ISSN-1682-0533

Научно-Техническое Общество «КАХАК»

ИЗВЕСТИЯ

Научно-Технического Общества «КАХАК»

|  |  |
| --- | --- |
| 2020, № 2 (69) | |
|  |  |

Алматы, 2020

**МРНТИ: 61.45.36**

**УДК: 547.978:66.084.7**

**УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ЭКСТРАКЦИЯ КАК СПОСОБ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТЕНИЙ ВИДА *LIMONIUM GMELINII***

**Касымова Д.Т., Алиева А.Б., Жузеева М.С., Жусупова Г.Е.**

*Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан*

*е-mail:* [*k\_dariya\_@mail.ru*](mailto:k_dariya_@mail.ru)

*В представленной работе приведен краткий обзор ультразвуковой (УЗ) экстракции, используемой как эффективный способ получения комплекса биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья. Рассмотрены основные технологические параметры процесса УЗ экстракции, указаны преимущества и недостатки метода. Представлен механизм действия ультразвука на растительные клетки и основные факторы, влияющие на данный процесс. УЗ экстракция была выбрана для совершенствования и интенсификации технологии получения субстанции из растений вида* *Limonium gmelinii (**L. gmelinii). Отработаны основные факторы, влияющие на диффузию БАВ из сырья в экстрагент, а именно концентрация этилового спирта, соотношение сырья и экстрагента, время и кратность экстракции. Установлена высокая эффективность и экономические преимущества ультразвуковой экстракции в сравнении с используемым ранее методом двухкратной мацерации. Полученные в исследовании числовые соотношения по выходу и содержанию дубильных веществ можно использовать при расчете взаимозаменяемости корней и надземной части в производстве фитопрепаратов.*

***Ключевые слова:*** *Limonium gmelinii, комплекс БАВ, дубильные вещества, ультразвуковая экстракция, диффузия, валидация, фармацевтическая субстанция.*

*Ұсынылған жұмыста өсімдік шикізатынан биологиялық белсенді заттар кешенін (ББЗ) алудың тиімді тәсілі ретінде қолданылатын ультрадыбыстық (УД) экстракцияға қысқаша шолу келтірілген. УД экстракция процесінің негізгі технологиялық параметрлері қарастырылған, әдістің артықшылықтары мен кемшіліктері көрсетілген. Ультрадыбыстың өсімдік жасушаларына әсер ету механизмі және бұл процеске әсер ететін негізгі факторлар көрсетілген. УД экстракция Limonium gmelinii (L. gmelinii) өсімдіктері түрінен субстанция алудың технологиясын жетілдіру және қарқындату үшін таңдалынып алынған. Шикізаттан экстрагентке ББЗ диффузиясына әсер ететін негізгі факторлар қарастырылды, атап айтқанда этил спиртінің концентрациясы, шикізат пен экстрагенттің арақатынасы, экстракцияның уақыты мен еселігі. Ультрадыбыстық экстракцияның тиімділігінің жоғарылығы мен экономикалық артықшылықтары бұған дейінгі қолданылған екі реттік мацерация әдісімен салыстырылып анықталған. Зерттеулер нәтижесінде илегіш заттардың шығымы мен құрамы бойынша алынған сандық қатынастарды фитопрепараттар өндірісінде өсімдік тамыры және жер үсті бөлігінің өзара алмасуын есептеу кезінде қолдануға болады.*

***Тірек сөздер:*** *Limonium gmelinii, ББЗ кешені, таниндер, ультрадыбыстық экстракция, диффузия, валидация, фармацевтикалық зат.*

*The given article presents a short review of ultrasound extraction to obtain a complex of biologically active substances (BAS), main technological parameters as well as the advantages and disadvantages of the method. Ultrasonic extraction was employed to improve and intensify the technology for obtaining drug substances from Limonium gmelinii (L. gmelinii). In addition, influencing factors, including ethanol concentration, ethanol-raw material ratio, extraction time and frequency rate of extraction, which affect diffusion of biologically active substances from raw material to extractant, were optimized. It was found that ultrasonic extraction is significantly better than the previously used method of double maceration in terms of high efficiency and economic advantages. The numerical ratios of the yield and content of tannins obtained in the study can be used in calculating the interchangeability of roots and aerial parts in production of phytopreparations.*

***Keywords:*** *Limonium gmelinii, a complex of biologically active substances, tannins, ultrasonic extraction, diffusion, validation, pharmaceutical substance.*

*Введение.* Территория Казахстана характеризуется разнообразием ландшафтов, включающих леса, горы, пастбища, сенокосные угодия, лесостепи и др., что в сочетании с климатическими условиями обуславливает биоразнообразие и богатый видовой состав флоры [1, 2]. Особенно ценными являются эндемические зоны в горах Каратау, Западном Тянь-Шане, отличающиеся уникальными природными комплексами и оригинальными по флористической композиции сообществами. На данный момент насчитывается более 13 тыс. видов растений, из которых 1525 вошли в «Аннотированный список видов лекарственных растений Казахстана» [3]. Однако потенциальными для медицинского использования могут стать только те биологически активные растения, которые имеют промышленные запасы, доступны для сбора, являются возобновляемыми, экологически безопасными, научно и практически значимыми, а их заготовка экономически рентабельной. Таким дикорастущим лекарственным сырьем являются корни и надземная часть растений вида *L. gmelinii* с уже доказанным широким спектром терапевтической активностии включенные в Государственную Фармакопею Республики Казахстан [4]. Поиск новых подходов к рациональному выделению фармацевтической субстанции из растений вида *L. gmelinii,* как эффективно действующего ингредиента получаемых на ее основе потенциальных фитопрепаратов в виде гелей, суппозиториев, таблеток и других лекарственных форм, является актуальной и важной задачей. В данной статье предлагается использование ультразвуковой экстракции с целью усовершенствования технологии извлечения комплекса БАВ из исследуемого растительного сырья. Данный способ извлечения экстрактивных веществ позволяет достичь выхода субстанции, сравнимого с 48-часовой классической мацерацией, а значит, менее трудоемок и оперативен, а также экономически выгоден.

*Основная часть.* Растительная фармацевтическая субстанция согласно определению GMP [5] представляет собой продукт, получаемый после обработки растительного сырья с помощью таких методов, как экстракция, дистилляция, отжим, фракционирование, очистка, концентрирование и ферментация. Для получения субстанции из исследуемых растений вида *L.* *gmelinii* растительное сырье подвергалось сушке, измельчению и водно-спиртовой экстракции с последующим концентрированием экстракта досуха в мягких условиях. Данный способ не требует сложного оборудования, прост в исполнении и показал хороший выход биологически активного комплекса экстрактивных веществ [6]. Однако, как показывает анализ литературы, данный метод теряет популярность ввиду ряда недостатков, таких как длительность и трудоемкость; возможное испарение экстрагента, неполнота извлечения БАВ, меньшие выходы по сравнению с другими способами экстракции [7]. В связи с этим развиваются альтернативные способы экстрагирования – ремацерия, турбоэстракция, ультразвуковая и микроволновая экстракции, перколяция, экстракция сжиженными газами и другие [7, 8].

Механизм процесса экстрагирования заключается в массопередаче БАВ из внутренних клеточных структур растительного материала в экстрагент до достижения равновесных концентраций по закону Фика [9]. Процессы диффузии БАВ происходят внутри частиц сырья за счет смачивания растворителем и их десорбции, далее осуществляется перенос веществ в пределах диффузионного пограничного слоя и в завершении их перенос движущимся экстрагентом [10, 11]. И как установлено скорость этих процессов зависит от гидродинамических условий и скорости перемешивания, разности концентраций, температуры, вязкости и природы растворителя, размера молекулы диффундирующего вещества и продолжительности процесса [9]. Так, высушивание сырья ведет к гибели пристенного слоя протоплазмы растительной клетки, в результате чего она становится полупроницаемой перегородкой и способна к диализу. Измельчение сырья способствует увеличению площади поверхности раздела фаз, но при этом учитывается недопустимость ослизнения при чрезмерно тонком помоле. Коэффициент молекулярной диффузии, влияющий на плотность потока вещества, согласно уравнению Эйнштейна прямо пропорционален продолжительности и температуре экстракции, однако необходимо руководствоваться экономическими соображениями длительности процесса и термолабильностью фитохимической композиции [9]. Такой технологический параметр, как кратность экстракции, а именно добавление свежих порций растворителя к биомассе, также благотворно воздействует на диффузию за счет разности концентраций в сырье и экстрагенте.

Учитывая перечисленную многофакторность процесса экстракции и особенности изучаемых растений, можно достичь более полного извлечения из них комплекса БАВ.

Метод ультразвуковой экстракции многими авторами рассматривается как способ интенсификации в технологии получения экстрактов. Спектр волн, участвующих в ультразвуке, называется ультразвуковыми волнами, а частоты этих волн выше звукового диапазона (> 20 кГц) и ниже микроволновых частот (до 10 МГц). Организовать процесс можно прямым воздействием ультразвука на образец с помощью зонда или косвенно в УЗ ванне через стенки сосуда с образцом. В последнем случае эффективность экстракции ниже, так как частота звуковых волн постоянна и недостаточно высока (20 или 40 кГц) [12].

УЗ воздействие основано на принципе акустической кавитации, которая разрушает клеточные структуры. С ростом ультразвуковой мощности возрастает количество кавитационных пузырей, коллапс которых приводит к локальным скачкам температуры и давления [13]. Этот процесс и облегчает повреждение растительных клеток. Схематично данный механизм изображен на рисунке 1.

Исследование растительного материала сканирующей электронной микроскопией показало, что изначально клетки сырья гладкие и непористые. Экстракция растворителем истощает их и приводит к появлению разрывов и складок. Между тем, УЗ экстракция ведет к изменению формы и полному повреждению клеточных стенок. Показано, что полнота извлечения паклитаксела возрастает с увеличением мощности ультразвука в диапазоне от 80 до 380 В, и выход после однократной УЗ экстракции в течение 10 мин при 380 В сопоставим с обычной четырехкратной экстракцией в растворителе [13].

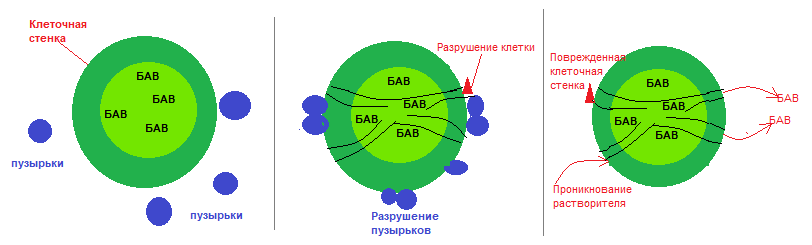


Рисунок 1 – Механизм образования пузырьков при УЗ воздействии

на растительные клетки и их разрушение

При проведении анализа влияния ультразвука на извлечение флавоноидов из зеленой массы гречихи было установлено, что их более высокий выход достигается в 100 раз быстрее по сравнению с традиционной экстракцией [14], а процесс экстракции семян томатов за счет интенсификации процесса УЗ сокращается с 48 минут до 8–10 [15]. Аналогичен пример более полного выхода экстрактивных веществ из семян пажитника за 60 мин воздействия ультразвуком, сравнимые с 5-ти часовой динамической мацерацией. Однако авторами отмечено, что обработка ультразвуком экстракта более 1 часа приводит к деструкции БАВ и его инактивации [16]. В исследовании [17] при обработке ультразвуком более 40 мин также происходили деструктивные процессы и снижение выхода экстрактивных веществ. Данный момент является критическим в применении ультразвука, способного изменять не только конформационные структуры молекул и их пространственную ориентацию, а также деформировать молекулярные цепочки, вести к деполимеризации, образованию макрорадикалов за счет механохимических реакций [8]. Чтобы препятствовать этим последствиям, нужно строго регулировать длительность процесса, анализировать качество экстракта на содержание БАВ или добавлять специальные добавки, как стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты [18]. Это касается и контроля мощности, и частоты ультразвука, так как вследствие слишком высоких значений этих технологических параметров имеются сведения о разрушении полисахаридов [19], падении антиоксидантной активности полифенолов [20]. Так, в работе [21] поддерживали частоту 40 кГц для экстракции флавоноидов и фенолов с целью сохранения их антиоксидантной активности, а интенсификацию процесса проводили улучшением качества экстрагента, варьированием времени и температуры обработки сырья. Диапазон 150–250 В ультразвука определен как оптимальный для экстракции флавоноидов из коричника камфорного 75 % этиловым спиртом в течение 15–25 мин [22]. В обзорной статье [23] сообщается об увеличении выхода субстанции при применении ультразвука по сравнению с обычной экстракцией от 20 % до 53 % и что ультразвуковое воздействие практически не влияет на химическую структуру экстрагируемых веществ.

При разработке оптимальных условий ультразвуковой экстракции важными остаются все вышеназванные факторы (природа растворителя, температура, время и другие), так как процесс мацерации подчиняется законам диффузии и зависит от этих технологических параметров. В настоящей работе проведена оптимизация и совершенствование технологии получения субстанции из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* методом УЗ экстракции*.* Учтены были требования современного фармацевтического рынка к разработке новых продуктов, а именно предусмотрены единые правила № 19 от 26.09.2017, № 24 от 06.08.2019, утвержденные в рамках ЕАЭС, и национальные нормативные документы [24, 25].

Исходя из этого, первым этапом работы служил входной контроль измельченных корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* на основании фармакопейных методов и установлена его доброкачественность по показателям: «микроскопия», «подлинность», «фармакогностические испытания», «содержание влаги», «примеси», «количественное определение аналитических маркеров» [4].

Раннее было установлено, что оптимальным экстрагентом для исследуемых растений является этиловый спирт, а наилучшей температурой будет комнатная, так как при низких температурах происходит осаждение слизей, пектинов и других балластных веществ, исключается деструкция БАВ [6]. Отработка технологии проводилась с установлением следующих параметров – концентрации этилового спирта, соотношения сырья и экстрагента, времени, кратности экстракции и степени измельченности сырья.

Для первого этапа эксперимента проводили УЗ экстракцию растений 30 %, 50 % и 70 % этиловым спиртом в качестве экстрагента при температуре 30 оС в течение 30 минут в трех параллельных опытах. Далее отфильтрованный экстракт концентрировали досуха на роторном испарителе при температуре 40–45 оС. На выходе получили кристаллический порошок коричневого цвета, взвешивали и определяли в нем количественное содержание дубильных веществ методом комплексонометрии в пересчете на танин. Выход субстанции из надземной части и содержание в ней дубильных веществ меньше на 4–5 % в сравнении с корнями, что позволяет при дальнейшем производстве учесть количественную взаимозаменяемость сырья (рисунки 2 и 3).

Рисунок 2 – Зависимость показателя выхода субстанции (%)

от концентрации этилового спирта (%)

Согласно полученным данным, использование этилового спирта различных концентраций в качестве экстрагента позволяет получить хороший выход субстанции. Количественное определение дубильных веществ в полученных экстрактах показывает максимальное их содержание в субстанциях корней и надземной части, полученных применением 50 % этилового спирта, который, следовательно, будет наилучшим экстрагентом для исследуемого лекарственного сырья в условиях УЗ экстракции.

Вторым этапом определяли оптимальное соотношение сырья и экстрагента для повышения выхода экстрагируемых веществ. Как видно из рисунков 4 и 5, результат по выходу субстанции из растений вида *L. gmelinii* растет с увеличением их соотношения, однако содержание дубильных веществ изменяется незначительно, и для более экономного расходования растворителя оптимальным будет соотношение 1:5.

Рисунок 3 – Зависимость содержания ДВ в субстанции (%)

от концентрации этилового спирта (%)

Рисунок 4 – Зависимость показателя выхода субстанции (%)

от соотношения сырье: экстрагент

Рисунок 5 – Зависимость содержания ДВ в субстанции (%)

от соотношения сырье: экстрагент

В дальнейшем проводилась валидация приемлемого времени ультразвуковой экстракции. Изменяли продолжительность процесса (30, 45, 60, 120 мин) при неизменной температуре, равной 30 °С, и соотношения сырья и экстрагента как 1:5.

Выход субстанции и дубильных веществ, полученных из надземной части и корней, с продолжительностью времени экстракции до 45 мин возрастает и остается неизменным до 60 мин (рисунки 6 и 7). Это подтверждает высокую эффективность технологии получения субстанции УЗ экстракцией за короткий период времени. Далее, как видно из рисунков 1, 6 и 7, происходит значительное уменьшение этих показателей, что можно объяснить возможной деструкцией экстрактивных веществ.

Рисунок 6 – Зависимость содержания показателя выхода субстанции (%)

от времени экстракции (мин)

Рисунок 7. Зависимость содержания показателя выхода субстанции (%)

от времени экстракции (мин)

При определении оптимальных условий экстракции также учитывали полноту извлечения дубильных веществ в зависимости от кратности экстракции. Экстрагирование проводили в две ступени при соотношении сырья и экстрагента 1:5 в течение 45 минут при 30 °С. К отфильтрованному сырью после первой экстракции добавляли свежую порцию водного спирта (50 %) и повторно проводили обработку ультразвуком при тех же условиях. Отфильтрованные водно-спиртовые экстракты объединяли и концентрировали при температуре 40–45 °С в вакууме досуха. Согласно экспериментальным данным (таблица 1) следует, что кратность экстракции не оказывает существенного влияния на повышение выхода субстанции из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii*. Проведение процесса в одну ступень по описанной технологии позволяет извлечь комплекс БАВ в полном количестве.

*Выводы.* Использование инновационных методов извлечения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья, таких как ультразвуковая экстракция, являются наиболее быстрым по времени, с высоким выходом экстрактивных веществ и эффективным для внедрения в производство. Применение данного метода широко освещено

в литературе и успешно реализовано для извлечения различных групп БАВ, таких как полифенолы, флавоноиды, полисахариды и других.

Таблица 1 – Выход субстанций, выделяемых из корней и надземной части растений вида *L.* *gmelinii*, в зависимости от кратности УЗ экстракции

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Сырье | Кратность экстракции | Объем экстракта, мл | Выход субстанций из растительного сырья, % | Содержaние суммы дубильных веществ в субстанциях, % |
| Корни | 1 | 338 | 23,88 | 23,56 |
| 2 | 620 | 24,57 | 24,29 |
| Надземная  часть | 1 | 355 | 19,09 | 20,37 |
| 2 | 610 | 20,11 | 21,03 |

Установлен механизм действия ультразвука на растительные клетки и основные факторы, влияющие на данный процесс. Согласно полученным результатам, извлечение дубильных веществ из растений вида *Limonium gmelinii* также осуществимо использованием УЗ экстракции. Показатель их содержания в корнях достигает 24 %, в надземной части 20 %. Хороший результат получен и по выходу фармацевтической субстанции: из корней он составляет в среднем 24 %, из надземной части – 20 %. Полученные в исследовании числовые соотношения по выходу и содержанию дубильных веществ можно использовать при расчете взаимозаменяемости корней и надземной части в производстве фитопрепаратов. Стоит также отметить оперативность, эффективность и экономические преимущества разработанной технологии в сравнении с используемым ранее методом двухкратной 48–часовой мацерации. Оптимальные условия для ультразвуковой однократной экстракции исследуемых растений: длительность 45 мин, экстрагент – 50 % этиловый спирт, соотношение сырья и экстрагента, равное 1:5.

**Литература:**

1. Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г. Список лекарственных растений Казахстана. – Алматы: Ғылым, 2012. – 123 с.
2. Пятый национальный доклад Республики Казахстан о биологическом разнообразии. – Астана, 2014. // <https://www.cbd.int/doc/world/kz/kz-nr-05-ru.pdf>.
3. Грудзинская Л.М., Г. Гемеджиева, Н.В. Нелина, Ж.Ж. Каржаубекова. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана: Справочное издание. – Алматы, 2014. – С. 111–115.
4. Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. – Т. 1. – 592 с.; 2009. – Т.2. – 804 с.; 2014. – Т.3. – 872 c.
5. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. – Geneva: WHO Press, 2007. – 92 c.
6. Жусупова Г.Е., Абилов Ж.А., Рахимов К.Д. Способ получения суммарного полифенольного комплекса из корней кермека Гмелина. / Патент РК. – №14418, 15.06.2004.
7. Гнездилова К.И. Технология изготовления настоек различными методами. // Международный научный журнал «Символ науки». – 2018. – № 1–2. – C. 173–174.
8. Коничев А.С., Баурин П.В. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2011. – №3. – С. 49–54.
9. Чуешов В.И. Промышленная технология лекарств. /под ред. В.И. Чуешова. – Харьков: МТК-Книга 2002. – Т. 2. – 570 с.
10. Милевская В.В. Кинетика извлечения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья различными способами экстракции. // [Вестник Московского университета.](https://cyberleninka.ru/journal/n/vestnik-moskovskogo-universiteta-seriya-2-himiya) – 2017. – №6. – Т. 58. – С. 281–289.
11. Пономарев В. Д. Экстрагирование лекарственного сырья. – М.: Медицина, 1976. – 202 с.
12. Nelly Medina-Torres. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources // Agronomy. – 2017. – Vol. 7. – Р. 1–19.
13. Kyung-Wan Yoo, Jin-Hyun Kim. Kinetics and Mechanism of Ultrasound-assisted Extraction of Paclitaxel from Taxus chinensis. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2018. – №23. – Р. 532–540.
14. А.В. Апаева, Э.Т. Ямансарова, О.С. Куковинец, О.Б. Зворыгин. Влияние ультразвукового облучения на извлечение флавоноидов из зеленой массы гречихи. // Вестник Башкирского университета. – 2016. – Т. 21. – С. 69–72.
15. П.Г. Думитраш, М.К. Болога, Т.Д. Шемякова. Ультразвуковая экстракция биологически активных соединений из семян томатов. // Электронная обработка материалов. – 2016. – 52. – С. 47–52.
16. Белокуров С.С., Флисюк Е.В., Смехова И.Е. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного с высоким содержанием биологически активных веществ. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019. – 8(3). – С. 35–39.
17. Jayalakshmi Ramasamy. Response Surface Optimization of Flavonoids from *Andrographis echioides. //* Pharmacognosy Magazine. – 2019. – Vol.15. – Issue 65. – Р. 547–556.
18. Muñiz-Márquez DB, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Laurus nobilis L. and their antioxidant activity. // Ultrasonics Sonochemistry. – 2013. – 20(5). – P. 1149–1154.
19. Wu W., Huang T., Xiang F. Polyethylene glycol‐based ultrasonic‐assisted enzymatic extraction, characterization, and antioxidant activity in vitro and in vivo of polysaccharides from *Lonicerae japonica* leaves. // Food Sci Nutr. – 2019. – P. 3452–3462.
20. Xiaoyu Li, Zhenyu Wang, Lu Wang. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Malus baccata* (Linn.) Borkh. using response surface methodology. // J. Sep. Sci. *–* 2013. – Vol. 36. – P. 1652–1658.
21. Jing Zhou. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction and Radical-Scavenging Capacity of Phenols and Flavonoids from Clerodendrum cyrtophyllum Turcz Leaves. // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – Issue 7. – P.68392.
22. Zaizhi Liu. Application of a Combined Homogenate and Ultrasonic Cavitation System for the Efficient Extraction of Flavonoids from *Cinnamomum camphora* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity in *vitro. //* Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2019. – P. 1–12.
23. Kamaljit Vilkhu, Raymond Mawson, Lloyd Simons, Darren Bates. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. // Innovative Food Science and Emerging Technologies. – 2008. – Vol. 9. – P. 161–169.
24. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии. О Руководстве по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения: утв. 26 сентября 2017 года, № 19.
25. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии. О Руководстве по контролю рисков микробной контаминации лекарственного растительного сырья, растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственных растительных препаратов: утв. 6 августа 2019 года, № 24.

*Поступила 11 мая 2020 г.*