Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 35, No. 3, Autumn 2025 **REVIEW ARTICLE**

A review on high-performance liquid chromatography method design and development

Seyed Mohammad Alavi[1], Amir Beheshti Maal[1], Hoda Jahandar[2]
[1] PhD student in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

Abstract

High performance liquid chromatography is a suitable method for the separation, identification and measurement of components in samples. In the pharmaceutical industry, this method is very important for the analysis of impurities and active pharmaceutical ingredients in the quality control of pharmaceutical products, stability studies and evaluation of new formulations. With the daily emergence of new drugs and pharmaceutical formulations, the need to design and develop analysis methods with high-performance liquid chromatography has also increased. The purpose of this review article is to investigate how to develop an analysis method using high-performance liquid chromatography and related influencing factors. The databases including PubMed, Google Scholar, and Google were utilized with the keywords HPLC, HPLC Method Development, HPLC Method optimization, HPLC Method troubleshooting and HPLC Method validation to find articles related to method design and development. Additionally, the book “Principles of Instrumental Analysis” was used as a guide. Factors such as column type, mobile phase composition, HPLC Separation modes, detector, modes of elution and examination of the physicochemical properties of the drug are important parameters in the design and development of a HPLC method.

Keywords: *High-performance liquid chromatography, Method design and development, Drug analysis*.

Cited as: Alavi SM, Beheshti Maal A, Jahandar H. A Review on High-Performance Liquid Chromatography Method Design and Development. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(3): **275-285.**

Correspondence to: Hoda Jahandar
Tel: *+98 9125009751*
E-mail: ho_jahandar@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-9444-2736
Received: 27 Jun 2024; **Accepted:** 6 Aug 2024

Review Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۵، شماره ۳، پاییز۱۴۰۴، صفحات ۲۷۵ تا ۲۸۵

مروری بر اصول طراحی و توسعه روش آنالیز با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

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

[۱] دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشکده داروسازی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران
[۲] استادیار، بخش گیاهان دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

*کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش مناسبی برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری اجزاء نمونه است. در صنعت داروسازی، این روش جهت آنالیز ناخالصی‌ها و ماده فعال دارویی طی کنترل کیفیت فراورده‌های دارویی، مطالعات پایداری و ارزیابی‌های فرمولاسیون‌های جدید، از اهمیت بالایی برخوردار است. با ظهور روزانه داروها و فرمولاسیون‌های دارویی جدید، نیاز به طراحی و توسعه روش های آنالیز با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز افزایش پیدا کرده است. هدف از این مقاله ی مروری، بررسی چگونگی توسعه یک روش آنالیز با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و عوامل تاثیرگذار مربوطه است. پایگاه‌های اطلاعاتی شامل **PubMed**، **Google Scholar** و **Google** با استفاده از کلید واژه‌های، **HPLC**، HPLC Method development، HPLC Method optimization، HPLC Method troubleshooting و HPLC Method validation به منظور یافتن مقالات مرتبط با طراحی و توسعه روش و همچنین کتاب Principles of Instrumental Analysis به عنوان منبع استفاده شد. عواملی اعم از نوع ستون، اجزاء فاز متحرک، نوع روش جداسازی با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، نوع آشکارساز، برنامه شویش فاز متحرک و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی دارو، از عوامل مهم در طراحی و توسعه یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است.*

واژگان کلیدی: *کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، طراحی و توسعه روش، آنالیز دارو.*

مقدمه

تعریف کروماتوگرافی

کروماتوگرافی روشی برای جداسازی اجزای نمونه بین دو فاز ساکن و متحرک است (۱). از کروماتوگرافی برای جداسازی، شناسایی و اندازه گیری ترکیب‌های مشابه با هم در یک نمونه مخلوط استفاده می‌شود. در این روش جدا سازی، نمونه در فاز متحرک، که می تواند گاز، مایع و سیال فوق بحرانی باشد، حل می‌شود. سپس فاز متحرک از داخل یک فاز ساکن (که غیر قابل اختلاط هستند) عبور می‌کند. فاز ساکن می‌تواند در یک ستون یا بر روی یک صفحه باشد. ترکیب‌هایی که توسط فاز ساکن نگهداشته می‌شوند، آهسته‌تر با فاز متحرک حرکت می‌کنند و ترکیب‌هایی که به فاز ساکن تمایل کمتر دارند، سریع‌تر با فاز متحرک حرکت می‌کنند (۲).

تاریخچه کروماتوگرافی

کروماتوگرافی توسط گیاه شناس روسی میخائیل تسوت در صده اخیر اختراع و نام گذاری شد. او از روش کروماتوگرافی برای جداسازی رنگدانه های مختلف گیاهی مانند کلروفیل‌ها و زانتوفیل‌ها، با حرکت دادن محلول‌ها از داخل یک ستون شیشه‌ای حاوی کلسیم کربنات استفاده کرد. رنگدانه‌های جدا شده به صورت نوارهای رنگی داخل ستون نمایان شدند و به همین علت این روش کروما به معنای رنگ در یونانی و گرافی به معنای نوشتن در یونانی، نام گذاری شد (۲-۴).

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، یکی از مهم‌ترین ابزارهای شیمی تجزیه امروزی است. اساس این روش به این شکل است که یک نمونه حاوی آنالیت‌های مورد نظر، به داخل یک ستون پر شده از مواد متخلخل (فاز ساکن) تزریق شده و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، مرکزتحقیقات علوم دارویی، هدی جهاندار (**email**: ho_jahandar@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0002-9444-2736
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۵/۱۶

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

فاز متحرک مایع، به داخل ستون با فشار بالا پمپ می‌شود. تفکیک نمونه بر اساس تفاوت در برهمکنش اجزاء مختلف نمونه با ستون و فاز متحرک و در نتیجه تفاوت در زمان خروج آنها از ستون انجام می‌شود (۵, ۶). این روش توانایی جداسازی، شناسایی و اندازه گیری ترکیبات موجود در هر نمونه ای که می تواند در یک مایع را حل شود، دارد و یکی از دقیق‌ترین روش‌های شیمی تجزیه در تحلیل کمی و کیفی دارو است (۷).

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نسبت به کروماتوگرافی گازی، به علت عدم وجود محدودیت فرار بودن و مقاومت نسبت به حرارت و همچنین گزینه‌های بیشتر در انتخاب فاز ساکن و متحرک، از تنوع بیشتری برخوردار است. از مزایای این روش می‌توان به وضوح و جداسازی بالا، حساسیت بالا، تکرارپذیری مناسب و حجم نمونه کم اشاره کرد. در ابتدا برای انجام آزمون‌های کیفی و کمی یک دارو قبل و بعد از ورود آن به بازار، از روش کروماتوگرافی گاز استفاده می‌شده است و زمانی که تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای اولین بار در این زمینه استفاده شد، تصور می‌شد که این روش تنها به عنوان یک روش کمکی در کنار گاز کروماتوگرافی استفاده خواهد شد، اما امروزه، به علت تنوع در فازهای متحرک و ساکن، این روش تقریباً جای کروماتوگرافی گازی را گرفته است (۵, ۸, ۹).

هدف از توسعه روش اندازه گیری

آنالیز دارویی شامل شناسایی و اندازه گیری دارو در ترکیبات مختلف اعم از فرم دارویی و مایعات بدن است. در زمان توسعه دارو، روش آنالیز دارویی می‌تواند فراهمی زیستی، ناخالصی‌ها، پایداری و یکنواختی آن را بررسی کند و اطلاعات ارزشمندی را ارائه نماید. همچنین در بحث کنترل کیفیت، روش‌های آنالیتیکال می‌توانند محصولات سالم و خوب را شناسایی کرده و از ایجاد مشکلات در مراحل مختلف تولید جلوگیری کنند. همزمان با افزایش تعداد شرکت‌های دارویی و محصولات دارویی جدید در دنیا، نیاز به روش‌های آنالیتیکال نیز برای کنترل کیفیت افزایش یافته است. توسعه روش‌های اندازه گیری و تجزیه‌ای، نقش بسیار مهمی در طراحی و توسعه محصولات دارویی دارد. از این روش‌ها برای شناسایی، بررسی ناخالصی و بررسی میزان اثربخشی دارو و فرمولاسیون دارویی استفاده می‌شود (۲, ۱۰-۱۲). از دلایل نیاز به توسعه روش جدید آنالیز می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

- دارو، مونوگراف مشخصی در فارماکوپه ندارد.
- به علت قوانین ثبت انحصاری اختراع یک دارو، مستندات مرتبط با آنالیز آن وجود ندارد.
- فرمولاسیون دارو و مواد جانبی موجود در آن، در روش اندازه گیری ماده فعال دارویی، اختلال ایجاد می کند.
- روش‌های آنالیز فراورده دارویی برای اندازه گیری دارو در مایعات بیولوژیکی، قابلیت تکرار و اجرا در آزمایشگاه را ندارند.
- روش‌های اندازه گیری ذکر شده از لحاظ اقتصادی به صرفه نیست (۱۳-۱۵).

هدف از نگارش این مقاله، مروری بر نحوه توسعه و طراحی روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، با نگرشی دارو محور به منظور انجام آزمایش‌های شناسایی، اندازه گیری، بررسی ناخالصی و مطالعه فرمولاسیون بود. در ادامه پس از بررسی اجزای دستگاه HPLC، به نحوه طراحی روش، بررسی پارامترهای مختلف و اثر گذار و بهینه سازی آنها پرداختیم.

مواد و روشها

پایگاه‌های اطلاعاتی شامل PubMed، Google Scholar و Google با استفاده از کلید واژه‌های، HPLC، HPLC Method development، HPLC Method optimization، HPLC Method troubleshooting و HPLC Method validation به منظور یافتن مقالات مرتبط با طراحی و توسعه روش و همچنین کتاب Principles of Instrumental Analysis به عنوان راهنما استفاده شد.

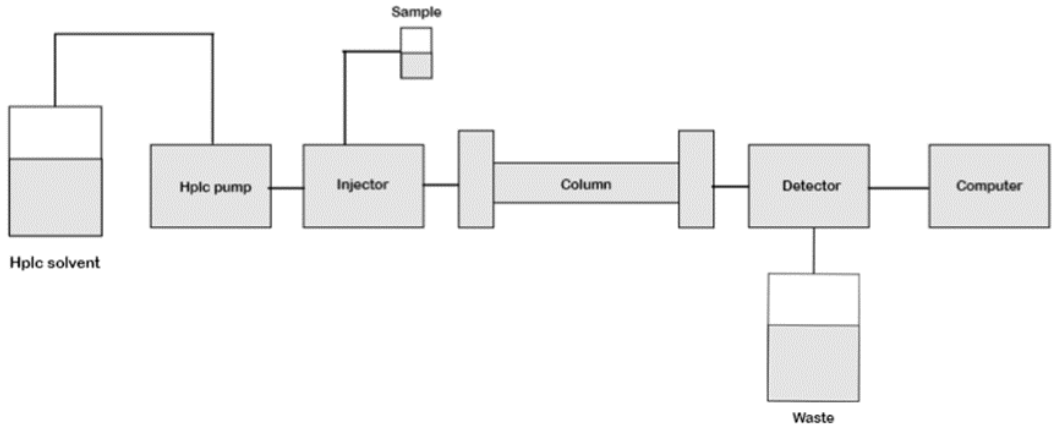
یافته‌ها

اجزای دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا شامل بخش‌های زیر است (شکل ۱):

- مخزن‌های فاز متحرک: یک یا چند مخزن شیشه‌ای حاوی حلال‌های مورد استفاده در فاز متحرک
- پمپ: پمپ دستگاه باید فشار تا PSI ۶۰۰۰ را، بدون نوسان برای جریان در گستره ml/min ۱۰ – ۰/۱ ایجاد کند. پمپ‌های پیستونی مهم‌ترین کاربرد را در دستگاه دارند. پمپ باید در برابر تخریب توسط حلال‌های شیمیایی مقاوم باشد. پمپ‌های پیستونی برای جلوگیری از ایجاد اشکال در آشکارساز، از دو سیلندر و دو پیستون ساخته شده‌اند که این دو

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]



شکل ۱. اجزای دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا

سیستم به تناوب از حلال پر شده و حلال را به سیستم می‌رساند. همچنین در کنار سیستم پمپ، سیستم گاززدایی وجود دارد که هدف آن از بین بردن حباب‌های موجود در حلال‌ها به منظور جلوگیری از ورود آن‌ها به داخل ستون و تخریب آن و همچنین ایجاد اثر منفی در نتایج آنالیز است.

- تزریق کننده: تزریق کننده نمونه را وارد ابتدای ستون می‌کند. استفاده از حلقه‌های نمونه برداری برای مشخص کردن حجم تزریق، روش متداولی برای وارد کردن نمونه به ستون است. این حلقه‌ها قابل تعویض بوده و حجمی بین ۵ تا ۵۰۰ میکرولیتر را فراهم می‌کنند. تزریق کننده نباید در میزان فشار دستگاه نوسان ایجاد کند.
- ستون کروماتوگرافی: بخش اصلی دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، ستون است. جداسازی نمونه در این بخش صورت می‌گیرد. اکثر ستون‌های کروماتوگرافی مایع از جنس فولاد زنگ نزن هستند و طول آنها بین ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر است. زمانی که نیاز به طول بیشتری باشد، می‌توان دو یا چند ستون را به یکدیگر متصل کرده و طول مورد نظر را ایجاد کرد. قطر داخلی اکثر ستون‌ها بین ۴ تا ۱۰ میلی متر و اندازه ذرات پرکننده ستون بین ۵ تا ۱۰ میکرومتر است.
- شناساگر یا آشکارساز: آشکارساز با توجه به غلظت موجود در نمونه پاسخ و سیگنال ارائه می‌دهد. از خصوصیات یک آشکارساز ایده‌آل می توان به موارد زیر اشاره کرد:
  - حساسیت مناسب
  - پایدار بودن و تکراپذیری نتایج آن
  - خطی بودن پاسخ آن در گستره وسیعی از غلظت‌ها برای تمام ترکیبات
  - عدم ایجاد اثرات تخریبی بر روی ترکیبات
  - سهولت استفاده
  - کوتاه بودن زمان پاسخ فارغ از سرعت جریان (۲, ۴, ۱۶, ۱۷).

مراحل توسعه یک روش اندازه گیری با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

۱- بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیب مورد نظر جمع‌آوری داده‌های مرتبط با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنالیت مورد نظر مانند حلالیت، ضریب تقسیم (logp)، لگاریتم منفی ده ثابت اسیدی (pka) و قطبیت مولکول، می‌تواند به طراحی بهتر روش آنالیز کمک کند.
قطبیت یکی از خصوصیات فیزیکی آنالیت است که به انتخاب حلال و تعیین ماهیت فاز متحرک کمک می‌کند. آنالیت باید در حلال و یا ترکیب حلال‌هایی که به عنوان رقیق کننده استفاده می‌شوند، کاملا محلول باشد و نباید با آنها واکنش دهد. مشخصات رقیق کننده باید مشابه فاز متحرک باشد تا تغییرشکل در پیککروماتوگرام ایجاد نشود (۱۸).

pH و Pka نقش بسیار مهمی در توسعه روش اندازه گیری دارند. اسیدی یا بازی بودن آنالیت به طور کل بر اساس مقدار pH آن، بیان می‌شود. انتخاب کردن pH مناسب برای فاز متحرک می‌تواند با یونیزه کردن آنالیت باعث

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

ایجاد پیک‌هایی متقارن و صاف شود. حصول پیک‌های متقارن و صاف، اهمیت بسیار زیادی در اندازه گیری‌های کمی جهت مشخص شدن کمترین حد تعیین مقدار، تکرار پذیری و صحت روش دارد (۱۹).

pH یک محلول نشان دهنده غلظت یون هیدروژن موجود در محلول است و عددی بین ۰ تا ۱۴ دارد. هر چقدر pH کمتر باشد، محلول غلظت بالاتری از یون هیدروژن داشته و اسیدی‌تر است. بر اساس معادله هندرسون- هاسلباخ، pHای که در آن غلظت اسید با باز مزدوج آن برابر شود، pka است. pH فاز متحرک، با توجه به مقدار Pka تعیین می شود و معمولا مقداری بین pka+2 و pka-2 دارد.

$$pH = pK_a + \log([A^-]/[HA])$$

که در این فرمول HA اسید و A^- باز مزدوج اسید است (۱, ۱۸-۲۱).

۲-انتخاب نوع جداسازی و نوع کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

الف) بر اساس نحوه ی جداسازی

کروماتوگرافی مایع با فاز معمولی

در این روش، فاز ساکن قطبی و فاز متحرک غیر قطبی است و بنابراین زمان بازداری ترکیبات قطبی نسبت به ترکیبات غیر قطبی در این روش بالاتر است (۲۲).

کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس

در این روش، فاز ساکن غیر قطبی و فاز متحرک قطبی است. این روش برای جداسازی دارو ها بیشتر استفاده می‌شود، چون اکثر داروها قطبی هستند. همچنین کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس، رایج‌ترین روش جداسازی و اندازه گیری آنالیت مورد نظر در نمونه‌های شیمیایی، بیولوژیک و غذایی است (۲۲, ۲۳).

ب) بر اساس مکانیسم جداسازی

کروماتوگرافی جذب سطحی

در این روش ترکیب مورد نظر توسط سطح فازساکن جذب می‌شود.

کروماتوگرافی تبادل یونی

در این روش سطح فاز ساکن توسط رزین های تبادل یونی که در سطح خود گروه‌هایی مانند SO_3^- و NR_3^+ دارند، پوشیده شده است. اجزای فاز ساکن با ترکیبات یونی داخل نمونه برهمکنش ایجاد می‌کند و بدین ترتیب مولکول‌های باردار جدا می‌شوند. تغییر در pH فاز متحرک و غلظت نمکی بافر، در میزان زمان بازداری ترکیبات در این روش، تاثیر گذار است.

کروماتوگرافی زوج یونی

نام دیگر این روش کروماتوگرافی صابونی است که در آن یون‌هایی که زنجیره ی هیدروکربنی غیر قطبی دارند با یون‌های با بار مخالف در نمونه جفت شده و توسط روش جداسازی با فاز معکوس جدا می‌شوند.

کروماتوگرافی اندازه‌ای

در این روش فاز متحرک از داخل ستون حاوی ذرات با سایز مشخص عبور کرده و ذرات درشت‌تر موجود در نمونه به این علت که نمی‌توانند وارد ستون شوند، زودتر خارج می‌شوند و بر عکس، ذرات ریزتر وارد ستون شده و دیرتر خارج می‌شوند.

کروماتوگرافی تمایلی

در این روش ترکیب مورد نظر با مولکول‌هایی که در سطح فاز ساکن قرار گرفته‌اند، بر اساس استریوشیمی و باری که دارند، بر همکنش ایجاد می‌کند و بدین ترتیب جداسازی انجام می‌شود. این تکنیک در جداسازی پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و آنتی بادی‌ها در مخلوط نمونه استفاده می‌شود.

کروماتوگرافی کایرال

این نوع از کروماتوگرافی برای انانتیومرها کاربرد دارد. از آنجایی که انانتیومرها با یکدیگر تفاوت فیزیکی و شیمیایی ندارند، برای جداسازی آنها فاز ساکن و یا فاز متحرک باید کایرال شوند (۱۷, ۲۴, ۲۵).

ج) بر اساس روش شویش

شست و شوی ایزوکراتیک

در جداسازی ایزوکراتیک، ماهیت فاز متحرک در طول آنالیز ثابت بوده و این مساله باعث ثبات در موازنه بین آنالیت-فاز متحرک و آنالیت-فاز ساکن می‌شود. بنابراین روش‌های ایزوکراتیک نسبت به روش‌های گرادیانت، قابل پیش بینی‌تر بوده، اگرچه قدرت جداسازی آن ها کمتر است. تعداد پیک‌هایی که توسط این روش جدا می‌شود کمتر از روش گرادیانت بوده و هر چقدر آنالیت در ستون بیشتر بازداری شود، پیک مرتبط با آن پهن تر خواهد شد (۱, ۱۷).

شست و شوی گرادیان

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

در مقایسه با روش‌های ایزوکراتیک، روش‌های گرادیانت توانایی جداسازی بالاتری داشته و پیک‌ها پهنای کمتری دارند. در زمانی که پیک آنالیت، کشیدگی دارد، با افزایش قدرت شویندگی فاز متحرک، پهنای پیک کاهش می‌یابد و توانایی جداسازی دو پیک نزدیک به هم نیز به طبع آن افزایش پیدا می‌کند. پهنای پیک به میزان شیب تغییرات در ماهیت فاز متحرک بستگی دارد. بنابراین از روش گرادیانت برای نمونه‌های پیچیده که شامل چندین ترکیب هستند، استفاده می‌شود، چرا که امکان جداسازی همه ترکیب‌ها با شاخص بازدارندگی بین ۱ تا ۱۰ با ترکیب ثابتی از فاز متحرک، وجود ندارد. با روش گرادیانت، جداسازی همه پیک‌ها در یک زمان مشخص با رزولوشن بالا به واسطه تغییر در نوع فاز متحرک امکان پذیر می‌شود (۱۷).

زمانی که از روش گرادیانت استفاده می‌شود، باید به ستون این فرصت داده شود تا به مدت زمان مناسبی با اولین فاز متحرک برنامه در تماس باشد و با آن به تعادل برسد. سپس پس از تزریق نمونه و اجرای برنامه گرادیانت، این امر باید دوباره تکرار شود. انتخاب بین روش گرادیانت و ایزوکراتیک وابسته به تعداد ترکیب مورد آنالیز در یک نمونه است. برای بررسی اینکه آیا روش گرادیانت مناسب است یا ایزوکراتیک، در ابتدا روش گرادیانت اجرا شده و تفاوت تغییر در ساختار فاز متحرک و فاصله بین پیک های مورد نظر بررسی می‌شود (۱, ۱۷, ۲۶, ۲۷).

۳-انتخاب فاز ساکن (ستون)

ستون در واقع قلب سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا است. تغییر در ستون باعث بیشترین تغییر در نتایج روش می‌شود؛ بنابراین، یکی از مهم‌ترین بخش‌های توسعه روش اندازه گیری با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، انتخاب ستون است. فاز ساکن داخل ستون‌ها بر پایه سیلیکا، پلیمر و آلومینیوم است. رایج‌ترین فاز ساکن بر پایه سیلیکا است. ماتریس سیلیکا از این نظر ارجح است که پایدار بوده و مشتق سازی آن آسان است و می‌تواند اندازه ذره‌ای یکنواختی را در طول ستون ارائه دهد و مقاوم بوده و تغییر نمی‌کند. سیلیکا از لحاظ شیمیایی در اکثر حلال های آلی و pH پایین پایدار است. یکی از عیوب سیلیکا حل شدن آن در pH بالاتر از ۷ است، اما در سال‌های اخیر ستون‌های سیلیکایی مقاوم در pH بالاتر از ۷ توسعه یافته‌اند (۲۸).

خصوصیات مشتق سیلیکایی و اندازه ذره‌ای آن بر جداسازی اثر می‌گذارند. از این نظر که هر چقدر اندازه ذره‌ای کوچک‌تر باشد، تعداد صفحات فرضی افزایش یافته و عملکرد جداسازی ستون افزایش می‌یابد. اما از طرفی کوچک‌تر شدن اندازه ذره‌ای باعث افزایش فشار در ابتدای ستون و افزایش احتمال گرفتگی ستون می‌شود. به منظور تهیه ستون برای کروماتوگرافی فاز معکوس، گروه‌های سیلانول آزاد سیلیکا با کلروسیلان آب گریز واکنش می‌دهند، تا یک مشتق غیرقطبی از سیلیکا حاصل شود. به علت مشکلاتی مانند ممانعت فضایی، با استفاده از این واکنش تنها ۱/۳ سیلانول‌های آزاد، تحت اشتقاق قرار می‌گیرند. باقی سیلانول‌های آزاد می‌توانند با آنالیت برهمکنش داشته باشند و این بر همکنش می‌تواند باعث کشیدگی پیک شود. به طور معمول پس از واکنش سیلیکا با کلروسیلان، در مرحله‌ای دیگر، مجدد با کلروتری متیل سیلان وارد واکنش می‌شود تا باقی گروه‌های سیلانول آزاد ستون نیز، دچار اشتقاق شوند و این امر باعث افزایش و بهبود عملکرد ستون می‌شود (۲۹).

فازهای ساکن ستون‌ها شامل انواع چهار کربنه (بوتیل)، هشت کربنه (اکتیل)، هجده کربنه (اکتادسیل)، نیتریل (سیانوپروپیل) و فنیل (فنیل پروپیل) است. به طور کل هر چه زنجیره آلکیلی طویل‌تر باشد، باعث افزایش زمان نگهداری آنالیت‌های غیر قطبی می‌شود:

- ستون‌های سه کربنه (پروپیل)، چهارکربنه (بوتیل) و پنج کربنه (پنتیل) بیشتر در کروماتوگرافی زوج یونی کاربرد دارند (Zorbax SB-C3، YMC-pack C4 و Luna C5).
- ستون‌های هشت کربنه (اکتیل) چند منظوره هستند و زمان بازداری آنها نسبت به ستون‌های هجده کربنه (اکتادسیل) کمتر است، اما در صنعت داروسازی بسیار پر کاربرد هستند (Zorbax SB-C8، Luna C8 و YMC-Pack-MOS).
- ستون‌های هجده کربنه (اکتادسیل) رایج‌ترین ستون‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی مایع فاز معکوس هستند و بالاترین زمان بازداری را برای آنالیت‌های غیرقطبی دارند (Luna C18، Xterra RP-C18 و Zorbax Extend-C18).
- ستون‌های فنیلی زمان بازداری کمتری را نسبت به ستون‌های هشت و هجده کربنه از خود نشان می‌دهند، اما به صورت انتخابی در جداسازی ترکیبات آروماتیک استفاده می‌شوند (Zorbax SB-Phenyl، YMC-Pack Phenyl و Luna Phenyl-Hexyl).
- ستون‌های نیتریلی (سیانو) قطبی هستند و می‌توانند هم در کروماتوگرافی مایع فاز معمولی و هم فاز معکوس

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

استفاده شوند. از این ستون برای افزایش زمان بازداری ترکیبات قطبی استفاده می‌شود (Zorbax SB-CN، Luna-CN و YMC-Pack CN). نوع ستون با توجه به هدف و نوع ترکیب مورد نظر انتخاب می‌شود (۱, ۲۵, ۲۸, ۲۹).

۴-تعیین فاز متحرک

الف) انتخاب حلال

نوع حلال (متانول، استونیتریل و تتراهیدروفوران) بر انتخابی بودن، توانایی جداسازی و حساسیت روش اثر می‌گذارد. انتخاب بین استونیتریل و متانول با توجه به حلالیت آنالیت در هر کدام از این دو حلال و همچنین نوع بافر انجام می‌شود (۳۰). تتراهیدروفوران غیر قطبی‌ترین حلال بین این سه حلال است و به علت جذب بالا در طول موج‌های کم، برای اکثر ترکیبات دارویی غیرقابل استفاده است. اتانول و متانول سمیت کمتری نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی مایع با روش معکوس دارند و امروزه در روش‌های کروماتوگرافی سبز استفاده می‌شوند (۳۱).

فاز متحرک بر رزولوشن، انتخابی بودن و عملکرد سیستم اثر می‌گذارد. در کروماتوگرافی فاز معکوس، فاز متحرک از بافر آبی و یک حلال آلی با جذب UV پایین و قابل اختلاط با آب تشکیل شده است. ماهیت هر کدام از این اجزا و نسبت آنها، بر روش اثر می‌گذارد. انتخاب فازهای متحرک، با توجه به قابلیت یون زایی و میزان آب گریز بودن ترکیبات موجود در نمونه انجام می‌شود. زمانی که فاز متحرک شامل ۱۰۰ درصد حلال آلی باشد، جداسازی رخ نمی‌دهد. چراکه نمونه در ستون نگهداری نمی‌شود و کامل شسته می‌شود. با کاهش قدرت شویندگی فاز متحرک و کاهش درصد حلال آلی و ایجاد رقابت در موازنه بین ترکیب حل شونده-فاز ساکن-فاز متحرک، انجام جداسازی مقدور می‌شود. زمانی که جداسازی پیچیده باشد، یعنی نمونه دارای چندین ترکیب است و یا زمانی که با کاهش قدرت شویندگی فاز متحرک جداسازی مناسبی بین دو پیک نزدیک هم مشاهده نمی‌شود، می‌توان از یک حلال آلی دیگر با قطبیت متفاوت و یا ترکیب دو حلال آلی به عنوان بخش آلی فاز متحرک استفاده کرد (۲۷, ۳۱).

ب) pH فاز متحرک

بافر آبی در pH پایین باعث پروتونه شدن گروه‌های آزاد سیلانولی ستون و کاهش کشیدگی پیک می‌شود و از طرفی در pH پایین، ترکیب‌های بازی، پروتونه شده و سریع‌تر خارج می‌شوند و شکل پیک آنها بهبود پیدا می‌کند. آنالیت‌های اسیدی در pH پایین بدون تغییر مانده و زمان بازداری آنها افزایش پیدا می‌کند. برعکس، در pH بالا، زمان بازداری ترکیبات بازی افزایش یافته، ترکیبات اسیدی یونیزه شده و سریع‌تر خارج می‌شوند. دو شاخه شدن پیک زمانی که PKa بافر و آنالیت خیلی شبیه هم باشد محتمل است، به این دلیل که آنالیت هم به صورت باردار و هم غیر باردار خارج می‌شود. pH بافر تاثیر زیادی بر زمان بازداری ترکیباتی که یونیزه نمی‌شوند، ندارد (۲۷).

غلظت رایج برای بافرها بین ۱۰ تا ۵۰ میلی مولار است و فاز آبی رایجی که برای بافر استفاده می‌شود از حل شدن هیدروژن فسفات ایجاد می‌شود که به آن بافر فسفات می‌گویند. pH بافر فسفات به راحتی با استفاده از نمک‌های مونو، دی و تری بازیک فسفات تنظیم می‌شود. اما زمانی که از این نمک‌ها استفاده می‌شود، بافر حتما باید از فیلر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شود تا رسوبات و ذرات حل نشده فیلتر شوند (۲۵, ۲۷).

ج) انتخاب بافر

با توجه به pH مورد نیاز، بافر مناسب انتخاب می شود. pH رایج در روش‌های کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با ستون‌های سیلیکا دار مقداری بین ۲ تا ۸ دارد. نزدیکی pka بافر با pH مورد نظر از نظر افزایش ظرفیت بافر اهمیت دارد. به طور معمول بهتر است بافری انتخاب شود که pka آن کمتر از ۲ واحد با pH مورد نظر تفاوت داشته باشد (۳۲).

جدول ۱. انواع کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و حلال‌ها و آنالیت‌های رایج آنها (۲۳)

نوع روش	حلال‌های رایج	نوع آنالیت
فاز معکوس	بافر آبی + استونیتریل/متانول	ترکیبات خنثی و غیر یونی که در ترکیب آب و حلال آلی محلول هستند.
فاز معمولی	حلال‌های آلی	ترکیباتی که در مخلوط آب و حلال آلی محلول نیستند.
تعویض یونی	بافر آبی	پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها، اسیدهای آلی و یون‌های غیر آلی
زوج یونی	بافر آبی + استونیتریل/متانول	ترکیب‌های یونی و ترکیب‌های که قابلیت یونی شدن دارند.
اندازه‌ای	آب، تتراهیدروفوران، کلروفرم	ترکیباتی که وزن مولکولی بالایی دارند.

جدول ۲. بافرهای رایج مورد استفاده با توجه به pH (۳۲)

بافر	pka	مناسب برای pH

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

آمونیوم استات	۴/۸	۳/۸ – ۵/۸
	۹/۲	۸/۲ – ۱۰/۲
آمونیوم فرمات	۳/۸	۲/۸ – ۴/۸
	۹/۲	۸/۲ – ۱۰/۲
پتاسیم دی هیدروژن فسفات و فسفوریک اسید	۲/۱	۱/۱ – ۳/۱
پتاسیم دی هیدروژن فسفات و دی پتاسیم فسفات	۷/۲	۶/۲ – ۸/۲
پتاسیم استات و استیک اسید	۴/۸	۳/۸ – ۵/۸
بورات	۹/۲	۸/۲ – ۱۰/۲
آمونیوم هیدروکساید/آمونیاک	۹/۲	۸/۲ – ۱۰/۲
ترفلورواستیک اسید	<۲	۱/۵ – ۲/۵
پتاسیم فرمات و فرمیک اسید	۳/۸	۲/۸ – ۴/۸

نکات کلی در رابطه با انتخاب بافر

- فسفات بیشتر در ترکیب آب و متانول محلول است تا ترکیب استونیتریل و آب یا ترکیب آب و تتراهیدروفوران.
- نمک بعضی از بافرها جاذب الرطوبه هستند که باعث تغییر در شکل پیک‌ها (به خصوص در ترکیب‌های بازی) و تضعیف انتخابی بودن روش می‌شود.
- نمک‌های آمونیوم به طور کلی بیشتر در ترکیب یک حلال آلی و آب، محلول هستند.
- تتراهیدروفوران با گذر زمان تخریب می‌شود، فرار است و در طول موج‌های پایین جذب دارد.
- فازهای متحرکی که در ترکیب آنها مقدار حلال آلی کم بوده و یا کاملا آبی هستند، پتانسیل آلودگی میکروبی بالایی دارند و باعث تخریب ستون و عملکرد سیستم می‌شوند.
- در pH بالاتر از ۷، بافر فسفات باعث حل شدن سیلیکای ستون می‌شود و این مساله به شدت طول عمر ستون را کاهش می‌دهد؛ بنابراین استفاده از بافر آلی در pH بالاتر از ۷، ترجیح داده می‌شود.
- اسید فسفریک و نمک‌های سدیم و پتاسیم آن، رایج ترین بافر برای کروماتوگرافی مایع فاز معکوس هستند.
- برای بررسی ترکیبات ارگانوفسفاتی می‌توان از بافرهای سولفاتی استفاده کرد.
- بافرها پس از آماده شدن باید از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شوند.
- فاز متحرک و بافرها باید گاز زدایی شوند (۳۳).

تعیین ظرفیت بافر و راه‌های افزایش آن

به توانایی مقاومت بافر در برابر تغییرات pH، ظرفیت آن می‌گویند و در تعریفی دیگر به میزان مول‌هایی از سدیم هیدروکساید به منظور افزایش pH بافر به مقدار یک واحد، ظرفیت آن می‌گویند. ظرفیت بافر با افزایش غلظت مولاری آن افزایش پیدا می‌کند و هر چقدر pH بافر به pKa اسید نزدیک‌تر باشد، ظرفیت بافر بیشتر می‌شود (۳۴).

۵-انتخاب آشکارساز

آشکارساز نقش بسیار مهمی در توسعه روش دارد. انتخاب آشکارساز مرتبط با مشخصات شیمیایی آنالیت، اختلالات احتمالی در روش، حد تشخیص مورد نیاز، در دسترس بودن و قیمت آن است:

- آشکارساز ماورابنفش چند منظوره است و حساسیت مطلوبی را در روش‌های تشخیص ناخالصی و اندازه گیری کمی ارائه می‌دهد.
- آشکارساز آرایه دیود نوری مناسب سیستم‌های ادغام شده با طیف سنج جرمی و کروماتوگرافی Preparative است.
- آشکارساز ضریب شکست، حساسیت، پایداری و تکرارپذیری بالایی برای ترکیباتی که جذب UV نداشته و یا جذب UV آنها کم است، ارائه می‌دهد.
- آشکارساز فلورسانت، حساسیت و انتخابی بودن بالایی را در غلظت‌های بسیار پایین آنالیت مورد نظر نشان می‌دهد (۳۵).

جدول ۳. انواع آشکارساز و موارد استفاده آنها (۲۳)

آشکارساز	ترکیباتی که می‌توانند شناسایی کند
ماورابنفش و آرایه دیود نوری	ترکیبات کروموفور، مانند حلقه‌های آروماتیک و یا ساختارهایی که در آن یکی در میان پیوند دوگانه وجود دارد.
فلورسانت	ترکیبات فلورسانتی که معمولاً در ساختار خود حلقه‌های به هم جوش خورده دارند و یا ساختار مزدوج دارند.
ضریب شکست	ترکیباتی که توسط سایر آشکارسازها به خوبی شناسایی نمی‌شوند مانند پلی‌مرها و ساکاریدها

۶-دمای ستون

تعیین و کنترل دمای ستون در تکرار پذیری روش تاثیرگذار است. از این نظر که تغییر در دما می‌تواند در انتخابی بودن روش به دلیل حساس بودن آنالیت به دما، اثر بگذارد. بازه دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد برای تکرار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

پذیری مناسب است. استفاده از دماهای بالاتر باعث کاهش فشار در ابتدای ستون با کاهش ویسکوزیته فاز متحرک می‌شود. زمانی که فشار ستون کاهش یابد، می‌توان از سرعت جریان بالاتر استفاده کرد تا زمان آنالیز کاهش یابد. استفاده از آون ستون تغییرات دمایی را از بین می‌برد و باعث افزایش تکرارپذیری روش می‌شود (۳۶).

اگرچه که تغییرات دمایی می‌تواند باعث تغییر در انتخابی بودن روش شود، اما تاثیر آن اندک است. افزایش دما به اندازه یک درجه سانتی گراد، شاخص K (شاخص بازدارندگی) را ۱ تا ۲ درصد کاهش می‌دهد. اثر افزایش دما در کاهش شاخص K، بیشتر در رابطه با ترکیبات خنثی است و اثر آن در رابطه با ترکیبات یونیزه شده کمتر است (۲۷, ۳۶).

۷-آماده سازی نمونه

آماده سازی نمونه مرحله بسیار مهمی در توسعه روش آنالیز است که در آن باید مسائلی اعم از نیاز به فیلتر کردن، سانتریفیوژ کردن و تکان دادن نمونه و غیره مشخص شود. توانایی فیلترهای موجود در جداسازی ترکیبات نامطلوب از نمونه باید بررسی شود. نوع فیلترها و اندازه منافذ آنها باید مشخص شود (۳۷).

نمونه نهایی که آماده تزریق به دستگاه است باید در فاز متحرک محلول باشد و حلال نمونه باید قابل اختلاط با حلال‌های موجود در فاز متحرک باشد. همچنین نمونه حل شده در حلال باید در طول آنالیز، از پایداری مناسبی برخوردار باشد و غلظت آن باید مناسب با روش و هدف آن باشد (۱۰).

۸-بهینه سازی روش

تغییر و تنظیم موارد زیر در بهینه سازی روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا از اهمیت قابل توجهی برخوردار هستند:

۱. فاز متحرک شامل:

- بررسی و تنظیم pH
- درصد حلال آلی و آب (۳۰)
- نوع حلال آلی مورد استفاده
- ایزوکراتیک یا گرادیانت بودن
- سرعت جریان فاز متحرک در سیستم (۳۸)

۲. فاز ساکن و ستون شامل:

- نوع ستون و فاز ساکن
- اندازه سایز ذره‌ای: هر چه سایز ذره‌ای کوچک‌تر باشد، حساسیت و جداسازی روش افزایش پیدا می‌کند، اما از طرفی دیگر فشار ابتدای ستون نیز بالا می‌رود.
- طول ستون
- قطر داخلی ستون: بر حساسیت، رزولوشن و میزان نمونه‌ای که می‌تواند به داخل ستون تزریق شود اثر می‌گذارد.

۳. دمای سیستم

۴. حجم نمونه و حجم تزریق

هنگام انجام بهینه سازی، در هر مرحله، یک پارامتر تغییر کرده و تغییرات حاصل در نتیجه روش، مستندسازی شده و در صورت نیاز در مراحل بعد، پارامترهای دیگر دچار تغییر می‌شوند (۱, ۲۳, ۲۶, ۳۰).

بحث

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) یکی از مهم‌ترین و دقیق‌ترین روش های شیمی تجزیه در تحلیل کمی و کیفی دارو است که توانایی جداسازی، شناسایی و اندازه گیری ترکیبات موجود در نمونه های محلول در آب را دارد. از مزایای روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نسبت به سایر روش-های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی گازی می‌توان به تنوع در فاز ساکن و متحرک، حساسیت بالا، تکرارپذیری مناسب و عدم وجود محدودیت در فرار بودن و مقاومت نسبت به حرارت آنالیت اشاره کرد (۵-۷, ۹).

روش آنالیز دارویی می‌تواند با بررسی پارامتر های مهمی اعم از فراهمی زیستی، ناخالصی‌ها، پایداری و یکنواختی، اطلاعات ارزشمندی را در روند شناسایی و اندازه‌گیری دارو در ترکیبات مختلف اعم از فرم دارویی و مایعات بدن ارائه دهد و در نتیجه در بخش کنترل کیفیت، محصولات سالم و مناسب را شناسایی کرده و از ایجاد مشکل در سایر مراحل مختلف تولید جلوگیری کند. از سوی دیگر، هم‌زمان با افزایش شرکت‌های دارویی و محصولات دارویی نوین در دنیا، نیاز به روش‌های آنالیتیکال در بخش کنترل کیفیت افزایش یافته است (۲, ۱۰).

در این مقاله مروری به اصول طراحی و توسعه یک روش آنالیتیکال با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و عوامل موثر و متغیرهای آن اشاره شد. پارامترهایی اعم از pH،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]
[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

pKa و حلالیت آنالیت، نقش کلیدی در طراحی اولیه روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا در رابطه با آنالیز آنالیت مورد نظر دارند. سپس با توجه به خصوصیات آنالیت مورد نظر، نوع روش کروماتوگرافی مایع بالا با عملکرد بالا و نوع آشکارساز انتخاب شده و در ادامه نوع فاز ساکن و متحرک مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت به منظور بهینه سازی روش پارامتر هایی نظیر نوع حلال، نوع بافر و pH آن، ماهیت و درصد حلال آلی و آبی و سرعت جریان در فاز متحرک و اندازه سایز ذره‌ای، قطر داخلی، طول و نوع ستون در فاز ساکن، دمای سیستم و حجم تزریق دچار تغییر و تنظیم می‌شوند.

REFERENCES

1. Sabir AM, Moloy M, Bhasin PS. HPLC method development and validation: A review. Int Res J Pharmacy 2013;4:39-46.

2.Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR, eds. Principles of instrumental analysis. Boston: Cengage Learning; 2017.

3.Bhardwaj SK, Dwivedia K, Agarwala D. A review: HPLC method development and validation. International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry 2015;5:76-81.

4.Rajan H. Development and validation of HPLC method-A Review. International Journal of Current Research in Pharmacy 2015;1:55-68.

5.Gupta V, Jain ADKJ, Gill N, Guptan K. Development and validation of HPLC method-a review. International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences 2012;2:17-25.

6.Kumar V, Bharadwaj R, Gupta G, Kumar S. An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation process for drug analysis. The Pharmaceutical and Chemical Journal 2015;2:30-40.

7.Rao BV, Sowjanya GN, Ajitha A, Rao VUM. A review on stability indicating HPLC method development. World J Pharm Pharm Sci 2015;4:405-23.

8.Sonia K, Nappinnai M. Development and validation of HPLC and UV-visible spectrophotometric method for the pharmaceutical dosage form and biological fluid–review. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences 2016;3:382-91.

9.Nikolin B, Imamović B, Medanhodžić-Vuk S, Sober M. High perfomance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. Bosn J Basic Med Sci 2004;4:5.

10.Ahuja S. Overview of HPLC method development for pharmaceuticals. In: Ahuja S, ed. Separation science and technology. Vol. 8. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 1–11.

11.Ahuja S, ed. Chromatography and separation science. San Diego: Academic Press; 2003.

12.Ahuja S, Dong M, eds. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Amsterdam: Elsevier; 2005.

13.Kazakevich YV, Lobrutto R, eds. HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken: John Wiley & Sons; 2007.

14.Mohammad T, Pandya K, Zaveri M, Sathe P. HPLC method development and validation for pharmaceutical analysis-A Review. International Pharmaceutica Sciencia 2012;2:14.

15. Patwekar S, Sakhare R, Nalbalwar N. HPLC method development and validation: a general concept. Int J Chem Pharm Sci 2015;6:8–14.

16.Jena A. HPLC: highly accessible instrument in pharmaceutical industry for effective method development. Pharm Anal Acta 2012;3:147

17. McMaster MC, ed. LC/MS: a practical user's guide. Hoboken: John Wiley & Sons; 2005.

18.Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR, eds. Fundamentals of analytical chemistry. Boston: Cengage Learning; 2013.

19.Jeffery GH, Bassett J, Mendham J, Denney RC, eds. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 2022.

20.Chandrul Kaushal K, Srivastava B. A process of method development: A chromatographic approach. J Chem Pharm Res 2010;2:519-45.

21.Phani R, Prasad K, Reddy U. Scientific Approach for RP-HPLC Method Development: Complete Review. International Journal of Science Innovations and Discoveries 2012;2:218-28.

22.Rao G, Goyal A. An overview on analytical method development and validation by using HPLC. The Pharmaceutical and Chemical Journal 2016;3:280-9.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]

[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]

23.Yadav V, Bharkatiya M. A review on HPLC method development and validation. Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci 2017;2:178–87.

24. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL, eds. Practical HPLC method development. Hoboken: John Wiley & Sons; 2012.

25.Dong MW, ed. HPLC and UHPLC for practicing scientists. Hoboken: John Wiley & Sons; 2019.

26.Patil MPN. HPLC Method Development–A Review. Journal of Pharmaceutical Research and Education 2017;1(2):243-60.

27. Patnaik P, ed. Dean's analytical chemistry handbook. New York: McGraw-Hill Education; 2004.

28.Donald D, Mumtaz S. Development and validation of HPLC stability indicating assays. In: Huynh-Ba K, ed. Drug stability: principles and practices. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 329–84.

29. Christian GD, Dasgupta PK, Schug KA, eds. Analytical chemistry. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013.

30.Faramarzi MA, Yazdi MT, Jahandar H, Amini M, Monsef-Esfahani HR. Studies on the microbial transformation of androst-1, 4-dien-3, 17-dione with Acremonium strictum. J Ind Microbiol Biotechnol 2006;33:725.

31. de la Guardia M, Garrigues S, eds. Handbook of green analytical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons; 2012.

32.Patel M, Patel D, Ahir K, Singh S. A Review: Development and validation of HPLC method. Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research 2019;9:173-82.

33.Chandra M, ed. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. San Diego: CALBIOCHEM, a brand of EMD Biosciences Inc, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 2003.

34.Reversed-phase H. Buffers: High Quality Buffers (solutions, solids or concentrates): available from: ccc. chem. pitt. edu/wipf/web/HPLC_RP_buffers. pdf. Accessed April. 2013;5.

35.Lindholm J, ed. Development and validation of HPLC methods for analytical and preparative purposes. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2004.

36.Sethi PD, ed. HPLC: quantitative analysis of pharmaceutical formulations. 1st ed. New Delhi: CBS Publishers & Distributors; 2012. P.1005.

37.Calderon LA, ed. Chromatography: the most versatile method of chemical analysis. Rijeka: IntechOpen; 2012.

38. Moradpour Z, Torshabi M, Faramarzi MA, Tabatabaei Yazdi M, Ghasemi Y, Jahandar H, et al. Microalgal transformation of androst-4-en-3,17-dione by Nostoc ellipsosporum. Res J Microbiol 2006;1:289–93.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.3.3.3]

[DOI: 10.61882/iau.35.3.275]