

Міністерство освіти і науки України
Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка
Кафедра біології та хімії

«До захисту допускаю»
завідувач кафедри біології та хімії
кандидат біологічних наук, доцент
_____ Ірина БРИНДЗЯ
«___» _____ 20___ р.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
МІКРОБІОЛОГІЧНИМИ ТА ФІЗИКО- ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Спеціальність: 091 Біологія та біохімія

Магістерська робота
на здобуття кваліфікації – Магістр з біології за спеціалізацією
«Лабораторна діагностика біологічних систем»

Автор роботи Паньків Світлана Василівна _____

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
доцент Клепач Галина Миколаївна _____

Дрогобич, 2025

Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка

Зав. кафедрою:

Завдання на підготовку кваліфікаційної магістерської роботи

Тема: Дослідження якості деяких лікарських засобів мікробіологічними та фізико-хімічними методами.

1. Керівник: Клепач Галина Миколаївна

2. Студент: Паньків Світлана Василівна

3. Перелік питань, що підлягають висвітленню у кваліфікаційній роботі: здійснити аналіз наукової та науково-методичної літератури з досліджуваної проблеми; ознайомитись із методологічними аспектами та оволодіти деякими мікробіологічними та фізико-хімічними методами, які використовуються у виробничих умовах фармацевтичного заводу «Фарматрейд», здійснити аналіз якості деяких лікарських засобів мікробіологічними та фізико-хімічними методами; проаналізувати та статистично опрацювати отримані результати досліджень; зробити висновки про ефективність застосованих мікробіологічних та фізико-хімічних методів для дослідження якості лікарських засобів у виробничих умовах.

4. Список рекомендованої літератури: 1) Захарія і ін.. Основи стандартизації та сертифікації, 2014; 2) Система якості лікарських засобів, 2023, 3) Про лікарські засоби : Закон України, 2006; 4) Чеботарьов і ін. Метрологічні основи хімічного аналізу, 2019; 5) Shu et. al. Strategy to Assess Quality Consistency of Drug Products, 2019.

5. Етапи підготовки роботи:

№	Назва етапу	Термін виконання	Термін звіту перед керівником, кафедрою
1.	Підготовчий: • затвердження теми магістерської роботи; визначення мети та завдань роботи; збір та аналіз літератури; написання аналітичного огляду літератури	вересень – грудень, 2025 р.	січень, 2025
2.	Експериментальний: - дослідити якість деяких лікарських засобів мікробіологічними методами; - дослідити якість деяких лікарських засобів фізико-хімічними методами у виробничих умовах.	лютий – вересень, 2025 р.	жовтень, 2025
3.	Аналітично-узагальнюючий: • аналіз та обробка результатів дослідження; • написання магістерської роботи	вересень – жовтень, 2025 р.	листопад, 2025 р.
4.	Попередній захист роботи	листопад, 2025 р.	листопад, 2025 р.

6. Дата видачі завдання: вересень, 2024 р.

7. Термін подачі роботи керівнику: жовтень, 2025 р.

8. З вимогами до виконання кваліфікаційної роботи і завданням ознайомлена _____

(підпис студента)

9. Керівник _____

Захист магістерської роботи

(тема роботи)

Оцінка за стобальною шкалою:

Оцінка за національною чотирибальною шкалою: _____

Коротка мотивація захисту:

[illegible]

Дата

Голова ЕК _____ підпис

прізвище, ім'я

Дата

Секретар ЕК _____

підпис

прізвище, ім'я

АНОТАЦІЯ

Паньків Світлана

Дослідження якості деяких лікарських засобів мікробіологічними та фізико-хімічними методами.

Досліджено якість лікарських засобів (ЛЗ) у виробничих умовах фармацевтичного заводу мікробіологічними та фізико-хімічними методами аналізу. Методом вискоєфективної рідинної хроматографії підтверджено високий вміст основної речовини та відсутність домішок, що перевищують допустимі норми, у досліджуваних ЛЗ (зокрема, метронідазолу розчин для інфузій та парацетамолу розчин для інфузій). Методом мембранної фільтрації з подальшим культивуванням зразків на диференційно-діагностичних живильних середовищах для аналізу мікробного росту підтверджено належну якість ЛЗ за показником «стерильність». ЛАЛ-тест (тест на лізат амебоцитів *Limulus*) засвідчив, що досліджувані ЛЗ відповідають граничним нормам вмісту бактеріальних ендотоксинів (пірогенів).

ABSTRACT

Pankiv Svitlana

Study of the quality of some medicinal products by microbiological and physico-chemical methods.

The quality of medicinal products (MPs) was investigated under the manufacturing conditions of a pharmaceutical plant using microbiological and physico-chemical methods of analysis. The high content of the main active substance and the absence of impurities exceeding permissible limits were confirmed in the analyzed MPs (specifically, Metronidazole solution for infusion and Paracetamol solution for infusion) by High-Performance Liquid Chromatography. The appropriate quality of the MPs regarding the "sterility" indicator was confirmed. The membrane filtration method, combined with subsequent sample cultivation on differential diagnostic nutrient media for microbial growth analysis, confirmed the satisfactory quality of the medicinal products (MPs) with respect to the "sterility" test. The LAL test (*Limulus* Amebocyte Lysate test) confirmed that the tested medicinal products (MPs) comply with the limit norms for the content of bacterial endotoxins (pyrogens).

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ	9
1.1. Фармакологічні аспекти контролю та оцінки якості лікарських засобів.....	9
1.2. Мікробіологічний контроль якості лікарських засобів.....	17
1.3. Характеристика деяких фізико-хімічних методів оцінки якості лікарських засобів.....	22
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ТА УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
2.1. Характеристика об'єкту дослідження.....	25
2.2. Характеристика умов проведення дослідження.....	26
2.3. Приготування інфузійних розчинів лікарських засобів.....	27
2.4. Визначення прозорості, кольоровості та водневого показника лікарських засобів.....	30
2.5. Контроль наявності механічних включень.....	31
2.6. Визначення об'єму, що витягується.....	32
2.7. Кількісне визначення метронідазолу спектрофотометричним методом.....	32
2.8. Визначення супровідних домішок методом викоефективної рідинної хроматографії.....	33
2.9. Кількісне визначення парацетамолу методом викоефективної рідинної хроматографії.....	37
2.10. Аналіз стерильності лікарських засобів.....	40
2.11. Аналіз лікарських засобів на вміст бактеріальних ендотоксинів.....	41
2.12. Статистичний аналіз даних.....	42
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	42
3.1. Дослідження якості лікарських засобів фізико-хімічними методами.....	42
3.2. Дослідження якості лікарських засобів мікробіологічними методами.....	56
ВИСНОВКИ	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	62
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Актуальність дослідження. Якість лікарського засобу (ЛЗ) є критично важливим аспектом у сучасній фармації, безпосередньо впливаючи на безпеку пацієнтів та ефективність лікування [14]. Оскільки виробництво фармацевтичної продукції суворо регламентується міжнародними та національними стандартами, це вимагає належного контролю якості ЛЗ на всіх його етапах життєвого циклу. Він включає ретельну перевірку ідентичності, кількісного вмісту діючих речовин, наявності домішок та мікробіологічної чистоти [14]. Неналежна якість лікарських засобів може призвести до серйозних негативних наслідків, включаючи відсутність терапевтичного ефекту, розвиток побічних реакцій або навіть загрозу життю [6].

У зв'язку з постійним розвитком фармацевтичної промисловості та появою нових лікарських форм і технологій їх виробництва, актуальність комплексного контролю якості ЛЗ є надзвичайно важливою [22]. Особлива увага приділяється інфузійним препаратам, які широко використовуються в медичній практиці. До них належать розчини метронідазолу та парацетамолу, які є важливими лікарськими засобами з великим попитом на фармацевтичному ринку. Забезпечення стабільно високої якості таких препаратів у виробничих умовах є запорукою їх надійного та безпечного застосування [23].

Водночас, зростаюча глобалізація фармацевтичного ринку та розширення міжнародного співробітництва у виробництві ЛЗ потребують уніфікованих та надійних методів контролю. Це уможлиблює забезпечити взаємне визнання стандартів якості та довіру до продукції. До того ж, еволюція мікробіологічних загроз та виникнення нових штамів мікроорганізмів, стійких до антибіотиків, вимагає постійного моніторингу мікробіологічної чистоти ЛЗ. Поєднання високо-специфічних мікробіологічних та фізико-хімічних методів уможливлюють точність та оперативність вияву потенційних відхилень від стандартів [14]. Таким

чином, комплексний аналіз якості ЛЗ є не лише вимогою державних та міжнародних органів контролю, але й основою підтримки громадського здоров'я. Забезпечення стабільно високої якості таких препаратів у виробничих умовах є запорукою їх надійного та безпечного застосування.

Мета роботи: дослідження якості деяких лікарських засобів у виробничих умовах мікробіологічними та фізико-хімічними методами.

Об'єкт дослідження: якість деяких лікарських засобів (на прикладі метронідазолу, розчину для інфузій, 0,5% та парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл), які виготовляються у виробничих умовах.

Предмет дослідження: фізико-хімічні та мікробіологічні показники, а також методи визначення якості деяких лікарських засобів (на прикладі метронідазолу, розчину для інфузій, 0,5% та парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл).

Основні завдання роботи:

- проаналізувати сучасну наукову та науково-методичну літературу, що стосується проблеми оцінки якості лікарських засобів;
- дослідити якість окремих лікарських засобів (на прикладі метронідазолу, розчину для інфузій 0,5% та парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл) фізико-хімічними методами (СФ-метричним, ВЕРХ, іонометричним) у виробничих умовах;
- дослідити якість зазначених лікарських засобів мікробіологічними методами, зокрема методом мембранної фільтрації у поєднанні з посівом на диференційно-діагностичні живильні середовища, а також методом гел-троб-тесту (метод А) – граничне випробування *in vitro* - у виробничих умовах;
- сформулювати узагальнені висновки щодо ефективності застосованих мікробіологічних та фізико-хімічних методів контролю якості лікарських засобів (на прикладі метронідазолу, розчину для інфузій 0,5% та парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл).

Методи досліджень: фізико-хімічні (метод високоефективної рідинної хроматографії, спектрофотометричний, потенціометричний) – для оцінки якості лікарських засобів; мікробіологічні (мембранна фільтрація, посів на диференційно-діагностичні живильні середовища, метод гелі-тромб тесту (LAL-тест) – для оцінки якості лікарських засобів; обчислювальний та математично-статистичний – для аналізу, обліку та інтерпретації результатів, визначення достовірності отриманих даних.

Наукова новизна. Встановлено, що застосування методу ВЕРХ, а також мембранної фільтрації у поєднанні мікробіологічним аналізом посівів на диференційно-діагностичних середовищах є надійними та високо ефективними підходами для оцінки якості лікарських засобів у виробничих умовах.

Практичне значення. Результати досліджень можуть бути застосовані для ефективного контролю якості деяких лікарських засобів у виробничих умовах та встановленню їх відповідності встановленим стандартам. Окремі розділи роботи можуть бути використані під час вивчення окремих тем з навчальних дисциплін “Мікробіологія і вірусологія”, “Санітарна мікробіологія” та виробничій практиці здобувачами вищої освіти біологічних спеціальностей.

Апробація роботи. Результати досліджень роботи обговорені на науковому семінарі кафедри біології та хімії, а також представлені на V Всеукраїнській науково-практичній конференції "Пріоритетні напрями досліджень в науковій та освітній діяльності: проблеми та перспективи" (23.10 – 24.10. 2025 р., м. Рівне) [7].

Структура та обсяг роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг роботи складає 66 сторінок, містить 9 таблиць, 5 рисунків, 53 джерела використаної літератури, додатки.

Кваліфікаційна робота виконана на базі відділу контролю якості ДП "Фарматрейд" у рамках договору про наукову співпрацю з ДДПУ імені І. Франка.

РОЗДІЛ 1. ОЦІНКА ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

1.1. Фармакологічні аспекти контролю та оцінки якості лікарських засобів

Основні компоненти фармацевтичної системи якості (ICH Q10) лікарських засобів. Одним з аспектів, пов'язаних з обігом ЛЗ, є забезпечення та контроль їх якості. Якість ЛЗ – це сукупність властивостей, які уможливають задовільняти споживачів відповідно до свого призначення та відповідають вимогам, встановленим законодавством. Задля забезпечення ефективності (належної якості) ЛЗ, держава здійснює контроль упродовж усього виробничого циклу, починаючи з часу його створення, виведення на ринок та під час його перебування на ринку. Для забезпечення ефективного контролю якості ЛЗ у рамках держав створюють спеціальні органи та служби, впроваджують відповідні контрольні процедури та нормативи [4 8; 9]. Система якості ЛЗ охоплює сукупність властивостей, що забезпечують відповідність ліків їх призначенню та відповідають потребам пацієнтів. Вона включає етапи планування та проведення клінічних випробувань (GCP) та має модель фармацевтичної системи якості, яка застосовується на всіх етапах виробничого циклу продукції як описано в ICH Q10 [40]. Фармацевтична система якості, згідно з міжнародним документом ICH Q10, включає кілька ключових компонентів, які забезпечують управління якістю на всіх етапах виробничого циклу ЛЗ [40]:

- **політика якості:** визначає стратегічний підхід до забезпечення якості на всіх рівнях виробничого процесу. Включає зобов'язання управління до підтримки системи якості;

- **керування ризиками:** включає оцінку, контроль і моніторинг ризиків, пов'язаних з якістю продукції.;

– **управління документами та записами:** включає процеси створення, контролю, зберігання та знищення документації, що стосується надійності системи якості. Це забезпечує належний контроль за послідовністю дій;

– **навчання та розвиток персоналу:** оцінювання і забезпечення підготовки, навчання та компетентності співробітників, які беруть участь у впровадженні й підтримці системи якості;

– **управління постачальниками:** оцінка та контроль постачальників для забезпечення якості вихідних матеріалів і послуг, які впливають на продукцію;

– **моніторинг та вдосконалення:** систематичний моніторинг процесів, перевірка відповідності та впровадження коригувальних дій для покращення системи якості;

– **розробка та валідація:** включає процеси розробки, валідації і перевірки виробничих процесів та систем для забезпечення належної якості ЛЗ;

– **управління змінами:** оцінювання, документування та контроль змін у виробничих процесах, системах чи документації.

Ці компоненти працюють сумісно, задля забезпечення безпечності і ефективності продукту, що відповідає вимогам регуляторів та відповідає потребам пацієнтів. Управління якістю є динамічним процесом, що потребує постійної уваги та вдосконалення [2].

Міжнародні стандарти, що регулюють якість ЛЗ. Якість ЛЗ та їх клінічних випробувань регулюється кількома важливими міжнародними стандартами та нормативними документами. Зокрема, ICH-GCP (International Conference on Harmonisation – Good Clinical Practice, укр. Міжнародна конференція з питань гармонізації – Належна Клінічна Практика) [43], ISO 14155, FDA (Food and Drug Administration, USFDA, укр. Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів, США) [47], Guidelines EMA (European Medicines Agency, укр. Настанови Європейського Медичного Комітету), GxP (Good Practices) [46].

У стандарті ICH-GCP (укр. Міжнародний Етичний і Науковий Стандарт, укр. Належна Клінічна Практика) регламентуються міжнародні етичні та наукові вимоги до планування та проведення клінічних досліджень ЛЗ за участю людей, а також документального оформлення і презентацію їх результатів. Ключові аспекти даного стандарту включають: а) походження інформованої згоди; б) збереження добробуту та прав учасників; в) якість даних та документації [42].

У ISO 1415-стандарті описуються вимоги до проведення клінічних випробувань ЛЗ. Він зосереджений на організації та управлінні досліджень, забезпечуючи дотримання принципів стандарту GCP (Good Clinical Practice) [5].

Стандарт ISO 14155:2011 встановлює правила належної клінічної практики для проєктування, проведення, запису та звітності клінічних досліджень на людях. Він стосується оцінювання медичних приладів. Зазначений стандарт встановлює належну клінічну практику для дизайну, проведення, реєстрації та повідомлення результатів клінічних досліджень на людях для оцінювання безпеки чи робочих характеристик медичних виробів з метою регулювання. Визначені в цьому стандарті принципи, потрібно застосовувати також і до інших клінічних досліджень. Зокрема, їх потрібно виконувати у повному обсязі, зважаючи на вид клінічного дослідження й вимоги чинного законодавства. Його не застосовують стосовно медичних виробів для *in vitro*-діагностики [5].

Стандарт ISO 14155:2011 визначає загальні вимоги, які мають захищати права, безпеку та здоров'я досліджуваних; забезпечити науковий підхід до проведення клінічних досліджень і достовірність результатів клінічних досліджень; визначити відповідальність спонсора й керівника клінічного дослідження й допомагати спонсорам, дослідникам, комітетам (комісіям) з питань етики, регуляторним та іншим органам, які беруть участь в оцінці відповідності медичних виробів [5].

У стандарті FDA (укр.: Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів, США) прописані настанови, які регулюють

безпеку харчових продуктів, біологічно активних добавок (БАДів), ліків, вакцин, медичних приладів, ветеринарної продукції та косметики. FDA має прописані стандарти щодо клінічних випробувань, які є обов'язковими для ЛЗ, що розробляються або локалізуються в США. Вони включають вимоги до реєстрації, моніторингу та звітування [47].

Настанови ЕМА, комітету з лікарських ЛЗ для використання людьми Європейського агентства з ЛЗ є науковими, які отримують за погодження з регуляторними органами держав-членів Європейського Союзу (ЄС). Вони призначені допомогти у підготовці заявок на отримання дозволу на маркетинг ЛЗ для людини. Керівні принципи ЕМА відображають гармонізований підхід державних депутатів та Агентства ЄС щодо застосовування їх вимог до якості, безпеки та ефективності ЛЗ, викладені в директивах Співтовариства. ЕМА надає консультативні документи та інструкції, що стосуються схвалення ЛЗ у Європі, включаючи правила клінічних випробувань [46].

Настанови Good Practices (укр.: Належна практика) розроблені для різних напрямків: лабораторних досліджень (Good Laboratory Practice, GLP), виробництва ЛЗ (Good Manufacturing Practice, GMP), клінічних досліджень (Good Clinical Practice, GCP) [15-21]. Ці настанови сприяють у забезпеченні ефективності, безпеки та якості ЛЗ, що направлені та беруть участь у клінічних випробуваннях.

У рамках Good Practices є розроблені настанови для таких напрямків: “Належна лабораторна практика” (англ. Good Laboratory Practice, GLP), “Належна клінічна практика” (англ. Good Clinical Practice, GCP), “Належна виробнича практика” (англ. Good Manufacturing Practice, GMP), “Належна дистрибуційна практика” (англ. Good Distribution Practice, GDP), “Належна практика фармаконагляду” (англ. Good Pharmacovigilance Practice, GVP) [8].

Метою належної виробничої практики (англ. Good Manufacturing Practice, GMP) є забезпечення стабільного та надійного виробництва продукції відповідно до стандартів якості ЕМА GMP [46]. Надійність якості продукції настановами

ЕМА GMP гарантується контролем п'яти критичних показників: людські ресурси (співробітники мають бути кваліфіковані та знати посадові обов'язки); середовище (якість продукту не має зазнавати негативного впливу з боку оточуючого середовища, а доступ до виробничої зони повинен надаватися тільки уповноваженому персоналу); обладнання (має бути відкаліброваним та повіреноим задля гарантування надійності її належного функціонування); методи (для усіх виробничих процесів обов'язково потрібно вести документацію задля забезпечення узгодженості даних. Ця документація включає стандартні операційні процедури (СОПи), виробничі інструкції, аналітичні методології тощо); матеріали (усі матеріали повинні відповідати технічним характеристикам і мати правильне маркування. Використання матеріалів має фіксуватися та відстежуватися) [24].

Критерії визначення якості лікарських засобів. Система якості ЛЗ охоплює сукупність властивостей, що забезпечують відповідність ліків їх призначенню та потребам пацієнтів. Вона включає етапи планування та проведення клінічних випробувань (GCP) та є моделлю фармацевтичної системи якості, яка застосовується на всіх етапах життєвого циклу продукції, як описано в ICH Q10 (англ. Pharmaceutical Quality System) [40; 43].

В Україні прийнято та діє нормативний документ – “Настанова. Лікарські засоби. Фармацевтична система якості” (ICH Q10) від 31.01.2011 р. (далі – Н.ЛЗ) [40]. Цей документ є тристоронньо гармонізованою настановою ICH, яка включена до Частини 3 чинних Європейських правил з належної виробничої практики лікарських засобів для людини та застосування у ветеринарії (EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, далі – Настанова з GMP ЄС). Відповідно, Настанову СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011 інтегровано до Частини 3 “Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011 Лікарські засоби. Належна виробнича практика”, що також гармонізована з Настановою з GMP ЄС. Ця настанова встановлює рекомендації щодо системи управління якістю у фармацевтичній промисловості. Її положення поширюються

на фармацевтичні системи якості, що застосовуються для розробки та виробництва лікарських речовин (активних фармацевтичних інгредієнтів) та готових лікарських препаратів, включно з біотехнологічними та біологічними препаратами, упродовж усього їх життєвого циклу. Настанова рекомендована для використання суб'єктами господарювання (організаціями), які здійснюють розробку та виробництво ЛЗ, незалежно від їхньої форми власності чи відомчого підпорядкування. Вона також слугує основою для оцінки ефективності фармацевтичної системи якості під час аудитів та інспекцій з боку регуляторних органів, а також для добровільної сертифікації фармацевтичної системи якості виробників ЛЗ [5].

Міжнародна організація зі стандартизації (ISO) розробила настанову, що регулює фармацевтичні системи якості, застосовні до розробки та виробництва лікарських речовин (активних фармацевтичних інгредієнтів, АФІ) та готових лікарських препаратів (ЛП), включаючи біотехнологічні та біологічні продукти, упродовж їх усього життєвого циклу. Рекомендовані елементи цієї настанови мають бути адаптовані та інтегровані у стадії життєвого циклу продукції. Останній охоплює наступну технічну діяльність для нових та існуючих ЛП [22]:

- **фармацевтична розробка:** включає розробку лікарської речовини, складу та системи контейнер/закупорювальний засіб, виробництво досліджуваних ЛЗ, розробку систем доставки (за потреби), розробку виробничого процесу та масштабування, а також розробку аналітичних методів;

- **передача технологій:** охоплює трансфер технологій нової продукції з розробки у виробництво, а також перенесення технологій вже існуючої продукції всередині або між виробничими та випробувальними дільницями;

- **промислове виробництво:** включає придбання та контроль матеріалів, забезпечення технічними засобами, системами постачання та обладнанням, технологічний процес (включно з пакуванням та маркуванням), контроль та

забезпечення якості, видачу дозволу на випуск, зберігання та дистрибуцію (за винятком діяльності оптових торговців);

- **припинення виробництва продукції**: передбачає збереження документації, зберігання зразків, подальшу оцінку продукції та звітність.

Елементи фармацевтичної системи якості. Фармацевтична система якості має кілька ключових елементів. До них належать: система моніторингу функціональних характеристик процесу та якості продукції; система коригувальних та запобіжних дій (CAPA); система управління змінами; а також аналіз керівництвом функціональних характеристик процесу та якості продукції. Посилення цих елементів є критично важливим для підтримки підходу до якості продукції, що охоплює увесь її цикл. Ці елементи слід адаптувати та застосовувати на кожній стадії життєвого циклу продукції, враховуючи відмінності між стадіями та їхні конкретні цілі. Упродовж усього циклу продукції компанії заохочуються до впровадження інноваційних підходів для постійного поліпшення оцінки та якості продукції [22].

Система моніторингу функціональних характеристик виробничого процесу та якості продукції. Для забезпечення належного контролю якості медичних препаратів, фармацевтичні компанії впроваджують систему моніторингу функціональних характеристик процесу та якості продукції. Ефективність такої системи гарантує постійну спроможність виробничих процесів та контрольних заходів, спрямованих на досягнення бажаної якості продукції, а також сприяє виявленню сфер для безперервного вдосконалення.

Система моніторингу функціональних характеристик процесів та якості продукції повинна забезпечувати [6]: **визначення стратегії контролю** із застосуванням управління ризиками для якості. Ця стратегія може включати параметри та характеристики лікарської речовини, вихідної сировини, робочі параметри приміщень та обладнання, контроль у процесі виробництва, специфікації на готову продукцію, а також відповідні методи та частоту

моніторингу та контролю. Стратегія контролю має сприяти своєчасному зворотному/прямому зв'язку та відповідним коригувальним і запобіжним діям; **надання інструментів** для вимірювання та аналізу параметрів і характеристик, визначених у стратегії контролю (наприклад, управління даними та статистичні інструменти); **аналіз параметрів та показників**, визначених у стратегії контролю, для підтвердження постійної роботи в контрольованому стані; **визначення джерел варіабельності**, що впливає на функціональні характеристики процесу та якість продукції, з метою впровадження заходів для зниження або контролю варіабельності; **зворотний зв'язок щодо якості продукції** як із внутрішніх, так і з зовнішніх джерел інформації (наприклад, рекламації, відбракування продукції, невідповідності, відкликання, відхилення, аудити та інспектування регуляторними органами та їхні висновки); **накопичення знань** для посилення розуміння процесу, розширення простору проєктних параметрів (за наявності), а також можливості застосування інноваційних підходів до валідації процесів (Додаток А, Таблиці 1–4).

Критерії оцінки якості лікарських засобів. При визначенні якості ЛЗ оцінюються кілька ключових критеріїв, що забезпечують їх безпечність та ефективність. Основні з них включають: **ефективність** (ЛЗ мають демонструвати достатній терапевтичний ефект під час лікування чи профілактики захворювань; **безпечність** (оцінка відсутності або прийнятного рівня небажаних ефектів, включаючи токсичність, алергічні реакції та інші можливі ускладнення; **якість компонентів** (оцінка чистоти, складу та стабільності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та допоміжних речовин; **відповідність стандартам** (ЛЗ повинні відповідати вимогам національних та міжнародних стандартів, таким як Державна фармакопея (ДФ) або міжнародним рекомендаціям ICH, WHO тощо; **процес виробництва**: застосування належних виробничих практик (GMP) для забезпечення контролю за процесом виготовлення, що охоплює документацію, контроль якості та належну обробку; **стабільність** (оцінка терміну придатності,

умов зберігання та збереження фізичних й хімічних характеристик упродовж всього періоду; **лабораторна оцінка** (проведення відповідних тестів для підтвердження параметрів, таких як концентрація активної речовини, відсутність контамінації та відповідність фізичних характеристик; **клінічні дані** (результати клінічних випробувань, що підтверджують ефективність та безпеку ЛЗ для цільової групи респондентів [6].

Отож, на всіх етапах життєвого циклу ЛЗ, від розробки до його виходу на ринок, мають застосовуватися вищезазначені критерії оцінки якості. Ретельний аналіз їхніх показників є гарантією забезпечення високої якості ЛЗ.

1.2. Мікробіологічний контроль якості лікарських засобів

Серед ключових аспектів контролю якості ЛЗ посідає мікробіологічний, метою якого є мінімізація або повне виключення контамінації. Остання може не лише становити пряму загрозу здоров'ю споживачів, але й негативно впливати на стабільність, термін зберігання та фармакологічні властивості ЛЗ. Для стерильних ЛЗ абсолютною вимогою є відсутність будь-яких життєздатних мікроорганізмів, тоді як для нестерильних встановлюються суворі норми щодо допустимого рівня мікробіологічного забруднення. Засадничі принципи мікробіологічного контролю якості ЛЗ закладено у провідних світових фармакопеях, таких як Європейська Фармакопея (ЄФ, англ. EP) [50], Фармакопея США (англ. USP) [52; 53], Японська Фармакопея (англ. JP) [51], а також у національних нормативних документах, включаючи Державну Фармакопею України (ДФУ) [2]. Ці стандарти тісно гармонізовані з вимогами Належної Виробничої Практики (НВП, англ. GMP), що є базовим регуляторним документом для фармацевтичної галузі [40; 41].

Основні завдання мікробіологічного контролю ЛЗ охоплюють: визначення рівня мікробіологічної чистоти – встановлення кількості та типів мікроорганізмів у нестерильних ЛЗ; підтвердження стерильності – гарантування абсолютної відсутності життєздатних мікроорганізмів у стерильних ЛЗ; виявлення

специфічних патогенних мікроорганізмів – ідентифікація та кількісне визначення потенційно небезпечних для людини мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Candida albicans*); оцінка ефективності антимікробних консервантів – перевірка здатності ЛЗ зберігати мікробіологічну чистоту упродовж терміну придатності [44].

Мікробіологічні методи, що застосовуються у виробничому середовищі [44]:

1. Оцінка мікробіологічної чистоти (кількісне визначення мікроорганізмів) застосовується для нестерильних ЛЗ. Визначає допустимий вміст аеробних мікроорганізмів, дріжджів і плісневих грибків, а також перевіряє відсутність або обмежену присутність певних специфічних видів мікроорганізмів. З цією метою застосовуються наступні методи [49]:

- **метод мембранної фільтрації** є придатним для аналізу рідких зразків. Зразок пропускається через фільтр з пористістю 0,45 мкм. Фільтр далі переноситься на відповідне ЖС (наприклад, казеїново-соєвий агар для бактерій та агар Сабуро з декстрозою для грибків) та інкубується. Кількість колоній, що виросли, використовують для обчислень загальної аеробної мікробної кількості (Total Aerobic Microbial Count, англ. ТАМС) та загальної кількості дріжджових і плісневих грибків (Total Yeast and Mold Count, англ. ТУМС);

- **метод прямого посіву на чашки Петрі** застосовується для твердих, напівтвердих або в'язких зразків, які можуть бути безпосередньо висіяні на поверхню агару, або змішані з розплавленим агаром. Зразок готується (розчиняється, або суспендується), виконуються серійні розведення та їх посів;

- **метод найімовірнішого числа (НІЧ)** – використовується для зразків із низькою концентрацією мікроорганізмів або тих, що не піддаються легкій фільтрації чи прямому посіву. Зразок додається до серійних розведень рідкого ЖС у кількох повторях. Після інкубації ріст оцінюється, а НІЧ обчислюється за спеціальними статистичними таблицями.

2. Тест на стерильність є обов'язковим для всіх стерильних ЛЗ (зокрема, ін'єкційних розчинів, офтальмологічних крапель, імплантатів та ін.), який має підтвердити у них повну відсутність життєздатних мікроорганізмів. Він здійснюється за допомогою методів мембранної фільтрації та прямого посіву.

Усі етапи тест-методів повинні виконуватися в умовах контрольовано чистих приміщень (клас А/В за GMP) для запобігання зовнішньому забрудненню. Стандартний термін інкубації – 14 діб для обох типів середовищ. При виконанні тестів передбачається постановка обов'язкових контролей: 1) контроль придатності методики (підтверджує здатність середовищ підтримувати ріст мікроорганізмів) та 2) контроль інактивації антимікробної активності (гарантує, що антимікробні властивості ЛЗ не пригнічують росту тест-мікроорганізмів). Кількість тестованих зразків з партії строго регламентується фармакопеями для забезпечення статистичної достовірності результатів [49].

3. Тест на бактеріальні ендотоксини (БЕТ) призначений для виявлення та кількісного визначення бактеріальних ендотоксинів – ліпополісахаридів (ЛПС), що є невід'ємними компонентами клітинної стінки грамнегативних бактерій. Тест виконується за допомогою:

Лал-тест (*Limulus Amoebocyte Lysate, LAL test*) є найбільш поширеним методом, принцип якого полягає у використанні лізату амебоцитів мечохвоста *Limulus polyphemus*, який реагує з ендотоксинами. Цю реакцію реєструють якісно, а також кількісними методами. Утворення гелю (гель-тромб тест) – якісна реакція, що візуально підтверджує наявність ендотоксинів; помутніння розчину – ступінь якого є пропорційний концентрації ендотоксинів, що оцінюється кількісно за допомогою турбідометричного методу. ензиматичної реакції з хромогенним субстратом (хромогенний метод) – кількісний тест, що вимірює інтенсивність забарвлення, що утворюється внаслідок дії ендотоксин-індукованих ензимів [49].

Лал-тест є обов'язковий для аналізу парентеральних препаратів, імплантатів, офтальмологічних розчинів та будь-яких інших ЛЗ, що безпосередньо

контактують із внутрішнім середовищем організму. Він відзначається високою чутливістю та уможлиблює виявлення надзвичайно низьких концентрацій ендотоксинів. Метод потребує валідації для кожного ЛЗ для виключення потенційних інгібуючих або посилюючих ефектів, спричинених матрицею ЛЗ, а також використання води для ін'єкцій (WFI) для усіх розведень, оскільки вона має мінімальний, контрольований рівень ендотоксинів.

4. Тест на ефективність антимікробних консервантів (Preservative Efficacy Test) спрямований на оцінку здатності консервантів – складників ЛЗ, пригнічувати ріст мікроорганізмів, або зменшувати їхню кількість упродовж заявленого терміну придатності. У цьому тесті використовують стандартизовані тест-штами мікроорганізмів (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*). Значне зниження їх кількості до встановленого рівня свідчить про належну ефективність консерванта. Цей тест є обов'язковим для багатодозових нестерильних препаратів (зокрема, очні краплі, назальні спреї). Критерії прийнятності результатів варіюються залежно від шляху введення та типу ЛЗ [44].

Міжнародні та національні стандарти у мікробіологічному контролі. Регуляторна база України у сфері контролю якості ЛЗ суттєво гармонізована з міжнародними, зокрема європейськими, вимогами:

- Державна Фармакопея України (ДФУ) є ключовим нормативним документом, що встановлює стандарти якості ЛЗ в Україні [2]. Відповідні розділи ДФУ, що регламентують мікробіологічний контроль (наприклад, Мікробіологічна чистота нестерильних ЛЗ, “Стерильність”, “Бактеріальні ендотоксини”, “Ефективність анти-мікробних консервантів”), відповідають розділам Європейської Фармакопеї [50].

- Належна Виробнича Практика в Україні: вимоги GMP, імplementовані в Україні через національні стандарти (Настанови СТ-Н МОЗУ) та є повністю гармонізовані з EU GMP. Це означає, що всі аспекти виробничих процесів, систем якості, лабораторного контролю, валідації методик та кваліфікації персоналу

повинні відповідати визнаним міжнародним стандартам. Мікробіологічний контроль є невід’ємною складовою системи якості GMP [39].

- ICH Q10 Фармацевтична система якості – ця настанова, прийнята в Україні, пропонує системний підхід до управління якістю ЛЗ. Мікробіологічний контроль інтегрований у цю систему, забезпечуючи безперервний моніторинг, ефективне управління ризиками та постійне вдосконалення процесів [17].

Особливості застосування в Україні: усі фармацевтичні виробники в Україні зобов’язані неухильно дотримуватися вимог GMP та ДФУ; регуляторні органи проводять інспекції щодо відповідності цим стандартам; лабораторії контролю якості повинні бути акредитовані та використовувати лише валідовані методики; персонал лабораторії повинен мати високу кваліфікацію та регулярно проходити навчання для підтримання компетентності. Незважаючи на значні досягнення, існують певні виклики у виконанні мікробіологічних тестів: тривале та трудомістке їх виконання; виявлення некультивованих мікроорганізмів, або таких, що взагалі не ростуть на стандартних ЖС; специфіка нових фармацевтичних продуктів (біопрепаратів, продукти клітинної та генної терапії) вимагає адаптації існуючих та розробки принципово нових, більш специфічних методів контролю [30].

До перспектив у розвитку мікробіологічного контролю відносять:

- швидкі мікробіологічні методи (*Rapid Microbiological Methods, RMMs*): передбачають активне впровадження автоматизованих систем, що використовують принципи флуоресценції, біоломінесценції (АТФ-метрія), ПЛР для значного прискорення виявлення та ідентифікації мікроорганізмів;

- молекулярні методи – засновані на аналізі нуклеїнових кислот (наприклад, ПЛР, секвенування 16S рРНК), для швидкої та точної ідентифікації мікроорганізмів без необхідності їх культивування;

- автоматизація – масштабна автоматизація етапів підготовки зразків, посіву, інкубації та підрахунку колоній для підвищення пропускної здатності лабораторій

та мінімізації людського чинника;

- концепція стерильності на основі ризику – перехід від традиційного кінцевого контролю стерильності до інтегрованого системного підходу, де ризики мікробіологічної контамінації управляються та мінімізуються на всіх етапах виробництва шляхом належного проектування процесів та постійного моніторингу (наприклад, через *Process Analytical Technology, PAT*).

Отже, мікробіологічний контроль якості є критично важливою складовою забезпечення безпеки ЛЗ. Існуючий спектр методів, від традиційних до сучасних швидких та молекулярних, уможливорює комплексну оцінку мікробіологічної чистоти та стерильності ЛЗ. Їх застосування у виробничих умовах суворо регулюється міжнародними та українськими стандартами, зокрема вимогами GMP та Фармакопеї. Постійний розвиток технологій та інтеграція інноваційних підходів мікробіологічного контролю є запорукою безперервного підвищення якості та безпеки ЛЗ для кінцевого споживача.

1.3. Характеристика деяких фізико-хімічних методів оцінки якості лікарських засобів

Загальна характеристика. Фізико-хімічні методи є основою для всебічної та об'єктивної оцінки якості ЛЗ на всіх етапах виробничого циклу – від розробки до кінцевого контролю готової продукції. Вони уможливлюють визначати різні параметри, що гарантує ефективність, безпеку та стабільність готового ЛЗ. Одним із ключових аспектів – ідентифікація діючих речовин та допоміжних компонентів ЛЗ, що підтверджує відповідність його складу заявленому виробником [25].

До поширених фізико-хімічних методів належать спектроскопічні методи, зокрема УФ-ВІС спектрофотометрія (використовується для ідентифікації та кількісного аналізу багатьох сполук), інфрачервона (ІЧ) спектроскопія (аналізує структуру молекул та виявляє наявність певних функціональних груп), а також метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (надає детальну інформацію про молекулярну структуру), що є незамінним для ідентифікації нових речовин та

аналізу комплексних домішок. Хроматографічні методи, зокрема рідинна (ВЕРХ, УВЕРХ) та газова (ГХ) хроматографія, є незамінними для розділення складних сумішей, ідентифікації та кількісного визначення як діючих речовин, так і домішок. Мас-спектрометрія (МС), часто у поєднанні з хроматографією (ГХ-МС, РХ-МС), уможливорює точно визначати молекулярну масу компонентів та їхню фрагментацію, що є важливо для структурного аналізу та ідентифікації невідомих сполук. Окрім цього, застосовуються методи титриметрії для кількісного визначення речовин шляхом реакції з відомим реагентом. Електрохімічні методи, такі як потенціометрія та вольтамперометрія, – для вимірювання рН, визначення вмісту іонів та деяких органічних сполук. У виробництві ЛЗ важливим є контроль їх деяких фізичних властивостей: температури плавлення, густини, показника заломлення, оптичної активності. Ці параметри допомагають підтвердити справжність речовини та її відповідність стандартам. Загалом, комплексне застосування фізико-хімічних підходів забезпечує високий рівень надійності та відтворюваності даних, що є запорукою якості та безпеки ЛЗ для споживачів [30].

Рідинна хроматографія (РХ) є важливим фізико-хімічним методом, який застосовується у контролі якості ЛЗ. Він призначений для розділення, ідентифікації та кількісного визначення компонентів складних сумішей, що перебувають у рідких зразках, ґрунтується на різній швидкості міграції компонентів аналізованої суміші між двома фазами [30]. До того ж, РХ є універсальним аналітичним інструментом, завдяки чому знаходить широке застосування: для **якісного та кількісного аналізу** (ідентифікації та визначення концентрації) компонентів у складних сумішах; **очищення речовин** (усунення домішок та підвищення чистоти цільових сполук); **препаративного виділення** (виокремлення індивідуальних компонентів суміші у чистому вигляді для подальших досліджень або їх використання); **контролю якості** (оцінювання якості фармацевтичних препаратів, продуктів харчування, косметики та інших промислових товарів); **аналізу біологічних зразків** (дослідження компонентів

крові, сечі, тканин та інших біологічних об'єктів); *екологічного моніторингу* (аналіз речовин-забруднювачів у водних об'єктах та ґрунтах) [35].

Залежно від принципів до розділення та умов виконання, РХ поділяється на кілька видів: високоефективну РХ (ВЕРХ / HPLC), ультрависокоефективну РХ (УВЕРХ / UHPLC), іонообмінну, гель-проникну (GPC/SEC), афінну [32].

Мембранна фільтрація – це метод, який використовує напівпроникні бар'єри (мембрани) для розділення компонентів рідин або газів на основі їхніх властивостей. Він уможливорює ефективне усунення з рідин та газів баластних частинок, мікроорганізмів, розчинені солі та інші забруднювачі [2]. Процес фільтрації відбувається під тиском: рідина проходить крізь мембрану, яка затримує небажані домішки, забезпечуючи тим самим отримання очищеного продукту – пермеату [36]. Залежно від розміру пор мембрани та типу компонентів, що розділяються, розрізняють кілька видів мембранної фільтрації: мікро-, ультра-, нанофільтрацію і зворотний осмос [45]. Мембранна фільтрація є універсальним інструментом, а тому широко застосовується в різних напрямках: водопідготовці, фармацевтичній, харчовій промисловостях, біотехнологіях, наукових дослідженнях [30].

Отже, фізико-хімічні методи, насамперед РХ є надзвичайно важливим, а іноді незамінним аналітичним інструментом у системі забезпечення якості та безпеки сучасних ЛЗ. Його можливості щодо деталізації складу, контролю чистоти та кількісної оцінки АФІ визначають його ключовим методом, що забезпечує безпеку та ефективність ЛЗ. Поряд з ним, метод мембранної фільтрації є надзвичайно цінним інструментом у багатьох промислових сферах, наукових дослідженнях, екологічних програмах та фармацевтичній промисловості. Його висока ефективність у очищенні, розділенні та концентрації речовин робить цей метод незамінним для досягнення високих стандартів якості та безпеки ЛЗ.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ТА УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

У роботі використовували наступні розчини лікарських засобів (ЛЗ):

1) метронідазол, розчин для інфузій, 0,5 % (по 100 мл препарату в контейнері з полівінілхлориду, закоркований закупорювальним засобом);

2) парацетамол, розчин для інфузій, 1000 мг/100 мл (по 100 мл препарату у флаконі з поліпропілену; по 1 контейнеру в картонній коробці).

Для приготування метронідазолу, розчину для інфузій, 0,5 % використовували наступні АФІ (скорочено: Активні Фармацевтичні Інгредієнти): субстанцію метронідазол (Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co., Ltd, Китай), натрію хлорид (Salinen Austria AG, Австрія), динатрію едетат (трилон Б) (CARLO ERBA Франція), воду для ін'єкцій.

Для приготування парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл використовували наступні АФІ: парацетамол (Anqiu Lu'an Pharmaceutical Co., Ltd., China), динатрію фосфат дигідрат (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Німеччина), маніт (Roquette Freres, France), воду для ін'єкцій.

Воду для ін'єкцій одержують методом дистиляції демінералізованої води на установці FINN-AQUA. Вода для ін'єкцій відповідає вимогам ДФУ – Монографія. Вода для ін'єкцій (ДФУ 8 вид, 2025) а також СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2024 [4].

Воду демінералізовану отримують з питної води на устаткуванні фірми ELGA методом іонного обміну. Смоли регенерують: катіоніт – 32 % розчином соляної кислоти, аніоніт – 32 % розчином натрію гідроксиду. Вода очищена відповідає вимогам ДФУ – Монографія. Вода очищена (ДФУ 8 вид, 2025).

Питну воду підприємство отримує з централізованої міської мережі водопостачання, яка відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості [4] та ДСанПІН 2.2.4-171-10 Гігієнічні вимоги до води питної призначеної для споживання людиною [4]. Питну воду з міського водопроводу фільтрують через систему фільтрів і подають у проміжний бак, з

якого подають на іонообмінні колони і накопичувальний бак для зберігання демінералізованої води.

Питну воду попередньо очищають на таких фільтрах: методом осадження на гравійно-піщаному фільтрі; фільтр 25 мкм, корпус нержавіюча сталь; фільтр з активованим вугіллям 20 мкм; фільтр 10 мкм.

2.2. Характеристика умов проведення дослідження

Усі дослідження здійснювались у фізико-хімічній та бактеріологічній лабораторіях відділу контролю якості фармацевтичного заводу ДП Фарматрейд (м. Дрогобич). Підприємство спеціалізується на виробництві та реалізації ЛЗ та працює згідно з міжнародними стандартами GMP (Good Manufacturing Practice), що гарантує високий рівень контролю якості на всіх етапах виробництва [23].

Класифікація чистих приміщень за класами чистоти визначена відповідно до вимог технологічного процесу і відповідають вимогам EUGMP [24]. Клас чистоти визначає передбачену чистоту повітря у виробничих приміщеннях. Для кожного класу чистоти задано допустиме забруднення повітря мікроорганізмами та кількістю частинок у повітрі, кратність повітрообміну за годину та надлишковий тиск. Для підтримки тиску в чистих приміщеннях встановлена система автоматичного регулювання надлишкового тиску в межах заданих значень. На підприємстві передбачено централізоване водяне опалення, припливно-витяжна вентиляція та автономне кондиціювання. Підготовка повітря спроектована у комплексі із системами кондиціювання та вентиляції. Для забезпечення чистоти повітря та мікроклімату в чистих приміщеннях використовуються комплексні системи очистки та кондиціювання провідних європейських виробників: WOLF (Німеччина) – для підготовки повітря у виробничих приміщеннях), ZIEHLABEGG (Німеччина) – у чистих приміщеннях та GEA (Німеччина) – для підготовки повітря на пральні одягу для чистих приміщень. Підприємство має кілька ключових підрозділів, які забезпечують повний цикл виробництва (див. Додаток Б).

2.3. Приготування інфузійних розчинів лікарських засобів

I. Приготування ЛЗ – метронідазолу, розчину для інфузій 0,5 % здійснювалось наступним чином:

I етап (*підготовка сировини й матеріалів*) – здійснюється оцінка якості промивних вод за показниками рН і електропровідності. Ці показники повинні відповідати показникам води для ін'єкцій;

II етап (*приготування розчину, його фільтрування*) – усі маніпуляції виконуються у приміщенні класу С, оскільки мікробне забруднення спричиняє особливий ризик для продукції. На реакторі встановлюють за допомогою датчика рівень необхідного об'єму (половина від заданого), заповнюють його водою для ін'єкцій (50-55 °С), далі завантажують субстанції: метронідазолу, натрію хлориду, динатрію едетату, вмикають мішалку і перемішують (66 об/хв) не менше 20 хв до повного розчинення субстанцій. Доводять водою для ін'єкцій об'єм розчину до заданого. Вмикають насос та гомогенізацію з одночасним фільтруванням розчину.

Після регламентного часу відбирають пробу для контролю якості за такими показниками: опис, прозорість, кольоровість, значення рН, кількісне визначення метронідазолу спектрофотометричним методом, кількісне визначення натрію хлориду титриметричним методом.

III етап (*наповнення контейнерів розчином і закупорювання*) – здійснюється на машинах для наповнення з ламінаром. При наповненні розчин постійно циркулює по кільцю наповнення через фільтри. На стадіях фільтрації розчину й наповнення контейнерів розчином здійснюють контроль критичних точок, пов'язаних із фільтраційною установкою і наповненими контейнерами, за такими показниками: герметичність фільтраційної установки й цілісність фільтрів до і після фільтрації, тиск і тривалість фільтрації, об'єм наповнення контейнерів, контроль герметизації контейнерів, мікробіологічна чистота (мікробіологічне навантаження) розчину в контейнерах, термін зберігання закупорених контейнерів, кількість наповнених контейнерів. Показник (об'єм, що витягається) періодично контролюють згідно з розробленою стандартною операційною процедурою. Об'єм наповнення контейнерів повинен на 2,5 % перевищувати

номінальний об'єм контейнера. контролюють Мікробіологічне навантаження розчину в контейнерах через те, що воно пов'язане з вмістом бактеріальних ендотоксинів після стерилізації.

IV етап (*стерилізація розчину в контейнерах*). Наповнені контейнери стерилізують в автоклаві насиченою парою при: температурі 121°C (ДФУ, 5.1.1); тиску $2,0\text{ кг}\cdot\text{с}/\text{см}^2$; час 18 хв. Процес стерилізації контролюють за такими технологічними параметрами: час нагрівання автоклава до температури стерилізації, тиск водяної пари, температура й тривалість стерилізації, час охолодження автоклава. Після закінчення процесу стерилізації, транспортні візки вивантажують з автоклава і залишають для остигання контейнерів.

Зразки простерилізованого напівпродукту відбирали для контролю за такими показниками: ідентифікація метронідазолу, прозорість, кольоровість, механічні включення (невидимі й видимі частинки), значення рН, наявність супровідних домішок, об'єм що витягається, стерильність, бактеріальні ендотоксини, кількісний вміст метронідазолу та натрію хлориду.

V етап (*візуальний контроль*) – простерилізовані наповнені контейнери піддаються 100 % візуальному контролю та контролю на герметичність. Контейнери з розчином аналізують на наявність видимих механічних включень, видимих неозброєним оком на матовому чорно-білому екрані під затемненим джерелом денного світла. Контейнери з розчином, у яких виявлені механічні включення: видимі частинки, з порушеною герметичністю тощо, відбраковують, складають в окрему тару і передають для подальшої утилізації.

VI етап (*пакування контейнерів з розчином*). Переглянуті контейнери поміщають у вторинне пакування – гофроящик (двошарову плівку з поліетилен/поліаміду чи поліетиленову термозбіжну плівку). У кожен ящик вкладають пакувальний лист, а зверху наклеюють промарковану самоклеючу етикетку. Укомплектовані гофроящики передають на склад готової продукції, де вони на час контролю перебувають у статусі "КАРАНТИН" і маркуються етикеткою з смужкою жовтого кольору, а після отримання сертифікату якості з відміткою "Дозволено до реалізації" – етикеткою зі смужкою зеленого кольору.

II. Приготування ЛЗ – парацетамолу, розчину для інфузій, 1000 мг/100 мл здійснювали наступним чином:

I етап (*підготовка сировини й матеріалів*) проводять якість промивних вод за показниками рН і електропровідність. Ці показники повинні відповідати показникам води для ін'єкцій.

II етап (*приготування розчину, його фільтрування*) усі маніпуляції виконують у приміщенні класу D. Заповнюють реактор водою (50-55 °С) для ін'єкцій, а після – завантажують субстанції: парацетамолу, динатрію фосфат дигідрат, маніт, вмикають мішалку і перемішують (66 об/хв) не менше 30 хв до повного розчинення субстанцій. Доводять об'єм розчину до заданого водою для ін'єкцій. Гомогенізацію з одночасним фільтруванням розчину. Після регламентного часу відбирають пробу для міжопераційного контролю якості за такими показниками: опис, прозорість, ідентифікація, ступінь забарвлення, значення рН, кількісне визначення парацетамолу).

III етап (*видування, наповнення і герметизація флаконів з розчином*) відбуваються автоматично в одному циклі в спеціальній машині, оснащений бункром, екструдером, пресс-формою. Матеріалом для виготовлення флаконів слугує поліпропілен. Наповнені і загерметизовані флакони транспортуються для нанесення номеру серії принтером машини для маркування.

На стадіях фільтрації розчину й наповнення флаконів розчином здійснюють контроль критичних точок, пов'язаних із фільтраційною установкою і наповненими флаконами, за такими показниками: герметичність фільтраційної установки й цілісність фільтрів до і після фільтрації, тиск і тривалість фільтрації, об'єм наповненості флаконів, контроль герметизації флаконів, мікробіологічна чистота (мікробіологічне навантаження), термін зберігання закупорених флаконів, кількість наповнених флаконів.

IV етап (*стерилізація розчину в флаконах*). Наповнені флакони стерилізують в автоклаві насиченою парою при температурі 121° С (ДФУ, 5.1.1); тиску 2,0 кгс/см²; час 18 хв. Процес стерилізації контролюють за такими технологічними параметрами: час нагрівання автоклава до температури стерилізації, тиск водяної пари, температура й тривалість стерилізації, час охолодження автоклава. Зразки

простерилізованого напівпродукту відбирають для контролю за такими показниками: ідентифікація, прозорість, ступінь забарвлення, значення рН, об'єм, що витягається, механічні включення (невидимі й видимі частинки), супровідні домішки, кількісне визначення парацетамолу, стерильність, бактеріальні ендотоксини.

V етап (*візуальний контроль*) простерилізовані наповнені флакони піддаються 100 % візуальному контролю та контролю на герметичність.

VI етап (*пакування флаконів з розчином*). Переглянуті простерилізовані й наповнені флакони поміщають у вторинне пакування – гофроящик (двошарову плівку з поліетилен/поліаміду або поліетиленову термозбіжну плівку). В кожен гофроящик вкладають пакувальний лист, а зверху наклеюють промарковану самоклеючу етикетку. Укомплектовані гофроящики передають на склад готової продукції. На час контролю запакована серія перебуває в статусі (КАРАНТИН) і маркується етикеткою з смужкою жовтого кольору, а після отримання сертифікату якості з відміткою (Дозволено до реалізації), маркується етикеткою зі смужкою зеленого кольору.

2.4. Визначення прозорості, кольоровості та водневого показника лікарських засобів

Визначення прозорості розчинів ЛЗ здійснювали шляхом порівняння досліджуваної рідини з водою *P* (вода для ін'єкцій). Порівняння рідин проводять у однакових пробірках за товщиною (≈ 40 мм) та діаметром (від 15 мм до 25 мм) з прозорого нейтрального скла, переглядаючи зразки у розсіяному денному світлі уздовж вертикальної осі на чорному фоні.

Придатність системи. Розсіювання світла має бути таким, щоб еталон І легко відрізнявся від води *P*, а еталон II – легко відрізнявся від еталона I. Випробовуваний зразок ЛЗ вважають прозорим, якщо він витримує порівняння з водою *P*.

Визначення кольоровості розчинів ЛЗ здійснювали шляхом візуального порівняння досліджуваного розчину ЛЗ з відповідним еталонним розчином, використовуючи однакові пробірки з безбарвного скла з плоским дном та

внутрішнім діаметром 15-25 мм. Порівняння забарвлення рідин (висотою 40 мм) проводили у розсіяному денному світлі, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на білому фоні. Забарвлення випробовуваного розчину не має бути інтенсивнішим за еталон.

Визначення водневого показника інфузійного розчину ЛЗ здійснювали до та після стерилізації потенціометричним методом на рН-метрі STARTER 3100 при температурі (20 – 25)°С відповідно до вимог ДФУ 2.2.3. Для калібрування рН-метра використовували три буферні розчини (рН 4,00, 6,86 та 9,18).

Отримані значення порівнювали з вимогами ДФУ: для метронідазолу, розчину для інфузій 0,5 % (рН має бути у межах 4,5 – 6,0; для парацетамолу, розчину для інфузій – рН у межах 4,5 – 6,5).

2.5. Контроль наявності механічних включень

Контроль наявності механічних включень – **видимих частинок** у інфузійних розчинах ЛЗ здійснювали за допомогою спеціального приладу, облаштований чорним екраном, чорним і білим матовими екранами потрібних розмірів, плафоном, споряджений належним закритим джерелом денного світла з належним розсіювачем світла (зокрема, освітлювальний пристрій, що складається з двох флуоресцентних ламп, кожна по 13 Вт і завдовжки 525 мм, або відповідне світлодіодне (LED) джерело світла). Інтенсивність освітлення у точці контролю має бути від 2000 до 3750 люкс відповідно до вимог ДФУ 2.9.20 [2]. Обережно збовтували обертальними рухами, або перевертали контейнер/флакон, уникаючи утворення повітряних бульбашок, і переглядали без збільшення приблизно 5 сек перед білим екраном. Повторювали перевірку перед чорним екраном. Відмічають наявність будь-яких частинок. Згідно вимог, вони мають бути відсутні.

Контроль наявності механічних включень – **невидимих частинок** у інфузійних розчинах ЛЗ здійснювали за допомогою лічильника частинок APSS-2000 з програмним забезпеченням Particle Measuring Systems відповідно до вимог ДФУ 2.9.19. **Хід.** Вміст контейнера/флакону ретельно перемішували повільно та безперервно перевертаючи його 20 разів. Зовнішню поверхню контейнера/флакону очищали струменем води, обережно розкривали, уникаючи

потрапляння будь-якого забруднення, відстоювали 2 хв. Відбирали 4 проби об'ємом по 5 мл кожна та визначали кількість частинок із розмірами, що дорівнюють або перевищують 10 мкм і 25 мкм. Виключають результат, одержаний для першої проби, і на основі трьох наступних вимірювань визначали середню кількість частинок у випробовуваному зразку ЛЗ [2].

2.6. Визначення об'єму що витягується.

Визначення об'єму ЛЗ, що витягується із контейнера/флакона здійснювали наступним чином: вміст контейнера/флакона охолоджували до 20-25 °С. Відбирали перший та останній контейнер/флакон при наповненні, а також один довільно вибраний із стерилізованим розчином. Вміст контейнерів/флаконів переносили у сухий мірний циліндр (не менше як 40 % від номінального об'єму циліндра). Реєстрували об'єм розчину [2].

2.7. Кількісне визначення метронідазолу спектрофотометричним методом

Ідентифікацію та кількісний вміст діючої речовини, а також наявність домішок у ЛЗ здійснювали на спектрофотометрі (СФ) SPECORD 200 PLUS.

Хід аналізу: 10,0 мл ЛЗ поміщали у мірну колбу І місткістю 100 мл та доводили об'єм розчину до мітки 0,1 М хлоридною кислотою, перемішували. Із отриманого розчину ЛЗ відбирали 10,0 мл і переносили у 250 мл мірну колбу, доводили об'єм розчину до мітки і перемішували (випробовуваний розчин).

Вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину на СФ-метрі за $\lambda=277\pm 2$ нм у кюветі ($l=10$ мм), використовуючи 0,1 М розчин хлоридної кислоти як розчин порівняння.

Вміст метронідазолу (X, г/мл), обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 250 \cdot 10}{A_0 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 250} = \frac{A_1 \cdot m_0}{A_0 \cdot 10}, \text{ де}$$

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину РСЗ метронідазолу;

m_0 – маса наважки РСЗ метронідазолу, г.

Вміст метронідазолу у ЛЗ має бути: при випуску не менше 0,00475 г/мл і не більше 0,00525 г/мл. Упродовж терміну зберігання – не менше 0,0045 г/мл і не більше 0,0055 г/мл.

2.8. Визначення супровідних домішок методом вискоєфективної рідинної хроматографії

Наявність супровідних домішок у субстанціях і ЛЗ (після стерилізації) здійснювали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за допомогою приладу Vanquish Core. Система ВЕРХ складається з системи подачі рухомої фази, блока вводу проби, хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза подається під тиском із однієї або кількох посудин і проходить через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор із заданою швидкістю. Сигнал від детектора перетворюється, підсилюється і реєструється у вигляді хроматограми. Для введення проби використовують петлеві дозатори, спеціальні мікрошприци або систему автоматичного пробовідбору. Підготовку рідинного хроматографа до роботи здійснювали як описано в інструкції до приладу.

Хроматографічний аналіз зразків: відбирали необхідну аліквоту випробовуваного розчину ЛЗ та вносили її у комірку хроматографа. Аналіз зразків розчинів ЛЗ здійснювали у 5-ти повторностях. Фіксацію та облік даних аналізу здійснювали за використання програмного забезпечення Chromeleon, що забезпечує додаткову відповідність нормативним вимогам, встановленим на комп'ютері. Результати аналізу статистично опрацьовували та візуалізували у вигляді хроматограми та відповідних таблиць.

Аналіз наявності супровідних домішок парацетамолу розчину для інфузій. Умови хроматографування: колонка: розмір: 0,5м×4,6мм; нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октадецилсилільний Р 1 (5 мкм); температура: 25⁰ С або аналогічна, яка витримує тест на придатність хроматографічної системи; швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв; детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 272 нм; інжекції: 20 мкл; розчин порівняння (а), розчин порівняння (в), розчин порівняння (с), випробовуваний

розчин, рухома фаза; *час хроматографування*: час хроматографування має бути в 12 разів більшим за час виходу піку парацетамолу.

Придатність хроматографічної системи визначали за використання розчину порівняння (*c*): ступінь розділення: не менше 4,0 між піками 4-амінофенолу і парацетамолу.

1) Обчислювали вміст 4-амінофенолу (%) за формулою:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times 1 \times 50 \times P \times 100}{S_0 \times 25 \times 50 \times 100 \times a \times 100}, \text{ де}$$

S_1 – середнє значення площ піків 4-амінофенолу, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків 4-амінофенолу, обчислене з хроматограм розчину порівняння (*a*);

m_0 – маса наважки робочого стандартного зразка 4-амінофенолу, мг;

a – заявлена кількість парацетамолу препараті, мг/мл;

P – вміст 4-амінофенолу в стандартному зразку 4-амінофенолу, %.

2) Обчислювали вміст будь-якої іншої домішки у % за формулою:

$$X = \frac{S_1}{S_0} \times 0.2\%, \text{ де}$$

S_1 – середнє значення площ піків будь-якої іншої домішки, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене з хроматограм розчину порівняння (*b*).

Критерії прийнятності: 4-амінофенол – не більше 0,05%; будь-яка інша домішка – не більше 0,2%; сума домішок – не більше 2,0%.

Аналіз наявності супровідних домішок субстанції парацетамолу.

Умови хроматографування: колонка: розмір: 0,15м×4,6мм; *нерухома фаза*: силікагель для хроматографії октадецилсилільний, із твердим ядром (5мкм); *температура*: 30⁰ С; *швидкість рухомої фази*: 1,5 мл/хв; *детектування*: спектрофотометрично за $\lambda=254$ нм; *інжекції*: 50 мкл; випробовуваний розчин і розчини порівняння (*a*), (*b*), (*d*) і (*e*); *ідентифікація домішок*: використовують

хроматограму, отриману для розчину порівняння (b) для ідентифікації піку домішки J; використовують хроматограму, отриману для розчину порівняння (d) для ідентифікації піку домішки K. *Відносні утримування до парацетамолу* (час утримування = близько 4 хвилини): домішки K = близько 0,4; домішки J = близько 10,1.

Придатність хроматографічної системи визначали за використання розчину порівняння (e): ступінь розділення: не менше 5,0 між піками домішки K і парацетамолу.

Обчислення вмісту: для домішки J використовують концентрацію домішки J в розчині порівняння (b); для домішки K використовують концентрацію домішки K в розчині порівняння (d); для будь-якої іншої домішки використовують концентрацію парацетамолу в розчині порівняння (a). *Поріг інформування:* 0,03%, за винятком домішок J і K.

Аналіз наявності супровідних домішок метронідазолу розчину для інфузій. *Умови хроматографування:* колонка: розмір: 150×3,9мм; рухома фаза: суміш 0,01М розчин калію дигідрофосфору та спирту метиловий (7:3); температура: 25⁰ С; швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв; детектування: спектрофотометрично за $\lambda=315$ нм; інжекції: 10 мкл; час хроматографування: має бути в 3 рази більше часу утримування метронідазолу (≈ 16 хв).

Придатність хроматографічної системи згідно з інструкцією, використовуючи стандартний зразок (СЗ) 2-метил-5-нітроімідазол, який наносили на колонку об'ємом 10 мкл та попеременно хроматографували, отримуючи не менше 5 хроматограм. На хроматограмі випробовуваного розчину площа додаткового піку, що відповідає 2-метил-5-нітроімідазолу, не має перевищувати площі основного піку на хроматограмі розчину Б СЗ 2-метил-5-нітроімідазолу (не більше 0,5%). Площа будь-якого іншого додаткового піку не має перевищувати 1/5 площі основного піку на хроматограмі розчину Б СЗ 2-метил-5-нітроімідазолу (не більше 0,1%) [14].

Аналіз наявності супровідних домішок субстанції метронідазолу. *Умови хроматографування:* колонка: розмір: 0,25м×4,6мм; нерухома фаза: силікагель

для хроматографії, октадецилсилільний Р (5 мкм); *швидкість рухомої фази*: 1,0 мл/хв; *детектування*: спектрофотометрично за довжини хвилі 315 нм; *інжекції*: 10 мкл; *рухома фаза*: метанол Р: розчин 1.36 г/л калію дигідрофосфату Р (30:70); *час хроматографування*: має бути в 3 рази більше часу утримування метронідазолу. Відносне утримування до метронідазолу (*час утримування метронідазолу близько 7 хв*): домішки А – близько 0,7.

Придатність хроматографічної системи визначали шляхом нанесення на колонку 10 мкл випробовуваного розчину, 10 мкл розчину порівняння (а) і 10 мкл розчину порівняння (b), їх поперемінно хроматографували отримуючи не менше 2 хроматограм. Розчин порівняння (b): *ступінь розділення*: не менше 2,0 між піками метронідазолу та домішки А.

Критерії прийнятності: будь-яка домішка: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,1%); сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,2%); не враховують: домішки, площа піків яких менше 0,1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0,01%) [14].

2.9. Кількісне визначення парацетамолу методом викоефективної рідинної хроматографії

Умови хроматографування: колонка: розмір: 0.25м×4.6мм; нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октадецилсилільний Р 1 (5 мкм); температура: 25° С; *швидкість рухомої фази*: 1,5 мл/хв; *детектування*: спектрофотометрично за $\lambda=243$ нм; *інжекції*: 20 мкл; розчин порівняння, випробовуваний розчин; *час хроматографування*: має бути в 12 разів більшим за час виходу піку парацетамолу.

Придатність хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною, якщо для хроматограм розчину порівняння виконуються наступні умови: коефіцієнт симетрії розрахований для піку парацетамолу має бути не більше 2,0; ефективність колонки розрахована за піком парацетамолу має складати не менше 2000 теоретичних тарілок; відносне стандартне відхилення

(RSD) розраховане за площею піків парацетамолу для п'яти послідовних інжекцій має бути не більше 2%.

Вколюють поперемінно по 20 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Вміст парацетамолу (мг в 100 мл розчину), обчислювали за формулою:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times 2 \times 100 \times 50 \times P \times 100}{S_0 \times 100 \times 50 \times 5 \times 2 \times 100}, \text{ де}$$

S_1 – середня площа піків парацетамолу на хроматограмах випробовуваного розчину;

S_0 – середня площа піків парацетамолу на хроматограмах розчину порівняння;

m_0 – маса наважки робочого стандартного зразка парацетамолу взятого для приготування розчину порівняння, мг;

P – вміст парацетамолу в робочому стандартному зразку парацетамолу, %.

Вміст парацетамолу ($Y, \%$) обчислюють за формулою:

$$Y = \frac{X \times 100}{LC}, \text{ де}$$

X – вміст парацетамолу в 100 мл препарату, мг;

LC – вміст парацетамолу, зазначений в рецептурі, мг/100 мл.

2.10. Аналіз стерильності лікарських засобів

Приготування тіогліколевого живильного середовища (Тіо ЖС, англ. *Fluid Thioglycollate Medium*). Тіо ЖС (Liofilchem, Італія) готували згідно з інструкцією виробника: зважували 9,8 г сухого середовища, додавали 1 л очищеної води; ретельно перемішуючи при нагріванні, кип'ятили 1 хв до повного розчинення. Отримане середовище охолодили, розлили у флакони (об'ємом 100 мл) через фільтрувальний папір, закрили гумовими корками та алюмінієвими ковпачками, промаркували (на етикетці зазначили назву середовища, дату та номер серії приготування).

Стерилізацію Тіо ЖС здійснювали у автоклаві Lequeux AUV 60/80 при режимі: тиск пари: $0,11 \pm 0,02$ МПа; $(1,1 \pm 0,2)$ кг·с/см² (бар); температура: 120 ± 1 °С; час: 15 ± 1 хв. Після автоклавування контролювали наступні показники

середовища: колірність та прозорість; рН; стерильність; ростові властивості. Вимірювання рН середовища (охолоджене до 25 °С) проводили потенціометричним методом за допомогою рН-метра РНТ 004ТА з використанням скляного електроду. Прозорість і кольоровість готового Тіо ЖС, визначали візуально в прохідному світлі.

Стерильність готового Тіо ЖС оцінювали візуально, переглядом 3–5 % флаконів із кожної партії після їх інкубації в термостаті при температурі 30 – 35 °С упродовж 14 діб. Середовище вважається придатним для використання за відсутності на ньому росту мікроорганізмів. Контроль ростових властивостей Тіо ЖС здійснювали згідно з вимогами ДФУ 2.0 (розділ "Ростові властивості"), у якому рекомендується використання штамів певних тест-мікроорганізмів [2].

Приготування Триптон-соєвого бульйону (ТСБ, англ. Tryptone Soya Broth.). ТСБ ЖС (Liofilchem, Італія) готували згідно з інструкцією виробника. Зокрема, зважували 30,0 г сухого середовища, поступово до нього додавали 1 л очищеної води, уникаючи утворення грудок. Усі наступні етапи приготування, автоклавування та аналізу були аналогічними як при підготовці Тіо ЖС (див. вище). Прозорість і кольоровість ТСБ визначали візуально у прохідному світлі, стерильність оцінювали візуально, переглядом 3–5 % флаконів із кожної партії після їх інкубації в термостаті при температурі 20 – 25 °С упродовж 14 діб. Контроль ростових властивостей ТСБ здійснювали згідно з вимогами ДФУ 2.0 (розділ Ростові властивості), у якому рекомендується використання певних штамів наступних тест-мікроорганізмів [14].

Якщо Тіо ЖС та ТСБ відповідали вимогам за ростовими, інгібіторними, індикативними властивостями та витримували випробування на стерильність відповідно до вимог ДФУ 1.4, їх використовували для подальших досліджень.

Випробування ЛЗ на стерильність проводили в потоці ламінарного повітря класу А, яке розташоване в приміщенні класу В. Підготовка повітря забезпечується за допомогою НЕРА-фільтрів з контролюванням перепаду тиску. Аналіз на стерильність готових розчинів ЛЗ для інфузій після стерилізації здійснювали у бактеріологічній лабораторії відділу контролю якості методом мембранної фільтрації у поєднанні з посівом на диференційно-діагностичні

середовища. Проведення випробування на стерильність ЛЗ здійснювали з використанням одноразових систем закритого типу Steritailin (номер за каталогом В–KSF220) згідно відповідної методики (Додаток В).

2.11. Аналіз лікарських засобів на вміст бактеріальних ендотоксинів

Відповідно до вимог ДФУ (розділ 2.6.14. Бактеріальні ендотоксини, існує шість основних методів: метод А – гель-тромб метод (граничне випробування); метод В – гель-тромб метод (кількісне випробування); метод С – турбідиметричний кінетичний метод; метод D – хромогенний кінетичний метод; метод Е – хромогенний метод кінцевої точки; метод F – турбідиметричний метод кінцевої точки [2]. Визначення рівня бактеріальних ендотоксинів у ЛЗ проводили гель-тромб методом (метод А) – граничне випробування *in vitro*, який є найбільш поширеним та економічно доцільним [34]. Для проведення дослідження використовували набори реактивів: лізат амебоцитів Pyrotell (заявлена чутливість 0,03 МО/мл; Associates of Cape Cod Incorporated, U.S.A.), лізат амебоцитів Pyrostar (заявлена чутливість 0,125 МО/мл; Fujifilm Wako Chemicals, U.S.A.), вода для БЕТ (Associates of Cape Cod Incorporated), стандартний препарат ендотоксину (СПЕ) *E. coli* 0113:H10 (Associates of Cape Cod Incorporated, U.S.A.).

Для розведення реактивів використовували апірогенні одноразові наконечники для дозаторів змінного об'єму (ISOLAB 100 – 1000, ISOLAB 20 – 200) та апірогенні пробірки, для їх розчинення – струшувач Вортекс MSV-3500. Інкубували реакційну суміш у водяній бані ВМР-30 при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 60 ± 2 хв.

Отримання основного розчину стандарту препарату ендотоксину (СПЕ) з концентрацією 1000 МО/мл здійснювали згідно з інструкцією: у флакон з ліофілізованим препаратом внесли розріджувач – води для БЕТ, суміш ретельно перемішувати 30-60 хв. СПЕ зберігали при 2 – 8 °С, придатність – 4 тижні. Готували СПЕ з концентрацією 0,125 МО/мл та 0,5 МО/мл користувались відповідною таблицею (Додаток Г).

Приготування робочого розчину лізату амебоцитів здійснювали згідно з інструкцією: у флакон з ліофілізованим реактивом внесли розріджувач – води для БЕТ, акуратно перемішали (придатний 24 год при 2 – 8 °С). Обчислювали

граничну концентрацію ендотоксинів (ГКЕ) відповідно до вимог ДФУ/ЕР п. 2.6.14 за формулою:

$$\text{Граничний вміст ендотоксину} = \frac{K}{M}, \text{ де}$$

K – максимально допустима доза ендотоксину в міжнародних одиницях (МО) на 1 кілограм маси тіла за годину при парентеральному введенні становить 5,0 МО/кг за годину;

M – максимальна рекомендована доза ЛЗ в міліграмах на кілограм маси тіла за годину.

Визначення максимально допустимого розведення (МДР). МДР є максимально можливим розведенням зразка, при якому може бути визначений граничний вміст ендотоксинів.

Обчислювали МДР випробовуваного зразка метронідазолу розчину для інфузій за формулою:

$$MДР = \frac{\text{граничний вміст ендотоксинів}}{\lambda(\text{чутливість лізату})}, \text{ де}$$

граничний вміст ендотоксину : 0,35 МО/мл;

чутливість лізату (ЛАЛ- реактиву): 0,03125 МО/мл.

Обчислювали МДР випробовуваного зразка парацетамолу за формулою:

$$MДР = \frac{\text{граничний вміст ендотоксинів} \times \text{концентрація зразка}}{\lambda(\text{чутливість лізату})}, \text{ де}$$

граничний вміст ендотоксину : 2,0 МО/мг; концентрація випробовуваного розчину: 10 мг/мл; чутливість ЛАЛ- реактиву: 0,125 МО/мл.

Хід аналізу. Помістили у штатив 8 пробірок для гель-тромб реакції. Внесли в пробірки воду для БЕТ, аліквоти досліджуваної проби, розведений СПЕ. Додали 100 мкл розчину лізату в кожную пробірку, обережно перемішали та помістили їх у водяну баню ($37 \pm 1^\circ\text{C}$), інкубували упродовж 60 ± 2 хв. Відбирали кожную пробірку по чергово, акуратно перемішували, оцінювали. Результати реєструвати як позитивні (+) або негативні (-). Позитивним результатом вважається утворення

стійкого гелю, негативним – відсутність гелю. Випробування вважається придатним, якщо обидві повторності проб розчину В та С дали позитивний результат та обидві повторності проб розчину D дали негативний результат.

Випробуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо для обох повторностей проб досліджуваній розчин мав негативний результат. Якщо для однієї з повторностей проб розчину А отримано позитивний результат, а для другої – негативний, випробування повторювали. Випробуваний зразок відповідає вимогам випробування, якщо під час проведення повторного випробування для обох повторностей проб розчину А отримано негативний результат. Якщо позитивний результат отриманий для однієї для обох повторностей проб розчину А, то випробування зразок не відповідає вимогам випробування. Позитивним є результат: коли є не більше 0,35 МО/мл.

2.12. Статистичний аналіз даних

Досліди проводились у багатократних повторностях. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне (M), стандартну похибку середнього (m), дисперсію (σ), достовірність (p). Дані виражені як середнє $\pm$ стандартна помилка середнього значення. Відносне стандартне відхилення (RSD – Relative Standard Deviation, %) обчислювали за допомогою табличного процесора MS EXCEL. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Statistica та Microsoft Office Excel. Статистична значущість вказана при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження якості лікарських засобів фізико-хімічними методами

Особливо важливе значення у виробничому циклі ЛЗ має кількісне визначення вмісту фармакологічно активних інгредієнтів (АФІ), що забезпечують його необхідний терапевтичний ефект та визначають його дозування [9]. З цією метою проводиться контроль якості ЛЗ шляхом виявлення та кількісного оцінювання домішок, продуктів розпаду та інших небажаних сполук, що є критично-важливим для запобігання токсичної дії, або зниження ефективності лікувального компонента [14]. Одним із важливих аналітичних інструментів, який використовується для контролю якості фармацевтичних продуктів є метод ВЕРХ. Цей метод уможливорює якісний та кількісний аналіз окремих компонентів у складних сумішах, забезпечуючи високу чутливість й роздільну здатність. Завдяки своїй універсальності, ВЕРХ є золотим стандартом для оцінки чистоти активних фармацевтичних інгредієнтів, контролю стабільності ЛЗ та моніторингу наявності домішок чи продуктів розкладу. Як наслідок, він є незамінним інструментом на усіх етапах виробничого циклу фармацевтичного продукту, від його розробки до серійного виробництва та контролю якості [25].

Дослідження якості субстанції метронідазолу на наявність супровідних домішок методом ВЕРХ. Субстанція метронідазолу була оцінена на придатність і відповідність вимогам методом ВЕРХ (англ. HPLC – High Performance Liquid Chromatography) як описано [2, п. 2.9]. Хроматограми, отримані методом ВЕРХ, для розчинів досліджуваної субстанції та їх інфузійних розчинів дають змогу здійснити контроль присутності супутніх домішок, на підставі чого можна оцінити їх придатність до застосування. На отриманих хроматограмах (рис. 1, 2) відображено залежність сигналу детектора (вісь ординат) від часу хроматографування (вісь абсис), який відлічується від моменту введення (інжекції) проби в хроматограф (рис.1). Спектрофотометричний (СФ) детектор,

який часто використовують у рідинній хроматографії, - це спектрофотометр з протічною кюветою. Його називають абсорбційним детектором, а при використанні в ділянці УФО (200-400 нм) його називають УФ-детектор. Сигнал СФ-детектора виражається у міліодинаціях абсорбції, mAU (англ. milliAbsorbance Units). Величина абсорбції показує наскільки інтенсивно речовина поглинає електромагнітне випромінювання певної довжини хвилі. Величина абсорбції (поглинання випромінювання) залежить від концентрації речовини в пробі, що використовується в кількісному фотометричному аналізі згідно прямолінійного закону Бугера-Ламберта-Бера – $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ (ϵ – молярний коефіцієнт поглинання, л/(моль·см); l – товщина поглинаючого шару, см; C – концентрація речовини в розчині, моль/л). При постійній довжині оптичного шляху та за певних сталих температури і довжини хвилі при використанні однакового розчинника для референтних зразків і досліджуваних проб залежність між поглинанням випромінювання речовиною та концентрацією речовини ϵ : $A = k \cdot C$ [32].

У хроматографії для кількісного аналізу використовують залежність площі, або, рідше висоти хроматографічного піка від концентрації речовини в пробі. Площа хроматографічного піка – це площа обмежена контуром піка та продовженням базової лінії під контуром піка. Базова лінія – це сигнал детектора при протіканні через детектор мобільної фази. Одиниці вимірювання площі при використанні СФ-детектора – це добуток одиниць вимірювання абсорбції на одиниці вимірювання часу (хв., англ. min) хроматографування (mAU·min). Як бачимо (рис. 1), хроматограма показує добре розділення компонентів розчину субстанції метронідазолу та демонструє наявність у її складі супутніх домішок, що виявляються у вигляді шести піків – домішки – це піки 1-5 та 7, а пік 6 – це пік основної речовини – метронідазолу. Придатність хроматографічної системи для розділення також перевіряється за розчином, що містить метронідазол та домішку 2-метил-5-нітроімідазолу (домішка А) в приблизно однакових концентраціях по 0,0005 мг/мл = 0,5мкг/мл. Хроматографічна система вважається придатною для

розділення цих двох речовин, якщо ступінь розділення між піками метронідазолу та домішки А буде не меншим ніж 2,0. Ступінь розділення між піками метронідазолу та домішки А, який був обчислений за хроматограмою цього розчину (рис.2), складав 4,2 хв.

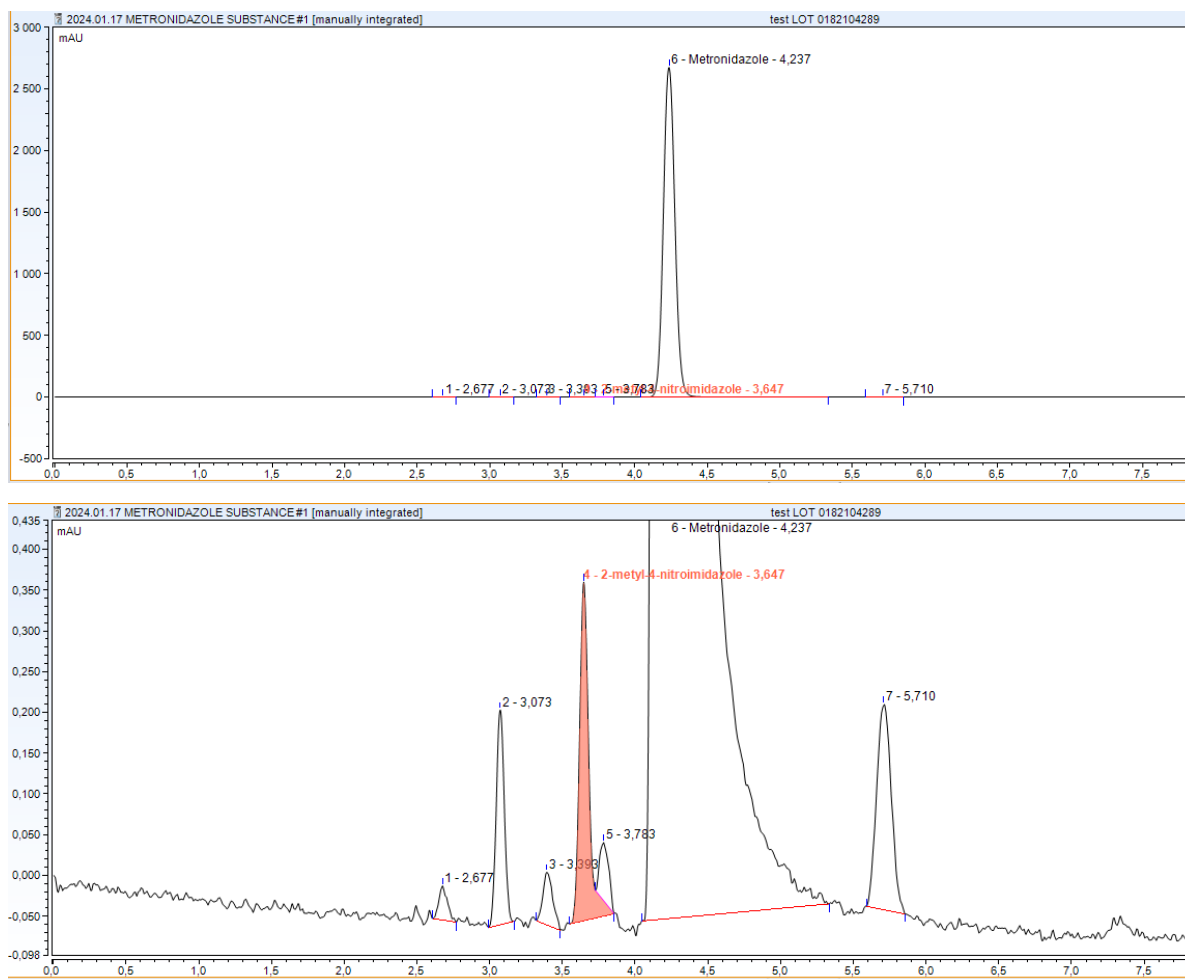


Рис. 1. Хроматограми розчину субстанції метронідазолу у мобільній фазі (концентрація розчину 0,5 мг/мл = 500 мкг/мл): а – у повному вигляді; б – у розгорнутому вигляді (з деталізацією піків домішок).

Площа піку метронідазолу складає приблизно 245 mAU·min і цей пік має час утримування біля 4,2 хвилини (4 хв 12 сек). Вміст метронідазолу у субстанції було визначено спектрофотометрично, який складає біля 99,95 %, що угоджується із

концентрацією цієї речовини, заявленою виробником, і вимогами до цієї сировини при виробництві фармацевтичних препаратів 99,0-101,0 %.

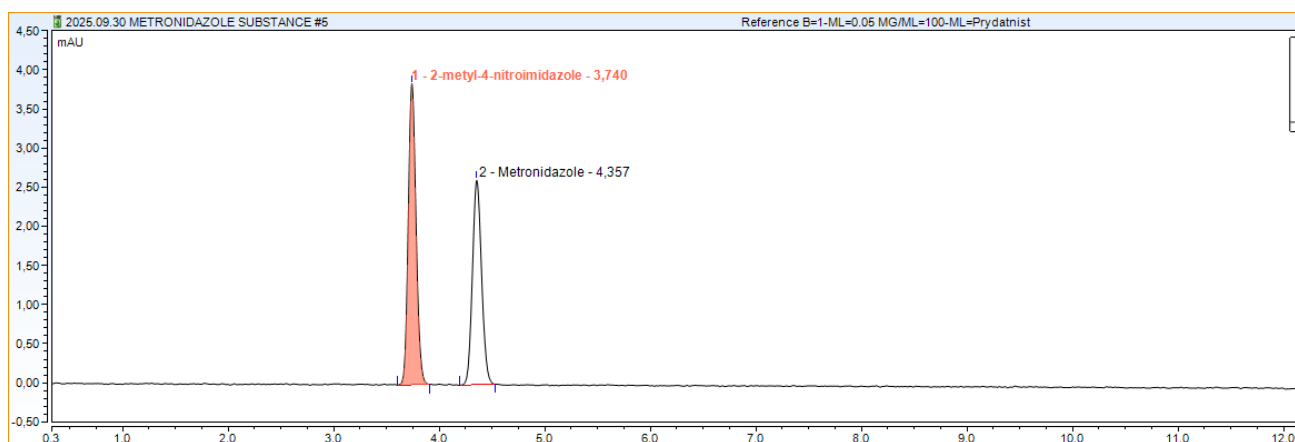


Рис. 2. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, який містить субстанцію метронідазолу та домішку 2-метил-5-нітроімідазолу (домішка А) в приблизно однакових концентраціях по 0,0005 мг/мл = 0,5 мкг/мл у мобільній фазі. Ступінь розділення дорівнює $R_s = 4,2$ (Resolution – розділення, розрішення).

Рідинна колонкова ВЕРХ дає змогу визначати в субстанції метронідазолу супутні домішки, які видно на рис. 1б як значно менші піки, площі яких знаходяться в межах від 0,005 до 0,03 mAU·min. Серед них, вирізняється пік, що відповідає 2-метил-5-нітроімідазолу, що має площу біля 0,031 mAU·min та час утримування біля 3,6 хвилини (3 хв 36 сек). Хроматографічні піки з часами утримування (хвилини) біля 2,68, 3,07, 3,39, 3,78 та 5,71 на рис. 1б відповідають іншим не ідентифікованим домішкам. За площами цих піків домішок в порівнянні з основним піком можна приблизно оцінити їх вміст, якщо допустити, що для довжини хвилі УФ-випромінювання, заданої згідно методики як 315 нм, поглинання цього електромагнітного випромінювання всіма речовинами є однаковим, тоді вміст їх буде приблизно знаходитися в межах $(0,005 \dots 0,03) \cdot 100 \% / 245 = (0,002 \dots 0,012) \%$ (для спрощення оціночних (приблизних) розрахунків в

знаменнику цього виразу нехтуємо вкладом у суму площ усіх піків малими площами піків для домішок). Час утримування (retention time) піку на хроматограмі – це час, який минає від моменту введення проби у хроматограф (час хроматографування рівний нулю) до моменту появи на хроматограмі максимуму піку. Час утримування є важливим параметром для ідентифікації речовини при проведенні якісного аналізу. У рідинній хроматографії за певних сталих умов, як температура хроматографічної колонки, швидкість та склад мобільної (рухомої) фази та тип колонки, кожна речовина має унікальний і відтворюваний час утримання.

Таблиця 1

Оцінка площі піків домішок на хроматограмі субстанції метронідазолу за трьома критеріями придатності субстанції метронідазолу щодо вмісту домішок згідно ДФУ

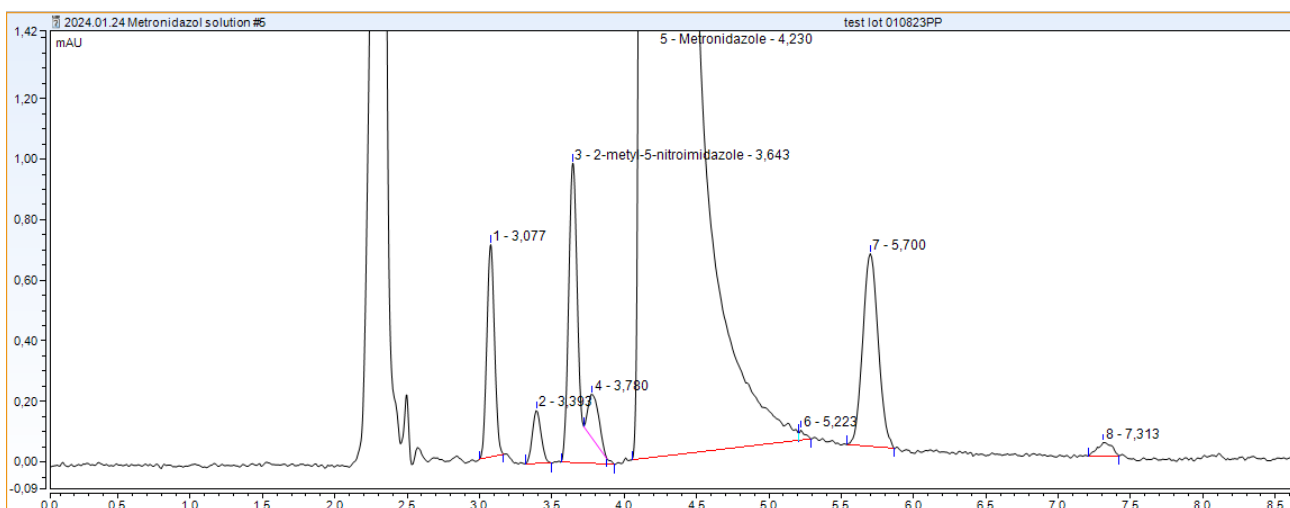
Номер піка на хроматограмі	Час утримування, хвилини	Площа піка, [mAU*min]	Не враховують домішки (сірим кольором відзначено домішки, які беруть до суми домішок)	Сума площ піків не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння
1	2,677	$0,0029 < 0,27$	$0,0029 < 0,027$	$0,0309$ $+$ $0,0297$ $\approx 0,0606 < 0,55$
2	3,073	$0,0170 < 0,27$	$0,0170 < 0,027$	
3	3,393	$0,0052 < 0,27$	$0,0052 < 0,027$	
4 2-метил-4-нітроїмідазол	3,647	$0,0309 < 0,27$	$0,0309 > 0,027$	
5	3,783	$0,0052 < 0,27$	$0,0052 < 0,027$	
7	5,710	$0,0297 < 0,27$	$0,0297 > 0,027$	
Розчин порівняння	4,237	$0,2766$ $0,2780$ Середнє: $0,2773$	$0,1 * 0,2773 = 0,02773$ [mAU·min]	$2 * 0,2773 = 0,5546$ [mAU·min] $\approx 0,55$

Для оцінки вмісту домішок в субстанції метронідазолу використовують метод порівняння, згідно якого площі піків домішок порівнюють з площею піка метронідазолу на хроматограмі розчину порівняння, який містить 0,5 мкг/мл (в перерахунку на (%) відносно метронідазолу субстанції $0,5 \text{ мкг/мл} \cdot 100 \% / 500 \text{ мкг/мл} = 0,1 \%$). Площа піка на хроматограмі розчину порівняння складає 0,27-0,28 mAU·min. Отже, найбільша площа (0,03 mAU·min) серед піків домішок є приблизно в 10 раз меншою за площу піка метронідазолу на хроматограмі розчину порівняння. Згідно ДФУ при нормуванні домішок застосовуються такі три критерії: 1) площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0,1%); 2) сума площ піків не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0,2%); 3) не враховують домішки, площі піків яких менше 0,1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0,01%). В таблиці 1 приведено площі піків домішок на хроматограмі субстанції метронідазолу та дано їх оцінку за вказаними трьома критеріями.

Отже, отримані результати визначення домішок у субстанції метронідазолу з допомогою методу ВЕРХ узгоджуються з заявленими технічними характеристиками виробника субстанції, а також підтверджують її придатність за критеріями вмісту домішок для приготування ЛЗ –розчину для інфузій, 0,5 % у виробничих масштабах.

Дослідження якості метронідазолу інфузійного розчину на наявність супровідних домішок методом ВЕРХ. На другому етапі дослідження було здійснено контроль якості ЛЗ – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % після стерилізації (при заданому режимі автоклавування у виробничих умовах заводу), приготовленого з однойменної субстанції методом ВЕРХ. Як бачимо (рис. 3), хроматограма розчину ЛЗ показує наявність кількох інтегрованих піків (пік 1 – пік 8), для яких визначено часи утримування і відповідні площі, як результат процесу інтегрування сигналу детектора під контуром піку за винятком площі під базовою лінією, та не проінтегрований пік, що відповідає хлориду натрію, який також

входить до складу ЛЗ. Площа піку метронідазолу, основної речовини ЛЗ, є найбільшою і складає приблизно 404 mAU·min і цей пік має час утримування біля 4,2 хв. Хроматограма (рис. 3) демонструє, що піки метронідазолу і 2-метил-5-нітроімідазолу є повністю розділеними, що свідчить про придатність хроматографічної системи. Крім того, її придатність для визначення домішок, щодо критерію відтворюваності, також було перевірено за стандартним (референтним) розчином, що містить 2-метил-5-нітроімідазолу (домішка А) з концентрацією 0,005 мг/мл. Хроматографічна система вважається придатною для відтворюваного визначення домішок в ЛЗ – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % згідно ДФУ, якщо виконуються критерії, які наведені в таблиці (Додаток Д).



Peak No.	Peak Name	Ret. Time min	Amount	Rel. Area %	Area mAU*min	Height mAU
1		3,077	n.a.	0,01	0,0433	0,70
2		3,393	n.a.	0,00	0,0123	0,18
3	2-metyl-5-nitroimidazole	3,643	n.a.	0,02	0,0814	0,99
4		3,780	n.a.	0,00	0,0128	0,15
5	Metronidazole	4,230	n.a.	99,94	403,8982	3817,35
6		5,223	n.a.	0,00	0,0015	0,03
7		5,700	n.a.	0,02	0,0791	0,64
8		7,313	n.a.	0,00	0,0053	0,04

Рис. 3. Хроматограма лікувального засобу (ЛЗ) – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % (2 мл (із 5 мг/мл) препарату розведено в 5 разів мобільною фазою; концентрація метронідазолу 0,1 % = 1 мг/мл = 1000 мкг/мл).

Відносне стандартне відхилення (RSD – Relative Standard Deviation, %) для площі піка 2-метил-5-нітроімідазолу (за хроматограмою розчину стандартного зразка з концентрацією 5 мкг/мл), складає $\approx 0,045$ (таблиця 2). Для оцінки вмісту домішок в ЛЗ використовують метод порівняння, як і для визначення домішок в субстанції. Згідно якого площі піків домішок порівнюють з площею відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння, який містить $0,005 \text{ мг/мл} = 5 \text{ мкг/мл}$ 2-метил-5-нітроімідазолу, що має маркування як домішка А метронідазолу (в перерахунку на (%)) відносно метронідазолу субстанції $5 \text{ мкг/мл} \cdot 100 \% / 1000 \text{ мкг/мл} = 0,5 \%$).

Таблиця 2

Відносне стандартне відхилення для площі піка 2-метил-5-нітроімідазолу

Площа піка, [mAU·min]	Середня площа, [mAU·min]	Відхилення від середнього d, [mAU·min]	Квадрат відхилення, d ²	Сума d ²	Квадратний корінь з суми квадратів відхилень	RSD, %
2,6948	2,69395	0,00085	$7,225 \cdot 10^{-7}$	$1,445 \cdot 10^{-6}$	0,001202	0,04462
2,6931		- 0,00085	$7,225 \cdot 10^{-7}$			

Площа піка 2-метил-5-нітроімідазолу на хроматограмі розчину порівняння складає приблизно 2,7 mAU·min. Згідно ДФУ при нормуванні домішок в ЛЗ – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % застосовуються такі три критерії: 1) на хроматограмі випробовуваного розчину площа піку, що відповідає 2-метил-5-нітроімідазолу, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння 2-метил-5-нітроімідазолу (не більше 0,5%); 2) на хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого іншого додаткового піку, крім основного, не має перевищувати 1/5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння 2-метил-5-нітроімідазолу (не більше 0,1%); 3) не враховують піки, площі яких не перевищують 1/10 площі піку основного піка на хроматограмі розчину порівняння 2-метил-5-нітроімідазолу (не більше як 0,05%).

Таблиця 3

Оцінка площі піків домішок на хроматограмі ЛЗ метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % за трьома критеріями придатності субстанції метронідазолу щодо вмісту домішок згідно ДФУ

Номер піка на хроматограмі	Час утримування, хвилини	Площа піка, [mAU*min] (критерій - не більше 0,5%)	Не враховують домішки (критерій не більше 0,05%)
1	3,077	0,0433 < 2,7	0,0433 < 0,27
2	3,393	0,0123 < 2,7	0,0123 < 0,27
3 2-метил-4-нітроїмідазол	3,643	0,0814 < 2,7	0,0814 < 0,27
4	3,780	0,0128 < 2,7	0,0128 < 0,27
6	5,223	0,0015 < 2,7	0,0015 < 0,27
7	5,700	0,0791 < 2,7	0,0791 < 0,27
8	7,313	0,0053 < 2,7	0,0053 < 0,27
Розчин порівняння: 2-метил-4-нітроїмідазол	3,643	2,6948 2,6931 Середнє: 2,69395	0,1* 2,69395= =0,27 [mAU*min]

В таблиці 3 наведено площі піків домішок на хроматограмі ЛЗ – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % та надано їх оцінку за вказаними трьома критеріями. Згідно з даними (табл. 3) для всіх піків домішок виконується критерій, за яким не враховують піки, площі яких не перевищують 0,1 від площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння 2-метил-5-нітроїмідазолу (не більше 0,05%), тому в дослідженій серії ЛЗ метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % вміст всіх домішок знаходиться нижче межі інформування (НПІ). Отже, отримані результати визначення домішок з допомогою методу ВЕРХ свідчать про те, що досліджувана серія ЛЗ метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % відповідає вимогам ДФУ до супровідних домішок.

Визначення прозорості, кольоровості та водневого показника метронідазолу, розчину для інфузій 0,5 %. ЛЗ після встановленого режиму стерилізації був прозорий; практично безбарвний (не перевищував забарвленості еталону); рН $5,5 \pm 0,3$, що повністю відповідає вимогам ДСТУ.

Дослідження якості якості субстанції парацетамолу на наявність супровідних домішок методом ВЕРХ. Придатність субстанції – вихідної сировини для приготування ЛЗ – парацетамолу розчину для інфузій здійснювали методом ВЕРХ (за використання УФ-детектора) як описано [2, п. 2.9]. Рис. 4 демонструє хроматограми градієнтного режиму мобільної фази для тестового розчину субстанції парацетамолу з концентрацією 10 мг/мл.

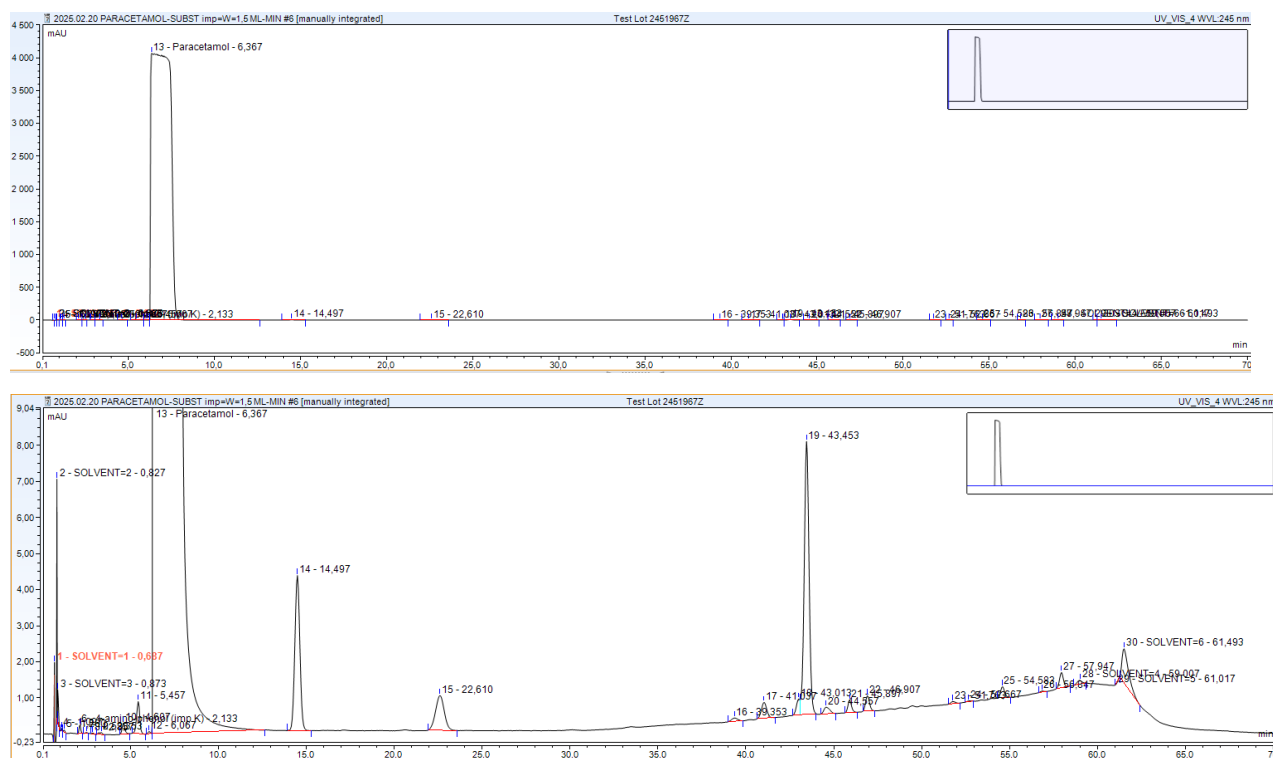


Рис. 4. Хроматограми градієнтного режиму мобільної фази для тестового розчину субстанції парацетамолу (а, б) у суміші розчинників (15 % метанол + 85% вода) (концентрація розчину парацетамолу 10 мг/мл): а – у повному вигляді; б – у розгорнутому вигляді (з деталізацією піків домішок).

Робота рідинного хроматографа у градієнтному режимі мобільної фази (МФ) для дослідження субстанції парацетамолу продемонстрована на рис.5. Параметри усіх піків на хроматограмі тестового розчину субстанції парацетамолу наведено у Додатку Д (табл.2). Площа піку парацетамолу складає приблизно 5199 mAU·min, час утримування $\approx 6,37$ хв (6 хв 22 сек), а його форма вказує на перевантаження хроматографічної колонки великою кількістю парацетамолу, яка взята для виявлення усіх домішок.

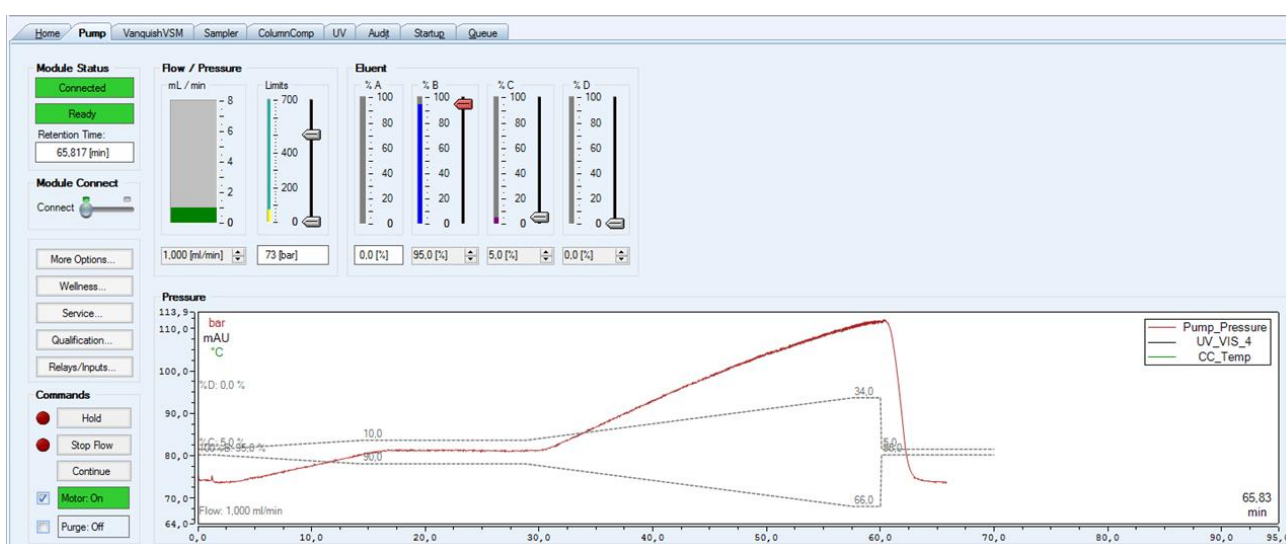


Рис. 5. Робота рідинного хроматографа у градієнтному режимі мобільної фази (МФ) для дослідження субстанції парацетамолу. Градієнт складу МФ за співвідношенням метанолу (% об.) – верхня штрихова лінія та водного буферного розчину (% об.) – верхня штрихова лінія; коричнева лінія – зміна тиску перед хроматографічною колонкою (bar) за постійної витрати мобільної фази $w=1,5$ мл/хв.

Особлива увага при визначенні домішок в субстанції парацетамолу приділяється 4-хлорацетаніліді (домішка J) – проміжний продукт у синтезі парацетамолу (під якого має час утримування 52,170 хв (55 хв 10 сек) (Додаток Е, рис. 1) та 4-амінофенолу (домішка К) – продукт гідролізу парацетамолу (під якого має час утримування 2,140 хв (2 хв 8 секунд) (Додаток Е, рис. 2).

Таблиця 4

Результати ідентифікації домішок за хроматограмами випробовуваного розчину субстанції парацетамолу

Дані хроматограми розчину порівняння (b) для ідентифікації домішки J (4-хлорацетаніліду)	
RT, хв (випробовуваний)	52,693; 52,667. Середнє: 52,6800
RT ₀ , хв (порівняння)	52,170; 52,150. Середнє: 52,1600
RSD, % (випробовуваний)	0,03
RSD, % (порівняння)	0,03
dif _{ref} , %)	0,997
Дані хроматограми розчину порівняння (d) для ідентифікації домішки K (4-амінофенолу)	
RT, хв (випробовуваний)	2,127; 2,133. Середнє: 2,1300
RT ₀ , хв (порівняння)	2,140; 2,140. Середнє: 2,1400
RSD, % (випробовуваний)	0,20
RSD, % (порівняння)	0,00
dif _{ref} , %)	0,47

Ідентифікацію домішок J та K на хроматограмах випробовуваного розчину та відповідних розчинах порівняння проводили за часами утримування піків, де співпадання часів утримування оцінювали за такими критеріями прийнятності (для двох паралельних інжекцій, $n_{\text{sample}}=2$) згідно ДФУ: 1) відносні стандартні відхилення (RSD, %) мають бути меншими як 0,25%; 2) відносна різниця середніх значень (dif_{ref}, %) величин часу утримування, на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння мають бути меншими як 1,85%. Результати кількісного визначення домішок J та K в субстанції парацетамолу за хроматограмами випробовуваного розчину та відповідних розчинів порівняння продемонстровано у Додатку Є. Результати ідентифікації домішок J та K (таблиця 4) у складі досліджуваної субстанції парацетамолу, підтверджують її відповідність нормативним вимогам.

Для визначення вмісту (%) інших домішок використовували референтний розчин парацетамолу, виготовлений з випробовуваного розчину субстанції.

Хроматограма референтного розчину парацетамолу (рис. 6), приготованого з випробуваного розчину субстанції (номінально 10 мг/мл) шляхом двох послідовних розведень в 2000 разів, з концентрацією $\approx 0,005$ мг/мл (0,5 мкг/мл) у суміші розчинників (15 % CH_3OH + 85% вода) свідчить про відсутність достовірно значимих концентрацій інших домішок. Отримані результати узгоджуються з заявленими технічними характеристиками виробника субстанції парацетамолу та підтверджують її придатність для приготування однойменного ЛЗ.

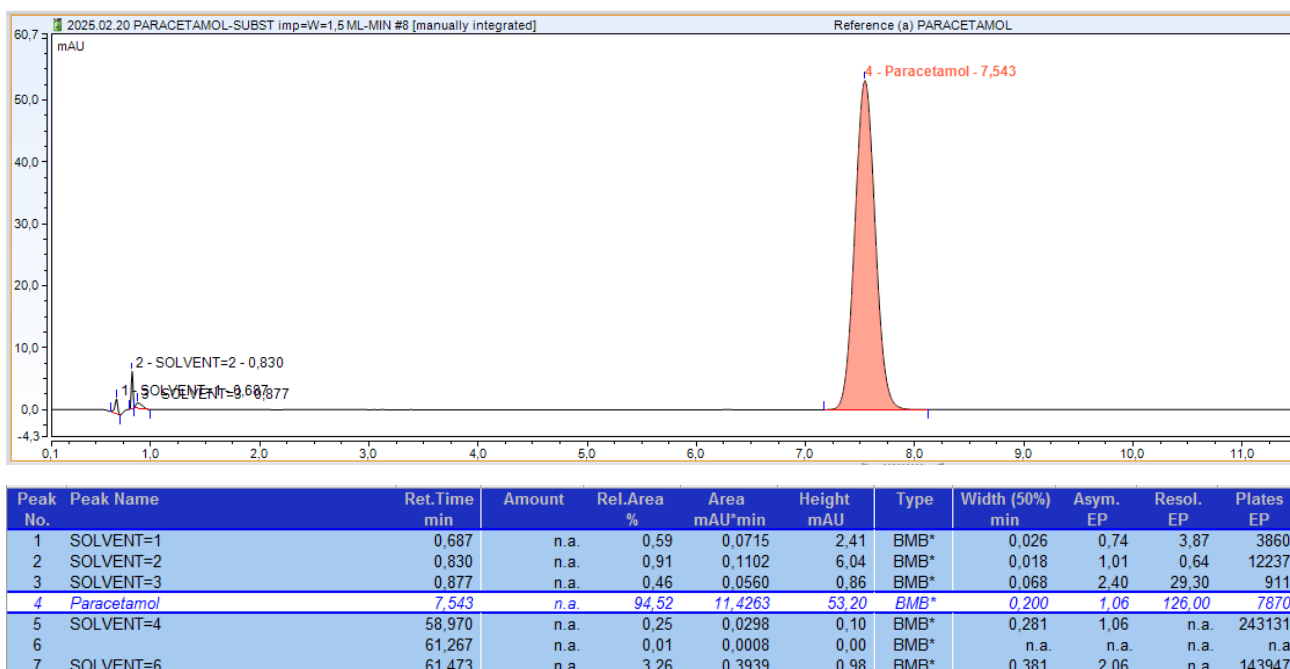


Рис. 6. Хроматограма референтного розчину парацетамолу, який приготовано з випробуваного розчину субстанції (концентрація $\approx 0,005$ мг/мл у суміші розчинників (15 % CH_3OH + 85% вода).

Дослідження якості парацетамолу розчину для інфузій на наявність супровідних домішок методом ВЕРХ. На наступному етапі було досліджено ЛЗ – парацетамол, розчин для інфузій (1000 мг/мл) після заданого режиму автоклавування на стабільність (через 18 місяців) методом ВЕРХ як описано (п. 2.9). Отримані хроматограми випробовуваних розчинів парацетамолу аналізували із урахуванням наступних критеріїв прийнятності: часом утримання основного

піку на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння (табл. 5), отриманих при кількісному визначенні (див. Додаток Ж), мають співпадати.

Таблиця 5.

Параметри хроматограми розчину порівняння на основі показників піків

Хроматограми розчину порівняння (с)			
№	Параметр	Вимоги	Результат
1	Ступінь розділення між піками 4-амінофенолу і парацетамолу	Не менше 4,0	16,87; 16,83
Висновок		ХС придатна для використання:	
		ТАК	
Нормування: 4-амінофенол: не більше 0,05%; будь-яка інша домішка: не більше 0,2%; сума домішок: не більше 2,0%; не враховують домішки: піки яких співпадають з піками рухомої фази; мінімум, що не враховується для 4-амінофенолу 0,025%, а для будь-якої іншої домішки 0,05%.			

Критерії прийнятності (для двох паралельних інжекцій, $n_{\text{sample}}=2$) мають бути наступними: відносні стандартні відхилення (RSD, %) $<0,15\%$; відносна різниця середніх значень (dif_{ref} , %) величин часу утримування на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння мають бути $<1,85\%$ (табл. 5 та табл. 6). Згідно з математично-статистичними даними аналізу хроматограм (табл. 6), показники випробовуваного розчину та розчину порівняння, співпадають. Це свідчить про стабільність та придатність до використання ЛЗ – парацетамолу, розчину для інфузій (1000 мг/мл) у межах гарантійного терміну. Отже, досліджувана субстанція парацетамолу та розчин для ін'єкцій, приготовлений на його основі відповідають нормативним вимогам: до кількісного вмісту парацетамолу і до кількісного вмісту супровідних домішок.

Визначення прозорості, кольоровості та водневого показника парацетамолу, розчину для інфузій. ЛЗ після встановленого режиму стерилізації

був прозорий; практично безбарвний (не перевищував забарвленості еталону); рН $5,8 \pm 0,3$, що повністю відповідає вимогам ДСТУ.

Таблиця 6.

Математично-статистичні показники відповідності лікарського засобу – парацетамолу, розчину для інфузій за даними хроматограм

Номер серії*		
Результати випробувань		
4-амінофенол		НПІ
будь-яка інша домішка		0,2%
сума домішок		0,2%
* Для приготування розчинів порівняння (а) і (с) використано: ФСЗ парацетамолу с.4 $m=48,4$ мг, $P=99,9\%$ і парацетамолу домішка К (4-амінофенол) ДФУ ФСЗ с.1 $m_0=25$ мг, $P=100,0\%$.		
Математично-статистичні показники відповідності		
Результати випробувань	RT, хв (випробовуваний)	5,560; 5,563 Середнє = 5,5615
	RT ₀ , хв (порівняння)	5,563; 5,560 Середнє = 5,5615
	RSD, % (випробовуваний)	0,04
	RSD, % (порівняння)	0,04
	dif _{ref} , %)	0,00
	Оцінка відповідності	ТАК

3.2 Дослідження якості лікарських засобів мікробіологічними методами

Тіогліколеве ЖС (Тіо ЖС) та триптон-соевий бульйон (ТСБ) були використані для подальшого контролю якості досліджуваних лікарських засобів на стерильність. Насамперед, ЖС оцінювали на придатність до застосування (Додаток 3, табл. 1) за такими показниками: зовнішній вигляд сухого середовища, консистенція, колір та термін його придатності. Готові ЖС після стерилізації (див. п. 2.11) також оцінювали на їх придатність до використання за такими

Отримані дані (табл. 7), свідчать про належну стерильність досліджуваного розчину ЛЗ. Отже, результати досліджень ЛЗ методом мембранної фільтрації після проведення встановленого режиму автоклавування підтверджують його стерильність та відповідність вимогам встановлених стандартів.

Аналіз якості ЛЗ на вміст бактеріальних ендотоксинів (БЕТ) здійснювали ЛАЛ-тестом (інакше гель-тромб тест, метод А) як описано [2. п. 2.12]. Принцип ЛАЛ-тесту полягає у тому, що при взаємодії ендотоксину із лізатом амебоцитів відбувається помутніння прозорої реакційної суміші та утворення твердого гелю (позитивна реакція). Це означає наявність ендотоксину у ЛЗ (результат аналізу інтерпретується як позитивний та записується знаком плюс). Відсутність помутніння реакційної суміші та твердого гелю інтерпретується як негативна реакція (означає відсутність ендотоксину у ЛЗ, результат аналізу записується знаком мінус). Гель-тромб (метод А) є граничним випробуванням БЕТ, його застосування уможливорює виявити БЕТ у концентрації, яка перевищує ГВЕ відповідно до специфікації. Згідно з інструкцією, перед виконанням тесту було здійснено перевірку серій розведень СПЕ (стандартний препарат ендотоксину *E. coli*). Перевірка серій розведення концентрації ендотоксину підтверджена при $\lambda = 0,03$ МО/мл (Додаток І). На наступному етапі виконання тесту було обчислено ГКЕ. Згідно з інструкцією для застосування випробовуваного ЛЗ (розділ Спосіб застосування та дози), максимальна добова доза для дорослих складає 400 мл (при масі тіла 70 кг), тоді ГКЕ буде складати 0,35 МО/мл ($5,0$ [МО/кг/год] / $14,29$ [мл/кг/год]). Таким чином, вміст БЕТ повинен складати не більш як 0,35 МО/ мл. Тоді, максимально допустиме розведення (МДР) для даного ЛЗ буде складати 11: $(0,35$ [МО/ мл] / $0,03125$ [МО/ мл]). Отже, результат розведення ЛЗ для виконання тесту буде наступним: МДР = 1: 11^{1/2} МДР = 5,5. У результаті проведених досліджень отримали наступні дані (табл. 8). Як бачимо, випробування ЛЗ можна вважати пройденим: в обох повторностях проб розчину В та С є позитивний результат, а в обох повторностях проб розчину

D є негативний. Це свідчить, що досліджуваний зразок ЛЗ – метронідазолу розчину для інфузій, 0,5 % відповідає вимогам випробування, оскільки для обох повторностей проб розчину A отриманий негативний результат.

Таблиця 8.

Показники випробування метронідазолу розчину для інфузій ЛАЛ тестом

Позначення проб	№ пробірк	Вода для БЕТ	Випробовуваний розчин/зразок $^{1/2}$ МДР	Стандарт ендотоксину 0,15 МО/мл	ЛАЛ-реактив	Результат
		Об'єм розчинів, мкл				
Негативний контроль випробовуваного розчину (розчин A)	1	50	50	-	100	-
	2	50	50	-	100	-
Позитивний контроль випробовуваного розчину (розчин B)	3	-	50	50	100	+
	4	-	50	50	100	+
Негативний контроль (розчин D)	5	100	-	-	100	-
	6	100	-	-	100	-
Позитивний контроль (розчин C)	7	50		50	100	+
	8	50		50	100	+

Аналіз якості парацетамолу розчину для інфузій на вміст бактеріальних ендотоксинів (БЕТ) здійснювали аналогічно як описано (див. п. 2.12) ЛАЛ-тестом. Аналогічно, перед виконанням тесту було здійснено перевірку серій розведень СПЕ як продемонстровано (Додаток I). На основі даних, перевірки серій розведення концентрації ендотоксину підтверджено при $\lambda = 0,125$ МО/мл.

На наступному етапі виконання тесту було здійснено обчислення ГКЕ згідно з інструкцією для медичного застосування випробовуваного ЛЗ (розділ Спосіб застосування та дози). У інструкції зазначено, що максимальна добова доза для дорослих становить 4000 мг (при масі тіла 70 кг), обчислюємо: кількість ЛЗ уведеного за годину буде складати 166,67 мг/год. Виходячи з цього: $M = 166,67$ (мг/ год) / 70 кг = 2,38 мг/кг маси/год. Тоді ГКЕ буде складати 2,1 МО/мг (5,0

[МО/ кг/год] / 2,38 [мг/кг/год]). Звідси, вміст БЕТ повинен складати не більш як 2,0 МО/мг парацетамолу. Тоді, МДР для даного ЛЗ буде 160: (2,0 [МО/ мг] · 10 [мг/ мг] / 0,125 [МО/ мл].

Отже, результат розведення ЛЗ для виконання тесту буде наступним: МДР = 160 $\frac{1}{2}$ МДР = 80. У результаті проведених досліджень отримали наступні дані (табл. 9). Як бачимо, випробування ЛЗ можна вважати пройденим: в обох повторностях проб розчину В та С є позитивний результат, а в обох повторностях проб розчину D – негативний результат. Це свідчить, що досліджуваний зразок ЛЗ – парацетамолу для інфузій (1000 мг/100 мл) відповідає вимогам випробування, оскільки для обох повторностей проб розчину А отриманий негативний результат.

Таблиця 9.

Показники випробування парацетамолу розчину для інфузій ЛАЛ тестом

Позначення проб	№ пробірок	Вода для БЕТ	Випробовуваний розчин/зразок ¹ / ₂ МДР	Стандарт ендотоксину, 0.5 МО/мл	ЛАЛ-реактив	Результат
		Об'єм розчинів, мкл				
Негативний контроль випробовуваного розчину (розчин А)	1	50	50	-	100	-
	2	50	50	-	100	-
Позитивний контроль випробовуваного розчину (розчин В)	3	-	50	50	100	+
	4	-	50	50	100	+
Негативний контроль (розчин D)	5	100	-	-	100	-
	6	100	-	-	100	-
Позитивний контроль (розчин С)	7	50		50	100	+
	8	50		50	100	+

Отож, результати досліджень обох лікарських засобів ЛАЛ-тестом показали відсутність у їхньому вмісті бактеріальних ендотоксинів, що відповідає встановленим критеріям та підтверджує їхню відповідність встановленим стандартам якості на пірогенність.

ВИСНОВКИ

У результаті досліджень якості деяких лікарських засобів мікробіологічними та фізико-хімічними методами було зроблено наступні висновки:

1. Встановлено, що субстанція метронідазолу та субстанція парацетамолу відповідають вимогам заявленим виробником, і відповідають показникам якості ДФУ. Методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) підтверджено високий вміст основної речовини (метронідазолу – 99,95%, парацетамолу – 99,95%) та відсутність домішок вище допустимих значень. Отримані результати свідчать про відповідність субстанцій вимогам фармакопейної чистоти та їх придатність для виготовлення ЛЗ.

2. З'ясовано, що лікарський засіб (ЛЗ) – метронідазолу розчин для інфузій 0,5% (після стерилізації чи після 24 місяців зберігання) та парацетамолу розчин для інфузій (після стерилізації чи після 18 місяців зберігання) відповідають нормативним вимогам до чистоти й стабільності. Хроматографічний аналіз підтвердив, що вміст супровідних домішок у розчинах ЛЗ не перевищує встановлених нормативних критеріїв ($< 0,001$ % площі основного піку).

3. Метод мембранної фільтрації з подальшим культивуванням зразків на спеціальних живильних середовищах (тіогліколовому живильному середовищі (Тіо ЖС) та триптон-соєвому бульйоні (ТСБ) для аналізу мікробного росту підтвердив належну якість досліджуваних ЛЗ за показником «стерильність».

4. Встановлено, що як метронідазолу розчин для інфузій, так і парацетамолу розчин для інфузій відповідають вимогам за показником «апірогенності». ЛАЛ-тест (тест на лізат амебоцитів *Limulus*) засвідчив, що досліджувані ЛЗ відповідають граничним нормам вмісту бактеріальних ендотоксинів (пірогенів) – в умовах тесту не було виявлено утворення гелю (негативний результат).

5. Підтверджено, що застосування фізико-хімічних (зокрема, ВЕРХ) та мікробіологічних (контроль стерильності, ЛАЛ-тест) методів для контролю якості досліджених ЛЗ підтверджує їхню необхідність та обов'язковість при встановленні їх відповідності встановленим стандартам.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості : Національний стандарт України: ДСТУ 7525:2014. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. 30 с. URL: http://iccwc.org.ua/docs/dstu_7525_2014.pdf.

2. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014–2015. Т. 1 (2015), Т. 2 (2014), Т. 3 (2014)Т. 1–3.

3. Державний реєстр лікарських засобів України : інформаційний фонд Департаменту фармацевтичної діяльності Державного експертного центру МОЗ України. URL: <http://www.drlz.com.ua> (дата звернення: 19.09.2025).

4. Державні Санітарні Норми та Правила "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10) : затв. наказом Міністерства охорони здоров'я України від 12.05.2010 № 400 (у ред. від 23.12.2024 № 2134) : чинні від 01.01.2011. Київ, 2024. URL: https://sphu.org/wp-content/uploads/2024/09/content_2t_2izd.pdf (дата звернення: 19.09.2025).

5. ДСТУ EN ISO 14155:2015. Клінічні дослідження медичних виробів для людей. Належна клінічна практика (EN ISO 14155:2011 + EN ISO 14155:2011/Cor.1:2011, IDT). URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=109220 (дата звернення: 19.09.2025).

6. Захарія О. М., Чеботарьов О. М., Щербакова Т. М. Основи стандартизації та сертифікації : навч. посібник. Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2014. 104 с. URL: <https://dspace.onu.edu.ua/bitstreams/7b27b002-1c91-4b9c-ae5c-661e9e0eb89a/download>

7. Клепач Г., Паньків С., Деревянчук Г. Оцінка якості інфузійного лікарського засобу методами мікробіологічного контролю в умовах виробництва. Пріоритетні напрями досліджень в науковій та освітній діяльності: проблеми та перспективи:

збірник матеріалів V Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (23–24 жовтня 2025 року, Рівне, Україна). Рівне, 2025. С. 154–156.

8. Наказ МОН України від 16.02.2009 № 5 про затвердження документів з питань забезпечення якості лікарських засобів. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ9538>

9. Настанова 42-4.0-2016. Лікарські засоби. Належна виробнича практика : офіц. вид. / М. Ляпунов, О. Безугла, Н. Тахтаулова [та ін.]. Вид. офіційне. К. : МОЗ України, 2016. 357 с.

10. Настанова 42-4.1:2011. Лікарські засоби. Досьє виробничої дільниці : офіц. вид. Київ, МОЗ України, 2016. 16 с. URL: <http://www.diklz.gov.ua/control/main/uk/publish/article/1381232>.

11. Настанова 42-4.2:2011. Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9). Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2011. 35 с. URL: <http://www.gmpua.com/World/Ukraine/nastanova42422011.pdf>

12. Настанова 42-4.3:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична система якості. Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2011. 30 с. URL: <http://www.gmpua.com/World/Ukraine/nastanova42432011.pdf>

13. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8). Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2011. 33 с.

14. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.1:2004. Лікарські засоби. Настанова з якості. Фармацевтична розробка ДП «Державний науковий центр лікарських засобів». Київ : МОЗ України, 2004. URL: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-1-2004/>

15. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.5:2016. Лікарські засоби. Валідація процесів : офіц. вид. Київ, МОЗ України, 2016. 31 с.

16. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. Лікарські засоби. Належна виробнича практика / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов та ін. Київ, МОЗ України, 2011.

17. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична система якості (ICH Q10). Київ, МОЗ України, 2011. 30 с.

18. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-5.0:2014. Лікарські засоби. Належна практика дистрибуції : офіц. вид. Київ, МОЗ України, 2014. 41 с.

19. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-5.1:2011. Лікарські засоби. Належна практика зберігання : офіц. вид. Київ, МОЗ України, 2011. 26 с.

20. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2014. Лікарські засоби. Доклінічні дослідження безпеки як підґрунтя клінічних випробувань за участю людини та реєстрації лікарських засобів (ІСН МЗ(R2)). Вид. офіц. К. : МОЗ України, 2014. 54 с.

21. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-7.1:2014. Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності : офіц. вид. Київ, МОЗ України, 2014. 62 с.

22. Настанова. Фармацевтична система якості освіти. URL: <https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2019/02/Настанова-Фармацевтична-система-якості.pdf>

23. Офіційний сайт ДП «Фарматрейд». URL: <http://pharmatrade.com.ua/index.html>

24. Офіційний сайт Good Practices. URL: <https://sm-mt.com.ua/services/standartu-serii-gxp-glp-gcp-gmp/>

25. Про затвердження Порядку контролю якості лікарських засобів під час оптової та роздрібною торгівлі : наказ Міністерства охорони здоров'я України від 29.09.2014 № 677. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1515-14#Text>.

26. Про затвердження Порядку проведення галузевої атестації лабораторія з контролю якості та безпеки лікарських засобів : Наказ МОЗ України від 14.01.2004 № 10. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z0130-04>

27. Про затвердження Порядку проведення підтвердження відповідності умовам виробництва лікарських засобів вимогам належної виробничої практики: Наказ МОЗ України від 27.12.2012 № 1130. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z0133-13>

28. Про затвердження Порядку проведення сертифікації підприємств, які використовують оптову реалізацію (дистрибуцію) лікарських засобів : Наказ МОЗ України № 421 від 23.08.2005. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z1013-05>.

29. Про лікарські засоби : Закон України від 04.04.1996 № 123/96-ВР. URL: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/123/96-вр>.

30. Промислова технологія лікарських засобів : підручник / Є. В. Гладих, О. А. Рубан, І. В. Сайко [та ін.] ; за ред. Є. В. Гладиха, В. І. Чуєшова. Вид. 2-ге, випр. та допов. Х. : НФаУ : Новий Світ-2000, 2018. 486 с.

31. Про підтвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісії з питань етики : Наказ МОЗ України від 23.09.2009 р. № 690. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z1010-09>.

32. Система якості лікарських засобів : електронний метод. посібник. Одеса : ОНУ, 2023. 66 с. URL: <https://dspace.onu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/bcca8199-9569-4be9-a553-582948fbd8f6/content>.

33. Чеботарьов О. М., Снігур Д. В. Метрологічні основи хімічного аналізу : підручник. Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2019. 229 с.

34. Bacterial Endotoxins 5.1.10. Guidelines for using the Test for Bacterial Endotoxins / European Pharmacopoeia. 10th ed. 2021. URL: <http://online.edqm.eu>.

35. Liquid chromatography / European Pharmacopoeia. 11.1th ed. 2023.

36. Cheryan M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., 1998. 55 p.

37. Commission Directive 91/412/EEC of 23.07 1991 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice for veterinary medicinal products.

38. Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use.

39. Cundell A. M. The Pros and Cons of Rapid Microbiological Methods. *American Pharmaceutical Review*. 2006. Vol. 9, No. 6. P. 66–70.

40. EMA/INS/GMP/79818/2011 Pharmaceutical Quality System (ICH Q10), 31.01.2011. URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000154.jsp&mid=WC0b01ac0580027088

41. European Medicines Agency. *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*. London : EMA, 2020.
42. EudraLex. – The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. – Vol. 4. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. URL: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm.
43. Guidance for Industry. Q10 Pharmaceutical Quality System. Rockville, MD : U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2009.
44. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use. *Pharmeuropa*. 2007. Vol. 19, No. 4. P. 605–611.
45. Mulder M. *Basic Principles of Membrane Technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.
46. Official website EMA: URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/scientific-guidelines> (дата звернення: 19.09.2025).
47. Official website FDA: Food and Drug Administration. URL: <https://www.fda.gov/> (дата звернення: 19.09.2025).
48. PDA Technical Report No. 33. Parenteral Water for Injection. Bethesda, MD : Parenteral Drug Association, 2014.
49. Sutton S. Validation of Microbial Enumeration Methods Revisited. *Journal of Validation Technology*. 2010. Vol. 16, No. 4. P. 44–56.
50. The European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg : Council of Europe, 2022.
51. The Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. Tokyo : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2021.
52. The United States Pharmacopeia. 46th ed. Rockville, MD : United States Pharmacopeial Convention, 2023.
53. USP General Chapter 1035. Analytical Procedure Lifecycle. *United States Pharmacopeia*. 2021.