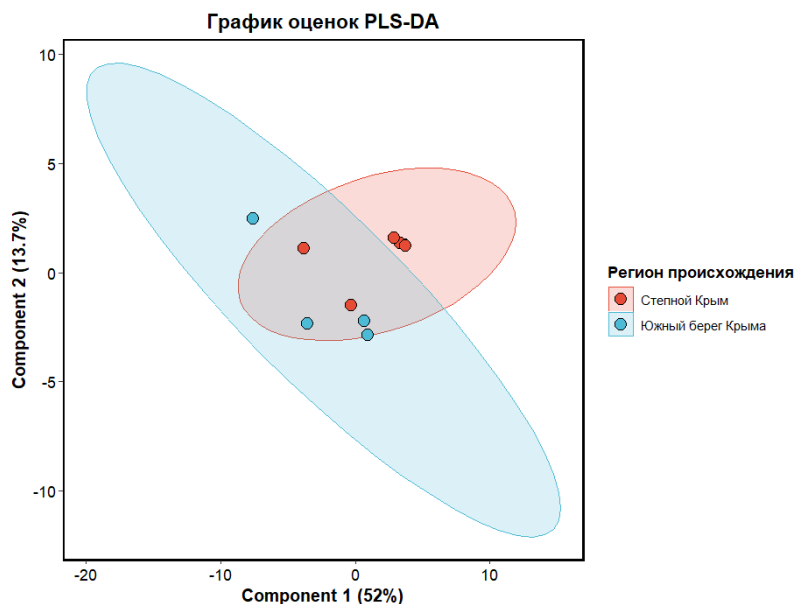


Рисунок 32 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла чабера горного крымского происхождения. Рисунок подготовлен автором

В результате проведенного анализа PLS-DA не обнаружено достаточное количество оснований для дополнительной дифференциации образцов внутри локализации на территории Республики Крым. Следовательно, для эфирного масла чабера горного крымского происхождения наиболее целесообразным будет формирование единого хроматографического профиля.

Для определения характерных компонентов хроматографического профиля эфирного масла чабера горного крымского происхождения был построен график важности переменной в проекции (Variable Importance in Projection, *VIP*), представленный на рисунке 33.

Наибольшую важность переменной в проекции для географической классификации эфирного масла чабера горного представляют производные терпинена: карвакрол, тимол, γ -терпинена и *n*-цимол. Высокая важность переменной в проекции также отмечена для β -кариофиллена. Внесение указанных компонентов в хроматографический профиль является обязательным, поскольку они являются основными компонентами эфирного масла чабера горного.

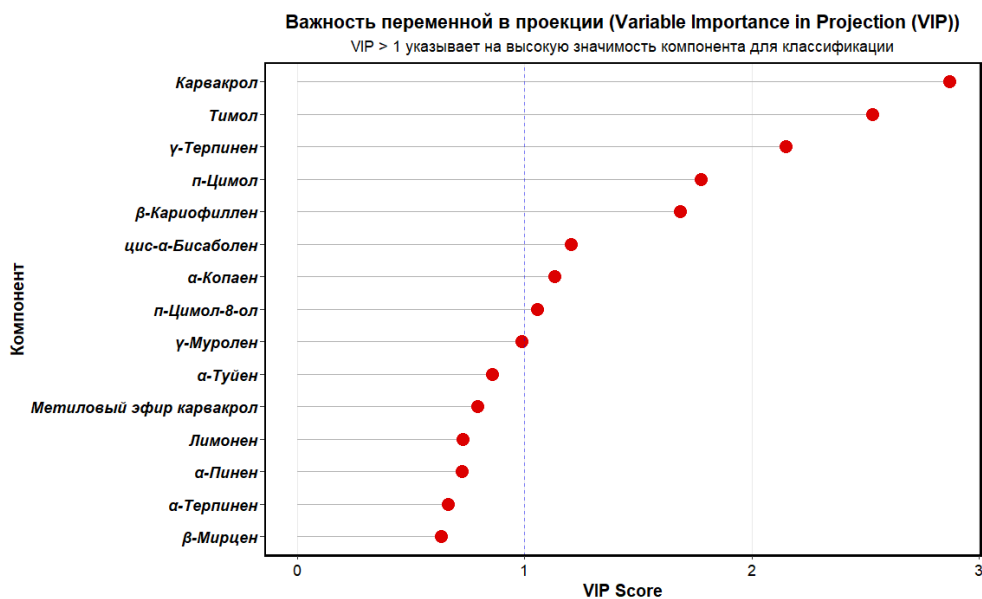


Рисунок 33 – Важность переменной в проекции для исследуемых эфирных масел чабера горного. Рисунок подготовлен автором

Эфирное масло чабера горного отличается достаточным разнообразием сесквитерпеновых соединений, однако, большинство из них, в том числе *цис-α*-бисаболен, *α*-копаен, *γ*-муролен содержатся в относительно небольшом количестве. По этой причине указанные соединения не включаются в хроматографический профиль эфирного масла чабера горного крымского происхождения. Включение *n*-цимол-8-ола в состав хроматографического профиля также не является достаточно обоснованным с учетом относительно низкого содержания в подавляющем большинстве образцов.

Характерные компоненты, способные однозначно различить эфирное масло чабера горного и эфирное масло близкородственного растения чабера садового, отсутствуют ввиду чрезвычайно высокой степени близости компонентных составов этих эфирных масел.

Таким образом, для формулирования хроматографического профиля были отобраны 5 характерных компонентов эфирного масла чабера горного: карвакрол, тимол, *γ*-терпинена, *n*-цимол и *β*-кариофиллен.

В таблице 28 представлено формулирование хроматографического профиля эфирного масла чабера горного крымского происхождения в соответствии с требованиями ISO.

Таблица 28 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла чабера горного крымского происхождения, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации
Карвакрол	55,63	7,59	40,75	70,51	(40,0...71,0) %
γ-Терпинен	17,54	4,45	8,82	26,26	(8,5...27,0) %
n-Цимол	5,10	2,46	0,29	9,92	(0...10,5) %
β-Кариофиллен	2,51	1,53	0	5,50	(0...5,5) %
Тимол	0,20	0,08	0	0,35	Не более 0,5 %

Ключевыми компонентами разработанного хроматографического профиля эфирного масла чабера горного крымского происхождения (таблица 28) являются производные терпинена: карвакрол, γ -терпинен, *n*-цимол и тимол. 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 крымского происхождения является преобладание γ -терпинена (8,5...27,0) % над *n*-цимолем (0...10,5) %. Подобное явление нетипично для эфирного масла чабера горного французского, хорватского и испанского происхождений (таблица 10). Сообщалось, что для чабера горного крымского происхождения также характерно преобладание *n*-цимола над γ -терпиненом (таблица 10) [221]. Указанные результаты не противоречат результатам хроматографического профилирования и имеют частный характер, поскольку в указанной публикации обсуждается компонентный состав эфирного масла определенного сорта и селекции. Другой характерной особенностью хроматографического профиля эфирного масла чабера горного крымского происхождения является достаточно высокая доля β -кариофиллена (от 0 до 5,5) %. В свою очередь, относительно высокое содержания β -кариофиллена является достаточно специфическим маркером, характеризующим локацию происхождения эфирного масла чабера горного.

Хроматографический профиль эфирного масла чабера горного российского происхождения закреплен в проекте ГОСТ, представленном в приложении В (приложение В.3).

3.4. Хроматографическое профилирование эфирного масла майорана

3.4.1. Формирование и характеристика итоговой выборки образцов эфирного масла майорана

Хроматографическое профилирование эфирного масла майорана проводили на основании анализа 32 образцов, из которых 10 являются коммерчески доступными (таблица 15), а 22 получены лабораторно (таблица 16). Перед формулированием хроматографического профиля был отбракован образец № 41 ввиду наличия разбавителя в своем составе и образец № 44, обладающий нетипичным компонентным составом, основу которого составляет линалоол и α -пинен.

Итоговая выборка составила 30 образцов из 5 стран: Российская Федерация – 11 образцов, Египет – 13 образцов, Испания – 3 образца, Марокко – 2 образца и Греция – 1 образец. Карта распределения образцов представлена на рисунке 34.

Анализируемые образцы египетского происхождения локализованы на территории 4 регионов: Мухафаз Асьют, Каир, Минья и Фйюмской мухафазы; испанского происхождения локализованы на территории 3 регионов: Эстремадура, Мурсия и Кастилия-и-Леон. Образцы греческого происхождения локализованы в регионе Ираклион (о. Крит), марокканского – в регионе Фес-Мекнес.



Рисунок 34 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла майорана.

Рисунок подготовлен автором

Все анализируемые образцы российского происхождения локализованы на территории Республики Крым, карта распределения образцов российского происхождения представлена на рисунке 35.

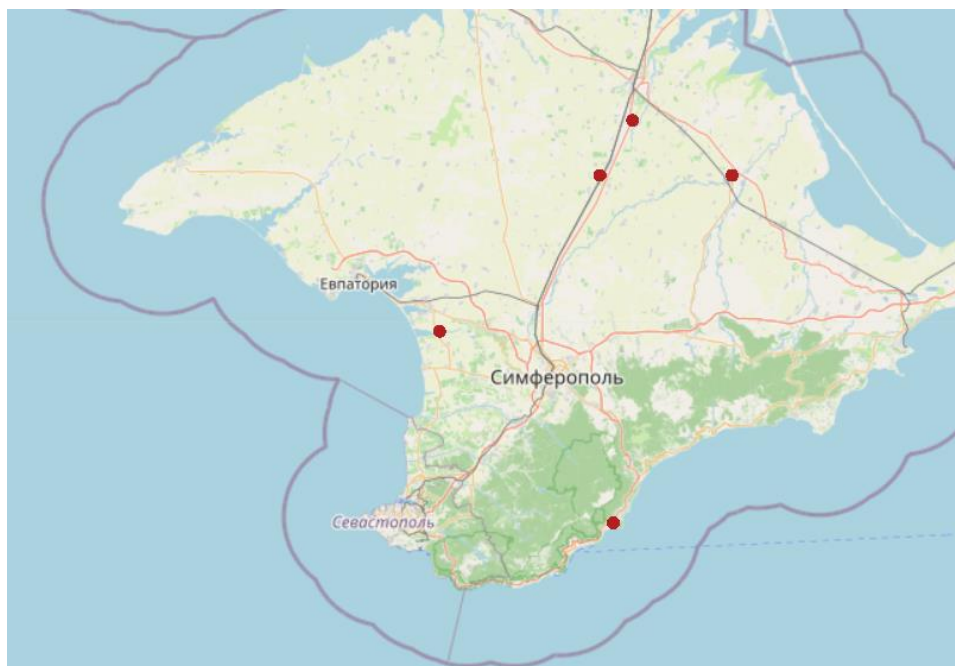


Рисунок 35 – Карта распределения анализируемых образцов эфирного масла майорана российского происхождения. Рисунок подготовлен автором

Среди 11 образцов крымского происхождения (рисунок 35) 4 образца локализованы на территории Красногвардейского района, на территории Джанкойского района, Бахчисарайского района и Ялтинского городского округа локализовано по 2 образца и 1 образец локализован на территории Нижнегорского района.

3.4.2. Хемометрический анализ данных

Для установления близости компонентных составов исследуемых образцов эфирных масел без учета региона их происхождения был проведен иерархический кластерный анализ (НСА), дендрограмма исследуемых образцов представлена на рисунке 36.

На полученной дендрограмме все образцы делятся на три смешанных кластера, в каждый из которых входят образцы различных регионов происхождения.

Первый кластер (выделен красным) является наибольшим и группирует 20 образцов, из которых 10 образцов имеют египетское происхождение, 8 образцов – российское происхождение, а два образца - греческое и испанское происхождение, соответственно. При рассмотрении структуры кластера заметны парадоксальные паттерны группировки образцов – большинство подкластеров образованы не образцами одной локализации, а образцами достаточно удаленных регионов происхождения. Подобные наблюдения позволяют предположить достаточную близость компонентных составов эфирных масел, несмотря на географическую удаленность регионов их произрастания.

Второй кластер (выделен голубым) является наименьшим и группирует 3 образца, из которых 2 имеют испанское происхождение, а 1 египетское. В структуре кластера также отмечается тенденция к образованию подкластеров между образцами отдаленных регионов (Египет и Испания).

Третий кластер (выделен зеленым) группирует 7 образцов, из которых 3 имеют российское происхождение, а египетское и марокканское происхождения имеют по два образца. В структуре данного кластера, напротив, отмечается тенденция к группированию и образованию подкластеров образцов из близких регионов произрастания – в подкластеры группируются образцы российского происхождения и образцы марокканского и египетского происхождения. Данное наблюдение позволяет выдвинуть гипотезу о наличии определенных особенностей компонентного состав эфирного масла майорана российского происхождения.

При общем анализе топологии дендрограммы очевидна асимметрия распределения образцов эфирных масел. Большинство из образцов двух сильно удаленных регионов (Египет и Россия) расположены в первом кластере, что позволяет утверждать о близости компонентных составов эфирных масел указанного происхождения. Вместе с этим

примечательно наличие 3 образцов российского происхождения и 2 образцов египетского происхождения в третьем кластере, что позволяет утверждать, что несмотря на достаточную близость компонентного состава для данных эфирных масел возможна его высокая вариабельность.

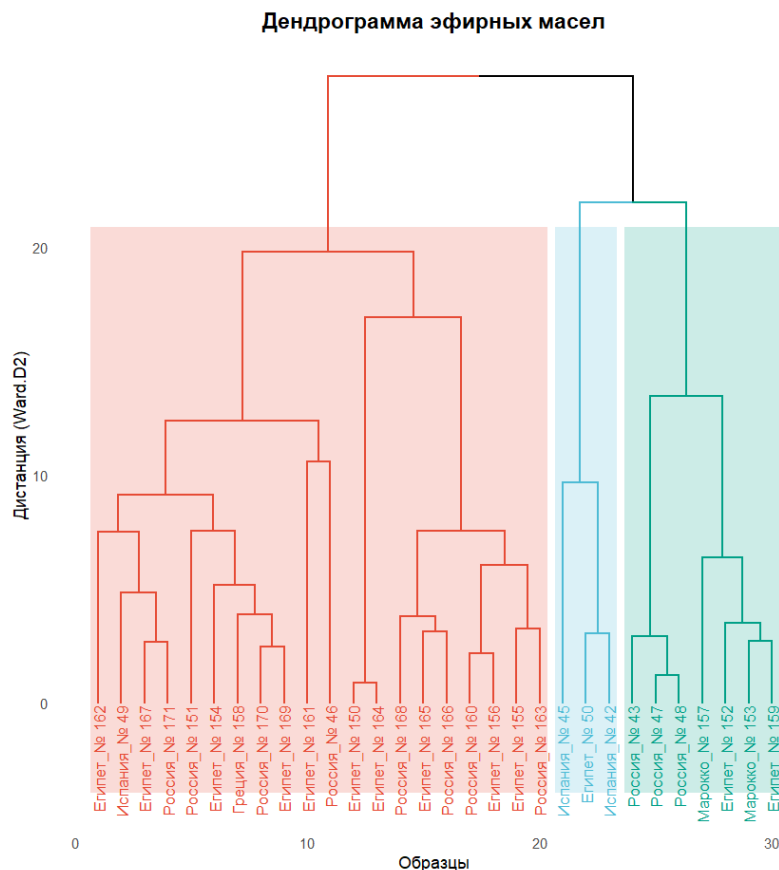


Рисунок 36 – Дендрограмма исследуемых образцов эфирного масла майорана. Рисунок подготовлен автором

Для подтверждения гипотезы о наличии географической вариабельности компонентного состава эфирных масел майорана был проведен анализ методом главных компонент (РСА). График оценок РСА представлен на рисунке 37.

В модели РСА (рисунок 37) две главные компоненты объясняют 48,5 % общей дисперсии данных. Равномерное распределение дисперсии между двумя компонентами (РС 1 – 27,9 %, РС 2 – 20,6 %) свидетельствует о сложном характере вариабельности состава.

Доверительные области двух наиболее представительных групп, эфирных масел египетского и российского происхождения, практически полностью перекрываются и охватывают основную площадь координатной плоскости. На графике оценок РСА прослеживается разделение всего массива данных на два подкластера вдоль оси РС1. Первый подкластер локализован в отрицательной полуплоскости, тогда как второй смещен в положительную область. Ключевая особенность полученной проекции – гетерогенность

выборки, поскольку в каждом из полученных подкластеров находятся образцы различного происхождения.

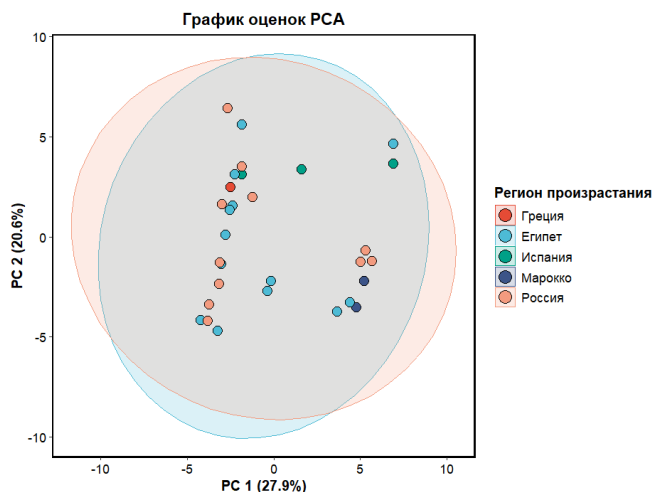


Рисунок 37 – График оценок PCA исследуемых образцов эфирного масла майорана.
Рисунок подготовлен автором

Анализ графика оценок PCA не позволяет подтвердить гипотезу о наличии географической вариабельности у эфирного масла майорана. Полученные результаты позволяют полагать о распространении и культивировании двух различных хемотипов майорана.

Для подтверждения гипотезы о наличии географически выраженной вариабельности компонентного состава была проведена PLS дискриминация (PLS-DA, метод регрессии частных наименьших квадратов). График оценок PLS-DA представлен на рисунке 38.

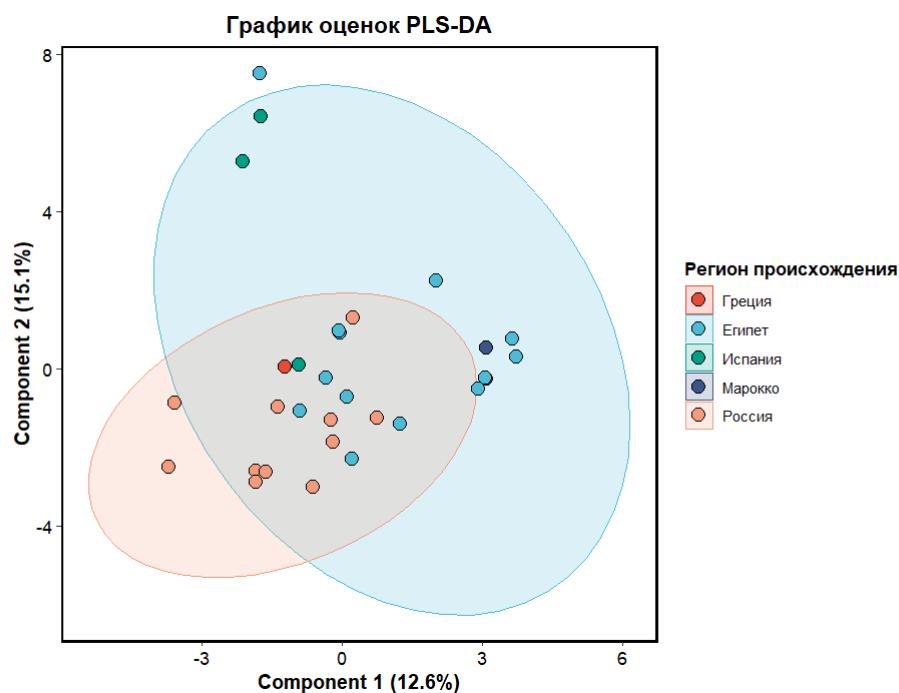


Рисунок 38 – График оценок PLS-DA исследуемых образцов эфирного масла майорана.
Рисунок подготовлен автором

В модели PLS-DA (рисунок 38) общий процент объясненной дисперсии составляет 27,7 %, что является достаточно низким показателем. Подобное наблюдение свидетельствует о низкой корреляции между компонентным составом эфирного масла майорана и регионом происхождения эфирного масла.

Доверительные области двух наиболее распространенных групп – эфирных масел российского и египетского происхождений - характеризуются глубоким взаимным наложением, что говорит о недостаточной пространственной изоляции двух групп.

Для доверительной области эфирных масел египетского происхождения характерна достаточно большая ширина, что может свидетельствовать как о большой вариабельности компонентного состава, так и о распространенности различных хемотипов эфирного масла.

Доверительная область эфирных масел российского происхождения характеризуется значительно меньшей шириной. Однако при рассмотрении расположения точек образцов очевидно, что большинство образцов расположено в области пересечения с доверительной областью образцов египетского происхождения.

Таким образом, в результате проведенного хемометрического анализа не выявлено достаточно оснований для подтверждения вариабельности компонентного состава эфирного масла майорана от региона его происхождения. Тем не менее, в ходе анализа подтверждено наличие особенностей эфирного масла майорана российского происхождения.

3.4.3. Хроматографическое профилирование эфирного масла майорана российского происхождения

Среди испытываемых образцов крымского происхождения (рисунок 35) 2 из 11 образцов локализуются на территории Южного берега Крыма, а 9 локализованы на территории Степного Крыма. С учетом неравномерности распределения испытываемых образцов дополнительная хемометрическая обработка не проводилась.

Для определения характерных компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана российского происхождения был построен график важности переменной в проекции (Variable Importance in Projection, *VIP*), представленный на рисунке 39.

На основании проведенного хемометрического анализа и графика важности переменной в проекции (рисунок 39) был проведен отбор характерных компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана российского происхождения. Наибольшая важность переменной в проекции отмечена для изотерпинолена и *цис*-сабинен гидрата. В составе эфирного масла майорана российского происхождения доля каждого из

них не превышает 5 %. Каждый из описанных компонентов является маркерным для характеристики локации происхождения, поскольку египетские образцы характеризуются более высоким уровнем содержания изотерпинолена (до 20 %) при схожем уровне содержания *цис*-сабинен гидрата, а испанские образцы, напротив, характеризуются схожим уровнем содержания изотерпинолена при значительно меньшем уровне содержания *цис*-сабинен гидрата (не более 3 %).

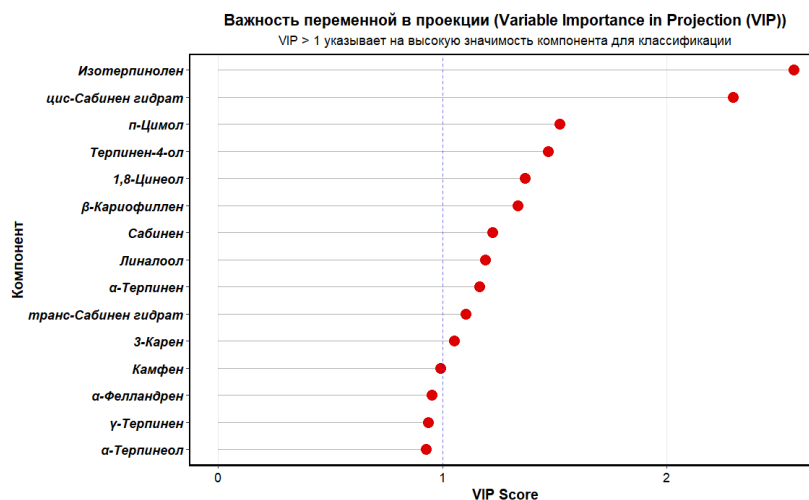


Рисунок 39 – Важность переменной в проекции для исследуемых эфирных масел майорана российского происхождения. Рисунок подготовлен автором

В хроматографический профиль включен терпинен-4-ол, как основной компонент эфирного масла майорана, а также компоненты присутствующие в значительных концентрациях в большинстве образцов: γ -терпинен и α -терпинен.

На основании общей представленности в компонентном составе и анализе графика важности переменной в проекции в хроматографический профиль включен *n*-цимол, сабинен и β -кариофиллен.

С целью возможности идентификации эфирного масла майорана в ряду эфирных масел близкородственных растений в хроматографический профиль добавлено суммарное содержание тимола и карвакрола для возможности дифференциации от эфирных масел душицы обыкновенной и тимьяна обыкновенно. С целью специфичной идентификации от эфирного масла испанского майорана в профиль российского майорана также добавлен 1,8-цинеол.

В таблице 29 представлен хроматографический профиль эфирного масла майорана российского происхождения, в соответствии с требованиями ISO.

Ключевыми компонентами разработанного хроматографического профиля эфирного масла майорана российского происхождения (таблица 29) являются производные

терпинена: терпинен-4-ол (22,0...37,0) %, γ -терпинен (11,0...21,5) % и α -терпинен (5,0...14,5) %.

Таблица 29 – Формулирование хроматографического профиля эфирного масла майорана российского происхождения, в соответствии с требованиями ISO

Компонент	Среднее	Стандартное отклонение	Нижний предел, %	Верхний предел, %	Пределы концентрации
Терпинен-4-ол	29,40	3,61	22,33	36,47	(22,0...37,0) %
γ -Терпинен	16,24	2,33	11,66	20,81	(11,0...21,5) %
α -Терпинен	9,81	2,16	5,57	14,05	(5,0...14,5) %
β -Кариофиллен	4,21	1,98	0,33	8,10	(0...8,5) %
Изотерпинолен	3,71	0,28	3,17	4,25	(2,5...5,0) %
<i>n</i> -Цимол	2,58	1,39	1,72	3,45	(1,0...4,0) %
<i>цис</i> -Сабинен гидрат	1,52	1,92	0,38	2,65	Не более 3,0 %
Сабинен	1,43	1,99	0	5,33	Не более 6,0 %
1,8-Цинеол	0,98	1,64	0	4,19	Не более 4,5 %
Карвакрол и Тимол	0,66	0,25	0	1,15	Не более 1,5 %

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 эфирного масла. Для возможности различения эфирного масла майорана от эфирных масел близкородственных растений – душицы обыкновенной, тимьяна обыкновенного и испанского майорана в хроматографический профиль были включены 1,8-цинеол и суммарное содержание карвакрола и тимола. Карвакрол и тимол присутствуют лишь в части проб в достаточно небольшом содержании, для суммарного содержания карвакрола и тимола установлен предел содержания не более 1,5 %. В испытуемых образцах 1,8-цинеол является более распространенным соединением, для него установлен предел содержания не более 4,5 %.

Хроматографический профиль эфирного масла майорана российского происхождения закреплён в проекте ГОСТ, представленном в приложении В (приложение В.4).

Выводы к главе 3

1. С использованием массива хроматографических данных и методов HCA, PCA и PLS-DA проведен хемометрический анализ 58 образцов эфирного масла розмарина

лекарственного, 34 образцов эфирного масла шалфея мускатного, 29 образцов эфирного масла чабера горного и 30 образцов эфирного масла майорана различного происхождения для оценки влияния географического фактора и репрезентативности выборки на компонентный состав эфирных масел и формулирования хроматографических профилей для масел, полученных из растительного сырья российского происхождения.

2. В результате проведенного хеометрического анализа эфирного масла розмарина лекарственного сформулированы три специфических хроматографических профиля, характеризующих эфирное масло российского происхождения, полученного из сырья различных локаций (Южный берег Крыма, Степной Крым и Республика Дагестан). Каждый сформулированный хроматографический профиль включает перечень из 13 характерных компонентов с определенными специфическими диапазонами концентраций: α -пинен, 1,8-цинеол, камфора, линалоол, лимонен, β -пинен, камфен, *n*-цимол, борнеол, β -мирцен, α -терпинеол, борнил ацетат, вербенон.
3. Установлены значимые отличия в компонентном составе эфирных масел розмарина лекарственного крымского происхождения, локализованного на территории Южного берега Крыма и на территории Степного. Проведенные исследования дали основания сформулировать два специфических хроматографических профиля, характеризующих локацию произрастания растительного сырья.
4. Произведена оценка сезонной вариабельности компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения. Установлено, что для эфирного масла розмарина лекарственного данной локализации характерен вербеноновый хемотип, а степень вариаций компонентного состава носит умеренный характер.
5. Сформулированный хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного российского происхождения включает в себя перечень из 9 компонентов (линалил ацетат, линалоол, гермакрен Д, склареол, α -терпинеол, β -мирцен, *транс*- β -оцимен, β -кариофиллен, лимонен) с установленным специфическим диапазонами концентрации каждого. Данный профиль имеет значимые отличия от регламентированных в ISO 24255:2025 и монографии Ph.Eur 11 по числу нормируемых компонентов и по диапазонам концентраций и может быть рекомендован для контроля качества эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения.
6. В хроматографический профиль чабера горного российского происхождения включены 5 компонентов (карвакрол, γ -терпинен, *n*-цимол, β -кариофиллен, тимол) с

указанием диапазона их концентраций. На основании анализа образцов эфирного масла майорана различного происхождения сформулирован хроматографический профиль эфирного масла российского происхождения, который включает 10 компонентов (терпинен-4-ол, γ -терпинен, α -терпинен, β -кариофиллен, изотерпинолен, *n*-цимол, *цис*-сабинен гидрат, сабинен, 1,8-цинеол, карвакрол, тимол).

7. Профили эфирных масел чабера горного и майорана систематизированы и сформулированы впервые, причем применительно не только к российским образцам. Поэтому после проведения сравнительного анализа химического состава на расширенной выборке данные профили могут быть трансферированы на эфирные масла, полученные из растений не российского происхождения.

ГЛАВА 4. Разработка методики газохроматографического анализа эфирных масел объектов исследования.

На текущий момент в научной литературе и нормативной документации представлено исчерпывающее количество аналитических методик анализа различных эфирных масел. Ключевые ограничения, возникающие при разработке методик анализа, связаны с высоким биологическим разнообразием данных объектов и их сложным многокомпонентным составом.

Строго говоря, специфика газохроматографического анализа эфирных масел заключается в невозможности разработки и применения унифицированных газохроматографических методик анализа. Указанное ограничение, в свою очередь позволяет использовать наиболее оптимальную для конкретного объекта методику анализа, что может быть актуально в аспекте оптимизации условий разделения. Однако, несмотря на невозможность унификации хроматографических условий анализа, процесс идентификации компонентов эфирных масел в достаточной степени унифицирован.

При разработке методики анализа эфирных масел идентификацию компонентов проводили с использованием линейных индексов удерживания в условиях ортогонального эксперимента – анализа на колонках различной полярности.

Важная особенность разработки методики для хроматографического профилирования эфирных масел заключается в необходимости проведения их скрининга. Сложность данного этапа заключается в отсутствии априорной информации о составе пробы. Используемая методика должна обеспечивать эффективное разделение всех нативных компонентов эфирного масла при учете возможной вариабельности компонентного состава (как в количественном, так и в качественном аспекте). В случае анализа коммерческих эфирных масел следует учитывать наличие возможных фиксаторов аромата (фталаты, гликоли, эфиры жирных кислот).

Таким образом, при разработке методики анализа эфирных масел следует опираться на подбор хроматографических условий, обеспечивающих «избыточную эффективность разделения».

4.1. Выбор способа проведения газохроматографического анализа и идентификации компонентов

Актуальные требования к проведению идентификации эфирных масел основаны исключительно на использовании данных хромато-масс-спектрометрии и линейных индексов удерживания [67]. Однако современный подход к идентификации летучих соединений основан на интерпретации данных ортогональных экспериментов. Допустимыми вариантами является проведение идентификации на основании данных ГХ-

МС и ГХ-анализа с использованием колонки одной полярности либо на основании данных ГХ-анализа с использованием двух колонок различной полярности [67]. Таким образом, несмотря на возрастающую популярность метода ГХ-МС для проведения идентификации летучих соединений, наиболее востребованными являются линейные индексы удерживания, используемые в обоих подходах для интерпретации данных ГХ-анализа. Следовательно, наиболее предпочтительным вариантом проведения анализа является проведение анализа на двух колонках различной полярности. Данный вариант позволяет значительно уменьшить требования к инструментальному оформлению методики и упростить саму процедуру анализа.

Расчет линейных индексов удерживания (*LRI*) проводится по уравнению 2. Для расчета используют хроматограмму испытуемого раствора эфирного масла и раствор *n*-алканов состава *C*₇-*C*₂₂ (гептан-докозан) с концентрацией 0,25 мг/мл в гексане. После расчета линейных индексов проводят идентификацию путем сравнения расчетных индексов со справочными. Для признания идентификации корректной расхождение между справочным *LRI* и расчетным для соединения-кандидата не должно превышать 5 единиц в случае колонки с неполярной НЖФ и 10 единиц в случае колонки с полярной НЖФ. При поиске справочных индексов удерживания пользуются специализированными базами данных [268-270] или данными научных публикаций [64-66]. В приложении Б представлена справочная таблица с линейными индексами удерживания и стандартными масс-спектрами репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана на колонках DB-5 и DB-WAX.

После проведения идентификации проводят количественную оценку каждого компонента на хроматограмме по методу внутренней нормализации, отбрасывая пики, совпадающие по времени удерживания с пиками, присутствующими на холостом растворе. За результат анализа принимают количественные результаты, полученные на колонке с неполярной НЖФ, ввиду большей стабильности этой НЖФ и намного большей воспроизводимости времен удерживания при её использовании.

4.2. Подбор и апробация условий газохроматографического анализа эфирных масел – объектов исследования

4.2.1. Эфирное масло розмарина лекарственного

В стандарте ISO 1342:2012 на эфирное масло розмарина лекарственного представлена рекомендуемая методика анализа с использованием колонки с неполярной НЖФ. Ключевым недостатком указанной методики является неполнота разделения ключевых компонентов хроматографического профиля: лимонена и 1,8-цинеола.

Следовательно, применение описанной методики сопряжено с получением искаженных значений содержания нормированных компонентов, что является недопустимым. В тексте Европейской Фармакопеи представлена методика анализа с использованием колонки с полярной НЖФ. Однако в основе методики использован нетипичный для анализа эфирных масел подход – предварительное растворение образца и анализ раствора эфирного масла. В монографии четко не закреплены геометрические параметры хроматографической колонки, а общее время хроматографирования составляет 110 минут.

Таким образом, каждая из регламентированных методик анализа эфирного масла розмарина лекарственного имеет существенные недостатки, что свидетельствует о необходимости проведения собственной разработки. В основу разработки положены условия применяемых методик для анализа эфирных масел розмарина лекарственного (таблица 8, раздел 1.5.2.2).

Во всех актуальных исследованиях для разделения используется режим программирования температуры (таблица 8, раздел 1.5.2.2), поскольку он обеспечивает наивысшую эффективность газохроматографического анализа. Ключевые отличия связаны с особенностями программы: начальной и конечной температурой, скоростью нагрева, а также наличием и продолжительностью изотермических выдержек. При разработке методики было решено апробировать программирование температуры линейное программирование с без дополнительных изотермических выдержек с 75 °С до 240 °С для колонки с неполярной НЖФ и с 75 °С до 225 °С для колонки с полярной НЖФ со скоростью 4 °С/минуту. В данных условиях используется достаточно высокая начальная температура при небольшой скорости нагрева. Уменьшение конечной температуры для колонки с полярной НЖФ связано с тем, что колонки данного типа нежелательно эксплуатировать при около максимальной допустимой температуры (250 °С). Разработка проводилась с использованием колонок HP-5MS UI 30 м*0,25 мм, 0,25 мкм и DB-WAX 30 м*0,32 мм, 0,50 мкм, указанные типы НЖФ хроматографических колонок, их толщина и их геометрические параметры являются наиболее часто используемыми для анализа эфирных масел. В качестве газа-носителя был выбран гелий с объемным расходом 1 мл/минуту, что в значительной степени упрощает трансфер методики на ГХ-МС. Описанные хроматографические условия были использованы для проведения анализа эфирного масла розмарина лекарственного.

Репрезентативные хроматограммы эфирного масла розмарина крымского происхождения представлены на рисунках 40 и 41. Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений представлены в таблице 30.

При анализе эфирного масла розмарина лекарственного на колонке с неполярной НЖФ число теоретических тарелок (N) для самого рано элюируемого компонента α -пинена составляет не менее 131504, что свидетельствует о высокой эффективности разделения. В данных хроматографических условиях образуется критическая пары соединений: лимонен и 1,8-цинеол.

Таблица 30 – Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений эфирного масла розмарина лекарственного

Компонент	Хроматографические параметры							
	Время удерживания (<i>t_r</i>), мин		Число теоретических тарелок (<i>N</i>)		Фактор асимметрии (<i>As</i>)		Разрешение (<i>Rs, n, n+1</i>)	
	Хроматографическая колонка							
	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX
α-пинен	4,97	4,94	131504	70035	0,80	0,93	1,60	5,26
1,8-цинеол	7,15	8,86	171219	132995	0,76	0,90	4,72	2,60
камфора	10,28	17,72	196829	377919	0,72	0,89	3,74	1,64
линалоол	8,79	17,89	289619	540365	1,05	1,01	1,78	3,24
лимонен	7,00	8,47	133409	148411	0,96	0,98	1,67	4,35
β-пинен	5,84	6,52	178022	95019	0,94	0,98	1,62	2,04
камфен	5,26	5,72	134774	79320	0,92	0,97	1,63	9,52
n-цимол	6,88	10,31	189032	197877	1,00	0,98	1,85	3,75
борнеол	10,84	22,63	362582	687711	1,01	1,08	1,75	1,72
β-мирцен	6,01	7,39	203175	134210	1,00	0,96	6,82	3,41
α-терпинеол	11,56	22,39	420049	593720	0,94	1,03	2,34	1,83
борнил ацетат	14,50	19,28	562706	523054	1,09	0,94	36,33	1,78
вербенон	12,18	21,86	410588	327689	1,19	1,03	17,22	10,70

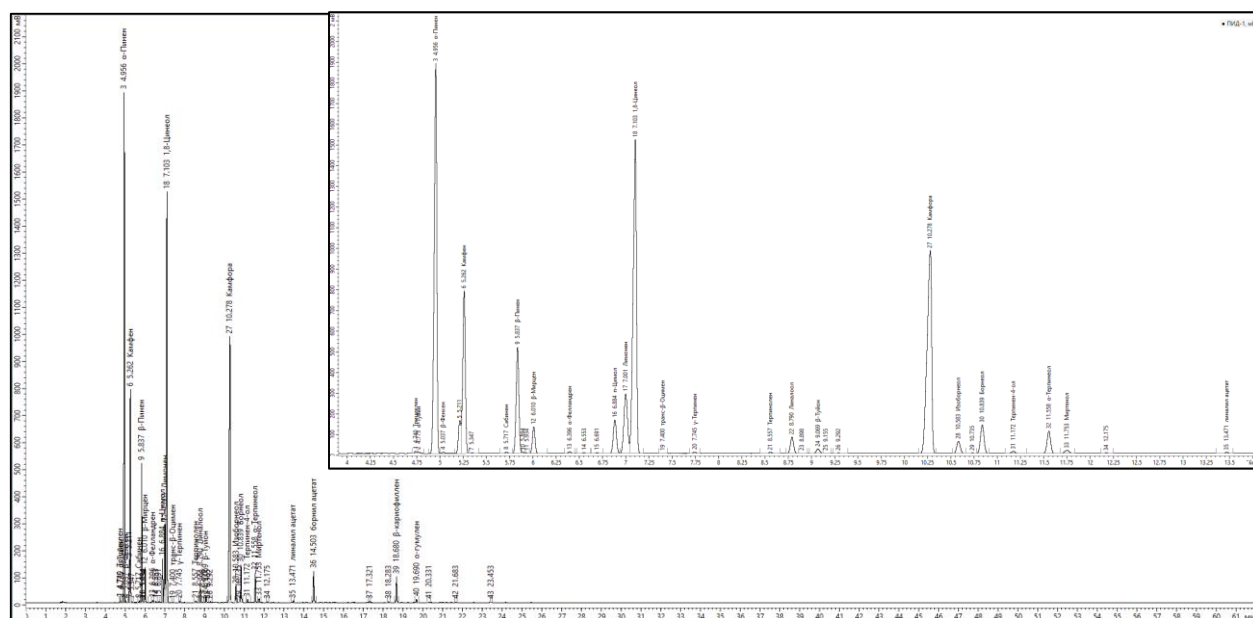


Рисунок 40 – Репрезентативная хроматограмма эфирного масла розмарина крымского происхождения на хроматографической колонке HP-5 MS UI. Рисунок подготовлен автором

Разрешение между указанными пиками является оптимальным способом оценки пригодности хроматографической системы для проведения анализа, поскольку каждое из

соединений входит в регламентированный ISO хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного. Разрешение (R_s) между пиками лимонена и 1,8-цинеола не менее 1,75. Указанные значения свидетельствуют о достаточной эффективности разделения двух критических пар пиков. Разрешение всех остальных пиков характерных компонентов эфирного масла розмарина также в полной мере соответствуют требованиям ($R_s \geq 1,5$) ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография».

В описанных условиях для большинства компонентов хроматографического профиля достигается оптимальная форма пика ($0,9 < A_s < 1,1$) за исключением ключевых компонентов хроматографического профиля: α -пинена ($A_s = 0,80$), 1,8-цинеола ($A_s = 0,76$) и камфоры ($A_s = 0,72$). Для каждого из указанных соединений наблюдается размывание переднего фронта хроматографического пика. Подобное явление объясняется как повышенным содержанием указанных компонентов, так и недостаточной толщиной пленки НЖФ. Тем не менее, с учетом особенности метода количественного определения – метода внутренней нормализации – указанные значения являются приемлемыми для анализа.

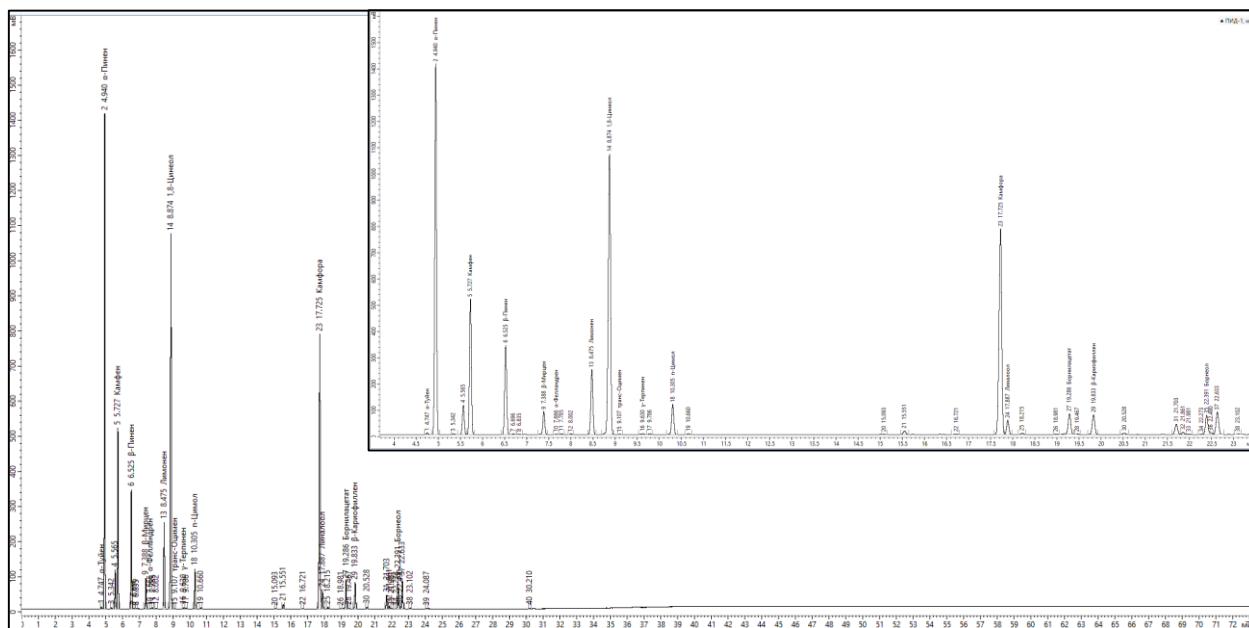


Рисунок 41 – Репрезентативная хроматограмма эфирного масла розмарина крымского происхождения на хроматографической колонке DB-WAX. Рисунок подготовлен автором

При проведении анализа эфирного масла розмарина лекарственного с использованием хроматографической колонки DB-WAX самым рано элюируемым компонентом также является α -пинен. Число теоретических тарелок для α -пинена составляет не менее 70035, что позволяет судить о суммарной высокой эффективности разделения.

На хроматограмме (рисунок 41) присутствует одна пара критических пиков: камфора и линалоол. Разделение этой пары пиков является обязательным ввиду того, что они включены в регламентированный хроматографический профиль ISO 1342:2012. В данном случае величина разрешения (R_s) между двумя пиками составляет не менее 1,64. Разрешение для всех остальных пиков (таблица 30) составляет не менее 1,72. Полученные значения в целом свидетельствуют о высокой разрешающей способности хроматографической системы.

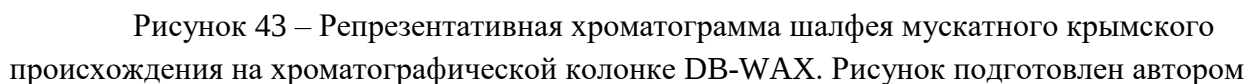
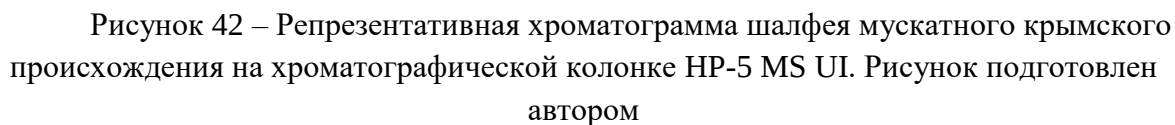
При использовании колонки DB-WAX с толщиной пленки НЖФ 0,50 мкм достигается удовлетворительная форма пиков всех основных компонентов хроматографического профиля (таблица 31). Критическими, как и в случае анализа на колонке HP-5 MS UI, являются также α -пинен ($A_s=0,93$), 1,8-цинеол ($A_s=0,90$) и камфора ($A_s=0,89$). В данном случае для каждого из указанных компонентов удастся обеспечить лучшую форму хроматографического пика.

Результаты хроматографического анализа свидетельствуют о пригодности предлагаемой методики для анализа эфирного масла розмарина лекарственного. Хроматографические условия методики представлены в таблице 17 (раздел 2.2.1). Предлагаемая методика обеспечивает высокую эффективность разделения всех основных компонентов эфирного масла и обеспечивает для каждого из них удовлетворительную форму хроматографического пика. Разрешение (R_s) между каждой критической парой пиков на хроматограммах, записанных на колонках различной полярности, превышает 1,5, что позволяет утверждать о достаточной полноте разделения всех компонентов эфирного масла розмарина лекарственного. В результате апробации предлагаемой методики анализа подтверждена её пригодность для анализа эфирного масла розмарина лекарственного.

4.2.2. Эфирное масло шалфея мускатного

Методика анализа эфирного масла шалфея мускатного закреплена в соответствующей монографии Европейской Фармакопеи. Тем не менее, для нее характерны ограничения, аналогичные методике анализа розмарина лекарственного. Следовательно, для эфирного масла шалфея мускатного также необходимо проведение разработки аналитической методики.

Для анализа образцов эфирного масла шалфея мускатного была апробирована ранее разработанная методика анализа эфирного масла розмарина лекарственного. Репрезентативные хроматограммы эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения представлены на рисунках 42 и 43. Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений представлены в таблице 31.



В данном случае наиболее правильным подходом оценки эффективности разделения является оценка числа теоретических тарелок у пика линалил ацетата, как основного компонента эфирного масла. При анализе с использованием колонки с неполярной НЖФ число теоретических тарелок для пика линалил ацетата составляет не менее 202152, а при анализе с использованием колонки с полярной НЖФ – не менее 468309. Полученные значения однозначно свидетельствуют о высокой суммарной эффективности разделения.

Таблица 31 – Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений эфирного масла шалфея мускатного

Компонент	Хроматографические параметры							
	Время удерживания (<i>t_r</i>), мин		Число теоретических тарелок (<i>N</i>)		Фактор асимметрии (<i>A_s</i>)		Разрешение (<i>R_s</i> , <i>n</i> , <i>n</i> +1)	
	Хроматографическая колонка							
	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB-WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB-WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB- WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB- WAX</i>
линалил ацетат	13,51	18,223	202152	468309	0,81	0,95	2,06	5,89
линалоол	8,78	17,89	185418	446583	0,85	0,92	1,76	3,32
гермакрен Д	20,50	22,63	896605	603474	0,95	0,95	1,67	1,68
склареол	38,94	37,57	2492132	1484205	1,01	0,95	н/п	3,83
α-терпинеол	11,55	22,39	404356	539029	0,97	1,02	1,63	2,82
β-мирцен	6,03	7,39	203176	179277	0,96	0,98	1,67	5,49
транс-β-оцимен	7,40	9,25	243202	133992	0,96	1,01	5,62	3,35
β-кариофиллен	18,57	19,83	424680	148038	1,12	1,00	1,64	2,26
лимонен	7,02	8,47	150487	553276	1,10	0,99	2,29	1,70

Форма большинства основных пиков на хроматограмме, полученной с использованием полярной хроматографической колонки, является симметричной. Незначительное уширение переднего фронта пика наблюдается для линалил ацетата ($A_s=0,81$) и линалоола ($A_s=0,85$), что связано с их относительно высокой полярностью и большим содержанием в пробе. Форма всех основных пиков при анализе с использованием хроматографической колонки с полярной НЖФ является оптимальной ($0,9 < A_s < 1,1$).

При проведении анализа с использованием колонки HP-5 MS UI не образуется значимых критических пар пиков, все целевые соединения полностью разрешаются. Однако при анализе на колонке DB-WAX присутствует критическая пара пиков: линалил ацетат и линалоол. Разделение этой пары пиков является обязательным, поскольку эти два компонента являются основными в эфирном масле шалфея мускатного. В данном случае разрешение между пиками линалил ацетата и линалоола составляет 3,32, что, однозначно, свидетельствует о полном разделении критической пары.

Результаты хроматографического анализа свидетельствуют о пригодности предлагаемой методики для анализа эфирного масла шалфея мускатного. Предлагаемая методика обеспечивает высокую эффективность разделения всех основных компонентов эфирного масла и обеспечивает для каждого из них удовлетворительную форму

хроматографического пика. Полученные результаты позволяют утверждать о достаточной полноте разделения всех компонентов эфирного масла шалфея мускатного. Таким образом, в результате апробации предлагаемой методики анализа подтверждена её пригодность для анализа эфирного масла шалфея мускатного.

4.2.3. Эфирное масло чабера горного

Для эфирного масла чабера горного отсутствуют регламентированные методики анализа, что естественным образом обуславливает необходимость проведения разработки. Анализ образцов эфирного масла чабера горного был проведен по разработанной ранее методике.

Репрезентативные хроматограммы эфирного масла чабера горного крымского происхождения представлены на рисунках 44 и 45. Основные параметры хроматографических пиков характеристических соединений представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Основные параметры хроматографических пиков характеристических соединений эфирного масла чабера горного

Компонент	Хроматографические параметры							
	Время удерживания (t_r), мин		Число теоретических тарелок (N)		Фактор асимметрии (A_s)		Разрешение ($R_s, n, n+1$)	
	Хроматографическая колонка							
	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX	HP-5 MS UI	DB-WAX
Карвакрол	14,98	35,03	127891	1566669	0,75	0,92	0,36	3,18
γ-Терпинен	7,80	9,65	183184	161671	0,92	0,85	2,97	1,70
п-Цимол	6,69	10,31	351386	195237	1,01	0,96	2,20	1,62
β-Кариофиллен	18,58	19,83	755417	526438	0,90	0,98	2,99	1,65
Тимол	14,56	34,33	425220	1418330	1,09	0,96	1,35	3,32

С учетом преобладания в составе эфирного масла одного компонента – карвакола, то оценку эффективности разделения наиболее целесообразно проводить именно по этому компоненту. Число теоретических тарелок при анализе с использованием колонки с неполярной НЖФ составляет не менее 127891, а при проведении анализа на колонке с полярной НЖФ – не менее 1566669, что свидетельствует о суммарной высокой эффективности разделения.

У пика основного компонента эфирного масла чабера горного наблюдается уширение переднего фронта ($A_s=0,75$). С учетом использования метода внутренней нормализации полученное значение фактора асимметрии является приемлемым. Значение фактора асимметрии пиков остальных целевых соединений является оптимальным, а форма пиков симметричной.

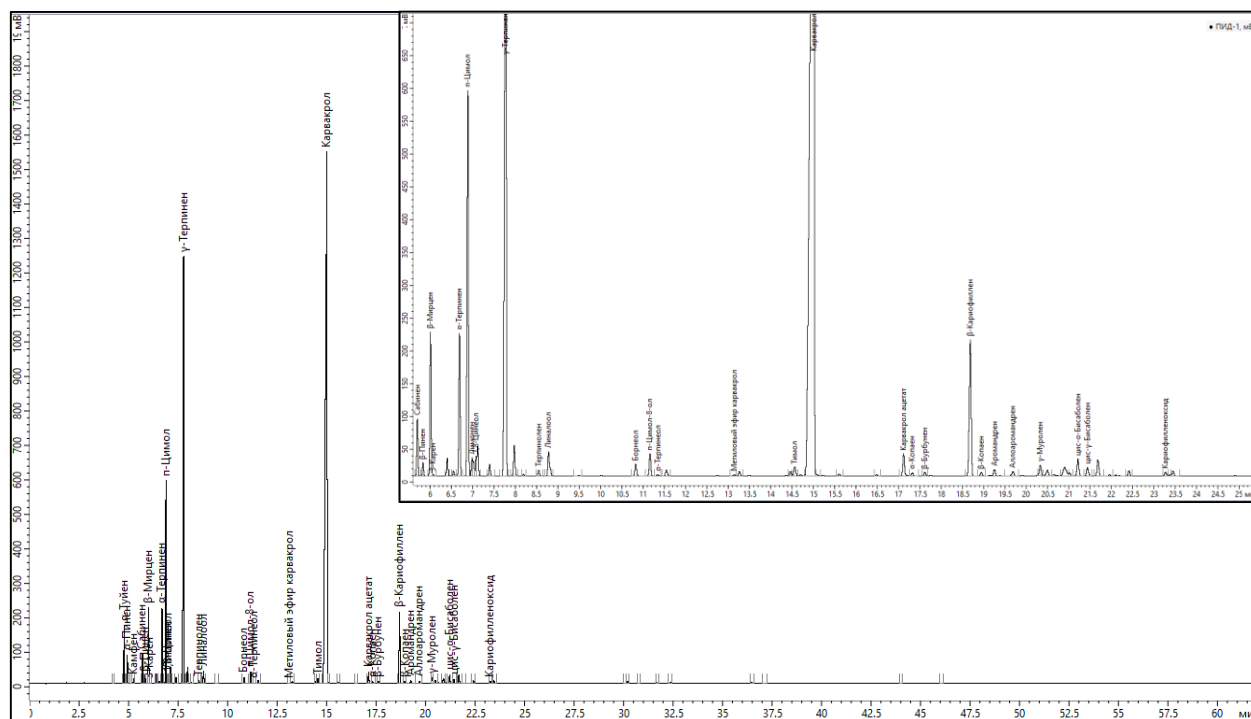


Рисунок 44 – Репрезентативная хроматограмма чабера горного крымского происхождения на хроматографической колонке HP-5 MS UI. Рисунок подготовлен автором

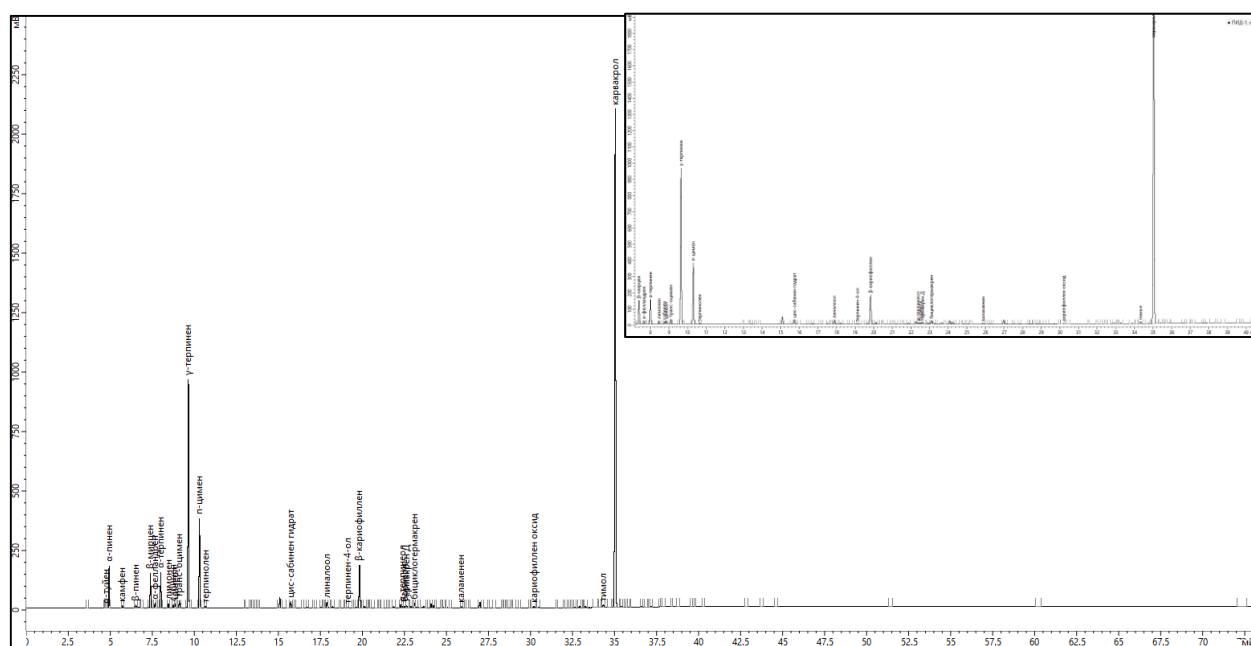


Рисунок 45 – Репрезентативная хроматограмма чабера горного крымского происхождения на хроматографической колонке DB-WAX. Рисунок подготовлен автором

Критические пары пиков при анализе с использованием колонки DB-WAX отсутствуют, для всех целевых соединений наблюдается необходимая полнота разделения. При проведении анализа на колонке HP-5 MS UI пик *n*-цимола образует критическую пару с пиком лимонена, неспецифированного, но встречающегося в образцах чабера соединения. Разрешение (R_s) между пиками *n*-цимола и лимонена в данных условиях составляет 1,62, что говорит о достаточной разрешающей способности хроматографической системы.

Полученные результаты апробации хроматографической методики свидетельствуют о её пригодности для проведения анализа эфирного масла чабера горного.

4.2.4. Эфирное масло майорана

Для эфирного масла майорана отсутствуют регламентированные методики анализа, поэтому было принято решение о проведении разработки. Для анализа была апробирована ранее разработанная методика.

Репрезентативные хроматограммы эфирного масла майорана крымского происхождения представлены на рисунках 46 и 47. Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Основные параметры хроматографических пиков характерных соединений эфирного масла майорана

Компонент	Хроматографические параметры							
	Время удерживания (<i>t_r</i>), мин		Число теоретических тарелок (<i>N</i>)		Фактор асимметрии (<i>A_s</i>)		Разрешение (<i>R_s</i> , <i>n</i> , <i>n</i> +1)	
	Хроматографическая колонка							
	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB-WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB-WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB-WAX</i>	<i>HP-5 MS UI</i>	<i>DB- WAX</i>
Терпинен-4-ол	11,15	19,14	191192	495481	0,85	0,91	1,60	2,23
γ-Терпинен	7,80	9,65	169921	162225	0,94	0,99	2,97	7,21
α-Терпинен	6,69	8,00	146925	129224	0,95	0,98	2,71	5,32
β-Кариофиллен	18,58	19,83	464027	584888	1,01	0,96	3,43	2,12
Изотерпинолен	8,35	10,44	183760	148127	0,97	1,09	1,75	1,99
п-Цимол	6,69	10,31	152442	183524	0,97	1,02	1,62	3,75
цис-Сабинен гидрат	7,98	15,74	167733	369950	0,99	1,00	7,42	17,44
Сабинен	5,70	8,76	131815	111088	1,01	0,99	1,75	8,27
1,8-Цинеол	7,15	8,86	127655	116552	1,09	0,99	3,93	3,27
Карвакрол	14,89	34,94	116603	1520518	1,11	1,07	2,11	8,24
Тимол	14,53	34,30	288603	1608769	1,07	1,04	3,01	4,65

Число теоретических тарелок для пика основного компонента эфирного масла – терпинен-4-ола - составляет не менее 191192 в случае анализа на колонке с неполярной НЖФ и не менее 495481, что свидетельствует о высокой эффективности разделения. Фактор асимметрии пиков всех целевых соединений находится в диапазоне от 0,85 до 1,11, что свидетельствует об их приемлемой форме.

При анализе на колонке с полярной НЖФ критической пары пиков не образуется, разрешение для всех целевых соединений составляет не менее 1,99. В случае анализа на колонке с неполярной НЖФ образуется критическая пара: разрешение между пиком неспецифицированного лимонена и 1,8-цинеолом – 1,60. Лимонен не является специфицированным компонентом в разработанном хроматографическом профиле, а 1,8-цинеол был включен в хроматографический профиль эфирного масла майорана для возможности дифференциации с эфирным маслом близкородственного растения

испанского майорана. Тем не менее, разделение этой критической пары пиков является обязательным. Поскольку разрешение между критической парой пиков выше предельного значения ($R_s=1,5$), то разрешение между ними признается достаточным. Полученные результаты апробации хроматографических условий для анализа эфирного масла майорана свидетельствуют об их однозначной пригодности.

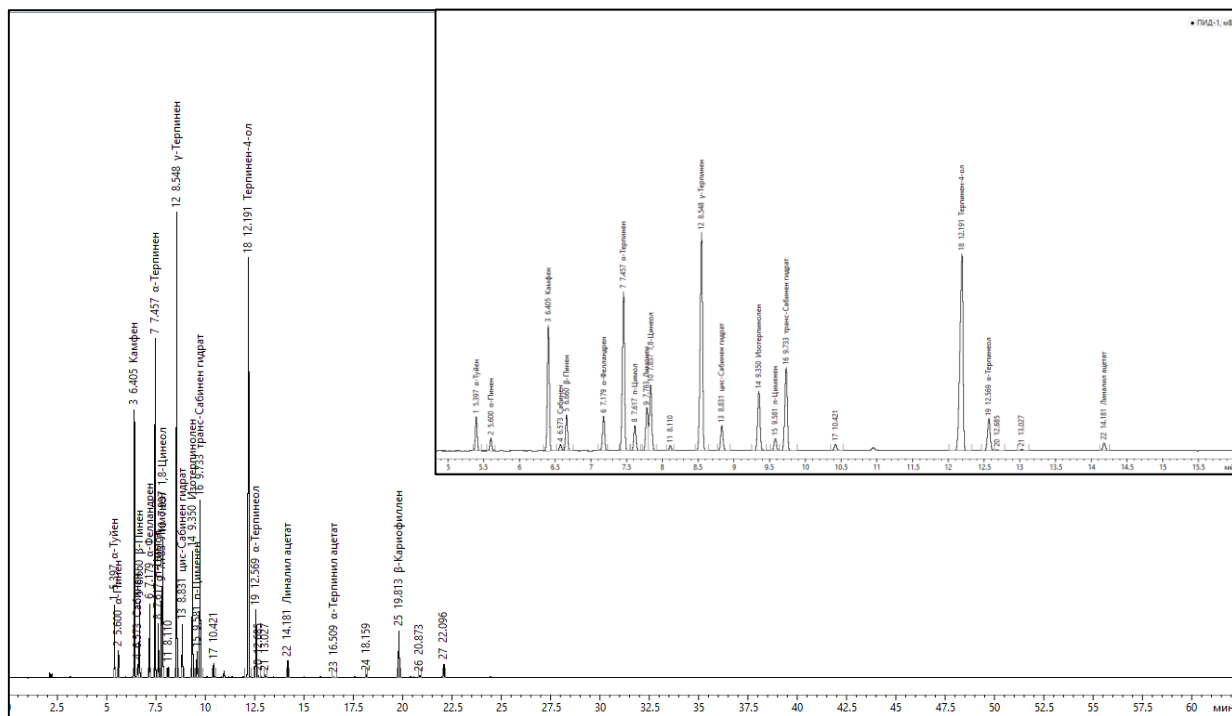


Рисунок 46 – Репрезентативная хроматограмма майорана крымского происхождения на хроматографической колонке HP-5 MS UI. Рисунок подготовлен автором

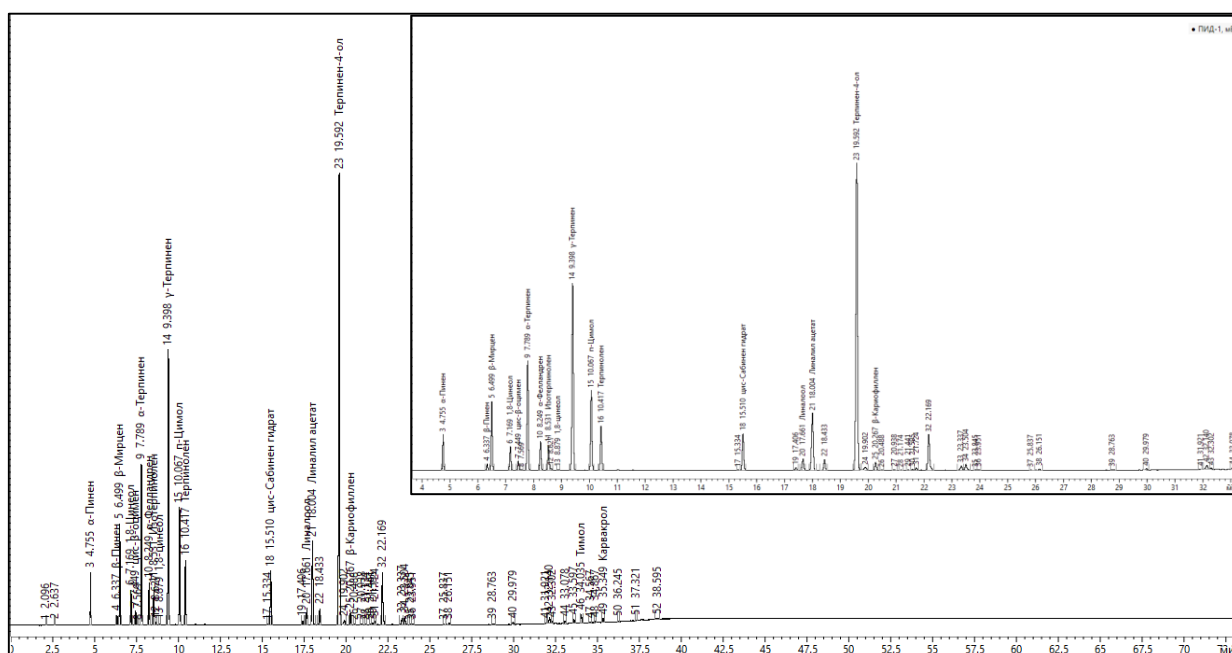


Рисунок 47 – Репрезентативная хроматограмма майорана крымского происхождения на хроматографической колонке DB-WAX. Рисунок подготовлен автором

4.3. Установление критериев пригодности хроматографической системы

Поскольку проведенная апробация хроматографических условий на образцах эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана показала положительные результаты, то в ходе дальнейшей разработки необходимо установить критерии пригодности хроматографической системы. Требования пригодности хроматографической системы для анализа эфирных масел объектов исследования представлены в таблице 34.

Таблица 34 – 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 <i>l</i> -цимола и лимонена, и 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 <i>p</i> -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 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.

Разработанные критерии пригодности хроматографической системы при анализе эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана установлены на основании результатов апробации хроматографических условий на выборке достаточного объема (18, 21, 20 и 15 образцов, соответственно).

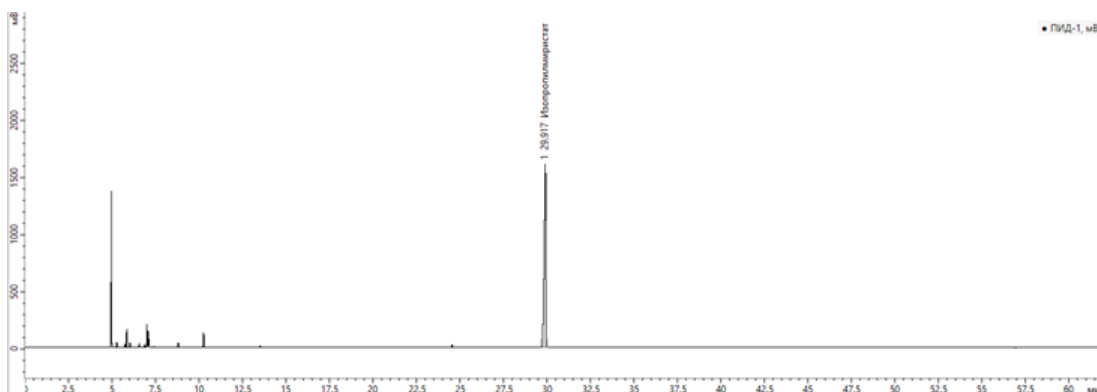
Эфирные масла, как анализируемые объекты, представляют собой многокомпонентные смеси, поэтому к общей эффективности разделения и к разрешающей способности хроматографической системы предъявляются повышенные требования. Для каждого из анализируемых объектов установлено предельное значение теоретических тарелок для подтверждения наличия требуемой эффективности разделения. Для каждого из анализируемых объектов установлена как минимум одна критическая пара пиков, разрешение между которой свидетельствует о приемлемости разрешающей способности системы. Для подтверждения пригодности установлены предельные значения коэффициента асимметрии для наиболее асимметричных пиков.

4.4. Апробация методики анализа для анализа фальсифицированных объектов

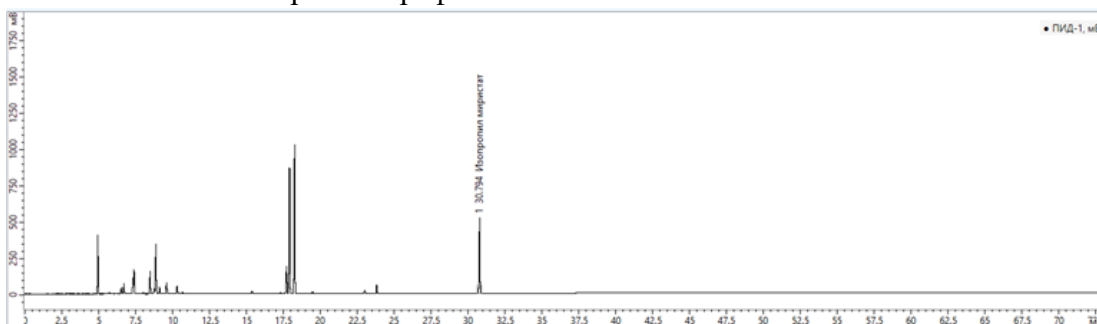
Поскольку одно из назначений апробированной аналитической методики - скрининговый анализ коммерчески доступных эфирных масел, необходимо проведение оценки применимости разработанной методики для анализа фальсифицированной продукции. Наибольший интерес в случае методики газохроматографического анализа представляют коммерческие образцы с добавлением фиксаторов аромата. На рисунке 48 представлены хроматограммы коммерческих образцов эфирных масел с добавками фиксаторов запаха.

На рисунке 48 представлена хроматограмма эфирного масла розмарина лекарственного с изопропилмирикатом, записанная на колонке HP-5 MS UI (№ 1) и хроматограмма эфирного масла шалфея мускатного с изопропилмирикатом, полученная на колонке DB-WAX (№ 2). Каждый из указанных фиксаторов запаха имеет достаточно большое время удерживания, нетипичное для большинства компонентов эфирного масла, поэтому не должен повлиять на разделение пиков целевых соединений. С другой стороны,

общее время хроматографирования должно быть достаточным для элюирования всех основных фиксаторов запаха. Для подтверждения пригодности методики были проанализированы 5 основных фиксаторов запаха: DEP (диэтилфталат), IPM (изопропилмирилат), BS (бензил салицилат), ТЕС (триэтилцитрат), ВНТ (ионол). Времена удерживания пиков фиксаторов запаха по разработанной методике представлены в таблице 35.



Эфирное масло розмарина лекарственного, содержащее изопропилмирилат.
Хроматографическая колонка: HP-5MS UI



Эфирное масло шалфея мукатного, содержащее изопропилмирилат.
Хроматографическая колонка: DB-WAX

Рисунок 48 – Хроматограммы эфирных масел с фиксаторами запаха. Рисунок подготовлен автором

Таблица 35 – Времена удерживания пиков фиксаторов запаха по разработанной методике

Компонент	Времена удерживания, мин	
	Хроматографическая колонка	
	HP-5 MS UI	DB-WAX
Диэтилфталат	23,74	38,67
Изопропилмирилат	29,81	30,78
Бензилсалицилат	31,01	52,57
Триэтилцитрат	25,68	40,70
Ионол	21,40	27,87

Большинство из фиксаторов запаха характеризуется умеренным временем удерживания около 30-40 минут на различных хроматографических колонках, что позволяет успешно разделять пики целевых компонентов эфирного масла и пики возможных фиксаторов запаха. Исключение составляет бензилсалицилат с временем удерживания 52,57 минуты на колонке DB-WAX. Такое высокое время удерживания также однозначно позволяет разделить все целевые пики компонентов эфирного масла с пиком бензилсалицилата, однако не позволяет уменьшить общее время хроматографирования.

В результате апробации установлено, что разработанная методика позволяет проводить анализ фальсифицированных эфирных масел - объектов исследования в присутствии фиксаторов запаха. Установлено, что наличие в пробе фиксаторов запаха из-за их большого времени удерживания не должно искажать результаты определения целевых компонентов эфирных масел.

4.5. Валидация методики газохроматографического анализа эфирных масел

Методика газохроматографического анализа эфирных масел используется для подтверждения его подлинности. В соответствии с требованиями [273, 274] валидация аналитических методик, используемых для доказательства подлинности, проводится только по параметру «Специфичность». Дополнительно в план валидационных испытаний был добавлен тест «Робастность» для подтверждения устойчивости методики.

Валидация аналитической методики проведена с использованием эфирных масел розмарина лекарственного, чабера горного, шалфея мускатного российского и майорана российского происхождения.

Специфичность. Критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Специфичность» следующие:

- Должны выполняться требования пригодности хроматографической системы.

Результаты определения теста «Специфичность» эфирных масел представлены в таблице 36.

Таблица 36 - Результаты определения теста «Специфичность»

Эфирное масло	Критерий пригодности	Результат
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	Неполярная НЖФ: не менее 131452; Полярная НЖФ: не менее 81832

	При использовании колонки с неполярной НЖФ разрешение между пиками лимонена и 1,8-цинеола должно составлять не менее 1,5	<i>Rs</i> (лимонен и 1,8-цинеола) – не менее 1,72
	При использовании колонки с полярной НЖФ разрешение между пиками камфоры и линалоола должно составлять не менее 1,5	<i>Rs</i> – не менее 1,64
	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	Неполярная НЖФ: <i>As</i> (α-пинен) – 1,16; <i>As</i> (1,8-цинеол) – 1,24; <i>As</i> (камфора) – 1,14; Полярная НЖФ: <i>As</i> (α-пинен) – 1,06; <i>As</i> (1,8-цинеол) – 1,13; <i>As</i> (камфора) – 1,09;
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	Неполярная НЖФ: не менее 187531; Полярная НЖФ: не менее 578512
	При использовании колонки с полярной НЖФ разрешение между пиками линалил ацетата и линалоола должно составлять не менее 2,5	<i>Rs</i> – не менее 3,24;
	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	Неполярная НЖФ: <i>As</i> – 1,12; Полярная НЖФ: <i>As</i> – 1,07;
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	Неполярная НЖФ: не менее 134954; Полярная НЖФ: не менее 174620
	При использовании колонки с неполярной НЖФ разрешение между пиками п-цимола и лимонена должно составлять не менее 1,5.	<i>Rs</i> – не менее 2,53;
	Фактор асимметрии пика карвакрола при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,7 до 1,4.	<i>As</i> – 1,26;
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	Неполярная НЖФ: не менее 199132; Полярная НЖФ: не менее 483298
	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	<i>Rs</i> (п-цимол и лимонен) – не менее 1,68; <i>Rs</i> (лимонен и 1,8-цинеола) – не менее 1,72
	Фактор асимметрии пика терпинен-4-ола при анализе на колонке с неполярной НЖФ должен составлять от 0,8 до 1,25.	<i>As</i> – 1,06;

В результате проведенных испытаний установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Специфичность».

Робастность. Установлены следующие критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Робастность»:

- Должны выполняться требования пригодности хроматографической системы при внесении незначительных контролируемых изменений в аналитическую методику.

При проведении теста робастность была проведена проверка пригодности хроматографической системы при изменении объемной скорости газа-носителя ($\pm 10\%$) и при изменении коэффициента деления потока ($\pm 20\%$). Результаты определения теста «Робастность» представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Результаты определения теста «Робастность»

Эфирное масло	Критерий пригодности	Объемная скорость газа носителя - 0,9 мл/мин	Объемная скорость газа носителя - 1,1 мл/мин	Деление потока – 1:160	Деление потока – 1:240
Розмарин лекарственный	Неполярная НЖФ: <i>N</i> для пика α -пинена не менее 90000; Полярная НЖФ: <i>N</i> для пика α -пинена не менее 50000;	Неполярная НЖФ: не менее 131452; Полярная НЖФ: не менее 81832	Неполярная НЖФ: не менее 128901; Полярная НЖФ: не менее 80516	Неполярная НЖФ: не менее 133761; Полярная НЖФ: не менее 83294	Неполярная НЖФ: не менее 129624; Полярная НЖФ: не менее 81234
	Неполярная НЖФ: <i>Rs</i> (лимонен; 1,8-цинеол) – не менее 1,5	<i>Rs</i> – не менее 1,72	<i>Rs</i> – не менее 1,69	<i>Rs</i> – не менее 1,79	<i>Rs</i> – не менее 1,75
	Полярная НЖФ: <i>Rs</i> (камфора; линалоол) – не менее 1,64	<i>Rs</i> – не менее 1,64	<i>Rs</i> – не менее 1,72	<i>Rs</i> – не менее 1,63	<i>Rs</i> – не менее 1,78
	Неполярная НЖФ: <i>As</i> пиков α -пинена, 1,8-цинеола и камфоры – от 0,7 до 1,4. Полярная НЖФ: <i>As</i> пиков α -пинена, 1,8-цинеола и камфоры – от 0,8 до 1,3.	Неполярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,14 до 1,26 Полярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,06 до 1,16	Неполярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,15 до 1,25; Полярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,07 до 1,15	Неполярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,16 до 1,24; Полярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,08 до 1,14	Неполярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,08 до 1,15; Полярная НЖФ: <i>As</i> – от 1,03 до 1,11
Шалфей мускатный	Неполярная НЖФ: <i>N</i> для пика линалил ацетата не менее 150000; Полярная НЖФ: <i>N</i> для пика линалил	Неполярная НЖФ: не менее 187531; Полярная НЖФ: не менее 578512	Неполярная НЖФ: не менее 182441; Полярная НЖФ: не менее 562303	Неполярная НЖФ: не менее 161806; Полярная НЖФ: не менее 491608	Неполярная НЖФ: не менее 185729; Полярная НЖФ: не менее 570261

	ацетата не менее 400000;				
	Полярная НЖФ: Rs (линалоол; линалилацетат) – не менее 2,5	Rs – не менее 3,24;	Rs – не менее 3,08	Rs – не менее 2,81	Rs – не менее 3,17
	Неполярная НЖФ: As пиков линалоола и линалил ацетата – от 0,7 до 1,4. Полярная НЖФ: As пиков линалоола и линалил ацетата – от 0,8 до 1,3.	Неполярная НЖФ: As – от 1,12 до 1,18; Полярная НЖФ: As – от 1,06 до 1,10;	Неполярная НЖФ: As – от 1,13 до 1,17; Полярная НЖФ: As – от 1,07 до 1,09	Неполярная НЖФ: As – от 1,14 до 1,18; Полярная НЖФ: As – от 1,06 до 1,10	Неполярная НЖФ: As – от 1,12 до 1,14; Полярная НЖФ: As – от 1,04 до 1,06
Чабер горный	Неполярная НЖФ: N для пика карвакрола не менее 100000; Полярная НЖФ: N для пика карвакрола не менее 120000;	Неполярная НЖФ: не менее 134954; Полярная НЖФ: не менее 174620	Неполярная НЖФ: не менее 131800; Полярная НЖФ: не менее 169900	Неполярная НЖФ: не менее 138600; Полярная НЖФ: не менее 179300	Неполярная НЖФ: не менее 136100; Полярная НЖФ: не менее 176500
	Неполярная НЖФ: Rs (<i>n</i> -цимол; лимонен) – не менее 1,5	Rs – не менее 2,53;	Rs – не менее 2,38	Rs – не менее 2,29	Rs – не менее 2,67
	Неполярная НЖФ: As пика карвакрола – от 0,7 до 1,4.	As – 1,26;	As – 1,21	As – 1,29	As – 1,24
Майоран	Неполярная НЖФ: N для пика терпинен-4-ола не менее 150000; Полярная НЖФ: N для пика терпинен-4-ола не менее 400000;	Неполярная НЖФ: не менее 199132; Полярная НЖФ: не менее 483298	Неполярная НЖФ: не менее 193771; Полярная НЖФ: не менее 468906	Неполярная НЖФ: не менее 184326; Полярная НЖФ: не менее 427664	Неполярная НЖФ: не менее 215414; Полярная НЖФ: не менее 496747
	Неполярная НЖФ: 1) Rs (<i>n</i> -цимола; лимонен) – не менее 1,5; 2) Rs (лимонен; 1,8-цинеол) – не менее 1,5	1) Rs – не менее 1,68; 2) Rs – не менее 1,72	1) Rs – не менее 1,61; 2) Rs – не менее 1,68	1) Rs – не менее 1,70; 2) Rs – не менее 1,75	1) Rs – не менее 1,76; 2) Rs – не менее 1,81
	Неполярная НЖФ: As пика терпинен-4-ола – от 0,8 до 1,25.	As – 1,06;	As – 1,02	As – 1,10	As – 1,08

В результате проведенных испытаний установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Робастность».

В процессе валидации методики газохроматографического анализа эфирных масел шалфея мускатного, розмарина лекарственного, чабера горного и майорана установлено

соответствие критериям пригодности по тестам «Специфичность» и «Робастность». Результаты проведенных экспериментов однозначно свидетельствуют о пригодности использования методики для анализа эфирных масел с целью подтверждения их идентичности.

Выводы к главе 4

1. Разработана методика газохроматографического анализа эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана. Для разработанной методики проведена успешная апробация на большом числе проб эфирных масел объектов исследования различного происхождения.
2. Особенностью методики является разделение и последующая идентификация компонентов эфирного масла в условиях ортогонального эксперимента – анализа на колонках различной полярности. Преимуществами методики является простота пробоподготовки, высокая эффективность разделения и значительная разделительная способность – разрешение между каждой критической парой пиков при анализе по предлагаемой методике составило более 1,5.
3. Для каждого из анализируемых объектов установлены критерии пригодности хроматографической системы в зависимости от типа используемой хроматографической колонки.
4. Методика была успешно апробирована для решений задач скринингового анализа эфирных масел. Установлено, что при анализе фальсифицированной продукции наличие в пробе специфических фиксаторов запаха не мешает разделению целевых компонентов исследуемых эфирных масел.
5. Для разработанной методики анализа проведена валидация по показателям «Специфичность» и «Робастность». Подтверждена пригодность использования аналитической методики для оценки идентичности эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана.

ГЛАВА 5. Разработка методики количественного определения воды в эфирных маслах

5.1. Выбор метода титрования и оптимизация условий количественного определения

Наличие воды в эфирных маслах является важной характеристикой их качества. Избыточное содержание воды может свидетельствовать о фальсификации эфирного масла и неправильных условиях его хранения. Рекомендуемые ГФ РФ и Ph.Eur 11 методики определения воды в эфирных маслах основаны на качественных реакциях с сероуглеродом и петролейным эфиром [46, 271]. Описанные методики носят сугубо качественный характер и не позволяют определить реальное содержание воды для объективной оценки ее влияния на качественные характеристики эфирного масла.

Среди существующих методов определения воды самым востребованным является титрование по методу Карла Фишера, которое основано на реакции между оксидом серы (IV), йодом, водой, метанолом и ненуклеофильным азотистым основанием – пиридином в классическом варианте или имидазолом в современном варианте титрования (рисунок 49) [276].

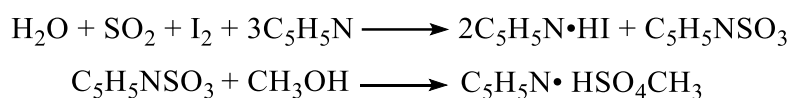


Рисунок 49. Схема реакции по методу Карла Фишера. Рисунок подготовлен автором на основании данных руководства [276]

В тексте документа ISO 11021:1999 описана методика волюметрического титрования по методу Карла Фишера [277]. Существенным недостатком описанной методики являются рекомендуемые объемы пробы: 10 мл эфирного масла при содержании воды менее 1 %. Примечательно, что несмотря на то, что данный стандарт является действующим, в частных стандартах ISO на эфирные масла количественное определение воды (качественное и количественное) не проводится вовсе.

Эффективным решением для снижения расхода пробы при проведении титрования по методу Карла Фишера является реализация кулонометрического титрования [278]. Однако методики кулонометрического титрования эфирных масел не описаны в стандартах и не являются регламентированными.

К особенностям кулонометрического титрования следует отнести генерацию титранта (йода) в ходе анодного окисления йодид аниона, а также высокую чувствительность метода. Кулонометрическое титрование по методу Карла Фишера позволяет производить количественное определение воды в диапазоне от 10 мкг до 10 мг

[276], тем не менее, оптимальное содержание воды для количественного определения находится в диапазоне от 0,5 до 2 мг [279].

Указанные ограничения напрямую влияют на точность и воспроизводимость методики. Поскольку эфирные масла являются жидкими веществами при нормальных условиях, то их количественное определение может быть реализовано путем прямого ввода их в электрохимическую ячейку. Однако, в таком случае, объем пробы составит около 100 мг при содержании воды 1 %. Оптимальным решением в таком случае будет проведение процедуры предварительного растворения эфирного масла в метаноле или другом растворителе. Описанная процедура позволит увеличить объем вводимой пробы и уменьшить воздействие атмосферной влаги при отборе и вводе пробы. При выборе растворителя необходимо учитывать растворимость эфирных масел в метаноле. Раствор эфирного масла должен быть прозрачен и не должно наблюдаться опалесценции.

Разработка и апробация методики титрования проводилась с использованием эфирных масел – объектов исследования: розмарина лекарственного, шалфея мускатного, майорана и чабера горного. Для оценки работоспособности методики было принято решение о расширении объектов исследования и введения в эксперимент эфирных масел с другим качественным набором терпенов: кориандра посевного (*Coriandrum sativum* L.), душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), полыни таврической (*Artemisia taurica* Willd.), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L. ssp. *officinalis*) и шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.). Кроме того, большой набор эфирных масел при разработке необходим для подбора универсальных условий титрования, пригодных для количественного определения в широком диапазоне компонентного состава.

На первоначальном этапе проводилась оценка возможности применения метанола в качестве растворителя. В ходе предварительных экспериментов установлено, что содержание воды в испытуемых эфирных маслах составляет от 0,2 % до 0,7 %. Определено, что растворы испытуемых эфирных масел в метаноле в диапазоне концентраций от 2 до 20 % были прозрачными без признаков опалесценции за исключением эфирных масел шалфея мускатного, майорана и розмарина лекарственного. Поэтому титрование данных масел проводилось в смешанном растворителе (метанол:октан-1-ол, 1:1, v/v).

Для проведения титрования был выбран диапазон концентраций от 10 % до 15 % эфирного масла в метаноле. Таким образом вводимая в ячейку проба, при ожидаемом содержании воды в эфирном масле, обеспечивает оптимальный объем вводимой пробы (раствора эфирного масла в метаноле).

Перед проведением титрования испытуемых образцов эфирного масла было установлено содержание воды в метаноле, которое составило 190,0 ppm. В качестве анолита при титровании использовался реактив Hydranal Coulomat AG (Honeywell, США), содержащий метанол. Результаты количественного определения воды в испытуемых эфирных маслах представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Результаты количественного определения воды в эфирных маслах

Эфирное масло	Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Содержание воды в пробе, ppm	Содержание воды в эфирном масле, %	Среднее значение содержания воды в эфирном масле, %	SD	RSD, %
Чабер горный	552,2	3968,2	965,5	0,654	0,650	0,006	0,88
			965,7	0,654			
			951,5	0,642			
			954,5	0,645			
Кориандр	466,0	3581,6	433,2	0,831	0,832	0,007	0,78
			278,2	0,825			
			317,8	0,832			
			349,8	0,841			
Душица обыкновенная	603,9	4969,2	835,5	0,620	0,618	0,005	0,89
			837,1	0,622			
			824,2	0,610			
			829,2	0,614			
Тимьян обыкновенный	473,1	4852,3	401,4	0,278	0,278	0,002	0,62
			422,9	0,279			
			411,3	0,275			
			399,1	0,278			
Шалфей мускатный	397,4	2987,6	769,4	0,340	0,337	0,005	1,47
			769,4	0,340			
			768	0,339			
			757,4	0,330			
Майоран	426,4	7345,5	725,7	0,600	0,590	0,008	1,37
			717,9	0,586			
			715,6	0,582			
			721,6	0,593			
Розмарин лекарственный	759,3	4874,4	724,3	0,268	0,267	0,003	1,11
			718,6	0,264			
			721,1	0,266			
			727,8	0,271			
Полынь таврическая	475,7	4059,9	565,3	696,5	0,521	0,012	2,22
			239,9	716,6			
			529,6	718,3			
Иссоп лекарственный	394,0	4671,9	375,2	482,2	0,426	0,034	7,93
			217,6	501,3			
			227,3	538,2			
			163,3	482,7			
Шалфей лекарственный	352,4	3984,6	Титрование невозможно по причине слишком большого дрейфа				

Апробация методики количественного определения воды в эфирных маслах показала положительные результаты для эфирных масел чабера горного, кориандра, душицы обыкновенной и тимьяна обыкновенного (таблица 38). Относительное стандартное

отклонение (RSD) по результатам 4 параллельных определений содержания воды в эфирном масле не превышает 1 %, что свидетельствует о высокой повторяемости разработанной методики.

Результаты определения содержания воды в эфирных маслах шалфея мускатного, майорана и розмарина лекарственного характеризуются большими значениями RSD – около 1,5 %. Применение смешанного растворителя на основе метанола и октан-1-ола обеспечивает отсутствие опалесценции у испытуемых растворов и позволяет проводить количественное определение воды в эфирных масла с приемлемой повторяемостью.

Для подтверждения гипотезы отсутствия протекания возможных побочных реакций была проведена оценка дрейфа до и после титрования. В ходе эксперимента наблюдалось повышенное значение дрейфа при титровании эфирных масел полыни таврической, иссопа лекарственного и шалфея лекарственного. При введении эфирного масла шалфея лекарственного величина дрейфа настолько велика, что не позволяет проводить титрование.

Подобные наблюдения указывают на протекание побочных реакций, что свидетельствует о невозможности титрования этих эфирных масел в описанных условиях.

С учетом того, что основу компонентного состава эфирных масел шалфея лекарственного (α - и β -туйон), иссопа лекарственного (изопинокамфон) и полыни таврической (α - и β -туйон) составляют кетоны, то наиболее вероятной побочной реакцией является реакция образования кеталей с метанолом. Реакция α -туйона с метанолом с образованием дикетала представлена на рисунке 50.

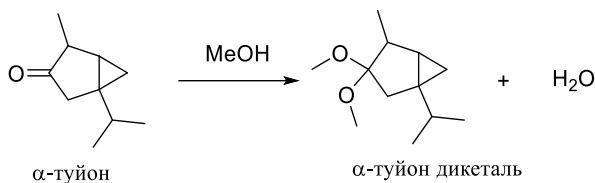


Рисунок 50 – Реакция α -туйона с метанолом с образованием дикетала. Рисунок подготовлен автором

Реакция образованием кеталей сопровождается выделением воды, что в свою очередь приводит к высоким значениям дрейфа во время титрования и завышенным результатам определения. При титровании реакционноспособных кетонов величина дрейфа может быть настолько большой, что титрование провести невозможно.

Для нивелирования реакции образования кеталей следует проводить титрование в среде, свободной от метанола. Однако следует учитывать, что при отсутствии метанола изменяется стехиометрия реакции [280, 281]. Описанный негативный эффект изменения

стехиометрии можно нивелировать использованием специальных реактивов для титрования кетонов и альдегидов на основе гликолей.

С учетом необходимости проведения титрования в среде, свободной от метанола, в качестве растворителя был апробирован ацетонитрил. Однако даже в разбавленных растворах (менее 2 %) эфирных масел шалфея лекарственного, иссопа лекарственного и полыни таврической наблюдается опалесценция. По этой причине было решено проводить их титрование путем непосредственного ввода эфирных масел в электрохимическую ячейку. Несмотря на то, что описанный способ характеризуется большей погрешностью отбора пробы, для описанных эфирных масел он признан оптимальным. В качестве анолита при титровании использовался реактив Hydranal Coulomat AK (Honeywell, США). Результаты количественного определения воды в испытуемых эфирных маслах в безметанольной среде представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Результаты количественного определения воды в эфирных маслах в безметанольной среде

Эфирное масло	Содержание воды в эфирном масле, %	Среднее значение содержания воды в эфирном масле, %	<i>SD</i>	<i>RSD</i> , %
Иссоп лекарственный	0,326	0,325	0,002	0,53
	0,324			
	0,323			
	0,327			
Полынь таврическая	0,404	0,405	0,005	1,27
	0,411			
	0,407			
	0,399			
Шалфей лекарственный	0,170	0,170	0,002	1,38
	0,169			
	0,173			
	0,167			

Использование безметанольной среды с условием прямого ввода эфирных масел в электрохимическую ячейку позволяет оттитровать эфирные масла иссопа лекарственного, полыни таврической и шалфея мускатного с приемлемой повторяемостью ($RSD < 1,4\%$). Несмотря на то, что в данном формате титрования наблюдаемые значения RSD выше, чем в случае титрования растворов эфирных масел (таблица 39), они являются приемлемыми для кулонометрического титрования по методу Карла Фишера. Повышение RSD , в первую очередь, обусловлено погрешностью при отборе пробы в данном варианте титрования. Следует отметить, что при титровании в безметанольной среде отсутствовало повышение дрейфа, что позволяет судить об отсутствии протекания побочных реакций. Таким образом, описанный вариант титрования является оптимальным для эфирных масел с протеканием побочных реакций образования ацеталей и кеталей.

На основании апробации методики количественного определения воды по методу Карла Фишера для 10 различных эфирных масел можно выделить три группы масел в зависимости от типа оптимальных условий титрования. Выделенные группы эфирных масел представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Дифференциация эфирных масел в зависимости от условий титрования по методу Карла Фишера

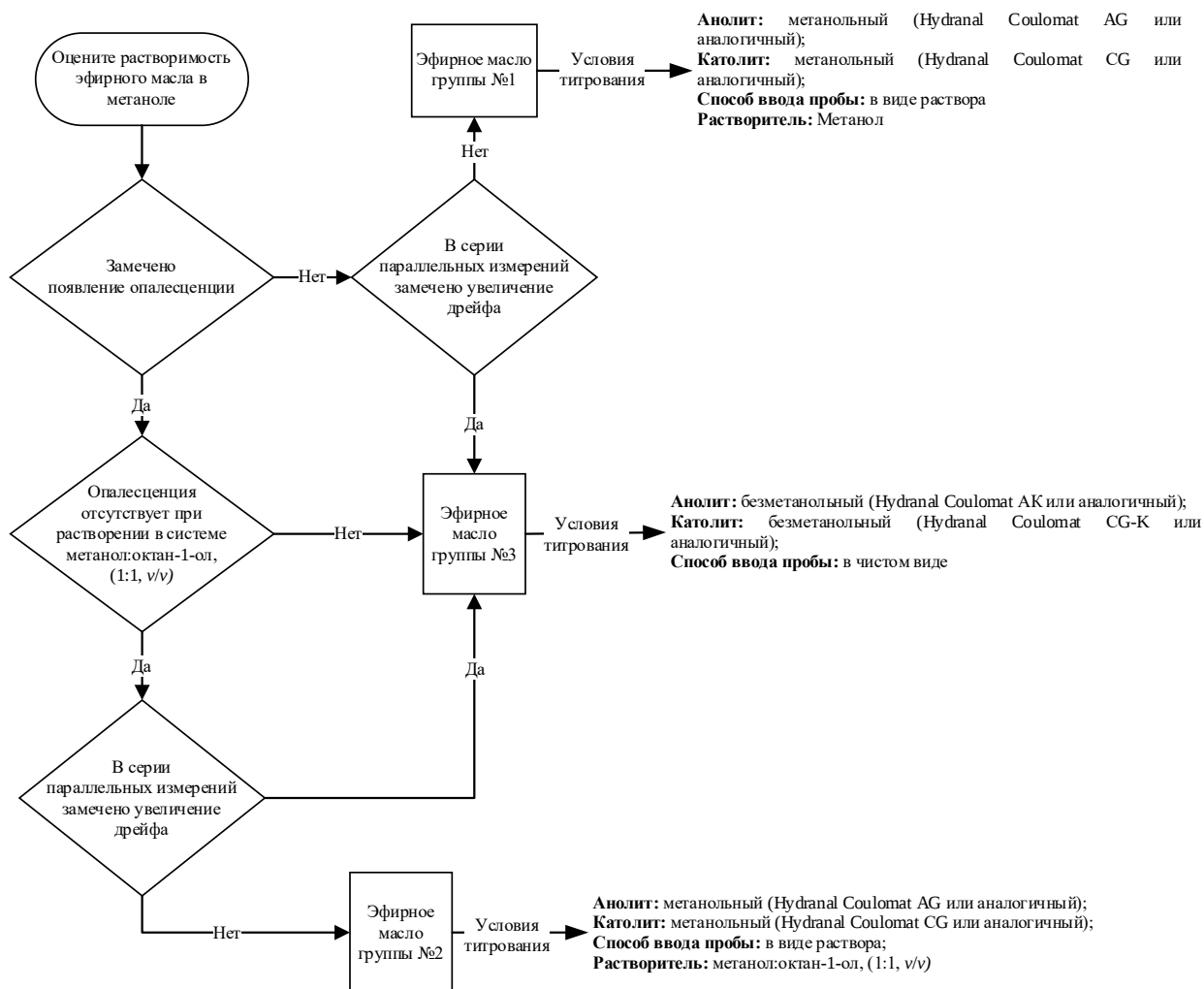
№	Группа	Оптимальные условия титрования	Примеры эфирных масел ЛР
1	Без протекания побочных реакций	Анолит: метанольный (Hydranal Coulomat AG или аналогичный); Способ ввода пробы: в виде раствора Растворитель: Метанол	Чабер горный, Кориандр, Душица обыкновенная, Тимьян обыкновенный
2	Без протекания побочных 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 АК или аналогичный); Способ ввода пробы: прямым вводом без разведения	Иссоп лекарственный, Полынь таврическая, Шалфей лекарственный

Необходимость дифференциации условий напрямую объясняется компонентным составом эфирных масел. Основными компонентами масел первой группы являются спирты и фенолы: линалоол (эфирное масло кориандра) [282], карвакрол (эфирное масло чабера горного и душицы обыкновенной [261]) и тимол (тимьян обыкновенный) [283]. Преобладание подобных соединений в компонентном составе эфирного масла 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 несклонны вступать в побочные реакции в процессе титрования, но для их титрования необходимо использование смешанного растворителя, состоящего из метанола и октан-1-ола для нивелирования опалесценции.

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 определения воды. Оптимальным в данном случае является применение безметанольной среды для титрования с вводом эфирных масел в электрохимическую ячейку без разведения.

Однако с учетом большого разнообразия эфирных масел и вариабельности 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 принятия решений», представленное на рисунке 51.



Примечание: Использование католита необходимо только в случае генераторного электрода с диафрагмой

Рисунок 51 – Дерево принятия решений для выбора условий кулонометрического определения воды по методу Карла Фишера в эфирных маслах. Рисунок подготовлен автором

В соответствии с разработанным деревом решений, для определения оптимальных условий титрования необходимо проведение предварительных испытаний, основанных на оценке растворимости и дрейфа, что свидетельствует о протекании побочных реакций.

Разработанный способ дифференциации эфирных масел в процессе титрования по методу Карла Фишера позволяет рассматривать методику количественного определения воды как унифицированную. Для разработанной методики характерна высокая повторяемость в каждой из трех группы эфирных масел. В процессе разработки был

подобран растворитель, обеспечивающий отсутствие опалесценции у растворов эфирных масел группы 2. Для эфирных масел группы 3 были подобраны оптимальные условия титрования, в которых отсутствуют специфические для метода побочные реакции образования кеталей и ацеталей. После проведения процесса разработки и определения оптимальных условий титрования для трех групп эфирных масел для аналитической методики был проведен процесс валидации.

5.2. Валидация методики количественного определения воды в эфирных маслах

Валидацию аналитической методики проводили по параметрам «Специфичность», «Повторяемость», «Линейность», «Промежуточная прецизионность», «Правильность» и «Робастность» в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» [273] и ICH Q2(R2) «Validation of analytical procedures» [274].

Валидация аналитической методики проведена на образцах эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного. Таким образом, валидация методики проводилась для эфирных масел - представителей каждой из трех групп.

Перед проведением валидации каждое из эфирных масел было предварительно осушено с использованием молекулярных сит $3 \text{ \AA}$ в течение 48 часов. Применение молекулярных сит $3 \text{ \AA}$ для осушения позволяет значительно снизить содержание воды в эфирном масле при отсутствии значимых изменений в компонентном составе – суммарное изменение концентраций компонентов для каждого из эфирных масел не превышало 5 %. Конечное содержание воды в эфирном масле чабера горного составило – 0,006 %, в эфирном масле шалфея мускатного – 0,012 %, в эфирном масле иссопа лекарственного – 0,010 %. Для проведения тестов «Линейность», «Правильность» и «Робастность» использовались предварительно осушенные эфирные масла в качестве матрицы для приготовления модельных растворов с определенной номинальной концентрацией – ожидаемым содержанием воды в эфирном масле. В качестве номинальной концентрации, соответствующей наиболее вероятному содержанию воды в эфирном масле, принята концентрация – 0,75 %. С учетом достаточно широкого возможного диапазона содержания воды в эфирных маслах тесты «Линейность» и «Правильность» проводятся в диапазоне возможного содержания воды от 0,10 до 1,25 %. Тест «Робастность» проводится с использованием модельных растворов с номинальной концентрацией воды в эфирном масле – 0,75 %. При проведении тестов «Повторяемость» и «Промежуточная прецизионность» для испытания использовались неосушенные образцы эфирных масел.

Специфичность. Учитывая стехиометричность реакции Карла Фишера, доказательством специфичности методики является выполнение критерия «Правильность».

Повторяемость. Для доказательства прецизионности методики на уровне повторяемости были использованы неосушенные растворы эфирных масел.

Критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Повторяемость»:

- Стандартное относительное отклонение (RSD), рассчитанное по результатам шести параллельных определений содержания воды в модельном растворе, не должно превышать 2,0 %.

В таблицах 41-43 представлены результаты определения теста «Повторяемость» для эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного.

Таблица 41 – Результаты определения теста «Повторяемость» для эфирного масла чабера горного

Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Содержание воды в пробе, %	Содержание воды в эфирном масле, %
518,5	4055,9	0,07569	0,619
545,3	4232,5	0,07539	0,602
510,1	3829,3	0,07600	0,600
511,8	3996,6	0,07643	0,614
501,3	4237,0	0,07372	0,611
515,0	3863,4	0,07746	0,607
Среднее значение, %			0,609
Стандартное отклонение, %			0,007
Стандартное относительное отклонение, %			1,19

Таблица 42 – Результаты определения теста «Повторяемость» для эфирного масла шалфея мускатного

Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Содержание воды в пробе, %	Содержание воды в эфирном масле, %
455,8	3966,7	0,07984	0,668
536,6	4191,1	0,07437	0,687
510,1	3848,7	0,08034	0,692
520,8	3750,0	0,08139	0,672
452,1	3888,3	0,07878	0,687
547,0	3804,8	0,07938	0,678
Среднее значение, %			0,681
Стандартное отклонение, %			0,009
Стандартное относительное отклонение, %			1,38

Таблица 43 – Результаты определения теста «Повторяемость» для эфирного масла иссопа лекарственного

Масса испытуемого вещества, мг	Содержание воды в эфирном масле, %
487,5	0,764
545,1	0,750
523,2	0,785
509,9	0,749
465,6	0,756
465,6	0,770
Среднее значение, %	0,762
Стандартное отклонение, %	0,014
Стандартное относительное отклонение, %	1,81

Относительное стандартное отклонение (RSD), рассчитанное по результатам 6 повторных определений содержания воды, полученное по валидируемой методике, при испытании эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного не превышает 2,0 %, что соответствует критериям приемлемости для теста «Повторяемость».

- При проведении теста «Правильность» были использованы 6 модельных растворов с номинальным содержанием воды в диапазоне от 0,10 % до 1,25 % в пересчете на содержание воды в испытуемом эфирном масле.

Таблица 44 – Результаты определения теста «Правильность» для эфирного масла чабера горного

Таблица 45 – Результаты определения теста «Правильность» для эфирного масла шалфея мускатного

[illegible]

Стандартное относительное отклонение, %	0,82
Доверительный интервал, %	0,82
Расчетное значение <i>t</i> -критерия	0,49
Критическое значение <i>t</i> -критерия ($t_{p=95\%, f=5}$)	2,57

Таблица 46 – Результаты определения теста «Правильность» для эфирного масла иссопа лекарственного

Масса испытуемого вещества, мг	Масса добавки, мг	Содержание воды в пробе, %	Найденное количество воды, мг	Введенное количество воды, мг	Номинальная концентрация воды в ЭМ, %	Открываемость, %
495,6	106,8	0,09808	0,534	0,541	0,10	101,36
528,5	230,7	0,15659	1,154	1,136	0,25	98,48
470,0	444,3	0,24736	2,222	2,215	0,50	99,69
501,4	623,7	0,28751	3,119	3,185	0,75	102,12
509,2	841,6	0,31075	4,208	4,147	1,00	98,54
454,6	1108,7	0,36299	5,544	5,629	1,25	101,54
Среднее значение открываемости, %						100,29
Стандартное отклонение, %						1,60
Стандартное относительное отклонение, %						1,59
Доверительный интервал, %						1,84
Расчетное значение <i>t</i> -критерия						0,41
Критическое значение <i>t</i> -критерия ($t_{p=95\%, f=5}$)						2,57

В результате проведенных испытаний для эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Правильность». Соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту правильность свидетельствует о соответствии критериям теста «Специфичность».

Линейность. Для доказательства линейности методики были приготовлены модельные растворы с использованием предварительно осушенных эфирных масел с добавлением стандарта воды Hydranal Standard 5.0 с концентрацией воды 5 мг/г. Тест «Линейность» выполнялся совместно с тестом «Правильность». Для проведения теста «Линейность» были приготовлены модельные растворы эфирного масла с добавками стандарта воды в диапазоне номинальных концентраций содержания воды в эфирном масле от 0,10 % до 1,25 %.

Критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Линейность»:

- Коэффициент корреляции (r) не менее 0,99.
- Отрезок, отсекаемый на оси ординат (Y -intercept), линией регрессии не должен превышать 2 % от массы найденной воды в эфирном масле при номинальной концентрации 100 % (содержание воды в эфирном масле - 0,75 %);
- Значение *t*-критерия Стьюдента свободного члена a уравнения линейной регрессии должно быть меньше табличного значения.

- График остатков линейной регрессии должен демонстрировать случайный характер остатков в исследуемом диапазоне при отсутствии какой-либо закономерности.

График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло чабера горного и параметры линии регрессии представлены на рисунке 52.

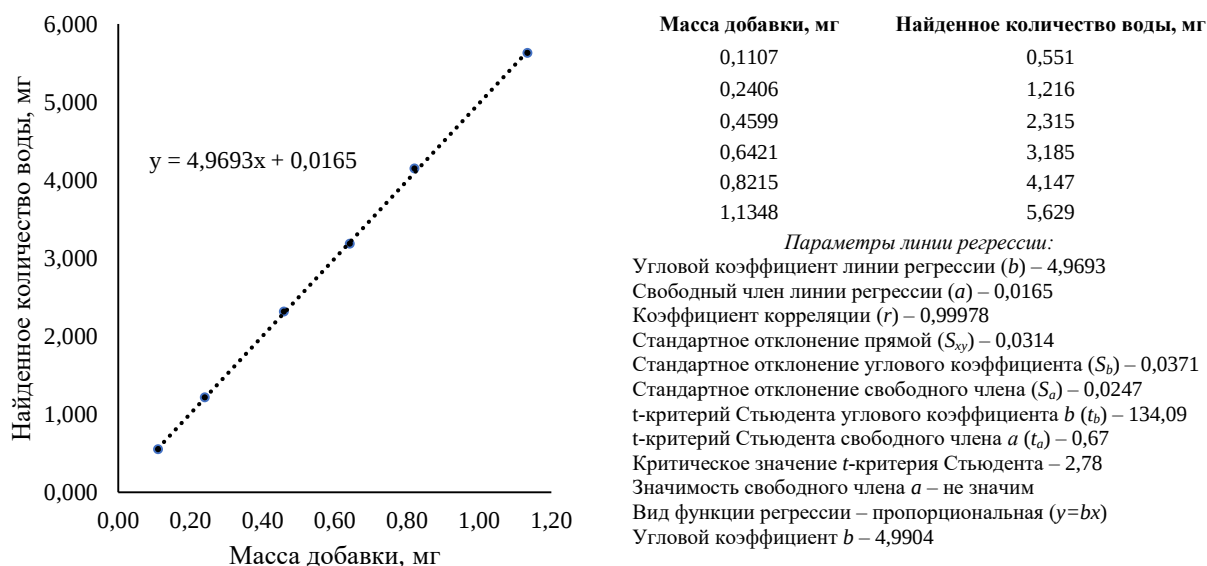


Рисунок 52 – График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло чабера горного и график остатков уравнения регрессии.

Рисунок подготовлен автором

На рисунке 53 представлен график остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла чабера горного.

Анализ графика остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла чабера горного свидетельствует об отсутствии систематических закономерностей, что подтверждает его случайный характер.

График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло шалфея мускатного и параметры линии регрессии представлены на рисунке 54.

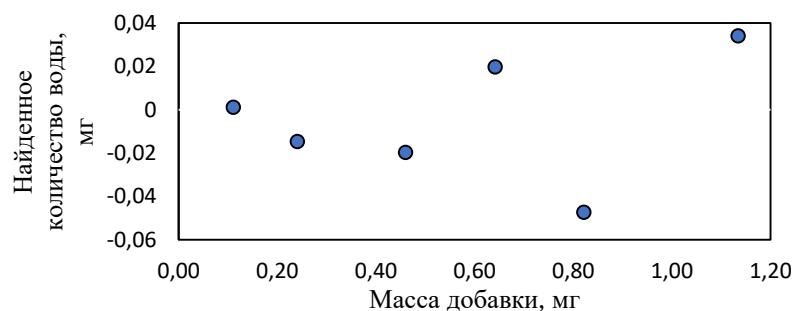


Рисунок 53 – График остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла чабера горного. Рисунок подготовлен автором

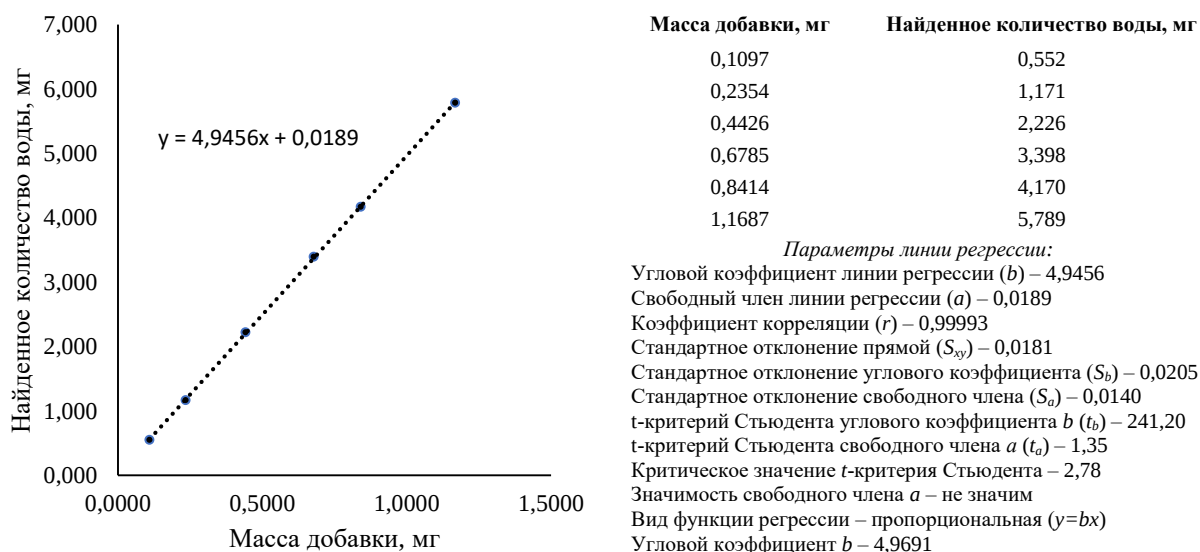


Рисунок 54 – График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло шалфея мускатного и график остатков уравнения регрессии.

Рисунок подготовлен автором

На рисунке 55 представлен график остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла шалфея мускатного.

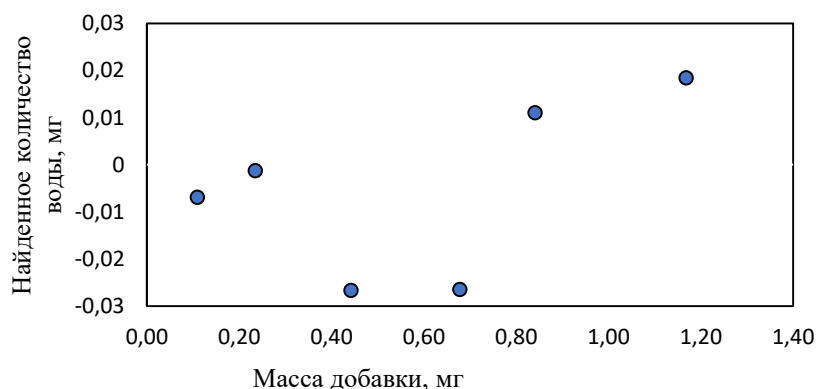


Рисунок 55 – График остатков уравнения линейной регрессии найденного количество воды от массы добавки для эфирного масла шалфея мускатного. Рисунок подготовлен автором

Анализ графика остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла шалфея мускатного свидетельствует об отсутствии систематических закономерностей, что подтверждает его случайный характер.

График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло иссопа лекарственного и параметры линии регрессии представлены на рисунке 56.

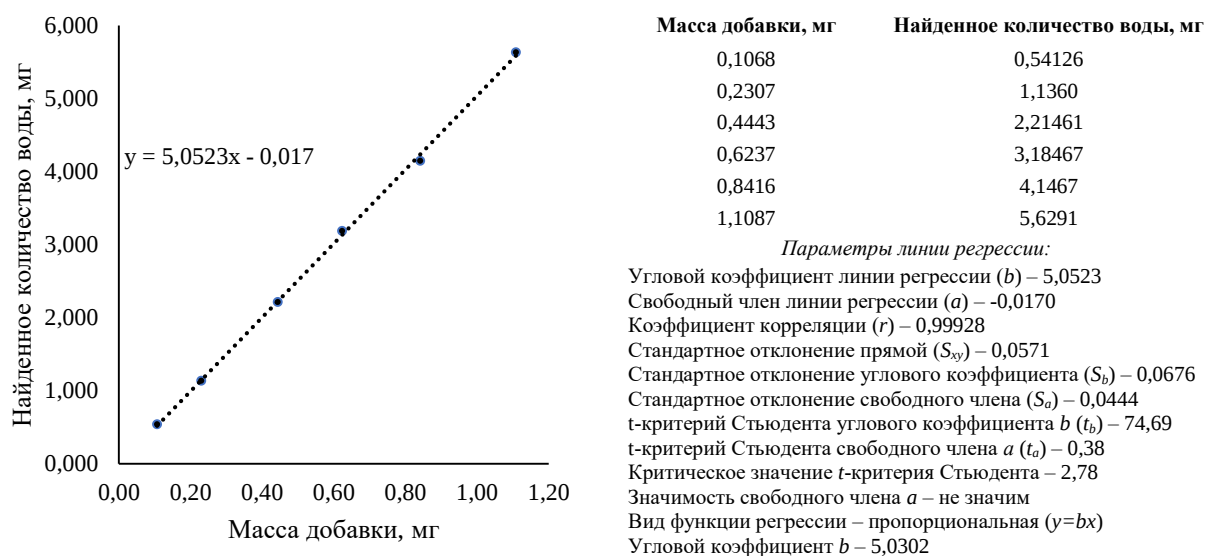


Рисунок 56 – График зависимости найденного количества воды от массы добавки стандарта в эфирное масло иссопа лекарственного и график остатков уравнения регрессии. Рисунок подготовлен автором

На рисунке 57 представлен график остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла иссопа лекарственного.

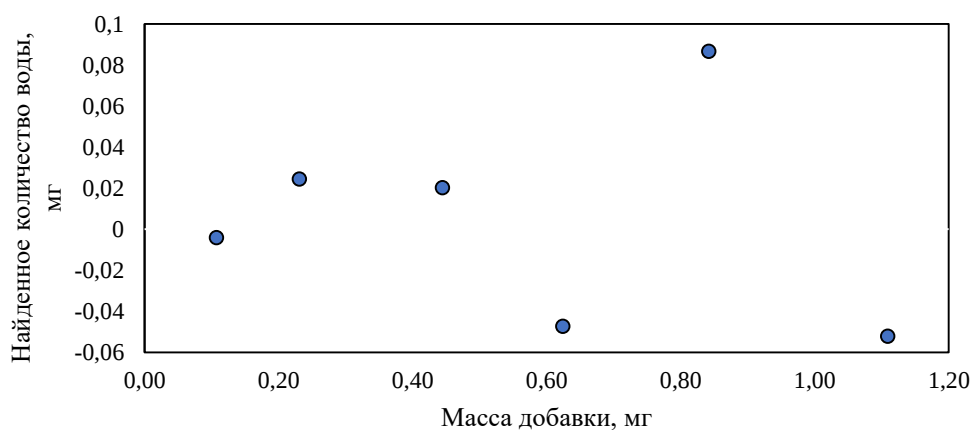


Рисунок 57 – График остатков уравнения линейной регрессии найденного количество воды от массы добавки для эфирного масла иссопа лекарственного. Рисунок подготовлен автором

Анализ графика остатков уравнения линейной регрессии найденного количества воды от массы добавки для эфирного масла иссопа лекарственного свидетельствует об отсутствии систематических закономерностей, что подтверждает его случайный характер.

Сводные результаты определения теста «Линейность» для испытуемых эфирных масел представлены в таблице 47.

Таблица 47 – Сводные результаты определения теста «Линейность» для испытуемых эфирных масел

Критерий	Эфирное масло		
	Чабер горный	Шалфей мускатный	Иссоп лекарственный
	Результат		
Коэффициент корреляции (r) не менее 0,99	0,99978	0,99993	0,99928
Отрезок, отсекаемый на оси ординат (Y -intercept), линией регрессии не должен превышать 2 % от массы найденной воды в эфирном масле при номинальной концентрации 100 % (содержание воды в эфирном масле - 0,75 %)	Не более 0,52 %	Не более 0,56 %	Не более 0,53 %
Значение t -критерия Стьюдента свободного члена a уравнения линейной регрессии должно быть меньше табличного значения	0,67<2,57	1,35<2,57	0,38<2,57
График остатков линейной регрессии должен демонстрировать случайный характер остатков в исследуемом диапазоне при отсутствии какой-либо закономерности	График остатков демонстрирует случайный характер		

В результате проведенных испытаний для эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Линейность».

Промежуточная прецизионность. Для доказательства прецизионности методики на уровне промежуточной прецизионности были приготовлены модельные растворы эфирных масел с использованием предварительно осушенных эфирных масел с добавлением стандарта воды Hydranal Standard 5.0 с концентрацией воды 5 мг/г. Масса добавки воды рассчитывалась так, чтобы содержание воды в эфирном масле с учетом добавки составило 0,75 %.

Критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Повторяемость»:

- Стандартное относительное отклонение (RSD), рассчитанное по результатам шести параллельных определений содержания воды в эфирных маслах, не должно превышать 2,0 %.
- Различие критерия Фишера для двух выборочных дисперсий не должно превышать табличного значения.
- Рассчитанное значение t -критерия Стьюдента для средних результатов двух выборок не должно превышать табличного значения.
- Внутрिलाбораторная прецизионность (объединенный коэффициент вариации), рассчитанная для двух выборок в условиях промежуточной прецизионности не должна превышать 2 %.

Испытание «Промежуточная прецизионность» проводилось с использованием неосушенных образцов эфирных масел. Результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для испытуемых эфирных масел представлены в таблицах 48-50.

Таблица 48 – Результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для эфирного масла чабера горного

Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Содержание воды в пробе, %	Содержание воды в эфирном масле, %
527,1	4223,4	0,07427	0,619
452,1	4039,1	0,07732	0,602
513,4	4290,6	0,07177	0,605
524,9	3907,5	0,07812	0,614
499,9	3758,8	0,07939	0,607
472,5	3895,5	0,07809	0,607
Среднее значение, %			0,609
Стандартное отклонение, %			0,006
Стандартное относительное отклонение, %			1,04
Среднее значение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)			0,609
Стандартное отклонение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)			0,007
Расчетное значение F -критерия Фишера			1,68
Критическое значение F -критерия Фишера ($F(P=95\%, f_1=5, f_2=5)$)			5,05
Средневзвешенная стандартное отклонение			0,007
Расчетное значение t -критерия Стьюдента			0,03
Критическое значение t -критерия Стьюдента ($F(P=95\%, f=10)$)			2,23
Объединенный коэффициент вариации, %			0,79

Таблица 49 – Результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для эфирного масла шалфея мускатного

Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Содержание воды в пробе, %	Содержание воды в эфирном масле, %
495,6	3848,2	0,07920	0,660
528,5	3977,6	0,07935	0,675
470,0	4231,7	0,07788	0,680
501,4	4259,5	0,07540	0,655
509,2	3704,5	0,08235	0,667
454,6	4032	0,07842	0,644
Среднее значение, %			0,667
Стандартное отклонение, %			0,0103
Стандартное относительное отклонение, %			1,54
Среднее значение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)			0,681
Стандартное отклонение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)			0,009
Расчетное значение F -критерия Фишера			0,69
Критическое значение F -критерия Фишера ($F(P=95\%, f_1=5, f_2=5)$)			5,05
Средневзвешенная стандартное отклонение			0,010
Расчетное значение t -критерия Стьюдента			2,13
Критическое значение t -критерия Стьюдента ($F(P=95\%, f=10)$)			2,23
Объединенный коэффициент вариации, %			1,46

Таблица 50 – Результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для эфирного масла иссопа лекарственного

Масса испытуемого вещества, мг	Содержание воды в пробе, %	Содержание воды в эфирном масле, %
480,5	0,29235	0,748
459,8	0,29960	0,776
518,4	0,29100	0,754
494,0	0,28509	0,746
462,2	0,30231	0,771
499,5	0,28434	0,748
Среднее значение, %		0,759
Стандартное отклонение, %		0,014
Стандартное относительное отклонение, %		1,79
Среднее значение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)		0,762
Стандартное отклонение в условиях повторяемости (тест «Повторяемость»)		0,014
Расчетное значение F -критерия Фишера		0,96
Критическое значение F -критерия Фишера ($F(P=95\%, f_1=5, f_2=5)$)		5,05
Средневзвешенная стандартное отклонение		0,014
Расчетное значение t -критерия Стьюдента		0,40

Критическое значение t -критерия Стьюдента ($F(P=95\%, f=10)$)	2,23
Объединенный коэффициент вариации, %	1,80

Сводные результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для испытуемых эфирных масел представлены в таблице 51.

Таблица 51 – Сводные результаты определения теста «Промежуточная прецизионность» для испытуемых эфирных масел

Критерий	Эфирное масло		
	Чабер горный	Шалфей мускатный	Иссоп лекарственный
	Результат		
Стандартное относительное отклонение (RSD), рассчитанное по результатам шести параллельных определений содержания воды в эфирных маслах, не должно превышать 2,0 %.	0,76	1,36	1,10
Различие критерия Фишера для двух выборочных дисперсий не должно превышать табличного значения.	1,39<5,05	2,45<5,05	3,20<5,05
Рассчитанное значение t -критерия Стьюдента для средних результатов двух выборок не должно превышать табличного значения.	1,35<2,23	0,72<2,23	0,34<2,23
Внутрилабораторная прецизионность (объединенный коэффициент вариации), рассчитанная для двух выборок в условиях промежуточной прецизионности не должна превышать 2 %.	0,79	1,23	0,97

В результате проведенных испытаний для эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Промежуточная прецизионность».

Робастность. Ключевыми факторами, влияющими на робастность методики кулонометрического определения воды в эфирных маслах, являются концентрация эфирного масла в растворителе и условия титрования. С целью доказательства робастности были проведены титрования эфирных масел чабера горного и шалфея мускатного с массовой долей эфирных масел 5 % и 15 % и всех испытуемых эфирных масел при различном токе поляризации (I_{pol}): 5 и 20 мкА. Для доказательства робастности методики были приготовлены модельные растворы с использованием предварительно осушенных эфирных масел с добавлением стандарта воды Hydranal Standard 5.0 с концентрацией воды 5 мг/г.

Критерии приемлемости аналитической методики по тесту «Робастность»:

- Величина открываемости для воды должна находиться в диапазоне от 95 % до 105 % от добавленного количества в модельный раствор.

Результаты определения теста «Робастность» для испытуемых эфирных масел представлены в таблицах 52-54.

Таблица 52 – Результаты определения теста «Робастность» для эфирного масла чабера горного

Параметр	Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Масса добавки, мг	Содержание воды в пробе, %	Найденное количество воды, мг	Введенное количество воды, мг	Открываемость, %
Массовая доля – 15 %	464,3	1887,1	609,9	0,11459	3,0247	3,0495	99,19
Массовая доля – 5 %	521,6	8477,2	607,2	0,04817	3,0647	3,0360	100,94
I _{pol} – 5 мкА	468,9	3734,3	648,1	0,08188	3,2695	3,2405	100,89
I _{pol} – 20 мкА	499,8	4106,5	632,5	0,07616	3,2185	3,1625	101,77
Среднее значение открываемости, %							100,70
Стандартное отклонение, %							1,09
RSD, %							1,08

Таблица 53 – Результаты определения теста «Робастность» для эфирного масла шалфея мускатного

Параметр	Масса испытуемого вещества, мг	Масса растворителя, мг	Масса добавки, мг	Содержание воды в пробе, %	Найденное количество воды, мг	Введенное количество воды, мг	Открываемость, %
Массовая доля – 15 %	564,3	1890,6	624,6	0,11540	3,1447	3,1230	100,69
Массовая доля – 5 %	421,6	8548,4	614,5	0,04861	3,0647	3,0725	99,75
I _{pol} – 5 мкА	459,3	3788,9	654,1	0,08178	3,2695	3,2705	99,97
I _{pol} – 20 мкА	481,4	4116,4	623,4	0,07584	3,1585	3,1170	101,33
Среднее значение открываемости, %							100,43
Стандартное отклонение, %							0,72
RSD, %							0,72

Таблица 54 – Результаты определения теста «Робастность» для эфирного масла иссопа лекарственного

Параметр	Масса испытуемого вещества, мг	Масса добавки, мг	Содержание воды в пробе, %	Найденное количество воды, мг	Введенное количество воды, мг	Открываемость, %
I _{pol} – 5 мкА	423,6	642,1	0,08114	3,2695	3,2105	101,84
I _{pol} – 20 мкА	454,6	632,4	0,07470	3,1585	3,1620	99,89
Среднее значение открываемости, %						100,86
Стандартное отклонение, %						1,38
RSD, %						1,37

В результате проведенных испытаний для эфирных масел чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного установлено соответствие валидируемой методики всем критериям приемлемости по тесту «Робастность».

В процессе валидации методики количественного определения воды в эфирных маслах чабера горного, шалфея мускатного и иссопа лекарственного установлено соответствие критериям приемлемости по критериям «Специфичность», «Правильность», «Линейность», «Повторяемость», «Промежуточная прецизионность» и «Робастность». Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о пригодности использования методики для количественного определения воды в эфирных маслах трех основных групп в реакции кулонометрического титрования.

Для разработанной и валидированной методики количественного определения воды в эфирных маслах методом кулонометрического титрования по методу Карла Фишера разработан проект ГОСТ, представленный в приложении Г.

Выводы к главе 5

1. Современный подход к контролю содержания воды в эфирных маслах, основанный на использовании регламентированных фармакопейных методик, носит качественный характер. В то же время количественная оценка содержания воды является точной характеристикой качества эфирного масла с учетом возможного негативного влияния ее содержания на качество.
2. В результате проведенных исследований была разработана методика количественного определения воды в эфирных маслах методом кулонометрического титрования по методу Карла Фишера. Методика была апробирована на 10 различных видах эфирных масел.
3. В ходе разработки установлено, что для эфирных масел необходима дифференциация условий в зависимости от поведения в условиях титрования. Возможные негативные эффекты, возникающие в процессе титрования были систематизированы, а эфирные масла были разделены на три основные группы в зависимости от оптимальных условий титрования:
 - Группа 1: Эфирные масла, титрующиеся без протекания побочных реакций;
 - Группа 2: Эфирные масла, титрующиеся без протекания побочных реакций, но с появлением опалесценции при растворении;
 - Группа 3: Эфирные масла, титрующиеся с протеканием побочных реакций.
4. Для предложенной методики разработана дерево принятия решений по выбору оптимальных условий титрования эфирного масла в зависимости от его поведения при кулонометрическом титровании по методу Карла Фишера. Разработанное дерево решений позволяет проводить кулонометрическое определение в эфирных маслах, титрование которых по описанной методике еще не апробировано.
5. Использование дифференциации оптимальных условий титрования в зависимости от поведения эфирного масла при кулонометрическом титровании по методу Карла Фишера и разработанное дерево решений позволяет рассматривать методику как унифицированную для определения содержания воды в эфирных маслах.
6. 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.

ГЛАВА 6. Разработка алгоритма изучения стабильности эфирных масел

6.1. Разработка алгоритма исследования стабильности

Как видно из обзора дизайнов экспериментов изучения стабильности эфирных масел (Глава 1.4.3.), при изучении долгосрочной стабильности основной упор делается именно на моделирование условий хранения, а не на изучение влияния отдельных факторов, влияющих на стабильность. Описанный подход является правильным, но тем не менее недостаточно обширным при подробном рассмотрении экспериментальных условий.

Дизайн большинства экспериментов в данных исследованиях предполагает целенаправленное варьирование лишь одного параметра: температуры хранения эфирного масла, тогда как воздействие УФ-излучения изучается опосредовано. Влияние наличия кислорода в долгосрочных исследованиях не изучается вовсе, несмотря на достаточную простоту реализации эксперимента.

Наиболее комплексным подходом в данном случае является проведение факторного эксперимента.

При использовании данного подхода варьируется тремя основными факторами: температура (3 уровня), наличие кислорода (2 уровня) и наличие УФ-излучения (2 уровня) при общей комбинации факторов – 12. Число контрольных точек является опциональным, но минимальным количеством являются 5 точек – начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев. Программа изучения стабильности, основанная на факторном эксперименте, представлена в таблице 55.

Таблица 55 – Программа изучения стабильности, основанная на факторном эксперименте

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

Тем не менее, эта программа является достаточно избыточной. Эксперименты № 1, 3, 5 и 7 можно исключить, поскольку они не моделируют условия реального хранения – в

условиях хранения в морозильной и холодильной камере влияние рассеянного света незначительно.

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. При варьировании температуры хранения предлагается использовать распространенный подход с тремя температурными зонами: от $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$; от $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ и от $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Воздействие влияния кислорода будет оцениваться путем проведения параллельного исследования стабильности в нормальной (воздушной) и инертной атмосфере. А воздействие УФ-излучения путем параллельного исследования с воздействием рассеянного света и без него при хранении образцов. При составлении алгоритма учитывались два основных этапа хранения эфирного масла: хранение до первого вскрытия и после него.

Программа изучения стабильности с учетом мультифакторного влияния приведена в таблице 19 (раздел 2.6.).

Эксперименты № 1, 4 и 5 в таблице 19 (раздел 2.6.) 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 при его хранении моделируются в экспериментах № 2, 3, 6, 7 и 8.

Исходя из выбора факторов хранения, которые оказывают влияние на стабильность и качество эфирного масла, нами было разработано «Дерево принятия решений» при изучении стабильности», которое представлено на рисунке 58. В соответствии с предлагаемым «деревом принятия решений» в случае значимых изменений в компонентном составе в ходе экспериментов № 5, 6, 7 и 8 предлагается для указанных экспериментов 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.

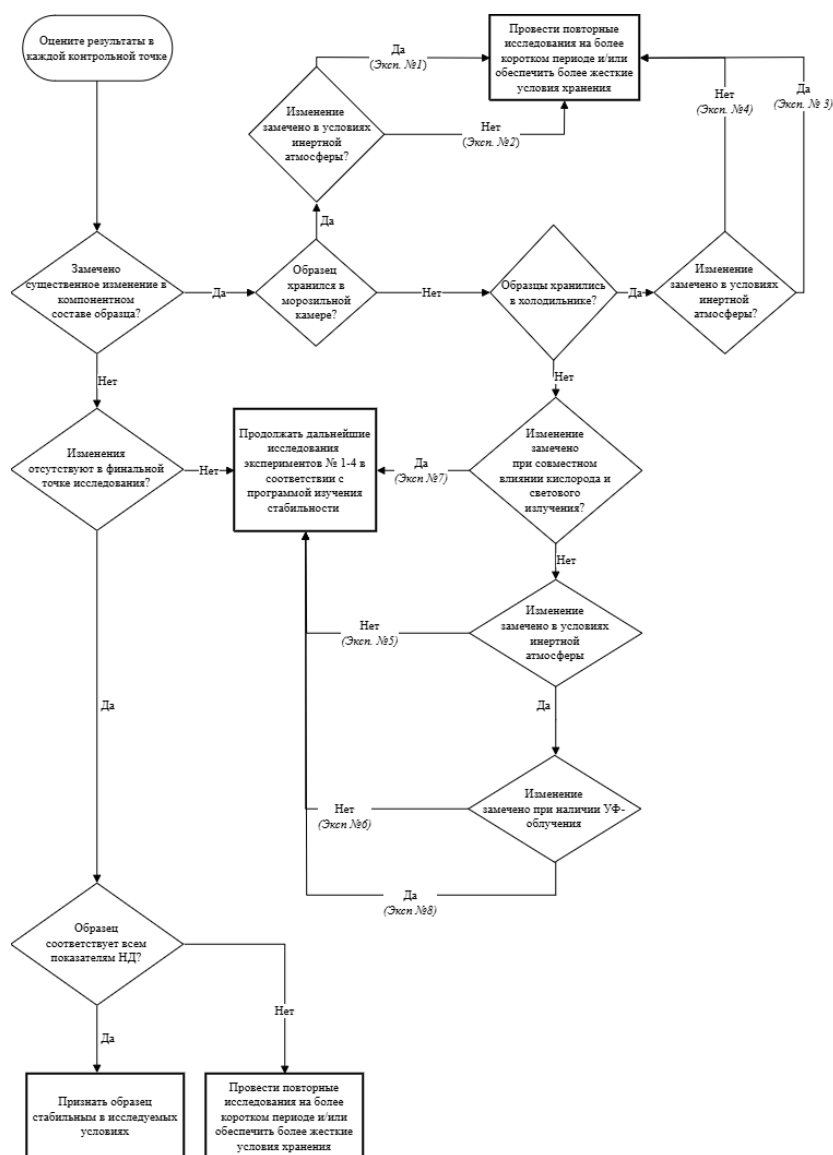


Рисунок 58 – Дерево принятий решений при изучении стабильности эфирных масел.

Рисунок подготовлен автором

Программа предполагает изучение стабильности эфирных масел в течение 12 месяцев с пятью точками контроля: начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев с возможностью дальнейшего изучения стабильности.

Для изучения стабильности предложено использовать два основных метода анализа: газовая хроматография для определения изменений в хроматографическом профиле в каждой точке испытания и йодометрическое титрование для определения показателя «Пероксидное число» [284] и контроля содержания гидропероксидов в трех точках контроля: начальной, 6 и 12 месяцев. Косвенно увеличение содержание гидропероксидов будет заметно в ходе ГХ-анализа при изучении хроматографического профиля эфирного масла.

В случае подтверждения факта стабильности эфирного масла в конечной точке исследования в различных условиях рекомендация по выбору условий хранения остается

за производителем. При этом важно отметить, что срок годности эфирного масла может быть установлен в соответствии со сроком проведенных испытаний без проведения экстраполяции.

Двумя важными требованиями перед проведением исследований является наличие разработанного хроматографического профиля эфирного масла, что в рамках исследования стабильности необходимо для однозначного определения соответствия спецификации эфирного масла в каждой точке контроля.

С целью дальнейшей унификации процесса изучения стабильности в соответствии с разработанной программой изучения стабильности был разработан проект ОФС «Стабильность эфирных масел», представленный в приложении Д.

6.2. Исследование стабильности эфирных масел объектов исследования

6.2.1. Исследование стабильности эфирного масла розмарина лекарственного

В качестве объекта исследования при проведении исследования стабильности использовался коммерчески доступный образец эфирного масла розмарина лекарственного. Дата производства эфирного масла – 14.03.2024, срок годности – 2 года. Дата начала эксперимента – 31.05.2024, дата окончания эксперимента – 26.11.2025. Регион происхождения эфирного масла: Испания, провинция Мурсия (37.99, 1.13).

Для эфирного масла розмарина лекарственного, в соответствии с разработанным протоколом изучения стабильности, проведено 18-месячное изучение стабильности. Результаты изучения стабильности в начальных условиях и в каждой из 8 экспериментальных точек по специфицируемым показателям представлены в таблице 56. С учетом региона происхождения и особенностей компонентного состава за основу при проведении исследования были взяты требования ISO 1342:2012 к эфирному маслу розмарина лекарственного испанского типа.

Исследуемое эфирное масло, несмотря на незначительное несоответствие его хроматографического профиля, можно отнести к испанскому типу в соответствии с ISO 1342:2012. По этой причине результаты исследования стабильности по показателям «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость», «Кислотное число» и «Хроматографический профиль» оценивались по заранее установленным ISO нормам. Определение показателя «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» проводилось в соответствии с требованиями ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла» [271].

Таблица 56 – Результаты 18-месячного изучения стабильности эфирного масла розмарина лекарственного

Показатель	Норма Ph.Eur 11	№ Эксперимента в соответствии с программой								
		Начальная точка	1	2	3	4	5	6	7	8
		Результат								
Описание	Прозрачная жидкость от бесцветного до бледно-желтого или зелено-желтого цвета со специфическим запахом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Относительная плотность	От 0,892 до 0,910	0,895	0,895	0,896	0,895	0,896	0,897	0,899	0,905	0,903
Показатель преломления	От 1,464 до 1,472	1,467	1,467	1,467	1,467	1,468	1,469	1,469	1,472	1,470
Угол вращения	От -6° до +8°	-2,16°	-2,12°	-2,17°	-2,26°	-2,06°	-2,01°	-1,86°	-1,61°	-1,79°
Растворимость	Смешивается с 90 % этиловым спиртом с получением прозрачного раствора в объемном соотношении 3:1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Кислотное число	Не более 2,0	0,66	0,69	0,73	0,72	0,79	0,85	1,06	1,54	1,36
Пероксидное число	Не более 2,0	1,34	1,35	1,37	1,42	1,48	1,5	1,77	1,99	2,29
Хроматографический профиль	α -Пинен - от 18,0 до 26,0 %	22,42	22,01	22,02	21,99	20,99	20,27	19,31	15,41	18,80
	Камфен - от 7,0 до 13,0 %	8,06	7,94	8,17	8,17	7,82	8,53	7,42	7,42	9,12
	β -Пинен - от 2,0 до 5,0 %	6,40	6,37	6,52	6,51	5,55	4,70	4,20	4,20	4,28
	β -Мирцен - от 2,5 до 4,5 %	0,42	0,20	0,21	0,20	0,08	0,04	0,04	0,04	0,05
	Лимонен - от 2,5 до 5,5 %	5,27	4,95	4,90	4,83	4,86	3,84	3,20	3,20	2,81
	1,8-Цинеол - от 16,0 до 23,0 %	24,54	24,52	24,23	24,28	25,06	25,71	25,46	25,46	22,91
	p-Цимол - от 1,0 до 2,0 %	5,99	6,21	6,00	6,04	6,02	5,32	6,05	6,05	6,59
	Камфора - от 12,5 до 22,0 %	17,60	17,95	17,93	17,97	20,46	18,41	19,34	21,27	20,20
	Линалоол - от 0,5 до 2,5 %	0,44	0,95	0,92	0,91	0,92	0,82	0,88	0,87	0,85
	Борнилацетат - от 0,5 до 2,5 %	1,29	1,76	1,70	1,70	1,70	1,81	1,85	2,12	2,02
	α -Терпинеол - от 1,0 до 4,0 %	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,40	0,42
	Борнеол - от 1,0 до 4,5 %	3,35	3,64	3,76	3,75	3,98	3,81	3,97	4,41	4,45
	Вербенон - от 0,7 до 2,5 %	0	0	0	0	0	0	0	0,06	0,08
Вода	Не более 0,8 %	0,27	0,34	0,36	0,35	0,42	0,46	0,51	0,59	0,66
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Несоотв.	Несоотв.
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,4 %	0,15	0,12	0,15	0,15	0,18	0,21	0,21	0,39	0,30

Нормирование показателей «Пероксидное число», «Вода» и «Остаток после выпаривания эфирного масла» проводился уже на основании результатов исследования стабильности.

Наименее репрезентативными в контексте оценки стабильности эфирного масла и оценки динамики изменений в его компонентном составе являются показатели «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость». Даже при наличии значимых изменений в компонентном составе указанные показатели изменяются незначительно, что видно при анализе результатов, полученных в экспериментальных условиях № 7. Тем не менее, подобное явление можно объяснить близостью значений измеряемых показателей для большинства компонентов эфирного масла, а также аддитивным характером этих показателей. Таким образом для наличия значимого изменения в каждом из показателей необходимы существенные девиации в компонентном составе.

Однако контроль описанных показателей является обязательной процедурой, поскольку каждый из них является косвенной характеристикой чистоты и непосредственной характеристикой идентичности. В результате проведенных исследований в каждом из экспериментов не обнаружено несоответствий требованиям спецификации по описанным показателям.

Несоответствие по показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» для экспериментов (№ 7 и № 8) по итогам 18-месячных исследований свидетельствуют о накоплении осмолившихся веществ, что коррелирует с результатами по показателю «Остаток после выпаривания эфирного масла». Наличие осмолившихся веществ является веским основанием для фиксации «значимых изменений» в эфирном масле в описанных условиях эксперимента. Следовательно, можно говорить об отсутствии стабильности эфирного масала в этих условиях хранения в течение 18 месяцев.

Хроматографический профиль эфирного масла является одной из его важнейших характеристик, определяющей идентичность. Оценка динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля (таблица 56) эфирного масла розмарина лекарственного представлена на рисунке 59.

Уровень статистической значимости различий концентраций компонентов определялся с помощью однофакторного дисперсионного анализа (*one-way ANOVA*). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$. В случае наличия значимых различий проводили последующее множественное сравнение по методу Тьюки (*Tukey HSD*). При проведении оценки концентрации компонентов из экспериментов № 1-8 сравнивали их с начальным значением. Для каждого из компонентов в подавляющем

большинстве случаев наблюдаются статистически значимые отличия ($p < 0,001$) в концентрациях в сравнении с начальной точкой. Подобное явление объясняется крайне высокой воспроизводимостью ГХ-анализа с использованием метода внутренней нормализации. Таким образом, дисперсии для каждой выборки являются достаточно малыми для адекватной статистической оценки с помощью классического дисперсионного анализа (ANOVA), что не говорит о невозможности его применения.

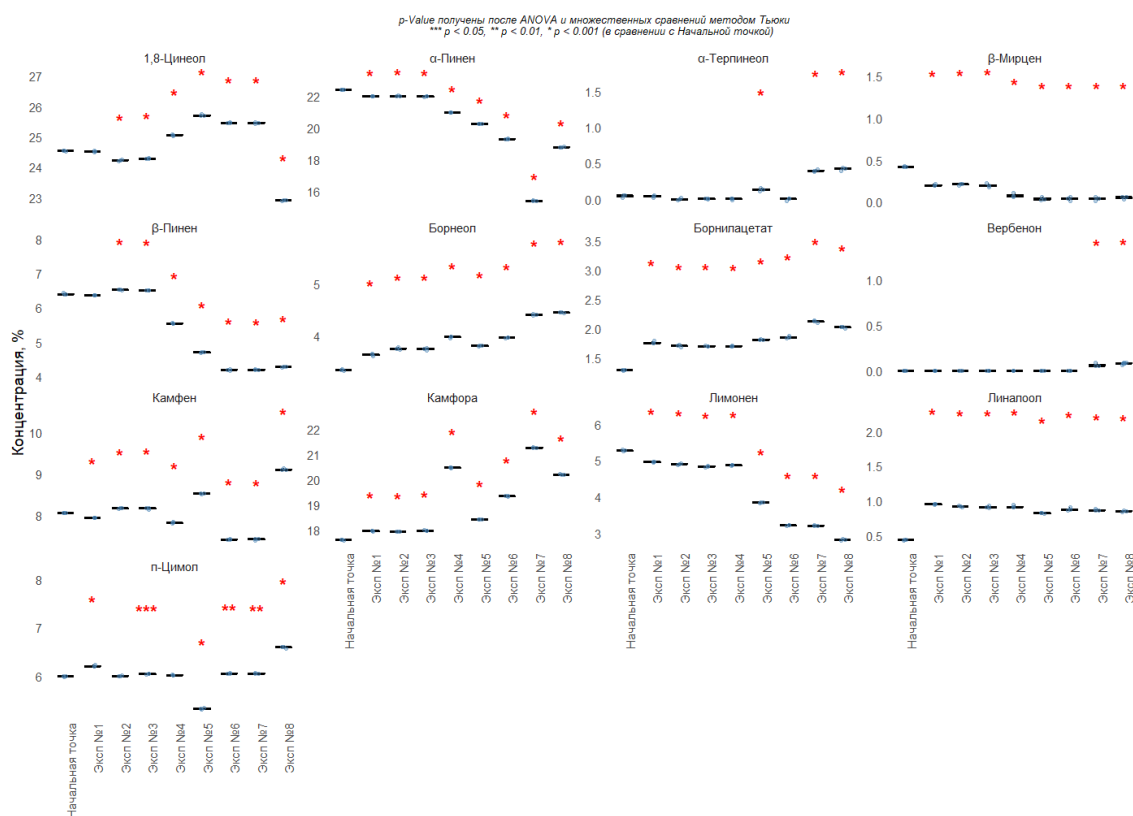


Рисунок 59 – Оценка динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного представленная с помощью ANOVA. Рисунок подготовлен автором

С учетом особенностей анализа одним из возможных статистических методов оценки динамики изменений является байесовский однофакторный дисперсионный анализ. Поскольку для эфирных масел является нормальным достаточно большая вариабельность состава, то статистический анализ следует проводить с применением области практической эквивалентности (ROPE, Region of Practical Equivalence). Данный параметр позволяет установить предельный порог относительного изменения концентрации компонента эфирного масла, ниже которого изменения будут считаться незначительными. В качестве области практической эквивалентности использовалось опорное значение – 5 % от концентрации компонента эфирного масла, таким образом, все изменения менее этого порога не являются статистически значимыми. Результаты оценки динамики изменения

концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного представлены на рисунке 60.

Для борнеола, борнилацетата, β -мирцена, лимонена и линалоола статистически значимое изменение концентрации наблюдается в каждой экспериментальной точке. Подобные наблюдения позволяют отнести перечисленные компоненты к наиболее лабильным в компонентном составе, поскольку изменение их концентрации происходит вне зависимости от условий хранения.

С другой стороны, достаточная стабильность концентраций отмечается для 1,8-цинеола, вербенона, п-цимола, камфоры, α -терпинеола. Следует отметить, что наибольшее значение Байесова коэффициента, превышающее 100, свидетельствующее о решающем отличии от концентрации компонента в составе эфирного масла в начальной точке эксперимента, отмечено для экспериментов № 7 и № 8. Напротив, для экспериментов № 1-3 в целом не характерно наличие значимых изменений для основных компонентов профиля, все наблюдаемые значимые изменения относятся исключительно к минорным компонентам. Для экспериментов № 4-6 характерна умеренная динамика изменения концентрации компонентов хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного.

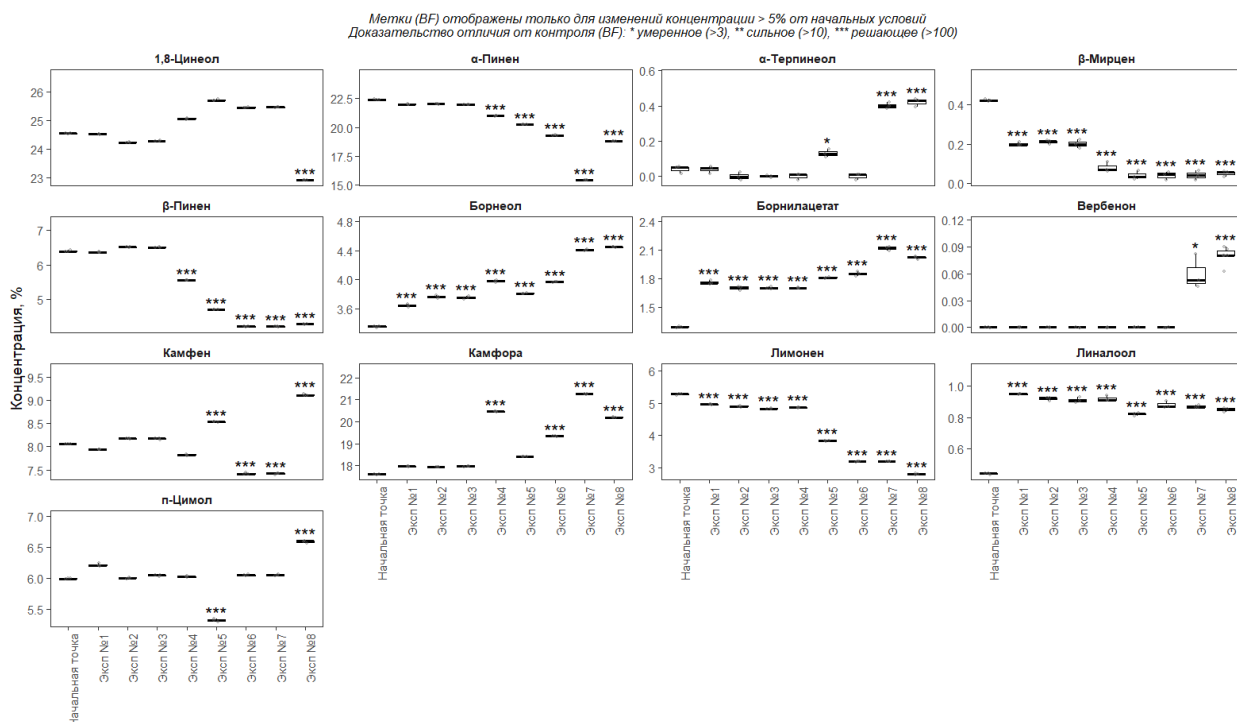


Рисунок 60 – Результаты оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного с помощью Байесовского однофакторного дисперсионного анализа. Рисунок подготовлен автором

Применение байесовского однофакторного дисперсионного анализа не позволяет однозначно судить о стабильности эфирного масла, однако, позволяет судить о динамике изменения концентраций конкретного компонента эфирного масла.

Матрица изменений концентрации начальных компонентов представлена в таблице 57, матрица суммарных изменений концентраций компонентов представлена в таблице 58.

Таблица 57 – Матрица изменений концентрации начальных компонентов

№ Эксп	Срок хранения					Условия хранения		
	3	6	9	12	18			
	Изменение концентрации (ΔC), %					УФ	Атмосфера	Температура, °C
1	0,43	0,60	0,58	0,31	0,55	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,00	0,58	0,16	0,34	0,56		Нормальная	
3	0,28	0,03	0,51	0,34	0,67	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	0,35	1,81	2,40	3,38	0,81		Нормальная	
5	0,47	1,18	1,92	1,26	2,89	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	0,17	1,48	3,39	2,65	6,29		Нормальная	
7	0,03	0,13	1,02	3,83	7,18	Рассеянный свет	Нормальная	
8	0,03	0,13	2,53	2,35	5,56		Инертная	

Условия экспериментов 1-3 (таблица 57-58) свидетельствуют о минимальном характере изменений в компонентном составе эфирного масла. В данном случае наименьшее изменения отмечены при хранении в условиях морозильной камеры в инертной атмосфере при отсутствии УФ-излучения. Схожий характер изменений наблюдается и при хранении в аналогичных условиях, но в условиях нормальной атмосферы. Сопоставимые же результаты получены при хранении в холодильной камере в инертной атмосфере при отсутствии УФ-излучения.

Таблица 58 – Матрица суммарных изменений концентраций компонентов

№ Эксп	Срок хранения					Условия хранения		
	3	6	9	12	18			
	Изменение концентрация ($\Sigma \Delta C$), %					УФ	Атмосфера	Температура, °C
1	2,06	1,97	2,47	3,18	4,88	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	1,68	2,42	2,68	4,63	4,89		Нормальная	
3	1,83	5,49	5,24	4,88	5,02	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	3,03	5,80	8,09	9,62	10,77		Нормальная	
5	2,35	4,30	6,16	9,01	12,40	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	2,20	4,33	7,15	10,44	14,93		Нормальная	
7	2,37	3,37	3,77	9,02	21,13	Рассеянный свет	Нормальная	
8	2,37	3,37	4,91	9,43	18,67		Инертная	

При оценке изменений в компонентном составе следует понимать, что параметр ΔC может давать искаженную оценку в определенной экспериментальной точке. Так при взаимном переходе одного компонента в другой будет наблюдаться его минимальное значение, что заметно при рассмотрении экспериментов 1 и 2 в точке 9 месяцев или эксперимента 4. С другой стороны, параметр $\Sigma \Delta C$ позволяет оценить суммарную динамику и для него характерен в целом линейный характер.

Изменение в компонентном составе в условиях эксперимента 4 в целом сопоставимо с изменениями в условиях эксперимента 5, однако повышение температуры до комнатного уровня даже при условии инертной атмосферы значительно увеличивает степень изменений в компонентном составе.

В ходе эксперимента 6 отмечено значительное накопление соединений, образующихся в процессе хранения - *транс*-пинокарвил ацетата, изовербенил ацетат, *цис*-пинокарвил ацетата и миртенил ацетат. Образование значимого количества ранее недетектируемых соединений заметно при рассмотрении показателя ΔC – 6,29 против 2,89 для эксперимента 5.

Накопление описанных соединений характерно и для экспериментов № 7 и № 8, однако, уже в большем количестве, что непосредственно обусловлено условиями хранения. Суммарная степень изменения в компонентном составе (ΔC) составляет 21,13 % и 18,67 % для экспериментов № 7 и № 8, соответственно.

Хроматографический профиль эфирного масла (таблица 56) остается в достаточной мере стабильным в экспериментах № 7-8, поскольку с его помощью возможно произвести идентификацию эфирного масла. При этом суммарное содержание изначальных компонентов хроматографического профиля изменилось не менее чем на 5,56 % с появлением в составе значительного количества нехарактерных для него компонентов.

Значение показателя «Пероксидное число» является важным маркером химической стабильности эфирного масла, его увеличение косвенно свидетельствует о накоплении гидропероксидов в составе эфирного масла. Матрица изменений показателя «Пероксидное число» представлена в таблице 59.

Таблица 59 – Матрица изменений показателя «Пероксидное число»

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	Начальные условия	6	12	18	УФ	Атмосфера	Температура, °C
1	1,34	1,35	1,35	1,35	Темнота	Инертная	-(25...18)
2		1,35	1,35	1,37		Нормальная	
3		1,38	1,39	1,42	Темнота	Инертная	+(2...8)
4		1,40	1,45	1,48		Нормальная	
5		1,41	1,44	1,50	Темнота	Инертная	+(15...25)
6		1,53	1,65	1,77		Нормальная	
7		1,75	1,96	2,29	Рассеянный свет	Нормальная	
8		1,62	1,79	1,99		Инертная	

Характер изменений показателя «Пероксидное число» для всей совокупности экспериментов в полной мере коррелирует с результатами определения характеристик косвенных показателей чистоты и результатами исследований хроматографического профиля. В условиях экспериментов № 1-5 отмечена незначительная динамика увеличения пероксидного числа – максимальный прирост составляет 12 % (от 1,34 до 1,50). В условиях

эксперимента № 6 наблюдается умеренный характер изменений – 32 % (от 1,34 до 1,77). Наибольшее изменение показателя также характерно для условий экспериментов № 7 и 8 – 71 % (от 1,34 до 2,29) и 49 % (от 1,34 до 1,99), соответственно.

С учетом проведенных 18-месячных исследований стабильности эфирного масла розмарина лекарственного можно заключить, что эфирное масло в экспериментах № 7 и № 8 (комнатная температура, нормальная и инертная атмосфера с воздействием рассеянного света) является нестабильным. В условиях данных экспериментов наблюдаются значимые изменения в компонентном составе, образование осмолившихся веществ, что подтверждается результатами анализа по показателям «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла», а также наблюдается слишком высокая динамика изменения показателя «Пероксидное число». В иных, описанных в данной программе условиях хранения, эфирное масло признается стабильным. В качестве оптимальных условий хранения до первого открытия эфирного масла с точки зрения практической реализации и с точки зрения минимально-возможных негативных изменений в его показателях качества являются условия эксперимента № 3 - хранение при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения. Эфирное масло признается стабильным и в наиболее вероятных условиях его хранения после первого вскрытия – в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ и $+(15...25)^\circ\text{C}$ - эксперименты № 4 и № 6.

6.2.2. Исследование стабильности эфирного масла шалфея мускатного

В качестве объекта при проведении исследования стабильности использовался коммерчески доступный образец эфирного масла шалфея мускатного. Дата производства эфирного масла – 20.03.2025, срок годности – 3 года. Дата начала эксперимента – 15.04.2025, дата окончания эксперимента – 15.04.2026. Регион происхождения эфирного масла: Россия, республика Крым, Бахчисарайский район (44.70, 33.83).

Для эфирного масла шалфея мускатного, в соответствии с разработанным протоколом изучения стабильности, проведено 12-месячное изучение стабильности. Результаты изучения стабильности в начальных условиях и в каждой из 8 экспериментальных точек по специфицируемым показателям представлены в таблице 60. За основу при проведении исследования были взяты требования Ph.Eur к эфирному маслу шалфея мускатного.

Таблица 60 – Результаты изучения стабильности эфирного масла шалфея мускатного

Показатель	Норма Ph.Eur 11	№ Эксперимента								
		Начальная точка	1	2	3	4	5	6	7	8
		Результат								
Описание	Прозрачная жидкость от бесцветного до коричнево-жёлтого цвета с специфическим запахом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Относительная плотность	От 0,890 до 0,908	0,895	0,894	0,894	0,892	0,891	0,890	0,889	0,879	0,885
Показатель преломления	От 1,456 до 1,466	1,459	1,459	1,459	1,460	1,461	1,461	1,461	1,463	1,462
Угол вращения	От -26° до -10°	-16,40°	-16,63°	-17,28°	-17,19°	-17,06°	-17,35°	-17,41°	-17,79°	-17,53°
Растворимость	Смешивается с 80 % этиловым спиртом с получением прозрачного раствора в объемном соотношении 3:1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Кислотное число	Не более 1,0	0,26	0,34	0,50	0,76	0,98	1,13	1,76	2,54	2,10
Пероксидное число	Не более 2,0	0,79	0,83	0,89	1,05	1,22	1,3	2,15	3,77	2,84
Хроматографический профиль	α -и β -Тусейн - не более 0,2 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Линалоол - от 6,5 до 24 %	25,30	25,38	25,45	26,24	26,31	27,61	32,49	36,80	32,49
	Линалил ацетат - от 56 до 78 %	55,15	54,75	54,36	50,06	49,64	47,03	39,71	30,43	39,71
	α -Терпинеол - не более 5,0 %	3,61	3,62	3,63	3,74	3,75	3,86	4,01	4,60	3,96
	Гермакрен Д - от 1,0 до 12 %	2,11	2,07	2,02	1,60	1,56	1,58	0,57	0,00	0,63
	Склареол - от 0,4 % до 2,6 %	2,70	2,72	2,72	2,80	2,81	2,83	3,01	3,44	2,97
Вода	Не более 0,8 %	0,34	0,48	0,46	0,54	0,53	0,51	0,64	0,72	0,67
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Не соотв.	Не соотв.	Не соотв.
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,4 %	0,11	0,11	0,11	0,14	0,11	0,18	0,32	0,56	0,49

В результате анализа образцов эфирного масла шалфея мускатного во всех экспериментальных условиях (таблица 60) установлено полное соответствие требованиям спецификации по показателям «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость» вне зависимости от условий хранения.

Показатель «Вода» не является нормированным, на основании данных анализа большого числа проб для эфирного масла шалфея мускатного нами установлена норма 0,8 %. В зависимости от условий хранения прослеживается динамика накопления воды в образцах эфирного масла. Наибольшее значения отмечены при хранении в условиях комнатной температуры.

По показателю «Кислотное число» установлено несоответствие в точках 5-8. Увеличение «Кислотного числа» является достаточно точным маркером, указывающим на изменения, протекающие в компонентном составе эфирного масла. Основным процесс, протекающий при хранении эфирного масла шалфея мускатного, гидролиз линалил ацетата, протекающий с выделением уксусной кислоты (рисунок 61). Таким образом, гидролиз линалил ацетата напрямую влияет на изменение показателя «Кислотное число».

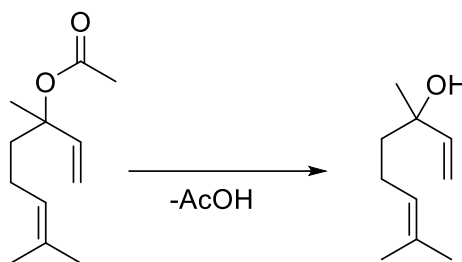


Рисунок 61 – Гидролиз линалил ацетата. Рисунок подготовлен автором

По показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» несоответствие отмечено для экспериментов № 6-8, по показателю «Остаток после выпаривания эфирного масла» - для экспериментов № 7-8.

Оценка динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного представлена на рисунке 62.

Для оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного применен Байесовский однофакторный дисперсионный анализ.

Нормирование α - и β -туйена вызвано необходимостью отличать эфирное масло шалфея мускатного от шалфея лекарственного. Не обнаружены α - и β -Туйен в компонентном составе эфирного масла шалфея мускатного в начальной точке и в других экспериментальных точках.

Содержание всех основных компонентов хроматографического профиля остается стабильным в экспериментах № 1-3. Относительно высокая стабильность концентраций отмечена для линалоола, склареола и α -терпинеола, изменение концентраций данных компонентов отмечено только начиная с экспериментов № 5 и 6. В экспериментах № 4-5 обнаруживается снижение концентрации основного компонента профиля – линалилацетата и ключевого сесквитерпенового соединения – гермакрена Д. В экспериментах № 6-8 отмечено убывание содержания всех основных компонентов хроматографического профиля. В целом изменения в хроматографическом профиле в данных экспериментах носят настолько высокий характер, что произвести однозначную идентификацию на основании хроматографических результатов становится невозможно. Подобные результаты свидетельствуют о невозможности установления идентичности эфирного масла, хранящегося в описанных условиях. Наиболее значимые изменения в компонентном составе отмечены для эксперимента №7. В эксперименте № 7 отмечено уменьшение содержания линалил ацетата в 1,81 раз, что закономерно сопровождается ростом содержания линалоола в 1,45 раз. Гермакрен Д в эксперименте № 7 не обнаружен.

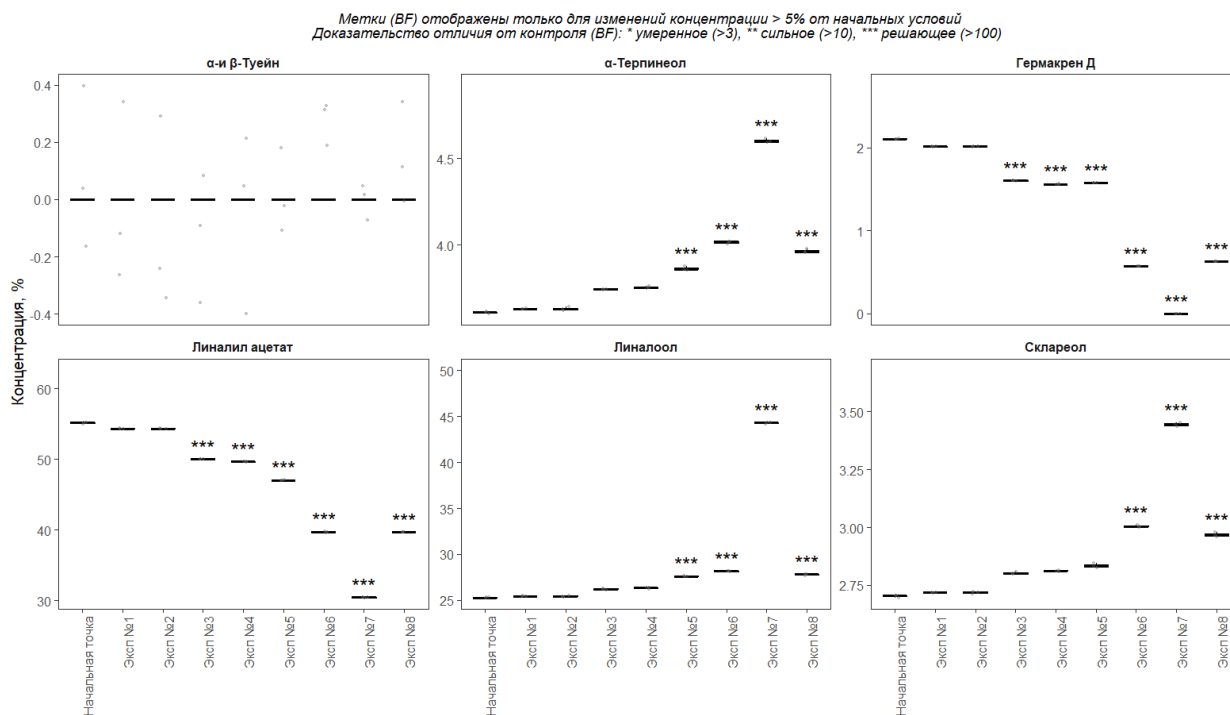


Рисунок 62 – Результаты оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла шалфея мускатного с помощью Байесовского однофакторного дисперсионного анализа. Рисунок подготовлен автором

Матрица изменений концентрации начальных компонентов представлена в таблице 61, матрица суммарных изменений концентраций компонентов представлена в таблице 62.

Таблица 61 – Матрица изменений концентрации начальных компонентов эфирного масла шалфея мускатного

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
	Изменение концентрации (ΔC), %						
1	0,09	0,17	0,26	0,35	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,20	0,41	0,61	0,81		Нормальная	
3	1,14	2,29	3,43	4,58	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	1,24	2,48	3,72	4,96		Нормальная	
5	4,07	5,23	6,40	6,11	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	2,38	4,76	7,14	9,52		Нормальная	
7	6,57	9,10	9,15	10,21	Рассеянный свет	Нормальная	
8	2,35	4,69	7,04	9,39		Инертная	

Анализ матриц изменений концентрации (таблица 61 и 62) также позволяет однозначно подтвердить серьезный характер изменений в экспериментах № 6-8. Суммарные изменения концентраций после 12 месяцев хранения в ходе эксперимента № 7 составляют 50,38 %, в ходе эксперимента № 6 и № 8 – 29,41 % и 28,35 %, соответственно. Следует отметить, что достаточно высокие значения изменения концентрации объясняются гидролизом линалил ацетата с образованием линалоола.

Таблица 62 – Матрица суммарных изменений концентраций компонентов эфирного масла шалфея мускатного

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
	Изменение концентрации ($\Sigma \Delta C$), %						
1	0,15	0,31	0,46	0,62	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,35	0,70	1,06	1,41		Нормальная	
3	2,07	4,13	6,20	8,27	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	2,24	4,48	6,71	8,95		Нормальная	
5	5,06	7,23	9,39	12,97	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	7,35	14,71	22,06	29,41		Нормальная	
7	19,84	28,64	37,97	50,38	Рассеянный свет	Нормальная	
8	7,09	14,17	21,26	28,35		Инертная	

Для эфирного масла шалфея мускатного наблюдается четкая зависимость степени изменения (ΔC и $\Sigma \Delta C$) от температуры хранения. Для экспериментов № 1 и 2 характерна самая низкая степень изменений – $\Sigma \Delta C$ составляет 0,62 % и 1,41 %, соответственно. Для экспериментов № 3 и № 4 – $\Sigma \Delta C$ составляет 8,27 % и 8,95 %, соответственно. Подобный феномен можно объяснить снижением скорости реакций гидролиза линалил ацетата, как основной реакции, протекающей при хранении, при понижении температуры. В экспериментах № 5 и № 6 наблюдается уже значительная разница в суммарном изменении концентраций – $\Sigma \Delta C$ составляет 12,97 % и 29,41 %, соответственно. Подобная разница обусловлена исключительно типом атмосферы – в условиях нормальной атмосферы отмечается высокая нестабильность эфирного масла при комнатной температуре. При этом

следует учитывать, что при хранении в условиях холодильной и морозильной камеры (эксперименты № 1-4) влияние типа атмосферы менее значимо.

Результаты анализа по показателю «Пероксидное число» представлены в таблице 63. Анализ образцов эфирного масла по показателю «Пероксидное число» в полной мере коррелирует с результатами, полученными по показателю «Хроматографический профиль», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла». Значительное повышение результата по показателю «Пероксидное число» отмечено для экспериментов № 6-8.

Таблица 63 – Матрица изменений показателя «Пероксидное число»

№ Эксп	Срок хранения			Условия хранения		
	Начальные условия	6	12	УФ	Атмосфера	Температура, °C
1	0,79	0,80	0,83	Темнота	Инертная	-(25...18)
2		0,82	0,89		Нормальная	
3		0,86	1,05	Темнота	Инертная	+(2...8)
4		0,90	1,22		Нормальная	
5		0,93	1,30	Темнота	Инертная	+(15...25)
6		1,15	2,15		Нормальная	
7		1,59	3,77	Рассеянный свет	Нормальная	
8		1,34	2,84		Инертная	

В результате проведенных 12-месячных исследований стабильности эфирного масла шалфея мускатного можно заключить, что эфирное масло в экспериментах № 6 (комнатная температура, нормальная атмосфера, отсутствие УФ-излучения) и № 7-8 (комнатная температура, нормальная и инертная атмосфера с воздействием рассеянного света) является нестабильным, о чем свидетельствуют результаты анализа по показателям «Хроматографический профиль», «Пероксидное число», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества», «Остаток после выпаривания эфирного масла». В иных, описанных в данной программе условиях хранения, эфирное масло признается стабильным. В качестве оптимальных условий хранения до первого открытия эфирного масла с точки зрения практической реализации и с точки зрения минимально-возможных негативных изменений в его показателях качества являются условия эксперимента № 3 – хранение при температуре +(2...8) °C в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения. Эфирное масло признается стабильным и в наиболее вероятных условиях его хранения после первого вскрытия – в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре +(2...8) °C - эксперимент № 4.

6.2.3. Исследование стабильности эфирного масла майорана

В качестве объекта исследования при проведении исследования стабильности использовался коммерчески доступный образец эфирного масла майорана. Дата производства эфирного масла – 07.02.2025, срок годности – 2 года. Дата начала

эксперимента – 15.04.2025, дата окончания эксперимента – 15.04.2026. Регион происхождения эфирного масла: Испания, Эстремадура (38.92, -6.34).

Для эфирного масла майорана, в соответствии с разработанным протоколом изучения стабильности, проведено 12-месячное изучение стабильности. Результаты изучения стабильности в начальных условиях и в каждом из 8 экспериментальных условий по специфицируемым показателям представлены в таблице 64. Поскольку для эфирного масла майорана отсутствуют утвержденные стандарты качества, то нормы по большинству показателей были установлены на основании литературного обзора. Для оценки изменений по показателю «Хроматографический профиль» были использованы содержания 11 наиболее распространенных соединений в составе эфирного масла.

В результате анализа образцов эфирного масла майорана во всех экспериментальных точках (таблица 64) установлено полное соответствие требованиям спецификации по показателям «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость» вне зависимости от условий хранения.

Для эфирного масла майорана по показателю «Вода» нами установлена норма в 0,8 %. В целом эфирное масло майорана характеризуется как большим начальным содержанием воды (0,56 %) при сравнении с содержанием в начальных точках у эфирных масел розмарина лекарственного (0,27 %) и шалфея мускатного (0,34 %), так и более высокой динамикой накопления воды. Наибольшая динамика также отмечена при хранении в условиях комнатной температуры.

По показателю «Кислотное число» установлено соответствие во всех экспериментальных точках. Подобное наблюдение объясняется, как изначально достаточно небольшим значением показателя «Кислотное число», так и отсутствием склонности у эфирного масла к его увеличению в ходе хранения ввиду отсутствия химических процессов, сопровождающихся выделением кислот или образованием соединений большей кислотности.

По показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла» несоответствие отмечено для экспериментов № 6-8.

Оценка динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана представлена на рисунке 63.

Для оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана применен Байесовский однофакторный дисперсионный анализ.

Для ряда минорных компонентов α -пинена, β -пинена, лимонена и β -кариофиллена отмечено наличие значимых изменений, начиная с экспериментов № 3-4. Однако следует, учитывать, что большое относительное изменение концентрации минорных компонентов вызвано фактически незначительным изменением абсолютной концентрации, что наблюдается в экспериментах № 1-6. Относительно высокая стабильность отмечена для линалоола, терпинен-4-ола, α -терпинеола и изотерпинолена – значимые изменения отмечены только в ходе эксперимента № 7.

Следует отметить, что для экспериментов № 1-5 отмечается относительно высокая стабильность концентраций γ -терпинена и n -цимола. Однако в ходе дальнейших экспериментов прослеживается четкая корреляция изменения динамики содержания γ -терпинена и n -цимола, что отчетливо видно при анализе результатов экспериментов № 6-8. Концентрация γ -терпинена в ходе экспериментов № 6-8 уменьшилась в 1,44; 3,13 и 1,74 раза, что сопровождалось увеличением концентрации n -цимола в 1,80; 2,74 и 2,20 раз, соответственно.

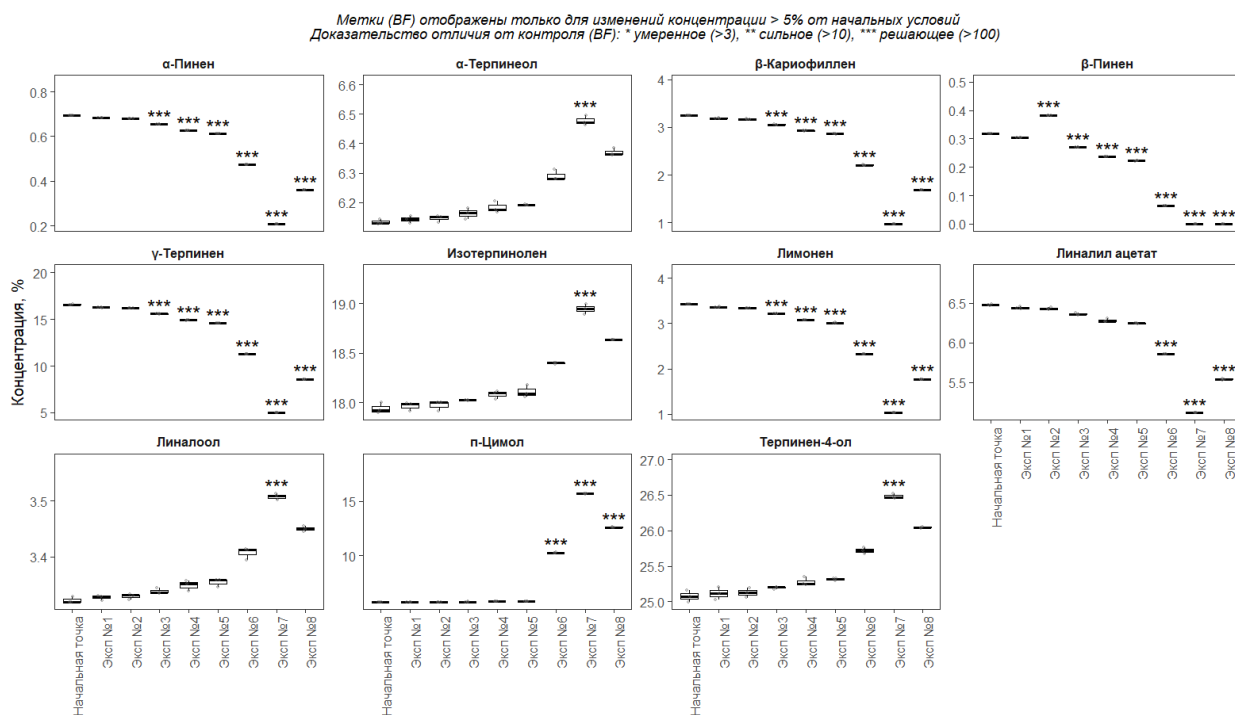


Рисунок 63 – Результаты оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана с помощью Байесовского однофакторного дисперсионного анализа. Рисунок подготовлен автором

Таблица 64 – Результаты изучения стабильности эфирного масла майорана

Показатель	Норма Ph.Eur 11	№ Эксперимента								
		Начальная точка	1	2	3	4	5	6	7	8
		Результат								
Описание	Прозрачная жидкость от бесцветного до зелено-желтого цвета со специфическим запахом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Относительная плотность	От 0,886 до 0,902	0,894	0,896	0,895	0,896	0,897	0,896	0,899	0,900	0,899
Показатель преломления	От 1,470 до 1,476	1,472	1,472	1,472	1,473	1,473	1,473	1,474	1,476	1,474
Угол вращения	От +4° до +24°	+8,25°	+8,29°	+8,28°	+8,32°	+8,33°	+8,35°	+8,37°	+8,46°	+8,40°
Растворимость	Смешивается с 80 % этиловым спиртом с получением прозрачного раствора в объемном соотношении 2:1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Кислотное число	Не более 1,5	0,78	0,87	0,81	0,87	0,92	0,93	1,11	1,42	1,26
Пероксидное число	Не более 2,0	1,55	1,56	1,58	1,64	1,7	1,72	2,02	2,57	2,25
Хроматографический профиль	α -Пинен	0,70	0,68	0,68	0,65	0,63	0,61	0,47	0,21	0,36
	β -Пинен	0,32	0,30	0,38	0,27	0,24	0,22	0,06	0,00	0,00
	p-Цимол	5,72	5,73	5,73	5,75	5,77	5,78	10,28	15,70	12,60
	Лимонен	3,42	3,36	3,34	3,22	3,08	3,01	2,33	1,03	1,77
	γ -Терпинен	16,57	16,28	16,17	15,58	14,91	14,58	11,27	4,97	8,57
	Изотерпинолен	17,94	17,96	17,97	18,02	18,08	18,11	18,40	18,94	18,63
	Линалоол	3,32	3,33	3,33	3,34	3,35	3,35	3,41	3,51	3,45
	Терпинен-4-ол	25,08	25,11	25,12	25,20	25,28	25,32	25,72	26,48	26,04
	α -Терпинеол	6,13	6,14	6,15	6,16	6,18	6,19	6,29	6,48	6,37
	Линалил ацетат	6,48	6,44	6,43	6,36	6,28	6,25	5,86	5,12	5,54
	β -Кариофиллен	3,25	3,19	3,17	3,05	2,92	2,86	2,21	0,97	1,68
Вода	Не более 0,8 %	0,56	0,59	0,57	0,64	0,69	0,75	0,84	1,07	0,89
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Не соотв.	Не соотв.	Не соотв.
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,5 %	0,12	0,12	0,12	0,18	0,30	0,36	0,54	0,72	0,54

Ароматизация γ -терпинена в *n*-цимол (рисунок 64) является одной из самых изученных реакций компонентов эфирных масел и основной химической реакцией, протекающей при хранении эфирного масла майорана. При этом следует отметить отсутствие образования пары изомеров тимол и карвакрол, продуктов дальнейшего окисления уже *n*-цимола.

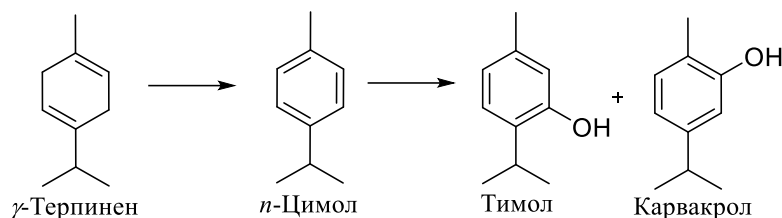


Рисунок 64 – Ароматизация γ -терпинена в *n*-цимол. Рисунок подготовлен автором

Матрица изменений концентрации начальных компонентов эфирного масла майорана представлена в таблице 65, матрица суммарных изменений концентраций компонентов эфирного масла майорана представлена в таблице 66.

Таблица 65 – Матрица изменений концентрации начальных компонентов эфирного масла майорана

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
	Изменение концентрации (ΔC), %						
1	0,14	0,28	0,42	0,56	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,19	0,39	0,58	0,77		Нормальная	
3	0,48	0,91	1,37	1,83	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	0,81	1,61	2,42	3,22		Нормальная	
5	0,97	1,93	2,90	3,87	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	1,48	2,95	4,43	5,91		Нормальная	
7	3,23	6,46	8,92	11,08	Рассеянный свет	Нормальная	
8	2,23	4,46	6,68	8,40		Инертная	

Таблица 66 – Матрица суммарных изменений концентраций компонентов эфирного масла майорана

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °C
	Изменение концентрации ($\Sigma \Delta C$), %						
1	0,19	0,37	0,56	0,75	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,26	0,52	0,78	1,04		Нормальная	
3	0,65	1,30	1,95	2,61	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	1,09	2,17	3,26	4,34		Нормальная	
5	1,30	2,61	3,91	5,21	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	4,58	9,15	13,73	18,31		Нормальная	
7	10,01	20,03	29,30	38,28	Рассеянный свет	Нормальная	
8	6,94	13,87	20,81	27,24		Инертная	

Данные матриц изменения концентрации (таблицы 65 и 66) также свидетельствуют о наличии значимых изменений в компонентном составе при хранении в условиях экспериментов № 6-8. При хранении в иных условиях же отмечается достаточно высокая

стабильность компонентного состава. На стабильность масла майорана критически влияет тип атмосферы при хранении, что очевидно при анализе образцов, хранившихся в различных температурных зонах, но в отличных типах атмосферы. При хранении в морозильной камере переход от инертной к нормальной атмосфере сопровождается увеличением суммарных изменений с 0,75 % до 1,04 %; при хранении в холодильной камере – с 2,61 % до 4,34 %, при хранении в темноте в комнатной температуре – с 5,21 % до 18,31 %; при хранении в комнатной температуре при воздействии рассеянного света – с 27,24% до 38,28 %. Подобная закономерность объясняется тем, что основной химический процесс при хранении – ароматизация γ -терпинена в *n*-цимол носит окислительный характер и протекает лучше в условиях доступа кислорода. Для эфирного масла майорана характерно достаточно невысокая степень изменения концентраций начальных компонентов эфирного масла, что объясняется синхронным изменением концентрации γ -терпинена и *n*-цимола.

Результаты анализа по показателю «Пероксидное число» представлены в таблице 67. Анализ образцов эфирного масла по показателю «Пероксидное число» в полной мере коррелирует с результатами, полученными по показателю «Хроматографический профиль», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла». Значительное повышение результата по показателю «Пероксидное число» отмечено для экспериментов № 6-8.

Таблица 67 – Матрица изменений показателя «Пероксидное число»

№ Эксп	Срок хранения			Условия хранения		
	Начальные условия	6	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
1	1,55	1,56	1,56	Темнота	Инертная	-(25...18)
2		1,57	1,58		Нормальная	
3		1,59	1,64	Темнота	Инертная	+(2...8)
4		1,61	1,70		Нормальная	
5		1,63	1,72	Темнота	Инертная	+(15...25)
6		1,75	2,02		Нормальная	
7		1,99	2,57	Рассеянный свет	Нормальная	
8		1,86	2,25		Инертная	

В результате проведенных 12-месячных исследований стабильности эфирного масла майорана можно заключить, что эфирное масло в экспериментах № 6 (комнатная температура, нормальная атмосфера, отсутствие УФ-излучения) и № 7-8 (комнатная температура, нормальная и инертная атмосфера с воздействием рассеянного света) является нестабильным, о чем свидетельствуют результаты анализа по показателям «Хроматографический профиль», «Пероксидное число», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества», «Остаток после выпаривания эфирного масла». В иных, описанных в данной программе условиях хранения, эфирное масло признается стабильным. В качестве оптимальных условий хранения до первого открытия эфирного

масла с точки зрения практической реализации и с точки зрения минимально-возможных негативных изменений в его показателях качества являются условия эксперимента № 3 - хранение при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения. Эфирное масло признается стабильным и в наиболее вероятных условиях его хранения после первого вскрытия – в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ и $+(15...25) ^\circ\text{C}$ - эксперименты № 4 и № 6.

6.2.4. Исследование стабильности эфирного масла чабера горного

В качестве объекта исследования при проведении исследования стабильности использовался коммерчески доступный образец эфирного масла чабера горного. Дата производства эфирного масла – 17.11.2024, срок годности – 3 года. Дата начала эксперимента – 15.04.2025, дата окончания эксперимента – 15.04.2026. Регион происхождения эфирного масла: Босния и Герцеговина, Любине (43.97, 19.25).

Для эфирного масла чабера горного, в соответствии с разработанным протоколом изучения стабильности, проведено 12-месячное изучение стабильности. Результаты изучения стабильности в начальных условиях и в каждой из 8 экспериментальных точек по специфицируемым показателям представлены в таблице 68. Поскольку для эфирного масла чабера горного отсутствуют утвержденные стандарты качества, то нормы по большинству показателей были установлены на основании литературного обзора. Для оценки изменений по показателю «Хроматографический профиль» были использованы содержания 11 наиболее распространенных соединений в составе эфирного масла.

В результате анализа образцов эфирного масла чабера горного во всех экспериментальных точках (таблица 68) установлено полное соответствие требованиям спецификации по показателям «Описание», «Относительная плотность», «Показатель преломления», «Угол вращения», «Растворимость» вне зависимости от условий хранения.

Для эфирного масла чабера по показателю «Вода» нами установлена норма в 1,0 %. В целом эфирное масло чабера горного характеризуется достаточно большим начальным содержанием воды в составе, что коррелирует с повышенным содержанием фенольного терпена – карвакрола. Наибольшая динамика накопления также наблюдается при хранении в условиях комнатной температуры.

По показателю «Кислотное число» установлено несоответствие в экспериментальных точках № 7-8. Для эфирного масла чабера горного в целом характерно достаточно высокое значение по показателю «Кислотное число», что объясняется повышенным содержанием карвакрола, обладающего кислотными свойствами.

По показателю «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла» несоответствие отмечено также для экспериментов № 7-8.

Оценка динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла чабера горного представлена на рисунке 65.

Для оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла чабера горного применен Байесовский однофакторный дисперсионный анализ.

В составе эфирного масла чабера горного отмечается наличие вариации для ряда минорных фенольных компонентов: тимола (эксп № 7-8), *транс*-анетол (эксп №5, № 7-8), карвакрол ацетата (эксп № 6-8). Характер указанных изменений носит незначительный характер, несмотря на наличие достаточно высокой степени относительных изменений, их абсолютная величина достаточно невелика.

Концентрация основного компонента – карвакрола остается стабильной вне зависимости от условий хранения, подобные наблюдения справедливы также для линалоола и *n*-цимола. Однако, в случае *n*-цимола отмечено увеличение концентрации в экспериментах №6-8, что, в свою очередь, сопровождается уменьшением содержания γ -терпинена.

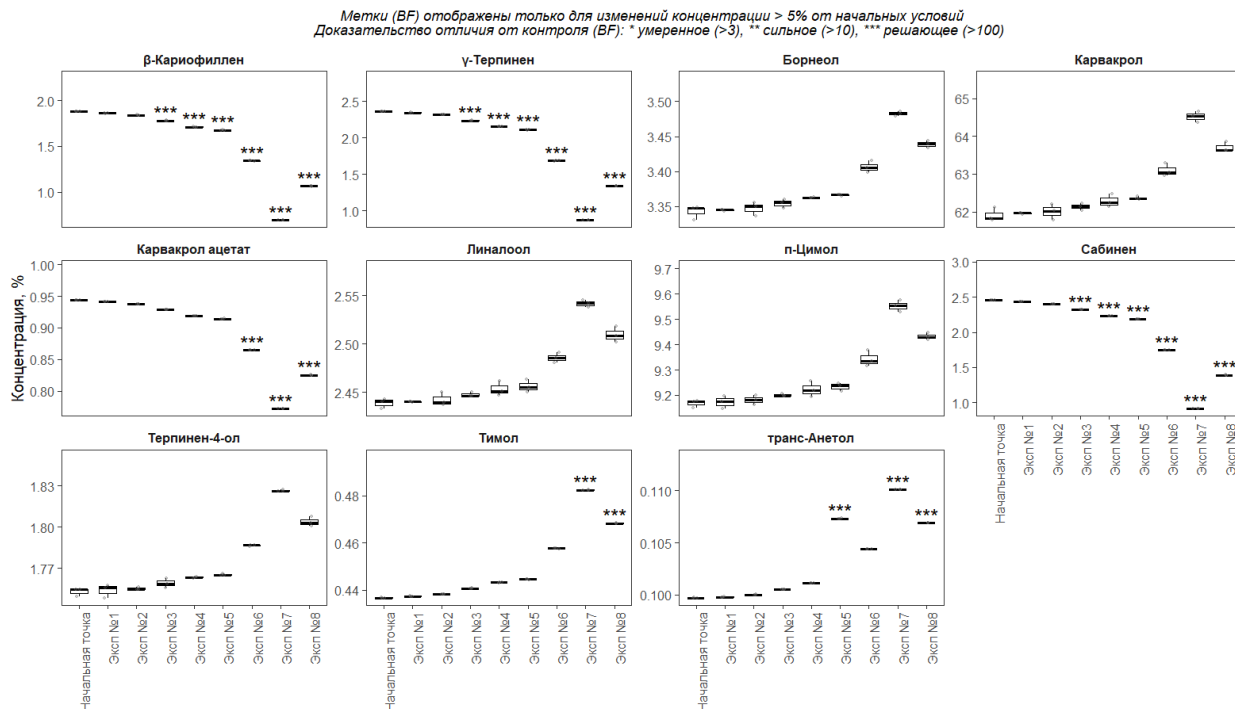


Рисунок 65 – Результаты оценки динамики изменения концентраций компонентов хроматографического профиля эфирного масла майорана с помощью Байесовского однофакторного дисперсионного анализа. Рисунок подготовлен автором

Таблица 68 – Результаты изучения стабильности эфирного масла чабера горного

Показатель	Норма Ph.Eur 11	№ Эксперимента								
		Начальная точка	1	2	3	4	5	6	7	8
		Результат								
Описание	Прозрачная жидкость от бесцветного до ярко-желтого цвета со специфическим запахом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Относительная плотность	От 0,910 до 0,940	0,925	0,925	0,924	0,926	0,927	0,929	0,930	0,936	0,931
Показатель преломления	От 1,535 до 1,542	1,537	1,536	1,538	1,537	1,538	1,538	1,538	1,541	1,539
Угол вращения	От +11,0° до +15,5°	12,60°	12,54°	12,56°	12,63°	12,64°	12,74°	12,79°	12,95°	12,85°
Растворимость	Смешивается с 80 % этиловым спиртом с получением прозрачного раствора в объемном соотношении 2:1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Кислотное число	Не более 4,0	3,62	3,43	3,30	3,23	3,18	3,08	3,41	4,13	3,48
Пероксидное число	Не более 5,5	3,91	3,94	3,99	4,12	4,26	4,33	5,02	6,34	5,58
Хроматографический профиль	Сабинен	2,45	2,43	2,40	2,32	2,23	2,19	1,75	0,91	1,39
	п-Цимол	9,17	9,17	9,18	9,20	9,22	9,23	9,34	9,55	9,43
	γ-Терпинен	2,37	2,34	2,31	2,24	2,15	2,11	1,68	0,88	1,34
	Линалоол	2,44	2,44	2,44	2,45	2,45	2,46	2,49	2,54	2,51
	Борнеол	3,34	3,34	3,35	3,35	3,36	3,37	3,41	3,48	3,44
	Терпинен-4-ол	1,75	1,75	1,76	1,76	1,76	1,77	1,79	1,83	1,80
	транс-Анетол	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11
	Тимол	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,46	0,48	0,47
	Карвакрол	61,91	61,95	62,00	62,14	62,29	62,36	63,10	64,51	63,71
	Карвакрол ацетат	0,94	0,94	0,94	0,93	0,92	0,91	0,86	0,77	0,83
	β-Кариофиллен	1,88	1,86	1,84	1,78	1,71	1,68	1,34	0,70	1,06
Вода	Не более 1,0 %	0,65	0,69	0,67	0,74	0,79	0,85	0,94	1,17	0,96
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Пятно масла должно испариться с бумаги полностью в течение 24 ч без оставления следа.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Не соотв.	Не соотв.
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,4 %	0,10	0,10	0,05	0,15	0,24	0,29	0,36	0,78	0,44

Концентрация γ -терпинена в ходе экспериментов № 6-8 уменьшилась в 1,40; 2,68 и 1,73 раза, что сопровождалось увеличением концентрации *n*-цимола и карвакрола в 1,02; 1,04 и 1,03 раза, соответственно. Таким образом, с высокой долей вероятности в составе эфирного масла чабера горного происходит ароматизация γ -терпинена до *n*-цимола с последующим окислением и получением карвакрола, что, однако, менее очевидно при анализе относительных изменений концентраций компонентов эфирного масла из-за относительно невысокой начальной доли γ -терпинена (2,37 %) и высокой доли карвакрола (61,91 %). Таким образом, несмотря на наличие зависимости между изменением концентрации *n*-цимола и γ -терпинена, общая степень изменений концентраций компонентов в эфирном масле чабера горного значительно меньше, чем в эфирном масле майорана.

Другое значимое изменение содержания наблюдается для β -кариофиллена в экспериментах № 6-8. В экспериментах №6-8 его доля уменьшилась в 0,71; 0,37 и 0,58 раз, что сопровождалось сопоставимым увеличением доли кариофилленоксида.

Матрица изменений концентрации начальных компонентов эфирного масла чабера горного представлена в таблице 69, матрица суммарных изменений концентраций компонентов эфирного масла майорана представлена в таблице 70.

Таблица 69 – Матрица изменений концентрации начальных компонентов эфирного масла чабера горного

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
	Изменение концентрации (ΔC), %						
1	0,02	0,03	0,05	0,07	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,04	0,08	0,12	0,16		Нормальная	
3	0,10	0,20	0,31	0,41	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	0,17	0,34	0,51	0,68		Нормальная	
5	0,20	0,41	0,61	0,82	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	0,54	1,09	1,63	2,17		Нормальная	
7	1,19	2,38	2,86	2,52	Рассеянный свет	Нормальная	
8	0,82	1,64	2,46	2,94		Инертная	

Данные матриц изменения концентрации (таблицы 69 и 70) также свидетельствуют о наличии значимых изменений в компонентном составе при хранении в условиях экспериментов № 6-8. При хранении в иных условиях же отмечается достаточно высокая стабильность компонентного состава. На стабильность эфирного масла чабера горного, как и на стабильность эфирного масла майорана, критически влияет тип атмосферы при хранении, что очевидно при анализе образцов, хранившихся в различных температурных зонах, но в отличных типах атмосферы. При хранении в морозильной камере переход от инертной к нормальной атмосфере сопровождается увеличением суммарных изменений с 0,27 % до 0,65 %; при хранении в холодильной камере – с 1,63 % до 2,72 %, при хранении

в темноте в комнатной температуре – с 3,27 % до 8,71 %; при хранении в комнатной температуре при воздействии рассеянного света – с 12,84% до 16,84 %.

Таблица 70 – Матрица суммарных изменений концентраций компонентов эфирного масла чабера горного

№ Эксп	Срок хранения				Условия хранения		
	3	6	9	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
	Изменение концентрация (ΔC), %						
1	0,07	0,14	0,21	0,27	Темнота	Инертная	-(25...18)
2	0,16	0,33	0,49	0,65		Нормальная	
3	0,41	0,82	1,23	1,63	Темнота	Инертная	+(2...8)
4	0,68	1,36	2,04	2,72		Нормальная	
5	0,82	1,63	2,45	3,27	Темнота	Инертная	+(15...25)
6	2,18	4,36	6,53	8,71		Нормальная	
7	4,76	9,53	13,59	16,84	Рассеянный свет	Нормальная	
8	3,30	6,59	9,88	12,84		Инертная	

Подобная закономерность объясняется тем, что основные химические процессы при хранении – ароматизация γ -терпинена в *n*-цимол с последующим окислением в карвакрол и окисление β -кариофиллена в кариофилленоксид носят окислительный характер и протекают лучше в условиях доступа кислорода. Для эфирного масла чабера горного характерно достаточно невысокая степень изменения концентраций начальных компонентов эфирного масла, что объясняется как синхронным изменением концентрации γ -терпинена, *n*-цимола и карвакрола, так и в целом достаточно высокой стабильностью главного компонента эфирного масла – карвакрола.

Результаты анализа по показателю «Пероксидное число» представлены в таблице 71. Анализ образцов эфирного масла по показателю «Пероксидное число» в полной мере коррелирует с результатами, полученными по показателю «Хроматографический профиль», «Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества» и «Остаток после выпаривания эфирного масла». Значительное повышение результата по показателю «Пероксидное число» отмечено для экспериментов № 7-8.

Таблица 71 – Матрица изменений показателя «Пероксидное число»

№ Эксп	Срок хранения			Условия хранения		
	Начальные условия	6	12	УФ	Атмосфера	Температура, °С
1	3,91	3,93	3,94	Темнота	Инертная	-(25...18)
2		3,95	3,99		Нормальная	
3		4,00	4,12	Темнота	Инертная	+(2...8)
4		4,06	4,26		Нормальная	
5		4,09	4,33	Темнота	Инертная	+(15...25)
6		4,39	5,02		Нормальная	
7		4,97	6,34	Рассеянный свет	Нормальная	
8		4,64	5,58		Инертная	

В результате проведенных 12-месячных исследований стабильности эфирного масла чабера горного можно заключить, что эфирное масло в экспериментах № 7-8 (комнатная температура, нормальная и инертная атмосфера с воздействием рассеянного света) является нестабильным, о чем свидетельствуют результаты анализа по показателям «Хроматографический профиль», «Пероксидное число», «Жирные и минеральные масла, в

том числе осмолившиеся вещества», «Остаток после выпаривания эфирного масла». В иных, описанных в данной программе условиях хранения, эфирное масло признается стабильным.

В качестве оптимальных условий хранения до первого открытия эфирного масла с точки зрения практической реализации и с точки зрения минимально-возможных негативных изменений в его показателях качества являются условия эксперимента № 3 - хранение при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения. Эфирное масло признается стабильным и в наиболее вероятных условиях его хранения после первого вскрытия – в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8)^\circ\text{C}$ и $+(15...25)^\circ\text{C}$ - эксперименты № 4 и № 6.

Выводы к главе 6

1. Предложен унифицированный алгоритм исследования стабильности эфирных масел, предусматривающий факторное параллельное изучение восьми идентичных образцов в течение 12 месяцев с систематическим варьированием трех ключевых факторов: температуры и атмосферы хранения, а также воздействия УФ-излучения. Алгоритм включает пять контрольных точек (начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев) и предполагает комплексный аналитический контроль испытуемых эфирных масел.
2. Для алгоритма было разработано «дерево принятия решений», что позволяет унифицировать исследовательский алгоритм установления оптимальных условий хранения эфирных масел.
3. Предложенный алгоритм моделирует реальные сценарии хранения эфирных масел как до первого вскрытия упаковки, так и после него, что позволяет получить исчерпывающие данные о стабильности продукции и обоснованно выбрать оптимальные условия хранения и срок годности.
4. 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. Установлена большая степень нестабильности для каждого из эфирных масел при хранении в условиях комнатной температуры при воздействии рассеянного света.
5. Для эфирного масла шалфея мускатного установлено критическое влияние температуры хранения на его стабильность, для эфирных масел майорана и чабера горного критическим является тип атмосферы. Для эфирного масла розмарина лекарственного

отсутствует единственный критический фактор, таким образом, на его стабильность влияет аддитивное влияние всех основных факторов стабильности.

6. Для всех изученных эфирных масел рекомендованы оптимальные условия хранения с точки зрения практической реализации и минимально-возможных негативных изменений в показателях качества: хранение при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения. После первого вскрытия – в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ и $+(15...25) ^\circ\text{C}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ научных данных свидетельствует об 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 10 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, п-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 к контролю 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 вербенона (от 9,48 % до 15,32 %).

3. На примере эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения была произведена 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 и атмосферы хранения, а также воздействия 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 $+(2...8) ^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения и в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ и $+(15...25) ^\circ\text{C}$ после вскрытия, соответственно; для эфирного масла шалфея мускатного хранение при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ в инертной атмосфере без доступа УФ-излучения и в нормальной атмосфере без доступа УФ-излучения при температуре $+(2...8) ^\circ\text{C}$ 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

**РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ
РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Сформулированные специфические хроматографические профили эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана российского происхождения рекомендуются для внедрения в проекты Фармакопейных статей Государственной Фармакопеи Российской Федерации и национальных стандартов ГОСТ в качестве однозначного критерия подлинности эфирного масла российского происхождения.
2. Результаты исследования воспроизводимости хроматографического профиля эфирного масла розмарина лекарственного и накопления эфирного масла в растительном сырье, а также описанный подход к оценке этих показателей могут быть применены при заготовке ЛРС производителями эфирных масел.
3. Разработанная и валидированная газохроматографическая методика анализа эфирных масел шалфея мускатного, розмарина лекарственного, чабера горного и майорана может быть рекомендована для внедрения в практику лабораторий и отделов контроля качества для рутинного анализа эфирных масел.
4. Разработанная и валидированная методика кулонометрического титрования эфирных масел по методу Карла Фишера рекомендуется для внедрения в проекты Фармакопейных статей Государственной Фармакопеи Российской Федерации и национальных стандартов ГОСТ в качестве унифицированной методики титрования эфирных масел и для внедрения в практику отделов контроля качества для рутинного анализа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ	- Биологически активное вещество
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	- Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ РФ	- Государственная Фармакопея Российской Федерации (действующая версия)
ГХ	- Газовая хроматография
ГХ-МС	- Газовая хроматография-масс-спектрометрия
ДНК	- Дезоксирибонуклеионовая кислота
ЛРС	- Лекарственное растительное сырье
МС	- Масс-спектрометрия
НЖФ	- Неподвижная жидкая фаза
СВЧ	- Сверхвысокочастотный
ТМС	- Триметилсилил
ТСХ	- Тонкослойная хроматография
УЗ	- Ультразвуковой
УФ	- Ультрафиолетовый
ЭМ	- Эфирное масло
ANOVA	- Analysis of Variance – Дисперсионный анализ
EMA	- European Medicines Agency - Европейское агентство лекарственных средств
FDA	- Food and Drug Administration - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
GRAS	- Generally recognized as safe - В целом признано безопасным
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
ROPE	- Region of practical equivalence - Область практической эквивалентности
RSD	- Относительное стандартное отклонение
SD	- Стандартное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> (дата обращения: 05.05.2026).
2. Barbieri C., Borsotto P. Essential Oils: Market and Legislation // Potential of Essential Oils. — 2018. — DOI: 10.5772/intechopen.77725.
3. Fortune Business Insights. Essential Oils Market Size, Share & Growth | Industry Report [Электронный ресурс]. — Report ID: FBI101063. — Last updated: June 22, 2026. — URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/essential-oils-market-101063> (дата обращения: 04.07.2026).
4. Essential Oils Market Size, Share Analysis Report by Type, Application, Distribution Channel, Region and Companies [Электронный ресурс]. — Market.us. — URL: <https://market.us/report/essential-oils-market/> (дата обращения: 04.07.2026).
5. Zinoviadou K. G., Kastanas P., Gougouli M., Biliaderis C. G. Innovative bio-based materials for packaging sustainability // Innovation Strategies in the Food Industry. — 2022. — P. 173–192. — DOI: 10.1016/b978-0-323-85203-6.00002-5.
6. ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials - Vocabulary [Стандарт]. — 3rd ed. — Geneva: International Organization for Standardization, 2021.
7. Sadgrove N., Padilla-González G., Phumthum M. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication // Plants. — 2022. — Vol. 11, no. 6. — P. 789. — DOI: 10.3390/plants11060789.
8. Hillier S. G., Lathe R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited // Journal of Endocrinology. — 2019. — Vol. 242, no. 2. — P. 9–22. — DOI: 10.1530/joe-19-0084.
9. Ruzicka L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds // Experientia. — 1953. — Vol. 9, no. 10. — P. 357–367. — DOI: 10.1007/bf02167631.
10. Fotsing Yannick Stephane F., Kezetas Jean Jules B. Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils // Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. — 2020. — DOI: 10.5772/intechopen.91426.
11. Falleh H., Ben Jemaa M., Saada M., Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative // Food Chemistry. — 2020. — Vol. 330. — DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127268.

12. Johnson S. R., Lange I., Srividya N., Lange B. M. Bioenergetics of Monoterpenoid Essential Oil Biosynthesis in Nonphotosynthetic Glandular Trichomes // *Plant Physiology*. — 2017. — Vol. 175, no. 2. — P. 681–695. — DOI: 10.1104/pp.17.00551.
13. Hussain H., Al-Harrasi A., Green I. R. Frankincense (*Boswellia*) Oils // *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. — 2016. — P. 431–440. — DOI: 10.1016/b978-0-12-416641-7.00048-1.
14. Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments // *Natural Product Communications*. — 2009. — Vol. 4, no. 8. — P. 1147–1154.
15. Vieira R. F., Grayer R. J., Paton A., Simon J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 2001. — Vol. 29, no. 3. — P. 287–304. — DOI: 10.1016/s0305-1978(00)00062-4.
16. Echeverrigaray S., Agostini G., Atti-Serfini L., Paroul N., Pauletti G. F., Atti dos Santos A. C. Correlation between the Chemical and Genetic Relationships among Commercial Thyme Cultivars // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2001. — Vol. 49, no. 9. — P. 4220–4223. — DOI: 10.1021/jf010289j.
17. Góra J., Lis A., Kula J., Staniszevska M., Wołoszyn A. Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2002. — Vol. 17, no. 6. — P. 445–451. — DOI: 10.1002/ffj.1126.
18. Benomari F. Z., Sarazin M., Chaib D. et al. Chemical Variability and Chemotype Concept of Essential Oils from Algerian Wild Plants // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28, no. 11. — DOI: 10.3390/molecules28114439.
19. Wajs-Bonikowska A., Stojakowska A., Kalembe D. Chemical composition of essential oils from a multiple shoot culture of *Telekia speciosa* and different plant organs // *Natural Product Communications*. — 2012. — Vol. 7, no. 5. — P. 625–628.
20. Varughese T., Unnikrishnan P. K., Deepak M., Balachandran I., Rema Shree A. B. Chemical Composition of the Essential Oils from Stem, Root, Fruit and Leaf of *Piper longum* Linn // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. — 2016. — Vol. 19, no. 1. — P. 52–58. — DOI: 10.1080/0972060x.2015.1119065.
21. Bertoli A., Pistelli L., Morelli I., Fraternale D., Giamperi L., Ricci D. Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniolus satrum* L. // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2004. — Vol. 19, no. 6. — P. 522–525. — DOI: 10.1002/ffj.1382.

22. Zhang T., Zheng Y., Fu C. et al. Chemical Variation and Environmental Influence on Essential Oil of *Cinnamomum camphora* // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28, no. 3. — P. 973. — DOI: 10.3390/molecules28030973.
23. Boira H., Blanquer A. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 1998. — Vol. 26, no. 8. — P. 811–822. — DOI: 10.1016/s0305-1978(98)00047-7.
24. Aboukhalid K., Al Faiz C., Douaik A. et al. Influence of Environmental Factors on Essential Oil Variability in *Origanum compactum* Benth. Growing Wild in Morocco // *Chemistry & Biodiversity*. — 2017. — Vol. 14, no. 9. — DOI: 10.1002/cbdv.201700158.
25. Etri K., Pluhár Z. Exploring Chemical Variability in the Essential Oils of the *Thymus* Genus // *Plants*. — 2024. — Vol. 13, no. 10. — P. 1375. — DOI: 10.3390/plants13101375.
26. Grulova D., De Martino L., Mancini E., Salamon I., De Feo V. Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha × piperita* L. // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. — 2015. — Vol. 95, no. 3. — P. 621–627. — DOI: 10.1002/jsfa.6802.
27. Verma R., Chauhan A., Verma R., Yadav A. Seasonal variation in essential oil content and composition of thyme, *thymus serpyllum* L. cultivated in Uttarakhand hills // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2011. — Vol. 73, no. 2. — P. 233. — DOI: 10.4103/0250-474x.91570.
28. Rathore S., Mukhia S., Kapoor S., Bhatt V., Kumar R., Kumar R. Seasonal variability in essential oil composition and biological activity of *Rosmarinus officinalis* L. accessions in the western Himalaya // *Scientific Reports*. — 2022. — Vol. 12, no. 1. — DOI: 10.1038/s41598-022-07298-x.
29. Souiy Z. Essential Oil Extraction // *Biochemistry*. IntechOpen — 2024. DOI: 10.5772/intechopen.113311
30. Rassem H. H. A., Nour A. H., Yunus R. M. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. — 2016. — Vol. 10, no. 16. — P. 117–127.
31. Rodilla J. M., Rosado T., Gallardo E. Essential Oils: Chemistry and Food Applications // *Foods*. — 2024. — Vol. 13, no. 7. — P. 1074. — DOI: 10.3390/foods13071074.
32. 21 CFR Part 182 - Substances Generally Recognized as Safe [Электронный ресурс]. — Electronic Code of Federal Regulations. — URL:

<https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-182> (дата обращения: 04.07.2026).

33. Noshirvani N. Essential Oils as Natural Food Preservatives: Special Emphasis on Antimicrobial and Antioxidant Activities // *Journal of Food Quality*. — 2024. — Vol. 2024, no. 1. — Article 5807281. — DOI: 10.1155/jfq/5807281.
34. Prakash B., Singh P. P., Gupta V., Raghuvanshi T. S. Essential oils as green promising alternatives to chemical preservatives for agri-food products: New insight into molecular mechanism, toxicity assessment, and safety profile // *Food and Chemical Toxicology*. — 2024. — Vol. 183. — DOI: 10.1016/j.fct.2023.114241.
35. Gupta I., Singh R., Muthusamy S. et al. Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints // *Plants*. — 2023. — Vol. 12, no. 16. — P. 2916. — DOI: 10.3390/plants12162916.
36. Assadpour E., Can Karaça A., Fasamanesh M. et al. Application of essential oils as natural biopesticides; recent advances // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. — 2024. — Vol. 64, no. 19. — P. 6477–6497. — DOI: 10.1080/10408398.2023.2170317.
37. Reddy B. H. V. et al. Essential oils in cosmetics: Antioxidant properties and advancements through nanoformulations // *Pharmacological Research-Natural Products*. — 2025. — Vol. 6. DOI: 10.1016/j.prenap.2025.100192.
38. Fajdek-Bieda A. et al. Antibacterial and preservative potential of eugenol and isoeugenol in cosmetics: a natural solution for product stability // *Applied Sciences*. — 2025. — Vol. 15, no. 4. — P. 2129. DOI: 10.3390/app15042129.
39. Sharmeen J., Mahomoodally F., Zengin G., Maggi F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals // *Molecules*. — 2021. — Vol. 26, no. 3. — P. 666. — DOI: 10.3390/molecules26030666.
40. Malhi H. K., Tu J., Riley T. V., Kumarasinghe S. P., Hammer K. A. Tea tree oil gel for mild to moderate acne; a 12 week uncontrolled, open-label phase II pilot study // *Australasian Journal of Dermatology*. — 2017. — Vol. 58, no. 3. — P. 205–210. — DOI: 10.1111/ajd.12465.
41. A Shaaban H. Potential Use of Essential Oils and Their Individual Components in Cosmeceuticals: A Review // *Annals of Biomedical Science and Engineering*. — 2023. — Vol. 7, no. 1. — P. 031–037. — DOI: 10.29328/journal.abse.1001023.
42. Pezantes-Orellana C., German Bermúdez F., Montalvo J., Packer T., Orellana-Manzano A. Evaluating efficacy, safety, and innovation in skin care applications of

- essential oils: a systematic review // *Frontiers in Medicine*. — 2025. — Vol. 12. — DOI: 10.3389/fmed.2025.1589691.
43. Herman A., Herman A. P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. — 2015. — Vol. 67, no. 4. — P. 473–485. — DOI: 10.1111/jphp.12334.
 44. Adorjan B., Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2010. — Vol. 25, no. 6. — P. 407–426. — DOI: 10.1002/ffj.2024.
 45. ISO 3515:2002. Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) — Geneva: International Organization for Standardization, 2002.
 46. European Pharmacopoeia. 11th ed. — Strasbourg: EDQM, 2022.
 47. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. — Beijing: China Medical Science Press, 2020.
 48. Indian Pharmacopoeia (IP) 2026 [Электронный ресурс] / Indian Pharmacopoeia Commission, Ministry of Health & Family Welfare, Government of India. — 10th ed. — 2026. — URL: <https://www.ipc.gov.in/mandates/indian-pharmacopoeia/indian-pharmacopoeia-ip-2026.html> (дата обращения: 04.07.2026).
 49. ISO 11024-1:1998. Essential oils — General guidance on chromatographic profiles. Part 1: Preparation of chromatographic profiles for presentation in standards. — Geneva: International Organization for Standardization, 1998.
 50. ISO 11024-2:1998. Essential oils — General guidance on chromatographic profiles. Part 2: Utilization of chromatographic profiles of samples of essential oils. — Geneva: International Organization for Standardization, 1998.
 51. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15> (дата обращения: 04.07.2026).
 52. ISO 11178:1995. Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) — Geneva: International Organization for Standardization, 1995.
 53. ISO 3216:1997. Oil of cassia, Chinese type (*Cinnamomum aromaticum* Nees, syn. *Cinnamomum cassia* Nees ex Blume) — Geneva: International Organization for Standardization, 1997.

54. Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2010. — Vol. 25, no. 5. — P. 282–290. — DOI: 10.1002/ffj.1984.
55. Баффингтон Р., Уилсон М. Детекторы для газовой хроматографии. М.: Мир – 1993.
56. ISO 7609:1985. Essential oils — Analysis by gas chromatography on capillary columns — General method — Geneva: International Organization for Standardization, 1985.
57. Chaintreau A., Bicchi C., Rubiolo P. Quantifying the constituents of flavours, fragrances and essential oils // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2018. — Vol. 33, no. 5. — P. 337–339. — DOI: 10.1002/ffj.3465.
58. Kováts E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone // *Helvetica Chimica Acta*. — 1958. — Vol. 41, no. 7. — P. 1915–1932. — DOI: 10.1002/hlca.19580410703.
59. Zellner B. d., Bicchi C., Dugo P., Rubiolo P., Dugo G., Mondello L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2008. — Vol. 23, no. 5. — P. 297–314. — DOI: 10.1002/ffj.1887.
60. Bizzo H. R., Brilhante N. S., Nolvachai Y., Marriott P. J. Use and abuse of retention indices in gas chromatography // *Journal of Chromatography A*. — 2023. — Vol. 1708. — DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464376.
61. Van Den Dool H., Dec. Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography // *Journal of Chromatography A*. — 1963. — Vol. 11. — P. 463–471. — DOI: 10.1016/s0021-9673(01)80947-x.
62. Eckel W. P., Kind T. Use of boiling point–Lee retention index correlation for rapid review of gas chromatography-mass spectrometry data // *Analytica Chimica Acta*. — 2003. — Vol. 494, no. 1-2. — P. 235–243. — DOI: 10.1016/j.aca.2003.08.003.
63. Tarján G., Nyiredy S., Györ M. et al. Thirtieth anniversary of the retention index according to Kováts in gas-liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. — 1989. — Vol. 472. — P. 1–92. — DOI: 10.1016/s0021-9673(00)94099-8.
64. Zenkevich I. G., Babushok V. I., Linstrom P. J., White V E., Stein S. E. Application of histograms in evaluation of large collections of gas chromatographic retention indices // *Journal of Chromatography A*. — 2009. — Vol. 1216, no. 38. — P. 6651–6661. — DOI: 10.1016/j.chroma.2009.07.065.

65. Zenkevich I. G. Generalized retention indexes for gas chromatographic analysis of temperature with linear programming // *Journal of Analytical Chemistry*. — 1984. — Vol. 39, no. 7. — P. 1297–1307.
66. Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils // *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. — 2011. — Vol. 40, no. 4. — DOI: 10.1063/1.3653552.
67. Bicchi C., Chaintreau A., Joulain D. Identification of flavour and fragrance constituents // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2018. — Vol. 33, no. 3. — P. 201–202. — DOI: 10.1002/ffj.3445.
68. Cagliero C., Bicchi C., Marengo A., Rubiolo P., Sgorbini B. Gas chromatography of essential oil: State-of-the-art, recent advances, and perspectives // *Journal of Separation Science*. — 2022. — Vol. 45, no. 1. — P. 94–112. — DOI: 10.1002/jssc.202100681.
69. Rasheed D. M., Serag A., Abdel Shakour Z. T., Farag M. Novel trends and applications of multidimensional chromatography in the analysis of food, cosmetics and medicine bearing essential oils // *Talanta*. — 2021. — Vol. 223. — DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121710.
70. Eyres G., Marriott P. J., Dufour J. P. The combination of gas chromatography–olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils // *Journal of Chromatography A*. — 2007. — Vol. 1150, no. 1-2. — P. 70–77. — DOI: 10.1016/j.chroma.2006.07.019.
71. Brattoli M., Cisternino E., Dambruoso P. et al. Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds // *Sensors*. — 2013. — Vol. 13, no. 12. — P. 16759–16800. — DOI: 10.3390/s131216759.
72. Novák I., Zámbořině N. É., Horváth H., Seregély Z., Kaffka K. Evaluation of essential oils by gas-chromatography and a new method: "electronic nose" // *International Journal of Horticultural Science*. — 2001. — Vol. 7, no. 1. — DOI: 10.31421/ijhs/7/1/255.
73. Roy M., Yadav B. K. Electronic nose for detection of food adulteration: a review // *Journal of Food Science and Technology*. — 2022. — Vol. 59, no. 3. — P. 846–858. — DOI: 10.1007/s13197-021-05057-w.
74. Capetti F., Marengo A., Cagliero C. et al. Adulteration of Essential Oils: A Multitask Issue for Quality Control. Three Case Studies: *Lavandula angustifolia* Mill., *Citrus*

- limon (L.) Osbeck and *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel // *Molecules*. — 2021. — Vol. 26, no. 18. — P. 5610. — DOI: 10.3390/molecules26185610.
75. Başer K. H. C., Buchbauer G., eds. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2020.
 76. Dubnicka M., Cromwell B., Levine M. Investigation of the Adulteration of Essential Oils by GC-MS // *Current Analytical Chemistry*. — 2020. — Vol. 16, no. 8. — P. 965–969. — DOI: 10.2174/1573411015666191127093710.
 77. Di Bella G., Saitta M., Pellegrino M., Salvo F., Dugo G. Contamination of Italian Citrus Essential Oils: Presence of Phthalate Esters // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 1999. — Vol. 47, no. 3. — P. 1009–1012. — DOI: 10.1021/jf980735b.
 78. Do T. K. T., Hadji-Minaglou F., Antoniotti S., Fernandez X. Authenticity of essential oils // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 66. — P. 146–157. — DOI: 10.1016/j.trac.2014.10.007.
 79. Kreis P., Mosandl A. Chiral compounds of essential oils. Part XVI. enantioselective multidimensional gas chromatography in authenticity control of balm oil (*melissa officinalis* L.) // *Flavour and Fragrance Journal*. — 1994. — Vol. 9, no. 5. — P. 249–256. — DOI: 10.1002/ffj.2730090510.
 80. König W. A., Fricke C., Saritas Y., Momeni B., Hohenfeld G. Adulteration or natural variability? enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils // *Journal of High Resolution Chromatography*. — 1997. — Vol. 20, no. 2. — P. 55–61. — DOI: 10.1002/jhrc.1240200202.
 81. Pierson M., Fernandez X., Antoniotti S. Type and magnitude of non-compliance and adulteration in neroli, mandarin and bergamot essential oils purchased on-line: potential consumer vulnerability // *Scientific Reports*. — 2021. — Vol. 11, no. 1. — DOI: 10.1038/s41598-021-90307-2.
 82. Lafhal S., Bombarda I., Dupuy N. et al. Chiroptical fingerprints to characterize lavender and lavandin essential oils // *Journal of Chromatography A*. — 2020. — Vol. 1610. — DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460568.
 83. Wilson T. M., Poulson A., Murphy B. J. et al. Authentication of *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiaceae) essential oil using physical property, gas chromatography, enantiomeric selectivity, and stable isotope analyses // *Journal of Essential Oil Research*. — 2023. — Vol. 35, no. 6. — P. 529–541. — DOI: 10.1080/10412905.2023.2280900.
 84. Dobрева A., Nedeltcheva-Antonova D. Comparative Chemical Profiling and Citronellol Enantiomers Distribution of Industrial-Type Rose Oils Produced in China

- // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28, no. 3. — P. 1281. — DOI: 10.3390/molecules28031281.
85. Атаева А. К., Атажанова Г. А., Бадекова К., Ивасенко С. А., Марченко А. Б., Лосева И. В. Оценка качества эфирных масел с помощью анализа ГХ-МС // *Медицина и экология*. — 2020. — № 1 (94).
 86. Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Revision 3 [Электронный ресурс]. — European Medicines Agency. — URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/final-guideline-quality-herbal-medicinal-productstraditional-herbal-medicinal-products-revision-3_en.pdf (дата обращения: 04.07.2026).
 87. Li S., Han Q., Qiao C., Song J., Lung Cheng C., Xu H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview // *Chinese Medicine*. — 2008. — Vol. 3, no. 1. — DOI: 10.1186/1749-8546-3-7.
 88. О Руководстве по выбору тестов и критериев приемлемости для составления спецификаций на лекарственное растительное сырье, растительные фармацевтические субстанции (препараты на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственные растительные препараты : Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 12 февраля 2019 г. № 6. — Текст : электронный // Правовой портал ЕАЭС : [сайт]. — URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01420760/clcd_15022019_6 (дата обращения: 01.07.2026).
 89. Xie P., Chen S., Liang Y. z., Wang X., Tian R., Upton R. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — Vol. 1112, no. 1-2. — P. 171–180. — DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.091.
 90. Liang Y., Xie P., Chan K. Quality control of herbal medicines // *Journal of Chromatography B*. — 2004. — Vol. 812, no. 1-2. — P. 53–70. — DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.041.
 91. Serrano-Lourido D. et al. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis // *Food chemistry*. — 2012. — Vol. 135., No 3. — P. 1425–1431. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.010
 92. Bayona J. M., Domínguez C., Albaigés J. Analytical developments for oil spill fingerprinting // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 5. — P. 26–34. DOI: 10.1016/j.teac.2015.01.004

93. Quintanilla-Casas B. et al. Geographical authentication of virgin olive oil by GC-MS sesquiterpene hydrocarbon fingerprint: Scaling down to the verification of PDO compliance // *Food Control*. — 2022. — Vol. 139. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.10905.
94. Guidelines for the assessment of herbal medicines. WHO/TRM/91.4. — Geneva: World Health Organization, 1991. — URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/872d60df-c492-4ee6-8984-de8b0aa2ee60/content> (дата обращения: 04.07.2026).
95. Xin B., Mu S., Tan T., Yeung A., Gu D., Feng Q. Belief in and use of traditional Chinese medicine in Shanghai older adults: a cross-sectional study // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. — 2020. — Vol. 20, no. 1. — DOI: 10.1186/s12906-020-02910-x.
96. Xiao L. J., Tao R. Traditional Chinese Medicine (TCM) Therapy // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2017. — P. 261–280. — DOI: 10.1007/978-981-10-5562-1_13.
97. Cuadros-Rodríguez L. et al. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food identification and food authentication—A tutorial // *Analytica Chimica Acta*. — 2016. — T. 909. — C. 9-23. DOI: 10.1016/j.aca.2015.12.04297
98. Qian G., Leung S. Y., Lu G., Leung K. S. Y. Optimization and validation of a chromatographic method for the simultaneous quantification of six bioactive compounds in *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. — 2008. — Vol. 60, no. 1. — P. 107–113. — DOI: 10.1211/jpp.60.1.0014.
99. Qian G., Leung S. Y., Lu G., Leung K. S. Y. Differentiation of *Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati* from Closely Related Herbs by HPLC Fingerprinting // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. — 2006. — Vol. 54, no. 8. — P. 1179–1186. — DOI: 10.1248/cpb.54.1179.
100. *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines Volume III*. — Springer International Publishing, 2015. — DOI: 10.1007/978-3-319-06047-7.
101. Liu X., Jiang W., Su M. et al. Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting // *Journal of Separation Science*. — 2020. — Vol. 43, no. 1. — P. 6–17. — DOI: 10.1002/jssc.201900365.
102. Zhong X. K., Li D. C., Jiang J. G. Identification and Quality Control of Chinese Medicine Based on the Fingerprint Techniques // *Current Medicinal Chemistry*. — 2009. — Vol. 16, no. 23. — P. 3064–3075. — DOI: 10.2174/092986709788803051.

103. Huie C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2002. — Vol. 373, no. 1-2. — P. 23–30. — DOI: 10.1007/s00216-002-1265-3.
104. Kataoka H. New Trends in Sample Preparation for Analysis of Plant-Derived Medicines // *Current Organic Chemistry*. — 2010. — Vol. 14, no. 16. — P. 1698–1713. — DOI: 10.2174/138527210792927627.
105. Lefebvre T., Destandau E., Lesellier E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review // *Journal of Chromatography A*. — 2021. — Vol. 1635. — DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461770.
106. Farooq S., Mir S. A., Shah M. A., Manickavasagan A. Extraction techniques // *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*. — 2022. — P. 23–37. — DOI: 10.1016/b978-0-12-822475-5.00005-3.
107. ISO 1342:2012. Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [Стандарт]. — Geneva: International Organization for Standardization, 2012.
108. Satyal P., Jones T., Lopez E. et al. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis* // *Foods*. — 2017. — Vol. 6, no. 3. — P. 20. — DOI: 10.3390/foods6030020.
109. Gan F., Ye R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — Vol. 1104, no. 1-2. — P. 100–105. — DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.099.
110. Fan X. H., Cheng Y. Y., Ye Z. L., Lin R. C., Qian Z. Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines // *Analytica Chimica Acta*. — 2006. — Vol. 555, no. 2. — P. 217–224. — DOI: 10.1016/j.aca.2005.09.037.
111. Pravdova V., Walczak B., Massart D. L. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals // *Analytica Chimica Acta*. — 2002. — Vol. 456, no. 1. — P. 77–92. — DOI: 10.1016/s0003-2670(02)00008-9.
112. van Nederkassel A. M., Daszykowski M., Eilers P. H. C., Heyden Y. V. A comparison of three algorithms for chromatograms alignment // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — Vol. 1118, no. 2. — P. 199–210. — DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.114.
113. Kharbach M., Marmouzi I., El Jemli M., Bouklouze A., Vander Heyden Y. Recent advances in untargeted and targeted approaches applied in herbal-extracts and essential-oils fingerprinting - A review // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2020. — Vol. 177. — DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112849.

114. Tominaga Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS, ANNs, and k-NN // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. — 1999. — Vol. 49, no. 1. — P. 105–115. — DOI: 10.1016/s0169-7439(99)00034-9.
115. Syafri S. et al. The use of instrumental technique and chemometrics for essential oil authentication: A review // *Results in Chemistry*. — 2022. — Vol. 4. DOI: 10.1016/j.rechem.2022.100622
116. Yao H. et al. Chromatographic fingerprint and quantitative analysis of seven bioactive compounds of *Scutellaria barbata* // *Planta medica*. — 2011. — Vol. 77, no. 04. — P. 388-393. DOI: 10.1055/s-0030-1250353
117. Kindell J., Bridge C. Error rate and similarity determination of latent fingerprint chemistry via 1D GC and GC× GC–MS // *Forensic Chemistry*. — 2023. — Vol. 35. DOI: 10.1016/j.forc.2023.100521
118. Sharma B., Yadav D. K. Chromatography and hyphenated techniques in quality-based standardization of medicinal plants: Current scenario and future perspectives // *South African Journal of Botany*. — 2023. — Vol. 157. — P. 467-483. DOI: 10.1016/j.sajb.2023.04.005
119. Фармакопея Евразийского экономического союза [Электронный ресурс]. — URL: https://eec.eaeunion.org/comission/departement/deptexreg/formirovanie-obshchikh-rynkov/pharmacopoeia/pharmacopoeia_utv.php (дата обращения: 04.07.2026).
120. Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственных растительных препаратов : Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 декабря 2021 г. № 169. — Текст : электронный // Правовой портал ЕАЭС : [сайт]. — URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431057/clcd_10122021_169 (дата обращения: 07.09.2026).
121. ICH Q1 guideline on stability testing of drug substances and drug products [Электронный ресурс]. — European Medicines Agency. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1-guideline-stability-testing-drug-substances-drug-products> (дата обращения: 04.07.2026).
122. Sell C. Chemistry of essential oils // *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* / eds. K. H. C. Başer, G. Buchbauer. — Boca Raton: CRC Press, 2010. — P. 121–150.

123. Haidar A. A. H., Guillo P., Agustin D. Polyoxometalates Surrounded by Organic Cations or Immobilized on Functionalized Merrifield Resin as Catalysts for Oxidation of β -Myrcene and β -Caryophyllene // *Applied Sciences*. — 2025. — Vol. 15, no. 14. — P. 7981. — DOI: 10.3390/app15147981.
124. Tan Z., Hantschke L., Kaminski M. et al. Atmospheric photo-oxidation of myrcene: OH reaction rate constant, gas-phase oxidation products and radical budgets // *Atmospheric Chemistry and Physics*. — 2021. — Vol. 21, no. 20. — P. 16067–16091. — DOI: 10.5194/acp-21-16067-2021.
125. Raeber J., Bajor B., Poetzsch M., Steuer C. Comprehensive analysis of chemical and enantiomeric stability of terpenes in *Cannabis sativa* L. flowers // *Phytochemical Analysis*. — 2025. — Vol. 36, no. 1. — P. 205–217. — DOI: 10.1002/pca.3432.
126. Zhang J., Aydogan C., Patias G. et al. Polymerization of Myrcene in Both Conventional and Renewable Solvents: Postpolymerization Modification via Regioselective Photoinduced Thiol–Ene Chemistry for Use as Carbon Renewable Dispersants // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. — 2022. — Vol. 10, no. 29. — P. 9654–9664. — DOI: 10.1021/acssuschemeng.2c03755.
127. Rudbäck J., Hagvall L., Börje A., Nilsson U., Karlberg A. Characterization of skin sensitizers from autoxidized citronellol – impact of the terpene structure on the autoxidation process // *Contact Dermatitis*. — 2014. — Vol. 70, no. 6. — P. 329–339. — DOI: 10.1111/cod.12234.
128. Kern S., Dkhil H., Hendarsa P., Ellis G., Natsch A. Detection of potentially skin sensitizing hydroperoxides of linalool in fragranced products // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2014. — Vol. 406, no. 25. — P. 6165–6178. — DOI: 10.1007/s00216-014-8066-3.
129. Hagvall L., Bäcktorp C., Svensson S., Nyman G., Börje A., Karlberg A. T. Fragrance Compound Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization // *Chemical Research in Toxicology*. — 2007. — Vol. 20, no. 5. — P. 807–814. — DOI: 10.1021/tx700017v.
130. McGraw G. W., Hemingway R. W., Ingram, L. L., Canady C. S., McGraw W. B. Thermal Degradation of Terpenes: Camphene, Δ^3 -Carene, Limonene, and α -Terpinene // *Environmental Science & Technology*. — 1999. — Vol. 33, no. 22. — P. 4029–4033. — DOI: 10.1021/es9810641.

131. Odak I., Škorić I., Talić S., Škobić D. Thermal Stability and Photostability of *Satureja montana* and *Lavandula angustifolia* Essential Oils // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. — 2021. — DOI: 10.21577/0103-5053.20210099.
132. Yeh H. F., Luo C. Y., Lin C. Y., Cheng S. S., Hsu Y. R., Chang S. T. Methods for Thermal Stability Enhancement of Leaf Essential Oils and Their Main Constituents from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2013. — Vol. 61, no. 26. — P. 6293–6298. — DOI: 10.1021/jf401536y.
133. Turek C., Stintzing F. C. Stability of Essential Oils: A Review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. — 2013. — Vol. 12, no. 1. — P. 40–53. — DOI: 10.1111/1541-4337.12006.
134. Marriott P. J., Shellie R., Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils // *Journal of Chromatography A*. — 2001. — Vol. 936, no. 1-2. — P. 1–22. — DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01314-0.
135. Olmedo R. H., Asensio C. M., Grosso N. R. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina // *Industrial Crops and Products*. — 2015. — Vol. 69. — P. 21–28. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.005.
136. Wang Y., O'Reilly J., Chen Y., Pawliszyn J. Equilibrium in-fibre standardisation technique for solid-phase microextraction // *Journal of Chromatography A*. — 2005. — Vol. 1072, no. 1. — P. 13–17. — DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.084.
137. Rudbäck J., Ramzy A., Karlberg A., Nilsson U. Determination of allergenic hydroperoxides in essential oils using gas chromatography with electron ionization mass spectrometry // *Journal of Separation Science*. — 2014. — Vol. 37, no. 8. — P. 982–989. — DOI: 10.1002/jssc.201300843.
138. Turek C., Stintzing F. C. Evaluation of Selected Quality Parameters to Monitor Essential Oil Alteration during Storage // *Journal of Food Science*. — 2011. — Vol. 76, no. 9. — DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02416.x.
139. Turek C., Stintzing F. C. Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2011. — Vol. 400, no. 9. — P. 3109–3123. — DOI: 10.1007/s00216-011-4976-5.
140. Rudbäck J., Islam N., Nilsson U., Karlberg A. A sensitive method for determination of allergenic fragrance terpene hydroperoxides using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // *Journal of Separation Science*. — 2013. — Vol. 36, no. 8. — P. 1370–1378. — DOI: 10.1002/jssc.201200855.

141. ISO 18321:2015. International Organization for Standardization. — Geneva: International Organization for Standardization, 2015.
142. Misharina T. A. Influence of the Duration and Conditions of Storage on the Composition of the Essential Oil from Coriander Seeds // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2001. — Vol. 37, no. 6. — P. 622–628. — DOI: 10.1023/a:1012315403828.
143. Misharina T. A., Polshkov A. N., Ruchkina E. L., Medvedeva I. B. Changes in the Composition of the Essential Oil of Marjoram during Storage // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2003. — Vol. 39, no. 3. — P. 311–316. — DOI: 10.1023/a:1023592030874.
144. Misharina T. A., Polshkov A. N. Antioxidant Properties of Essential Oils: Autoxidation of Essential Oils from Laurel and Fennel and of Their Mixtures with Essential Oil from Coriander // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2005. — Vol. 41, no. 6. — P. 610–618. — DOI: 10.1007/s10438-005-0111-8.
145. Rowshan V., Bahmanzadegan A., Saharkhiz M. J. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak // *Industrial Crops and Products*. — 2013. — Vol. 49. — P. 97–101. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.029.
146. Najafian S. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (*Lamiaceae*) in Iran // *Industrial Crops and Products*. — 2014. — Vol. 52. — P. 575–581. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.11.015.
147. Njoroge S. M., Ukeda H., Sawamura M. Changes in the Volatile Composition of Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Cold-Pressed Oil during Storage // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 1996. — Vol. 44, no. 2. — P. 550–556. — DOI: 10.1021/jf950284k.
148. Njoroge S. M., Ukeda H., Sawamura M. Changes of the Volatile Profile and Artifact Formation in Daidai (*Citrus aurantium*) Cold-Pressed Peel Oil on Storage // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2003. — Vol. 51, no. 14. — P. 4029–4035. — DOI: 10.1021/jf021215q.
149. Choi H. S., Sawamura M. Effects of Storage Conditions on the Composition of *Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka (*Hyuganatsu*) Essential Oil // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. — 2002. — Vol. 66, no. 2. — P. 439–443. — DOI: 10.1271/bbb.66.439.
150. Park C., Garland S. M., Close D. C. The influence of temperature, light, and storage period on the colour and chemical profile of *kunzea* essential oil (*Kunzea ambigua*

- (Sm.) Druce) // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. — 2022. — Vol. 30. — P. 100383. — DOI: 10.1016/j.jarmap.2022.100383.
151. Soltanbeigi A. Qualitative Variations of Lavandin Essential Oil under Various Storage Conditions // Journal of Essential Oil Bearing Plants. — 2020. — Vol. 23, no. 6. — P. 1237–1252. — DOI: 10.1080/0972060x.2020.1871076.
 152. Najafian S. The effect of time and temperature on the shelf life of essential oils of *Lavandula officinalis* // Journal of Essential Oil Research. — 2016. — Vol. 28, no. 5. — P. 413–420. — DOI: 10.1080/10412905.2016.1165743.
 153. Mehdizadeh L., Ghasemi Pirbalouti A., Moghaddam M. Storage stability of essential oil of cumin (*Cuminum Cyminum* L.) as a function of temperature // International Journal of Food Properties. — 2017. — P. 1–9. — DOI: 10.1080/10942912.2017.1354018.
 154. Karami A., Tashani F., Tahmasebi A., Maggi F. Chemical Variability in the Composition of *Zhumeria majdae* (Rech. F. & Wendelbo) Essential Oil According to Storage Time and Temperature // Horticulturae. — 2021. — Vol. 7, no. 11. — P. 463. — DOI: 10.3390/horticulturae7110463.
 155. Bahmanzadegan A., Rowshan V., Saharkhiz M. J. Essential Oil Composition of *Myrtus communis* L. Under Different Storage Conditions // Journal of Essential Oil Bearing Plants. — 2015. — Vol. 18, no. 6. — P. 1467–1475. — DOI: 10.1080/0972060x.2014.884767.
 156. Rosado L. D. S., Pinto J. E. B. P., Bertolucci S. K. V., Jesus H. C. R. d., Alves P. B. Changes in the content and composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. during storage // Journal of Essential Oil Research. — 2013. — Vol. 25, no. 3. — P. 227–232. — DOI: 10.1080/10412905.2013.775017.
 157. Ganosi E., Barda C., Grafakou M. E., Rallis M. C., Skaltsa H. An In-Depth Stability Study of the Essential Oils from *Mentha × piperita*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*, and *Thymus vulgaris*: The Impact of Thermal and Storage Conditions // Separations. — 2023. — Vol. 10, no. 9. — P. 488. — DOI: 10.3390/separations10090488.
 158. Poulose A. J., Croteau R. γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1978. — Vol. 191, no. 1. — P. 400–411. — DOI: 10.1016/0003-9861(78)90104-2.
 159. Poulose A. J., Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1978. — Vol. 187, no. 2. — P. 307–314. — DOI: 10.1016/0003-9861(78)90039-5.

160. Dewick P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. — 2nd ed. — Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
161. Farahbakhsh J., Najafian S., HosseiniFarahi M., Gholipour S. The effect of time and temperature on shelf life of essential oil composition of *Teucrium polium* L // Natural Product Research. — 2022. — Vol. 36, no. 1. — P. 424–428. — DOI: 10.1080/14786419.2020.1771711.
162. *Salvia sclarea* L. // World Flora Online [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000302258> (дата обращения: 04.07.2026).
163. *Salvia sclarea* L. // Plants of the World Online. Kew Science [Электронный ресурс]. — URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:457210-1> (дата обращения: 04.07.2026).
164. Cui H., Zhang X., Zhou H., Zhao C., Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil // Botanical Studies. — 2015. — Vol. 56, no. 1. — Article 16. — DOI: 10.1186/s40529-015-0096-4.
165. Sienkiewicz M., Głowacka A., Poznańska-Kurowska K., Kaszuba A., Urbaniak A., Kowalczyk E. The effect of clary sage oil on staphylococci responsible for wound infections // Advances in Dermatology and Allergology. — 2015. — Vol. 1. — P. 21–26. — DOI: 10.5114/pdia.2014.40957.
166. Kačániová M., Vukovic N. L., Čmiková N. et al. *Salvia sclarea* Essential Oil Chemical Composition and Biological Activities // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24, no. 6. — P. 5179. — DOI: 10.3390/ijms24065179.
167. Yuce E., Yildirim N., Yildirim N. C., Paksoy M. Y., Bagci E. Essential oil composition, antioxidant and antifungal activities of *Salvia sclarea* L. from Munzur Valley in Tunceli, Turkey // Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France). — 2014. — Vol. 60, no. 2. — P. 1–5.
168. Zhou J., Xie X., Tang H., Peng C., Peng F. The bioactivities of sclareol: A mini review // Frontiers in Pharmacology. — 2022. — Vol. 13. — Article 1014105. — DOI: 10.3389/fphar.2022.1014105.
169. Saharkhiz M. J., Ghani A., Hassanzadeh-Khayyat M. Changes in essential oil content and composition of clary sage (*Salvia sclarea*) aerial parts during different phenological stages // Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. — 2009. — Vol. 3, special issue 1. — P. 90–93.

170. Ladjel-Mendil A., Amarni M., Chelghoum H. et al. Essential oil from aerial parts of *Salvia sclarea* : A comprehensive study of antibacterial activity through chemical profiling, molecular interactions, and predictive modeling using QSAR_KNN_PCA // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. — 2025. — Vol. 28, no. 5. — P. 902–919. — DOI: 10.1080/0972060x.2025.2559656.
171. ISO 24255:2025. Essential oil of clary sage (*Salvia sclarea* L.) "prewilted" French type and "chopped" French type [Стандарт]. — Geneva: International Organization for Standardization, 2025.
172. Логвиненко Л.А., Хлыпенко Л.А., Марко Н.В. Ароматические растения семейства Lamiaceae для фитотерапии // *Фармация и фармакология*. - 2016. - Т. 4. - №4. - С. 34-47. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-4-34-47
173. Коваленко Н. А., Супиченко Г. Н., Леонтьев В. Н., Шутова А. Г., Спиридович Е. В., Кухарева Л. В. Динамика накопления и компонентный состав эфирных масел некоторых видов рода *Salvia* L. [Электронный ресурс]. — Минск: БГУ, 2010. — URL: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/16319> (дата обращения: 04.07.2026).
174. Гусейнова А. Э., Ибрагимов А. Ш., Набиева Ф. Х. Эфирное масло и химический состав некоторых перспективных видов рода *Salvia*, распространенных на территории Нахчыванской Автономной Республики // *Academy*. — 2018. — № 4 (31). — С. 13–16.
175. Farkasbreve P., Hollá M., Tekel J., Mellen S., Vaverková. Composition of the Essential Oils from the Flowers and Leaves of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) Cultivated in Slovak Republic // *Journal of Essential Oil Research*. — 2005. — Vol. 17, no. 2. — P. 141–144. — DOI: 10.1080/10412905.2005.9698858.
176. Dzumayev K. K., Tsibulskaya I. A., Zenkevich I. G., Tkachenko K. G., Satzyperova I. F. Essential Oils of *Salvia sclarea* L. Produced from Plants Grown in Southern Uzbekistan // *Journal of Essential Oil Research*. — 1995. — Vol. 7, no. 6. — P. 597–604. — DOI: 10.1080/10412905.1995.9700513.
177. Verma R. S. Chemical investigation of decanted and hydrophilic fractions of *Salvia sclarea* essential oil // *Asian Journal of Traditional Medicines*. — 2010. — Vol. 5, no. 3. — P. 102–108.
178. Schmiderer C., Grassi P., Novak J., Weber M., Franz C. Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae) // *Plant Biology*. — 2008. — Vol. 10, no. 4. — P. 433–440. — DOI: 10.1111/j.1438-8677.2008.00053.x.

179. Shanaida M., Hudz N., Białoń M. et al. Chromatographic profiles and antimicrobial activity of the essential oils obtained from some species and cultivars of the *Menthae* tribe (*Lamiaceae*) // *Saudi Journal of Biological Sciences*. — 2021. — Vol. 28, no. 11. — P. 6145–6152. — DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.06.068.
180. Ovidi E., Laghezza Masci V., Zambelli M., Tiezzi A., Vitalini S., Garzoli S. *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, no. 4. — P. 707. — DOI: 10.3390/plants10040707.
181. Moretti M. D. L., Peana A. T., Satta M. A Study on Anti-Inflammatory and Peripheral Analgesic Action of *Salvia sclarea* Oil and Its Main Components // *Journal of Essential Oil Research*. — 1997. — Vol. 9, no. 2. — P. 199–204. — DOI: 10.1080/10412905.1997.9699459.
182. El-Gohary A. E., Amer H. M., Salama A. B., Wahba H. E., Khalid K. A. Characterization of the Essential Oil Components of Adapted *Salvia sclarea* L. (Clary sage) Plant Under Egyptian Environmental Conditions // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. — 2020. — Vol. 23, no. 4. — P. 788–794. — DOI: 10.1080/0972060x.2020.1818635.
183. Hudaib M., Bellardi M. G., Rubies-Autonell C., Fiori J., Cavrini V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-I // *Il Farmaco*. — 2001. — Vol. 56, no. 3. — P. 219–227. — DOI: 10.1016/s0014-827x(01)01038-2.
184. Carrubba A., la Torre R., Piccaglia R., Marotti M. Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2002. — Vol. 17, no. 3. — P. 191–194. — DOI: 10.1002/ffj.1080.
185. Pitarokili D., Couladis M., Petsikos-Panayotarou N., Tzakou O. Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential Oil of *Salvia sclarea* from Greece // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2002. — Vol. 50, no. 23. — P. 6688–6691. — DOI: 10.1021/jf020422n.
186. Elnir O., Ravid U., Putievsky E., Dudai N., Ladizinsky G. The chemical composition of two clary sage chemotypes and their hybrids // *Flavour and Fragrance Journal*. — 1991. — Vol. 6, no. 2. — P. 153–155. — DOI: 10.1002/ffj.2730060212.

187. *Rosmarinus officinalis* L. // World Flora Online [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000298062> (дата обращения: 04.07.2026).
188. *Rosmarinus officinalis* // Plants of the World Online. Kew Science [Электронный ресурс]. — URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:455509-1> (дата обращения: 04.07.2026).
189. Попов И. В., Чумакова В. В., Попова О. И., Чумаков В. Ф. Биологически активные вещества, проявляющие антиоксидантную активность, некоторых представителей семейства Lamiaceae, культивируемых в Ставропольском крае // Химия растительного сырья. — 2019. — № 4. — С. 163–172.
190. ISO 1342:2012. Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). — Geneva: International Organization for Standardization, 2012.
191. Ghasemzadeh Rahbardar M., Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. — 2020. — Vol. 23, no. 9. — P. 1100–1112. — DOI: 10.22038/ijbms.2020.45269.10541.
192. Borges R. S., Ortiz B. L. S., Pereira A. C. M., Keita H., Carvalho J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved // Journal of Ethnopharmacology. — 2019. — Vol. 229. — P. 29–45. — DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.038.
193. Zhaeintan P. Radioprotective Effect of *Rosmarinus officinalis* L (Rosemary) Essential Oil on Apoptosis, Necrosis and Mitotic Death of Human Peripheral Lymphocytes (PBMCs) // Journal of Biomedical Physics and Engineering. — 2022. — Vol. 12, no. 3. — DOI: 10.31661/jbpe.v0i0.2105-1333.
194. Oduncuoglu G., Şanlıtürk G. Anti-inflammatory and Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil and Hydrosol against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // EMU Journal of Pharmaceutical Sciences. — 2025. — Vol. 8, no. 3. — P. 124–131. — DOI: 10.54994/emujpharmsci.1827520.
195. de Oliveira J. R., Camargo S. E. A., de Oliveira L. D. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent // Journal of Biomedical Science. — 2019. — Vol. 26, no. 1. — Article 5. — DOI: 10.1186/s12929-019-0499-8.
196. Melito S., Petretto G. L., Chahine S., Pintore G., Chessa M. Seasonal Variation of Essential Oil in *Rosmarinus officinalis* Leaves in Sardinia // Natural Product

- Communications. — 2019. — Vol. 14, no. 7. — Article 1934578X19864005. — DOI: 10.1177/1934578x19864005.
197. Li G., Cervelli C., Ruffoni B., Shachter A., Dudai N. Volatile diversity in wild populations of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from the Tyrrhenian Sea vicinity cultivated under homogeneous environmental conditions // *Industrial Crops and Products*. — 2016. — Vol. 84. — P. 381–390. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.029.
 198. Sadeh D., Nitzan N., Chaimovitsh D., Shachter A., Ghanim M., Dudai N. Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) // *Industrial Crops and Products*. — 2019. — Vol. 138. — P. 111419. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.05.068.
 199. Özcan M. M., Chalchat J. C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. — 2008. — Vol. 59, no. 7-8. — P. 691–698. — DOI: 10.1080/09637480701777944.
 200. Napoli E. M., Curcuruto G., Ruberto G. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 2010. — Vol. 38, no. 4. — P. 659–670. — DOI: 10.1016/j.bse.2010.04.001.
 201. Bekhechi A., Malti C. E. W., Babali B. et al. Chemical Variability and Anti-Inflammatory Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Leaf Essential Oil from Algerian Sahara // *Chemistry & Biodiversity*. — 2024. — Vol. 21, no. 4. — Article e202302077. — DOI: 10.1002/cbdv.202302077.
 202. Lakušić D., Ristić M., Slavkovska V., Lakušić B. Seasonal Variations in the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) // *Natural Product Communications*. — 2013. — Vol. 8, no. 1. — Article 1934578X1300800132. — DOI: 10.1177/1934578x1300800132.
 203. Celiktaş O. Y., Kocabas E. E. H., Bedir E., Sukan F. V., Ozek T., Baser K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations // *Food Chemistry*. — 2007. — Vol. 100, no. 2. — P. 553–559. — DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.10.011.
 204. Lemos M. F., Lemos M. F., Pacheco H. P., Endringer D. C., Scherer R. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity // *Industrial Crops and Products*. — 2015. — Vol. 70. — P. 41–47. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.062.

205. Farhani F., El Aboudi A., Boujraf A., Dallahi Y. Influence of Harvest Time and Environmental Factors on the Yield and Chemical Composition of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Essential Oil in Northeast Morocco // *Ecological Engineering & Environmental Technology*. — 2024. — Vol. 25, no. 11. — P. 1–17. — DOI: 10.12912/27197050/191265.
206. Chalchat J. C., Garry R. P., Michet A., Benjlali B., Chabart J. L. Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The Chemical Composition of Oils of Various Origins (Morocco, Spain, France) // *Journal of Essential Oil Research*. — 1993. — Vol. 5, no. 6. — P. 613–618. — DOI: 10.1080/10412905.1993.9698293.
207. Christopoulou S. D., Androutsopoulou C., Hahalis P., Kotsalou C., Vantarakis A., Lamari F. N. Rosemary Extract and Essential Oil as Drink Ingredients: An Evaluation of Their Chemical Composition, Genotoxicity, Antimicrobial, Antiviral, and Antioxidant Properties // *Foods*. — 2021. — Vol. 10, no. 12. — P. 3143. — DOI: 10.3390/foods10123143.
208. Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Saánchez A., Luque P. Chemical Composition and Seasonal Variations of Rosemary Oil from Southern Spain // *Journal of Essential Oil Research*. — 2003. — Vol. 15, no. 1. — P. 10–14. — DOI: 10.1080/10412905.2003.9712248.
209. Jiang Y., Wu N., Fu Y. J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. — 2011. — Vol. 32, no. 1. — P. 63–68. — DOI: 10.1016/j.etap.2011.03.011.
210. Micić D., Đurović S., Riabov P. et al. Rosemary Essential Oils as a Promising Source of Bioactive Compounds: Chemical Composition, Thermal Properties, Biological Activity, and Gastronomical Perspectives // *Foods*. — 2021. — Vol. 10, no. 11. — P. 2734. — DOI: 10.3390/foods10112734.
211. Хлыпенко Л. А., Шевчук О. М., Бакова Н. Н., Феськов С. А. О качестве эфирного масла *Rosmarinus officinalis* L., произрастающего на Южном берегу Крыма // *Сборник научных трудов ГНБС*. — 2015. — Т. 141. — С. 118–126.
212. Тохсырова З. М., Никитина А. С., Попова О. И., Меликов Ф. М., Попов И. В. Состав эфирного масла побегов розмарина лекарственного, интродуцированного в России // *Фармация*. — 2016. — Т. 65, № 6. — С. 25–29.
213. *Satureja montana* L. // *Plants of the World Online*. Kew Science [Электронный ресурс]. — URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:457736-1> (дата обращения: 04.07.2026).

214. Dunkić V., Bezić N., Vuko E., Cukrov D. Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L. ssp. *variegata* (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV // *Molecules*. — 2010. — Vol. 15, no. 10. — P. 6713–6721. — DOI: 10.3390/molecules15106713.
215. Ćavar S., Maksimović M., Šolić M. E., Jerković-Mujkić A., Bešta R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils // *Food Chemistry*. — 2008. — Vol. 111, no. 3. — P. 648–653. — DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.033.
216. Maccelli A., Vitanza L., Imbriano A. et al. *Satureja montana* L. Essential Oils: Chemical Profiles/Phytochemical Screening, Antimicrobial Activity and O/W NanoEmulsion Formulations // *Pharmaceutics*. — 2019. — Vol. 12, no. 1. — P. 7. — DOI: 10.3390/pharmaceutics12010007.
217. Serrano C., Matos O., Teixeira B. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. — 2011. — Vol. 91, no. 9. — P. 1554–1560. — DOI: 10.1002/jsfa.4347.
218. Marin M., Novaković M., Tešević V. et al. Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana* L. from Dalmatia, Croatia // *Flavour and Fragrance Journal*. — 2012. — Vol. 27, no. 3. — P. 216–223. — DOI: 10.1002/ffj.3082.
219. Said-Al Ahl H. A. H., Kačániova M., Mahmoud A. A. et al. Phytochemical Characterization and Biological Activities of Essential Oil from *Satureja montana* L., a Medicinal Plant Grown under the Influence of Fertilization and Planting Dates // *Biology*. — 2024. — Vol. 13, no. 5. — P. 328. — DOI: 10.3390/biology13050328.
220. Hajhashemi V., Ghannadi A., Pezeshkian S. K. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2002. — Vol. 82, no. 2-3. — P. 83–87. — DOI: 10.1016/s0378-8741(02)00137-x.
221. Свиденко Л. В., Работягов В. Д., Хлыпенко Л. А. Внутривидовая изменчивость состава эфирных масел *Ocimum basilicum* L. и *Satureja montana* L. // *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. — 2006. — № 93. — С. 50–52.
222. Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E. Chemical Composition and Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Satureja montana* L. Essential Oil and Its Antibacterial Potential against *Salmonella* Spp. Strains // *Journal*

- of Chemistry. — 2013. — Vol. 2013, no. 1. — Article 275698. — DOI: 10.1155/2013/275698.
223. Radonic A., Milos M. Chemical Composition and In Vitro Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L. // Free Radical Research. — 2003. — Vol. 37, no. 6. — P. 673–679. — DOI: 10.1080/1071576031000105643.
 224. Sanja Ć., Šolić M. E., Maksimović M. Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo // Botanica Serbica. — 2013. — Vol. 37, no. 2. — P. 159–165.
 225. Navarro-Rocha J., Andrés M. F., Díaz C. E., Burillo J., González-Coloma A. Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja Montana* // Industrial Crops and Products. — 2020. — Vol. 145. — P. 111958. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111958.
 226. Ibraliu A. et al. Variability of essential oil composition in Albanian accessions of *Satureja montana* L. // Journal of Medicinal Plants Research. — 2010. — Vol. 4. — P. 1359–1364.
 227. Slavkovska V., Jancic R., Milosavljevic S., Djokovic D. Variability of the Essential Oil Composition of the Species *Satureja montana* L. (Lamiaceae) // Journal of Essential Oil Research. — 1997. — Vol. 9, no. 6. — P. 629–634. — DOI: 10.1080/10412905.1997.9700801.
 228. Dodoš T., Novaković J., Vujisić L., Marin P. D., Rajčević N. Geographic variability of winter savory essential oil // Industrial Crops and Products. — 2024. — Vol. 210. — P. 118167. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.118167.
 229. *Satureja montana* subsp. *taurica* // International Plant Names Index [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.ipni.org/n/884195-1> (дата обращения: 04.07.2026).
 230. *Satureja taurica* Velen. // World Flora Online Plant List [Электронный ресурс]. — WFO ID: wfo-0000304540. — Snapshot: December 2025. — URL: https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-0000304540-2025-12?matched_id=wfo-0000304356 (дата обращения: 04.07.2026).
 231. Абдулганиева Э.Ф., Вахрушева Л.П. Гетерогенность структуры ценопопуляций *Satureja montana* l. Subsp. *Taurica* (velen.) P. W. Ball [s. *Taurica* velen.] В различных экотопах предгорного Крыма // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. — 2020. — Т. 6 (72), № 1.

232. Ejaz A., Waliat S., Arshad M. S. et al. A comprehensive review of summer savory (*Satureja hortensis* L.): promising ingredient for production of functional foods // *Frontiers in Pharmacology*. — 2023. — Vol. 14. — Article 1198970. — DOI: 10.3389/fphar.2023.1198970.
233. Mahboubi M., Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil // *Iranian Journal of Microbiology*. — 2011. — Vol. 3. — P. 194–200.
234. Katar D., Kacar O., Kara N. et al. Ecological variation of yield and aroma components of summer savory (*Satureja hortensis* L.) // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. — 2017. — Vol. 7. — P. 131–135. — DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.07.005.
235. Mohtashami S., Rowshan V., Tabrizi L., Babalar M., Ghani A. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions // *Industrial Crops and Products*. — 2018. — Vol. 111. — P. 226–231. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.09.055.
236. Ilić Z. S., Milenković L., Stanojević L. et al. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing in shading condition // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. — 2023. — Vol. 26, no. 6. — P. 1397–1409. — DOI: 10.1080/0972060x.2023.2289055.
237. Найда Н.М. Изучение чабера садового (*Satureja hortensis* L.) в Ленинградской области // *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. — 2016. — № 42.
238. Маланкина Е. Л., Козловская Л. Н., Солопов С. Г., Зайчик Б. Ц., Ружицкий А. О., Евграфов А. А. Особенности компонентного состава эфирного масла чабера садового (*Satureja hortensis* L.) в зависимости от сорта // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. — 2017. — № 3. — С. 19–29.
239. *Origanum majorana* L. // *Plants of the World Online*. Kew Science [Электронный ресурс]. — URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:453303-1> (дата обращения: 04.07.2026).
240. *Origanum majorana* L. // *World Flora Online* [Электронный ресурс]. — URL: <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-0000260658-2025-12> (дата обращения: 04.07.2026).

241. Kakouri E., Daferera D., Kanakis C. et al. *Origanum majorana* Essential Oil—A Review of Its Chemical Profile and Pesticide Activity // *Life*. — 2022. — Vol. 12, no. 12. — P. 1982. — DOI: 10.3390/life12121982.
242. Hashem A. H., Ibrahim N. A., Badr B. M. et al. Exploring the biological activities of the *Origanum majorana* essential oil nanoemulsion: antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and anticancer activities // *RSC Advances*. — 2025. — Vol. 15, no. 55. — P. 46870–46881. — DOI: 10.1039/d5ra06064h.
243. Mossa A. T. H., Nawwar G. Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil // *Human & Experimental Toxicology*. — 2011. — Vol. 30, no. 10. — P. 1501–1513. — DOI: 10.1177/09603271110391686.
244. Hashem A. H., Ibrahim N. A., Badr B. M. et al. Exploring the biological activities of the *Origanum majorana* essential oil nanoemulsion: antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and anticancer activities // *RSC Advances*. — 2025. — Vol. 15, no. 55. — P. 46870–46881. — DOI: 10.1039/d5ra06064h.
245. Wagdy R., Abdel-Kader R. M., El-Khatib A. H., Linscheid M. W., Handoussa H., Hamdi N. *Origanum majorana* L. protects against neuroinflammation-mediated cognitive impairment: a phyto-pharmacological study // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. — 2023. — Vol. 23, no. 1. — Article 165. — DOI: 10.1186/s12906-023-03994-x.
246. Gheitasi I., Motaghi N., Sadeghi H. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Origanum majorana* L. Methanolic Extract on Bile Duct Ligation in Male Rats // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. — 2021. — Vol. 2021. — P. 1–10. — DOI: 10.1155/2021/9927196.
247. Miguel M. G., da Silva C. I., Farah L., Castro Braga F., Figueiredo A. C. Effect of Essential Oils on the Release of TNF- α and CCL2 by LPS-Stimulated THP-1 Cells // *Plants*. — 2020. — Vol. 10, no. 1. — P. 50. — DOI: 10.3390/plants10010050.
248. Ghazal T. S. A., Schelz Z., Vidács L. et al. Antimicrobial, Multidrug Resistance Reversal and Biofilm Formation Inhibitory Effect of *Origanum majorana* Extracts, Essential Oil and Monoterpenes // *Plants*. — 2022. — Vol. 11, no. 11. — P. 1432. — DOI: 10.3390/plants11111432.
249. Vera R. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island // *Food Chemistry*. — 1999. — Vol. 66, no. 2. — P. 143–145. — DOI: 10.1016/s0308-8146(98)00018-1.

250. Schmidt E., Bail S., Buchbauer G. et al. Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of the Essential oil of *Origanum Majorana* L. from Albania // *Natural Product Communications*. — 2008. — Vol. 3, no. 7. — Article 1934578X0800300704. — DOI: 10.1177/1934578x0800300704.
251. Paudel P. N., Satyal P., Satyal R., Setzer W. N., Gyawali R. Chemical Composition, Enantiomeric Distribution, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum majorana* L. Essential Oil from Nepal // *Molecules*. — 2022. — Vol. 27, no. 18. — P. 6136. — DOI: 10.3390/molecules27186136.
252. Busatta C., Vidal R. S., Popielski A. S. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage // *Food Microbiology*. — 2008. — Vol. 25, no. 1. — P. 207–211. — DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.003.
253. Hajlaoui H., Mighri H., Aouni M., Gharsallah N., Kadri A. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil // *Microbial Pathogenesis*. — 2016. — Vol. 95. — P. 86–94. — DOI: 10.1016/j.micpath.2016.03.003.
254. Jiang Z. T., Li R., Wang Y., Chen S. H., Guan W. Q. Volatile Oil Composition of Natural Spice, *Origanum majorana* L. Grown in China // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. — 2011. — Vol. 14, no. 4. — P. 458–462. — DOI: 10.1080/0972060x.2011.10643601.
255. Shrestha S., Nyaupane D. R., Yahara S., Rajbhandari M., Gewali M. B. Quality Assessment of the Essential Oils From *Artemisia Gmelinii* and *Origanum Majorana* of Nepali Origin // *Scientific World*. — 2013. — Vol. 11, no. 11. — P. 77–80. — DOI: 10.3126/sw.v11i11.8557.
256. El-Akhal F., Lalami A. E. O., Zoubi Y. E., Greche H., Guemmouh R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. — 2014. — Vol. 4, no. 9. — P. 746–750. — DOI: 10.12980/apjtb.4.2014apjtb-2014-0392.
257. Charai M., Mosaddak M., Faid M. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Two Aromatic Plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. // *Journal of Essential Oil Research*. — 1996. — Vol. 8, no. 6. — P. 657–664. — DOI: 10.1080/10412905.1996.9701036.
258. Partovi R., Talebi F., Sharifzadeh A. Antimicrobial Efficacy and Chemical Properties of *Caryophyllus aromaticus* and *Origanum majorana* Essential Oils Against

- Foodborne Bacteria Alone and in Combination // International Journal of Enteric Pathogens. — 2018. — Vol. 6, no. 4. — P. 95–103. — DOI: 10.15171/ijep.2018.25.
259. Soliman F. M., Yousif M. F., Zaghloul S. S., Okba M. M. Seasonal Variation in the Essential Oil Composition of *Origanum majorana* L. Cultivated in Egypt // Zeitschrift für Naturforschung C. — 2009. — Vol. 64, no. 9-10. — P. 611–614. — DOI: 10.1515/znc-2009-9-1001.
260. ISO 13171:2016. Essential oil of oregano [*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietsw.]. — Geneva: International Organization for Standardization, 2016.
261. ISO 14717:2008. Oil of origanum, Spanish type [*Coridothymus capitatus* (L.) Rchb.f.]. — Geneva: International Organization for Standardization, 2008.
262. ISO 4728:2003. Oil of Spanish wild marjoram (*Thymus mastichina* L.). — Geneva: International Organization for Standardization, 2003.
263. ОФС.1.5.3.0010 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» // Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-5/1-5-1/opredelenie-soderzhaniya-efirnogo-masla-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennykh-sredstvakh/> (дата обращения: 04.07.2026).
264. Образец LE 01062579. *Rosmarinus officinalis* L. // Виртуальный гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН [Электронный ресурс]. — URL: <http://rr.herbariumle.ru/01062579> (дата обращения: 04.07.2026).
265. Образец LE 01179330 // Виртуальный гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН [Электронный ресурс]. — URL: <http://rr.herbariumle.ru/01179330> (дата обращения: 04.07.2026).
266. Образец LE 01179312 // Виртуальный гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН [Электронный ресурс]. — URL: <http://rr.herbariumle.ru/01179312> (дата обращения: 04.07.2026).
267. Specimen 00655977 // Index of Botanical Specimens. Harvard University Herbaria & Libraries [Электронный ресурс]. — URL: https://kiki.huh.harvard.edu/databases/specimen_search.php?mode=details&id=469287 (дата обращения: 04.07.2026).
268. Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. — 4th ed. — Carol Stream: Allured Publishing, 2017.

269. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 2020) [База данных]. National Institute of Standards and Technology (NIST), Mass Spectrometry Data Center. Gaithersburg, Maryland.
270. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 2025) [База данных]. National Institute of Standards and Technology (NIST), Mass Spectrometry Data Center. Gaithersburg, Maryland.
271. ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла». Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-5/1-5-3/efirnye-masla/> (дата обращения: 04.07.2026).
272. ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-fizicheskikh-fiziko-khimicheskikh-i-khimicheskikh-ispytaniy/> (дата обращения: 04.07.2026).
273. ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/> (дата обращения: 04.07.2026).
274. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline [Электронный ресурс]. — European Medicines Agency. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (дата обращения: 04.07.2026).
275. ISO 210:2023. Essential oils — General requirements and guidelines for packaging, conditioning and storage. — Geneva: International Organization for Standardization, 2023.
276. Introduction to Karl Fischer Titration. — Mettler Toledo, 2014.
277. ISO 11021:1999. Essential oils — Determination of water content — Karl Fischer method. — Geneva: International Organization for Standardization, 1999.
278. ОФС.1.2.3.0002 Определение воды // Государственная фармакопея Российской Федерации : XV изд. / Министерство здравоохранения Российской Федерации. — Москва, 2023. — Текст : электронный // Электронная библиотека ГФ XV : [сайт]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-3-metody-kolichestvennogo-opredeleniya/opredelenie-vody/> (дата обращения: 07.05.2026).

279. HYDRANAL Manual for Karl Fischer Titration. — Honeywell, 2020.
280. Wünsch G., Seubert A. Stöchiometrie und Kinetik der Karl-Fischer-Reaktion in Methanol als Reaktionsmedium // Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. — 1989. — Vol. 334, no. 1. — P. 16–21. — DOI: 10.1007/bf00481963.
281. Sherman F. B. Determination of water with a modified Karl Fischer reagent Stability and the mechanism of reaction with water // Talanta. — 1980. — Vol. 27, no. 12. — P. 1067–1072. — DOI: 10.1016/0039-9140(80)80249-9.
282. ISO 3516:1997. Oil of coriander fruits (*Coriandrum sativum* L.). — Geneva: International Organization for Standardization, 1997.
283. ISO 19817:2017. essential oil of thyme [*Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L.], thymol type. — Geneva: International Organization for Standardization, 2017.
284. ОФС.1.2.3.0007 «Пероксидное число». Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-3-metody-kolichestvennogo-opredeleniya/peroksidnoe-chislo/> (дата обращения: 04.07.2026).

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акты внедрения и апробации результатов исследования

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора института
биохимических технологий, экологии и
фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.
Вернадского»



И.В. Алексашкин

12 2025 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Подходы к хемотипированию и хроматографическому профилированию эфирных масел, сформулированные в процессе выполнения диссертационной работы *«Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения»*. Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Бурцева, Е. В. Тернинко, И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – №. 4. – С. 161-179.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.
- Ермаченков Р.Э., Марков А.Л., Тернинко И.И. Хроматографическое профилирование эфирных масел: практическое приложение метода на примере розмарина лекарственного. «Молодая фармация – потенциал будущего», XIV всероссийская научная конференция с международным участием Молодежного научного общества: Сборник материалов конференции – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 542-547
- Ермаченков Р.Э. Тернинко И.И., Оглоблина Н.И. Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла майорана египетского происхождения разных сезонов заготовки. «Фитофарм 2024», XXV международный съезд (25; 2024; Санкт-Петербург): сборник тезисов съезда – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 59-60
- Ермаченков Р.Э., Агаев М.М., Марков А.Л., Тернинко И.И. Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла майорана египетского происхождения разных сезонов заготовки. «Молодая фармация – потенциал будущего», XIV всероссийская научная конференция с международным

участим Молодежного научного общества – Санкт-Петербург: Изд-во СПбХФУ, 2025. – С. 375-378

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в образовательной деятельности института биохимических технологий, экологии и фармации Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского при изучении подходов к стандартизации эфирных масел, в курсе лекций и практических занятий по дисциплине «Фармацевтическая химия» (специальность 33.05.01 «Фармация») и в научной деятельности института.

Результаты внедрения: разработанные авторами аналитические подходы характеризуются высокой воспроизводимостью и точностью. Данные, полученные в результате исследования, систематизируют подходы к стандартизации эфирных масел, создавая единые методологические основания для дальнейших исследований.

Заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии



А.М. Кацев

И.И. Тернинко
КФУ им. В.И. Вернадского



А.М. Кацев

Л.М. Митрохина

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «Агрофирма «Тургеневская»



А.В. Мишин

2025 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Подходы к стандартизации эфирных масел, разработанные в процессе выполнения диссертационной работы «Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Бурцева, Е. В. Тернинко, И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – №. 4. – С. 161-179.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.
- Количественное определение воды в эфирном масле чабера горного (*Satureja Montana* L.) Материалы VI международной научно-практической конференции «Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений». 19-20 июня 2024, Симферополь.

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: внедрено в работу отдела контроля качества и использовано в научной деятельности ООО «Агрофирма «Тургеневская».

Результаты внедрения: Данные, полученные в результате исследования, систематизируют подходы к стандартизации эфирных масел, создавая единые методологические основания для дальнейших исследований. Разработанные авторами подходы к газохроматографическому анализу характеризуются высокой воспроизводимостью и точностью идентификации компонентов эфирных масел. Предложенная методика титрования эфирных масел по методу Карла Фишера позволяет

производить количественную оценку содержания воды в испытуемых образцах с достаточной точностью и воспроизводимостью.

Заместитель директора



Максимов И.Г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ДФИЦ РАН,
Академик РАН, д.ф.-м.н

А.К. Муртазаев

«19» декабря 2025 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Методика газохроматографического анализа эфирных масел розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn.), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и чабера горного (*Satureja montana* L.) с идентификацией компонентов эфирного масла с помощью линейных индексов удерживания и метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии, разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в научной деятельности лаборатории фитохимии и медицинской ботаники ОП «Горный ботанический сада» Дагестанского федерального научного центра Российской академии наук.

Результаты внедрения: разработанная авторами методика анализа позволяет значительно повысить точность и воспроизводимость идентификации различных классов химических соединений, входящих в состав эфирных масел. Разработанная методика может быть использована для исследования широкого перечня объектов: эфирных масел, гидролатов и экстрактов.

Старший научный сотрудник
лаборатории фитохимии и медицинской
ботаники ОП «Горный ботанический
сад» ДФИЦ РАН

А.М. Алиев

	«С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАҚ НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д. АСФЕНДИЯРОВА»		
Школа Фармации	Акт	Редакция: 1	
		Страница 1 из 2	

УТВЕРЖДАЮ

Декан Школы фармации,
КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова
д.фарм.н., профессор



З.Б. Сакипова

«12» февраля 2026 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Подходы к хемотипированию и хроматографическому профилированию эфирных масел, сформулированные в процессе выполнения диссертационной работы «Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Бурцева, Е. В. Тернинко, И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – №. 4. – С. 161-179.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.
- Ермаченков Р.Э., Марков А.Л., Тернинко И.И. Хроматографическое профилирование эфирных масел: практическое приложение метода на примере розмарина лекарственного. «Молодая фармация – потенциал будущего», XIV всероссийская научная конференция с международным участием Молодежного научного общества: Сборник материалов конференции – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 542-547
- Ермаченков Р.Э. Тернинко И.И., Оглоблина Н.И. Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла майорана египетского происхождения разных сезонов заготовки. «Фитофарм 2024», XXV международный съезд (25; 2024; Санкт-Петербург): сборник тезисов съезда – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 59-60

	«С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАҚ НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д.АСФЕНДИЯРОВА»		
	Школа Фармации	Акт	Редакция: 1
			Страница 2 из 2

- Ермаченков Р.Э., Агаев М.М., Марков А.Л., Тернинко И.И. Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла майорана египетского происхождения разных сезонов заготовки. «Молодая фармация – потенциал будущего», XIV всероссийская научная конференция с международным участием Молодежного научного общества – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2025. – С. 375-378

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в образовательной деятельности кафедры фармакогнозии и ботаники Школы фармации КазНМУ при изучении подходов к стандартизации эфирных масел, в курсе лекций и практических занятий дисциплин «Фармакогнозия», «Современные аспекты фитониринга» (специальность бакалавриата 6В10104 – «Фармация») «Стандартизация и сертификация ЛРС», «Природное сырье для производства парфюмерно-косметических средств» (специальности магистратуры «Фармация» и «Косметология фармацевтическая») и в научной деятельности кафедры.

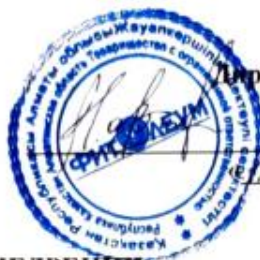
Результаты внедрения: внедрение результатов диссертационной работы позволило расширить представления обучающихся о стандартизации эфирных масел и хроматографическому профилированию. Данные по хемотипированию эфирных масел используются при формировании научных гипотез, планировании экспериментальных исследований и интерпретации результатов по исследованию эфиромасличного сырья.

Разработанные авторами аналитические подходы характеризуются воспроизводимостью и точностью. Данные, полученные в результате исследования, систематизируют подходы к хроматографическому профилированию эфирных масел, создавая единые методологические основания для их стандартизации.

Заведующий кафедры
фармакогнозии с курсом ботаники
Школы Фармации КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова,
к.фарм.н., профессор



Г.М. Саякова



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ТОО «ФитОлеум»

Сермухамедова О.В.
«12» февраля 2026 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Методика газохроматографического анализа эфирных масел розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn.), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и чабера горного (*Satureja montana* L.) с идентификацией компонентов эфирного масла с помощью линейных индексов удерживания и метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии, разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Бурцева, Е. В. Тернинко, И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – №. 4. – С. 161-179.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в производственной деятельности ОКК ТОО «ФитОлеум» (Республика Казахстан) в рамках проведения контроля качества эфирных масел (в т.ч. чабера горного, розмарина лекарственного и шалфея мускатного).

Результаты внедрения: разработанная авторами методика анализа позволяет производить однозначную идентификацию компонентов эфирных масел и определять подлинность эфирных масел с использованием метода хроматографического профилирования. Методика является воспроизводимой, экспрессной и применима в условиях ОКК предприятия.

Руководитель ОКК, начальник НПКАЛ
ТОО «ФитОлеум»

Балагазиева С.А.


БРАТСКХИМСИНТЕЗ

ИНН 3804049957 ОГРН 1133804000527
ул. Коммунальная, д. 5А/1, жилой район Центральный,
г. Братск, Иркутская область, 665717
Телефон: +7 3953 21-69-21
Телефон для звонков по России: 8 800 100-15-50
info-bhs@pharmasyntez.com
pharmasyntez.com



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «Братскхимсинтез»

И.С. Драцкий

2025 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: Методика газохроматографического анализа эфирных масел розмарина лекарственного (*Salvia rosmarinus* Spenn.), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и чабера горного (*Satureja montana* L.) с идентификацией компонентов эфирного масла с помощью линейных индексов удерживания и метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии, разработанная в процессе выполнения диссертационной работы «Хроматографическое профилирование локальных эфирных масел российского происхождения». Результаты представлены в следующих публикациях:

- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Алиев, А. М., Повыдыш, М. Н., Тернинко, И. И. Исследование сезонных вариаций компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного дагестанского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – №. 3. – С. 124-136.
- Ермаченков, Р. Э., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Бурцева, Е. В. Тернинко, И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – №. 4. – С. 161-179.
- Ермаченков, Р. Э., Сипкина, Н. Ю., Вишняков, Е. В., Марков, А. Л., Агаев, М. М., Тернинко, И. И. Хемотипирование и стандартизация эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) Российского происхождения //Химия растительного сырья. – 2025. – №. 3. – С. 199-209.

Автор разработки: *Ермаченков Роман Энверович*, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», *Тернинко Инна Ивановна*, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в научной деятельности отдела инноваций и развития ООО «Братскхимсинтез»

Результаты внедрения: разработанная авторами методика анализа позволяет значительно повысить точность и воспроизводимость идентификации различных классов химических соединений, анализируемых методом газовой хроматографии.

**БРАТСКХИМСИНТЕЗ**

ИНН 3804049957 ОГРН 1133804000527
ул. Коммунальная, д. 5А/1, ж/п район Центральный,
г. Братск, Иркутская область, 666717
Телефон: +7 3953 21-69-21
Телефон для звонков по России: 8 800 100-15-50
info-bhs@pharmasyntez.com
pharmasyntez.com

Использованный авторами подход с использованием линейных индексов удерживания и метода ГХ-МС может применяться не только для анализа объектов биологического происхождения, но и для контроля качества лекарственных средств.

Руководитель отдела инноваций и
развития

 Д.Д. Жуковский
«16» декабря 2025

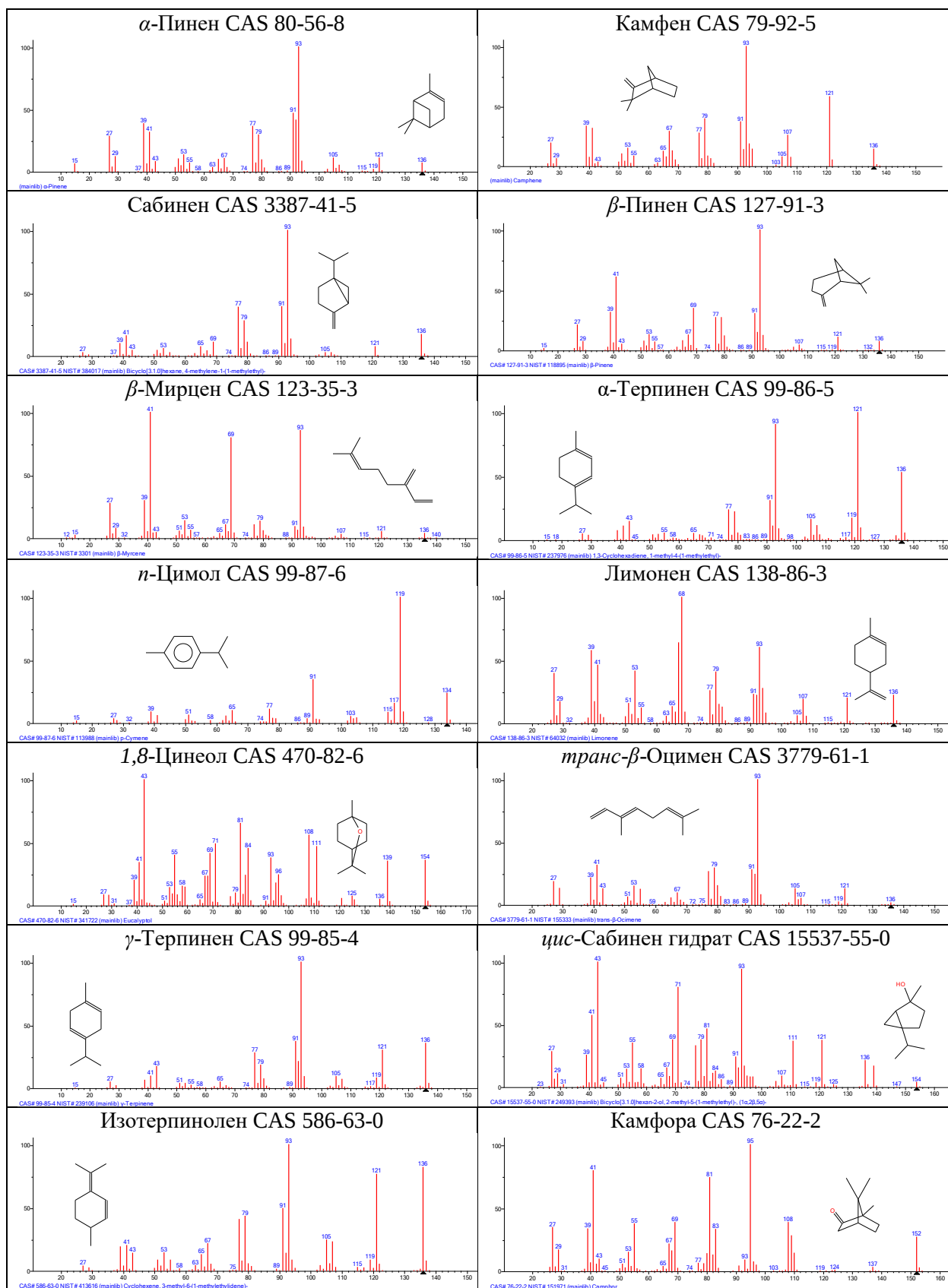
**ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Линейные индексы удерживания и стандартные масс-спектры
репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел объектов
исследования**

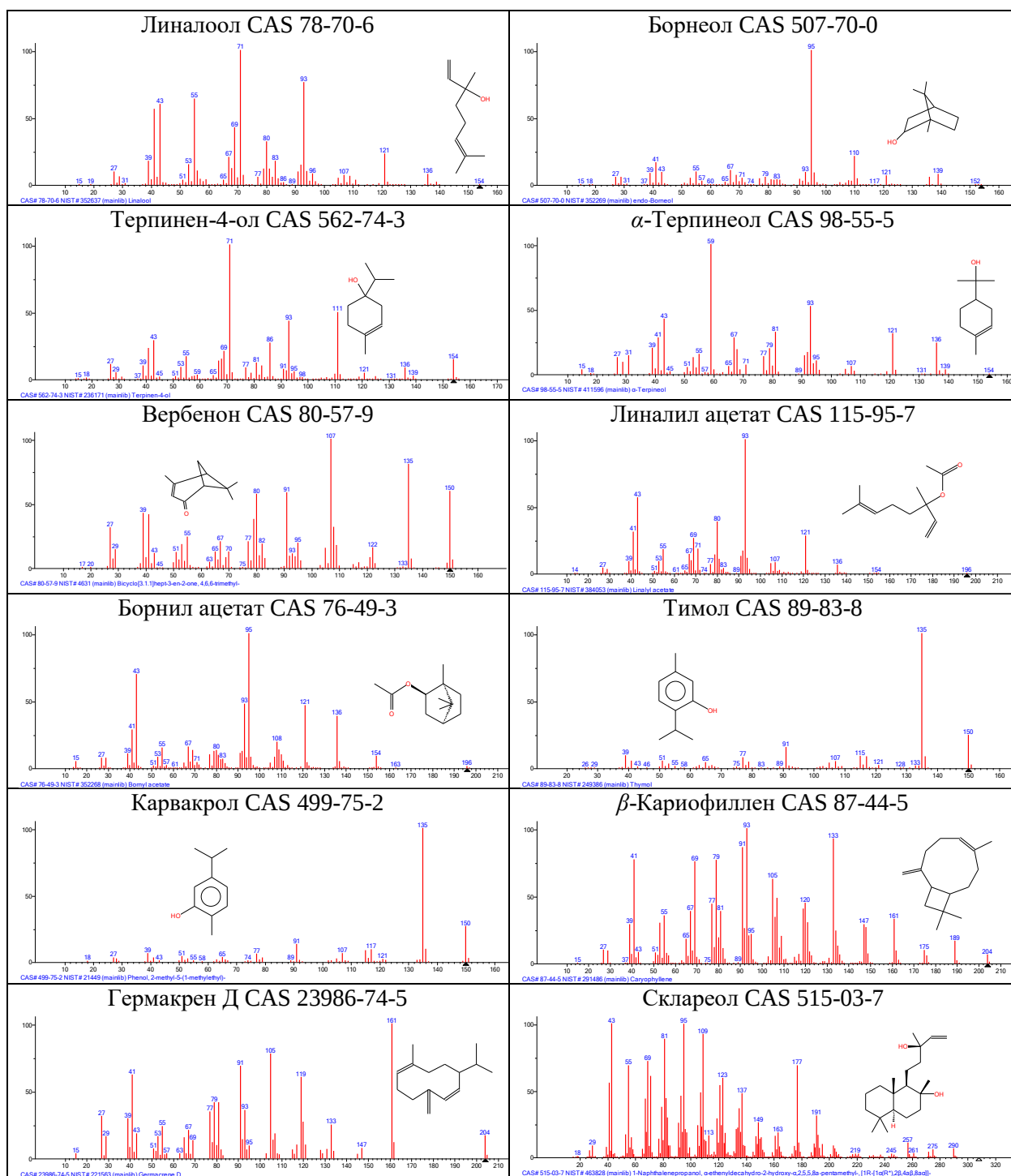
Таблица Б.1 – Линейные индексы удерживания репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана на колонках DB-5 и DB-WAX

Компоненты	CAS	DB-5	DB-WAX
α -Пинен	80-56-8	936	1035
Камфен	79-92-5	952	1087
Сабинен	3387-41-5	975	1130
β -Пинен	127-91-3	982	1130
β -Мирцен	123-35-3	990	1171
α -Терпинен	99-86-5	1017	1198
<i>n</i> -Цимол	99-87-6	1024	1289
Лимонен	138-86-3	1032	1215
1,8-Цинеол	470-82-6	1036	1232
транс- β -Оцимен	3779-61-1	1051	1250
γ -Терпинен	99-85-4	1059	1264
<i>цис</i> -Сабинен гидрат	17699-16-0	1070	1486
Изотерпинолен	586-63-0	1083	1295
Камфора	76-22-2	1150	1547
Линалоол	78-70-6	1098	1562
Борнеол	507-70-0	1169	1723
Терпинен-4-ол	562-74-3	1177	1609
α -Терпинеол	98-55-5	1189	1721
Вербенон	80-57-9	1205	1702
Линалил ацетат	115-95-7	1257	1570
Борнил ацетат	76-49-3	1286	1595
Тимол	89-83-8	1290	2202
Карвакрол	499-75-2	1300	2245
β -Кариофиллен	87-44-5	1420	1618
Гермакрен Д	23986-74-5	1482	1726
Склареол	515-03-7	2222	2384

В таблице Б.1 представлены линейные индексы удерживания репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана на колонках DB-5 и DB-WAX. Линейные индексы установлены путем анализа индивидуальных веществ и проб эфирных масел, в таблице представлены средние значения, округленные до целых.

Таблица Б.2 – Стандартные масс-спектры репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана





В таблице Б.2 представлены стандартные масс-спектры репрезентативных и характерных компонентов эфирных масел розмарина лекарственного, шалфея мускатного, чабера горного и майорана. Масс-спектры записаны в условиях электронной ионизации (EI, «электронный удар») при энергии ионизации 70 эВ.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Проекты ГОСТ на эфирные масла российского происхождения**ПРИЛОЖЕНИЕ В.1. Проект ГОСТ на эфирное масло розмарина лекарственного
российского происхождения**

ГОСТ
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**ЭФИРНОЕ МАСЛО РОЗМАРИНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*Rosmarinus
officinalis* L.) РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****Технические условия**

Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) of Russia origin. Specification

Дата введения – 202_ - __ - __

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает определенные характеристики эфирного масла розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.) российского происхождения для достоверной оценки его идентичности, качества и происхождения.

2. Область применения

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO/TR 210 Essential oils — General rules for packaging, conditioning and storage (Эфирные масла. Общие правила упаковки, кондиционирования и хранения)

ISO/TR 211 Essential oils — General rules for labelling and marking of containers (Эфирные масла. Общие правила по этикетированию и маркировке тары,)

ISO 212 Essential oils — Sampling (Масла эфирные. Отбор проб)

ISO 279 Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method (Масла эфирные. Метод определения относительной плотности при 20 °C. Контрольный метод)

ISO 280 Essential oils — Determination of refractive index (Масла эфирные. Метод определения показателя преломления)

ISO 592 Essential oils — Determination of optical rotation (Масла эфирные. Определение вращения плоскости поляризации света)

ISO 875 Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol (Масла эфирные. Оценка смешиваемости в этиловом спирте)

ISO 1242 Essential oils — Determination of acid value (Масла эфирные. Определение кислотного числа)

ISO 11024 (all parts) Essential oils — General guidance on chromatographic profiles (Масла эфирные. Общее руководство по хроматографическим профилям) (все части ISO 11024)

ISO 18321 – Essential oils – Determination of peroxide value (Эфирные масла. Определение перекисного числа)

ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания.

3. Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 эфирное масло розмарина лекарственного (essential oil of rosemary) российского происхождения: Эфирное масло, полученное методом паровой дистилляцией веток и соцветий розмарина (*Rosmarinus officinalis* L.), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) из растений, произрастающих на территории Республики Крым в регионах Южного берега Крыма и Степного Крыма.

4. Требования

4.1 Описание

Прозрачная, легкоподвижная жидкость от бесцветного до бледно-желтого или зелено-желтого цвета со специфическим запахом.

4.2 Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}

Южный берег Крыма	Степной Крым
Минимум: 0,903	Минимум: 0,895
Максимум: 0,916	Максимум: 0,907

4.3 Показатель преломления при 20 °C

Южный берег Крыма	Степной Крым
Минимум: 1,462	Минимум: 1,463
Максимум: 1,468	Максимум: 1,472

4.4 Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C

Южный берег Крыма	Степной Крым
Между -2° и +5°	Между -6° и +8°

4.5 Растворимость в этиловом спирте при 20 °C

4.5.1 Южный берег Крыма

Для получения прозрачного раствора нет необходимости использовать более трех объемных частей этилового спирта с объемной долей 90 % и одной объемной части эфирного масла.

4.5.2 Степной Крым

Для получения прозрачного раствора нет необходимости использовать более трех объемных частей этилового спирта с объемной долей 80 % и одной объемной части эфирного масла.

4.6 Кислотное число

Южный берег Крыма	Степной Крым
Максимум: 2,0	Максимум: 2,0

4.7 Перекисное число

Южный берег Крыма	Степной Крым
Максимум: 2,0	Максимум: 2,0

4.8. Вода

Южный берег Крыма	Степной Крым
Максимум: 0,8 %	Максимум: 0,8 %

4.8. Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества

Должны отсутствовать

4.8. Остаток после выпаривания эфирного масла

Не более 0,4 %

4.9. Хроматографический профиль

Испытание эфирного масла проводят при помощи метода газовой хроматографии. По полученной хроматограмме определяют репрезентативные и характерные компоненты, представленные в таблице 1. Соотношение этих компонентов, определенное интегратором, должно быть таким, как указано в таблице 1. Они представляют собой хроматографический профиль эфирного масла.

Таблица 1 – Хроматографический профиль

Компонент	Южный берег Крыма		Степной Крым	
	мин. %	макс. %	мин. %	макс. %
α -Пинен	15,0	28,0	4,0	12,5
1,8-Цинеол	13,0	31,0	38,0	50,0
Камфора	15,0	22,0	10,5	17,0
Линалоол	0,5	1,5	н.о	1,5
Лимонен	3,5	5,0	2,0	3,5
β -Пинен	4,0	7,5	н.о	1,0
Камфен	7,0	11,0	10,0	17,0
<i>n</i> -Цимол	2,5	5,5	1,5	2,5
Борнеол	1,5	3,5	6,5	10,0
β -Мирцен	н.о ^а	2,0	0,5	1,5
α -Терпинеол	н.о	3,0	3,0	5,5
Борнил ацетат	1,0	2,5	н.о	1,5
Вербенон	н.о	0,5	н.о	0,1
Примечание – Хроматографический профиль обязателен в отличие от типовых хроматограмм, которые даны для информации в приложении А				
^а Не обнаруживаемые				

5. Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ISO 212. Минимальный объем образца для испытания: 25 см³.

Примечание — Данный объем позволяет каждое испытание, изложенное в настоящем стандарте, провести, по меньшей мере, один раз.

6. Методы испытаний

6.1 Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}

Относительную плотность определяют в соответствии с ISO 279.

6.2 Показатель преломления при 20 °C

Метод определения показателя преломления приведен ISO 280.

6.3 Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C

Метод определения угла вращения плоскости поляризации света приведен в ISO 592.

6.4 Растворимость в этиловом спирте при 20 °C

Растворимость в этиловом спирте определяют в соответствии с ISO 875.

6.5 Кислотное число

Метод определения кислотного числа приведен в ISO 1242.

6.6 Перекисное число

Метод определения перекисного числа приведен в ISO 18321.

6.7 Хроматографический профиль

Требования к хроматографическим профилям приведены в ISO 11024.

4.8. Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

4.9. Остаток после выпаривания эфирного масла

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

6.7 Вода

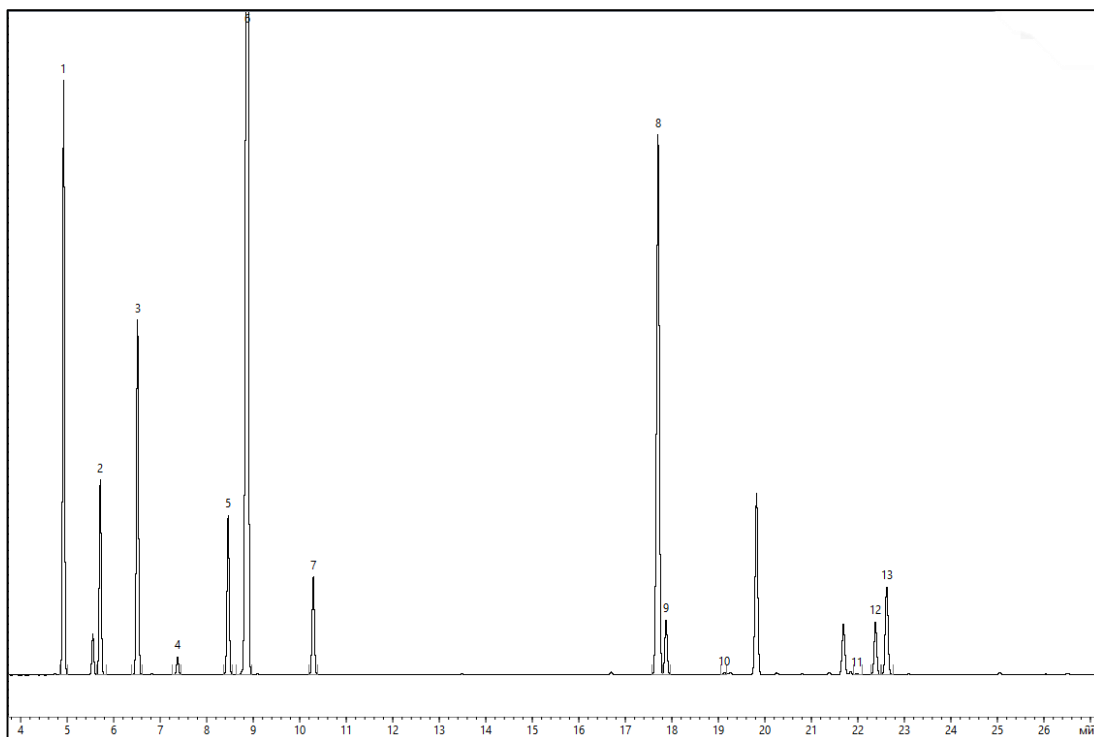
Метод определения изложен в ГОСТ (проект).

7. Упаковка, этикетирование, маркировка и хранение

Процессы проводят в соответствии с ISO/TR 210 и ISO/TR 211.

Приложение А (справочное)

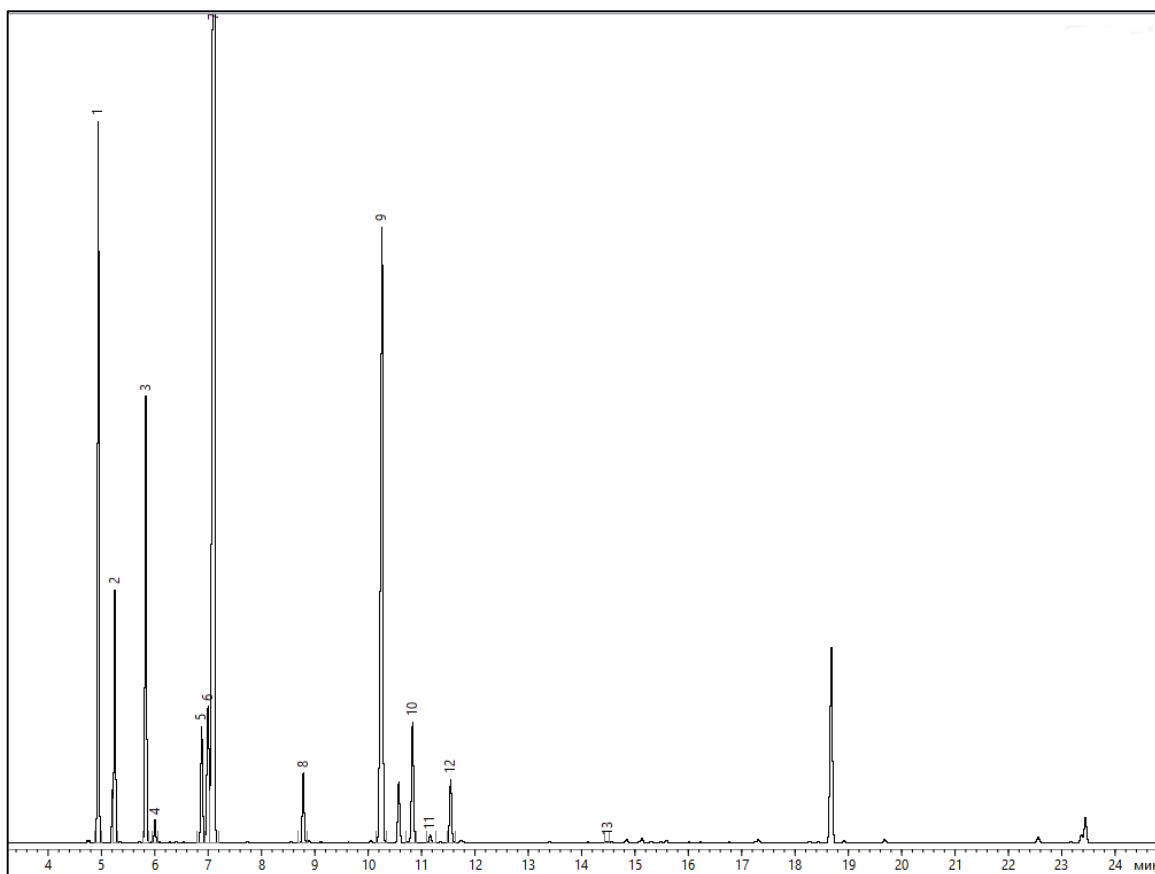
Типовые хроматограммы анализа эфирного масла розмарина лекарственного, проведенного с помощью метода газовой хроматографии



Идентификация пика		Условия анализа
1	α -Пинен	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм Неподвижная фаза: полиэтиленгликоль (DB-WAX ^a) Толщина пленки: 0,50 мкм
2	Камфен	
3	β -Пинен	
4	β -Мирцен	
5	Лимонен	Температурный режим термостата: 75 °C на 1 мин, далее от 75 °C до 225 °C при скорости 4 °C/мин, выдержка при 225 °C в течение 35 минут
6	1,8-Цинеол	
7	<i>n</i> -Цимол	Температура испарителя: 250 °C
8	Камфора	Температура детектора: 250 °C
9	Линалоол	Детектор: пламенно-ионизационный
10	Борнил ацетат	Газ-носитель: азот
11	Вербенон	Вводимый объем: 0,1 мм ³
12	α -Терпинеол	Режим газа-носителя: постоянный поток
13	Борнеол	Объемная скорость: 1 мл/мин Деление потока: 1/200

^aDB-WAX – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.1 – Типовая хроматограмма эфирного масла розмарина лекарственного, полученного из растения, локализованного на территории Степного Крыма, на колонке с полярной неподвижной фазой



Идентификация пика		Условия анализа
1	α -Пинен	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм Неподвижная фаза: 5 % дифенил-95 % диметилполисилоксан (DB-5 ^a) Толщина пленки: 0,25 мкм Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 240 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 240 °С в течение 20 минут Температура испарителя: 250 °С Температура детектора: 250 °С Детектор: пламенно-ионизационный Газ-носитель: азот Вводимый объем: 0,1 мм ³ Режим газа-носителя: постоянный поток Объемная скорость: 1 мл/мин Деление потока: 1/200
2	Камфен	
3	β -Пинен	
4	β -Мирцен	
5	<i>n</i> -Цимол	
6	Лимонен	
7	1,8-Цинеол	
8	Линалоол	
9	Камфора	
10	Борнеол	
11	Вербенон	
12	α -Терпинеол	
13	Борнил ацетат	

^aDB-5 – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.2 – Типовая хроматограмма эфирного масла розмарина лекарственного, полученного из растения, локализованного на территории Степного Крыма, на колонке с неполярной неподвижной фазой

**ПРИЛОЖЕНИЕ В.2. Проект ГОСТ на эфирное масло шалфея мускатного
российского происхождения**

ГОСТ
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ЭФИРНОЕ МАСЛО ШАЛФЕЯ МУСКАТНОГО (*Salvia sclarea* L.)
РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Технические условия

Essential oil of sage (*Salvia sclarea* L.) of Russia origin. Specification

Дата введения – 202_ - __ - __

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает определенные характеристики эфирного масла шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) российского происхождения для достоверной оценки его идентичности, качества и происхождения.

2. Область применения

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO/TR 210 Essential oils — General rules for packaging, conditioning and storage (Эфирные масла. Общие правила упаковки, кондиционирования и хранения)

ISO/TR 211 Essential oils — General rules for labelling and marking of containers (Эфирные масла. Общие правила по этикетированию и маркировке тары,)

ISO 212 Essential oils — Sampling (Масла эфирные. Отбор проб)

ISO 279 Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method (Масла эфирные. Метод определения относительной плотности при 20 °C. Контрольный метод)

ISO 280 Essential oils — Determination of refractive index (Масла эфирные. Метод определения показателя преломления)

ISO 592 Essential oils — Determination of optical rotation (Масла эфирные. Определение вращения плоскости поляризации света)

ISO 875 Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol (Масла эфирные. Оценка смешиваемости в этиловом спирте)

ISO 1242 Essential oils — Determination of acid value (Масла эфирные. Определение кислотного числа)

ISO 11024 (all parts) Essential oils — General guidance on chromatographic profiles (Масла эфирные. Общее руководство по хроматографическим профилям) (все части ISO 11024)

ISO 18321 – Essential oils – Determination of peroxide value (Эфирные масла. Определение перекисного числа)

ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания.

3. Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 эфирное масло шалфея мускатного (essential oil of sage) российского происхождения: Эфирное масло, полученное методом паровой дистилляцией свежих или высушенных цветущих стеблей шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) из растений, произрастающих на территории Республики Крым.

4. Требования

4.1 Общие требования

Эфирное масло шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) должно соответствовать требованиям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 – Требования к эфирному маслу шалфея мускатного

Характеристика	Требование
Описание	Прозрачная, легкоподвижная жидкость от бесцветного до коричнево-желтого цвета со специфическим запахом.
Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}	От 0,889 до 0,908
Показатель преломления при 20 °C	От 1,455 до 1,465
Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C	От минус 26° до минус 10°
Растворимость в этиловом спирте при 20 °C	Для получения прозрачного раствора нет необходимости использовать более трех объемных частей этилового спирта с объемной долей 80 % и одной объемной части эфирного масла
Кислотное число	Не более 1,0
Перекисное число	Не более 2,0
Вода	Не более 0,8 %
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Должны отсутствовать
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,4 %

4.2. Хроматографический профиль

Испытание эфирного масла проводят при помощи метода газовой хроматографии. По полученной хроматограмме определяют репрезентативные и характерные компоненты, представленные в таблице 2. Соотношение этих компонентов, определенное интегратором, должно быть таким, как указано в таблице 2. Они представляют собой хроматографический профиль эфирного масла.

Таблица 2 – Хроматографический профиль

Компонент	мин. %	макс. %
Линалил ацетат	28,0	67,0
Линалоол	13,5	26,0
Гермакрен Д	1,0	7,0
Склареол	н.о ^а	0,5
α -Терпинеол	0,4	4,0
β -Мирцен	0,5	16,0
транс- β -Оцимен	0,5	10,0
β -Кариофиллен	0,4	3,5
Лимонен	0,2	6,5
Примечание – Хроматографический профиль обязателен в отличие от типовых хроматограмм, которые даны для информации в приложении А		
^а Не обнаруживаемые		

5. Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ISO 212. Минимальный объем образца для испытания: 25 см³.

Примечание — Данный объем позволяет каждое испытание, изложенное в настоящем стандарте, провести, по меньшей мере, один раз.

6. Методы испытаний

6.1 Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}

Относительную плотность определяют в соответствии с ISO 279.

6.2 Показатель преломления при 20 °C

Метод определения показателя преломления приведен ISO 280.

6.3 Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C

Метод определения угла вращения плоскости поляризации света приведен в ISO 592.

6.4 Растворимость в этиловом спирте при 20 °C

Растворимость в этиловом спирте определяют в соответствии с ISO 875.

6.5 Кислотное число

Метод определения кислотного числа приведен в ISO 1242.

6.6 Перекисное число

Метод определения перекисного числа приведен в ISO 18321.

6.7 Хроматографический профиль

Требования к хроматографическим профилям приведены в ISO 11024.

4.8. Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

4.9. Остаток после выпаривания эфирного масла

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

6.7 Вода

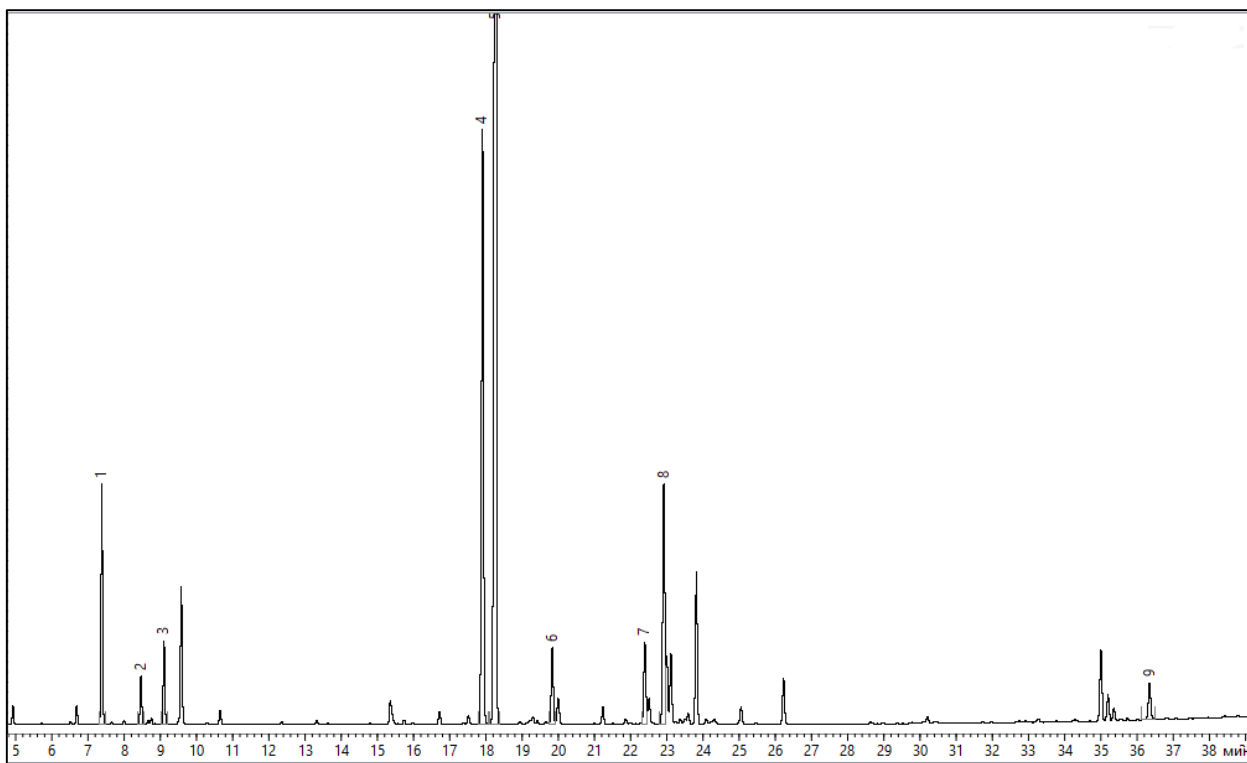
Метод определения изложен в ГОСТ (проект).

7. Упаковка, этикетирование, маркировка и хранение

Процессы проводят в соответствии с ISO/TR 210 и ISO/TR 211.

Приложение А (справочное)

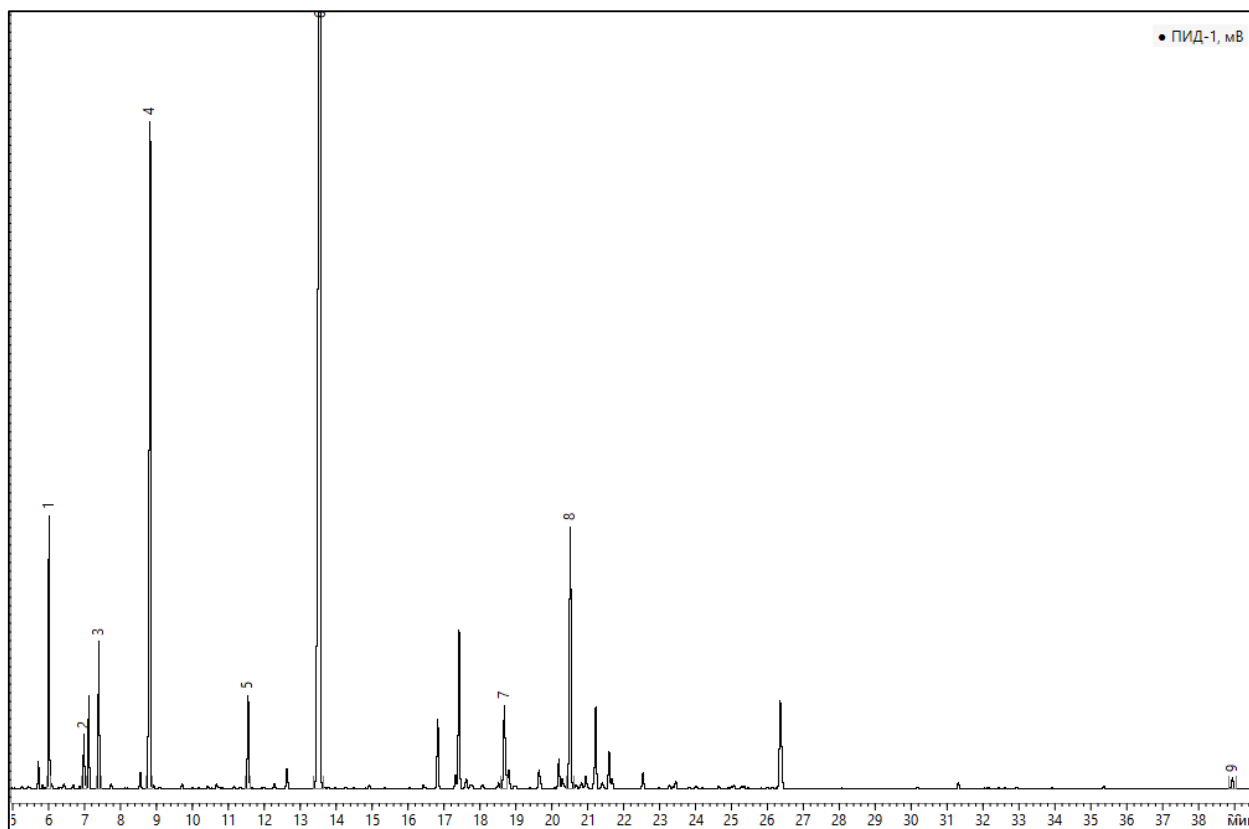
Типовые хроматограммы анализа эфирного масла шалфея мускатного, проведенного с помощью метода газовой хроматографии



Идентификация пика	Условия анализа
1 β -Мирцен	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм Непо движная фаза: полиэтиленгликоль (DB-WAX ^a) Толщина пленки: 0,50 мкм Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 225 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 225 °С в течение 35 минут Температура испарителя: 250 °С Температура детектора: 250 °С Детектор: пламенно-ионизационный Газ-носитель: азот Вводимый объем: 0,1 мм ³ Режим газа-носителя: постоянный поток Объемная скорость: 1 мл/мин Деление потока: 1/200
2 Лимонен	
3 транс- β -Оцимен	
4 Линалоол	
5 Линалил ацетат	
6 β -Кариофиллен	
7 α -Терпинеол	
8 Гермакрен Д	
9 Сclareол	

^aDB-WAX – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.1 – Типовая хроматограмма эфирного масла шалфея мускатного, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с полярной неподвижной фазой



Идентификация пика

Условия анализа

1	β -Мирцен	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм
2	Лимонен	Неподвижная фаза: 5 % дифенил-95 % диметилполисилоксан (DB-5 ^a)
3	транс- β -Оцимен	Толщина пленки: 0,25 мкм
4	Линалоол	Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 240 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 240 °С в течение 20 минут
5	α -Терпинеол	Температура испарителя: 250 °С
6	Линалил ацетат	Температура детектора: 250 °С
7	β -Кариофиллен	Детектор: пламенно-ионизационный
8	Гермакрен Д	Газ-носитель: азот
9	Склареол	Вводимый объем: 0,1 мм ³
		Режим газа-носителя: постоянный поток
		Объемная скорость: 1 мл/мин
		Деление потока: 1/200

^aDB-5 – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.2 – Типовая хроматограмма эфирного масла шалфея мускатного, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с неполярной неподвижной фазой

ПРИЛОЖЕНИЕ В.3. Проект ГОСТ на эфирное масло чабера горного российского происхождения

ГОСТ
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ЭФИРНОЕ МАСЛО ЧАБЕРА ГОРНОГО (*Saturea montana* L.)
РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Технические условия

Essential oil of winter savory (*Saturea montana* L.) of Russia origin. Specification

Дата введения – 202_ - _ - _

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает определенные характеристики эфирного масла чабера горного (*Satureja montana* L.) российского происхождения для достоверной оценки его идентичности, качества и происхождения.

2. Область применения

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO/TR 210 Essential oils — General rules for packaging, conditioning and storage (Эфирные масла. Общие правила упаковки, кондиционирования и хранения)

ISO/TR 211 Essential oils — General rules for labelling and marking of containers (Эфирные масла. Общие правила по этикетированию и маркировке тары,)

ISO 212 Essential oils — Sampling (Масла эфирные. Отбор проб)

ISO 279 Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method (Масла эфирные. Метод определения относительной плотности при 20 °C. Контрольный метод)

ISO 280 Essential oils — Determination of refractive index (Масла эфирные. Метод определения показателя преломления)

ISO 592 Essential oils — Determination of optical rotation (Масла эфирные. Определение вращения плоскости поляризации света)

ISO 875 Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol (Масла эфирные. Оценка смешиваемости в этиловом спирте)

ISO 1242 Essential oils — Determination of acid value (Масла эфирные. Определение кислотного числа)

ISO 11024 (all parts) Essential oils — General guidance on chromatographic profiles (Масла эфирные. Общее руководство по хроматографическим профилям) (все части ISO 11024)

ISO 18321 – Essential oils – Determination of peroxide value (Эфирные масла. Определение перекисного числа)

ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания.

3. Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 эфирное масло чабера горного (essential oil of winter savory) российского происхождения: Эфирное масло, полученное методом паровой дистилляцией надземной части чабера горного (*Satureja montana* L.), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) из растений, произрастающих на территории Республики Крым.

4. Требования

4.1 Общие требования

Эфирное масло чабера горного (*Satureja montana* L.) должно соответствовать требованиям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 – Требования к эфирному чабера горного

Характеристика	Требование
Описание	Прозрачная жидкость от бесцветного до ярко-желтого цвета со специфическим запахом
Относительная плотность при 20 °С, d_{20}^{20}	От 0,895 до 0,925
Показатель преломления при 20 °С	От 1,490 до 1,540
Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °С	От минус 5° до плюс 5°
Растворимость в этиловом спирте при 20 °С	Для получения прозрачного раствора нет необходимости использовать более трех объемных частей этилового спирта с объемной долей 80 % и одной объемной части эфирного масла
Кислотное число	Не более 4,0
Переокисное число	Не более 5,5
Вода	Не более 1,0 %
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Должны отсутствовать
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,4 %

4.2. Хроматографический профиль

Испытание эфирного масла проводят при помощи метода газовой хроматографии. По полученной хроматограмме определяют репрезентативные и характерные компоненты, представленные в таблице 2. Соотношение этих компонентов, определенное интегратором, должно быть таким, как указано в таблице 2. Они представляют собой хроматографический профиль эфирного масла.

Таблица 2 – Хроматографический профиль

Компонент	мин. %	макс. %
Карвакрол	40,0	71,0
γ -Терпинен	8,5	27,0
<i>n</i> -Цимол	н.о. ^a	10,5
β -Кариофиллен	н.о	5,5
Тимол	н.о	0,5
Примечание – Хроматографический профиль обязателен в отличие от типовых хроматограмм, которые даны для информации в приложении А		
^a Не обнаруживаемые		

5. Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ISO 212. Минимальный объем образца для испытания: 25 см³.

Примечание — Данный объем позволяет каждое испытание, изложенное в настоящем стандарте, провести, по меньшей мере, один раз.

6. Методы испытаний

6.1 Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}

Относительную плотность определяют в соответствии с ISO 279.

6.2 Показатель преломления при 20 °C

Метод определения показателя преломления приведен ISO 280.

6.3 Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C

Метод определения угла вращения плоскости поляризации света приведен в ISO 592.

6.4 Растворимость в этиловом спирте при 20 °C

Растворимость в этиловом спирте определяют в соответствии с ISO 875.

6.5 Кислотное число

Метод определения кислотного числа приведен в ISO 1242.

6.6 Перекисное число

Метод определения перекисного числа приведен в ISO 18321.

6.7 Хроматографический профиль

Требования к хроматографическим профилям приведены в ISO 11024.

4.8. Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

4.9. Остаток после выпаривания эфирного масла

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

6.7 Вода

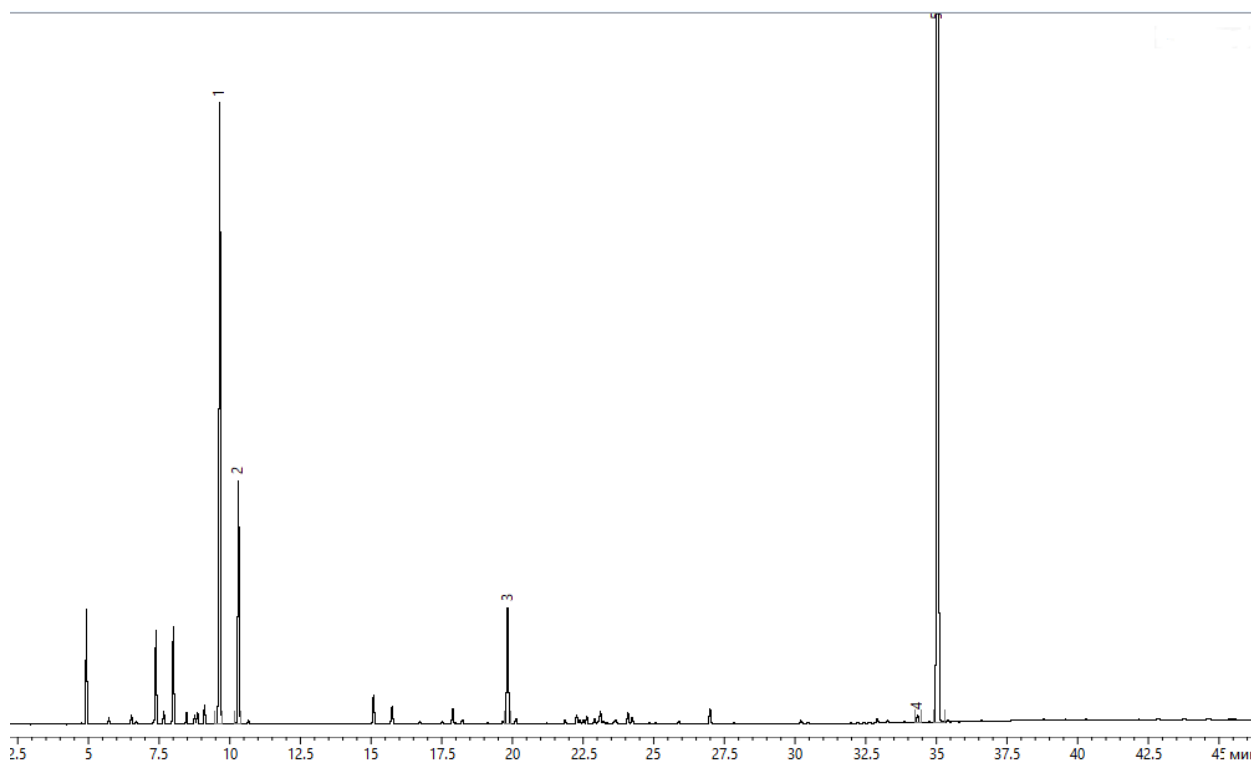
Метод определения изложен в ГОСТ (проект).

7. Упаковка, этикетирование, маркировка и хранение

Процессы проводят в соответствии с ISO/TR 210 и ISO/TR 211.

Приложение А (справочное)

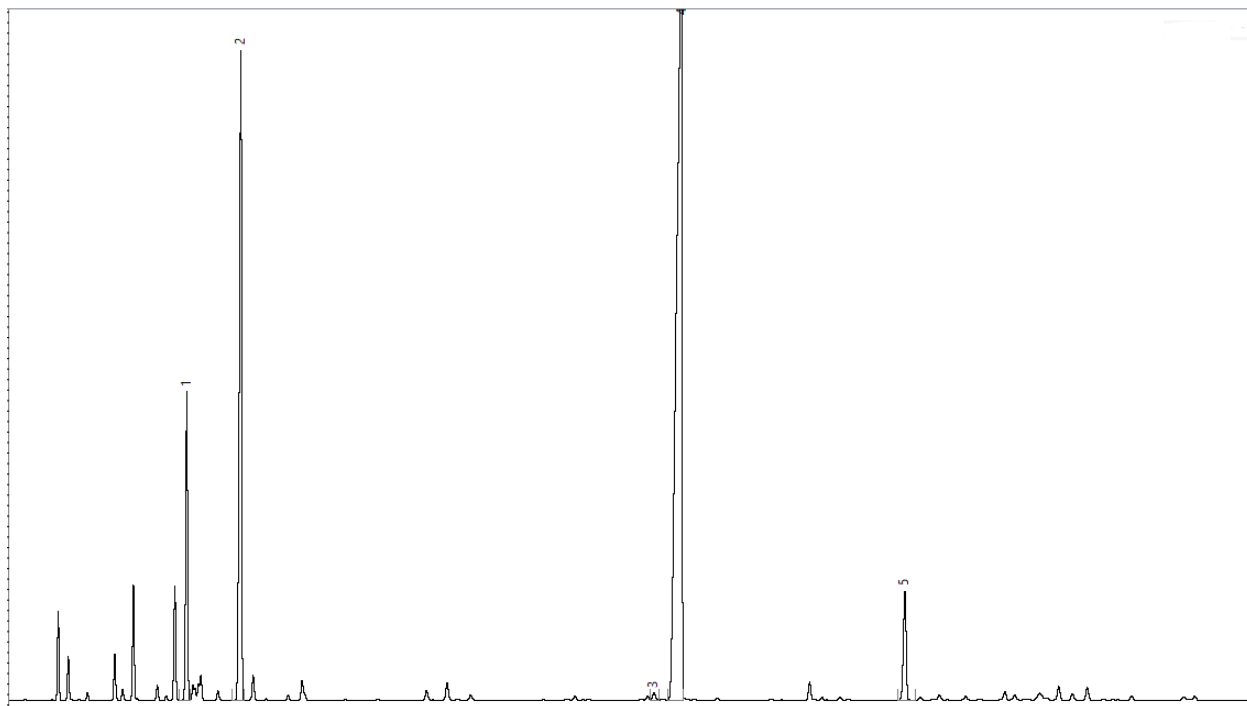
Типовые хроматограммы анализа эфирного масла чабера горного, проведенного с помощью метода газовой хроматографии



Идентификация пика	Условия анализа
1 γ -Терпинен	Колонка: капиллярная, плавленый кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм
2 <i>n</i> -Цимол	Неподвижная фаза: полиэтиленгликоль (DB-WAX ^a)
3 β -Кариофиллен	Толщина пленки: 0,50 мкм
4 Тимол	Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 225 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 225 °С в течение 35 минут
5 Карвакрол	Температура испарителя: 250 °С
	Температура детектора: 250 °С
	Детектор: пламенно-ионизационный
	Газ-носитель: азот
	Вводимый объем: 0,1 мм ³
	Режим газа-носителя: постоянный поток
	Объемная скорость: 1 мл/мин
	Деление потока: 1/200

^aDB-WAX – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.1 – Типовая хроматограмма эфирного масла чабера горного, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с полярной неподвижной фазой



Идентификация пика		Условия анализа
1	<i>n</i> -Цимол	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм Непо движная фаза: 5 % дифенил-95 % диметилполисилоксан (DB-5 ^a) Толщина пленки: 0,25 мкм Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 240 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 240 °С в течение 20 минут Температура испарителя: 250 °С Температура детектора: 250 °С Детектор: пламенно-ионизационный Газ-носитель: азот Вводимый объем: 0,1 мм ³ Режим газа-носителя: постоянный поток Объемная скорость: 1 мл/мин Деление потока: 1/200
2	γ -Терпинен	
3	Тимол	
4	Карвакрол	
5	β -Кариофиллен	

^aDB-5 – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.2 – Типовая хроматограмма эфирного масла чабера горного, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с неполярной неподвижной фазой

ПРИЛОЖЕНИЕ В.4. Проект ГОСТ на эфирное масло майорана российского происхождения

ГОСТ
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ЭФИРНОЕ МАСЛО МАЙОРАНА (*Origanum majorana* L.)
РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Технические условия

Essential oil of marjoram (*Origanum marjorana* L.) of Russia origin. Specification

Дата введения – 202_ - __ - __

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает определенные характеристики эфирного масла майорана (*Origanum marjorana* L.) российского происхождения для достоверной оценки его идентичности, качества и происхождения.

2. Область применения

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO/TR 210 Essential oils — General rules for packaging, conditioning and storage (Эфирные масла. Общие правила упаковки, кондиционирования и хранения)

ISO/TR 211 Essential oils — General rules for labelling and marking of containers (Эфирные масла. Общие правила по этикетированию и маркировке тары,)

ISO 212 Essential oils — Sampling (Масла эфирные. Отбор проб)

ISO 279 Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method (Масла эфирные. Метод определения относительной плотности при 20 °C. Контрольный метод)

ISO 280 Essential oils — Determination of refractive index (Масла эфирные. Метод определения показателя преломления)

ISO 592 Essential oils — Determination of optical rotation (Масла эфирные. Определение вращения плоскости поляризации света)

ISO 875 Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol (Масла эфирные. Оценка смешиваемости в этиловом спирте)

ISO 1242 Essential oils — Determination of acid value (Масла эфирные. Определение кислотного числа)

ISO 11024 (all parts) Essential oils — General guidance on chromatographic profiles (Масла эфирные. Общее руководство по хроматографическим профилям) (все части ISO 11024)

ISO 18321 – Essential oils – Determination of peroxide value (Эфирные масла. Определение перекисного числа)

ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла». Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания.

3. Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 эфирное масло майорана (essential oil of marjoram) российского происхождения:

Эфирное масло, полученное методом паровой дистилляцией надземной части майорана (*Origanum marjorana* L.), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) из растений, произрастающих на территории Республики Крым.

4. Требования

4.1 Общие требования

Эфирное масло майорана (*Origanum marjorana* L.) должно соответствовать требованиям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 – Требования к эфирному маслу майорана

Характеристика	Требование
Описание	Прозрачная легкоподвижная жидкость от бесцветного до зелено-желтого цвета со специфическим запахом
Относительная плотность при 20 °С, d_{20}^{20}	От 0,875 до 0,901
Показатель преломления при 20 °С	От 1,459 до 1,484
Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °С	От плюс 7° до плюс 27°
Растворимость в этиловом спирте при 20 °С	Для получения прозрачного раствора нет необходимости использовать более двух объемных частей этилового спирта с объемной долей 80 % и одной объемной части эфирного масла
Кислотное число	Не более 2,0
Перекисное число	Не более 2,0
Вода	Не более 0,8 %
Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества	Должны отсутствовать
Остаток после выпаривания эфирного масла	Не более 0,5 %

4.2. Хроматографический профиль

Испытание эфирного масла проводят при помощи метода газовой хроматографии. По полученной хроматограмме определяют репрезентативные и характерные компоненты, представленные в таблице 2. Соотношение этих компонентов, определенное интегратором, должно быть таким, как указано в таблице 2. Они представляют собой хроматографический профиль эфирного масла.

Таблица 2 – Хроматографический профиль

Компонент	мин. %	макс. %
Терпинен-4-ол	22,0	37,0
γ-Терпинен	11,0	21,5
α-Терпинен	5,0	14,5
β-Кариофиллен	н.о ^а	8,5
Изотерпинолен	2,5	5,0
n-Цимол	1,0	4,0
цис-Сабинен гидрат	н.о	3,0
Сабинен	н.о	6,0
1,8-Цинеол	н.о	4,5
Карвакрол и Тимол	н.о	1,5
Примечание – Хроматографический профиль обязателен в отличие от типовых хроматограмм, которые даны для информации в приложении А		
^а Не обнаруживаемые		

5. Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ISO 212. Минимальный объем образца для испытания: 25 см³.

Примечание — Данный объем позволяет каждое испытание, изложенное в настоящем стандарте, провести, по меньшей мере, один раз.

6. Методы испытаний

6.1 Относительная плотность при 20 °C, d_{20}^{20}

Относительную плотность определяют в соответствии с ISO 279.

6.2 Показатель преломления при 20 °C

Метод определения показателя преломления приведен ISO 280.

6.3 Угол вращения плоскости поляризации света при 20 °C

Метод определения угла вращения плоскости поляризации света приведен в ISO 592.

6.4 Растворимость в этиловом спирте при 20 °C

Растворимость в этиловом спирте определяют в соответствии с ISO 875.

6.5 Кислотное число

Метод определения кислотного числа приведен в ISO 1242.

6.6 Перекисное число

Метод определения перекисного числа приведен в ISO 18321.

6.7 Хроматографический профиль

Требования к хроматографическим профилям приведены в ISO 11024.

4.8. Жирные и минеральные масла, в том числе осмолившиеся вещества

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

4.9. Остаток после выпаривания эфирного масла

Метод определения приведен в ОФС.1.5.2.0001.

6.7 Вода

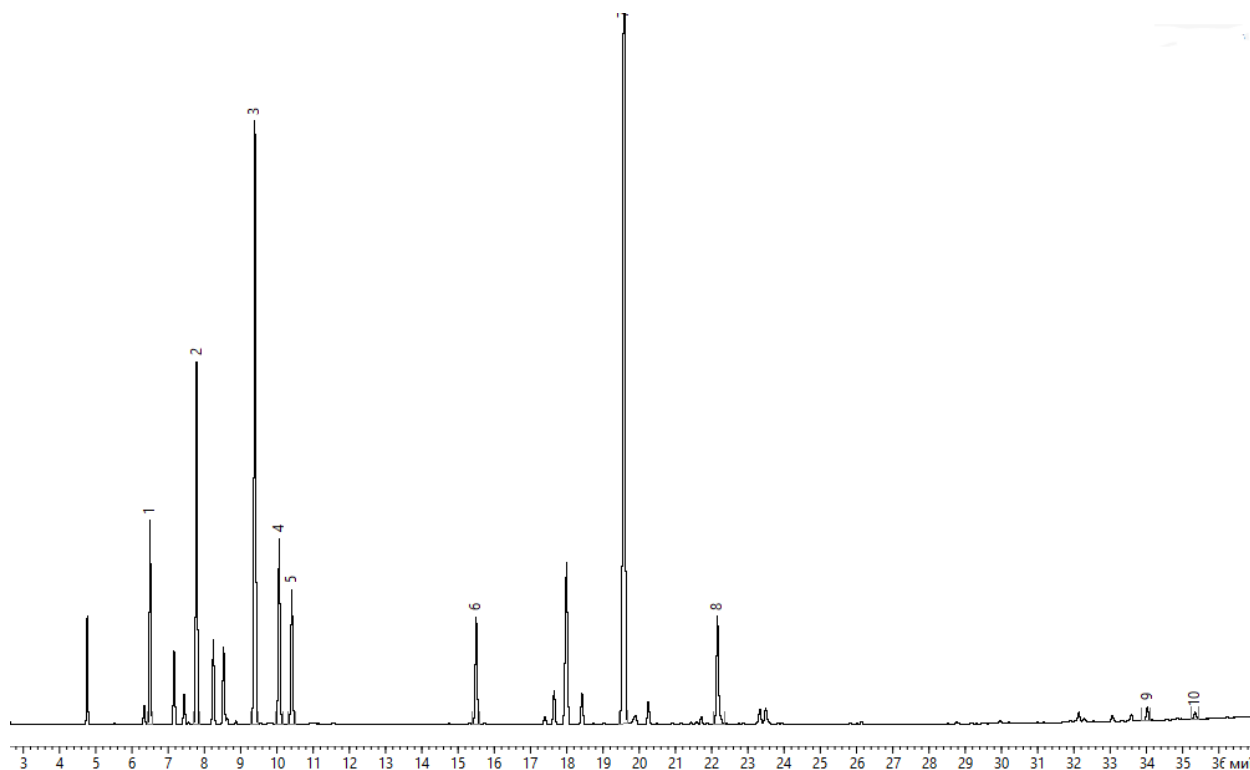
Метод определения изложен в ГОСТ (проект).

7. Упаковка, этикетирование, маркировка и хранение

Процессы проводят в соответствии с ISO/TR 210 и ISO/TR 211.

Приложение А (справочное)

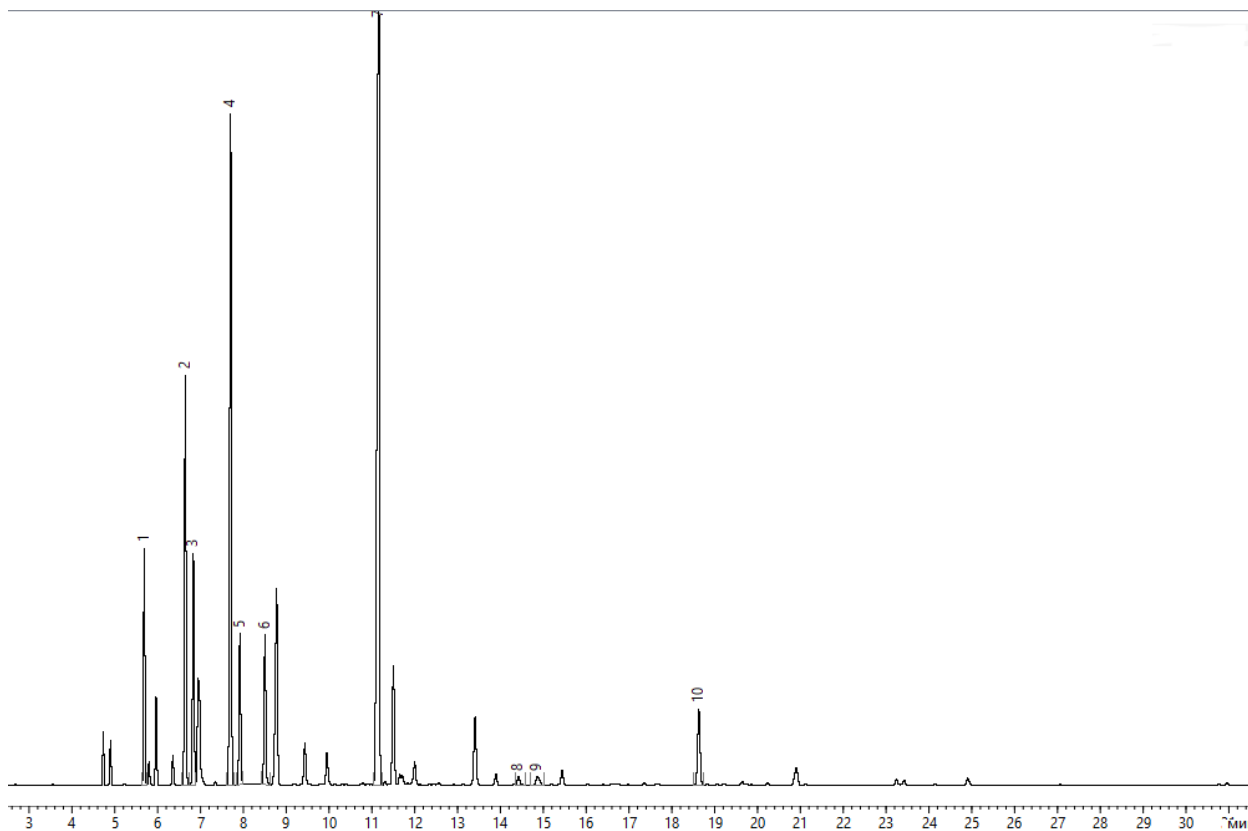
Типовые хроматограммы анализа эфирного масла майорана, проведенного с помощью метода газовой хроматографии



Идентификация пика	Условия анализа
1 Сабинен	Колонка: капиллярная, плавленный кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм
2 α -Терпинен	Неподвижная фаза: полиэтиленгликоль (DB-WAX ^a)
3 γ -Терпинен	Толщина пленки: 0,50 мкм
4 <i>n</i> -Цимол	Температурный режим термостата: 75 °C на 1 мин, далее от 75 °C до 225 °C при скорости 4 °C/мин, выдержка при 225 °C в течение 35 минут
5 Изотерпинолен	Температура испарителя: 250 °C
6 <i>цис</i> -Сабинен гидрат	Температура детектора: 250 °C
7 Терпинен-4-ол	Детектор: пламенно-ионизационный
8 β -Кариофиллен	Газ-носитель: азот
9 Тимол	Вводимый объем: 0,1 мм ³
10 Карвакрол	Режим газа-носителя: постоянный поток
	Объемная скорость: 1 мл/мин
	Деление потока: 1/200

^aDB-WAX – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.1 – Типовая хроматограмма эфирного масла майорана, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с полярной неподвижной фазой



Идентификация пика		Условия анализа
1	Сабинен	Колонка: капиллярная, плавленый кварц; длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм Непо движная фаза: 5 % дифенил-95 % диметилполисилоксан (DB-5 ^a) Толщина пленки: 0,25 мкм Температурный режим термостата: 75 °С на 1 мин, далее от 75 °С до 240 °С при скорости 4 °С/мин, выдержка при 240 °С в течение 20 минут Температура испарителя: 250 °С Температура детектора: 250 °С Детектор: пламенно-ионизационный Газ-носитель: азот Вводимый объем: 0,1 мм ³ Режим газа-носителя: постоянный поток Объемная скорость: 1 мл/мин Деление потока: 1/200
2	α -Терпинен	
3	<i>n</i> -Цимол	
4	γ -Терпинен	
5	<i>цис</i> -Сабинен гидрат	
6	Изотерпинолен	
7	Терпинен-4-ол	
8	Тимол	
9	Карвакрол	
10	β -Кариофиллен	

^aDB-5 – пример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

Рисунок А.2 – Типовая хроматограмма эфирного масла майорана, полученного из растения, локализованного на территории Республики Крым, на колонке с неполярной неподвижной фазой

**ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Проект ГОСТ на методику кулонометрического определения
содержания воды в эфирных маслах**

ГОСТ
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Масла эфирные

КУЛОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ

МЕТОД КАРЛА ФИШЕРА

Essential oils. Coulometric Determination of water content. Karl Fischer method

Дата введения – 202_ - __ - __

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методику кулонометрического определения воды в эфирных маслах путем титрования по методу Карла Фишера

2. Область применения

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO 760, Determination of water content — Karl Fischer method (General method) [Определение содержания воды. Метод Карла Фишера (Общий метод)] ISO 18321 – Essential oils – Determination of peroxide value (Эфирные масла. Определение перекисного числа)

3. Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 содержание воды (water content): Количество воды, содержащееся в исследуемом эфирном масле, определенное в соответствии с методикой, установленной в настоящем стандарте.

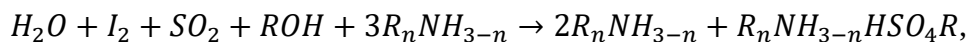
Примечание – Содержание воды выражают с помощью массовой доли в процентах.

4. Сущность метода

Сущность метода, приведенного в настоящем стандарте, заключается в проведении анодной реакции выделения йода при титровании испытуемого образца, избыток выделяемого йода, определяемый электрометрическим детектором, указывает на завершение титрования. Согласно стехиометрическому уравнению реакции один моль йода взаимодействует с одним молем воды. В соответствии с законом Фарадея количество воды в образце пропорционально суммарному количеству тока, затраченному на титрование.

5. Реакции

Во время определения содержания воды методом Карла Фишера, вода, присутствующая в пробе, реагирует в присутствии амина и спирта с йодом и диоксидом серы:



где R – алкильная или алкоксильная группа.

Конечную точку реакции определяют электрометрически избытком йода.

6. Реактивы и материалы

Применяют только реактивы подтвержденной аналитической степени чистоты.

6.1 Анолит метанольный. Реактив Карла Фишера, содержащий метанол (Hydranal Coulomat AG^a).

6.2 Анолит безметанольный. Реактив Карла Фишера, свободный от метанола. Предпочтительным являются реактивы на основе 2-метоксиэтанола (Hydranal Coulomat AK^a).

6.3 Католит метанольный. Реактив Карла Фишера, содержащий метанол, для заполнения катодного пространства (Hydranal Coulomat CG^a). Используется только при наличии мембранного генераторного электрода.

6.4 Католит безметанольный. Реактив Карла Фишера, свободный от метанола, для заполнения катодного пространства (Hydranal Coulomat CG-K^a). Используется только при наличии мембранного генераторного электрода.

6.5 Метанол с массовой долей воды не более 500 ppm. Если реактив содержит большее количество воды допустимо его обезвоживание путем дистилляции или выдерживанием над молекулярными ситами 3 Å до допустимого уровня содержания воды.

6.6 Октан-1-ол с массовой долей воды не более 1000 ppm. Если реактив содержит большее количество воды допустимо его обезвоживание путем дистилляции или выдерживанием над молекулярными ситами 3 Å до допустимого уровня содержания воды.

^aПример подходящего коммерчески доступного продукта. Информация дана для удобства пользователей документов и не является подтверждением того, что данный продукт одобрен ISO.

7. Оборудование, посуда и вспомогательные материалы

Требования к оборудованию приведены в ISO 760.

Всю стеклянную посуду предварительно высушивают в течение 30 мин в сушильном шкафу, обеспечивающим поддержание температуры около 130 °С, затем выдерживают в эксикаторе, содержащем осушитель, затем охлаждают до комнатной температуры.

7.1 Оборудование для титрования

Доступное для приобретения оборудование для автоматического определения содержания воды методом Карла Фишера, которое состоит из элементов, описанных в 7.1.1—7.1.4.

7.1.1 Генераторный электрод с диафрагмой или без неё.

7.1.2 Двойной платиновый электрод.

7.1.3 Магнитная мешалка, покрытой политетрафторэтиленом, работающая с частотой вращения от 150 до 600 об/мин.

7.1.4 Электрохимическая ячейка объемом не менее 150 см³ с тремя и более входами со шлифами из матового стекла.

К электрохимической ячейке присоединяют генераторный электрод и двойной платиновый электрод. Третий шлиф электрохимической ячейки плотно укупоривают полимерной мембраной и винтовой крышкой. Добавление пробы осуществляется только через это соединение. При наличии дополнительного шлифа в электрохимической ячейке присоединяют трубку, заполненную осушителем (молекулярные сита 3 Å). Допускается иное присоединение трубки с осушителем, например, через генераторный электрод. Все открытые шлифы электрохимической ячейке плотно укупоривают либо полимерной мембраной и винтовой крышкой, либо пробками.

7.1.5 Сушильный шкаф, обеспечивающий поддержание температуры $(130 \pm 5) ^\circ\text{C}$, для хранения стеклянной посуды.

7.1.6 Аналитические весы с точностью до 0,001 г.

8. Отбор проб

Рекомендуемый метод отбора проб установлен в ISO 212

9. Проведение испытания

9.1 Подготовка оборудования для титрования

Готовят оборудование для титрования в соответствии с инструкциями изготовителя и смазывают каждое соединение смазкой (при наличии винтовых соединений их уплотняют полимерной мембраной). Особое значение имеет герметичность электрохимической ячейки.

9.2 Подготовка пробы

Проводят подготовку пробы в соответствии с описанной процедурой в стандарте. В случае её отсутствия устанавливают оптимальные условия подготовки пробы и титрования.

9.3 Титрование пробы с известными оптимальными условиями титрования

При наличии в соответствующем стандарте описанных оптимальных условий титрования, в соответствии с указаниями, помещают 50 см³ анолита (см. 6.1-6.2) в электрохимическую ячейку. Необходимо удостовериться, что металлические части двойного платинового электрода (см. 7.1.2) полностью погружены. При использовании генераторного электрода с диафрагмой заполняют катодное пространство католитом (см. 6.3-6.4). Запускают автоматическое титрование и проводят кондиционирование ячейки.

Готовят пробу в соответствии с указанием стандарта, вводят указанное в стандарте количество пробы в электрохимическую ячейку. Титрование и обнаружение конечной точки контролируют автоматически соответствующим оборудованием.

Выполняют три титрования на каждую пробу и используют среднеарифметическое значение результатов расчета.

9.2 Титрование пробы с неизвестными оптимальными условиями титрования

При отсутствии в соответствующем стандарте описанных оптимальных условий титрования проводят предварительную процедуру их определения. Процедура определения оптимальных условий титрования основана на последовательных титрованиях испытуемого раствора в трех условиях. В приложении А представлено дерево принятия решений для выбора оптимальных условий кулонометрического титрования эфирных масел.

9.2.1. Титрование в среде метанола

9.2.1.1. Подготовка пробы

Помещают около 0,5 г испытуемого образца в герметичный флакон с полимерной мембранной и около 5 см³ метанола (см. 6.5). Фиксируют массы добавленных испытуемого образца и метанола. Перемешивают содержимое флакона до получения гомогенного раствора. В случае появления опалесценции переходят к пункту 9.2.2.

9.2.1.2. Проведение испытания

Помещают 50 см³ анолита (см. 6.1) в электрохимическую ячейку. Необходимо удостовериться, что металлические части двойного платинового электрода (см. 7.1.2) полностью погружены. При использовании генераторного электрода с диафрагмой заполняют катодное пространство католитом (см. 6.3). Запускают автоматическое титрование и проводят кондиционирование ячейки. С помощью шприца помещают в электрохимическую ячейку около 4 см³ растворителя, фиксируют массу добавленной пробы и рассчитывают содержание воды. Выполняют три титрования растворителя и используют среднеарифметическое значение результатов расчета (см. 10.1).

С помощью шприца помещают в электрохимическую ячейку около 0,6 см³ испытуемой пробы, фиксируют массу добавленной пробы и рассчитывают содержание воды. Выполняют три титрования испытуемого раствора и используют среднеарифметическое значение результатов расчета (см. 10.2). После каждого титрования (растворителя и испытуемой пробы) ожидают завершения кондиционирования электрохимической ячейки. В случае появления повышенного значения дрейфа (более 30 мкг/с) до и после титрования испытуемого раствора переходят к пункту 9.2.2. В случае отсутствия опалесценции при проведении подготовки пробы и при отсутствии повышения дрейфа указанные условия признаются оптимальными.

9.2.2. Титрование в среде метанола с альтернативным растворителем

9.2.2.1. Подготовка пробы

Помещают около 5 см³ метанола (см. 6.5) и около 5 см³ октан-1-ола (см. 6.6) в герметичный флакон с полимерной мембранной, перемешивают содержимое флакона до получения гомогенного раствора. Полученный раствор используют как растворитель.

0,5 г испытуемого образца в герметичный флакон с полимерной мембранной и около 5 см³ метанола (см. 6.5). Фиксируют массы добавленных испытуемого образца и метанола. Перемешивают содержимое флакона. В случае появления опалесценции переходят к пункту 9.2.3.

9.2.2.2. Проведение испытания

Помещают 50 см³ анолита (см. 6.1) в электрохимическую ячейку. Необходимо удостовериться, что металлические части двойного платинового электрода (см. 7.1.2) полностью погружены. При использовании генераторного электрода с диафрагмой заполняют катодное пространство католитом (см. 6.3). Запускают автоматическое титрование и проводят кондиционирование ячейки. С помощью шприца помещают в электрохимическую ячейку около 1 см³ растворителя, фиксируют массу добавленной пробы и рассчитывают содержание воды. Выполняют три титрования растворителя и используют среднеарифметическое значение результатов расчета (см. 10.1).

С помощью шприца помещают в электрохимическую ячейку около 0,6 см³ испытуемой пробы, фиксируют массу добавленной пробы и рассчитывают содержание воды. Выполняют три титрования испытуемого раствора и используют среднеарифметическое значение результатов расчета (см. 10.2). После каждого титрования

(растворителя и испытуемой пробы) ожидают завершения кондиционирования электрохимической ячейки. В случае появления повышенного значения дрейфа (более 30 мкг/с) до и после титрования испытуемого раствора переходят к пункту 9.2.3. В случае отсутствия опалесценции при проведении подготовки пробы и при отсутствии повышения дрейфа указанные условия признаются оптимальными.

9.2.3. Титрование в безметанольной среде

В случае невозможности проведения титрований в описанных выше условиях (см. 9.2.1-9.2.2) условия 9.2.3. признаются оптимальными.

9.2.3.1. Подготовка пробы

Отбирают около 2,5 см³ испытуемого образца в шприц.

9.2.3.2. Проведение испытания

Помещают 50 см³ анолита (см. 6.2) в электрохимическую ячейку. Необходимо удостовериться, что металлические части двойного платинового электрода (см. 7.1.2) полностью погружены. При использовании генераторного электрода с диафрагмой заполняют катодное пространство католитом (см. 6.4). Запускают автоматическое титрование и проводят кондиционирование ячейки.

С помощью шприца помещают в электрохимическую ячейку около 0,6 см³ испытуемой пробы, фиксируют массу добавленной пробы и рассчитывают содержание воды. Выполняют три титрования испытуемой пробы и используют среднеарифметическое значение результатов расчета (см. 10.3). После каждого титрования ожидают завершения кондиционирования электрохимической ячейки.

10. Обработка результатов испытания

10.1 Титрование растворителя

Расчет содержания воды в растворителе $X_{p-ль}$, выраженный в процентах, осуществляется автоматически или по следующей формуле

$$X_{p-ль} = \frac{m_i^B}{m_i} * 100,$$

где m_i – масса растворителя, введенная в электрохимическую ячейку, г;

m_i^B – масса воды, определенная в результате титрования, г;

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) для которых не превышает 10 %.

10.2 Титрование испытуемого раствора

Расчет содержания воды в эфирном масле w_i , выраженный в процентах, осуществляется по следующей формуле:

$$w_i = \frac{((m_{p-ль} + m_{эм}) * x_i - (m_{p-ль} * x_{p-ль}))}{m_{эм}},$$

где $m_{p-ль}$ – масса растворителя, использованная для приготовления испытуемого раствора, г;

$m_{эм}$ – масса эфирного масла, использованная для приготовления испытуемого раствора, г;

x_i – содержание воды в испытуемом растворе, %;

$x_{p-ль}$ – содержание воды в растворителе, %.

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) для которых не превышает 10 %.

10.3 Титрование эфирного масла

Расчет содержания воды в эфирном масле w_i , выраженный в процентах, осуществляется автоматически или по следующей формуле:

$$w_i = \frac{m_i^B}{m_{эм}} * 100,$$

где $m_{эм}$ – масса эфирного масла, введенная в электрохимическую ячейку, г;

m_i^B – масса воды, определенная в результате титрования, г;

Примечание – пункт 10.3 используется только в случае титрования по условиям 9.2.3.

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) для которых не превышает 10 %.

11. Протокол испытаний

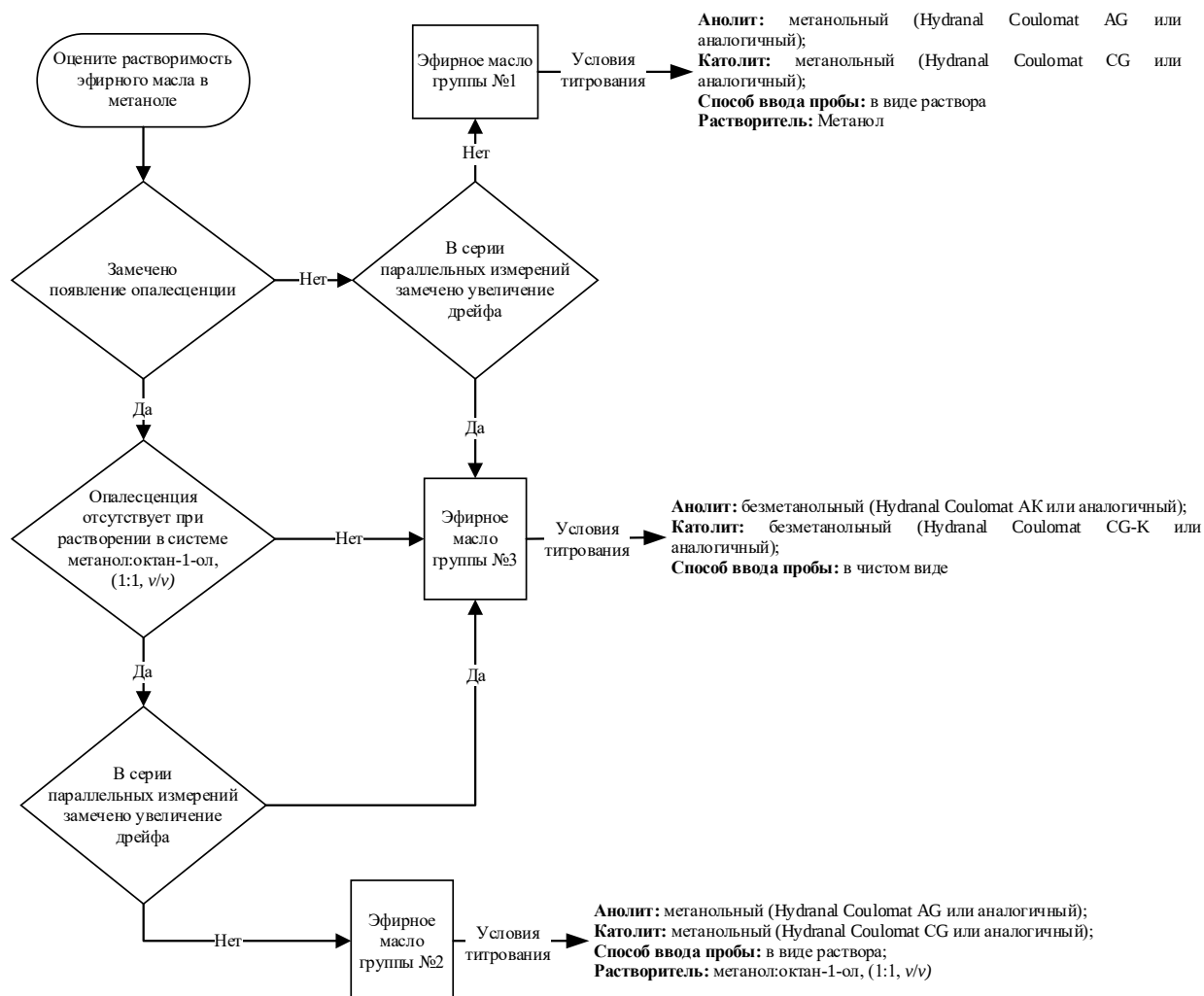
Протокол испытаний должен включать следующую информацию:

- использованный метод;
- полученный результат;
- любые детали, не установленные в настоящем стандарте, или рассмотренные как необязательные, а также любые обстоятельства, которые могут повлиять на результат испытания.

Протокол испытаний должен содержать всю информацию, требуемую для полной идентификации пробы.

Приложение А (справочное)

Дерево принятия решений для выбора оптимальных условий кулонометрического титрования эфирных масел



Примечание: Использование католита необходимо только в случае генераторного электрода с диафрагмой

ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Проект ОФС «Стабильность эфирных масел»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Стабильность и сроки годности эфирных
масел

ОФС Х.Х.ХХХХ.Х

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к исследованию стабильности и установлению сроков годности эфирных масел.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Дата производства - начальная дата производственной операции по фасовке и упаковке.

Опытно-промышленная серия - серия, произведённая на промышленном оборудовании в соответствии с технологией (или посредством её моделирования), используемой при полномасштабном серийном производстве. Объем опытно-промышленной серии должен составлять не менее 1/10 объема промышленной серии.

Промышленная серия - серия промышленного масштаба, произведённая в производственном помещении с использованием производственного оборудования таким образом, как в промышленном регламенте.

Спецификация на выпуск (спецификация при выпуске) - перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, с помощью которых определяют качество эфирного масла на момент выпуска.

Спецификация на срок годности - перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, которым должно соответствовать эфирное масло в течение срока годности.

Срок годности – период времени, в течение которого эфирное масло должно полностью соответствовать спецификации на срок годности при надлежащем хранении в условиях, указанных в фармакопейной статье и на упаковке.

Стабильность - способность эфирного масла сохранять химические и физические свойства в определённых границах в течение установленного срока годности.

Общие положения

Целью изучения эфирного масла является:

- получение данных об изменении качества эфирного масла с течением времени под влиянием различных факторов окружающей среды, таких как, температура, свет и др.;
- получение данных о влиянии на качество эфирного масла системы упаковки и её элементов, включая укупорочные средства и упаковочные материалы;
- получение данных о сохранении качества во время применения эфирного масла после вскрытия первичной упаковки;

Данные, полученные в ходе изучения стабильности, необходимы:

- для установления срока годности эфирных масел;
- для установления рекомендуемых требований к надлежащим условиям хранения и перевозки эфирного масла и последующего выбора необходимых указаний по его маркировке;
- для выбора надлежащих упаковочных материалов, системы упаковки/укупорки, включающей укупорочные средства и другие элементы упаковки для конкретного эфирного масла;

Изучение стабильности должно осуществляться по программе (плану). Программа изучения стабильности должна включать виды планируемых испытаний, выбор серий, описание системы упаковки/укупорки; испытываемые характеристики; методики испытаний; периодичность (частоту) испытаний; требования к условиям хранения при проведении испытаний.

Общие рекомендации по изучению стабильности эфирных масел

Изучение стабильности должно включать испытания таких характеристик, которые подвержены изменениям в процессе хранения и которые, вероятно, могут оказать влияние на качество эфирного масла. В зависимости от конкретной ситуации объём испытаний по изучению стабильности должен охватить все физические и химические параметры эфирного масла.

Должны быть применены валидированные аналитические методики, позволяющие охарактеризовать стабильность. Необходимость проведения повторных испытаний по изучению стабильности и их объём будут зависеть от результатов валидации.

Перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, которым должны соответствовать эфирное масло, регламентируют спецификации: на выпуск и на срок годности лекарственного средства.

Для каждого конкретного испытания эфирного масла должны быть определены критерии приемлемости, представляющие собой числовые пределы, интервалы или другие критерии. В случае испытания эфирного масла по показателю «Хроматографический профиль» критерии приемлемости должны включать верхние и нижние пределы содержания отдельных компонентов хроматографического профиля эфирного масла. При этом должен контролироваться процесс образования продуктов разложения.

Допускаются приемлемые и обоснованные отклонения одних и тех же показателей качества для одного и того же эфирного масла в спецификации на выпуск и в спецификации на срок годности, основанные на оценке стабильности и наблюдаемых изменениях при хранении.

При изучении стабильности возможно получение результатов, выходящих за пределы спецификации, называемых «значительными изменениями».

«Значительное изменение эфирного масла» означает изменение, после которого эфирное масло перестает соответствовать спецификации.

Для изучения стабильности эфирных масел допустимо применение только долгосрочных испытаний в соответствии с утвержденным планом исследования.

Долгосрочные испытания стабильности эфирного масла представляют собой испытания по изучению стабильности физических и химических характеристик эфирного масла, проводимые в условиях хранения, заявленных в фармакопейной статье и нормативной документации в период предполагаемого срока годности (предполагаемого периода до проведения повторных испытаний).

Полученные данные долгосрочных испытаний стабильности используют для установления срока годности (периода до проведения повторных испытаний), а также для подтверждения предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний) и условий хранения, предлагаемых (или утвержденных) в маркировке эфирного масла.

Долгосрочные испытания необходимо проводить в рекомендованной для данного эфирного масла потребительской упаковке при утвержденных в плане исследования режимах хранения в течение всего предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

Требования к выбору методов и методик изучения стабильности

Программа предполагает изучение стабильности эфирных масел в течение 12 месяцев с пятью точками контроля: начальная, 3, 6, 9 и 12 месяцев с возможностью дальнейшего изучения стабильности – с двумя точками контроля (18 и 24 месяца) в течение второго года исследования.

Для изучения стабильности рекомендуется использовать два основных метода анализа: газовая хроматография для определения изменений в хроматографическом профиле в каждой точке испытания и йодометрическое титрование для определения показателя «Пероксидное число» и контроля содержания гидропероксидов в трех точках контроля в течение первого года исследований: начальной, 6 и 12 месяцев.

Исследование изменений в хроматографическом профиле проводится на основании закрепленного хроматографического профиля в фармакопейной статье (при наличии) или в нормативной документации. Указанные исследования проводятся в каждой точке контроля.

В начальной и конечной точке исследования (в течение первого года) обязательным является проведение анализа по всем показателям в соответствии со спецификацией качества испытуемого эфирного масла.

При разработке плана исследования стабильности на срок более 12 месяцев анализ по всем показателям в соответствии со спецификацией качества испытуемого эфирного масла следует проводить ежегодно с интервалом между измерениями не более 12 месяцев.

Двумя важными требованиями перед проведением исследований является наличие разработанного хроматографического профиля эфирного масла, что в рамках исследования стабильности необходимо для однозначного определения соответствия спецификации эфирного масла в каждой точке контроля.

Хранение любого эфирного масла предполагает плотно укупленную тару. Недопустимым является проведение исследований с экспозицией эфирных масел в открытых флаконах. Для проведения исследования хранение эфирных масел должно быть реализовано в соответствии с требованиями фармакопейной статьи (при наличии) и нормативной документации. Обязательным при проведении исследования является его проведение с использованием первичной упаковки, в соответствии с ISO 210:2023.

План исследования стабильности эфирных масел

План исследования стабильности эфирных масел должен быть основан на моделировании реальных условий хранения с варьированием трех основных факторов, влияющих на стабильность эфирного масла: температуры хранения, наличия кислорода и воздействия солнечного излучения. При варьировании температуры хранения

рекомендуется использовать распространенный подход с тремя температурными зонами: с температурами от -25 °С до -18 °С; от +2 °С до + 8 °С и от 15 °С до 25 °С. Воздействие влияния кислорода следует оценивать путем проведения параллельного исследования стабильности в нормальной (воздушной) и инертной атмосфере. А воздействие УФ-излучения путем параллельного исследования с воздействием рассеянного света и без него при хранении образцов. Описанный алгоритм учитываем два основных сценария хранения эфирного масла: до первого вскрытия и после него. В таблице Д.1 приведены рекомендуемые условия хранения эфирных масел при исследовании их стабильности.

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

Таблица Д.1 – Описание экспериментов и параметры переменных факторов

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

Для интерпретации данных при исследовании стабильности по рекомендуемой программе изучения стабильности следует использовать дерево принятия решений, которое представлено на рисунке Д.1

В соответствии с деревом принятия решений (рисунок Д.1) в случае значимых изменений в компонентном составе в ходе экспериментов № 5, 6, 7 и 8 предлагается для указанных экспериментов окончить исследование стабильности, но продолжить дальнейшее изучение в соответствии с разработанной программой для экспериментов № 1-4. При наличии значимых изменений в компонентном составе в ходе экспериментов № 1-4 предлагается провести повторные исследования на более коротком периоде времени и/или обеспечить более жесткие условия хранения.

При определении наиболее оптимальных условий хранения следует оценивать два возможных сценария хранения: до первого вскрытия и после него. При выборе условий

хранения вне зависимости от сценария хранения (до первого вскрытия или после) предпочтительными являются условия, при которых обеспечиваются наименьшие изменения в компонентном составе.

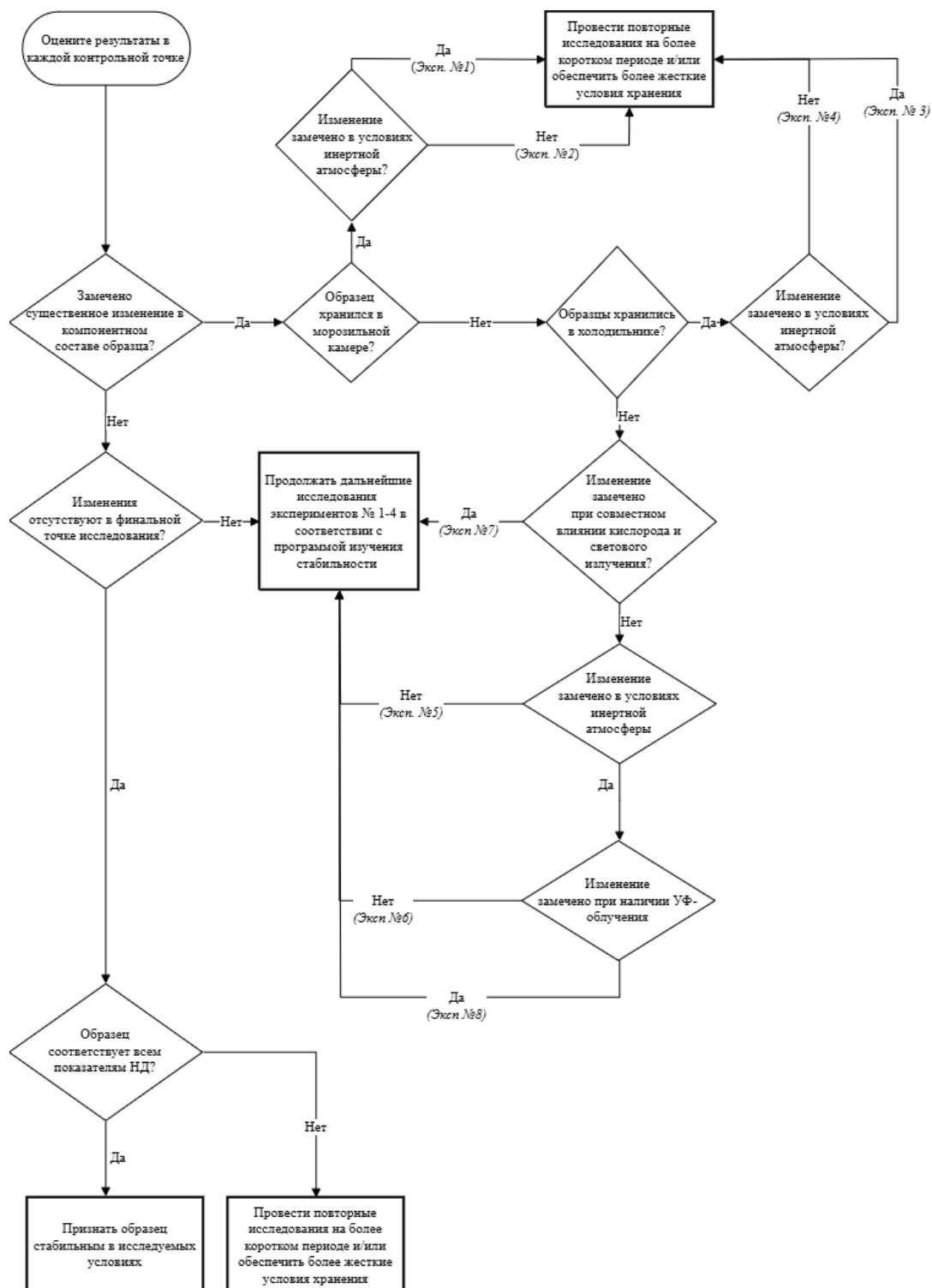


Рисунок Д.1 – Дерево принятий решений при изучении стабильности эфирных масел

Однако в качестве условий хранения может быть выбраны и те, в которых эфирное масло соответствует спецификации в конце исследований (предполагаемого срока годности).

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.

Требования к выбору серий при изучении стабильности

В зависимости от масштаба производства для изучения стабильности рекомендуется использовать промышленные серии или опытно-промышленные серии эфирного масла.

Отбираемые опытно-промышленные серии эфирного масла должны быть получены с использованием аналогичной промышленным сериям технологии, с использованием способа производства, моделирующего окончательный процесс, который будет использоваться при промышленном производстве. Качество эфирного масла, в целом для серий, отбираемых для изучения стабильности, должно быть репрезентативным в отношении качества, которое будет производиться в промышленном масштабе.

Оценка данных по стабильности при декларировании условий хранения и указаний по маркировке

Условия хранения лекарственного средства должны быть установлены на основании оценки данных по изучению стабильности эфирного масла при долгосрочных испытаниях

Установленные условия хранения эфирного масла должны быть включены в фармакопейную статью, нормативную документацию и отображены в маркировке лекарственного средства.

Для декларирования условий хранения лекарственных средств необходимо использовать унифицированные, стандартные формулировки, при этом предложенные условия хранения должны быть достижимы на практике. Таким образом, декларируются только те условия хранения, которые моделируют сценарии хранения после вскрытия упаковки в соответствии с рекомендуемым планом исследований.

Основные рекомендуемые формулировки указаний по маркировке лекарственных средств, связанных с декларированием условий хранения, приведены в таблице Д.2.

Альтернативные указания по хранению эфирного масла являются допустимыми в случае достаточного обоснования и должны быть обоснованы данными по результатам исследования стабильности.

Таблица Д.1 – Указания по маркировке эфирных масел в зависимости от результатов исследования стабильности

Номер эксперимента	Указания по маркировке	Дополнительные указания по маркировке
2	«Хранить в морозильной камере» или «Хранить и перевозить в морозильной камере» ¹	Нет
4	«Хранить в холодильнике» или «Хранить и перевозить в холодильнике» ²	«Не замораживать» ³
6	«Хранить при температуре не выше 25 °С в защищенном от света месте»	«Не хранить в холодильнике» или «Не замораживать» ³
8	«Хранить при температуре не выше 25 °С»	«Не хранить в холодильнике» или «Не замораживать» ³
Примечания: 1. Указания дается по результатам исследования стабильности в случае обоснованной необходимости. 2. Необходимо указать температурный диапазон (например, от +2 °С до + 8 °С) 3. Указание дается по результатам исследования стабильности в случае наблюдения в описанных условиях результатов, свидетельствующих об ухудшении стабильности эфирного масла или в случае наблюдения в рамках исследования эффектов опалесценции, выпадения осадка и др. при замораживании эфирного масла		