



Оригинальная статья/Research article

Количественное определение налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Ю. М. Домнина^{1,2*}, В. В. Суслов^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}, Е. В. Ворфоломеева^{1,2}, А. В. Мелешко^{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

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

Статья получена: 03.02.2020. Статья принята к печати: 18.03.2020

Резюме

Введение. Налтрексон – антагонист μ -опиоидных рецепторов является перспективным для лечения различных аутоиммунных и онкологических заболеваний при применении в дозах 1,5–5 мг/сут. На сегодняшний день лекарственные препараты, обеспечивающие такие дозировки налтрексона, отсутствуют. В связи с отсутствием на рынке препаратов, обеспечивающих такие дозировки налтрексона, нами был подобран состав назального спрея налтрексона гидрохлорида, содержащего водорастворимый термочувствительный полимер – полоксамер Kolliphor® P 407. Для данного состава необходимо разработать методику количественного определения активного вещества с учетом сложности состава.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали назальный спрей налтрексона гидрохлорида. Методика количественного определения налтрексона в исследуемом образце была разработана на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Dionex UltiMate 3000» (Thermo Scientific, США), оснащенный диодно-матричным детектором.

Результаты и обсуждение. Изучена возможность применения изократических и градиентных режимов хроматографирования для количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее. На основании этих результатов предложена новая методика определения с использованием градиентного режима, которая позволяет минимизировать влияние полимерного компонента в исследуемом образце на результаты анализа.

Заключение. Разработана новая методика, позволяющая осуществлять идентификацию и определять количественное содержание налтрексона гидрохлорида в назальном спрее, содержащем в качестве загустителя водорастворимый термочувствительный полоксамер в высокой концентрации. Разработанная методика была валидирована по параметрам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность.

Ключевые слова: назальный спрей, налтрексон, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, градиентный режим.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В. Количественное определение налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 98–104.

Quantitative Determination of Naltrexone Hydrochloride in a Nasal Spray by High-performance Liquid Chromatography

Yuliya M. Domnina^{1,2*}, Vasiliy V. Suslov^{1,2}, Stanislav A. Kedik^{1,2}, Elena V. Vorfolomeeva^{1,2}, Anastasiya V. Meleshko^{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

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

Received: 03.02.2020. Accepted: 18.03.2020

Abstract

Introduction. Naltrexone, an antagonist of μ -opioid receptors, is promising for the treatment of various autoimmune and oncological diseases when used in doses of 1.5–5 mg/day. To date, there are no medications that provide such dosages of naltrexone.

Aim. Development and validation of a method for the quantitative determination of naltrexone hydrochloride in a nasal spray by high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods. As an object of research, a naltrexone hydrochloride nasal spray was used. The quantitative determination of naltrexone in the test sample was developed using a Dionex UltiMate 3000 high-performance liquid chromatograph (Thermo Scientific, USA) equipped with a diode-matrix detector.

Results and discussion. The possibility of using isocratic and gradient chromatographic modes for the quantitative determination of naltrexone hydrochloride in the nasal spray was studied. Based on these results, a new method of determination using the gradient mode is proposed, which allows minimizing the influence of the polymer component in the test sample on the analysis results.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В., 2020

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V., 2020

Conclusion. A new technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) is proposed that allows identification and quantification of naltrexone hydrochloride in a nasal spray containing a high concentration of water-soluble heat-sensitive poloxamer as a thickener. The developed method was validated according to the parameters: correctness, precision, specificity, linearity.

Keywords: nasal spray, naltrexone, high-performance liquid chromatography, validation, gradient mode.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V. Quantitative determination of naltrexone hydrochloride in a nasal spray by high-performance liquid chromatography. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 98–104.

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексон – опиоидный антагонист с наибольшим сродством к μ -рецепторам [1] был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для медикаментозного лечения алкоголизма или расстройств, связанных с употреблением опиоидов [2]. Впоследствии, после первоначального использования доктором Бихари налтрексона в дозах от 1,5 мг до 5 мг в качестве вспомогательной терапии при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД) в клиническую практику для терапии аутоиммунных заболеваний была введена низкая доза налтрексона (НДН) [3, 4]. Однако, несмотря на это, до настоящего времени, лекарственные препараты, обеспечивающие такие дозировки налтрексона, отсутствуют. В связи с этим, нами был разработан состав назального спрея налтрексона гидрохлорида [5]. Одной из важных особенностей спрея является наличие в его составе водорастворимого термочувствительного полимера – полоксамера Kolliphor® P 407, загустевающего при повышении температуры, что должно предотвращать самопроизвольное вытекание препарата из полости носа.

В связи со сложностью состава лекарственной формы, из существующих методов применимых для количественного определения налтрексона [6–9], наиболее перспективным методом для анализа лекарственной формы является высокоэффективная жидкостная хроматография.

Цель данной работы заключалась в разработке и валидации методики количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

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

Таблица 1. Состав назального спрея

Table 1. The composition of the nasal spray

Компоненты	Производитель	Концентрация, %
Налтрексона гидрохлорид	Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915	2,5
Полоксамер Kolliphor® P 407	Geismar США, № GNA 18721 D, NF-USP/ Ph. Eur.	14,0
Лимонная кислота безводная, х.ч.	Химмед, Россия	0,01
Натрия хлорид, х.ч.	Химмед, Россия	0,2
Бензалкония хлорид	Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP	0,006
Вода очищенная (ФС.2.2.0020.15)		До 100

Оборудование

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «Dionex UltiMate 3000» (Thermo Scientific, США) оснащенный диодно-матричным детектором.

Установка для фильтрования Millipore (Merck, США).

Стерилизатор паровой ВК-75-1 (ТЗМОИ, Россия).

Используемые реактивы

Налтрексона гидрохлорид, субстанция-порошок (Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915, годен до 09.06.2020 г.), 1-пентилсульфонат натрия (Panreac, кат. № 245-208-4), ортофосфорная кислота (Fluka, кат. № 79606), ацетонитрил (Panreac, HPLC-gradient grade, кат. № 200-835-2).

Метод ВЭЖХ

Приготовление подвижной фазы А: в мерную колбу вместимостью 1000 мл количественно переносили навеску 0,870 г натрия 1-пентилсульфоната. Затем прибавляли 10 мл кислоты ортофосфорной 85 % и доводили раствор до метки водой для хроматографии. Полученный раствор отфильтровывали с помощью вакуумного насоса через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

В качестве подвижной фазы В использовали ацетонитрил для хроматографии.

Приготовление растворителя [начальной подвижной фазой (A : B = 86 : 14 %) об./об]: в емкость вместимостью 1000 мл помещали 860 мл подвижной фазы А и 140 мл подвижной фазы В и перемешивали.

Приготовление раствора налтрексона для анализа: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 62,5 мг (точная навеска) налтрексона гидрохлорида, растворяли начальной подвижной фазой (A : B = 86 : 14 % об./об.), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Затем 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали.

Приготовление раствора назального спрея для анализа: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл назального спрея, объем раствора доводили до метки раствором начальной подвижной фазы и перемешивали.

Приготовление раствора плацебо: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 14,0 г полоксамера Kolliphor® P 407, 0,01 г лимонной кислоты безводной, 0,2 г натрия хлорида, 0,006 г бензалкония хлорида приливали 70 мл холодной воды очищенной и оставляют при постоянном перемешивании при температуре +4 – +7 °С на 5–6 часов. Затем доводили до метки водой очищенной и перемешивали.

Приготовление раствора плацебо для анализа: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл раствора плацебо, доводили до метки раствором начальной подвижной фазы и перемешивали.

Приготовление раствора назального спрея подвергнутого воздействию высокой температуры: в пенициллиновый флакон помещали 20 мл назального спрея, закупоривали резиновой пробкой снабженной алюминиевым колпачком, флакон помещали в автоклав и нагревали до 120–122 °С при давлении 120 кПа, выдерживали в течение 15 минут и охлаждали.

Условия хроматографирования

Колонка: Phenomenex Kinetex XB C18 250 × 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм, размер пор 100 Å:

- скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин;
- длина волны детектирования 230 нм;
- температура колонки 25 °С;
- вводимый объем испытуемого образца 10,0 мкл.

Элюирование проводилось в градиентном режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Первоначальная попытка использовать условия хроматографирования, предложенные в ранее разработанной методике [9], оказалась неудачной. На хроматограмме образца спрея (рисунок 1) в отличие от хроматограммы раствора налтрексона (рисунок 2) наблюдается проявление дополнительных пиков. Это, вероятно, обусловлено блокировкой водораствори-

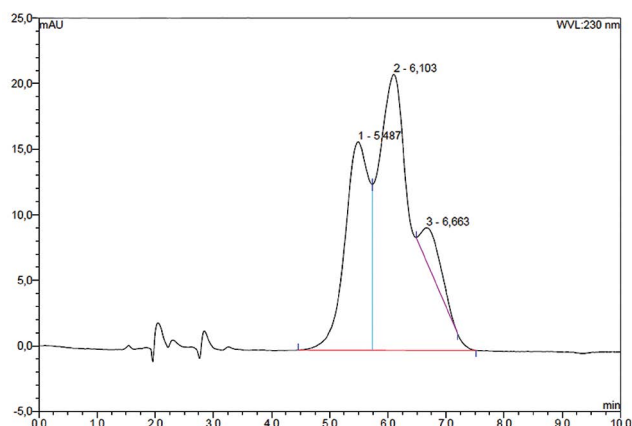


Рисунок 1. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида

Figure 1. Chromatogram of naltrexone hydrochloride spray test solution

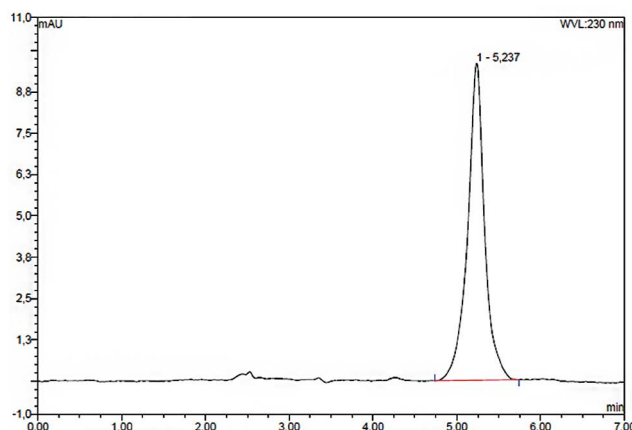


Рисунок 2. Хроматограмма раствора налтрексона гидрохлорида

Figure 2. Chromatogram of naltrexone hydrochloride solution

мым полоксамером активных центров сорбента колонки и как следствие ступенчатой десорбции определяемого компонента – налтрексона.

Для предотвращения данного эффекта нами были исследованы три градиентных режима элюирования (таблица 2) с использованием ион-парного реагента 1-пентилсульфонат натрия.

В первом режиме градиента (рисунок 3) в течение 20 минут возрастает элюирующая сила растворителя, активный компонент определяется на 11 минуте, но пик имеет неудовлетворительную асимметрию, так как активный компонент неэффективно сорбируется на колонке.

Замена формы градиента с линейной на ступенчатую (режим 2, рисунок 4) также не позволила провести корректное определение содержания налтрексона. Наблюдаемый с пятой по восьмую минуту при 70 % органической фазы пик налтрексона является малоэффективным. В тоже время, наблюдается подъем базовой линии, затрудняющий его интегрирование.

Таблица 2. Режимы градиентного элюирования

Table 2. Gradient Elution Modes

Режим 1		Режим 2		Режим 3 (Выбранная методика)	
Интервал, мин	Подвижная фаза В, % об	Интервал, мин	Подвижная фаза В, % об	Интервал, мин	Подвижная фаза В, % об
0	10	0–4	15	0–7	14
0–20	30	4–5	15→70	7–13	14→60
20–21	30–10	5–8	70	13–20	60→90
21–30	10	8–9	70→15	20–21	90→14
		9–17	15	21–26	14

В третьем режиме (рисунок 5) применяли двойной ступенчатый градиент. Сорбция налтрексона осуществлялась при возрастании элюирующей силы с 14 % до

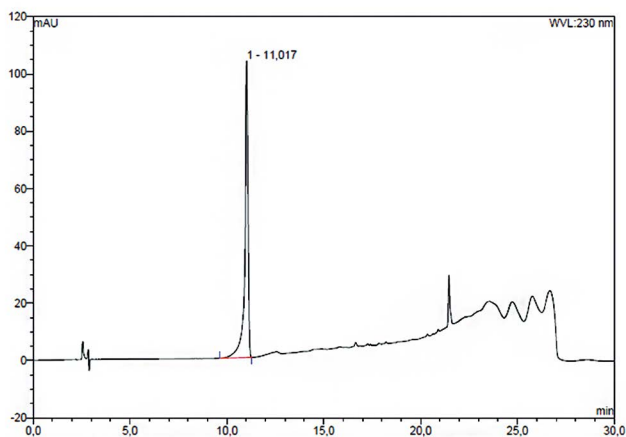


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 1)

Figure 3. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 1)

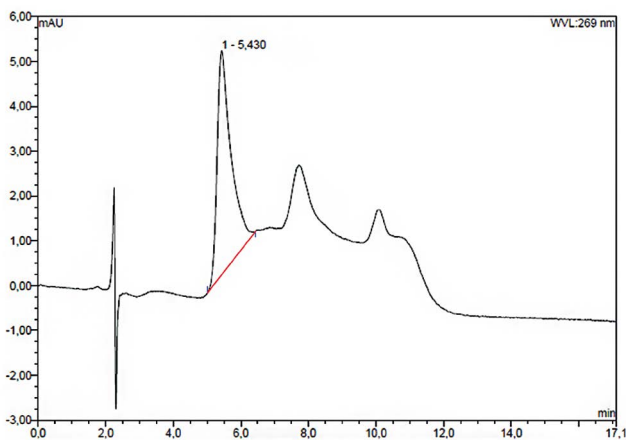


Рисунок 4. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 2)

Figure 4. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 2)

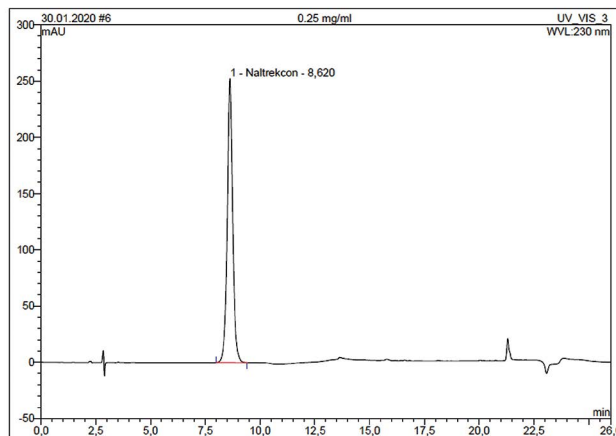


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 3)

Figure 5. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 3)

60 %, при дальнейшем увеличении фазы В с 60 % до 90 % происходит удаление полуксамера с поверхности сорбента.

Для определения налтрексона в составе назального спрея выбрали режим № 3. Данный режим можно варьировать при условии выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Она включает в себя:

- фактор асимметрии (As) для пика налтрексона на хроматограммах стандартного раствора должен находиться в диапазоне от 0,8 до 1,5;
- среднеквадратичное отклонение площадей пиков налтрексона на пяти хроматограммах стандартного раствора составляет не более 3 %.

Валидацию методики количественного определения налтрексона в назальном спрее проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV [10].

Специфичность подтверждали на основе сравнения результатов хроматографирования растворителя (рисунок 6), раствора назального спрея, не содержа-

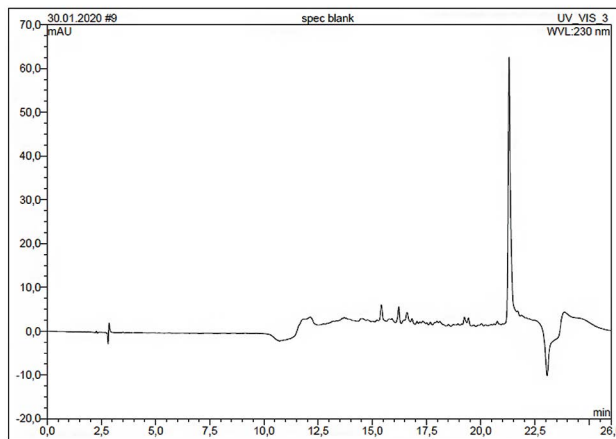


Рисунок 6. Хроматограмма растворителя

Figure 6. Chromatogram of solvent

щего налтрексона гидрохлорида («плацебо») (рисунок 7), раствора налтрексона гидрохлорида для анализа (рисунок 8), раствора назального спрея для анализа (рисунок 9) и раствора назального спрея подвергнутого воздействию высокой температуры (рисунок 10).

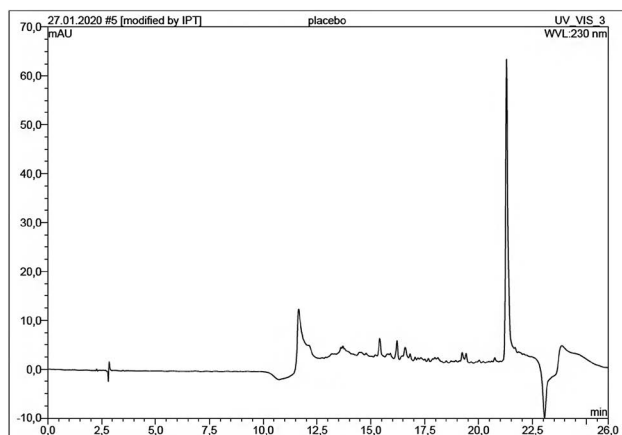


Рисунок 7. Хроматограмма «плацебо»

Figure 7. Chromatogram of placebo

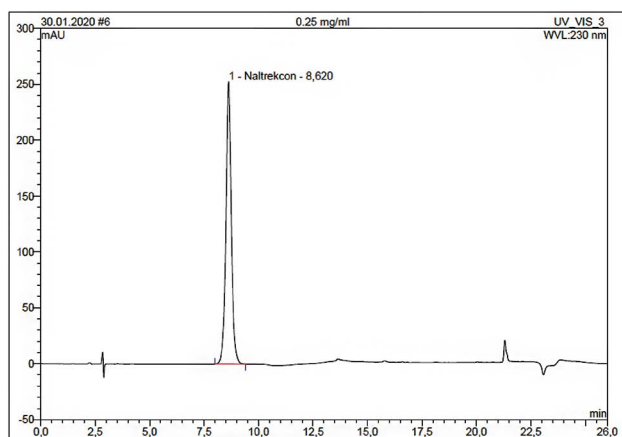
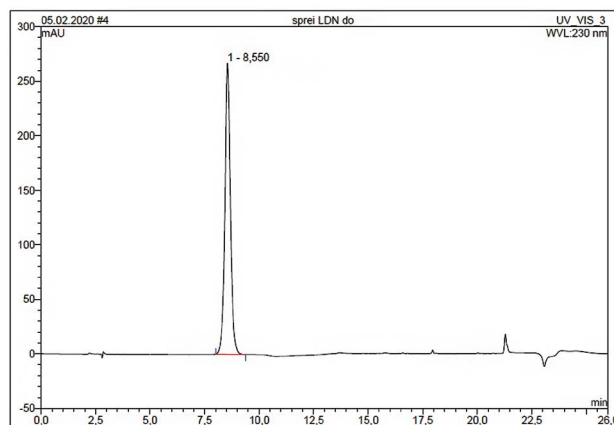


Рисунок 8. Хроматограмма раствора налтрексона гидрохлорида для анализа

Figure 8. Chromatogram of naltrexone hydrochloride solution

На представленных выше хроматограммах растворителя и «плацебо» (рисунки 6 и 7) отсутствуют пики, мешающие определению налтрексона гидрохлорида. Пик, соответствующий налтрексону гидрохлориду на хроматограмме, анализируемого образца назального спрея (рисунок 9), имеет такое же время удерживания, как пик на хроматограмме раствора налтрексона гидрохлорида для анализа (рисунок 8).

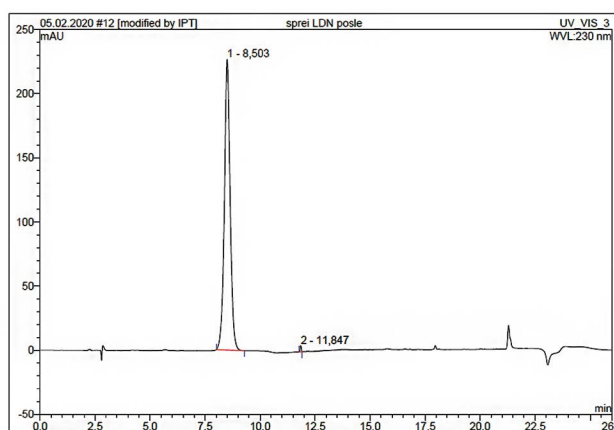
На хроматограмме раствора назального спрея, подвергнутого воздействию высокой температуры (рисунок 10), наблюдается уменьшение площади пика налтрексона гидрохлорида на 8,5 минуте и дополнительный пик на 11,8 минуте, образующейся в результате нагревания примеси. Пик, соответствующий



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU · min	Rel. Area %	Amount	Type
1	8,55	n.a.	266,987	77,237	100,00	n.a.	BMB
Total:			266,987	77,237	100,00	0,000	

Рисунок 9. Хроматограмма анализируемого образца назального спрея

Figure 9. Chromatogram of the test sample of the nasal spray



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU · min	Rel. Area %	Amount	Type
1	8,50	n.a.	226,613	67,800	99,63	n.a.	BMB
2	11,85	n.a.	4,812	0,254	0,37	n.a.	BMB*
Total:			231,425	68,054	100,00	0,000	

Рисунок 10. Хроматограмма раствора назального спрея, подвергнутого воздействию высокой температуры

Figure 10. Chromatogram of nasal spray solution exposed to high temperature

щий примеси, не мешает определению налтрексона гидрохлорида.

Прецизионность оценивали по параметрам повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность (таблицы 3 и 4).

Относительное стандартное отклонение (RSD) не должно превышать 4,0 %. Требования критерия прецизионность по параметру повторяемости выполнены.

Исследование параметра «Прецизионность по критерию внутрилабораторная воспроизводимость» было выполнено двумя сотрудниками независимо друг от друга на разных сериях препарата (таблица 4).

Таблица 3. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру повторяемость (сходимость)

Table 3. Statistical characteristics of the validated method for the repeatability (convergence) parameter

№	A, мАУхмин	C, мг/мл	Среднее	Стандартное отклонение, s	Относительная погрешность ε, %	Доверительный интервал	RSD, %
1	80,21	0,250	0,251	0,0002	0,084	0,251 ± 0,000	0,080
2	80,19	0,251					
3	80,26	0,251					
4	80,26	0,251					
5	80,28	0,251					
6	80,36	0,251					

Относительное стандартное отклонение (RSD) по результатам измерений в течение двух дней должно составлять не более 4,0 %. Критерий Фишера составил 0,138 %, что не превышает требуемый диапазон не более 5,05 %. Требования критерия прецизионность по параметру внутрилабораторной воспроизводимости выполнены.

Необходимым условием пригодности методики количественного определения активного компонента является наличие линейной зависимости площади пика от концентрации. Экспериментально полученные точки описываются уравнением прямой $y = 18005x + 292,68$ с коэффициентом корреляции $r = 0,994$. Величина коэффициента корреляции более 0,99, что удовлетворяет требованиям критерия «Линейность». На рисунке 11 представлено графическое отображение зависимости площади пика от концентрации.

Таблица 4. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру внутрилабораторная воспроизводимость

Table 4. Statistical characteristics of the validated method for the parameter intralaboratory reproducibility

№	A, мАУхмин	C, мг/мл	Среднее	Сандартное отклонение, s	Относительная погрешность ε, %	Доверительный интервал	RSD, %	
Сотрудник А	1	80,21	0,251	0,0002	0,084	0,251 ± 0,000	0,080	
	2	80,19						0,251
	3	80,26						0,251
	4	80,26						0,251
	5	80,28						0,251
	6	80,36						0,251
Сотрудник Б	1	81,27	0,255	0,0002	0,077	0,255 ± 0,000	0,073	
	2	80,27						0,255
	3	81,25						0,254
	4	81,28						0,255
	5	81,40						0,255
	6	81,33						0,255

Правильность методики оценивали при помощи растворов с заданным уровнем концентраций налтрексона гидрохлорида, сравнивая найденные значения с истинными (расчетным) данными (таблица 5).

Процент открываемости должен находиться в диапазоне 95–105 %; относительное стандартное отклонение (RSD) не более 4,0 %.

Робастность (устойчивость) методики оценивали по двум параметрам: влияние температуры колонки и концентрации ион-парного реагента в подвижной фазе. При изменении температуры +/-5 °C не происходит значительных изменений измеряемых парамет-

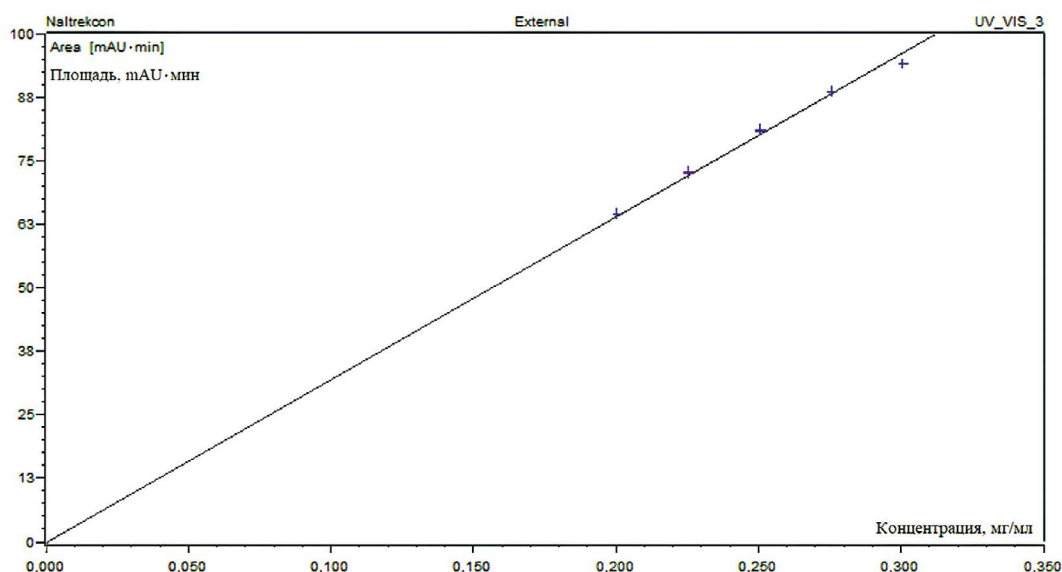


Рисунок 11. Графическое отображение параметра «Линейность»

Figure 11. Graphical display of the Linearity parameter

ров. При увеличении температуры на 10 °С и более происходит уменьшение времени удерживания активного компонента (рисунок 12).

Таблица 5. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру правильность

Table 5. Statistical characteristics of the validated method for the correctness parameter

Уровень концентрации, %	A, мАУхмин	Найдено С, мг/мл	Среднее	RSD, %	Процент открываемости, %
80	64,74	0,199	0,200	0,10	99,83
	64,77	0,200			
	64,86	0,200			
100	81,05	0,254	0,254	0,28	101,67
	81,40	0,255			
	81,02	0,254			
120	64,09	0,297	0,298	0,32	99,44
	94,64	0,299			
	94,48	0,299			

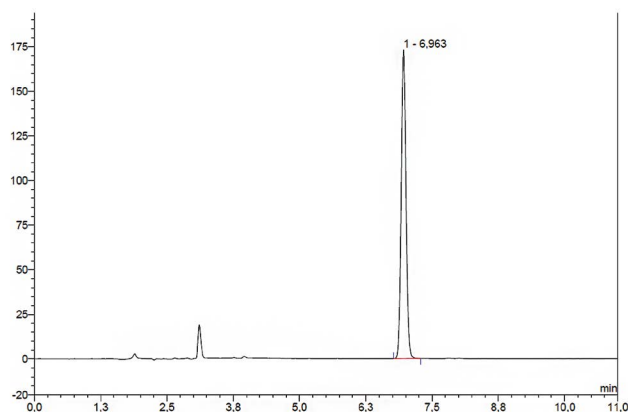


Рисунок 12. Хроматограмма испытуемого раствора при термостатировании колонки при 35

Figure 12. Chromatogram of the test solution during column temperature control at 35

Таким образом, методика устойчива в температурном диапазоне от 20 до 30 °С. При уменьшении концентрации ион-парного реагента до 4 ммоль/л также происходит уменьшение времени удерживания определяемого компонента (рисунок 13), ввиду образования меньшего количества ионных пар на поверхности сорбента.

В диапазоне концентраций ион-парного реагента 4,5–5,5 ммоль/л разработанная методика устойчива.

Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяли предъявленным критериям, что позволяет сделать заключение о корректности применения методики количественного определения налтрексона в препарате «Налтрексон гидрохлорид, спрей назальный».

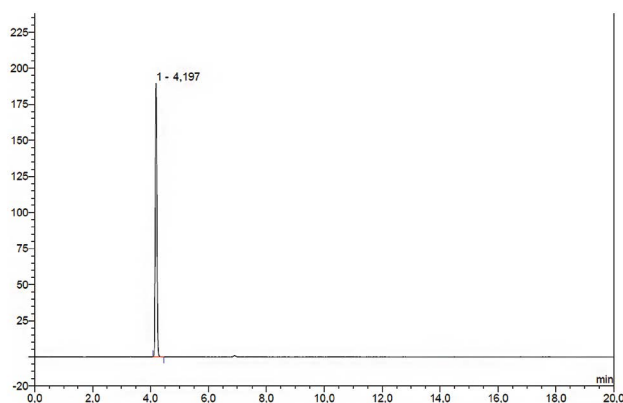


Рисунок 13. Хроматограмма испытуемого раствора при концентрации ион-парного реагента 4 ммоль/л

Figure 13. Chromatogram of the test solution at an ion-pair reagent concentration of 4 mmol/L

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика, позволяет с высокой точностью осуществлять идентификацию и определять количественное содержание налтрексона гидрохлорида в назальном спрее, содержащем полкамер в высокой концентрации.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Schumacher M., Basbaum A., Ramana N. Opioid Agonists & Antagonists. In Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 13th ed. Wiley: Hoboken, USA. 2014: 531.
- Sudakin D. Naltrexone: not just for opioids anymore. *Journal of Medical Toxicology*. 2016; 12(1): 71–75.
- Schopick J. Bernard Bihari, MD: low-dose naltrexone for normalizing immune system function. *Alternative therapies in health and medicine*. 2013; 19(2): 56.
- Li Z. et al. Low-dose naltrexone (LDN): A promising treatment in immune-related diseases and cancer therapy. *International immunopharmacology*. 2018; 61: 178–184.
- Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Shnyak E. A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Drug development & registration*. 2018; 4: 73–77 (in Russ.).
- Rezazadeh M., Yamini Y., Seidi S. Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmeferne from untreated biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 2011; 879(15-16): 1143–1148.
- Valiveti S. et al. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitation of naltrexone and 6β-naltrexol in guinea pig plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004; 810(2): 259–267.
- Clavijo C. et al. An automated, highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of the opiate antagonist naltrexone and its major metabolite 6β-naltrexol in dog and human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2008; 874(1-2): 33–41.
- Moreno-Vicente R. et al. Development and validation of a bioanalytical method for the simultaneous determination of heroin, its main metabolites, naloxone and naltrexone by LC-MS/MS in human plasma samples: Application to a clinical trial of oral administration of a heroin/naloxone formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015; 114: 105–112.
- Petrova E. A. Development of the composition and technology for producing an injectable dosage form of naltrexone with a modified release. Diss. ... Ph.D. – M.: 2014: 147 (in Russ.).
- Sarsambi P. S. et al. Reverse phase-HPLC method for the analysis of naltrexone hydrochloride in bulk drug and its pharmaceutical formulations. *Pharm. Lett*. 2010; 2: 294–299.