مروری کوتاه بر اعتبارسنجی روش آنالیز با استفاده از تکنیک HPLC

امیر بهشتی مآل[۱]، سید محمد علوی[۱]، **هدی جهاندار**[*۲]

۱ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

۲ گروه گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۸

چکیده

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) به دلیل کارایی استثنایی و حساسیت بالا در تشخیص آنالیت مورد نظر، به‌عنوان تکنیک جداسازی مورد توجه در آنالیزهای دارویی و زیست پزشکی مدرن شناخته شده است. در حوزه تجزیه وتحلیل نمونه‌های دارویی، نتایج بدست آمده باید قابل اعتماد باشند. بنابراین اعتبارسنجی روش‌های آنالیز، مرحله‌ای اساسی در فرایند توسعه‌ی آن‌ها می‌باشد که اثبات می‌کند این روش‌ها برای اهداف مورد نظرشان مناسب و قابل اعتماد هستند. پایگاه‌های داده شامل PubMed، PubMed Central، Google Scholar و ICH Q2R2 با استفاده از کلمات کلیدی شامل HPLC ، Validation، Accuracy و Precision مورد بررسی قرار گرفتند. برای تامین الزامات تعیین شده توسط دستورالعمل‌های شرایط بهینه تولید(GMP) ، شرکت‌های دارویی موظف به برنامه‌ریزی به‌منظور نظارت و بررسی تمامی فرآیندهای خود هستند. هدف اصلی از این کار، اثبات استاندارد بودن تمامی فرآیندهای صنعت اعم از توسعه، ساخت، تولید و روش‌های آنالیز می‌باشد. هدف از نگارش این مقاله‌ی مروری ارائه راهکاری برای انجام مطالعه‌ی اعتبارسنجی روش‌های آنالیز مورد استفاده در صنعت داروسازی می‌باشد که به‌ویژه بر روی دستورالعمل‌های ICH در این زمینه متمرکز شده است. در این دستورالعمل‌ها، پارامترهایی نظیر صحت، دقت، اختصاصی بودن، خطی بودن نتایج، محدوده‌ی کاری، حد تشخیص، حد اندازه گیری و استحکام روش آنالیز بررسی شده‌اند.

واژه‌های کلیدی : اعتبارسنجی، دقت، صحت، کروماتوگرافی مایع با کاربرد بالا

* ho_jahandar@yahoo.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۲]یکی از روش‌های کروماتوگرافی ستونی بوده و امروزه از مهمترین ابزارهای شیمی تجزیه می‌باشد که در صنعت داروسازی مدرن، در تمامی مراحل کشف، توسعه و تولید دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش انتخابی به‌منظور بررسی خلوص داروهای جدید، نظارت و کنترل تغییرات حین پروسه ی اسکیل آپ در صنعت، ارزیابی و بررسی فرمولاسیون های جدید [۲] و کنترل و مانیتورینگ محصول دارویی نهایی می‌باشد [۳] [۴]. هدف از آنالیز با این دستگاه، شناسایی و تعیین مقدار ماده موثره دارویی و ناخالصی‌ها می‌باشد [۵].

در این تکنیک، نمونه به ستونی متشکل از مواد متخلخل (فاز ثابت) تزریق شده و فاز مایع (فاز متحرک) با فشار بالاتر از طریق پمپ دستگاه به ستون وارد می‌شود. اصل جداسازی براساس تمایل متفاوت اجزای نمونه به فاز ساکن و متحرک میباشد [۶].

هدف از توسعه و معتبرسازی روش آنالیز

پیشرفت سریع علوم پزشکی و صنایع داروسازی در سراسر جهان، سبب افزایش تقاضای اجتناب ناپذیر برای جستجوی تکنیک های جدید آنالیز داروها شده است [۷]. از طرفی توسعه روش‌های آنالیز جدید، باعث کاهش زمان، هزینه و افزایش صحت و دقت می‌شود [۸]. بررسی ماده ی فعال دارویی، مواد جانبی (اکسیپیان ها)، محصول نهایی و مطالعات کنترل کیفیت، همگی از مراحل اصلی معرفی و تولید یک محصول دارویی جدید بوده، که انجام هرکدام از آنها نیاز به روش‌های آنالیز معتبر دارد. به‌منظور تایید محصول دارویی جدید توسط مراجع نظارتی، تولید کننده باید در تمامی مراحل ساخت دارو از شروع تا پایان و همچنین تمامی مراحل مطالعات کنترل کیفیت آن از روش‌های معتبر استفاده نماید [۹] [۱۰].

با توجه به اهمیت تکنیک HPLC و معتبر بودن روش‌های آنالیز، هدف از نگارش این مقاله، مروری بر نحوه‌ی اعتبارسنجی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با توجه به دستورالعملات رسمی ICH می‌باشد.

روش بررسی

پایگاه‌های داده شامل PubMed، PubMed Central، Google Scholar با استفاده از کلمات کلیدی شامل HPLC، Validation، Accuracy و Precision مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعدی، جهت تبیین اصول معتبرسازی، به دستورالعمل ICH Q2R2 مراجعه شد.

نتایج و بحث

دلیل اعتبارسنجی و انواع روش‌ها

اعتبارسنجی، فرآیند بررسی یک روش آنالیز است که طی آن مشخص می‌شود که روش معرفی شده الزامات مورد نظر را برآورده می کند و تضمین میکند که این رویه پیشنهادی، قابلیت استفاده آزمایشگاهی و یا صنعتی دارد [۱۱]. هدف اصلی اعتبارسنجی این است که نشان دهد روش آنالیز برای هدف مورد نظر و در محدوده مشخصی که یک آنالیت مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهد گرفت، مناسب، دقیق و اختصاصی است. فرایند اعتبارسنجی باید برای روش‌های

[2] High performance liquid chromatography (HPLC)

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

آنالیز جدید و یا زمانی که تغییری در روش ایجاد می گردد، انجام شود [۱۲].

روش‌های آنالیز متداولی که در صنعت داروسازی اعتبارسنجی می شوند شامل آزمونهای شناسایی، ارزیابی کمی ناخالصی‌ها، تعیین محدوده ناخالصی‌ها، تعیین مقدار ماده دارویی فعال، می‌باشد. همچنین طبق دستورالعمل شورای عالی بین المللی هماهنگسازی الزامات فنی داروسازی برای استفاده انسانی (ICH) [3] در صورت ایجاد هرگونه تغییر در روش سنتز ماده دارویی، فرمولاسیون محصول دارویی و روش‌های آنالیز آن، انجام مطالعه اعتبارسنجی ضروری خواهد بود. پارامترهایی که در اعتبارسنجی روش آنالیز مورد ارزیابی قرار میگیرند شامل: دقت، صحت، اختصاصی بودن، حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، خطی بودن و استحکام میباشند.

تهیه پروتکل، مشخص کردن هدف ها و توضیح مراحل روش آنالیز

همان طور که گفته شد، فرایند اعتبارسنجی تایید می نماید که روش تحلیلی به کار گرفته شده برای یک آزمون خاص، الزامات مورد نظر را برآورده می کند [۱۳]. پارامترهای موردنظر در اعتبارسنجی باید بر اساس نوع روش آنالیز انتخاب شوند. قبل از آغاز مطالعه اعتبارسنجی، باید یک پروتکل اعتبارسنجی تهیه شود. پروتکل اعتبارسنجی شامل دو بخش میباشد: [۱۴]

- ارزیابی داده‌های مستند شده ای که در گذشته معتبرشده اند و نتایجشان مشخص است.
- انجام آزمایشات و ارزیابی بر اساس روش‌های استاندارد

در مواردی که از اطلاعات گزارشات معتبرسازی ای که در گذشته انجام شده استفاده کنیم، می بایست توجیه مناسب این کار ارائه شود. سپس نتایج مطالعات و آزمایش های عملی اعتبارسنجی با معیار های پذیرش مورد قبول سازمان استاندارد (ICHQ2R2) ارزیابی شده و پذیرش و یا رد شدن آن در قالب یک گزارش اعتبارسنجی ارائه می‌شود. همچنین در صورت ایجاد هرگونه تغییر در طراحی، توسعه و هرکدام از مراحل روش آنالیز، باتوجه به ارزیابی ریسک ها و علم موجود، لزوم انجام اعتبارسنجی مجدد در یک مرحله و یا تمامی مراحل روش آنالیز، محتمل میباشد. [۱۳, ۱۵]

طراحی و انجام مطالعه اعتبارسنجی

بحث طراحی مطالعه اعتبارسنجی به طور کلی به سه بخش تقسیم می‌شود [۱۵, ۱۶]. در جدول زیر یک طرح کلی از پارامترهای مورد نیاز به منظور انجام مطالعه اعتبارسنجی مربوط به انواع روش‌های آنالیز نشان داده شده است [۸].

[3] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول ۱ پارامتر های اعتبارسنجی در انواع روش آنالیز

ویژگی‌های اعتبارسنجی	تست های شناسایی	تست های کمی برای ناخالصی‌ها	تست محدودیت ناخالصی‌ها	ارزیابی حلالیت	تست های اختصاصی
صحت	–	✓	–	✓	✓
دقت	–	✓	–	✓	✓
محدوده عملیاتی	–	✓	–	✓	
اختصاصی بودن	✓	✓	✓	✓	✓
خطی بودن	–	✓	–	✓	–
حد تشخیص	–	–	✓	–	–
حد اندازه‌گیری	–	✓	–	–	–
استحکام روش	–	✓	–	✓	✓

دستورالعمل ICH، پارامترهای عملی خاصی را جهت اعتبارسنجی روش آنالیز تعیین کرده است. در بخش بعدی، آزمون های عملی برای ارزیابی عملکرد یک روش آنالیز توضیح داده شده است.

انتخابی بودن [۴]

اولین گام در توسعه و اعتبارسنجی یک روش آنالیز مناسب، اختصاصی بودن آن میباشد [۱۷]. Specificity/ Selectivity ویژگی و گزینش پذیری دو اصطلاحی هستند که توضیح می دهند یک آزمایش تا چه حد می‌تواند یک ماده خاص را بدون تأثیر سایر موادی که ممکن است وجود داشته باشد، اندازه‌گیری کند. Specificity به این معنی است که روش آنالیز بتواند آنالیت مورد نظر را به دقت اندازه‌گیری کند. Selectivity به این معنا میباشد که روش آنالیز بتواند آنالیت مورد نظر را در یک مخلوط نمونه، در کنار سایر مواد موجود در مخلوط نمونه مانند ناخالصی‌ها، مواد محتمل در محیط نمونه مورد نظر و ماتریس نمونه، اندازه‌گیری کند [۱۸, ۱۹]. همچنین انتخابی بودن روش را میتوان با مقایسه نتایج حاصل از روش آنالیز جدید با نتایج حاصل از یک روش آنالیز توسعه‌یافته و معتبر شده مرتبط، بررسی کرد. اگر اختصاصی بودن روش مشخص نباشد، سایر پارامتر ها از جمله صحت و دقت و خطی بودن از اعتبار لازم برخوردار نیستند. انتخابی بودن روش باید به طور مداوم در طول اعتبارسنجی مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد [۱۷].

شناسایی [۵]

توانایی روش آنالیز در شناسایی آنالیت مورد نظر با توجه به ساختار منحصر به فرد مولکولی و سایر ویژگی‌های آن، در حضور ماتریس مخلوط نمونه با انجام آزمایش شناسایی بررسی می‌شود. میتوان با مقایسه نتایج حاصل از نمونه مثبت حاوی آنالیت مورد نظر، با نمونه منفی ماتریس مخلوط نمونه بدون آنالیت، توانایی روش آنالیز را در شناسایی آنالیت مورد نظر بررسی کرد [۲۰]. علاوه بر این، آزمایش شناسایی را می‌توان همراه با موادی که ساختاری مشابه یا نزدیک به آنالیت دارند انجام داد تا تأیید شود که پاسخ مثبت ناخواسته و تصادفی به دست نیامده است. انتخاب چنین تداخلگرهای بالقوه ای، باید بر اساس مبانی علمی با در نظر گرفتن هرگونه تداخلی باشد که ممکن است رخ دهد [۲۱].

[4] Specificity/Selectivity

[5] Identification

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

محدوده کاری [6]

محدوده کاری یک روش آنالیز، کمترین و بیشترین غلظتی است که روش آنالیز میتواند برای آن نتایج معنی داری ارائه دهد. باتوجه به مراحل مختلف روش آنالیز و نوع آن، یک محدوده کاری قابل گزارش بررسی و تعیین می‌شود. به‌منظور ارزیابی محدوده کاری گزارش شده، غلظت‌های مختلفی از نمونه تهیه شده و نتایج حاصل از آنالیز هرکدام از آنها مورد ارزیابی قرار میگیرند [۲۲]. دستورالعمل ICH حداقل محدوده کاری را ۸۰ – ۱۲۰٪ محدوده آنالیز ماده مورد نظر مشخص کرده است. برای نشان دادن یک محدوده خطی قابل‌قبول، پیشنهاد می‌شود پنج محلول استاندارد مختلف با غلظت‌های ۵۰–۱۵۰٪ محدوده کاری تهیه شود [۱۷].

نتایج خطی [7]

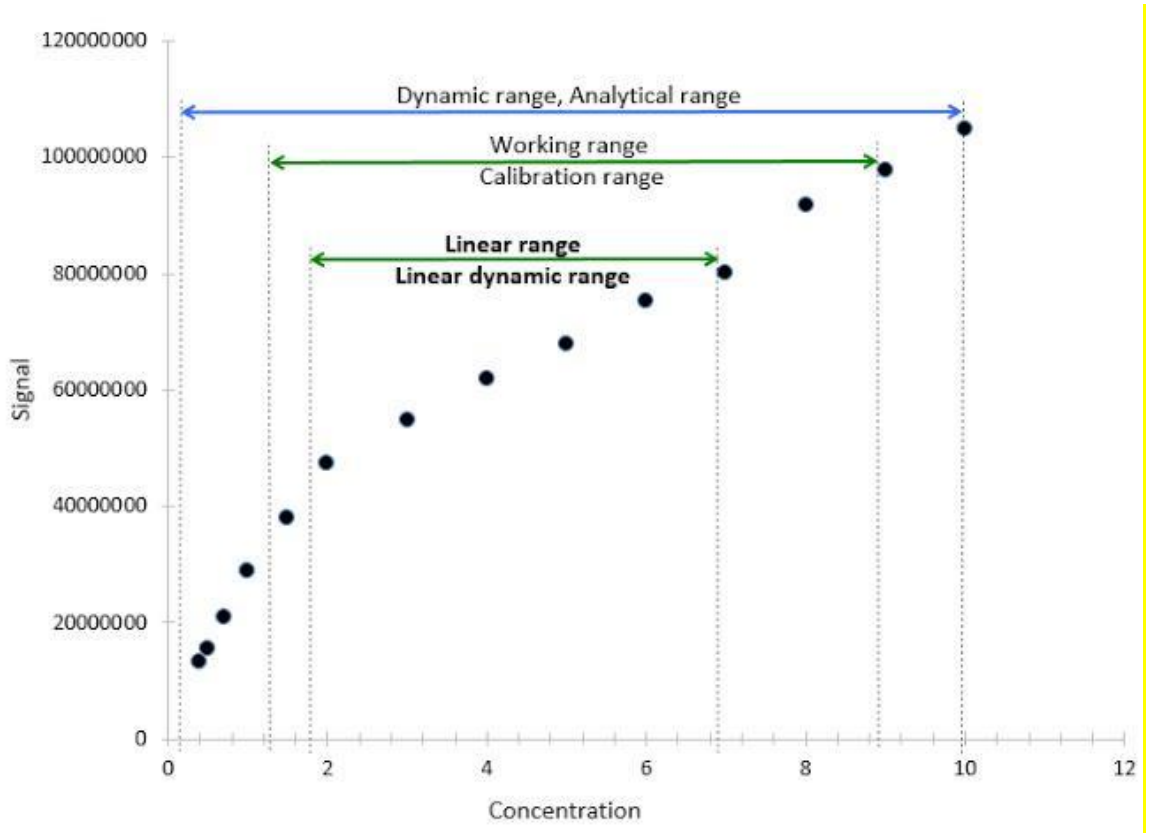
یک رابطه خطی بین غلظت آنالیت و نتیجه بدست آمده باید در سراسر محدوده کاری روش آنالیز ارزیابی شود تا مناسب بودن روش برای استفاده مورد نظر تأیید شود. پاسخ را می‌توان مستقیماً بر روی ماده دارویی (به‌عنوان مثال، با رقیق کردن یک محلول ذخیره استاندارد) یا توزین جداگانه مخلوط های مصنوعی اجزای محصول دارویی، با استفاده از روش آنالیز پیشنهادی نشان داد [۲۳].

در ابتدا، خطی بودن را می‌توان با نموداری از سیگنال ها به‌عنوان تابعی از غلظت یا محتوای آنالیت ارزیابی کرد. نتایج آزمون باید با روش‌های آماری مناسب (بعنوان مثال با محاسبه خط رگرسیون) ارزیابی شود. نتایج حاصل از بررسی خط رگرسیون مانند شیب خط رگرسیون، ضریب همبستگی و عرض از مبدا آن، میتوانند به بررسی خطی بودن نتایج کمک کنند [۲۴]. سپس نموداری از داده‌ها، ضریب همبستگی، عرض از مبدا و شیب خط رگرسیون باید ارائه شود [۱۹]. برای بررسی خطی بودن روش آنالیز، باید حداقل پنج غلظت مختلف که به طور مناسب در سراسر محدوده کاری توزیع شده، بررسی شوند. با این حال، غلظت‌های اضافی ممکن است برای مدل های پیچیده تر مورد نیاز باشد [۱۹]. ضریب همبستگی خطی بالای ۰.۹۹۹ برای اکثر روش‌ها، به ویژه در روش‌های سنجش قابل‌قبول است [۱۷].

[6] Working Range

[7] Linear Response

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل ۱- مقایسه محدوده کاری و خطی و آنالیز

حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری(LOQ)

حد تشخیص [۸] یک روش، کمترین مقدار آنالیت در یک نمونه است که می‌توان آن را تشخیص داد، اما لزوماً به‌عنوان مقدار دقیق اندازه‌گیری نمی‌باشد [۲۵]. حد اندازه‌گیری [۹] یک روش آنالیز، کمترین مقداری از آنالیت است که در یک نمونه می‌تواند با صحت و دقت مناسب تعیین مقدار شود [۲۶].

حد تشخیص و حد اندازه‌گیری را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف بررسی کرد [۲۷].

اندازه‌گیری حد تشخیص و حد اندازه‌گیری بر اساس روش سیگنال به نویز

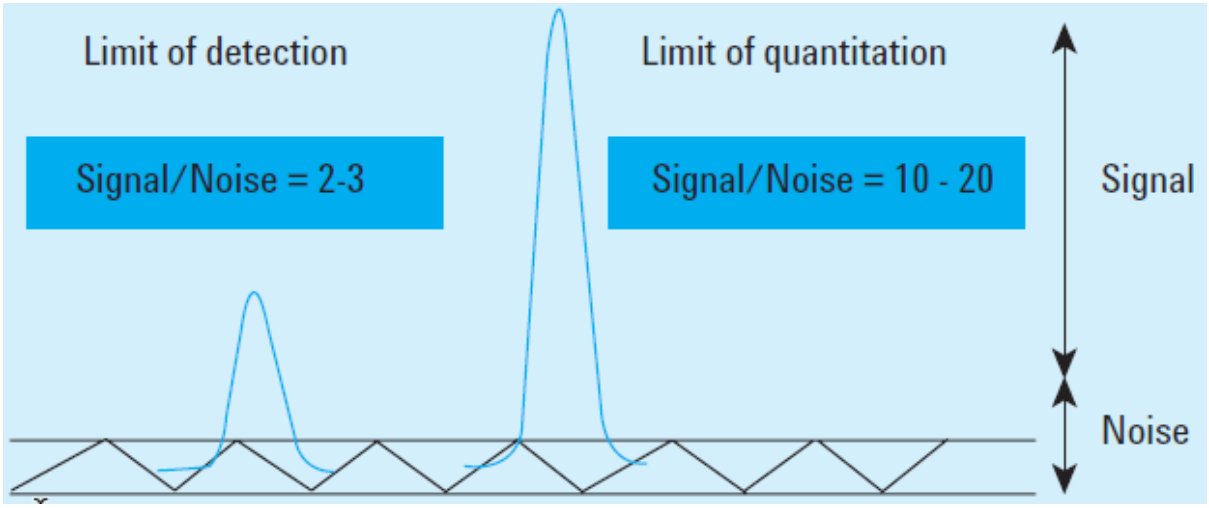
این رویکرد را فقط می‌توان برای روش‌های آنالیزی که نویز پایه را نشان می دهند، اعمال کرد. تعیین نسبت سیگنال به نویز با مقایسه سیگنال‌های اندازه‌گیری شده از نمونه‌هایی با غلظت‌های پایین آنالیت با سیگنال‌های نمونه‌های فاقد آنالیت انجام می‌شود. به طور کلی نسبت سیگنال به نویز ۳:۱ برای تخمین حد تشخیص و حداقل نسبت ۱۰:۱ برای حد اندازه‌گیری، قابل‌قبول در نظر گرفته می‌شود [۲۴].

در روش‌های آنالیز کروماتوگرافی، نسبت سیگنال به نویز باید در یک ناحیه تعریف‌شده تعیین شود و در صورت امکان، ناحیه تعیین شده میتواند به طور مساوی در اطراف پیک مورد نظر در کروماتوگرام، قرار داده شود.

[8] Limit Of Detection (LOD)

[9] Limit Of Quantitation (LOQ)

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل ۲- بررسی سیگنال به نویز در حد تشخیص و حد اندازه‌گیری

براساس انحراف معیار و شیب خط حاصل از معادله خطی منحنی کالیبراسیون

برای بدست آوردن مقدار نظری حد تشخیص از فرمول زیر استفاده می‌شود:

حد تشخیص=$\frac{۳.۳\sigma}{S}$ که σ انحراف معیار استاندارد و S شیب خط منحنی کالیبراسیون میباشد.

همچنین جهت بدست آوردن مقدار کمی حد اندازه‌گیری فرمول زیر استفاده می‌شود:

حد اندازه‌گیری= $\frac{10\sigma}{S}$

سپس به‌منظور اندازه‌گیری مقادیر عملی هرکدام از حدود تشخیص و اندازه‌گیری، غلظت‌هایی از آنالیت مشابه مقادیر نظری آنها تهیه شده و صحت و دقت حاصل از نتایج آنالیز هرکدام از آنها، بررسی می‌شود.

بعنوان جمع بندی می‌توان گفت، حد تشخیص و رویکرد مورد استفاده برای تعیین آن باید ارائه شود. اگر LOD بر اساس ارزیابی بصری یا نسبت سیگنال به نویز تعیین شود، قابل‌قبول در نظر گرفته می‌شود. در مواردی که این حد، تخمین زده شده باشد، این براورد می‌تواند با آنالیز تعداد مناسبی از نمونه‌ها با غلظت نزدیک به مقدار موردنظر، تایید شود. همچنین حد اندازه‌گیری و رویکرد مورد استفاده برای تعیین آن باید ارائه شود. اگر LOQ تخمین زده شود، باید متعاقباً با آنالیز تعداد مناسبی از نمونه‌ها با غلظت نزدیک به مقدار براورد شده، تأیید شود.

صحت

صحت یک روش آنالیز، بیانگر نزدیکی بین مقادیر عملی حاصل از نتایج نمونه‌ها با مقادیر نظری آنها میباشد. صحت باید در سراسر محدوده گزارش شده یک روش آنالیز وجود داشته باشد و معمولا از طریق مقایسه نتایج اندازه‌گیری شده با مقدار مورد انتظار و نتایج حاصل از اندازه‌گیری نمونه‌های استاندارد مرجع، نشان داده می‌شود. بررسی صحت پس از ارزیابی و مشخص شدن اختصاصی و خطی بودن روش در محدوده گزارش شده انجام می‌شود [۱۹]. به‌منظور بررسی صحت یک روش آنالیز حداقل ۹ اندازه‌گیری انجام شود. این اندازه‌گیری ها باید کل محدوده گزارش را پوشش دهند. به‌عنوان مثال برای بررسی صحت می‌توان، نتایج حاصل از اندازه‌گیری سه غلظت حد بالا، حد میانی و حد

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

پایین هرکدام سه مرتبه، را بررسی کرد. تهیه هرکدام از این غلظت‌ها باید به‌صورت مستقل و بدون استفاده از روش رقیق سازی سریالی انجام شود [۲۴].

دقت

دقت یک روش آنالیز، بیانگر نزدیکی نتایج حاصل از بررسی یک نمونه همگن در شرایط تعیین شده میباشد. دقت باید با استفاده از نمونه‌های همگن، معتبر یا نمونه‌های تهیه‌شده مصنوعی (مثلاً مخلوط‌های ماتریسی spike شده با مقادیر مربوط به آنالیت مورد نظر) بررسی شود. اگر یک نمونه همگن در دسترس نباشد، می‌توان از نمونه‌های تهیه شده مصنوعی یا نمونه محلول استفاده کرد.

دقت را می‌توان در سه سطح بررسی کرد:

دقت در یک آزمایشگاه در یک روز، دقت در یک آزمایشگاه در روزهای مختلف [۱۰]و تکثیرپذیری. [۱۱]

دقت در یک آزمایشگاه در یک روز

دقت در یک آزمایشگاه در یک روز میزان تکرارپذیری داده‌های حاصل از روش آنالیز در یک روز در شرایط عملیاتی یکسان با اپراتور و دستگاه یکسان را بیان میکند. به‌منظور بررسی دقت روش آنالیز، حداقل ۹ اندازه‌گیری در محدوده گزارش شده انجام می‌شود. به‌عنوان مثال برای بررسی دقت می‌توان، انحراف معیار استاندارد اصل از اندازه‌گیری سه غلظت شامل حد بالا، حد میانی و حد پایین هرکدام سه مرتبه، را بررسی کرد [۲, ۲۴].

دقت در یک آزمایشگاه در روزهای مختلف [۱۲]

دقت در یک آزمایشگاه در روزهای دیگر، میزان تکرارپذیری داده‌های حاصل از روش آنالیز در یک آزمایشگاه در روز های مختلف با اپراتور و شرایط متفاوت را بیان میکند. برای این مهم تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از روش آنالیز در روزهای مختلف، با استفاده از ابزار مختلف، یا توسط تحلیلگران مختلف مقایسه میشوند. هدف این است که اطمینان حاصل شود که یک روش آنالیز، پس از توسعه، به طور مداوم نتایج یکسانی را هنگام انجام در همان آزمایشگاه ایجاد کند و نتایج قابل اطمینان است. نمونه‌ها هم مکررا در روزهای مختلف تهیه میشوند [۲۲].

تکثیرپذیری [۱۳]

تکثیرپذیری یک روش آنالیز، تکرارپذیری یا دقت بین آزمایشگاهی را ارزیابی میکند که معمولاً از طریق مطالعات مشترک با سایرآزمایشگاه ها تعیین می‌شود. هدف اولیه تکثیر پذیری تأیید این است که یک روش آنالیز یکسان نتایج یکسانی را هنگام انجام در آزمایشگاههای مختلف ارائه می‌دهد بنابراین از سازگاری و اطمینان روش در محیطهای آزمایشی مختلف اطمینان حاصل میکند [۱۷]. بررسی تکثیرپذیری معمولاً اجباری نیست، اما باید در موارد استانداردسازی یک روش آنالیز، به‌عنوان مثال، برای گنجاندن رویه‌ها در فارماکوپه ها، در نظرگرفته شود.

استحکام روش [۱۴]

استحکام یک روش آنالیز، به توانایی آن در مقاومت در برابر تغییرات جزئی و عمدی مانند تغییر pH فاز متحرک، تغییر دمای ستون و یا تغییر سرعت جریان در پارامترهای آن گفته می‌شود [۲۲]. بررسی استحکام روش آنالیز یک امر حیاتی در روند توسعه و معتبرسازی آن می‌باشد و نحوه‌ی ارزیابی آن با توجه به نوع روش آنالیز مورد نظر، تعیین می‌شود [۱۹].

[10] intermediate precision
[11] reproducibility
[12] Intermediate precision
[13] Reproducibility
[14] Robustness

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول ۲- معیار پذیرش پارامتر های مختلف در اعتبارسنجی روش آنالیز

پارامتر	معیار پذیرش
صحت	بازیابی بین ۹۸ تا ۱۰۲٪ RSD بازیابی ها کمتر از ۲ ٪
دقت	RSD≤2%
محدوده کاری	غلظتی که در آن داده‌ها را می‌توان به طور قابل اعتماد شناسایی کرد (۸۰ – ۱۲۰٪)
اختصاصی بودن	بدون تداخل
خطی بودن	ضریب همبستگی بالاتر از ۰.۹۹۹
حد تشخیص	S/N > 2 or 3
حد اندازه‌گیری	S/N > 10
استحکام روش	RSD < 2%

نتیجه‌گیری

در سال های اخیر توسعه روش‌های آنالیز جهت شناسایی و ارزیابی داروها در زمینه آنالیز دارویی موردتوجه زیادی قرارگرفته است. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)یکی از مهمترین و دقیق‌ترین روش‌های شیمی تجزیه در تحلیل کمی و کیفی دارو بوده که توانایی جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات موجود در نمونه‌های محلول را دارد. مطابق دستورالعمل‌های بین المللی، یک روش آنالیز توسعه‌یافته نیاز به اعتبارسنجی دارد [۲۸]. به این علت که این فرآیند نه تنها اثر بخشی روش آنالیز را تایید کرده، بلکه صلاحیت و شایستگی واحد آزمایشگاه آنالیز را نیز نشان می‌دهد. همزمان با توسعه و معرفی روش‌های آنالیز جدید، اهمیت اعتبارسنجی و تضمین کیفیت نیز افزایش پیدا کرده است. در نتیجه اعتبارسنجی به‌عنوان یک مرحله ی حیاتی در تضمین کیفیت هرکدام از مراحل روش آنالیز، در نظر گرفته می‌شود. در این مقاله، اعتبارسنجی روش آنالیز با استفاده از دستگاه HPLC به‌صورت کلی توصیف شده و ایده ای از چگونگی انجام این فرایند ارائه گردید.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

منابع

.1 Kazakevich, Y.V. and R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007: John Wiley & Sons.

.2 Moradpour, Z., *Microalgal Transformation of Androst-4-en-3, 17-dione by Nostoc ellipsosporum Zahra Moradpour," Mayam Torshabi," Mohammad Ali Faramarzi," Mojtaba Tabatabaei Yazdi,"Younes Ghasemi," Hoda Jahandar," Nadia Zolfaghary and" Gholamreza Zarrini.* Research Journal of Microbiology, 2006. 1(3): p. 289-293.

.3 Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Textbook" principles of instrumental analysis.".* Cengage learning. core. ac. uk. https://core.ac.uk/download/pdf/232277508. pdf, 2019.

.4 Ahuja, S. and H. Rasmussen, *Development for Pharmaceuticals, Vol. 8 Separation Science and Technology*. 2007, Elsevier, New York.

.5 Sattar, A., et al., *Development of an HPLC Method for the Determination of Levothyroxine Applied to Four Different Preparations.* Journal of Hunan University Natural Sciences, 2022. 49(11).https://doi.org/10.55463/issn.1674-2974.49.11.1

.6 Dadhich, B., R. Goyal, and D. Agarwal, *A Review On: Development and Validation of HPLC in Pharmaceutical Dosage Form.* Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 2020. 8(4): p. 110-121. https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i4.656

.7 Gassmann, O., G. Reepmeyer, and M. Von Zedtwitz, *Leading pharmaceutical innovation.* Berlin: Springer. https://doi. org/10, 2008. 1007: p. 978-3.

.8 Breaux, J., K. Jones, and P. Boulas, *Analytical methods development and validation.* Pharm. Technol, 2003. 1: p. 6-13.

.9 Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Practical HPLC method development*. 2012: John Wiley & Sons.

.10 Lal, B., D. Kapoor, and M .Jaimini, *A review on analytical method validation and its regulatory perspectives.* Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 2019. 9(2): p. 501-506.https://doi.org/10.22270/jddt.v9i2.2403

.11 Raposo, F. and C. Ibelli-Bianco, *Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020. 129: p. 115913.https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913

.12 Aithal, A. and P. Aithal, *Development and validation of survey questionnaire & experimental data–a systematical review-based statistical approach.* International Journal of Management, Technology, and Social Sciences (IJMTS), 2020. 5(2): p. 233-251.https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3724105

.13 Singh, K. and V. Sharma, *Analytical method development and validation of Carotene in multivitamin & Multiminerals syrup.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2022. 11(3): p. 39-45.https://doi.org/10.22271/phyto.2022.v11.i3a.14407

.14 Alladio, E., et al., *Experimental and statistical protocol for the effective validation of chromatographic analytical methods.* MethodsX, 2020. 7: p. 100919.https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100919

.15 Sankar, R., et al., *Applications in HPLC in pharmaceutical analysis.* International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2019. 59: p. 117-124.

.16 Ravisankar, P., et al., *A review on step-by-step analytical method validation.* IOSR J Pharm, 2015. 5(10): p. 7-19.

.17 Ravisankar, P., et al., *Validation characteristics and statistics in analytical method development.* High technology letters, 2021. 27(7): p. 76-88.

.18 Orlandini, S., et al., *New trends in the quality control of enantiomeric drugs: quality by design-compliant development of chiral capillary electrophoresis methods.* Molecules, 2022. 27(20): p. 7058.https://doi.org/10.3390/molecules27207058

.19 Guideline, I.H., *Validation of analytical procedures Q2 (R2).* ICH: Geneva, Switzerland, 2022.

.20 Ozkan, S.A., *Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis*. Pharm Sci, 2018. 24(1): p. 1-2.doi: 10.15171/PS.2018.01

.21 LK, T., R. NT, and M. UN, *A review on bioanalytical method development and validation.* Asian J Pharm Clin Res, 2016. 9(3): p. 6-

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

10.http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s3.14321

.22 Guideline, I.H.T., *Analytical Procedure Development Q14.* International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Geneva, Switzerland, 2022.

.23 Sharma, S., S. Goyal, and K. Chauhan, *A review on analytical method development and validation.* International Journal of Applied Pharmaceutics, 2018. 10(6): p. 8-15.http://dx.doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28279

.24 Faramarzi, M.A., et al., *Studies on the microbial transformation of androst-1, 4-dien-3, 17-dione with Acremonium strictum.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006. 33(9): p. 725.https://doi.org/10.1007/s10295-006-0135-y

.25 Guideline, I.H.T. ,*Validation of analytical procedures: text and methodology.* Q2 (R1), 2005. 1(20): p. 05.

.26 Alquadeib, B.T., *Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of diclofenac in tablets.* Saudi pharmaceutical journal, 2019. 2 :(1)7p. 66-70.https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.020

.27 Varma, M.M., et al., *Hplc Method Development an d validation: A Review.* 2021.DOI: 10.20959/wjpr202111-21356

.28 Blessy, M., et al., *Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review.* Journal of pharmaceutical analysis, 2014. 4(3): p. 159-165. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

A Brief Review of HPLC Analytical Method Validation

Amir Beheshti Maal[1], Seyed Mohammad Alavi[1], **Hoda Jahandar**[*2]

1 Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

2 Department of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

Abstract

High-performance liquid chromatography (HPLC) is recognized as a primary separation technique in modern pharmaceutical and biomedical analyses due to its exceptional efficiency and high sensitivity in detecting the analyte of interest. In the analysis of pharmaceutical samples, it is essential to ensure the reliability of the produced results. Method validation is a critical stage in the development of analytical methods, determining whether these methods are suitable and reliable for their intended purposes. The databases including PubMed, PubMed Central, Google Scholar, and ICHQ2R2 were searched using keywords such as HPLC, Validation, Accuracy, and Precision. To meet the requirements set by Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, pharmaceutical companies must establish a program to monitor and evaluate all their processes. The primary goal of this effort is to standardize all processes involved in the industry, including development, manufacturing, production, and analytical methods. This review article aims to provide insightful guidance on conducting validation for analytical methods that employed in pharmaceutical analysis. Specifically, it focuses on the validation process as per ICH Guidelines, which encompasses a comprehensive evaluation of performance characteristics such as accuracy, precision, specificity, linearity, working range, limit of detection, limit of quantification, robustness.

Key words: Accuracy, High performance liquid chromatography, Precision, Validation

* ho_jahandar@yahoo.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]