



Оригинальная статья/Research article

Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид

Ю. М. Домнина^{1,2*}, В. В. Суслов^{1,2}, Н. Э. Грамматикова^{1,3}, С. А. Кедик^{1,2}

1 – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

2 – АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

3 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе», 119021, Россия, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

*Контактное лицо: Домнина Юлия Михайловна. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Ю. М. Домнина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; В. В. Суслов – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Н. Э. Грамматикова – <https://orcid.org/0000-0003-3508-231X>; С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Статья поступила: 02.09.2020. Статья принята в печать: 08.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Для стандартизации показателей качества в течение предполагаемого срока хранения, разработанного лекарственного препарата налтрексона гидрохлорида в форме назального спрея, содержащего высокую концентрацию полоксамера, а также бензалкония хлорид в качестве консерванта, проведено исследование по микробиологическим показателям. Изучена возможность применения метода мембранной фильтрации при испытании опытных образцов, рекомендованного ГФ XIV.

Цель. Изучение и подбор условий проведения испытаний по показателю «микробиологическая чистота» образцов назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали образцы назального спрея налтрексона гидрохлорида. При анализе микробиологической чистоты применяли метод мембранной фильтрации, рекомендованный в ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. В рамках проведенного исследования установлено, что образцы препарата отвечают требованиям по микробиологическому показателю для препаратов категории 2. Проверка пригодности метода для образцов лекарственной формы показала, что антимикробное действие препарата полностью снимается промыванием фильтра, что доказано посевом индикаторных тест-микроорганизмов, количественный и качественный характер роста, которых не отличался от контроля без препарата.

Заключение. В результате проведенных исследований подобраны и обоснованы оптимальные условия проведения испытаний по показателю «Микробиологическая чистота» для назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид.

Ключевые слова: назальный спрей, налтрексон, микробиологическая чистота, мембранная фильтрация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в планировании и постановке экспериментов, в интерпретации результатов и написании текста статьи. Автор Н. Э. Грамматикова осуществляла проведение экспериментальных исследований. Автор Ю. М. Домнина нарабатывала опытные образцы препарата для исследования.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Грамматикова Н. Э., Кедик С. А. Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120>

Microbiological Estimation of Nasal Spray Containing Naltrexone Hydrochloride

Yuliya M. Domnina^{1,2*}, Vasilii V. Suslov^{1,2}, Nataliya E. Grammatikova^{1,3}, Stanislav A. Kedik^{1,2}

1 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

3 – FSBI Gause Institute of New Antibiotics, 11/1, Bolshaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435, Russia

*Corresponding author: Yuliya M. Domnina. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Yuliya M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; Vasilii V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Nataliya E. Grammatikova – <https://orcid.org/0000-0003-3508-231X>; Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Received: 02.09.2020. Revised: 08.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. In order to standardize the quality indicators during the expected shelf life of the developed drug naltrexone hydrochloride in the form of a nasal spray containing a high concentration of poloxamer and benzalkonium chloride as a preservative, a microbiological study was carried out. The possibility of using the membrane filtration method for testing prototypes recommended by the State Pharmacopoeia XIV.

Aim. Study and selection of test conditions for the «microbiological purity» indicator of nasal spray samples containing naltrexone hydrochloride.

Materials and methods. As an object of research, a naltrexone hydrochloride nasal spray was used.

When analyzing the microbiological purity, the membrane filtration method recommended in the State Pharmacopoeia XIV.

Results and discussion. As part of the study, it was found that the samples of the drug meet the requirements for a microbiological indicator for drugs of category 2. Testing the suitability of the method for samples of the dosage form showed that the antimicrobial effect of the drug was completely removed by washing the filter, which was proved by inoculation of indicator test microorganisms, the quantitative and qualitative nature of growth, which did not differ from the control without the drug.

Conclusion. As a result of the studies carried out, the optimal test conditions for the «Microbiological purity» indicator for the nasal spray containing naltrexone hydrochloride were selected and substantiated.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Грамматикова Н. Э., Кедик С. А., 2020

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Grammatikova N. E., Kedik S. A., 2020

Keywords: nasal spray, naltrexone, microbiological purity, membrane filtration.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors were actively involved in planning and setting up the experiments, interpreting the results, and writing the text of the article. Author N. E. Grammatikova carried out experimental research. The author Yu. M. Domnina developed prototypes of the drug for research.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Grammatikova N. E., Kedik S. A. Microbiological estimation of nasal spray containing naltrexone hydrochloride. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных этапов разработки новых препаратов является контроль по микробиологическим показателям, необходимых при изучении стабильности, в процессе хранения или выпуске партии в условиях производства. Кроме того, состав действующих и вспомогательных веществ должен обеспечивать как стандарты качества, так и гарантировать возможность применения стандартных методов испытания, в том числе по микробиологической чистоте.

Разработанный назальный спрей налтрексона гидрохлорид в качестве вспомогательных компонентов содержит высокую концентрацию полоксамера и консервант бензалкония хлорида [1–3].

В соответствии с ГФ XIV [4], назальный спрей относится к категории 2 и должен соответствовать следующим показателям:

- ✓ Общее число аэробных бактерий не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл).
- ✓ Общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10^1 в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл).

В XIV Фармакопее описаны два основных метода контроля микробиологической чистоты для нестерильных лекарственных средств: метод прямого

посева и метод мембранной фильтрации. Опытный образец – спрей назальный, содержащий в качестве консерванта бензалкония хлорид, проявляет активность в отношении широкого спектра микроорганизмов [5]. Для препаратов с антимикробным действием и хорошо растворимых в воде наиболее предпочтителен метод мембранной фильтрации, так как для данного метода не требуется нейтрализации антисептика методом разведения или применение инактиваторов [6]. Однако для каждой нового лекарственного препарата необходимо экспериментально установить пригодность метода.

Целью исследования является изучение условий проведения испытания по показателю «микробиологическая чистота» образцов назального спрея, содержащего в качестве действующего вещества налтрексона гидрохлорид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для анализа использовали назальный спрей налтрексона, состав которого представлен в таблице 1.

Исследуемый препарат представляет собой раствор с термозависимыми свойствами и при повышении температуры от 20 до 35 °С происходит увеличение динамической вязкости от 25 до 60 мПа · с [1].

Фильтрацию осуществляли через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и диамет-

Таблица 1. Состав назального спрея

Table 1. The composition of the nasal spray

Компоненты Components	Производитель Manufacturer	Концентрация, % Concentration, %
Налтрексона гидрохлорид Naltrexone hydrochloride	Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915 Aspenn Oss B.V., Netherlands, series L00037915	2,5
Полоксамер Kolliphor® P 407 Poloxamer Kolliphor® P 407	Geismar США, № GNA 18721 D, NF-USP/Ph. Eur. Geismar USA, № GNA 18721 D, NF-USP/Ph. Eur.	14,0
Лимонная кислота безводная, х.ч. Anhydrous citric acid, chemically pure	Химмед, Россия, ГОСТ 3652-69 Himmed, Russia, GOST 3652-69	0,01
Натрия хлорид, х.ч. Sodium chloride, chemically pure	Ленреактив, Россия, ГОСТ 4233-77 Lenreaktiv, Russia, GOST 4233-77	0,2
Бензалкония хлорид Benzalkonium chloride	Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., Индия, USP Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., Индия, USP	0,006
Вода очищенная (ФС.2.2.0020.15) Purified water (Ph. monograph.2.2.0020.15)		до 100

ром диска 47 мм (Millipore, США) на установке, состоящей из колбы Бунзена, фильтродержателя со стаканом, вакуум-нагнетательного насоса при комнатной температуре.

В работе использованы штаммы тест-микроорганизмов, которые были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ): *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Aspergillus brasiliensis* (*A. niger*) ATCC 9642 (ВКМ F1119), *Candida albicans* ATCC 10231.

Для анализа применяли следующие питательные среды и растворы: триптон-соевый агар сухой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); цетримидный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); пептон сухой ферментативный (ГОСТ 13805-76); агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); Бульон Мосселя (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); Sabouraud 4 % Glucose Agar (Sigma-Aldrich, Индия, Lot BCCB7065); соево-казеиновая среда жидкая (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); полисорбат-80 (твин-80) (OLEON, Бельгия).

В работе использовали промывные жидкости № 1 и №2, приготовленные в соответствии с ГФ XIV [4].

Подготовка тест-микроорганизмов

Бактериальные тест-штаммы сохраняли при температуре $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в триптиказо-соевом бульоне, содержащем 15 % глицерина. Для активации бактериальные тест-микроорганизмы высевали на триптон-соевую агаризованную среду. Инкубацию проводили в течение ночи (около 18 часов) при температуре $(32,5 \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C})$. Грибные тест-штаммы активировали на Сабуро агаре при температуре $(22,5 \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C})$. *C. albicans* в течение 48 часов, *A. brasiliensis* в течение 5–7 суток до образования спорулирующего воздушного мицелия.

Для анализа антимикробного действия лекарственной формы бактериальные тест-культуры и *A. brasiliensis* разводили в фосфатно-солевом буферном растворе с натрием хлорида и пептоном (pH 7,0) до титра 10^2 КОЕ/мл. Филаментозный тест-микроорганизм *A. brasiliensis* после 5 суток инкубации (до формирования плотного воздушного мицелия и спорообразования) смывали с агара Сабуро фосфатным буфером, содержащим 0,05 % твина-80, определяли количество конидий и спор в 1 мл раствора с использованием камеры Горяева.

Далее суспензии всех тест-штаммов разводили 1:10 до титра около 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Подготовка образцов для испытания на наличие антимикробного действия

Для определения антимикробного действия 10 мл спрея назального вносили в 100 мл разбавителя (жидкость № 2), тщательно перемешивали (разведение 1:10). Полученный раствор последовательно разводили 1:20, 1:50, 1:100 и 1:500, переносили по 1 мл в чашки Петри и заливали агаризованной средой инокулиро-

ванной тест-микроорганизмами. Анализ осуществляли в отношении тест-культур *B. cereus* ATCC 10702 и *S. aureus* ATCC 6538, к которым препарат проявляет максимальную активность.

Методика определения минимальной подавляющей концентрации

Чувствительность тест-микроорганизмов к образцу спрея изучали микрометодом двукратных серийных разведений в бульоне. Анализ осуществляли в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

Для постановки эксперимента в первые лунки планшета вносили препарат в питательной среде в количестве 50 мкл для бактериальных культур и 100 мкл, для грибных культур. Диапазон изучаемых концентраций бензалкония хлорида в препарате составлял от 30 до 0,23 мг/мл. Для контроля роста в 3 ячейки вносили 50 мкл инокулята без препарата («контроль роста»).

Подготовленные планшеты инкубировали в режиме $(32,5 \pm 2,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ для бактериальных культур и *Candida*, $(22,5 \pm 2,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ для *A. brasiliensis*.

Методика определения микробиологической чистоты для назального спрея налтрексона гидрохлорида

Образцы исследуемого препарата в количестве 10 мл растворяли в 100 мл жидкости № 1 [4]. Далее 10 мл полученного раствора переносили в стакан с фильтродержателем, содержащего 50 мл жидкости над мембраной. Включали насос и осуществляли фильтрацию, оставляя около 10 мл перед каждым промыванием фильтра. Промывную жидкость вносили порциями по 50 мл. Общий объем промывной жидкости составил 300 мл. Процедуру повторяли на новом фильтре в соответствии с задачей исследования. Промытые фильтры снимали с фильтродержателя стерильным пинцетом и накладывали на соответствующие агаризованные среды для анализа наличия аэробных микроорганизмов и грибов, а также погружали в накопительный соево-казеиновый бульон для анализа отдельных видов микроорганизмов. Соево-казеиновый бульон инкубировали 24–48 часов, по истечении времени пересевали на селективные среды.

Проверка пригодности метода мембранной фильтрации

Фильтрацию осуществляли в соответствии с методикой определения микробиологической чистоты, добавляя в последнюю порцию промывной жидкости по 10 мл взвеси тест-микроорганизмов (каждого на отдельный фильтр) в титре около 10 КОЕ/мл.

Фильтры помещали на соответствующие питательные среды: на триптон-соевый агар – *B. cereus* ATCC 10702; на агар Сабуро – *A. brasiliensis* ВКМ F1119;

в соево-казеиновый бульон – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Посевы инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ для бактериальных культур, $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ для *A. brasiliensis* в течение 1–5 суток.

По окончании времени инкубации из флаконов с инокулированными тест-микроорганизмами мембранами производили высев для морфологического анализа выросших тест-микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 на маннитно-солевой агар, *E. coli* ATCC 25922 в бульон Мосселя, через 24 часа инкубации на агар Эндо, *P. aeruginosa* ATCC 9027 на цетримидный агар, *A. brasiliensis* BKM F 1119 на агар Сабуру.

Чашки с агаризованной питательной средой Сабуру инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 24–72 часов, чашки с бактериальными культурами при $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение ночи.

По окончании инкубации проводили визуальную оценку роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Риски микробной контаминации в процессе производства, хранения или применения лекарственного средства могут значительно изменить качество препарата, срок годности и как следствие его безопасность. Добавление консервантов в состав лекарственного препарата позволяет минимизировать эти риски.

Известно, что эффективность бензалкония хлорида зависит от концентраций модификаторов вязкости [7]. Учитывая, что в состав исследуемого препарата входит полоксамер 407, который при повышении температуры от 20 до 35 °C приводит к значительному увеличению динамической вязкости, необходимо изучить антимикробное действие состава и возможность его устранения для дальнейшего подбора условий оценки микробиологической чистоты препарата.

Содержание бензалкония хлорида в лекарственной форме составляет 60 мкг/мл. Значения минимальной подавляющей концентрации этого консерванта в отношении тест-микроорганизмов соответствуют (мкг/мл): *A. brasiliensis* BKM F-1119 – 16,0; *S. albicans* ATCC 10231 – 8,0; *E. coli* ATCC 25922 – 4,0; *P. aeruginosa* ATCC 9027 – $\geq 30,0$; *B. cereus* ATCC 10702 – 1,0; *S. aureus* ATCC 6538 – 0,5.

При анализе по показателю «Микробиологическая чистота» необходимо нейтрализовать антимикробное действие вспомогательных компонентов. При исследовании снятия антимикробной активности применяли метод разведения с использованием разбавителя жидкость № 2, содержащий в качестве неспецифического инактиватора твин-80 (3%), рекомендованный ГФ XIV [4].

Как показывают результаты эксперимента, при росте в агаризованной среде, тест-культуры проявляют чувствительность, даже с учетом разбавления препарата с использованием инактивирующего агента.

Рост тест-микроорганизма *B. cereus* ATCC 10702 не достигал контроля в разведении 1:200. После 48 часов инкубации в этом разведении количество жизнеспособных

клеток в среднем составило 6,5 КОЕ, в то время как в контроле без препарата этот показатель составил 11,5 КОЕ (рисунок 1).

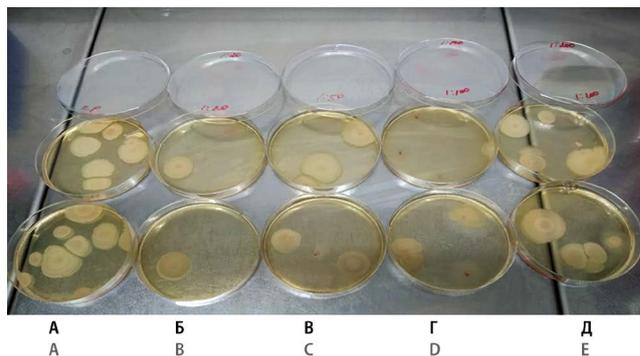


Рисунок 1. Проверка антимикробного действия в отношении *B. cereus* ATCC 10702:

А – контроль; **Б** – разведение 1:20; **В** – разведение 1:50; **Г** – разведение 1:100; **Д** – разведение 1:200

Figure 1. Checking the antimicrobial action against *B. cereus* ATCC 10702:

A – control; **B** – dilution 1:20; **C** – dilution 1:50; **D** – dilution 1:100; **E** – dilution 1:200

При установленных нормах допустимого содержания аэробных микроорганизмов (не более 100), метод прямого посева с использованием в качестве инактиватора раствора 3% твина-80 не приемлем для данного анализа. Кроме того, с учетом минимальной подавляющей концентрации в отношении грибных культур, для исследования их наличия необходимо разведение не менее 1:10 при допустимом содержании в лекарственной форме не более 10 КОЕ/мл, что также затрудняет получение достоверных результатов. Так как препарат проявляет высокую активность к грамположительным микроорганизмам, а также в меньшей степени, но активен в отношении грамотрицательных и грибных культур, для анализа микробиологической чистоты препарата исследовали возможность применения метода мембранной фильтрации (рисунки 2 и 3). Учитывая, что все компоненты, входящие в экспериментальный образец хорошо растворимы в воде, для испытания не требуется применять инактивирующих агентов. Результаты исследования возможности применения мембранной фильтрации показали, что промывка жидкостью № 1 в объеме 300 мл обеспечивает удаление препарата с мембраны и тем самым снимает антимикробное действие консерванта. Рост *B. cereus* и *A. brasiliensis* не отличался от контрольных вариантов, не содержащих препарат, количество колониеобразующих единиц соответствовало расчетному значению в посевной суспензии.

Для определения наличия отдельных видов бактерий: семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*, испытание включает использование среды для предварительной инкубации, а также селективных и дифференциально-диагностических питательных сред.

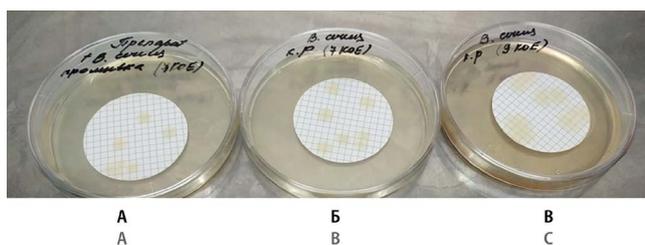


Рисунок 2. Проверка пригодности мембранной фильтрации для контроля по показателю «Микробиологическая чистота» спрея назального.

A – мембрана с препаратом после промывки инокулирована тест-культурой *B. cereus* ATCC 10702 – 7 КОЕ; Б – контрольная мембрана после фильтрации промывной жидкости без препарата, инокулирована в том же титре – 7 КОЕ; В – контрольная мембрана после фильтрации промывной жидкости без препарата, инокулирована в том же титре – 9 КОЕ

Figure 2. Checking the suitability of membrane filtration to control the «Microbiological purity» of the nasal spray.

A – the membrane with the preparation after washing was inoculated with a test culture of *B. cereus* ATCC 10702 – 7 CFU; B – control membrane after filtration of washing liquid without preparation, inoculated in the same titer – 7 CFU; C – control membrane after filtration of washing liquid without preparation, inoculated in the same titer – 9 CFU

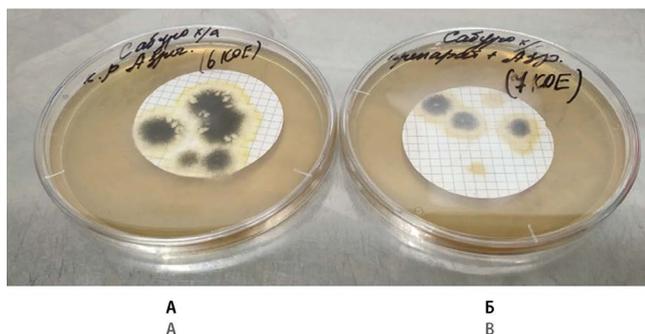


Рисунок 3. Проверка пригодности мембранной фильтрации.

A – контрольная мембрана после промывной жидкости без препарата инокулирована тест-культурой *A. brasiliensis* VKM F 1119 (6 КОЕ); Б – мембрана после промывки препарата с последней порцией внесена тест-культура (7 КОЕ)

Figure 3. Checking the suitability of membrane filtration.

A – the control membrane after washing liquid without the preparation was inoculated with the *A. brasiliensis* VKM F 1119 test culture (6 CFU); B – the membrane after washing the preparation, the test culture (7 CFU) was added with the last portion

В соответствии с этим проводили исследование на возможность выявления *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* в 1 грамме. Каждую культуру микроорганизма наносили на мембрану с последней порцией промывной жидкости после фильтрации препарата в разбавителе, мембрану погружали в соево-казеиновый питательный бульон. По истечении времени инкубации пересевали на соответствующие селективные среды.

В ходе исследования пригодности мембранной фильтрации для анализа присутствие в лекарственной форме отдельных видов микроорганизмов показало,

что для устранения антимикробного действия консерванта для промывки мембраны с образцом достаточно 300 мл жидкости № 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что препарат спрей назальный проявляет антимикробную активность в отношении *Bacillus cereus* ATCC 10702 в разведении 1:200 (МПК 1 мкг/мл) и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 в разведении 1: 200 (МПК 0,5 мкг/мл).

Методом мембранной фильтрации осуществлен анализ опытных образцов спрея назального по показателю «Микробиологическая чистота». В рамках проведенного исследования установлено, что образцы препарата отвечают требованиям по микробиологическому показателю для препаратов категории 2 в соответствии с ГФ XIV [4]. Проверка пригодности метода мембранной фильтрации для опытных образцов лекарственной формы показала, что антимикробное действие полностью снимается при промывании 300 мл жидкости № 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора вспомогательных компонентов назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;4:73–77.
2. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Разработка назального спрея Налтрексона гидрохлорида. *Научный форум: Медицина, биология и химия*. 2018. С. 69–73.
3. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора загустителя назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Сборник тезисов*.
4. ГФ XIV ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота».
5. Sandle T., Skinner K., Yeandle E. Optimal conditions for the recovery of bioburden from pharmaceutical processes: a case study. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. 2013;18(3):84–90.
6. Яремчук А. А., Хишова О. М., Половко Н. П. Микробиологическое обоснование использования бензалкония хлорида в мягкой лекарственной форме для наружного применения. *Вестник фармации*. 2012;2:9–45.
7. Jira T., Panzig B., Pohloudek-Fabini R. Antimicrobial activity of benzalkonium chloride in potential contact lens fluids. *Pharmazie*. 1982;37(8):587–90.

REFERENCES

1. Domnina Y.M., Kedik S.A., Suslov V.V., Shnyak E.A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;4:73–77. (In Russ.).
2. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E.A. Development of Naltrexone Hydrochloride Nasal Spray. *Nauchnyy forum: Meditsina, biologiya i khimiya*. 2018. P. 69–73. (In Russ.).
3. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Rationale for the choice of naltrexone hydrochloride nasal spray thickener. *Sbornik tezisov*. (In Russ.).
4. GF XIV OFS 1.2.4.0002.18 «Mikrobiologicheskaya chistota» (In Russ.).
5. Sandle T., Skinner K., Yeandle E. Optimal conditions for the recovery of bioburden from pharmaceutical processes: a case study. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. 2013;18(3):84–90.
6. Yaremchuk A. A., Khishova O. M., Polovko N. P. Microbiological rationale for the use of benzalkonium chloride in a soft dosage form for external use. *Vestnik farmatsii*. 2012;2:39–45. (In Russ.).
7. Jira T., Panzig B., Pohloudek-Fabini R. Antimicrobial activity of benzalkonium chloride in potential contact lens fluids. *Pharmazie*. 1982;37(8):587–90.