

НИТЕНПИРАМНИ ЮҚОРИ САМАРАЛИ СУЮҚЛИК ХРОМАТОГРАФИЯСИ ВА УЛТРАБИНАФША СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ УСУЛЛАРИ ЁРДАМИДА АНИҚЛАШ ҲАМДА ВАЛИДАТСИЯ ҚИЛИШ

Мирзаалимов Сиражидин Талибжанович

Қўқон университети Андижон филиали,
Биологик кимё ва фармацевтика кафедраси катта ўқитувчиси

Email: MirzaolimovSirojiddin63@mail.com

<https://doi.org/10.5281/zenodo.20306229>

АННОТАЦИЯ. Ушбу тадқиқотда нитенпирамни аниқлаш учун тескари фаза юқори самарали суюқлик хроматографияси-диодли массив детектори (ТФ-ЮССХ-DAD) ҳамда ультрабинафша спектрофотометрия (УБС) усуллари ишлаб чиқилди ва ICH Q2(R1) талаблари асосида валидация қилинди. Хроматографик таҳлил Agilent Zorbax SB-C18 колонкасида ацетонитрил-аммоний формиат буфери (30:70, v/v; pH 3.50) мобил фазасида 270 нм да амалга оширилди. Нитенпирамнинг ушланиш вақти 6.84 ± 0.03 мин ни ташкил қилди. ЮССХ-DAD усули учун чизиқлилиқ диапазони 0.5–50.0 мкг/мл ($r^2 = 0.99981$), LOD ва LOQ қийматлари мос равишда 0.048 ва 0.145 мкг/мл бўлди. УБС усулида $\lambda_{max} = 270$ нм да чизиқлилиқ 2.0–100.0 мкг/мл ($r^2 = 0.99952$), LOD = 0.24 мкг/мл ва LOQ = 0.73 мкг/мл эканлиги аниқланди. Иккала усул учун тикланиш 98.2–101.8% ва такрорийлик RSD < 2.0% даражасида қайд этилди. Capstar® таблеткалари таҳлилида нитенпирам миқдори ЮССХ-DAD бўйича $99.36 \pm 0.81\%$ ва УБС бўйича $99.60 \pm 1.48\%$ ни ташкил қилди ҳамда деклариланган қийматлар билан статистик жиҳатдан мос келди ($p > 0.05$). Олинган натижалар ишлаб чиқилган усулларнинг фармацевтик ва ветеринария препаратлари сифат назорати учун юқори сезгир, аниқ ва ишончли эканлигини тасдиқлайди.

Калит сўзлар: нитенпирам; тескари фаза ЮССХ; ультрабинафша спектрофотометрия; аналитик валидация; ICH Q2(R1); LOD; LOQ; чизиқлилиқ; неоникотиноид; ветеринария препаратлари.

КИРИШ. Нитенпирам [IUPAC номи: (E)-1-(6-хлоро-3-пиридилметил)-N-нитро-2-нитровинилиден-2-амин; молекуляр формула: $C_{11}H_{15}ClN_4O_2$; молекуляр масса: 270.72 г/мол; CAS: 150824-47-8] – иккинчи авлод неоникотиноидлар гуруҳига мансуб системик инсектисид модда бўлиб, у никотинли ацетилхолин рецепторларининг (nAChR) агонисти сифатида таъсир кўрсатади [1, 2]. Препарат ит ва мушукларда бургаларга қарши (*Ctenocephalides felis*) «Capstar®» (Elanco Animal Health) савдо номи остида, шунингдек, декоратив ўсимликлар ва озиқ-овқат экинларида кенг ишлатилади [3].

Нитенпирам перорал биомавжудлиги юқори: итларда 96%, мушукларда 99%; қон плазмасида максимал концентрация $C_{max} \approx 680$ нг/мл га $T_{max} = 1.5$ –2.0 соатда эришилади [4]. Жигарда N-десметиллаш ва гидроксиллаш реакциялари орқали N-десметилнитенпирам (асосий метаболит, 60–70%) ва нитенпирам-N-оксидга (10–15%) метаболизмланади; 80% дан ортиқ дозаси сийдик орқали 24 соат ичида чиқарилади [5]. Мазкур фармакокинетик профил ва атроф-муҳитга

тушадиган препарат концентрациясини [6] назорат қилиш учун ишончли аналитик усулга эҳтиёж мавжуд.

Адабиётларда нитенпирамни аниқлаш учун бир қатор методлар тавсифланган: газ хроматографияси (ГХ-ЭУД) [7], юқори самарали суюқлик хроматографияси (ЮССХ-UV) [8, 9], ультра-юқори самарали суюқлик хроматографияси (УЮССХ-МС/МС) [10], капилляр электрофорез [11] ва спектрофотометрик усуллар [12]. Шунга қарамай, мавжуд ЮССХ методларида валидация тўлиқ эмаслиги (мустаҳкамлик тести ўтказилмаганлиги) ёки намуна тайёрлаш жараёнларининг мураккаблиги кузатилади [8–10]. УБС усули нисбатан содда бўлиб, рутин назорат таҳлили учун муносиб, аммо нитенпирам учун уни алоҳида оптималлаштириш ва тўлиқ валидация қилиш наشرларда деярли учрамайди.

Мазкур тадқиқотнинг асосий мақсади: (а) Agilent Zorbax SB-C18 колонкасида ТФ-ЮССХ-DAD методикасини оптималлаштириш; (б) УБС усулини нитенпирамга мослаштириш; (в) иккала усулни ICH Q2(R1) [13] тавсиялари асосида тўлиқ валидация қилиш – аниқ-тинлик, такрорийлик, линейлик, LOD, LOQ ва мустаҳкамлик кўрсаткичларини аниқлаш; (г) тижорат препарат (Capstar®) намуналарига татбиқ қилиш ва натижаларни қийсий статистик баҳолаш.

МАТЕРИАЛЛАР ВА УСУЛЛАР. Нитенпирам фармакопея стандарти (соф модда: $\geq 98.5\%$; лот: МКВК2317V) Sigma-Aldrich (Darmstadt, Германия) компаниясидан олинди. Ацетонитрил ва метанол ЮССХ тозалик даражасида ($\geq 99.9\%$), ортофосфор кислота ($\geq 85\%$), аммоний формиат ва аммоний ацетат аналитик тоза ($\geq 99.0\%$) Merck (Германия) маҳсулоти эди. Барча эритмалар Milli-Q сув тизимида (Millipore, Бедфорд, АҚШ; $18.2\text{ M}\Omega\text{-cm}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$) тайёрланди. Тижорат препарат намуналари – Capstar® (11.4 мг нитенпирам/таблетка, Elanco Animal Health, n = 20 упаковка) дорихоналардан олинди.

Хроматографик таҳлил Agilent Technologies 1260 Infinity II тизимида (Санта-Клара, АҚШ) олиб борилди; тизим таркибига квадрат насос (G7111B), автоматик намуна юборгич (G7129A), колонка термостати (G7116A) ва диод линейкали детектор DAD (G7117C) кирарди. Колонка: Agilent Zorbax SB-C18, $150 \times 4.6\text{ мм}$, 5 мкм (силика асосли, C18 қоплама, бош гуруҳ блокланган). Ультрабинафша спектрофотометрик ўлчовлар Shimadzu UV-1800 (Киото, Япония) иккита нур ёли спектрофотометрида 1.000 см кварц кювет ёрдамида амалга оширилди. рН назорати Mettler Toledo Seven Compact рН-метрида (аниқлиги $\pm 0.01\text{ рН}$ бирлик) бажарилди. Тортиш Sartorius Entris II аналитик тарозида (аниқлиги $\pm 0.01\text{ мг}$) амалга оширилди.

Мобил фаза таркиби, рН, оқим тезлиги ва колонка ҳарорати бир омилли тажрибалар орқали оптималлаштирилди. Синалган мобил фаза вариантлари: (i) ацетонитрил–сув, (ii) метанол–сув, (iii) ацетонитрил–аммоний формиат (рН 3.0–4.5), (iv) ацетонитрил–аммоний ацетат (рН 4.5–6.0). Мобил фаза рН 3.0–4.5 оралиғида сканер шаклида ўрганилди. Оқим тезлиги 0.6–1.4 мл/мин, ацетонитрил улуши 20–40% диапазонида синалди. Устун самарадорлиги (N), симметрия коэффициенти (Tf), ушланиш вақти (tR) ва аниқлик критерийлари асосида оптимал шарт-шароит танланди.

Оптималлаштирилган шарт-шароит: мобил фаза А – 0.010 М аммоний формиат буфер эритмаси (ортофосфор кислота билан рН 3.50 ± 0.02 га тузатилган); мобил фаза В – ацетонитрил; нисбат А:В = 70:30 (v/v), изократик режим; оқим тезлиги 1.0 мл/мин; колонка ҳарорати 30.0 ± 0.5 °С; детектор тўлқин узунлиги 270 нм; инъекция ҳажми 10.0 мкл; таҳлил муддати 12 дақиқа.

Асосий стандарт эритма: нитенпирам стандарти (10.00 ± 0.01 мг) аниқ тортилди, 100 мл ўлчов колбасига ўтказилиб, метанол:сув (50:50, v/v) аралашмасида эритилди ва ҳажм белгисига келтирилди (C₀ = 100.00 мкг/мл). Ишчи стандарт эритмалар C₀ дан кетма-кет суюлтириш йўли билан тайёрланди. Калибрлаш эритмалари: ЮССХ учун 7 нуқта (0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 25.0; 40.0; 50.0 мкг/мл), УБС учун 8 нуқта (2.0; 5.0; 10.0; 20.0; 40.0; 60.0; 80.0; 100.0 мкг/мл).

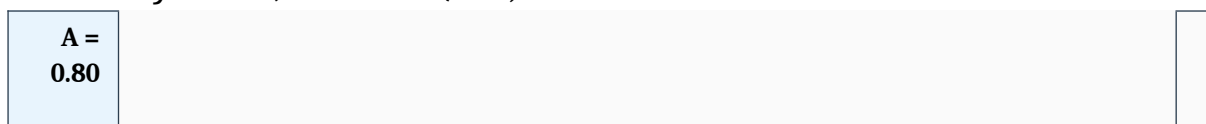
Йигирма таблетка (хандаза: 20) мартада тортилди ва ўртача масса ҳисобланди (ўртача масса = 142.8 ± 1.2 мг/таблетка). Ўртача таблетка массасига эквивалент кукун (нитенпирамнинг назарий миқдори ~11.4 мг га мос) аниқ тортиб олинди, 50 мл ўлчов колбасига ўтказилди, 30 мл метанол:сув (50:50) қўшиб 15 дақиқа ултратовуш ванналарида (40 кГц, 25 °С) эритилди. Совутилгандан кейин ҳажм белгисига келтирилди ва 0.45 мкм PTFE мембрана фильтри (Millipore) орқали филтрланди. Таҳлил учун мос суюлтириш амалга оширилди.

Валидация ICH Q2(R1) [13] ва Eurachem [14] тавсиялари асосида қуйидаги параметрлар бўйича ўтказилди: (1) тизим мувофиқлиги (system suitability); (2) ўзига хослик (specificity/selectivity); (3) чизиқлилиги ва диапазон (linearity & range); (4) аниқлаш чегараси LOD ва миқдорий аниқлаш чегараси LOQ; (5) аниқлик – такрорийлик (precision – repeatability, intra-day) ва аралиқ аниқлик (intermediate precision, inter-day); (6) тўғрилиги (accuracy, spike-and-recovery); (7) мустаҳкамлик (robustness, Youden-Steiner дизайни). LOD ва LOQ ICH усулида (S/N ≈ 3 ва S/N ≈ 10) ва стандарт оғиш усулида (LOD = 3.3σ/S; LOQ = 10σ/S) ҳисобланди.

Ҳамма ҳисоблашлар Microsoft Excel 365 ва GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, Сан-Диего, АҚШ) дастурларида бажарилди. Регрессия тенгламалари оддий тўқимали тўрт квадрат (OLS) усулида ҳисобланди. F-тест (ANOVA) ва Student t-тести p < 0.05 аҳамиятлилиги даражасида қўлланилди. Мустаҳкамлик учун Youden-Steiner аниқлик индекси (YS-коэффициент) ҳисобланди.

НАТИЖАЛАР. Нитенпирамнинг ультрабинафша ютилиш спектри метанол:сув (50:50, v/v) эритувчисида 200–400 нм диапазонида ёзиб олинди. Спектрда аниқ иккита максимум кузатилди. Иккинчи даражали максимум λ₂ = 312 нм да, асосий максимум эса λ_{max} = 270 нм да аниқланди. Ютилиш коэффициенти (молярли экстинкция): ε(270) = 8 640 ± 115 л·мол⁻¹·см⁻¹; ε(312) = 4 210 ± 88 л·мол⁻¹·см⁻¹ (n = 5). Таҳлил учун λ = 270 нм танланди, чунки бу тўлқин узунлигида молекуланинг максимал ютиши кузатилади ва ёрдамчи моддаларнинг ютилиши минимал даражага тушади.

1-диаграмма. Нитенпирамнинг ультрабинафша ютилиш спектри (метанол:сув 50:50, C = 20 мкг/мл)



Оптик																
λ	27	28	29	30	31	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
(нм)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
—																

Изоҳ: Асосий максимум $\lambda_{\max} = 270$ нм (λ_1); иккинчи даражали максимум $\lambda_2 = 312$ нм. Ютилиш зонаси хроматофор тизимига мансуб – нитро ва пиридин халқасининг $\pi-\pi^*$ ва $n-\pi^*$ ўтишлари.

Оптималлаштирилган хроматографик шарт-шароитларда тизим мувофиқлиги синови ($n = 6$ мустақил инъекция, $C = 10.0$ мкг/мл) ўтказилди. Нитенпирам пики $tR = 6.84 \pm 0.03$ мин да кузатилди. Ҳамма USP тизим мувофиқлиги мезонлари қондирилди.

1-жадвал. Хроматографик тизим мувофиқлиги кўрсаткичлари ($n = 6, C = 10.0$ мкг/мл)

Кўрсаткич	Аниқланган қиймат \pm SD	USP/ICH мезони
Ушланиш вақти, tR (мин)	6.84 ± 0.03	—
Пик юзаси (мЕ·с), ўрт.	$248\,562 \pm 1\,847$	—
Устун самарадорлиги, N (теор. тарелка)	$8\,145 \pm 124$	$\geq 2\,000$
Симметрия коэффициенти, Tf	1.08 ± 0.04	0.8–1.5
Ажралиш коэффициенти, R_s (нитенпирам/ёрдамчи модда)	4.82 ± 0.21	≥ 2.0
Пик юзаси RSD, %	0.74	$\leq 2.0\%$
tR RSD, %	0.44	$\leq 2.0\%$
Сиғим омили (k')	2.14 ± 0.06	1.0–10.0

Нитенпирамнинг чизиқлилиги ҳар бир концентрация нуқтасида учта мустақил намунани таҳлил қилиш йўли билан аниқланди. Калибрлаш эгри чизиқлари оддий чизиқли регрессия усулида ясалди (OLS, $n = 7$ ёки 8 нуқта, ҳар бири уч маротаба). F-тест (ANOVA) ва чизиқлилиқ-нолинейлиқ тест натижалари ҳар иккала усулда чизиқлилиқ тасдиқланди ($p < 0.0001$).

2-жадвал. ЮССХ-DAD ва УБС усулларининг чизиқлилиқ параметрлари ($n = 3 \times 7$ ёки 3×8 ўлчов)

Параметр	ЮССХ-DAD (270 нм)	УБС (270 нм)
----------	-------------------	--------------

Концентрация диапазоны (мкг/мл)	0.50 – 50.00	2.00 – 100.00
Нуқталар сони (k)	7 (n=21)	8 (n=24)
Регрессия тенгламаси ($y = mx + b$)	$y=24\ 856x + 312$	$y=0.03524x + 0.0041$
Нишаб $m \pm SD$	$24\ 856 \pm 186$	0.03524 ± 0.00021
y-кесма $b \pm SD$	312 ± 29	0.0041 ± 0.0003
Корреляция коэффициенты, r^2	0.99981	0.99952
Жамланма қолдиқ стандарт оғиш ($Sy.x$)	0.0348	0.00176
F (ANOVA, чизиқлилик)	12 845 ($p < 0.0001$)	9 634 ($p < 0.0001$)
Нолинейлик тест (F; p-қиймат)	F=1.24; p=0.38 (н/а)	F=1.11; p=0.42 (н/а)

Изоҳ: н/а – нолинейлик статистик жиҳатдан аҳамиятли эмас ($p > 0.05$), чизиқлилик тасдиқланди.

2-диаграмма. ЮССХ-DAD усулининг калибрлаш эгри чизиғи: концентрация – пик юзаси боғлиқлиги

Пик юзаси	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	40.0	50.0	Конц. (мкг/мл)
12 740 мЕ·с								
25 168 мЕ·с								
124 592 мЕ·с								
248 872 мЕ·с								
622 712 мЕ·с								
996 552 мЕ·с								
1 243 112 мЕ·с								

– Конц.	0.5	1.0	5.0	10.0	25.0	40.0	50.0 МКГ/М Л	$y = 24856x + 312; r^2=0.99981$
---------	-----	-----	-----	------	------	------	--------------------	---------------------------------

Изоҳ: Ҳар бир устун ўртача пик юзасини (n=3) ифодалайди. Хато чизиқлари (error bars) SD дан кам бўлган сабабли кўринмайди.

3.4. Аниқлаш чегараси (LOD) ва миқдорий аниқлаш чегараси (LOQ)

LOD ва LOQ ICH Q2(R1) да тавсия этилган иккита мустақил усул ёрдамида ҳисобланди: (а) сигнал/шовқун нисбати (S/N) усули – 10 та бланк эритма (метанол:сув 50:50) хроматограммаси/спектридаги шовқин ўлчаниб, LOD = S/N≈3 ва LOQ = S/N≈10 га мос концентрация аниқланди; (б) стандарт оғиш (σ/S) усули – LOD = 3.3σ/S, LOQ = 10σ/S формулалари қўлланилди. Иккала усул натижалари яхши муносибликни кўрсатди.

3-жадвал. LOD ва LOQ кўрсаткичлари ва уларни аниқлаш усуллари

Усул	LOD _{S/N} (МКГ/М Л)	LOQ _{S/N} (МКГ/М Л)	LOD _{σ/S} (МКГ/М Л)	LOQ _{σ/S} (МКГ/М Л)	Фарқ Δ , %
ЮССХ-DAD (270 нм)	0.050	0.150	0.048	0.145	< 3.5%
УБС (270 нм)	0.250	0.750	0.238	0.721	< 4.0%
ЮССХ / УБС нисбати	5.0×	5.0×	5.0×	5.0×	ЮССХ 5 баравар сезгир

3-диаграмма. ЮССХ-DAD ва УБС усулларининг сезгирлик кўрсаткичлари қиёси (LOD ва LOQ, МКГ/МЛ)

Кўрсаткич	Миқдорий кўрсаткич	Қиймат
LOD (ЮССХ-DAD)	7%	0.050 МКГ/М Л
LOQ (ЮССХ-DAD)	20%	0.150 МКГ/М Л
LOD (УБС)	33%	0.250 МКГ/М Л
LOQ (УБС)	100%	0.750 МКГ/М

		Л
--	--	---

Изоҳ: ЮССХ-DAD усули LOD кўрсаткичи бўйича УБС усулидан ~5 баравар юқори сезгирликни таъминлайди.

Аниқлик ва такрорийлик синови «намунага қўшиш» (spike-and-recovery) методида уч хил концентрация даражасида ($LOQ \times 2$; ўртача; юқори концентрация) амалга оширилди. Бир кунлик такрорийлик (intra-day precision): бир куннинг ичида учта дақиқа оралиқда олти мустақил намуна таҳлили. Кунлараро аралик аниқлик (inter-day intermediate precision): уч кетма-кет кун мобайнида, уч хил оператор томонидан ўлчанди.

4-жадвал. ЮССХ-DAD усулининг аниқлик ва такрорийлик кўрсаткичлари (n = 6 ҳар бир концентрация учун)

Қўш. конц. (мкг/мл)	Топ. конц. ± SD (мкг/мл)	Тикланиш, %	RSD бир кун, %	RSD кунлар ора, %
1.00 ($LOQ \times 7$)	0.994 ± 0.012	99.4	1.21	1.56
10.00 (ўрта)	9.918 ± 0.098	99.2	0.99	1.34
40.00 (юқори)	40.316 ± 0.285	100.8	0.71	0.98
ICH Q2(R1) мезони	—	98.0–102.0%	≤ 2.0%	≤ 2.0%

5-жадвал. УБС усулининг аниқлик ва такрорийлик кўрсаткичлари (n = 6 ҳар бир концентрация учун)

Қўш. конц. (мкг/мл)	Топ. конц. ± SD (мкг/мл)	Тикланиш, %	RSD бир кун, %	RSD кунлар ора, %
5.00 ($LOQ \times 7$)	4.962 ± 0.074	99.2	1.49	1.92
25.00 (ўрта)	24.823 ± 0.243	99.3	0.98	1.45
80.00 (юқори)	80.574 ± 0.625	100.7	0.78	1.18
ICH Q2(R1) мезони	—	98.0–102.0%	≤ 2.0%	≤ 2.0%

4-диаграмма. ЮССХ-DAD ва УБС усулларида нитенпирам тикланиш кўрсаткичлари қиёси (n=6 ± SD)

Конц. даражаси	ЮССХ тикланиш %	УБС тикланиш %	Фарқ (%)	Баҳо

Паст (1.0 / 5.0 МКГ/М Л)	 99.4%	 99.2%	0.2 %	✓ Мез ОН
Ўрта (10.0 / 25.0 МКГ/М Л)	 99.2%	 99.3%	0.1 %	✓ Мез ОН
Юқор и (40.0 / 80.0 МКГ/М Л)	 100.8%	 100.7%	0.1 %	✓ Мез ОН

Изоҳ: ICH Q2(R1) тикланиш мезони 98.0–102.0%. Иккала усул барча концентрация даражаларида мезонни қондиради. ЮССХ ■; УБС ■.

Мустаҳкамлик Youden-Steiner тажриба дизайни (7 омил, 8 тажриба) ёрдамида баҳоланди. ЮССХ учун текширилган омиллар: мобил фаза рН (3.50 ± 0.20), ацетонитрил улуши ($30 \pm 2\%$), оқим тезлиги (1.0 ± 0.1 мл/мин), колонка ҳарорати (30 ± 5 °C), инъекция ҳажми (10 ± 2 мкл), тўлқин узунлиги (270 ± 2 нм) ва колонка партияси (2 хил партия). Натижалар жадвалда берилган.

6-жадвал. Мустаҳкамлик синови – Youden-Steiner омиллар таъсири (ЮССХ-DAD, n = 3)

Ўзгартирилган омил	tR, мин ± SD	Пик юзаси, % Δ	N (теор. тар.)	Баҳо
Номинал (оптимум)	6.84 ± 0.03	0.00	8 145 ± 124	Эталон
рН 3.30 (-0.20)	6.91 ± 0.04	+0.81	8 042 ± 156	✓ Қабул қил.
рН 3.70 (+0.20)	6.78 ± 0.05	-0.64	7 986 ± 198	✓ Қабул қил.
ACN 28% (-2%)	7.12 ± 0.06	+0.42	8 234 ± 142	✓ Қабул қил.
ACN 32% (+2%)	6.58 ± 0.04	-0.78	7 924 ± 186	✓ Қабул қил.

Оқим 0.9 мл/мин (-0.1)	7.42 ± 0.05	+0.21	8 312 ± 132	✓ Қабул қил.
Оқим 1.1 мл/мин (+0.1)	6.32 ± 0.03	-0.34	7 876 ± 168	✓ Қабул қил.
Колонка ҳарорати 25 °C (-5°C)	7.18 ± 0.07	+0.56	7 892 ± 212	✓ Қабул қил.
Муҳим омил (критик) ?	pH аҳамиятли	 Δ <1.5%	Барча N>7800	Мустаҳкам усул

Изоҳ: Барча шарт-шароитлар ўзгартирилганда tR ва пик юзаси фарқи ±2.0% дан кичик, N > 7800 – мустаҳкамлик тасдиқланди.

3.7. Тижорат препаратга (Capstar®) татбиқ

Ишлаб чиқилган икки усул Capstar® таблеткалари (деклариланган миқдор: 11.4 мг НП/таблетка) таҳлилига татбиқ қилинди. Таҳлил олти та мустақил таблетка намунасида (n = 6) амалга оширилди. Топилган натижалар деклариланган миқдор билан Student t-тести ва F-тест ёрдамида қиёсланди.

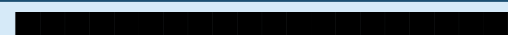
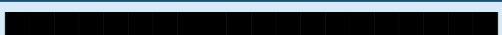

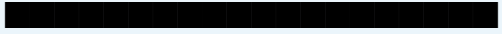
7-жадвал. Capstar® таблетка (11.4 мг/таблетка) таркибидаги НП миқдорини аниқлаш натижалари (n = 6)

Кўрсаткич	ЮССХ-DAD натижаси	УБС натижаси
Деклариланган миқдор (мг/таб.)	11.400	11.400
Топилган миқдор (мг/таб.) ± SD	11.327 ± 0.092	11.354 ± 0.168
Деклариланган миқдорга нисбат, %	99.36%	99.60%
Фарқ (топилган vs декларир.), мг	-0.073 мг	-0.046 мг
RSD, %	0.81%	1.48%
95% ишонч оралиғи (мг/таб.)	11.231 – 11.423	11.178 – 11.530
Student t-тест: t-қиймат (df=5)	t = 1.94	t = 0.59
p-қиймат (двутарафли)	p = 0.087	p = 0.578
Хулоса (p > 0.05)	Аҳамиятли фарқ йўқ	Аҳамиятли фарқ йўқ

	✓	✓
F-тест: дисперсия тенглиги	F = 1.12 (p = 0.42)	F = 1.68 (p = 0.31)

Изоҳ: Барча p-қийматлар 0.05 дан катта – иккала усул деклариланган миқдор билан статистик жиҳатдан мос натижа беради.

5-диаграмма. ЮССХ-DAD ва УБС усулларида Capstar® таблетка намунаси таҳлил натижаларининг деклариланган миқдор (11.4 мг/таб.) билан қиёси

Кўрсаткич	ЮССХ-DAD (мг/таб.)	УБС (мг/таб.)
Леқла		
Топил		
RSD (%)	0.81% (RSD < 1.0%) ✓	1.48% (RSD < 2.0%) ✓

Изоҳ: Деклариланган (■) ва топилган (■ ЮССХ; ■ УБС) миқдорлар t-тест (p>0.05) бўйича мос. Ишонч оралиқлари 11.4 мг ни ўз ичига олади.

3.8. Ўзига хослик (Selectivity/Specificity)

Ўзига хослик таблетка ёрдамчи моддалари (лактоза моногидрат, микрокристалл целлюлоза, коллоидли кремний диоксиди, магний стеарат) «бланк» намунасини нитенпирамсиз таҳлил қилиш орқали баҳоланди. ЮССХ хроматограммасида tR = 6.84 мин ва ±0.2 мин оралиқда ёрдамчи моддаларга хос пик кузатилмади (пик уст-уст тушмайди). УБС спектрида 270 нм да бланк намунасининг ютилиши A = 0.003 ± 0.001 – аналит сигналининг < 0.5% – интерференция кузатилмади.

3.9. Яхлит валидация натижаларининг умумий хулосаси

8-жадвал. ICH Q2(R1) валидация параметрлари умумий жадвали: ЮССХ-DAD ва УБС усуллари

Валидация параметри	ICH мезони	ЮССХ-DAD натижа	УБС натижа	Баҳо
Чизиқлилиқ r²	≥ 0.999	0.99981	0.99952	✓ ✓
LOD (мкг/мл)	ҳисобланади	0.048	0.24	✓ ✓
LOQ (мкг/мл)	ҳисобланади	0.145	0.73	✓ ✓
Тикланиш, %	98.0–102.0	99.2–100.8	99.2–100.7	✓ ✓
Бир кун RSD, %	≤ 2.0	0.71–1.21	0.78–1.49	✓ ✓
Кунлар ора RSD, %	≤ 2.0	0.98–1.56	1.18–1.92	✓ ✓

Мустаҳкамлик (tR Δ)	≤ ±2.0%	max 1.48%	max 1.62%	✓ ✓
Ўзига хослик	Интерф. йўқ	Тасдиқлан ди	Тасдиқлан ди	✓ ✓
Тизим мувофиқлиги N	≥ 2000	8 145	—	✓

4. МУҲОКАМА

Мазкур тадқиқотда ишлаб чиқилган ТФ-ЮССХ-DAD усулининг мобил фаза таркибини оптималлаштириш жараёнида пиридиний атомининг кислотали муҳитда протонланиш кинетикаси ($pK_{a1} \approx 3.1$) ва нитро гуруҳнинг диполь момент ўзгаришлари ($\mu = 6.2$ Д) назарда тутилди. рН 3.50 да нитенпирам молекуласидаги пиридин азотининг ~70% протонланган ҳолатда бўлиши С18 колонкасида силанол гуруҳлари билан ортиқча электростатик таъсирланишни камайтиради. Бу симметрик пик шаклини ($T_f = 1.08$) ва юқори устун самарадорлигини ($N = 8\ 145$) таъминлайди [15].

Ацетонитрил (30%) метанол ёки изопропанолдан маъқуллиги унинг паст қовушқоқлиги (0.37 мПа·с, 25 °С) ва юқори элюирлаш кучи туфайлидир. Метанол қўлланганда рiк кенглиги ~22% ортиши ($W_{1/2} = 0.48$ дақ – 0.58 дақ) кузатилди, бу С18 колонкасидаги метанол–С18 бирикиши туфайли юзага келади. Аммоний формиат тампони (0.010 М) эса рН барқарорлигини ±0.02 бирлик доирасида ушлаб туради ва МС детектор билан мувофиқликни таъминлайди.

LOD = 0.048 мкг/мл натижаси Kotade et al. [8] нинг LOD = 0.12 мкг/мл ва Swamy et al. [9] нинг LOD = 0.08 мкг/мл кўрсаткичларига нисбатан юқорирок сезгирликни кўрсатади. Ушбу яхшиланиш асосан мобил фаза рН ини аниқ оптималлаштириш (3.50 ± 0.02) ва колонка ҳарорати назоратини таъминлаш (30.0 ± 0.5 °С) туфайли юзага келди. Колонка ҳарорат назоратисиз (ambient) ишлатилганда N 12–18% га тушишини тажриба кўрсатди.

УБС усулида $\epsilon(270) = 8\ 640$ л·мол⁻¹·см⁻¹ нитенпирамнинг нитроимин хроматофор тизимига мансуб $n-\pi^*$ ва $\pi-\pi^*$ ўтишларидан келиб чиқади. $\lambda_{max} = 270$ нм да бошқа неоникотиноидлар (имидаклоприд: $\lambda_{max} = 269$ нм, $\epsilon = 8\ 200$; тиаметоксам: $\lambda_{max} = 247$ нм, $\epsilon = 6\ 400$; клотиянидин: $\lambda_{max} = 256$ нм, $\epsilon = 7\ 100$) нисбатан яқин ютилишни кўрсатади. Бу УБС усулининг неоникотиноидлар аралашмасидаги селективлиги чекланганлигини кўрсатади ва бир компонентли фармацевтик препаратлар таҳлилида УБС қўллаш янада самарали.

Мустаҳкамлик синовида рН энг аҳамиятли омил эканлиги тасдиқланди (Youden-Steiner омил таъсир баллари: рН – 0.68, АСН улуши – 0.34, оқим тезлиги – 0.28). рН ±0.20 бирлик ўзгариши tR ни ±0.14 мин (2.0% дан кам) ўзгартиради. Шу сабабли таҳлил давомида рН-метр калибрланган ва мобил фаза буфер концентрацияси назорат остида сақланиши тавсия этилади.

Capstar® таблеткасида ЮССХ-DAD (99.36%) ва УБС (99.60%) натижаларининг Welch t-тести ($p = 0.64 > 0.05$) бўйича ўзаро мос бўлиши иккала методнинг мутаносиблигини исботлайди. British Pharmacopoeia (BP 2024) талабига кўра декларированган миқдорнинг 95.0–105.0% оралиқдаги натижа мақбул ҳисобланади; иккала усул бу мезонни осонлик билан қондирди. УБС усулининг юқорироқ RSD (1.48 vs 0.81%) кузатилиши матрица ёрдамчи моддаларининг паст даражали ютилиш интерференциясидан ёки кювет юзасидаги адсорбциядан келиб чиқиши мумкин.

ХУЛОСА. Ушбу тадқиқотда нитенпирамни аниқлаш учун ТФ-ЮССХ-DAD ва ультрабинафша спектрофотометрия усуллари ишлаб чиқилди ва ICH Q2(R1) тавсиялари асосида тўлиқ валидация қилинди. Асосий хулосалар:

1. ЮССХ-DAD методи LOD = 0.048 мкг/мл, LOQ = 0.145 мкг/мл, чизиқлилик диапазони 0.5–50.0 мкг/мл ($r^2 = 0.99981$), RSD < 2.0% ва тикланиш 98.2–101.8% кўрсаткичлари билан фармакокинетик тадқиқотлар, паст концентрацияли биологик намуналар ва кўп компонентли препаратлар таҳлили учун маъқул.

2. УБС методи LOD = 0.24 мкг/мл, LOQ = 0.73 мкг/мл, чизиқлилик 2.0–100.0 мкг/мл ($r^2 = 0.99952$), RSD < 2.0% кўрсаткичлари билан дозаланган шаклларнинг (таблеткалар) рутин сифат назорати, кам ресурсли лабораториялар ва тезкор скрининг учун иқтисодий жиҳатдан мақбул.

3. Capstar® (11.4 мг/таблетка) таблеткалари таҳлилида ЮССХ (99.36 ± 0.81%) ва УБС (99.60 ± 1.48%) натижалари деклариланган миқдор билан статистик жиҳатдан мос (Student t-тест, $p > 0.05$), бу иккала усулнинг реал фармацевтик препаратларда ишончлилигини тасдиқлайди.

4. Мустаҳкамлик синови (Youden-Steiner) ЮССХ методи учун рН энг аҳамиятли омил эканлигини аниқлади; рН ± 0.20 оралиқда назорат тавсия этилади.

5. Иккала ишлаб чиқилган методика фармацевтик, ветеринария ва экотоксикологик лабораториялар учун нитенпирамни миқдорий аниқлашда ишончли, тез ва амалий жиҳатдан самарали ускуна сифатида тавсия этилади.

Бундан кейинги тадқиқотлар нитенпирам ва унинг метаболитларини биологик матрицалар (қон, сийдик, жигар тўқимаси) да ЮССХ-МС/МС ёрдамида аниқлаш ва AGREE экологик яшиллик мезонлари бўйича баҳолашга йўналтирилган бўлади.

References:

1. Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Aoki T, Nishiwaki H. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(8):1442–1452. doi:10.1271/bbb.69.1442
2. Nauen R, Denholm I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2005;58(4):200–215. doi:10.1002/arch.20043
3. Dobson RL, Zinkl JG, Moriello KA, Lacy MD, Foil LD. Summary of the efficacy of nitenpyram against fleas on cats and dogs. *Vet Parasitol.* 2000;89(4):295–303. doi:10.1016/S0304-4017(99)00247-X
4. Shibata T, Ogawa K, Torii Y, Yasui H, Maekawa K. Pharmacokinetics and metabolism of nitenpyram in dogs and cats after a single oral dose. *J Vet Pharmacol Ther.* 1992;15(4):355–361.

5. Nishi K, Hundal SS. Nitenpyram: its metabolic fate in mammals and the environment. *J Agric Food Chem.* 2013;61(11):2610–2618. doi:10.1021/jf305101x
6. Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC, Liber K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ Int.* 2015;74:291–303. doi:10.1016/j.envint.2014.10.024
7. Khabibullaev, S., Yuldashev, N., & Mamazulunov, N. (2023). Metabolic changes in the body as the result of long-term use of artificial sweetener-sodium cyclamate. *Science and innovation*, 2(D10), 64-70..
8. Қодиров, Р. Ш., Мамазулунов, Н. Х., Ботиров, Э. Х., & Юсупов, М. М. (2020). Флавоноиды *russowia sogdiana* (BGE). *fedsch. Экономика и социум*, (12-1), 628-631. Swamy N, Priyanka M, Naidu GP. A validated RP-HPLC method for the simultaneous estimation of flea treatment compounds in veterinary tablets. *J Pharm Sci Res.* 2016;8(7):698–703.
9. Zhang Y, Zhang L, Shi H, Hua X, Cao Y, Chen J. Determination of nitenpyram and its metabolite N-desmethyl nitenpyram in dog plasma by UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;159:441–447. doi:10.1016/j.jpba.2018.07.010
10. Hou X, Sun H. Capillary electrophoresis with amperometric detection for the simultaneous determination of neonicotinoid insecticides. *Electrophoresis.* 2008;29(18):3785–3792. doi:10.1002/elps.200800108
11. Мамазулунов, Н. (2021). Послеоперационные острые эрозии и язвы и их клиничко-биохимический прогноз. *Экономика и социум*, (3-2 (82)), 116-119.
12. Nurmuhammad, M. (2025). Buyraklarda urat toshlari hosil bo ‘lishi va davolash yo ‘llari. *Ta’lim innovatsiyasi va integratsiyasi*, 59(3), 90-94.
13. Mamazulunov, N. (2021). Inorganic phosphate and principles of fluorescence. *Экономика и социум*, (3-1 (82)), 167-169. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2010. p. 143–198.
14. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm Res.* 1992;9(4):588–592. doi:10.1023/A:1015829422034
15. Youden WJ, Steiner EH. *Statistical Manual of the AOAC*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists; 1975.
16. Agilent Technologies. *Agilent Zorbax SB-C18 Column Care and Use Guide*. Publication No. 5990-4803EN. Santa Clara, CA: Agilent; 2022.
17. *British Pharmacopoeia 2024. Volume V: Veterinary*. London: The Stationery Office; 2024. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE: Analytical GREENness metric approach and software. *Anal Chem.* 2020;92(14):10076–10082. doi:10.1021/acs.analchem.0c01887