

HPLC

راهنمای کاربردی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

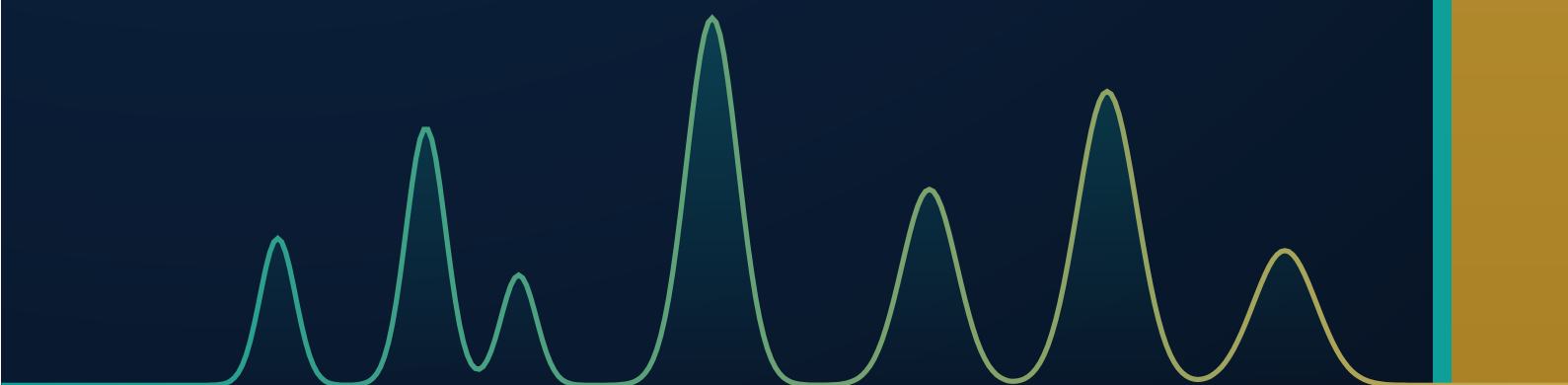
از مبانی جداسازی تا عیب‌یابی سیستماتیک
ویژه کارشناسان واحد کنترل کیفیت

High-Performance Liquid Chromatography – An Applied Handbook for the QC Laboratory

- ◆ مبانی جداسازی، پارامترهای کروماتوگرافی و معادله تفکیک ◆ اجزای دستگاه، ستون‌ها و دتکتورها
- ◆ فاز متحرک، الزامات فارماکوپه و سیستم سوتیبیلیتی ◆ صحت‌گذاری، کوالیفیکیشن و یکپارچگی داده
- ◆ عیب‌یابی سیستماتیک و 12 مطالعه موردی ◆ مسائل محاسباتی حل‌شده و پرسش‌های ارزیابی



C18 · 150 × 4.6 mm · 5 μm



PharmaVault

گنجینه اطلاعات داروسازی · pharmavault.ir · مهر 1405
دانلود رایگان · هرگونه کپی‌برداری و بازنشر بدون مجوز ممنوع است





حقوق نشر و شرایط استفاده

Copyright and terms of use

© 1405 PharmaVault – pharmavault.ir

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر، شامل متن، ساختار، جداول، شکل‌ها و طراحی گرافیکی، متعلق به PharmaVault (گنجینه اطلاعات داروسازی) است.

این هندبوک به صورت رایگان و صرفاً برای مطالعه شخصی و استفاده حرفه‌ای در محل کار ارائه شده است.

هرگونه کپی‌برداری، تکثیر، بازنشر کامل یا بخشی، ویرایش، ترجمه، استخراج متن یا شکل‌ها، فروش، و قرار دادن فایل یا محتوای آن در وبسایت‌ها، کانال‌ها، گروه‌ها و شبکه‌های اجتماعی بدون مجوز کتبی PharmaVault ممنوع است و بر اساس قانون حمایت حقوق مؤلفان و مصنفان و هنرمندان پیگرد قانونی دارد.

برای معرفی این هندبوک به همکاران، لطفاً لینک صفحه دانلود در pharmavault.ir را به اشتراک بگذارید.

نحوه استناد

PharmaVault. راهنمای کاربردی HPLC در واحد کنترل کیفیت: از مبانی جداسازی تا عیب‌یابی سیستماتیک. هندبوک رایگان هفته، شماره 1، ویرایش 1.0، مهر 1405. pharmavault.ir

سلب مسئولیت

محتوای این هندبوک برای اطلاع‌رسانی تخصصی و ارتقای دانش کاربردی تهیه شده و جایگزین متن رسمی نسخه جاری فارماکوپه‌ها، گایدلاین‌های مراجع نظارتی و SOPهای مصوب سازمان نیست. داده‌های شکل‌ها و مطالعات موردی نمایشی است.



فهرست

فهرست مطالب

Contents

4	پیشگفتار – درباره این هندبوک
5	نمادها و اختصارها
6	فصل 1 – مبانی جداسازی و پارامترهای کروماتوگرافی
6	HPLC و جایگاه آن در کنترل کیفیت
7	کروماتوگرام و پارامترهای بنیادی
8	معادله تفکیک و سه متغیر کنترل کننده
9	پهن شدگی نوار و معادله Van Deemter
9	تقارن پیک: تیلینگ فاکتور
10	حالت های جداسازی در HPLC
12	فصل 2 – اجزای دستگاه و مسیر جریان
12	مخازن حلال و دگازینگ
13	پمپ: قلب سیستم
14	اتوسمپلر
15	محفظه ستون و کنترل دما
15	لوله ها، اتصالات و حجم خارج از ستون
16	دکتور و سیستم داده
17	فصل 3 – ستون ها: شیمی، ساختار و نگهداری
17	ساختار فیزیکی ستون
17	بستر سیلیکا و ذرات
18	شیمی فاز ساکن
20	دیوتینگ در فاز متحرک آبی
20	گارد ستون و فیلتر این لاین
20	نگهداری، شستشو و ذخیره ستون
22	فصل 4 – دکتورها
22	دکتورهای جذب فرابنفش-مرئی
24	سایر دکتورها
26	کنترل عملکرد دکتور
27	فصل 5 – فاز متحرک و ملاحظات روش
27	حلال ها: قدرت الوشن، شفافیت فرابنفش و ویسکوزیته



28	بافر ها و کنترل pH
30	الوشن ایزوکراتیک و گرادیانی
31	جفت یون و افزودنی ها
31	دایلوئنت و حجم تزریق

فصل 6 – الزامات فارماکوپه و آزمون سیستم سوتیبیلیتی

32	پارامترهای سیستم سوتیبیلیتی
34	تنظیمات مجاز شرایط کروماتوگرافی
35	محاسبات کمی

فصل 7 – صحه گذاری، تأیید و انتقال روش

37	ویژگی های صحه گذاری بر اساس نوع آزمون
38	طراحی آزمایش ها
39	تأیید روش فارماکوپه ای و انتقال روش

فصل 8 – عملیات روزمره، کوالیفیکیشن دستگاه و یکپارچگی داده

41	روال کار روزانه
42	کوالیفیکیشن دستگاه تجزیه ای
43	یکپارچگی داده
44	ارتباط با بررسی نتایج خارج از مشخصات

فصل 9 – عیب یابی سیستماتیک

45	اصول عیب یابی
45	مشکلات فشار
47	مشکلات بیس لاین
48	مشکلات شکل پیک
49	مشکلات ریتنشن تایم
49	مشکلات کمی سازی

فصل 10 – مطالعات موردی عیب یابی

فصل 11 – مسائل محاسباتی حل شده

پیوست الف – جدول عیب یابی سریع

پیوست ب – پرسش های ارزیابی همراه با پاسخ

پیوست ج – واژه نامه فارسی-انگلیسی

پیوست د – منابع و مطالعه بیشتر

72	کتاب های مرجع
72	مقالات کلیدی
72	فارماکوپه ها و گایدلاین ها





پیشگفتار

درباره این هندبوک

About this handbook

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) پرکاربردترین روش تجزیه‌ای در واحدهای کنترل کیفیت صنایع داروسازی است؛ از آزمون شناسایی و تعیین مقدار ماده مؤثره تا تعیین ناخالصی‌ها، آزمون انحلال، یکنواختی محتوا و مطالعات پایداری. با وجود این گستردگی، بخش قابل‌توجهی از انحراف‌ها، نتایج خارج از مشخصات (Out-of-Specification, OOS) و توقف‌های دستگاه در عمل به چند علت تکرارشونده بازمی‌گردد: درک ناکافی از سازوکار جداسازی، انتخاب یا نگهداری نامناسب ستون، آماده‌سازی غیراستاندارد فاز متحرک، تفسیر نادرست الزامات فارماکوپه و رویکرد غیرسیستماتیک به عیب‌یابی.

این هندبوک برای آشنایی دقیق‌تر، تسلط جامع‌تر و ارتقای کیفیت فعالیت روزمره کارشناسان در کار با دستگاه HPLC در واحد کنترل کیفیت تدوین شده است. محتوا بر پایه منابع مرجع کروماتوگرافی، فصل‌های عمومی فارماکوپه‌های **USP** و **Ph. Eur.** و رهنمودهای **ICH** بازنویسی شده و تمرکز آن بر پرسش‌هایی است که در عمل آزمایشگاه مطرح می‌شود: «چرا فشار ستون به تدریج بالا می‌رود؟»، «چرا پیک ماده مؤثره تیلینگ‌دار شده است؟»، «کدام تغییر در روش بدون صحت‌گذاری مجدد مجاز است؟» و «یک تزریق خارج از روند را چگونه باید بررسی کرد؟».

ساختار هندبوک از مبانی نظری جداسازی (فصل 1) آغاز می‌شود، به اجزای دستگاه، ستون‌ها، دتکتورها و فاز متحرک (فصل‌های 2 تا 5) می‌پردازد، سپس الزامات فارماکوپه، سیستم سوتیبیلیتی، صحت‌گذاری و عملیات روزمره همراه با کوالیفیکیشن دستگاه و یکپارچگی داده (فصل‌های 6 تا 8) را مرور می‌کند و در پایان به عیب‌یابی سیستماتیک، مطالعات موردی و مسائل محاسباتی حل‌شده (فصل‌های 9 تا 11) می‌رسد. پیوست‌ها شامل جدول عیب‌یابی سریع، پرسش‌های ارزیابی همراه با پاسخ، واژه‌نامه و فهرست منابع است.

از منابع مرجع: کادرهای طلایی

در سراسر هندبوک، کادرهای طلایی‌رنگ خلاصه‌ای بازنویسی‌شده از دیدگاه‌ها و مفاهیم کلیدی کتاب‌ها، مقالات و متون رسمی مرجع است و منبع هر کادر در انتهای آن ذکر شده است. این کادرها نقل‌قول مستقیم نیستند؛ برای مطالعه متن کامل به منبع اصلی (پیوست د) مراجعه شود.

اعتبار الزامات رسمی

الزامات فارماکوپه و رهنمودها به‌طور دوره‌ای بازننگری می‌شوند. خلاصه‌های این هندبوک برای درک مفهومی و مرور سریع است؛ در هر تصمیم مستند (انطباق، تغییر روش، پذیرش نتیجه) **متن نسخه جاری** فارماکوپه یا رهنمود مربوط و SOPهای داخلی سازمان ملاک عمل است.



نمادها و اختصارها

نماد	کمیت	واحد رایج	توضیح
t_R	ریتنشن تایم (Retention time)	min	زمان خروج رأس پیک از لحظه تزریق
t_M , t_0	زمان مرده (Hold-up time)	min	زمان خروج جزء بدون ریتنشن
k	ریتنشن فاکتور (Retention factor)	بی بعد	$k = (t_R - t_M) / t_M$
α	سلکتیویته (Selectivity)	بی بعد	$\alpha = k_2 / k_1$
N	تعداد پلیت های تئوری (Plate number)	بی بعد	شاخص کارایی ستون
H , HETP	ارتفاع معادل پلیت تئوری	μm	$H = L / N$
R_s	رزولوشن (Resolution)	بی بعد	میزان جدایی دو پیک مجاور
T , A_s	تیلینگ فاکتور / ضریب تقارن	بی بعد	در 5 درصد ارتفاع پیک
L , d_c , d_p	طول ستون، قطر داخلی، اندازه ذره	mm , mm , μm	ابعاد ستون
F	فلوریت (Flow rate)	mL/min	
u	سرعت خطی فاز متحرک	mm/s	$u = L / t_M$
V_M , V_D	حجم مرده ستون، حجم تأخیر (Dwell volume)	mL	
S/N	نسبت سیگنال به نویز	بی بعد	مبنای LOD و LOQ
RRF	ضریب پاسخ نسبی (Relative response factor)	بی بعد	پاسخ ناخالصی نسبت به ماده مرجع

اختصار	عبارت کامل	اختصار	عبارت کامل
RP / NP	Reversed phase / Normal phase	SST	System suitability test
HILIC	Hydrophilic interaction LC	AIQ	Analytical instrument qualification
UHPLC	Ultra-high-performance LC	CDS	Chromatography data system
VWD / DAD	Variable wavelength / Diode array detector	OOS / OOT	Out of specification / trend
FLD / RID	Fluorescence / Refractive index detector	RSD	Relative standard deviation
ELSD / CAD	Evaporative light scattering / Charged aerosol	LOD / LOQ	Limit of detection / quantitation
SPP / FPP	Superficially / Fully porous particles	+ALCOA	Data integrity principles



فصل 1



مبانی جداسازی و پارامترهای کروماتوگرافی

Chapter 1 – Separation fundamentals and chromatographic parameters

HPLC و جایگاه آن در کنترل کیفیت

HPLC روشی جداسازی است که در آن اجزای نمونه، با عبور فاز متحرک مایع تحت فشار از درون ستونی پرشده با ذرات ریز فاز ساکن، بر اساس تفاوت در توزیع میان دو فاز از یکدیگر جدا می‌شوند. هر جزء که برهم‌کنش قوی‌تری با فاز ساکن داشته باشد، مدت طولانی‌تری در ستون باقی می‌ماند و دیرتر به دتکتور می‌رسد. خروجی دتکتور نسبت به زمان، **کروماتوگرام** نامیده می‌شود و هر پیک آن حامل دو اطلاعات اصلی است: **موقعیت** (ریتنشن تایم) که مبناى شناسایی است و **اندازه** (سطح یا ارتفاع) که مبناى تعیین مقدار است.

در واحد کنترل کیفیت، HPLC در آزمون‌های شناسایی، تعیین مقدار (Assay)، ناخالصی‌ها و محصولات تخریب (Related substances)، انحلال (Dissolution)، یکنواختی محتوا (Content uniformity)، باقی‌مانده پاک‌سازی (Cleaning validation) و مطالعات پایداری به کار می‌رود. قابلیت اطمینان همه این نتایج به سه رکن وابسته است: **جداسازی کافی** (اختصاصی بودن)، **پاسخ تکرارپذیر دتکتور** (دقت) و **کالیبراسیون صحیح** (صحت).

سازوکار توزیع و ریتنشن فاکتور

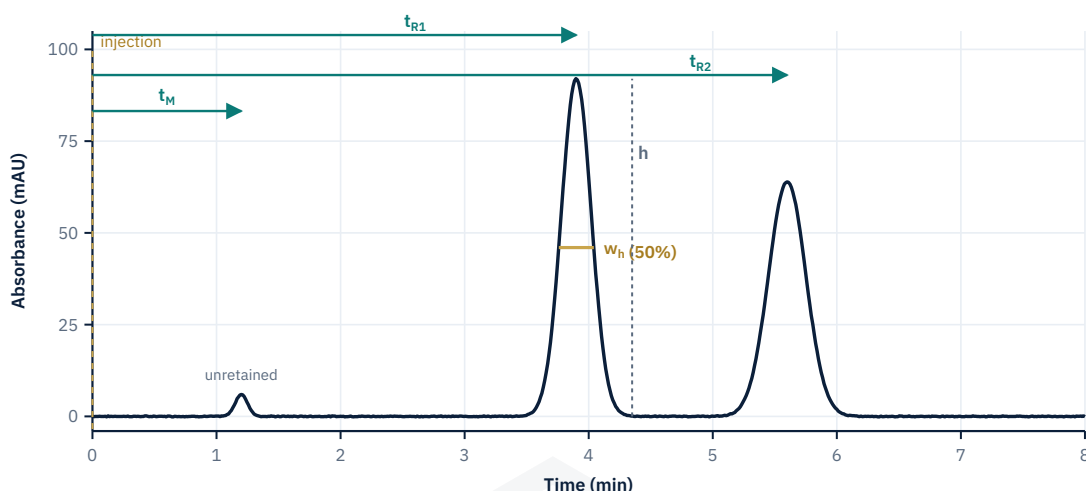
توزیع هر ماده میان فاز ساکن و فاز متحرک با ضریب توزیع $K = C_S / C_M$ توصیف می‌شود. ریتنشن فاکتور k ، که از کروماتوگرام قابل محاسبه است، حاصل ضرب این ضریب در نسبت فازی ستون (V_S / V_M) است. بنابراین هر عاملی که توزیع را تغییر دهد، شامل ترکیب و pH فاز متحرک، دما و نوع فاز ساکن، مستقیماً ریتنشن تایم را تغییر می‌دهد.

$$k = (t_R - t_M) / t_M = K \cdot (V_S / V_M)$$

مزیت ریتنشن فاکتور نسبت به ریتنشن تایم: مستقل از فلوریت و ابعاد ستون است و برای مقایسه شرایط مختلف مناسب‌تر است



کروماتوگرام و پارامترهای بنیادی



شکل 1-1. پارامترهای اصلی یک کروماتوگرام: زمان مرده، ریتنشن تایم، ارتفاع پیک و پهنا در نیمه ارتفاع. داده‌ها نمایشی است.

پارامتر	تعریف و رابطه	مقدار مطلوب رایج
زمان مرده (t_M)	زمان خروج جزء بدون ریتنشن؛ معمولاً از اولین اغتشاش بیس‌لاین یا تزریق یوراسیل/نیترات تعیین می‌شود	—
ریتنشن فاکتور (k)	$(t_R - t_M) / t_M$	حدود 2 تا 10 برای پیک‌های اصلی
سلکتیویته (α)	k_2 / k_1 (همواره $1 \leq$)	بزرگ‌تر از حدود 1.05 برای جفت بحرانی
تعداد پلیت تئوری (N)	$5.54 (t_R / w_h)^2$	وابسته به ابعاد ستون؛ طبق روش SST
رزولوشن (R_s)	$1.18 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$	$1.5 \leq$ (اغلب $2.0 \leq$ برای جفت بحرانی)
تیلینگ فاکتور (T)	$w_{0.05} / 2f$	نزدیک به 1؛ معمولاً 0.8 تا 1.8

جدول 1-1. پارامترهای بنیادی کروماتوگرافی. روابط مطابق تعاریف هماهنگ‌شده USP <621 و Ph. Eur. 2.2.46 است.

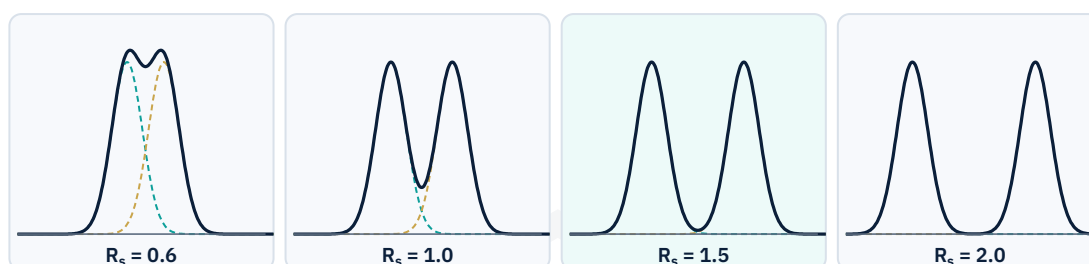
نکته کاربردی آزمایشگاه

محاسبه N با پهناي پیک در نیمه ارتفاع (w_h) نسبت به روش مماس ($N = 16 (t_R/w)^2$) به خطای ترسیم حساسیت کمتری دارد و در نرم‌افزارهای CDS معمولاً به صورت پیش‌فرض استفاده می‌شود. هنگام مقایسه N دو آزمایشگاه یا دو گزارش، حتماً بررسی کنید که هر دو از یک روش محاسبه استفاده کرده باشند؛ در غیر این صورت اختلاف ظاهری ناشی از تعریف است، نه کارایی ستون.



معادله تفکیک و سه متغیر کنترل کننده

رزولوشن معیار نهایی کیفیت جداسازی است. برای دو پیک هم‌اندازه با شکل گاوسی، در $R_s = 1.0$ هر پیک حدود 2.3 درصد به محدوده پیک مجاور نفوذ می‌کند و در $R_s = 1.5$ این همپوشانی به حدود 0.13 درصد می‌رسد؛ به همین دلیل $R_s = 1.5$ «تفکیک تا بیس‌لاین» نامیده می‌شود. در عمل، وقتی یک پیک کوچک (ناخالصی) در کنار پیک بزرگ (ماده مؤثره) قرار دارد، برای کمی‌سازی قابل‌اعتماد به رزولوشن بیشتری نیاز است.



شکل 1-2. دو پیک هم‌اندازه در رزولوشن‌های مختلف. خط چین‌ها پیک‌های منفرد و خط پر سیگنال کل دکتور است.

رابطه بنیادی تفکیک (معادله Purnell) سهم هر یک از سه عامل کارایی، سلکتیویتی و ریتشن را جداگانه نشان می‌دهد:

$$R_s = (\sqrt{N} / 4) \cdot ((\alpha - 1) / \alpha) \cdot (k / (1 + k))$$

جمله اول: کارایی (ستون و دستگاه) – جمله دوم: سلکتیویتی (شیمی جداسازی) – جمله سوم: ریتشن (قدرت فاز متحرک)

- **کارایی (N):** افزایش N با ستون بلندتر یا ذرات ریزتر حاصل می‌شود، اما رزولوشن تنها با جذر N افزایش می‌یابد؛ دو برابر کردن طول ستون R_s را حدود 41 درصد بالا می‌برد و زمان آنالیز و فشار را دو برابر می‌کند.
- **سلکتیویتی (α):** مؤثرترین متغیر است. تغییر نوع حلال آلی (متانول به جای استونیتریل)، pH، دما یا شیمی فاز ساکن (مثلاً فنیل یا PFP به جای C18) می‌تواند ترتیب الوشن و فاصله پیک‌ها را به‌طور اساسی تغییر دهد.
- **ریتشن (k):** افزایش k از 1 به 3 جمله سوم را از 0.50 به 0.75 می‌رساند، اما بالاتر از حدود 10 بهبود قابل‌توجهی ایجاد نمی‌کند و فقط زمان آنالیز و پهنای پیک را افزایش می‌دهد.

از منابع مرجع: ترتیب منطقی بهینه‌سازی

منابع مرجع توسعه روش توصیه می‌کنند ابتدا k در محدوده مناسب قرار گیرد (تنظیم درصد حلال آلی)، سپس برای جفت بحرانی α بهینه شود (pH، نوع حلال، دما، نوع ستون) و تنها در پایان، برای کسب حاشیه اطمینان، N افزایش یابد. افزایش طول ستون برای جبران سلکتیویتی ناکافی، راهکاری پرهزینه و معمولاً ناکارآمد است.

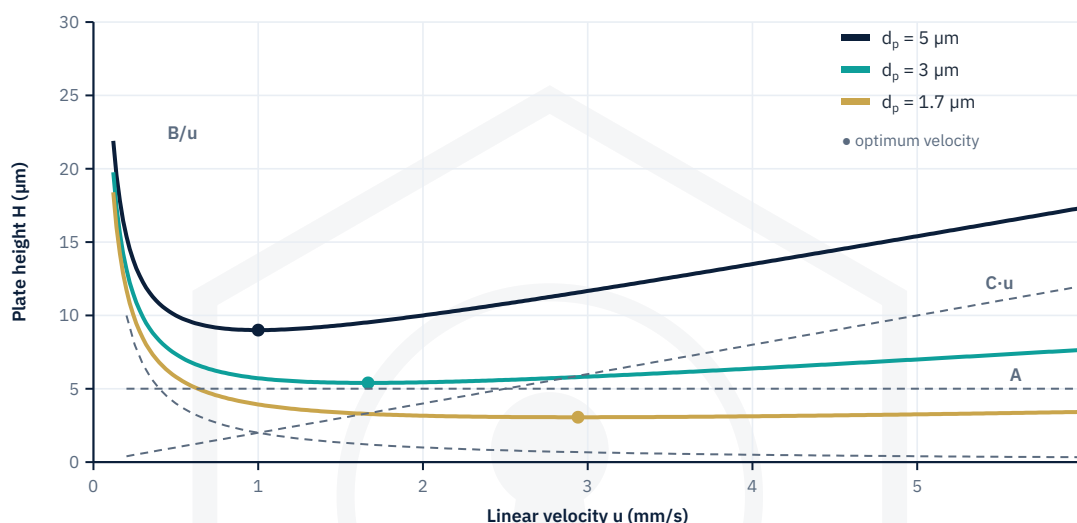
Based on: Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed. (2010); Snyder, Kirkland, Glajch. Practical HPLC Method Development, 2nd ed. (1997)

پهن‌شدگی نوار و معادله Van Deemter

هر ماده به شکل یک نوار باریک وارد ستون می‌شود و در مسیر خود به دلیل سه فرایند مستقل پهن می‌شود. معادله Van Deemter ارتفاع معادل پلیت تئوری ($H = L/N$) را به سرعت خطی فاز متحرک (u) مرتبط می‌کند؛ هرچه H کوچک‌تر باشد، ستون کاراتر است.

$$H = A + B / u + C \cdot u$$

A: پخش گردابی (ناهمگنی مسیرهای جریان در بستر) - B: پخش طولی مولکولی - C: مقاومت در برابر انتقال جرم میان دو فاز



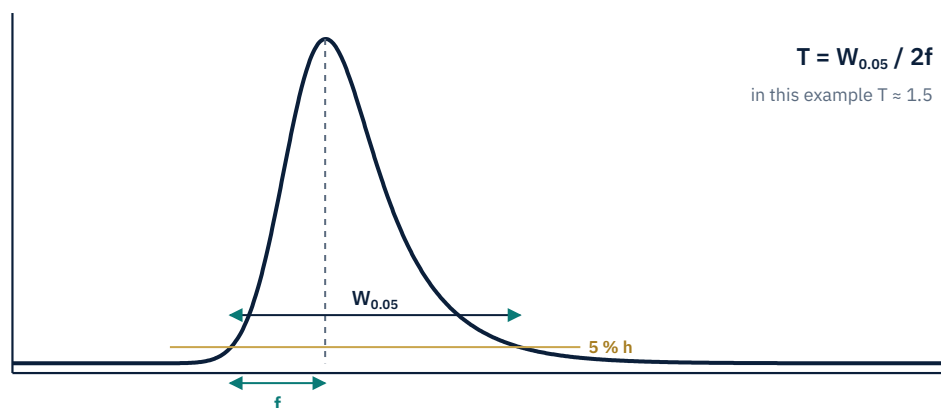
شکل 1-3. منحنی‌های Van Deemter برای ذرات با اندازه 5، 3 و 1.7 میکرومتر (نمایشی، بر اساس پارامترهای کاهش یافته رایج). با کوچک شدن ذره، کمینه منحنی پایین‌تر می‌آید و به سرعت‌های بالاتر جابه‌جا می‌شود. خط‌چین‌ها سهم جملات B/u ، A ، و $C \cdot u$ برای ذره 5 میکرومتر است.

- **پیامد عملی ذرات ریزتر:** کارایی بالاتر و افت کمتر کارایی در سرعت‌های بالا (شیب کمتر شاخه C). در مقابل، افت فشار تقریباً با عکس مجذور اندازه ذره افزایش می‌یابد؛ کاهش اندازه ذره از 5 به 2.5 میکرومتر در طول و سرعت ثابت فشار را حدود چهار برابر می‌کند.
- **ذرات با پوسته متخلخل (Superficially porous, Core-shell):** به دلیل مسیر نفوذ کوتاه‌تر و بستر یکنواخت‌تر، کارایی نزدیک به ذرات کاملاً متخلخل ریزتر را با فشار به مراتب کمتر فراهم می‌کنند (فصل 3).
- **پهن‌شدگی خارج از ستون:** واریانس‌ها جمع‌پذیرند ($\sigma^2_{\text{کل}} = \sigma^2_{\text{ستون}} + \sigma^2_{\text{خارج ستون}}$). لوله‌های بلند یا پهن، اتصالات نادرست و فلوسل دتکتور حجیم، کارایی ستون‌های کوتاه و ذرات ریز را به شدت کاهش می‌دهد.

تقارن پیک: تیلینگ فاکتور

پیک ایده‌آل متقارن (گاوسی) است. انحراف از تقارن، هم دقت انتگرال‌گیری و هم رزولوشن پیک‌های مجاور را کاهش می‌دهد. در USP **تیلینگ فاکتور (T)** و در Ph. Eur **ضریب تقارن (A_s , Symmetry factor)** با رابطه‌ای یکسان و در 5 درصد ارتفاع پیک تعریف می‌شود.





شکل 1-4. تعریف تیلینگ فاکتور: $W_{0.05}$ پهنای کل پیک در 5 درصد ارتفاع و f فاصله لبه جلویی تا عمود رأس در همان ارتفاع است. T برابر 1 نشانه تقارن کامل، T بزرگتر از 1 نشانه تیلینگ (Tailing) و کوچکتر از 1 نشانه فرانتینگ (Fronting) است.

⚠ تفاوت تعریفها

سازندگان ستون در گواهی آزمون اغلب **ضریب عدم تقارن** را به صورت نسبت b/a در 10 درصد ارتفاع گزارش می کنند که از نظر عددی با T فارماکوپه ای برابر نیست. برای قضاوت درباره انطباق با SST، تنها مقدار محاسبه شده با تعریف فارماکوپه معتبر است.

حالت های جداسازی در HPLC

حالت	فاز ساکن	فاز متحرک	سازوکار غالب	کاربرد رایج در QC
فاز معکوس (RP)	C8، C18، فنیل، CN، PFP	آب یا بافر + استونیتریل / متانول	برهم کنش آب گریز	اکثر آزمون های تعیین مقدار و ناخالصی
فاز نرمال (NP)	سیلیکا، دی ال، CN، NH ₂	حلال های غیرقطبی (هگزان، هپتان) + اصلاح گر قطبی	جذب سطحی قطبی	ایزومرها، ویتامین های محلول در چربی
HILIC	سیلیکا، آمید، زویتیرونی	استونیتریل بالا (بیش از حدود 70 درصد) + بافر آبی	تقسیم در لایه آبی سطحی و برهم کنش الکترواستاتیک	ترکیبات بسیار قطبی، یون های مخالف، متفورمین
تبادل یونی (IEX)	رزین یا سیلیکای دارای گروه باردار	بافر آبی با قدرت یونی / pH کنترل شده	جاذبه الکترواستاتیک	یون ها، آمینواسیدها، پروتئین ها
طردی (SEC)	ذرات با اندازه منافذ کنترل شده	بافر آبی یا حلال آلی	طرد بر اساس اندازه مولکولی	تجمعات پروتئینی، توزیع وزن مولکولی پلیمرها
کایرال	پلی ساکاریدهای مشتق شده، پروتئین، سیکلودکسترن	NP، RP یا قطبی آلی	تشکیل کمپلکس گذرای فضاگزین	خلوص آنانتیومری

جدول 1-2. مقایسه حالت های اصلی جداسازی در کروماتوگرافی مایع.



HPLC و UHPLC

سیستم‌های UHPLC برای کار با ذرات کوچک‌تر از حدود 2 میکرومتر و فشارهای بالاتر (به‌طور معمول تا حدود 1000 تا 1300 بار) طراحی شده‌اند و حجم خارج از ستون و حجم تأخیر کمتری دارند. انتقال روش میان HPLC و UHPLC باید با رعایت قواعد تنظیم مجاز فارماکوپه (فصل 6) و با توجه به اثر گرمای اصطکاکی در ستون‌های با ذرات ریز در فشار بالا انجام شود؛ این گرما می‌تواند گرادیان دمایی شعاعی و محوری ایجاد کند و بر سلکتیویته اثر بگذارد.

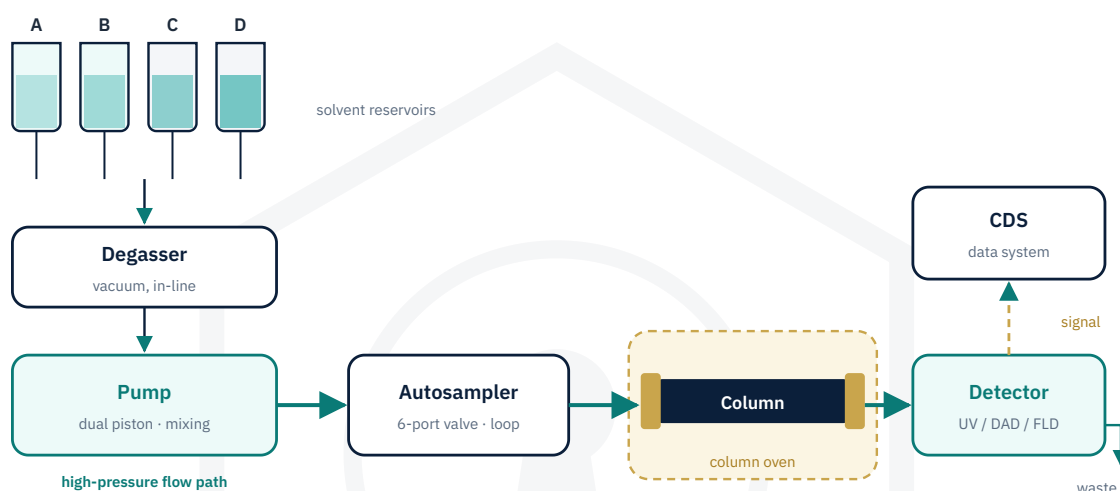


فصل 2

اجزای دستگاه و مسیر جریان

Chapter 2 – Instrument components and flow path

سیستم HPLC از چند واحد مستقل تشکیل شده است که هر یک سهم مشخصی در صحت، دقت و پایداری نتایج دارد. شناخت عملکرد هر واحد، پیش‌نیاز عیب‌یابی سیستماتیک است؛ زیرا هر نشانه در کروماتوگرام، مانند نوسان فشار، نویز بیس‌لاین یا جابه‌جایی ریتنشن تایم، معمولاً به یک واحد مشخص قابل ردیابی است.



شکل 2-1. نمای کلی اجزای سیستم HPLC و مسیر جریان پرفشار از پمپ تا دتکتور.

مخازن حلال و دگازینگ

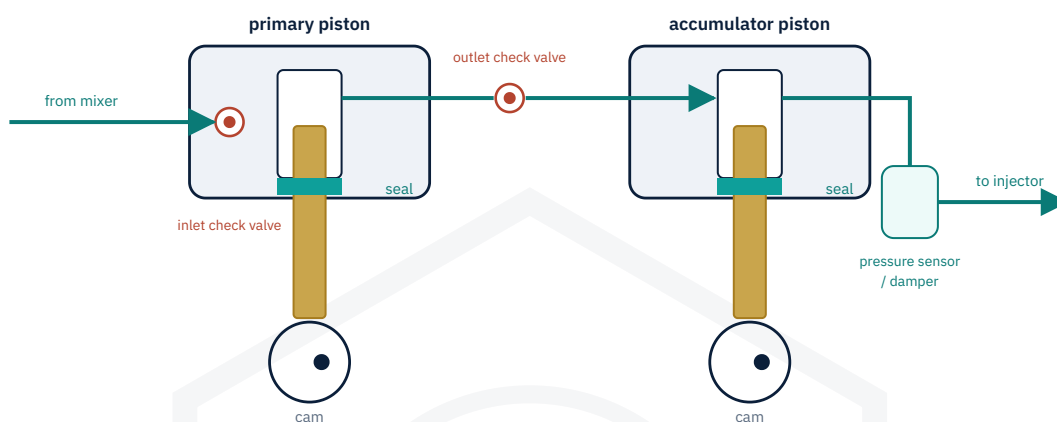
فاز متحرک از مخازن شیشه‌ای از طریق فیلتر ورودی (Inlet frit، معمولاً با تخلخل حدود 10 میکرومتر) کشیده می‌شود. گازهای محلول در فاز متحرک، به‌ویژه هنگام مخلوط شدن آب و حلال آلی که حلالیت گاز را کاهش می‌دهد، در محفظه پمپ یا فلوسل دتکتور به حباب تبدیل می‌شوند و نوسان فشار، خطای فلوریت و نویز یا اسپایک بیس‌لاین ایجاد می‌کنند. دگازرهای خلأ درون‌خطی (In-line vacuum degasser) امروزه روش استاندارد هستند؛ جریان هلیوم (Helium sparging) و صاف‌کردن تحت خلأ روش‌های جایگزین‌اند.

- مخازن را با درپوش مناسب ببندید تا تبخیر جزء فرار (مثلاً استونیتریل یا تری‌اتیل‌آمین) ترکیب فاز متحرک را در طول سکانس تغییر ندهد.
- از «سرریز کردن» (Topping-off) فاز متحرک تازه روی باقی‌مانده فاز قدیمی پرهیز کنید؛ این کار ردیابی سری ساخت و تاریخ را مخدوش و خطر رشد میکروبی در بافرهای آبی را افزایش می‌دهد.
- فیلتر ورودی مسدود، به‌ویژه در بافرهای فسفاتی با غلظت بالا یا رشد میکروبی، به تشکیل حباب در سمت مکش و کاهش واقعی فلوریت منجر می‌شود.



پمپ: قلب سیستم

پمپ باید جریان پایدار و بدون ضربان را در برابر فشار برگشتی ستون (معمولاً 50 تا 400 بار در HPLC و تا حدود 1300 بار در UHPLC) تأمین کند. رایج‌ترین طراحی، پمپ رفت و برگشتی دوپیستونی (Dual-piston reciprocating) است که در دو آرایش موازی یا سری ساخته می‌شود. در آرایش سری، پیستون اول (اصلی) حلال را از چک‌ولو ورودی مکش و با فشار ارسال می‌کند و پیستون دوم (انباشتگر) در زمان مکش پیستون اول، جریان را جبران می‌کند.



شکل 2-2. طرح‌واره پمپ دوپیستونی با آرایش سری: چک‌ولوها (Check valves) جهت جریان را تعیین می‌کنند، سیل پیستون (Piston seal) از نشت جلوگیری می‌کند و سنسور فشار/دمپر باقی‌مانده نوسان را کاهش می‌دهد.

جزء	عملکرد	نشانه خرابی	اقدام پیشگیرانه
چک‌ولو (توپ و نشیمنگاه از یاقوت/سافایر)	جلوگیری از برگشت جریان	نوسان منظم فشار، خطای فلوریت، افت فشار در مکش	صاف کردن فاز متحرک، شستشوی سیستم با آب پس از بافر، جایگزینی دوره‌ای
سیل پیستون	آب‌بندی در فشار بالا	نشت پشت هد پمپ، رسوب نمک، کاهش تکرارپذیری ریتنشن تایم	شستشوی پشت سیل (Seal wash) هنگام کار با بافر، تعویض طبق برنامه نگهداری
پیستون (سرامیک یا سافایر)	جابه‌جایی حلال	خراش، شکستگی، نشت	پرهیز از خشک‌کار کردن، حذف رسوب نمک
ولو تناسب‌ساز (پمپ کواترنری)	اختلاط حلال‌ها با نسبت برنامه‌ریزی‌شده	خطای ترکیب، جابه‌جایی ریتنشن تایم در گرادیان	پرچ منظم همه کانال‌ها، آزمون دقت ترکیب در OQ
دمپر	کاهش نوسان باقی‌مانده	نویز دوره‌ای بیس‌لاین	بررسی در PQ، به‌ویژه در طول موج‌های پایین

جدول 1-2. اجزای پمپ، نشانه‌های خرابی و اقدام‌های پیشگیرانه.

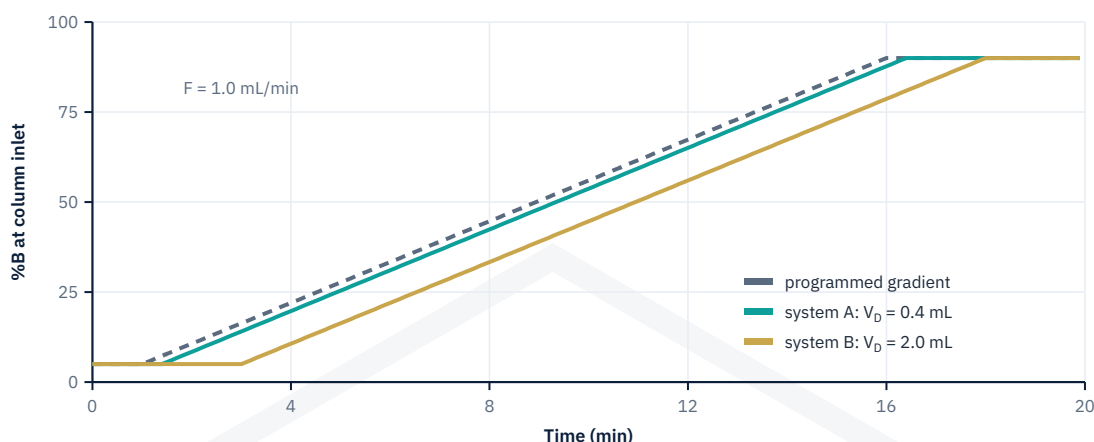
اختلاط در فشار کم و فشار بالا

در **پمپ کواترنری (Quaternary, low-pressure mixing)** یک پمپ واحد و یک ولو تناسب‌ساز، حلال‌ها را پیش از ورود به پمپ با نسبت معین مخلوط می‌کند؛ انعطاف‌پذیری آن بالا است اما حجم تأخیر بیشتری دارد و به دگازینگ کارآمد حساس‌تر است. در **پمپ باینری (Binary, high-pressure mixing)** دو پمپ مستقل هر یک حلال را تحویل می‌دهند و اختلاط پس از پمپ و در فشار بالا انجام می‌شود؛ حجم تأخیر کمتر و دقت ترکیب در درصدهای پایین بهتر است.



حجم تأخیر (Dwell volume)

حجم تأخیر، حجم مسیر از نقطه اختلاط حلال‌ها تا ورودی ستون است. در الوشن گرادیانی، تغییر ترکیب به اندازه V_D / F دیرتر از برنامه به ستون می‌رسد. این حجم در دستگاه‌های مختلف از حدود 0.1 میلی‌لیتر در برخی سیستم‌های UHPLC باینری تا بیش از 1 میلی‌لیتر در برخی سیستم‌های کواترنری متغیر است و یکی از شایع‌ترین علت‌های ناکامی انتقال روش‌های گرادیانی میان دستگاه‌هاست؛ به‌ویژه برای پیک‌هایی که در ابتدای گرادیان خارج می‌شوند.



شکل 2-3. اثر حجم تأخیر بر گرادیان واقعی رسیده به ستون در دو سیستم با برنامه یکسان. اختلاف حدود 1.6 دقیقه در شروع گرادیان می‌تواند ترتیب یا تفکیک پیک‌های ابتدایی را تغییر دهد.

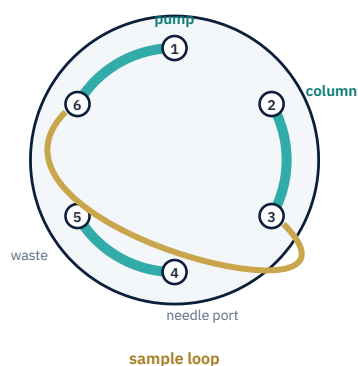
نکته کاربردی آزمایشگاه

حجم تأخیر هر دستگاه را یک بار با روش استاندارد اندازه‌گیری و در پرونده دستگاه ثبت کنید: ستون را با یک اتصال‌دهنده با حجم کم جایگزین کنید، حلال A آب و حلال B آب حاوی حدود 0.1 درصد استون باشد، گرادیان خطی 0 تا 100 درصد B اجرا و در 265 نانومتر پایش شود. زمان رسیدن به نیمه ارتفاع پله منهای نیمه زمان گرادیان، ضرب در فلوریت، برابر V_D است. این عدد در انتقال روش و بررسی انحراف‌ها کاربرد مستقیم دارد.

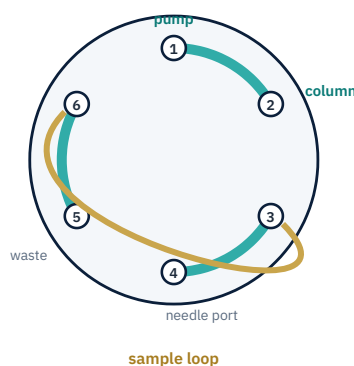
اتوسمپلر

اتوسمپلر (Autosampler) باید حجم مشخصی از نمونه را با تکرارپذیری بالا و بدون کری‌اوور از تزریق قبلی وارد جریان پرفشار کند. اساس اغلب طراحی‌ها ولو شش‌پورت (Six-port valve) است: در وضعیت **بارگذاری** لوپ نمونه (Sample loop) خارج از مسیر پرفشار پر می‌شود و با چرخش ولو به وضعیت **تزریق**، فاز متحرک محتوای لوپ را به سوی ستون می‌برد.

LOAD: loop filled at ambient pressure



INJECT: loop in the high-pressure path



شکل 2-4. ولو تزریق شش پورت در دو وضعیت بارگذاری و تزریق. شیارهای روتور (سبز) در هر وضعیت دو درگاه مجاور را به هم متصل می‌کنند.

- **پرکردن کامل لوپ (Full-loop):** حجم نمونه چند برابر حجم لوپ (معمولاً 2 تا 3 برابر) است و بیشترین دقت را دارد؛ حجم تزریق برابر حجم اسمی لوپ است.
- **پرکردن جزئی (Partial-loop):** حجم تزریق کمتر از حدود نیمی از حجم لوپ است و دقت به دقت سرنگ اندازه‌گیر وابسته است.
- **طراحی سوزن یکپارچه (Flow-through needle):** سوزن و لوپ بخشی از مسیر پرفشار هستند و پس از هر تزریق با فاز متحرک شسته می‌شوند؛ کری‌اوور کمتر است اما حجم تأخیر افزایش می‌یابد.
- **کری‌اوور (Carryover):** با تزریق بلانک پس از غلیظترین استاندارد ارزیابی می‌شود. انتخاب حلال شستشوی سوزن با قدرت حل‌کنندگی کافی برای آنالیت، مؤثرترین راهکار است.
- **کنترل دمای سینی:** برای نمونه‌های ناپایدار یا حلال‌های فرار، تنظیم دمای سینی (مثلاً 5 تا 10 درجه سانتی‌گراد) از تخریب و تبخیر در طول سکانس جلوگیری می‌کند.

محفظه ستون و کنترل دما

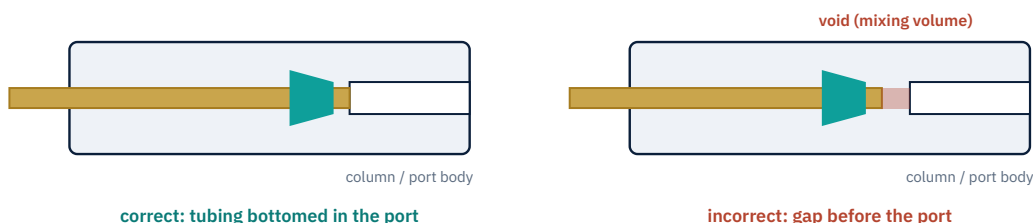
دمای ستون بر ویسکوزیته فاز متحرک، فشار، ریتنشن فاکتور و در مواردی بر سلکتیویته اثر دارد. در فاز معکوس، به‌عنوان قاعده تجربی، افزایش 1 درجه سانتی‌گراد ریتنشن فاکتور را حدود 1 تا 2 درصد کاهش می‌دهد؛ بنابراین نوسان چندین درجه‌ای دمای اتاق در ستون بدون کنترل دما، به‌تنهایی می‌تواند ریتنشن تایم را بیش از حد مجاز جابه‌جا کند. پری‌هیتر فاز متحرک (Pre-heater) از ایجاد گرادیان دمایی شعاعی در ستون جلوگیری می‌کند؛ این موضوع در فلوریت‌های بالا و دماهای بالاتر از حدود 40 درجه اهمیت بیشتری دارد.

لوله‌ها، اتصالات و حجم خارج از ستون

لوله‌های مسیر پرفشار معمولاً از فولاد ضدزنگ یا PEEK با قطر داخلی حدود 0.12 تا 0.25 میلی‌متر هستند. حجم هر قطعه لوله با $V = \pi \cdot r^2 \cdot L$ محاسبه می‌شود؛ برای مثال 50 سانتی‌متر لوله با قطر داخلی 0.25 میلی‌متر حدود 25 میکرولیتر حجم دارد که برای ستون‌های کوتاه با قطر 2.1 میلی‌متر قابل توجه است. مهم‌تر از طول لوله، **کیفیت اتصال** است؛ اگر انتهای



لوله تا ته درگاه ننشسته باشد، فضای خالی ایجادشده به محفظه اختلاط تبدیل می‌شود و پیک‌ها پهن، تیلینگ‌دار یا دوشاخه می‌شوند.



شکل 2-5. اثر نشستن صحیح و نادرست لوله و فرول در درگاه. فاصله کوچک میان انتهای لوله و کف درگاه، حجم مرده‌ای ایجاد می‌کند که شکل پیک را تخریب می‌کند.

⚠ هشدار

فرول‌های فولادی پس از یک بار سفت شدن روی لوله ثابت می‌شوند و عمق نشست آن‌ها با هندسه درگاه همان سازنده تنظیم شده است. انتقال یک لوله با فرول ثابت‌شده به ستون سازنده دیگر، علت شایع حجم مرده یا نشست است. در جابه‌جایی مکرر ستون‌ها از اتصالات انگشتی قابل تنظیم (Finger-tight) مناسب فشار کاری استفاده کنید.

دتکتور و سیستم داده

دتکتور سیگنال الکتریکی متناسب با غلظت یا جرم آنالیت تولید می‌کند و سیستم داده کروماتوگرافی (Chromatography Data System, CDS) آن را جمع‌آوری، انترگرال‌گیری و محاسبه می‌کند. انواع دتکتورها و ویژگی‌های آن‌ها در فصل 4 بررسی شده است. در سطح سیستم، دو تنظیم اثر مستقیم بر کیفیت داده دارد: **سرعت نمونه‌برداری داده** (Data rate) که باید حداقل حدود 20 نقطه در پهنای پیک ایجاد کند، و **ثابت زمانی یا پهنای پاسخ فیلتر** (Time constant / Response time) که مقدار بیش از حد آن پیک‌های باریک را پهن و کوتاه می‌کند. CDS همچنین محل اجرای کنترل‌های یکپارچگی داده، شامل حساب‌های کاربری، آدیت تریل (Audit trail) و کنترل نسخه روش‌های پردازش است (فصل 8).

فصل 3

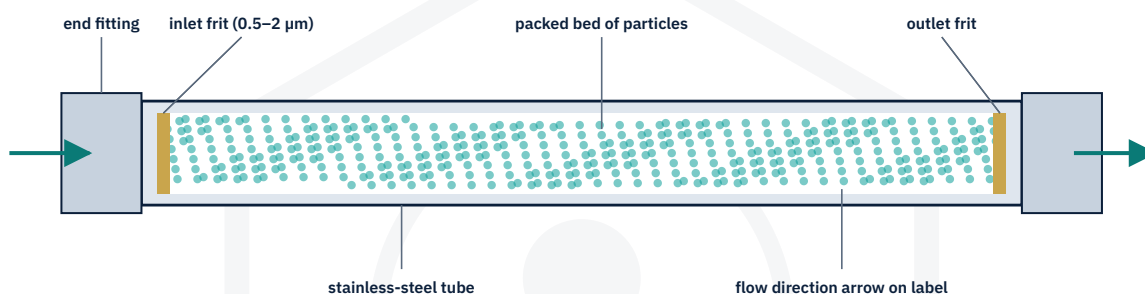


ستون‌ها: شیمی، ساختار و نگهداری

Chapter 3 – Columns: chemistry, morphology and care

ستون محل وقوع جداسازی و حساس‌ترین جزء مصرفی سیستم است. بخش بزرگی از مشکلات تکرارپذیری، تیلینگ و از دست رفتن تفکیک، به انتخاب نادرست، تفاوت سری ساخت (Batch-to-batch variability) یا نگهداری نامناسب ستون مربوط است.

ساختار فیزیکی ستون



شکل 3-1. اجزای یک ستون تحلیلی: لوله فولادی، فريت‌های ورودی و خروجی که ذرات را در جای خود نگه می‌دارند، بستر پرشده و اتصالات انتهایی. جهت جریان روی برچسب ستون مشخص است.

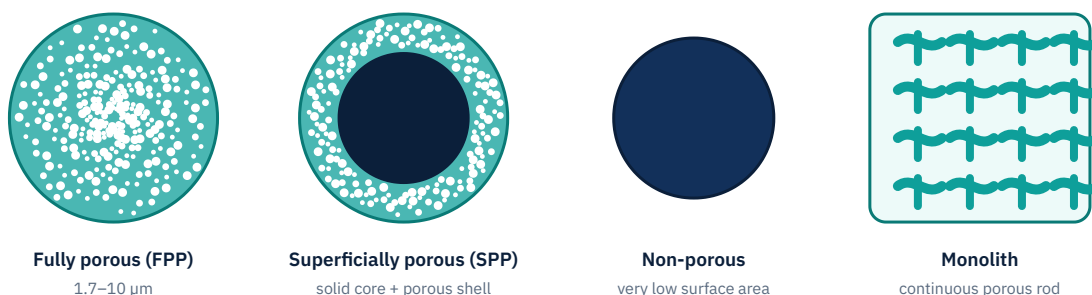
قطر داخلی (mm)	فلوریت رایج (mL/min)	حجم مرده تقریبی ستون 150 mm (mL)	کاربرد
4.6	1.0 تا 2.0	حدود 1.6	HPLC متداول؛ اکثر روش‌های فارماکوپه‌ای
3.0	0.4 تا 0.9	حدود 0.7	کاهش مصرف حلال؛ سازگار با HPLC و UHPLC
2.1	0.2 تا 0.5	حدود 0.33	UHPLC و LC-MS؛ حساس به حجم خارج از ستون

جدول 3-1. ابعاد رایج ستون‌های تحلیلی. حجم مرده با رابطه تقریبی $V_M \approx 0.5 \cdot L \cdot d_c^2$ (L و d_c بر حسب سانتی‌متر، V_M بر حسب میلی‌لیتر) برآورد شده است؛ سرعت‌ها برای ذرات 3 تا 5 میکرومتر است.

بستر سیلیکا و ذرات

اکثر ستون‌های فاز معکوس بر پایه ذرات سیلیکا ساخته می‌شوند. **سیلیکای نوع B** (با خلوص بالا و فلزات بسیار کم) نسبت به سیلیکای قدیمی نوع A، فعالیت سیلانولی کمتر و تیلینگ بسیار کمتری برای ترکیبات بازی ایجاد می‌کند. **ذرات هیبریدی** (سیلیکای حاوی پل‌های آلی مانند اتیلن) پایداری بیشتری در pH بالا دارند و **ذرات پلیمری** در تمام گستره pH پایداری دارند اما کارایی کمتری دارند.





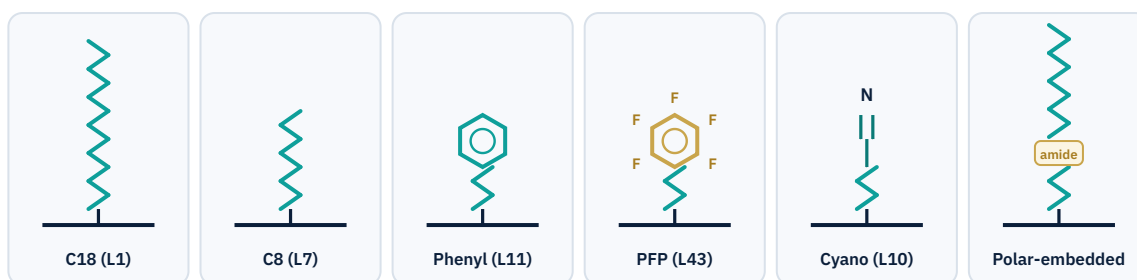
شکل 3-2. ریخت‌شناسی ذرات فاز ساکن. ذرات با پوسته متخلخل (مثلاً 2.7 میکرومتر با هسته جامد حدود 1.7 میکرومتر) به دلیل مسیر نفوذ کوتاه‌تر، کارایی بالا را با فشار کمتر از ذرات کاملاً متخلخل کوچک‌تر از 2 میکرومتر فراهم می‌کنند.

- **اندازه منافذ:** برای مولکول‌های کوچک (وزن مولکولی کمتر از حدود 2000 دالتون) منافذ حدود 80 تا 120 آنگستروم و برای پپتیدها و پروتئین‌ها منافذ حدود 300 آنگستروم مناسب است تا مولکول به سطح داخلی دسترسی داشته باشد.
- **سطح ویژه و درصد کربن:** سطح ویژه بیشتر و بارگذاری کربن بالاتر معمولاً ریتنشن بیشتری ایجاد می‌کند، اما این اعداد به‌تنهایی معیار هم‌ارزی دو ستون نیستند.
- **محدوده pH و دما:** سیلیکای پیوندی متداول معمولاً در محدوده pH حدود 2 تا 8 پایدار است. در pH پایین‌تر، پیوند سیلوکسان فاز پیوندی هیدرولیز می‌شود و در pH بالاتر بستر سیلیکا حل می‌شود؛ هر دو حالت با افزایش دما تشدید می‌شوند. محدوده‌های مجاز هر ستون را از گواهی سازنده بخوانید.

شیمی فاز ساکن



شکل 3-3. طرح‌واره سطح سیلیکا پس از پیوند با زنجیره‌های C18. گروه‌های سیلانول باقی‌مانده (قرمز) منشأ برهم‌کنش‌های ثانویه با بازهای پروتونه‌اند و اندک‌پینگ (End-capping) با گروه‌های تری‌متیل‌سیلیل کوچک (طلایی) بخشی از آن‌ها را می‌پوشاند.



شکل 3-4. لیگندهای متداول فازهای پیوندی و کد USP مربوط. هر شیمی، علاوه بر آب‌گریزی، سازوکارهای سلکتیویته متفاوتی (برهم‌کنش $\pi-\pi$ ، دوقطبی، پیوند هیدروژنی) ایجاد می‌کند.

فاز	سازوکارهای غالب	موارد استفاده مناسب	ملاحظات
C18	آب‌گریزی	انتخاب نخست برای اکثر داروهای مولکول کوچک	تنوع بسیار زیاد میان برندها با برچسب یکسان L1
C8 / C4	آب‌گریزی کمتر	ترکیبات بسیار آب‌گریز، کاهش زمان آنالیز؛ C4 برای پروتئین‌ها	ریتشن کمتر ترکیبات قطبی
فنیل / فنیل‌هگزیل	آب‌گریزی + $\pi-\pi$	ترکیبات آروماتیک، ایزومرهای موقعیتی	اثر $\pi-\pi$ با متانول آشکارتر از استونیتریل است
PFP (پنتاfluورو فنیل)	$\pi-\pi$ ، دوقطبی، پیوند هیدروژنی، تبادل یونی ضعیف	ترکیبات هالوژنه، ایزومرها، بازهای قطبی	سلکتیویته بسیار متفاوت از C18؛ گزینه جایگزین در توسعه روش
CN (سیانو)	دوقطبی، آب‌گریزی کم	قابل استفاده در RP و NP	پایداری کمتر؛ تعادل یابی کندتر
قطبی‌نهفته (Polar-embedded)	آب‌گریزی + پیوند هیدروژنی	بازها با تقارن بهتر، فاز متحرک با درصد آب بالا	ترتیب الوشن ممکن است با C18 متفاوت باشد
C18 سازگار با آب (AQ)	آب‌گریزی	ترکیبات قطبی با فاز متحرک تا 100 درصد آبی	مقاوم در برابر دی‌وتینگ (Dewetting)
HILIC (سیلیکا، آمید، زویتریونی)	تقسیم در لایه آبی، الکترواستاتیک	ترکیبات بسیار قطبی	تعادل یابی طولانی؛ حساس به ترکیب دیالوننت

جدول 3-2. شیمی‌های متداول فاز ساکن و کاربرد آنها.

طبقه‌بندی USP و هم‌ارزی ستون‌ها

در USP، ستون‌ها با کد L طبقه‌بندی می‌شوند. این کدها فقط نوع کلی فاز را مشخص می‌کنند؛ دو ستون با یک کد ممکن است سلکتیویته کاملاً متفاوتی داشته باشند.

کد USP	توصیف خلاصه فاز ساکن	کد USP	توصیف خلاصه فاز ساکن
L1	اکتادسیل سیلان (C18) پیوندی روی سیلیکا یا ذرات سرامیکی	L10	گروه‌های نیتریل (CN) پیوندی روی سیلیکا
L3	سیلیکای متخلخل	L11	گروه‌های فنیل پیوندی روی سیلیکا
L7	اکتیل سیلان (C8) پیوندی روی سیلیکا	L14	سیلیکا با پوشش تبادل آنیونی قوی (آمونیم کواترنری)



کد USP	توصیف خلاصه فاز ساکن	کد USP	توصیف خلاصه فاز ساکن
L8	آمینوپروپیل سیلان (NH ₂) پیوندی روی سیلیکا	L17	رزین تبادل کاتیونی قوی استایرن-دیوینیل بنزن در فرم هیدروژن
L9	سیلیکا با پوشش تبادل کاتیونی قوی	L43	پنتافلوئوروفنیل (PFP) پیوندی روی سیلیکا

جدول 3-3. نمونه‌ای از کدهای پرکاربرد USP. فهرست کامل و تعاریف رسمی در بخش Reagents, Chromatographic Columns فارماکوپه آمده است.

از منابع مرجع: مدل تفریق آب‌گریزی

برای مقایسه عینی ستون‌های فاز معکوس، مدل تفریق آب‌گریزی (Hydrophobic subtraction model) سلکتیویته هر ستون را با پنج پارامتر توصیف می‌کند: آب‌گریزی (H)، ممانعت فضایی (*S)، اسیدیته پیوند هیدروژنی (A)، بازیته پیوند هیدروژنی (B) و برهم‌کنش تبادل کاتیونی (C). پایگاه‌های داده مبتنی بر این مدل، از جمله پایگاه USP، برای یافتن ستون جایگزین با سلکتیویته مشابه، ابزار کارآمدی هستند؛ با این حال هم‌ارزی نهایی تنها با آزمون سیستم سوتیبیلیتی اثبات می‌شود.

Based on: Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. J. Chromatogr. A 1060 (2004) 77–116; USP column equivalency resources

دی‌وتینگ در فاز متحرک آبی

در ستون‌های C18 متداول با فاز متحرک حاوی کمتر از حدود 5 درصد حلال آلی، به‌ویژه پس از توقف جریان و کاهش فشار، آب ممکن است از منافذ آب‌گریز خارج شود (Dewetting). نتیجه، کاهش ناگهانی و شدید ریتشن است که اغلب به اشتباه «فروپاشی فاز» (Phase collapse) نامیده می‌شود. شستشوی ستون با درصد بالای حلال آلی و سپس تعادل مجدد، معمولاً ریتشن را بازمی‌گرداند. برای روش‌های با فاز متحرک تقریباً کاملاً آبی، ستون‌های سازگار با آب (AQ یا قطبی‌نهفته) انتخاب شوند.

گارد ستون و فیلتر این‌لاین

گارد ستون (Guard column) کارتریج کوتاهی از همان فاز ساکن است که پیش از ستون اصلی قرار می‌گیرد و ذرات و ترکیبات با جذب برگشت‌ناپذیر از ماتریس نمونه را به دام می‌اندازد. فیلتر این‌لاین (In-line filter، معمولاً 0.5 میکرومتر) میان اتوسمپلر و ستون، از گرفتگی فریت ورودی ستون اصلی جلوگیری می‌کند. استفاده از گارد ستون در روش‌های فارماکوپه‌ای باید با شیمی یکسان باشد و اثر آن بر سیستم سوتیبیلیتی در صحنه‌گذاری یا تأیید روش ارزیابی شود.

نگهداری، شستشو و ذخیره ستون

1. پیش از استفاده: گواهی آزمون (Certificate of analysis) و دفترچه سازنده را مطالعه و شماره سریال ستون را در دفتر ستون (Column logbook) ثبت کنید. ستون‌ها را برای روش‌های حساس، به‌ویژه روش‌های حاوی جفت‌یون، به‌طور اختصاصی تعیین کنید.



2. حذف بافر: هرگز ستون را مستقیماً از بافر به حلال آلی خالص منتقل نکنید؛ خطر رسوب نمک در منافذ و فریت وجود دارد. ابتدا با حداقل حدود 10 تا 20 حجم ستون از مخلوط آب و حلال آلی بدون نمک با همان درصد آلی (یا حدود 5 تا 10 درصد آلی) شستشو دهید.

3. ذخیره کوتاه مدت و بلندمدت: ستون‌های فاز معکوس را در حلال آلی با غلظت بالا (معمولاً استونیتریل یا متانول بیش از حدود 50 درصد، طبق توصیه سازنده) ذخیره و دو سر آن را با درپوش ببندید.

4. بازیابی (Regeneration): در صورت افزایش فشار یا افت کارایی، سکانس شستشو با حلال‌هایی با قدرت فزاینده (آب، متانول، استونیتریل، ایزوپروپانول) و بازگشت با همان ترتیب، با فلوریت کاهش‌یافته اجرا شود. شستشوی معکوس (Back-flush) تنها در صورت مجاز بودن در دستورالعمل سازنده و بدون اتصال به دتکتور انجام شود.

5. پایش روند: فشار، تعداد پلیت، تیلینگ فاکتور و تعداد تزریق هر ستون را ثبت و روندیابی کنید. افت تدریجی پارامترهای سیستم سوتیبیلیتی پیش از رسیدن به حد پذیرش، زمان مناسب برای تعویض برنامه‌ریزی‌شده ستون را مشخص می‌کند.

نکته کاربردی آزمایشگاه

ستون جدید همیشه با ستون در حال استفاده یکسان رفتار نمی‌کند. برای روش‌های دارای جفت بحرانی با حاشیه تفکیک کم، پیش از به‌کارگیری ستون از سری ساخت جدید، تزریق محلول سیستم سوتیبیلیتی و مقایسه با کروماتوگرام مرجع را به‌عنوان یک گام کنترلی در SOP پیش‌بینی کنید. نگهداری یک ستون پشتیبان از سری ساخت متفاوت، ریسک توقف آزمون‌ها را کاهش می‌دهد.

فصل 4

دتکتورها

Chapter 4 – Detectors

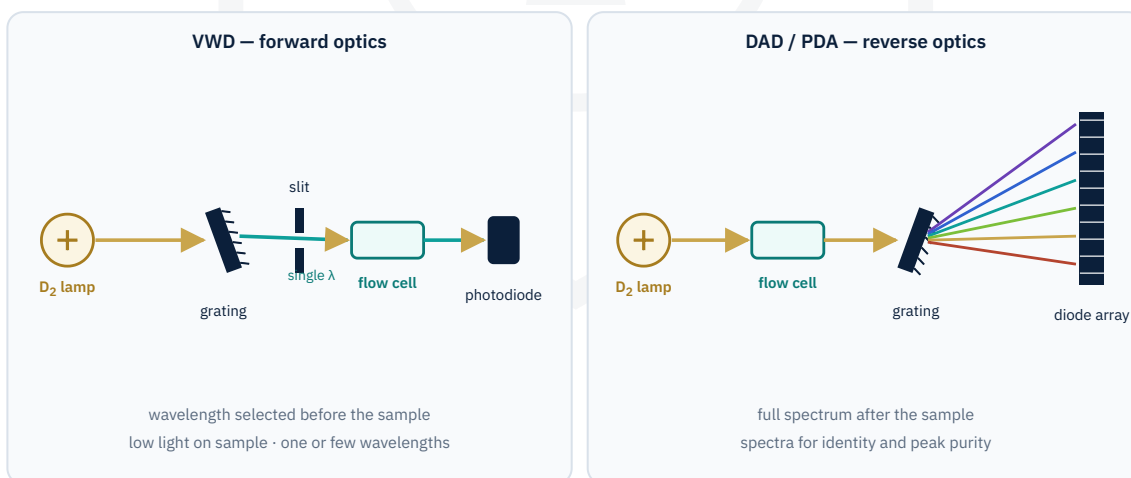
دتکتور باید پاسخی پایدار، حساس، خطی و اختصاصی نسبت به آنالیت ایجاد کند و کمترین پهن‌شدگی را به پیک بیفزاید. انتخاب دتکتور به ساختار شیمیایی آنالیت (وجود کروموفور، فلوئوروفور یا گروه الکتروفعال)، سطح غلظت مورد نیاز، سازگاری با الوشن گرادیانی و الزامات روش بستگی دارد. در واحدهای کنترل کیفیت داروسازی، دتکتورهای جذب فرابنفش-مرئی بیشترین سهم را دارند.

دتکتورهای جذب فرابنفش-مرئی

اساس این دتکتورها قانون Beer-Lambert است: جذب با غلظت آنالیت، طول مسیر نوری فلوسل و ضریب جذب مولی متناسب است. منبع تابش در ناحیه فرابنفش، لامپ دوتریم (گستره حدود 190 تا 400 نانومتر) و در ناحیه مرئی معمولاً لامپ تنگستن است. طول مسیر نوری فلوسل استاندارد حدود 10 میلی‌متر است؛ فلوسل‌های با مسیر بلندتر حساسیت را افزایش و فلوسل‌های با حجم کمتر پهن‌شدگی را کاهش می‌دهند.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A: جذب (AU) - ε : ضریب جذب مولی ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) - b: طول مسیر نوری (cm) - c: غلظت (mol/L)



شکل 4-1. مقایسه آرایش نوری دتکتور طول موج متغیر (VWD) و دتکتور آرایه دیودی (DAD/PDA). در VWD نور پیش از نمونه تک‌فام می‌شود؛ در DAD نور سفید از فلوسل عبور می‌کند و پس از تفکیک توسط توری، طیف کامل همزمان ثبت می‌شود.

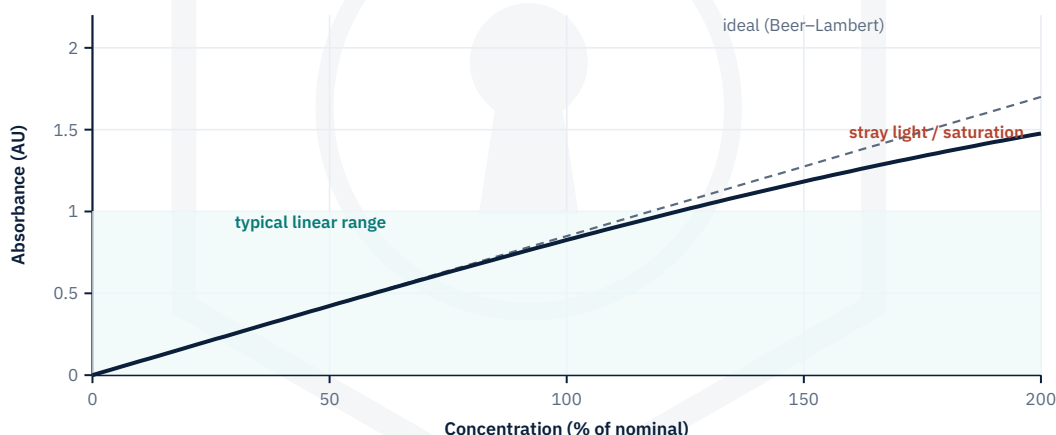
تنظیم	اثر	توصیه کاربردی
طول موج آنالیز	حساسیت و اختصاصی بودن	در نزدیکی بیشینه جذب و در ناحیه‌ای با شیب طیفی کم، تا خطای کوچک طول موج اثر محدودی بر پاسخ داشته باشد

تنظیم	اثر	توصیه کاربردی
پهنای باند (Bandwidth)	پهنای باند بیشتر: نویز کمتر، اختصاصی بودن و خطی بودن کمتر	مطابق روش؛ معمولاً 4 تا 8 نانومتر
طول موج مرجع (DAD)	جبران تغییرات شدت لامپ و ضریب شکست در گرادیان	در ناحیه‌ای که آنالیت جذب ندارد؛ در صورت جذب آنالیت در طول موج مرجع، پاسخ کاهش می‌یابد
پهنای شکاف (Slit)	شکاف باریک: تفکیک طیفی بهتر، نویز بیشتر	برای خلوص پیک و طیف‌سنجی دقیق باریک‌تر
سرعت داده و ثابت زمانی	شکل و ارتفاع پیک	حداقل حدود 20 نقطه در پهنای پیک؛ ثابت زمانی کمتر از حدود یک‌دهم پهنای پیک

جدول 4-1. تنظیمات کلیدی دتکتورهای فرابنفش و اثر آن‌ها.

گستره خطی و اشباع

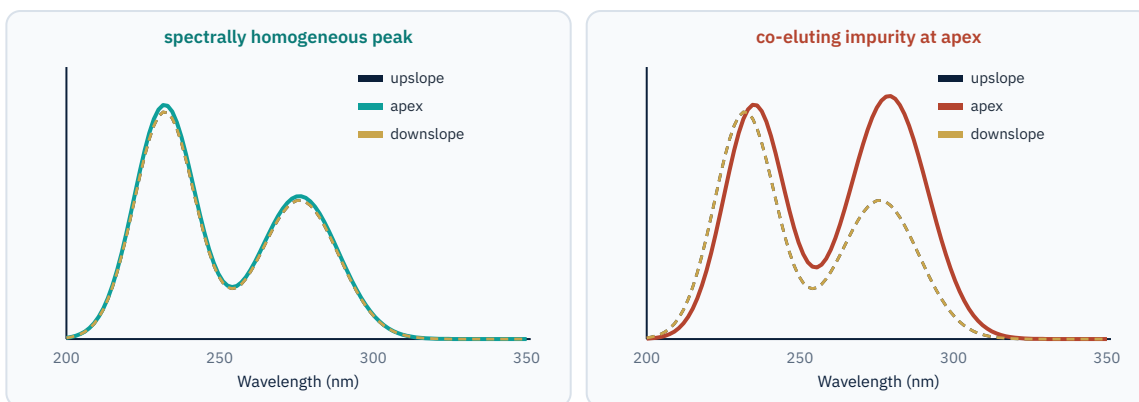
در جذب‌های بالا، نور سرگردان (Stray light) و پهنای باند محدود، رابطه خطی جذب و غلظت را مخدوش می‌کنند. گستره خطی بسیاری از دتکتورهای جدید تا حدود 1 تا 2 واحد جذب است، اما مرز واقعی به دستگاه، طول موج و پهنای باند بستگی دارد. در آزمون‌های تعیین مقدار، جذب پیک اصلی در غلظت اسمی بهتر است در ناحیه میانی گستره خطی باشد تا استانداردهای بالای منحنی کالیبراسیون (مثلاً 120 یا 150 درصد) به ناحیه غیرخطی نرسند.



شکل 4-2. انحراف پاسخ دتکتور از قانون Beer-Lambert در جذب‌های بالا (نمایشی). منحنی کالیبراسیونی که در غلظت‌های بالا خم می‌شود، معمولاً نشانه اشباع یا نور سرگردان است، نه رفتار نمونه.

خلوص طیفی پیک با DAD

دتکتور DAD در هر نقطه از پیک طیف کامل ثبت می‌کند. اگر پیک فقط از یک ترکیب تشکیل شده باشد، طیف‌های نرمال شده در لبه بالارونده، رأس و لبه پایین‌رونده یکسان‌اند؛ کوالویشن یک ناخالصی با طیف متفاوت، این همانندی را برهم می‌زند. نرم‌افزارهای CDS این مقایسه را به صورت شاخص‌هایی مانند زاویه خلوص (Purity angle) در برابر آستانه خلوص (Purity threshold) یا ضریب تطابق طیفی گزارش می‌کنند.

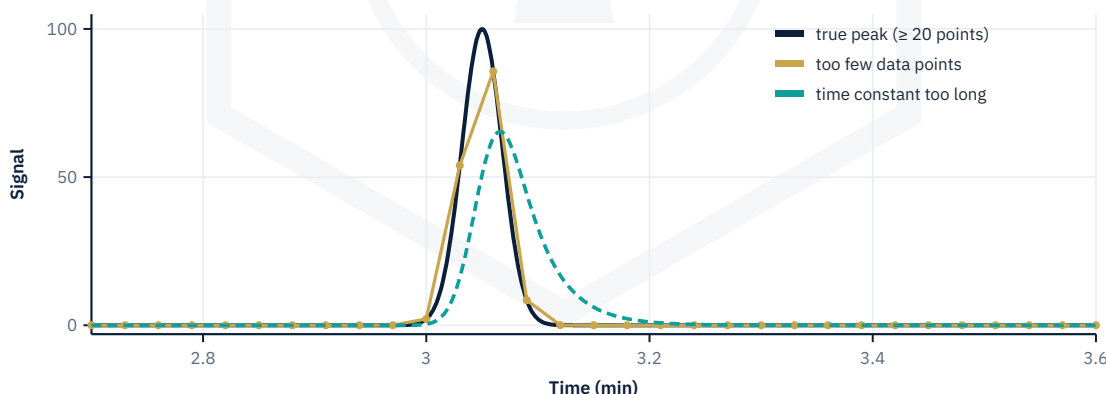


شکل 4-3. مفهوم ارزیابی خلوص پیک: طیف‌های نرمال‌شده در سه نقطه از پیک. سمت چپ: پیک همگن. سمت راست: تغییر شکل طیف در رأس به دلیل کوالویشن ناخالصی با طیف متفاوت (نمایشی).

⚠ محدودیت‌های خلوص طیفی

نتیجه «پیک خالص» در DAD اثبات قطعی اختصاصی بودن نیست. ناخالصی با طیف بسیار مشابه (مانند ایزومرها و بسیاری از محصولات تخریب)، ناخالصی با غلظت بسیار کم نسبت به پیک اصلی، یا کوالویشن کامل در رأس، ممکن است تشخیص داده نشود. همچنین جذب بیش از حد پیک اصلی، نویز طیفی و انتخاب نادرست طول موج مرجع می‌تواند نتیجه کاذب «ناخالص» ایجاد کند. در مطالعات تخریب اجباری، تکمیل ارزیابی با یک روش متعامد (ستون با سلکتیویته متفاوت یا طیف‌سنجی جرمی) توصیه می‌شود.

سرعت داده و ثابت زمانی

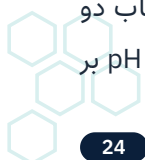


شکل 4-4. اثر سرعت نمونه‌برداری داده و ثابت زمانی فیلتر بر یک پیک باریک (نمایشی). تعداد کم نقاط داده، رأس پیک را از دست می‌دهد و ثابت زمانی طولانی، پیک را کوتاه، پهن و جابه‌جا می‌کند؛ هر دو، ارتفاع، تعداد پلیت و تفکیک را کاهش می‌دهند.

سایر دتکتورها

دتکتور فلورسانس (FLD)

برای ترکیبات فلورسان ذاتی یا مشتق‌شده، حساسیت آن ده تا هزار برابر دتکتور جذبی و سلکتیویته آن به دلیل انتخاب دو طول موج تحریک و نشر بسیار بالاست. خاموشی (Quenching) ناشی از اکسیژن محلول، حلال یا اجزای ماتریس، و اثر pH بر



شدت نشر، از عوامل اصلی خطا هستند. پیک رامان آب، ابزار رایج برای ارزیابی حساسیت و عملکرد این دتکتور است.

دتکتور ضریب شکست (RID)

تقریباً عمومی است و برای ترکیبات فاقد کروموفور مانند قندها، پلی‌ال‌ها و برخی مواد جانبی به کار می‌رود. به دما و ترکیب فاز متحرک بسیار حساس است، با الوشن گرادیانی سازگار نیست و حساسیت محدودی دارد. پایداری دمای فلوسل و ستون و تعادل یابی طولانی، پیش شرط بیس‌لاین پایدار است.

دتکتورهای مبتنی بر افشانه: ELSD و CAD

در این دتکتورها، فاز متحرک افشانده و تبخیر می‌شود و ذرات آنالیت غیرفرار با پراکندگی نور (ELSD) یا با بار الکتریکی منتقل شده (CAD) اندازه‌گیری می‌شوند. با الوشن گرادیانی سازگارند و برای ترکیبات فاقد کروموفور مناسب‌اند، اما فاز متحرک باید کاملاً فرار باشد (بافرهای فسفاتی غیرمجازند) و پاسخ غیرخطی است؛ بنابراین کالیبراسیون معمولاً با مدل غیرخطی یا در گستره محدود انجام می‌شود.

دتکتور الکتروشیمیایی و طیف‌سنج جرمی

دتکتور الکتروشیمیایی (ECD) برای ترکیبات اکسایش‌پذیر یا کاهش‌پذیر، مانند کاتکول‌آمین‌ها، حساسیت بسیار بالا دارد. طیف‌سنج جرمی (LC-MS) با یونش الکترواسپری (ESI) یا یونش شیمیایی در فشار جو (APCI)، بالاترین اختصاصی بودن را برای شناسایی ناخالصی‌ها و محصولات تخریب فراهم می‌کند و به فاز متحرک فرار (فرمیک اسید، استات یا فرمات آمونیوم) نیاز دارد. سرکوب یونی (Ion suppression) ناشی از اجزای ماتریس، مهم‌ترین منبع خطای کمی در LC-MS است.

دتکتور	اختصاصی بودن	حساسیت نسبی	گرادیانی	نیاز فاز متحرک	کاربرد شاخص در QC
UV / VWD	متوسط	خوب	سازگار	شفاف در طول موج کاری	تعیین مقدار، ناخالصی، انحلال
DAD / PDA	متوسط + طیف	خوب	سازگار	شفاف در گستره طیفی	توسعه روش، تخریب اجباری، خلوص پیک
FLD	بالا	بسیار بالا	سازگار	بدون خاموش‌کننده	آنالیت‌های فلورئورسان، مقادیر کم
RID	پایین (عمومی)	پایین	ناسازگار	ترکیب و دمای ثابت	قندها، پلی‌ال‌ها
ELSD / CAD	پایین (عمومی برای غیرفرارها)	متوسط تا خوب	سازگار	کاملاً فرار	مواد فاقد کروموفور، لیپیدها، مواد جانبی
ECD	بالا	بسیار بالا	محدود	رسانا، خالص	ترکیبات الکتروفعال
MS	بسیار بالا	بسیار بالا	سازگار	فرار، بدون فسفات	شناسایی ناخالصی، ناخالصی‌های چشم‌زا

جدول 4-2. مقایسه کیفی دتکتورهای HPLC.

کنترل عملکرد دتکتور

- **انرژی و ساعت کارکرد لامپ:** کاهش انرژی لامپ دوتریم، به ویژه در طول موج‌های پایین (کمتر از حدود 230 نانومتر)، نویز را افزایش می‌دهد. روند انرژی لامپ را ثبت کنید و تعویض را بر اساس عملکرد و نه صرفاً ساعت کارکرد برنامه‌ریزی کنید.
- **صحت طول موج:** با فیلتر داخلی اکسید هولمیوم یا خطوط نشری لامپ دوتریم (مانند 486 و 656 نانومتر) و در صورت نیاز با محلول‌های مرجع (مثلاً بیشینه‌های جذب کافئین) ارزیابی می‌شود. خطای طول موج در گرادیان‌های تند طیف، تغییر قابل توجهی در پاسخ ایجاد می‌کند.
- **نویز و دریفت:** در آزمون کوالیفیکیشن عملیاتی (OQ) با شرایط استاندارد سازنده اندازه‌گیری و با مقادیر قبلی مقایسه می‌شود.
- **فلوسل:** آلودگی پنجره‌ها یا حباب، نویز و دریفت ایجاد می‌کند. شستشو با آب، سپس ایزوپروپانول یا متانول، و در صورت نیاز با محلول‌های پاک‌کننده توصیه‌شده سازنده انجام شود. اعمال فشار برگشتی کم در خروجی فلوسل (مثلاً با لوله باریک) از تشکیل حباب جلوگیری می‌کند، به شرط اینکه از حد فشار مجاز فلوسل تجاوز نکند.



فصل 5



فاز متحرک و ملاحظات روش

Chapter 5 – Mobile phase and method considerations

فاز متحرک در HPLC تنها حامل نمونه نیست، بلکه مستقیماً در سازوکار جداسازی مشارکت می‌کند. ترکیب حلال‌ها، نوع و غلظت بافر، pH و دما، ریتشن و سلکتیویتی را تعیین می‌کنند و کیفیت آماده‌سازی آن یکی از بزرگ‌ترین منابع تغییرپذیری میان روزها، کارشناسان و آزمایشگاه‌هاست.

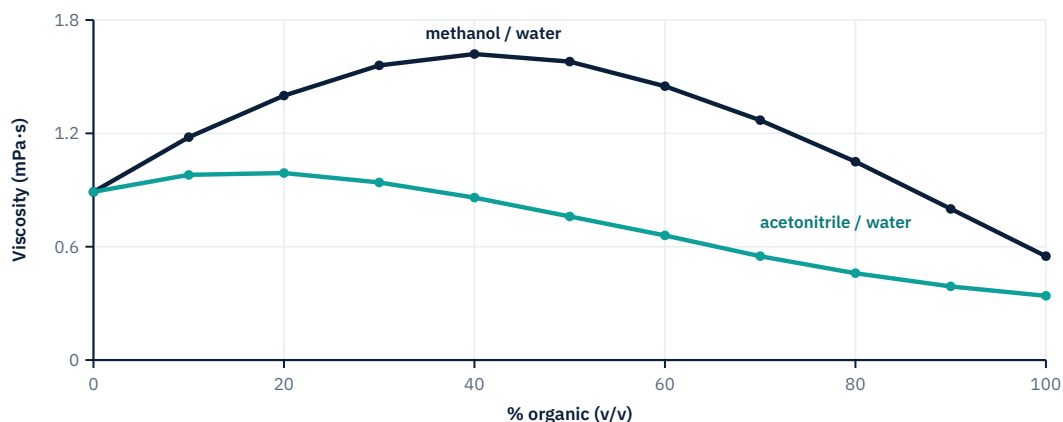
حلال‌ها: قدرت الوشن، شفافیت فرابنفش و ویسکوزیته

در فاز معکوس، آب ضعیف‌ترین حلال است و افزودن حلال آلی قدرت الوشن را افزایش می‌دهد. برای ترکیبات مولکول کوچک، به‌عنوان یک قاعده تجربی، افزایش 10 درصد حجمی حلال آلی ریتشن فاکتور را حدود 2 تا 3 برابر کاهش می‌دهد (قاعده سه‌برابری). استونیتریل، متانول و تتراهیدروفوران سه حلال اصلی‌اند که علاوه بر قدرت، سلکتیویتی متفاوتی (به ترتیب برهم‌کنش دوقطبی، پیوند هیدروژنی دهنده/پذیرنده و برهم‌کنش‌های قطبی ویژه) ایجاد می‌کنند.

حلال	حد قطع فرابنفش (nm)	ویسکوزیته در C°25 (mPa·s)	ملاحظات کاربردی
آب	کمتر از 190	0.89	آب با کیفیت HPLC (مقاومت ویژه حدود 18.2 MΩ·cm، TOC پایین)؛ منبع شایع گوشت پیک‌ها در گرادیان
استونیتریل	190	0.34	فشار کم، شفافیت عالی در طول موج پایین، قدرت الوشن بالاتر از متانول
متانول	205	0.55	سلکتیویتی متفاوت، ارزان‌تر؛ مخلوط با آب ویسکوزیته بالایی دارد
تتراهیدروفوران (THF)	حدود 212 (فاقد پایدارکننده)	0.46	قدرت بالا؛ تشکیل پراکسید، ناسازگار با برخی قطعات PEEK
ایزوپروپانول	205	حدود 2.0	شستشوی ستون، حل‌کردن آلاینده‌های آب‌گریز؛ فشار بالا
اتانول	210	حدود 1.1	گزینه سبزتر؛ ویسکوزیته بالاتر
n-هگزان / -n هپتان	200 / 195	0.39 / 0.30	فاز نرمال

جدول 5-1. ویژگی‌های حلال‌های پرکاربرد. حد قطع فرابنفش برای حلال‌های با کیفیت HPLC و در جذب حدود 1 واحد در فلوسل 10 میلی‌متری است و بسته به سازنده اندکی متفاوت است.





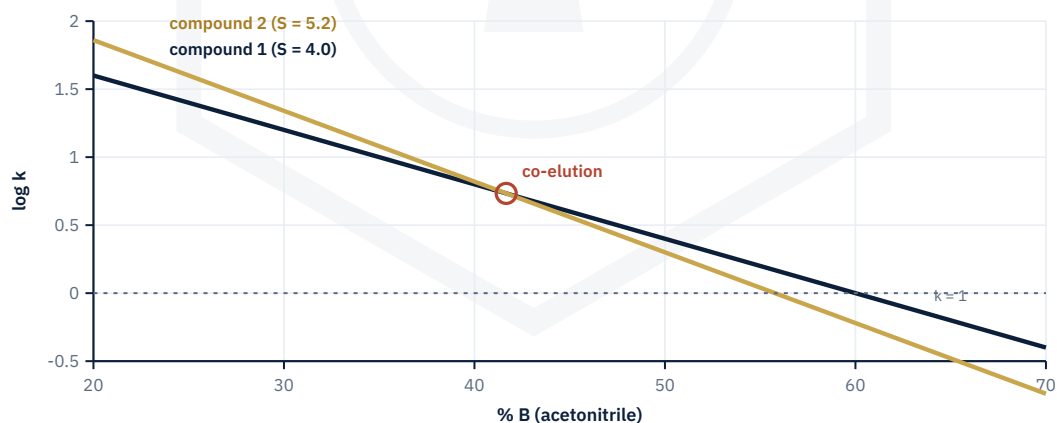
شکل 5-1. ویسکوزیته تقریبی مخلوط‌های آب با متانول و استونیتریل در 25 درجه سانتی‌گراد. بیشینه ویسکوزیته مخلوط متانول-آب در حدود 40 تا 50 درصد، فشار ستون را در الوشن‌گرادیانی به بیشینه می‌رساند.

رفتار حلال‌دردت خطی و تغییر سلکتیویته

در گستره‌ای از ترکیب فاز متحرک، رابطه لگاریتم ریتنشن فاکتور با کسر حجمی حلال آلی (ϕ) تقریباً خطی است. شیب این رابطه (S) برای ترکیبات مختلف متفاوت است؛ بنابراین تغییر درصد حلال آلی، علاوه بر جابه‌جایی همه پیک‌ها، می‌تواند فاصله نسبی پیک‌ها و حتی ترتیب الوشن را تغییر دهد. این پدیده دلیل حساسیت برخی جفت‌های بحرانی به خطای کوچک در آماده‌سازی فاز متحرک است.

$$\log k = \log k_w - S \cdot \phi$$

k_w : ریتنشن فاکتور برون‌یابی‌شده در آب خالص — S : گرادیان، برای مولکول‌های کوچک معمولاً حدود 3 تا 5



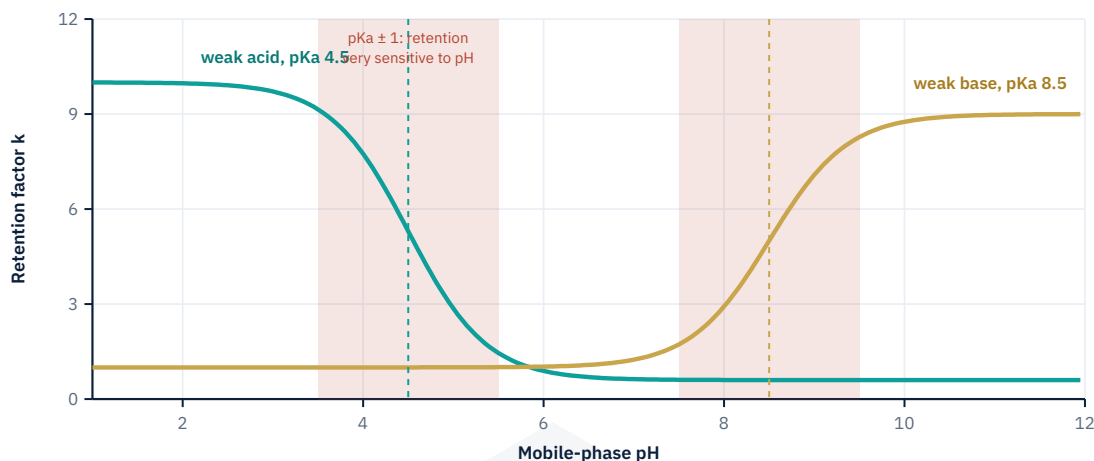
شکل 5-2. دو ترکیب با شیب S متفاوت (نمایشی): با تغییر درصد استونیتریل، فاصله دو پیک تغییر می‌کند و در یک ترکیب مشخص، کوالوشن رخ می‌دهد.

بافرها و کنترل pH

بسیاری از داروها اسید یا باز ضعیف‌اند. شکل یونیزه هر ترکیب در فاز معکوس بسیار کمتر از شکل خنثی ریتنشن می‌شود؛ بنابراین در نزدیکی pK_a ، تغییر کوچک pH تغییر بزرگی در ریتنشن ایجاد می‌کند. قاعده کاربردی برای مقاومت روش، انتخاب



pH حداقل حدود 1.5 تا 2 واحد دور از pKa آنالیت‌ها، و ثابت نگه‌داشتن pH با بافری است که pKa آن در فاصله حدود 1 واحد از pH مطلوب قرار دارد.



شکل 5-3. اثر pH فاز متحرک بر ریتینشن فاکتور یک اسید ضعیف و یک باز ضعیف در فاز معکوس (نمایشی). نواحی قرمز، محدوده $pKa \pm 1$ را نشان می‌دهند که روش در آن به خطای pH بسیار حساس است.

بافر / افزودنی	pKa (25°C)	گستره مؤثر بافری	حد قطع فرابنفش تقریبی (nm)	سازگاری با MS
فسفات	2.1 · 7.2 · 12.3	1.1–3.1 · 6.2–8.2	کمتر از 200	ناسازگار
فرمات (فرمیک اسید / آمونیوم فرمات)	3.8	2.8–4.8	حدود 210	سازگار
استات	4.8	3.8–5.8	حدود 210	سازگار (آمونیم استات)
سیترات	3.1 · 4.8 · 6.4	2.1–7.4	حدود 230	نامناسب
تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA)، حدود 0.1 درصد	کمتر از 1	pH حدود 2 (بافر واقعی نیست)	حدود 210	سرکوب یونی
آمونیم بی‌کربنات / آمونیاک	6.4 · 9.2 · 10.3	8.2–10.2	حدود 200 تا 210	سازگار

جدول 5-2. بافرهای رایج در HPLC. مقادیر pKa گرد شده و گستره مؤثر برابر $pKa \pm 1$ است؛ pKa بافرها به دما و درصد حلال آلی وابسته است.

آماده‌سازی استاندارد فاز متحرک

- توزین به جای حجم‌سنجی تقریبی:** نمک‌ها با ترازوی کالیبره توزین و حجم‌ها با ظروف حجمی کلاس A یا استوانه مدرج مطابق روش سنجیده شوند. ترتیب افزودن اجزا مطابق متن روش رعایت شود.
- اندازه‌گیری pH پیش از افزودن حلال آلی:** pH فقط در بخش آبی و با الکتروود کالیبره در دمای مشخص اندازه‌گیری و تنظیم شود، مگر اینکه روش صراحتاً روش دیگری تعیین کرده باشد. pH ظاهری مخلوط آبی-آلی با pH بخش آبی قابل مقایسه نیست.



3. **غلظت بافر:** معمولاً 10 تا 50 میلی مولار ظرفیت بافری کافی را فراهم می کند. غلظت بالاتر، خطر رسوب در درصدهای بالای حلال آلی (به ویژه برای فسفات پتاسیم در استونیتریل بالاتر از حدود 70 تا 80 درصد) و سایش سیل ها را افزایش می دهد.
4. **صاف کردن و دگازینگ:** بخش آبی حاوی نمک با غشای 0.45 یا 0.2 میکرومتر سازگار با حلال صاف شود. صاف کردن مجدد حلال های آلی با کیفیت HPLC معمولاً ضرورتی ندارد و خطر آلودگی از غشا را دارد.
5. **تاریخ اعتبار:** بافرهای آبی بدون حلال آلی، به ویژه در pH نزدیک خنثی، محیط مناسبی برای رشد میکروبی اند. مدت مجاز استفاده باید بر اساس داده پایداری یا SOP تعیین و روی برچسب ثبت شود.
6. **ثبت و برچسب گذاری:** شماره سری مواد، مقادیر توزین، pH اندازه گیری شده، تاریخ ساخت و انقضا و نام کارشناس، جزئی از سوابق خام آزمون است.

نکته کاربردی آزمایشگاه

اختلاط پیش ساخته (Premixed) و اختلاط درون خطی توسط پمپ برای یک ترکیب اسمی یکسان، الزاماً ریتشن تایم یکسان نمی دهند؛ زیرا انقباض حجمی هنگام اختلاط آب و حلال آلی و خطای تناسب سازی پمپ وجود دارد. اگر روش با فاز متحرک پیش ساخته صحنه گذاری شده است، تغییر به اختلاط درون خطی باید با داده مقایسه ای پشتیبانی شود.

الوشن ایزوکراتیک و گرادیانی

در الوشن ایزوکراتیک ترکیب فاز متحرک ثابت است؛ ساده، مقاوم و قابل انتقال است، اما برای نمونه های با گستره وسیع قطبیت، پیک های دیررس پهن و زمان آنالیز طولانی می شود. در الوشن گرادیانی (Gradient elution)، قدرت فاز متحرک در طول آنالیز افزایش می یابد و پیک ها با پهنای تقریباً یکسان شسته می شوند. ریتشن فاکتور مؤثر در گرادیان (k^*) به زمان گرادیان، فلوریت، حجم ستون و دامنه تغییر ترکیب وابسته است:

$$k^* = (t_g \cdot F) / (1.15 \cdot V_M \cdot \Delta\phi \cdot S)$$

t_g : زمان گرادیان - F : فلوریت - V_M : حجم مرده ستون - $\Delta\phi$: تغییر کسر حلال آلی در طول گرادیان - S : گرادیان رابطه حلال قدرت خطی

- برای حفظ جداسازی هنگام تغییر ابعاد ستون یا فلوریت، باید k^* ثابت بماند؛ یعنی نسبت حجم گرادیان ($t_g \cdot F$) به حجم ستون حفظ شود.
- **تعادل یابی مجدد:** پس از هر گرادیان، ستون باید به ترکیب اولیه بازگردد. معمولاً حدود 5 تا 10 حجم ستون کافی است، اما برای فازهای HILIC و روش های حاوی جفت یون یا افزودنی های جذب شونده، زمان بیشتری لازم است. تکرارپذیری ریتشن تایم پیک های ابتدایی، شاخص کفایت تعادل یابی است.
- **بیس لاین گرادیان:** تفاوت جذب حلال A و B در طول موج کاری، دریافت بیس لاین ایجاد می کند. افزودن مقدار هم ارز افزودنی جاذب (مثلاً TFA) به هر دو حلال، این دریافت را کاهش می دهد.



جفت‌یون و افزودنی‌ها

در کروماتوگرافی جفت‌یون (Ion-pair chromatography)، یک یون آب‌گریز با بار مخالف، مانند آلکیل سولفونات‌ها برای بازها یا نمک‌های تترابوتیل‌آمونیم برای اسیدها، به فاز متحرک افزوده می‌شود تا ریتشن ترکیبات یونی افزایش یابد. این عوامل روی فاز ساکن جذب می‌شوند؛ از این رو تعادل‌یابی طولانی (گاه ده‌ها حجم ستون) لازم است، ستون باید به آن روش اختصاص یابد و دما با دقت کنترل شود. افزودنی‌های آمینی مانند تری‌اتیل‌آمین، که در گذشته برای پوشاندن سیلانول‌ها به کار می‌رفتند، با ستون‌های سیلیکای نوع B کمتر مورد نیاز هستند.

دایلوئنت و حجم تزریق

دایلوئنت (Diluent) باید آنالیت را به‌طور کامل حل کند، پایداری آن را تضمین کند و از نظر قدرت الوشن، برابر یا ضعیف‌تر از فاز متحرک اولیه باشد. تزریق حجم زیاد نمونه در حلال قوی‌تر، آنالیت را پیش از اتصال به فاز ساکن در طول ستون جابه‌جا می‌کند و پیک‌های ابتدایی را پهن، فرانتینگ‌دار یا دوشاخه می‌کند.



شکل 4-5. اثر قدرت دایلوئنت بر پیک‌های ابتدایی (نمایشی): تزریق در حلال قوی‌تر از فاز متحرک، به ویژه با حجم زیاد، پیک اول را تخریب و دوشاخه می‌کند در حالی که پیک‌های دیررس کمتر متأثر می‌شوند.

از منابع مرجع: حجم تزریق قابل قبول

منابع مرجع برای تزریق در حلالی هم‌قدرت با فاز متحرک، حجم تزریق تا حدود 1 تا 2 درصد حجم مرده ستون (برای ستون 4.6×150 میلی‌متر حدود 15 تا 30 میکرولیتر) را معمولاً بدون افت محسوس کارایی می‌دانند. با حلال ضعیف‌تر، حجم بزرگ‌تری قابل تحمل است زیرا آنالیت در ابتدای ستون متمرکز می‌شود (On-column focusing).

Based on: Snyder, Kirkland, Dolan. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed. (2010); Dolan J.W., LC Troubleshooting column, LCGC North America

فصل 6



الزامات فارماکوپه و آزمون سیستم سوتیبیلیتی

Chapter 6 – Pharmacopoeial requirements and system suitability

روش‌های فارماکوپه‌ای و روش‌های صحه‌گذاری شده داخلی، شرایط کروماتوگرافی را همراه با معیارهای سیستم سوتیبیلیتی (System Suitability Test, SST) تعریف می‌کنند. SST بخشی جدایی‌ناپذیر از روش است و تأیید می‌کند که مجموعه دستگاه، ستون، فاز متحرک، محلول‌ها و کارشناس، در زمان انجام آزمون، قادر به تولید نتیجه معتبرند. فصل‌های عمومی USP <621> Chromatography و Ph. Eur. 2.2.46 Chromatographic separation techniques که در سال‌های اخیر هماهنگ (Harmonized) شده‌اند، تعاریف پارامترها و تنظیمات مجاز شرایط را مشخص می‌کنند.

نکته کلیدی

SST جایگزین کوالیفیکیشن دستگاه (فصل 8) نیست و برعکس. کوالیفیکیشن نشان می‌دهد دستگاه برای کاربرد مورد نظر مناسب است؛ SST نشان می‌دهد سیستم در همین آزمون و همین روز، الزامات این روش را برآورده می‌کند. در صورت ناکامی SST، تزریق نمونه‌ها نباید ادامه یابد و نتایج نمونه‌های همان سکانس بدون ارزیابی مستند قابل گزارش نیست.

پارامترهای سیستم سوتیبیلیتی

پارامتر	هدف	معیار رایج (در صورت عدم تعیین در روش)
رزولوشن (R_s)	اثبات جداسازی جفت بحرانی	طبق مونوگراف؛ معمولاً حداقل 1.5 و اغلب 2.0
تکرارپذیری سیستم (RSD%)	دقت تزریق و پاسخ	USP: حداکثر 2.0 درصد برای 5 تزریق (6 تزریق اگر حد بالاتر از 2.0 درصد باشد)؛ Ph. Eur.: جدول 6-2
ضریب تقارن / تیلینگ	کیفیت شکل پیک	در هماهنگ‌سازی جدید، برای پیک مورد سنجش 0.8 تا 1.8 مگر آنکه روش معیار دیگری تعیین کند
نسبت سیگنال به نویز (S/N)	حساسیت در حد گزارش یا حد کمی	حد کمی: حداقل 10؛ حد تشخیص: حدود 3
نسبت قله به دره (p/v)	جایگزین R_s وقتی جدایی تا بیس‌لاین ممکن نیست	طبق مونوگراف
تعداد پلیت (N) / ریتنشن فاکتور (k)	پایش کارایی و ریتنشن	طبق روش؛ اغلب به عنوان معیار تکمیلی
ریتنشن تایم نسبی (RRT)	شناسایی پیک‌ها	طبق مونوگراف؛ مقادیر تقریبی برای شناسایی و نه پذیرش

جدول 6-1. پارامترهای متداول سیستم سوتیبیلیتی. معیار نهایی همان است که در متن مونوگراف یا روش صحه‌گذاری شده آمده است.



تکرارپذیری مجاز در Ph. Eur.

در Ph. Eur.، برای تعیین مقدار ماده مؤثره خالص، حداکثر انحراف معیار نسبی مجاز تزریق‌های تکراری محلول مرجع به حد بالایی محتوای تعریف‌شده در مونوگراف (B، درصد بالاتر از 100) و تعداد تزریق (n) وابسته است:

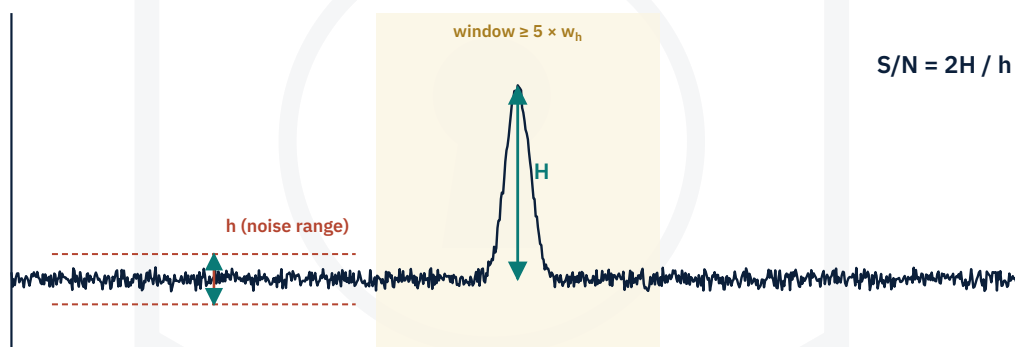
$$\%RSD_{\max} = K \cdot B \cdot \sqrt{n} / t_{90\%, n-1}$$

K = 0.349 (ثابت) - مقدار t استیودنت با احتمال 90 درصد (دوطرفه) و n - 1 درجه آزادی

n = 6	n = 5	n = 4	n = 3	(%) B
0.85	0.73	0.59	0.41	2.0
1.06	0.92	0.74	0.52	2.5
1.27	1.10	0.89	0.62	3.0

جدول 2-6. حداکثر RSD% مجاز محاسبه‌شده با رابطه فوق. برای مثال اگر محتوای مجاز 98.0 تا 102.0 درصد باشد (B = 2.0) و 6 تزریق انجام شود، RSD% حداکثر 0.85 درصد است.

نسبت سیگنال به نویز

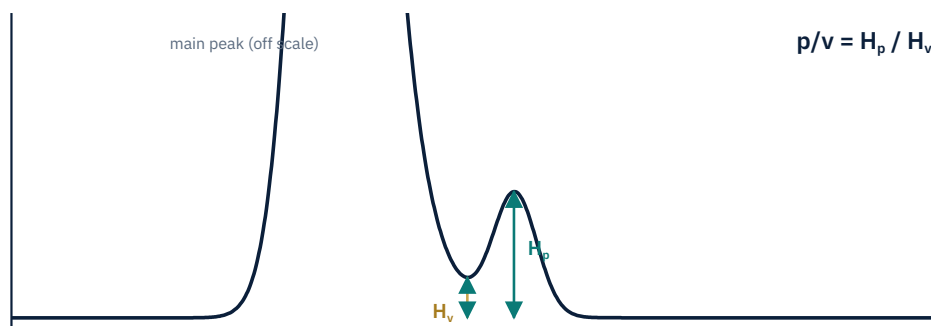


شکل 6-1. اندازه‌گیری نسبت سیگنال به نویز: H ارتفاع پیک از بیس‌لاین برون‌یابی‌شده و h دامنه نویز (فاصله بیشینه و کمینه) بیس‌لاین در پنجره‌ای به پهنای حداقل 5 برابر پهنای پیک در نیمه ارتفاع، ترجیحاً در دو سوی محل پیک در تزریق بلانک.

⚠ هشدار

نرم‌افزارهای CDS ممکن است نویز را با تعاریف متفاوت (مانند ریشه میانگین مربعات، RMS) یا در پنجره زمانی پیش‌فرض محاسبه کنند که با تعریف فارماکوپه منطبق نیست؛ نسبت S/N محاسبه‌شده با RMS به طور معمول عددی بسیار بزرگ‌تر به دست می‌دهد. پیش از اتکا به این پارامتر در SST، تنظیمات محاسبه نویز در روش پردازش را با تعریف فارماکوپه تطبیق داده و مستند کنید.

نسبت قله به دره



شکل 6-2. نسبت قله به دره برای ناخالصی کوچکی که روی دنباله پیک اصلی قرار دارد: H_p ارتفاع ناخالصی از بیس لاین برون یابی شده و H_v ارتفاع پایین ترین نقطه منحنی میان دو پیک از همان بیس لاین است.

تنظیمات مجاز شرایط کروماتوگرافی

فصل های عمومی هماهنگ شده اجازه می دهند برخی شرایط روش های فارماکوپه ای، بدون صحه گذاری مجدد کامل، در محدوده های تعیین شده تنظیم شوند؛ به شرط اینکه معیارهای سیستم سوتیبیلیتی برآورده شود. هدف این تنظیمات، برآورده کردن SST یا بهره گیری از فناوری ستون های جدید است، نه جبران نقص روش. خلاصه اصلی این تنظیمات در جدول زیر آمده است.

متغیر	الوشن ایزوکراتیک	الوشن گرادیانی
فاز ساکن	تغییر نوع (کد L) مجاز نیست	تغییر نوع مجاز نیست
طول ستون و اندازه ذره	نسبت L/d_p در محدوده -25 تا +50 درصد مقدار اصلی (یا N در همین محدوده)	همانند ایزوکراتیک؛ با تنظیم متناسب برنامه گرادیان
قطر داخلی ستون	قابل تغییر با تنظیم فلوریت	قابل تغییر با تنظیم فلوریت و برنامه گرادیان
فلوریت	تنظیم با رابطه ابعاد؛ سپس ± 50 درصد اضافی در صورت برآورده شدن SST	فقط تنظیم متناسب با ابعاد و اندازه ذره
حجم تزریق	قابل تنظیم متناسب با حجم ستون؛ در صورت حفظ دقت و حساسیت	همانند ایزوکراتیک
دمای ستون	± 10 درجه سانتی گراد	± 5 درجه سانتی گراد
ترکیب فاز متحرک	جزء (های) فرعی ± 30 درصد نسبی، بدون تغییر بیش از ± 10 درصد مطلق	تنظیم ترکیب و زمان ها برای جبران حجم تأخیر
pH بخش آبی	± 0.2 واحد	± 0.2 واحد
غلظت نمک در بافر	± 10 درصد	± 10 درصد
طول موج دتکتور	تغییر مجاز نیست (فقط در حد دقت دتکتور)	تغییر مجاز نیست

جدول 6-3. خلاصه تنظیمات مجاز بر اساس متن هماهنگ شده USP <621> و Ph. Eur. 2.2.46. جزئیات، استثنایا و شرایط تکمیلی (مانند ذرات با پوسته متخلخل و تغییر چند پارامتر همزمان) فقط از متن جاری فارماکوپه استخراج شود.

روابط تنظیم ابعاد

$$F_2 = F_1 \cdot (d_{c2}^2 \cdot d_{p1}) / (d_{c1}^2 \cdot d_{p2})$$

تنظیم فلوریت برای تغییر قطر داخلی ستون (d_c) و اندازه ذره (d_p)

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot (L_2 \cdot d_{c2}^2) / (L_1 \cdot d_{c1}^2)$$

تنظیم حجم تزریق متناسب با حجم ستون

$$t_{G2} = t_{G1} \cdot (F_1 / F_2) \cdot (L_2 \cdot d_{c2}^2) / (L_1 \cdot d_{c1}^2)$$

تنظیم زمان هر بخش گرادیان برای حفظ نسبت حجم گرادیان به حجم ستون

نکته کاربردی آزمایشگاه

هر تنظیم انجام شده بر اساس فصل عمومی باید در سوابق آزمون مستند شود: مقدار اصلی، مقدار جدید، مبنای محاسبه و نتیجه SST. تنظیمات متعدد می‌توانند اثر تجمعی داشته باشند؛ بنابراین ارزیابی ریسک و در صورت نیاز، تأیید عملکرد روش (Verification) با شرایط جدید توصیه می‌شود. اگر روش داخلی بر پایه روش فارماکوپه‌ای اما با تغییرات خارج از این محدوده‌ها اجرا شود، روش جایگزین محسوب می‌شود و صحت‌گذاری لازم دارد.

محاسبات کمی

استاندارد خارجی

رایج‌ترین روش در تعیین مقدار است: پاسخ نمونه با پاسخ رفرنس استاندارد با خلوص مشخص مقایسه می‌شود. پیش‌شرط آن، تکرارپذیری حجم تزریق و خطی بودن پاسخ در محدوده غلظت‌هاست.

$$\text{Assay (\%)} = (A_s / A_{std}) \cdot (C_{std} / C_s) \cdot P \cdot 100$$

A: سطح پیک — C: غلظت اسمی محلول (پس از رقیق‌سازی) — P: خلوص رفرنس استاندارد (کسر، بر مبنای ماده تعریف شده در روش)

استاندارد داخلی

ماده‌ای با ساختار مشابه و پیک جدا از آنالیت، با غلظت ثابت به استاندارد و نمونه افزوده می‌شود و نسبت سطوح مبنای محاسبه قرار می‌گیرد. خطای حجم تزریق و بخشی از خطای آماده‌سازی جبران می‌شود؛ این روش در آماده‌سازی‌های چندمرحله‌ای (مانند استخراج) مزیت دارد.

ناخالصی‌ها: ضریب پاسخ نسبی و حدود

وقتی ناخالصی نسبت به استاندارد ماده مؤثره (رقیق شده) سنجیده می‌شود، تفاوت پاسخ دتکتور با RRF اصلاح می‌شود. در Ph. Eur، ضریب تصحیح (Correction factor) معکوس RRF تعریف شده است؛ پیش از استفاده، تعریف به کاررفته در روش را بررسی کنید.



$$\text{Impurity (\%)} = (A_i / A_{\text{std}}) \cdot (C_{\text{std}} / C_s) \cdot (1 / \text{RRF}) \cdot P \cdot 100$$

$\text{RRF} = (\text{پاسخ ناخالصی بر واحد غلظت}) / (\text{پاسخ ماده مؤثره بر واحد غلظت})$

حد صلاحیت سنجی (Qualification)	حد شناسایی	حد گزارش	حداکثر مصرف روزانه
0.15% یا 1.0 mg روزانه (هر کدام کمتر)	0.10% یا 1.0 mg روزانه (هر کدام کمتر)	0.05%	$\geq 2 \text{ g/day}$
0.05%	0.05%	0.03%	$< 2 \text{ g/day}$

جدول 4-6. آستانه‌های ناخالصی در ماده مؤثره مطابق ICH Q3A(R2). آستانه‌های فرآورده نهایی در ICH Q3B(R2) بر اساس محصولات تخریب و مقدار مصرف روزانه به‌طور جداگانه تعریف شده است.

- **حد نادیده‌گیری (Disregard limit):** پیک‌های کوچک‌تر از این حد در مجموع ناخالصی‌ها لحاظ نمی‌شوند؛ این حد معمولاً با حد گزارش برابر است و باید با حد کمی روش سازگار باشد.
- **گردکردن:** نتایج مطابق قواعد گردکردن فارماکوپه و با تعداد ارقام معنادار حد پذیرش گزارش شوند. گردکردن مراحل میانی، خطای تجمعی ایجاد می‌کند.
- **پیک‌های بلانک و پلاسبو:** پیک‌های متعلق به حلال، فاز متحرک یا مواد جانبی باید با تزریق بلانک و پلاسبو شناسایی و از محاسبه حذف شوند؛ مبنای حذف مستند شود.

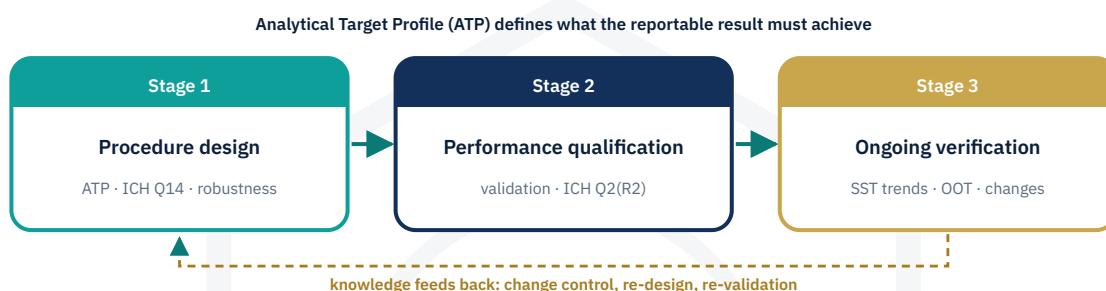


فصل 7

صحه‌گذاری، تأیید و انتقال روش

Chapter 7 – Validation, verification and transfer of procedures

هدف صحه‌گذاری روش تجزیه‌ای، اثبات مستند این است که روش برای کاربرد مورد نظر مناسب است؛ یعنی نتیجه قابل گزارش (Reportable result) آن با صحت و دقت کافی، ویژگی کیفی مورد نظر را اندازه‌گیری می‌کند. رهنمود ICH Q2(R2) اصول صحه‌گذاری و رهنمود ICH Q14 اصول توسعه روش را بیان می‌کنند و این دو در کنار هم رویکرد «چرخه عمر روش تجزیه‌ای» را شکل می‌دهند.



شکل 7-1. چرخه عمر روش تجزیه‌ای: طراحی روش بر اساس پروفایل هدف (ATP)، کوالیفیکیشن عملکرد (صحه‌گذاری) و پایش مستمر عملکرد در کاربرد روزمره، همراه با بازخورد دانش به مرحله طراحی. ساختار سه‌مرحله‌ای مطابق USP <1220> است.

ویژگی‌های صحه‌گذاری بر اساس نوع آزمون

ویژگی	شناسایی	ناخالصی (کمی)	ناخالصی (حدی)	تعیین مقدار / انحلال / یکنواختی محتوا
اختصاصی بودن / سلکتیویتی	✓	✓	✓	✓
گستره کاری (Working range): پاسخ و حد پایین	—	✓ (شامل حد کمی)	✓ (حد تشخیص)	✓
صحت (Accuracy)	—	✓	—	✓
دقت: تکرارپذیری	—	✓	—	✓
دقت: دقت میانی	—	✓	—	✓

جدول 7-1. ویژگی‌های صحه‌گذاری بر اساس نوع کاربرد، به صورت خلاصه از ICH Q2(R2). در نسخه بازنگری‌شده، مفهوم «پاسخ» شامل روابط خطی و غیرخطی است و مقاومت (Robustness) عمدتاً در مرحله توسعه روش (ICH Q14) ارزیابی می‌شود.



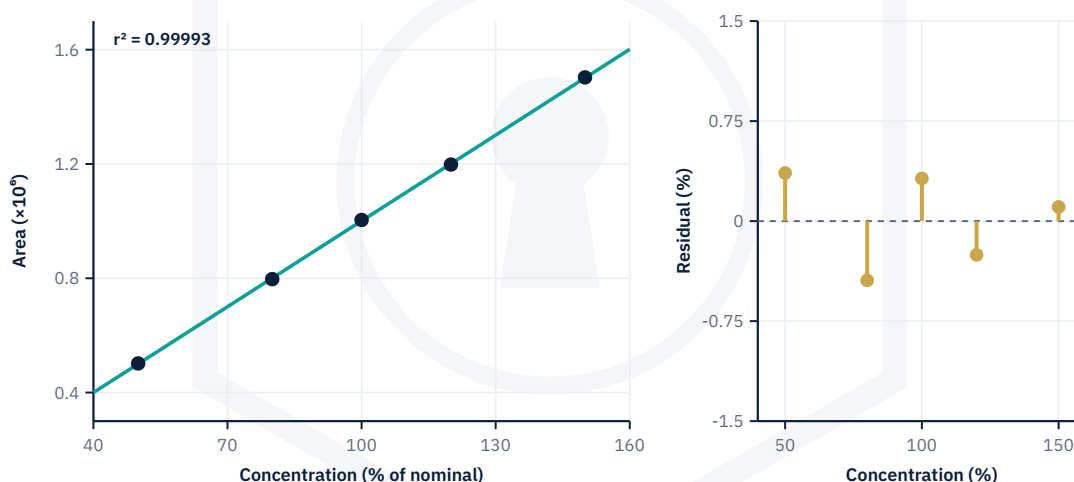
طراحی آزمایش‌ها

اختصاصی بودن و تخریب اجباری

اختصاصی بودن نشان می‌دهد روش، آنالیت را در حضور اجزای مورد انتظار (ناخالصی‌ها، محصولات تخریب، مواد جانبی، حلال‌ها) بدون تداخل اندازه‌گیری می‌کند. برای روش‌های نشان‌دهنده پایداری (Stability-indicating)، نمونه تحت تنش‌های اسیدی، بازی، اکسیداتیو، حرارتی، رطوبت و نور قرار می‌گیرد. هدف، ایجاد میزان تخریب معنادار (در عمل اغلب حدود 5 تا 20 درصد) است، نه تخریب کامل؛ تخریب بیش از حد محصولات ثانویه غیرواقعی ایجاد می‌کند. تفکیک محصولات تخریب از پیک اصلی، خلوص طیفی یا جرمی پیک اصلی و موازنه جرم (Mass balance) ارزیابی می‌شود.

گستره و پاسخ (خطی بودن)

حداقل پنج سطح غلظت در گستره کاری توصیه می‌شود. گستره رایج برای تعیین مقدار 80 تا 120 درصد غلظت اسمی، برای یکنواختی محتوا 70 تا 130 درصد، برای انحلال $20 \pm$ درصد فراتر از محدوده مشخصات و برای ناخالصی‌ها از حد گزارش تا 120 درصد حد مشخصات است. ضریب همبستگی به تنهایی معیار کافی خطی بودن نیست؛ بررسی نمودار باقی‌مانده‌ها (Residual plot) و عرض از مبدأ نسبی، الگوهای انحنای خطای سیستماتیک را آشکار می‌کند.



شکل 7-2. منحنی کالیبراسیون و نمودار باقی‌مانده‌های نسبی برای پنج سطح (داده‌های نمایشی). پراکندگی تصادفی باقی‌مانده‌ها در اطراف صفر، نشانه مناسب بودن مدل خطی است؛ الگوی منظم (U شکل یا روند) نشانه انحنای اشباع است.

صحت و دقت

- **صحت:** معمولاً با حداقل 9 تعیین در 3 سطح غلظت (3 تکرار در هر سطح) با افزودن مقدار معلوم آنالیت به پلاسبو (برای فرآورده) یا مقایسه با روش مرجع ارزیابی و به صورت درصد بازیابی همراه با فاصله اطمینان گزارش می‌شود.
- **تکرارپذیری:** حداقل 6 تعیین در غلظت 100 درصد یا 9 تعیین در گستره (3 سطح $\times$ 3 تکرار) توسط یک کارشناس و در شرایط یکسان.
- **دقت میانی:** اثر روزهای مختلف، کارشناسان مختلف، دستگاه‌ها و ستون‌های مختلف در همان آزمایشگاه؛ طراحی ماتریسی یا عاملی امکان ارزیابی همزمان چند منبع تغییرپذیری را فراهم می‌کند.



- **معیارهای رایج:** در عمل صنعتی برای تعیین مقدار، بازیابی حدود 98 تا 102 درصد و RSD% تکرارپذیری حداکثر حدود 2 درصد متداول است؛ برای ناخالصی‌ها در سطوح پایین، معیارها گسترده‌ترند. معیار نهایی باید بر اساس ATP و مشخصات محصول تعیین و در پروتکل صحه‌گذاری از پیش تعریف شود.

حد تشخیص و حد کمی

$$LOD = 3.3 \cdot \sigma / S \quad \cdot \cdot \cdot \quad LOQ = 10 \cdot \sigma / S$$

σ : انحراف معیار پاسخ (بلانک، عرض از مبدأ یا باقی‌مانده رگرسیون در غلظت‌های پایین) – S : شیب منحنی کالیبراسیون

روش جایگزین، تعیین غلظتی است که نسبت سیگنال به نویز حدود 3 (LOD) و 10 (LOQ) ایجاد کند. حد کمی برآورده باید با تزریق تکراری محلول در همان غلظت و ارزیابی صحت و دقت تأیید شود. حد کمی روش ناخالصی باید برابر یا کمتر از حد گزارش باشد.

مقاومت و پایداری محلول‌ها

مقاومت (Robustness)، حساسیت نتیجه به تغییرات کوچک و عمدی پارامترهای روش (pH، درصد حلال آلی، دما، فلوریت، سری ساخت ستون) است. طبق ICH Q14، این ارزیابی بهتر است در توسعه روش و با طراحی آزمایش (Design of Experiments) انجام شود و نتیجه آن به تعیین محدوده‌های کنترل و معیارهای SST منجر شود. پایداری محلول استاندارد و نمونه در دمای سینی و زمان واقعی سکانس، و سازگاری فیلتر سرنگی (مقایسه محلول صاف‌شده با محلول سانتریفیوژشده و بررسی جذب سطحی در حجم‌های اولیه صافش) از آزمون‌هایی است که در عمل بیشترین اثر را بر نتایج روزمره دارند.

از منابع مرجع: تغییرات اصلی (ICH Q2(R2))

نسخه بازنگری‌شده (تصویب 2023) دامنه را به روش‌های چندمتغیره و غیرخطی، از جمله روش‌های طیفی و زیستی، گسترش داده است؛ «خطی بودن» را در قالب مفهوم عام‌تر «پاسخ» در گستره کاری بیان می‌کند؛ ترکیب ارزیابی صحت و دقت را مجاز می‌داند؛ و استفاده از داده‌های توسعه روش (طبق ICH Q14) را برای کاهش آزمایش‌های تکراری در صحه‌گذاری می‌پذیرد.

Based on: ICH Q2(R2) Validation of Analytical Procedures (2023); ICH Q14 Analytical Procedure Development (2023)

تأیید روش فارماکوپه‌ای و انتقال روش

روش‌های فارماکوپه‌ای از نظر قانونی صحه‌گذاری‌شده تلقی می‌شوند، اما آزمایشگاه باید نشان دهد روش در شرایط واقعی خود (ماده یا فرآورده مشخص، دستگاه، کارشناس) عملکرد مناسب دارد. این فرایند **تأیید (Verification)** نامیده می‌شود (USP <1226>) و معمولاً شامل ارزیابی اختصاصی بودن در حضور ماتریس فرآورده، دقت و در صورت لزوم صحت و حد کمی است؛ گستره آن بر اساس پیچیدگی روش و ریسک تعیین می‌شود.

رویکرد انتقال	شرح	زمان مناسب
آزمون مقایسه‌ای	آنالیز همزمان نمونه‌های یکسان در آزمایشگاه مبدأ و مقصد با معیارهای از پیش تعریف‌شده	رایج‌ترین رویکرد برای روش‌های تعیین مقدار و ناخالصی

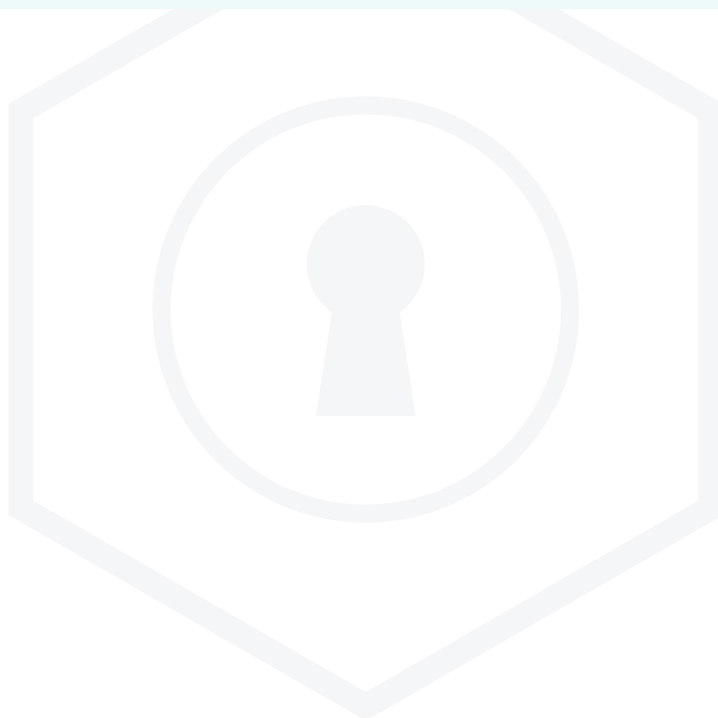


رویکرد انتقال	شرح	زمان مناسب
صحه‌گذاری مشترک	آزمایشگاه مقصد در صحه‌گذاری (معمولاً دقت میانی) مشارکت می‌کند	روش‌های جدید که همزمان در چند سایت به کار می‌روند
صحه‌گذاری مجدد (کامل یا جزئی)	آزمایشگاه مقصد ویژگی‌های تأثیرپذیر را دوباره صحه‌گذاری می‌کند	تفاوت قابل توجه دستگاه یا شرایط
معافیت از انتقال	با توجه مستند، مانند روش فارماکوپه‌ای یا آشنایی قبلی	روش‌های ساده یا مشابه روش‌های جاری

جدول 7-2. رویکردهای انتقال روش تجزیه‌ای بر اساس USP <1224>.

نکته کاربردی آزمایشگاه

در انتقال روش‌های گرادانی، پیش از آزمون مقایسه‌ای، حجم تأخیر، حجم خارج از ستون، روش پیش‌گرم‌کردن فاز متحرک و تنظیمات دتکتور (پهنای باند، سرعت داده، ثابت زمانی) دو دستگاه را مقایسه کنید. بیشتر ناکامی‌های انتقال، از تفاوت‌های سخت‌افزاری مستند نشده ناشی می‌شود و نه از خود شیمی جداسازی.



فصل 8

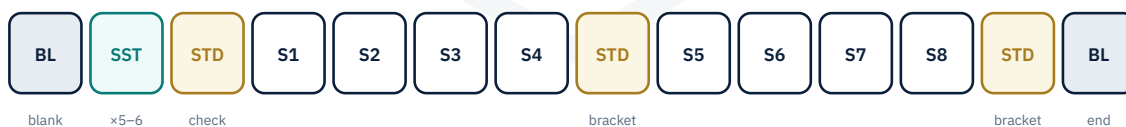
عملیات روزمره، کوالیفیکیشن دستگاه و یکپارچگی داده

Chapter 8 – Routine operation, instrument qualification and data integrity

روال کار روزانه

- 1. بازبینی پیش از شروع:** وضعیت کوالیفیکیشن و برچسب کالیبراسیون دستگاه، سطح ضایعات، کفایت حجم فاز متحرک برای کل سکانس، وضعیت ستون در دفتر ستون و نسخه تأییدشده روش در CDS بررسی شود.
- 2. پرچ و آماده‌سازی پمپ:** هر کانال حلال با سرعت بالا (بدون اتصال ستون یا با ولو پرچ باز) پرچ شود تا حباب‌ها و حلال قبلی خارج شوند. هنگام تغییر از حلال آلی به بافر، ابتدا آب یا مخلوط آب-آلی بدون نمک عبور داده شود.
- 3. تعادل‌یابی ستون:** فلوریت به تدریج تا مقدار روش افزایش یابد؛ تعادل تا رسیدن به فشار پایدار و بیس‌لاین پایدار ادامه یابد (معمولاً حداقل حدود 10 تا 20 حجم ستون؛ برای روش‌های جفت‌یون و HILIC بیشتر). تزریق یک یا چند بلانک یا محلول آماده‌سازی (Conditioning) در صورت پیش‌بینی در روش انجام شود.
- 4. بررسی سیستم پیش از سکانس:** فشار در محدوده معمول دستگاه و ستون، نوسان فشار ناچیز، نویز و دریافت بیس‌لاین قابل قبول. ثبت فشار اولیه در دفتر ستون، ابزار ساده و بسیار مؤثری برای تشخیص زودهنگام گرفتگی است.
- 5. اجرای سکانس:** بلانک، تزریق‌های SST، استاندارد(های) کنترلی، نمونه‌ها با استانداردهای کنترلی دوره‌ای (Bracketing) و بلانک پایانی؛ مطابق ترتیب تعریف‌شده در روش.
- 6. پایان کار:** شستشوی بافر از ستون و سیستم، انتقال ستون به حلال ذخیره، خاموش‌کردن یا کاهش جریان طبق SOP و ثبت تعداد تزریق‌ها و هرگونه رخداد غیرعادی.

Typical assay sequence



each sample group is bracketed by standards that must meet the drift criterion

شکل 8-1. ساختار نمونه یک سکانس تعیین مقدار: بلانک، تزریق‌های سیستم سوتیبیلیتی، استاندارد کنترلی و گروه‌های نمونه که با استانداردهای کنترلی محصور شده‌اند.

نکته کاربردی آزمایشگاه

معیار پذیرش استانداردهای کنترلی دوره‌ای (برای مثال اختلاف پاسخ نسبت به میانگین استانداردهای SST حداکثر حدود 2 درصد برای تعیین مقدار) و نحوه برخورد با ناکامی آن (ابطال گروه نمونه‌های پس از آخرین استاندارد قابل قبول) باید پیش از آزمون در روش یا SOP تعریف شده باشد؛ تصمیم‌گیری پس از مشاهده نتایج، با اصول یکپارچگی داده سازگار نیست.

کوالیفیکیشن دستگاه تجزیه‌ای

بر اساس **USP <1058> Analytical Instrument Qualification**، کوالیفیکیشن دستگاه در چارچوب چرخه عمر و شامل چهار مرحله است: کوالیفیکیشن طراحی (DQ)، نصب (IQ)، عملیاتی (OQ) و عملکردی (PQ). سیستم HPLC همراه با نرم‌افزار کنترل و داده در گروه C (دستگاه‌های پیچیده) طبقه‌بندی می‌شود و کوالیفیکیشن کامل همراه با اعتبارسنجی نرم‌افزار را لازم دارد.

جزء	آزمون رایج OQ / PQ	مثال معیار پذیرش رایج
پمپ	صحت و دقت فلوریت (اندازه‌گیری حجمی یا وزنی)	انحراف حدود $1 \pm$ تا 2 درصد از مقدار تنظیم‌شده
پمپ / اختلاط	صحت ترکیب گرادیان (پله‌های استون در آب)	انحراف حدود $1 \pm$ درصد مطلق در هر پله
اتوسمپلر	دقت حجم تزریق (RSD% سطح در تزریق‌های تکراری)	RSD% حدود 1 درصد یا کمتر
اتوسمپلر	خطی بودن حجم تزریق و کری‌اوور	r حدود 0.999 یا بیشتر؛ کری‌اوور کمتر از حدود 0.1 درصد
دتکتور	صحت طول موج	حدود $1 \pm$ تا 2 نانومتر
دتکتور	نویز و دررفت، خطی بودن پاسخ	طبق مشخصات سازنده
محفظه ستون	صحت و پایداری دما با سنسور کالیبره	حدود $1 \pm$ تا 2 درجه سانتی‌گراد
سیستم	آزمون عملکرد کل با ستون و مخلوط مرجع (PQ)	معیارهای SST مرجع آزمایشگاه

جدول 8-1. آزمون‌های متداول کوالیفیکیشن عملیاتی و عملکردی HPLC. مقادیر ستون سوم نمونه‌ای از معیارهای رایج است؛ معیار قطعی بر اساس مشخصات سازنده، الزامات کاربری (URS) و SOP سازمان تعیین می‌شود.

- پس از تعمیرات اساسی (تعویض پمپ، سرپمپ، ولو تزریق یا قطعات نوری)، ارزیابی ریسک مشخص می‌کند کدام آزمون‌های OQ باید تکرار شود.
- استانداردها و ابزارهای کالیبراسیون (دماسنج، فلومتر، فیلترهای مرجع) باید قابلیت ردیابی به مراجع ملی یا بین‌المللی داشته باشند.
- نتایج PQ و روند پارامترهای SST روزمره، شواهد مستمر مناسب بودن دستگاه را فراهم می‌کند و برای تعیین فواصل OQ بر پایه ریسک به کار می‌رود.

یکپارچگی داده

داده‌های کروماتوگرافی از پرریسک‌ترین داده‌ها در بازرسی‌های GMP هستند. اصول **ALCOA+** ایجاب می‌کند داده‌ها قابل انتساب (Attributable)، خوانا (Legible)، همزمان (Contemporaneous)، اصیل (Original) و دقیق (Accurate) و همچنین کامل، پایدار، ماندگار و در دسترس باشند.

کنترل	الزام کاربردی
دسترسی کاربران	حساب کاربری انفرادی، بدون اشتراک رمز؛ تفکیک نقش‌ها (کارشناس، بازبین، مدیر سیستم) و عدم امکان حذف یا تغییر داده توسط کاربر عادی
آدیت تریل (Audit trail)	فعال، غیرقابل غیرفعال‌سازی توسط کارشناس، شامل علت تغییرات؛ بازبینی آدیت تریل مرتبط با هر نتیجه پیش از تأیید آن
تزریق‌های آزمایشی	تزریق نمونه برای «آزمودن» سیستم پیش از سکانس رسمی مجاز نیست؛ آماده‌سازی سیستم فقط با محلول‌های تعریف‌شده در روش (مانند استاندارد یا محلول آماده‌سازی)
داده‌های کامل	همه تزریق‌ها، شامل تزریق‌های متوقف‌شده و نامعتبر، حفظ و با دلیل مستند شوند؛ هیچ داده‌ای بدون ثبت حذف نشود
روش پردازش	نسخه‌دار، تأییدشده و قفل؛ تغییر پارامترهای انتگرال‌گیری پس از مشاهده نتیجه، فقط با توجیه علمی و تأیید
تاریخ و زمان	ساعت سیستم همگام و قفل؛ عدم امکان تغییر توسط کارشناس
پشتیبان‌گیری و بایگانی	داده خام الکترونیکی (و نه فقط گزارش چاپی) داده اصلی محسوب می‌شود و باید قابل بازیابی و پردازش مجدد باشد

جدول 8-2. کنترل‌های کلیدی یکپارچگی داده در سیستم‌های داده کروماتوگرافی.

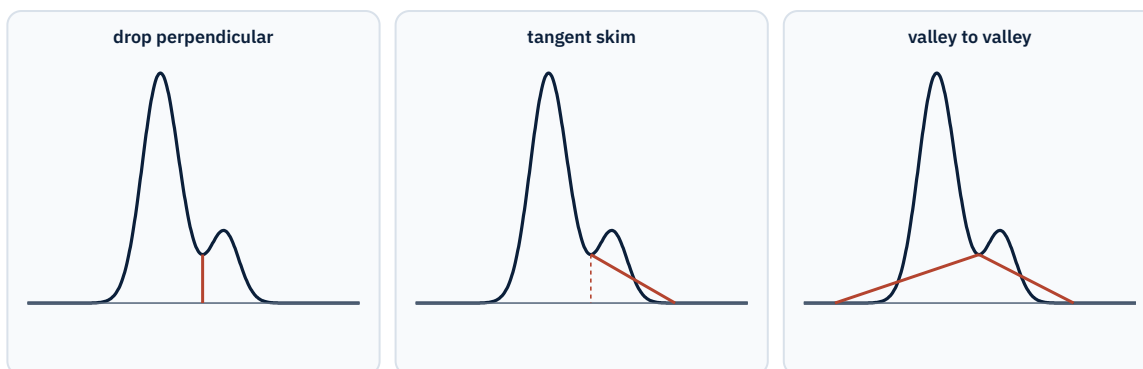
از منابع مرجع: انتگرال‌گیری دستی

راهنماهای نهادهای نظارتی انتگرال‌گیری دستی را ممنوع نمی‌دانند، اما انتظار دارند شرایط استفاده از آن در SOP تعریف شود، پیش از هر اصلاح علت علمی ثبت شود، کروماتوگرام‌های پیش و پس از اصلاح قابل مشاهده باشد و بازبین مستقل آن را تأیید کند. انتگرال‌گیری دستی با هدف رساندن نتیجه به محدوده مشخصات (Testing into compliance) نقض جدی یکپارچگی داده است.

Based on: FDA, Data Integrity and Compliance With Drug CGMP – Questions and Answers (2018); MHRA, GXP Data Integrity Guidance and Definitions (2018); PIC/S PI 041-1 (2021)

پارامترهای انتگرال‌گیری

در روش پردازش، پهنای پیک مورد انتظار (Peak width) و آستانه (Threshold) تعیین می‌کنند چه نوساناتی پیک محسوب شوند. حداقل سطح (Minimum area) پیک‌های بسیار کوچک را حذف می‌کند و باید با حد گزارش سازگار باشد. برای پیک‌های نیمه‌تفکیک‌شده، نحوه تقسیم سطح اثر مستقیم بر نتیجه ناخالصی دارد.



شکل 8-2. سه شیوه انتگرال‌گیری یک جفت پیک نیمه‌تفکیک‌شده (نمایشی). عمود از دره (Drop perpendicular) برای پیک‌های با ارتفاع نسبتاً مشابه؛ برش مماسی (Tangent skim) برای پیک کوچک روی دنباله پیک بزرگ؛ دره به دره (Valley to valley) که هر دو پیک را کوچک‌تر نشان می‌دهد. شیوه انتخابی باید در روش تعریف و به طور یکسان برای استانداردها و نمونه‌ها اعمال شود.

ارتباط با بررسی نتایج خارج از مشخصات

در مرحله نخست بررسی نتیجه OOS (بررسی آزمایشگاهی)، پیش از هرگونه آزمون مجدد، فرضیه‌های خطای آزمایشگاهی به صورت سیستماتیک ارزیابی می‌شوند. بخش مهمی از این بررسی، بازبینی داده‌های کروماتوگرافی است:

- نتایج SST و استانداردهای کنترلی، فشار و پروفایل فشار در طول سکانس، و کروماتوگرام بلانک.
- شکل پیک، انتگرال‌گیری و شناسایی پیک‌ها در مقایسه با کروماتوگرام‌های مرجع و نتایج تاریخی.
- محاسبات، ضرایب رقیق‌سازی، خلوص و شماره سری رفرنس استاندارد، تاریخ اعتبار محلول‌ها.
- آدیت تریل: تغییرات روش پردازش، تزریق‌های تکراری، توقف‌ها و پردازش‌های مجدد.
- سوابق آماده‌سازی نمونه و فاز متحرک، شیشه‌آلات، فیلترها و کالیبراسیون ترازو و pH متر.

⚠ هشدار

نسبت دادن نتیجه OOS به «خطای تزریق» یا «مشکل دستگاه» بدون شاهد مستند (مانند ناکامی SST، خطای ثبت‌شده در دستگاه یا انحراف آشکار در فشار) پذیرفتنی نیست. اگر علت آزمایشگاهی قابل اثبات شناسایی نشود، بررسی باید به مرحله بررسی تولید گسترش یابد.

فصل 9



عیب‌یابی سیستماتیک

Chapter 9 – Systematic troubleshooting

عیب‌یابی کارآمد بر پایه روش است، نه حدس. هدف، رسیدن به علت ریشه‌ای با کمترین آزمون، کمترین تغییر در سیستم و بدون ایجاد مشکل جدید است. بیشتر مشکلات HPLC به چند دسته قابل تقسیم‌اند: فشار، بیس‌لاین، شکل پیک، ریتشن تایم و کمی‌سازی. هر دسته، الگوی نشانه‌ها و مسیر تشخیصی مشخص خود را دارد.

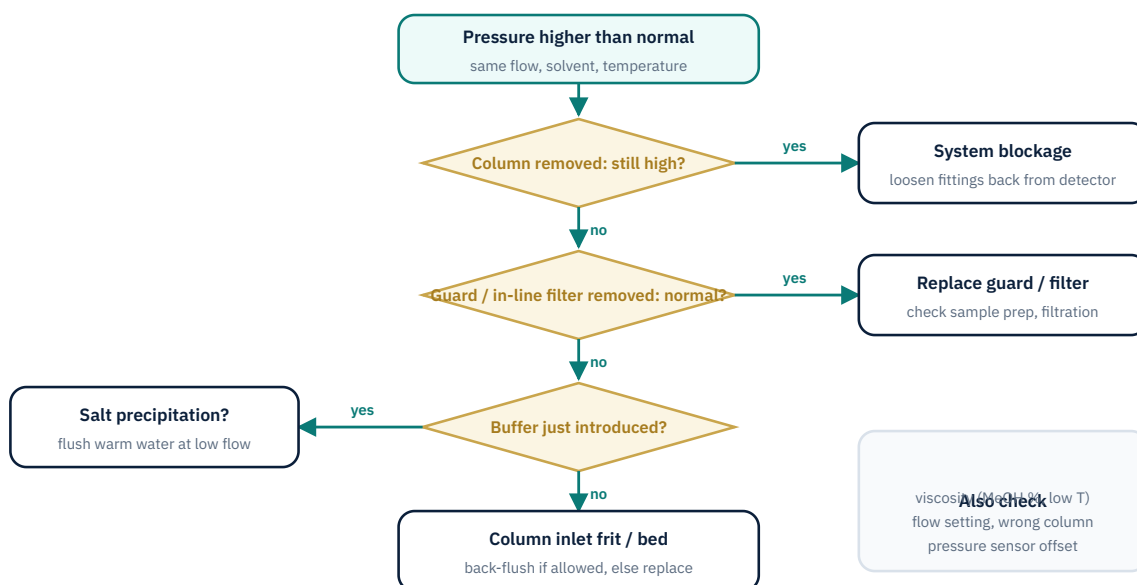
اصول عیب‌یابی

- 1. مقایسه با وضعیت مرجع:** بدون داده مرجع، «غیرعادی» تعریف‌پذیر نیست. کروماتوگرام مرجع روش، فشار معمول هر ستون و دستگاه، نویز معمول دتکتور و روند SST، ابزار اصلی تشخیص‌اند.
- 2. یک تغییر در هر مرحله:** تغییر همزمان چند متغیر (مثلاً تعویض ستون و فاز متحرک با هم) حل مشکل را ممکن می‌کند اما علت را پنهان می‌گذارد و تکرار مشکل را محتمل می‌کند.
- 3. از ساده و ارزان به پیچیده:** ابتدا تنظیمات روش، حلال‌ها، اتصالات و مصرفی‌ها، سپس قطعات گران‌تر و در آخر تعمیرات تخصصی.
- 4. جداسازی بخش‌ها (Divide and conquer):** با حذف ستون، جایگزینی آن با اتصال‌دهنده، تزریق بلانک یا اجرای بدون تزریق، مشکل به یک بخش مشخص محدود می‌شود.
- 5. «چه چیزی تغییر کرده است؟»:** سری جدید حلال یا بافر، ستون جدید، نمونه از ماتریس متفاوت، نگهداری اخیر، تغییر کارشناس یا تغییر دمای محیط. بیشتر مشکلات ناگهانی با یک تغییر اخیر همزمان‌اند.
- 6. مستندسازی:** هر مشکل، آزمون‌های انجام‌شده، علت و اقدام اصلاحی در دفتر دستگاه ثبت شود. این سوابق، عیب‌یابی بعدی را سریع‌تر و تحلیل روند را ممکن می‌کند.

مشکلات فشار

فشار، ساده‌ترین و حساس‌ترین شاخص سلامت مسیر جریان است. فشار هر ستون در شرایط روش، با ستون نو و پس از تعادل، باید ثبت شود تا تغییرات بعدی قابل تفسیر باشد.



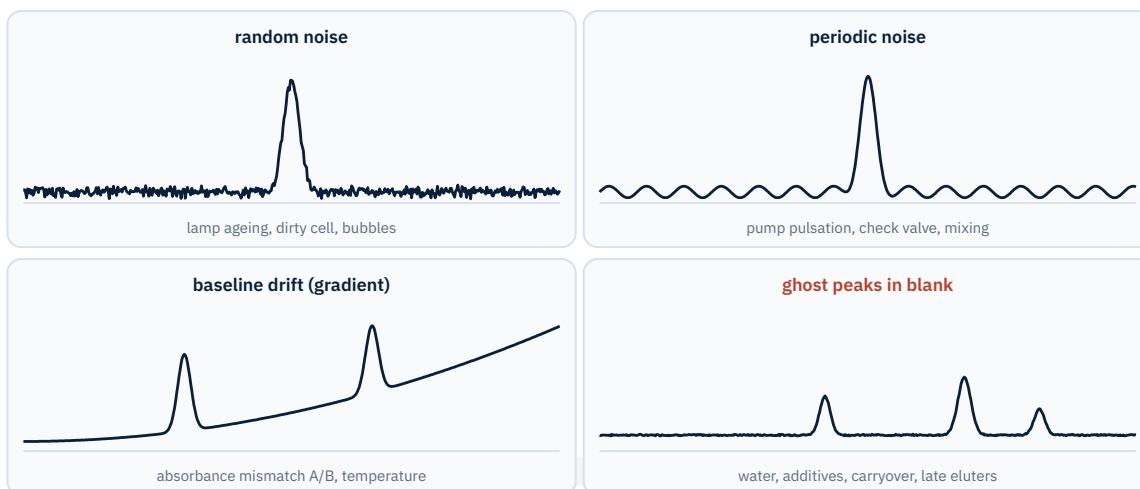


شکل 1-9. مسیر تشخیص افزایش فشار با جداسازی گام به گام بخش‌های مسیر جریان.

نشانه	علل محتمل	بررسی	اقدام
فشار بالا و پایدار	گرفتگی فريت ورودی، گارد ستون یا فیلتر این‌لاین؛ رسوب بافر؛ لوله مسدود؛ ویسکوزیته بالاتر (دمای پایین، متانول)	جداسازی بخش‌ها طبق شکل 1-9	تعویض مصرفی؛ صاف کردن نمونه؛ شستشوی نمک با آب گرم با جریان کم
فشار به تدریج افزایشی در طول سکانس	ذرات یا اجزای جذب‌شونده ماتریس نمونه؛ رسوب در ستون	مقایسه فشار ابتدا و انتهای هر سکانس	گارد ستون؛ بهبود آماده‌سازی نمونه؛ مرحله شستشو در انتهای گرادیان
فشار پایین	نشت؛ هوا در پمپ؛ چک‌ولو معیوب؛ فلوریت یا حلال اشتباه؛ ستون اشتباه	بازرسی اتصالات و سرپمپ؛ اندازه‌گیری حجمی فلوریت	سفت کردن یا تعویض اتصال؛ پرچ؛ تمیزکردن یا تعویض چک‌ولو
نوسان منظم فشار	حباب در سرپمپ؛ چک‌ولو چسبیده یا آلوده؛ سیل فرسوده	دامنه و دوره نوسان در برابر حرکت پیستون	دگازینگ و پرچ؛ شستشو با ایزوپروپانول یا سونیکیت شیر؛ تعویض سیل
نوسان نامنظم فشار	دگازر معیوب؛ فیلتر ورودی مسدود؛ تبخیر حلال در خط مکش	بررسی دگازر و فیلترهای ورودی	تعمیر دگازر؛ تعویض فیلتر ورودی

جدول 1-9. عیب‌یابی مشکلات فشار.

مشکلات بیس لاین



شکل 9-2. الگوهای متداول مشکلات بیس لاین و علل اصلی هر یک (نمایشی).

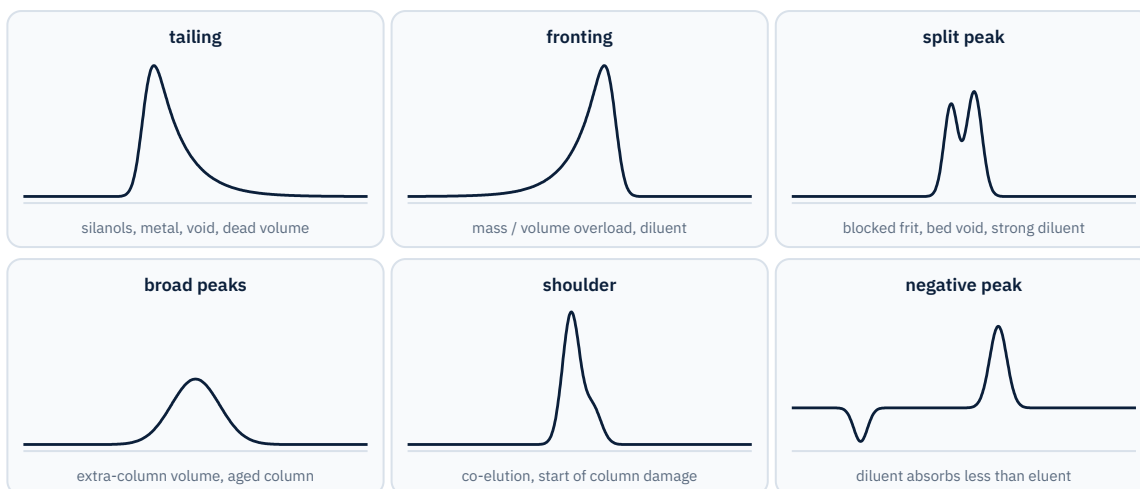
نشانه	علل محتمل	بررسی و اقدام
نویز تصادفی زیاد	کاهش انرژی لامپ؛ فلوسل آلوده؛ حباب در فلوسل؛ طول موج پایین با حلال جاذب؛ ثابت زمانی بسیار کم	بررسی انرژی لامپ و نویز بدون جریان؛ شستشوی فلوسل؛ ایجاد فشار برگشتی کم در خروجی؛ بازبینی کیفیت حلال
نویز دوره‌ای همزمان با پمپ	ضربان پمپ؛ چک ولو؛ اختلاط ناکافی (به ویژه با TFA در طول موج پایین)	مقایسه دوره نویز با حرکت پیستون؛ پرچ؛ میکسر با حجم بیشتر در صورت مجاز بودن
دریفت پیوسته بیس لاین	تعادل ناکافی؛ تغییر دمای محیط یا ستون؛ آلاینده‌های در حال روشن شدن از ستون؛ اختلاف جذب حلال A و B در گرادیان	افزایش زمان تعادل؛ کنترل دمای ستون و جلوگیری از جریان هوا روی دتکتور؛ هم‌ارز کردن جذب حلال‌ها
اسپایک‌های تیز تصادفی	حباب گاز؛ تداخل الکتریکی؛ ذرات در فلوسل	دگازینگ؛ بررسی اتصال زمین؛ صاف کردن
گوست پیک‌ها (Ghost peaks)	آلاینده‌های آب یا افزودنی‌ها که در ابتدای گرادیان روی ستون متمرکز می‌شوند؛ کری‌اوور؛ پیک دیررس تزریق قبلی؛ آلودگی ویال یا درپوش	اجرای گرادیان بدون تزریق (اگر پیک باقی ماند: فاز متحرک یا سیستم)؛ تزریق بلانک پس از استاندارد غلیظ (کری‌اوور)؛ افزایش زمان آنالیز (پیک دیررس)
پیک‌های منفی	دایلوئنت با جذب کمتر از فاز متحرک؛ اختلاف ضریب شکست؛ تنظیم نادرست طول موج مرجع در DAD	تطبیق دایلوئنت با فاز متحرک؛ بازبینی طول موج مرجع

جدول 9-2. عیب‌یابی مشکلات بیس لاین.

آزمون سه مرحله‌ای گوست پیک

برای تعیین منشأ گوست پیک‌ها در گرادیان: (1) گرادیان را بدون هیچ تزریقی اجرا کنید؛ (2) گرادیان را با تزریق دایلوئنت از ویال تازه اجرا کنید؛ (3) پس از غلیظ‌ترین استاندارد، بلانک تزریق کنید. حضور پیک در مرحله اول یعنی منشأ فاز متحرک یا سیستم است؛ ظهور آن در مرحله دوم یعنی دایلوئنت، ویال یا مسیر تزریق؛ و افزایش آن فقط در مرحله سوم یعنی کری‌اوور. افزایش مساحت گوست پیک با طولانی‌تر شدن زمان تعادل پیش از گرادیان، نشانه آلاینده متمرکزشونده در فاز متحرک A است.

مشکلات شکل پیک



شکل 9-3. الگوهای متداول تخریب شکل پیک و علل اصلی هر یک (نمایشی).

تیلینگ

اگر فقط پیک‌های بازی تیلینگ‌دار شده‌اند، علت معمولاً شیمیایی است: برهم‌کنش آمین‌های پروتونه با سیلانول‌های یونیزه یا ناخالصی‌های فلزی سیلیکا. اگر همه پیک‌ها، به ویژه پیک‌های ابتدایی، تیلینگ‌دار شده‌اند، علت معمولاً فیزیکی است: حجم مرده در اتصالات، فضای خالی در ابتدای بستر ستون یا فریت نیمه‌مسدود. این تمایز ساده، نیمی از مسیر عیب‌یابی را کوتاه می‌کند.

الگو	علل محتمل	اقدام
فقط بازها تیلینگ‌دار	سیلانول‌های فعال؛ ستون سیلیکای نوع A یا فرسوده؛ pH در ناحیه یونیزه شدن سیلانول‌ها؛ ظرفیت بافری ناکافی	pH پایین‌تر (حدود 2.5 تا 3) در محدوده مجاز؛ افزایش غلظت بافر در محدوده مجاز؛ ستون سیلیکای نوع B یا قطبی‌نهفته معادل
فقط اسیدها یا ترکیبات کی‌لایت‌ساز	برهم‌کنش با فلز در ستون یا سیستم	غیرفعال‌سازی سیستم، ستون با سخت‌افزار یا ذرات کم‌فلز
همه پیک‌ها تیلینگ‌دار	حجم مرده؛ فضای خالی سر ستون؛ فریت نیمه‌مسدود	بازبینی اتصالات (شکل 2-5)؛ آزمون با ستون دیگر؛ تعویض ستون
تیلینگ با افزایش غلظت بیشتر می‌شود	اورلود جرمی در سایت‌های قوی جذب (به ویژه برای بازها)	کاهش جرم تزریق در محدوده روش

جدول 9-3. تفکیک علل تیلینگ پیک.

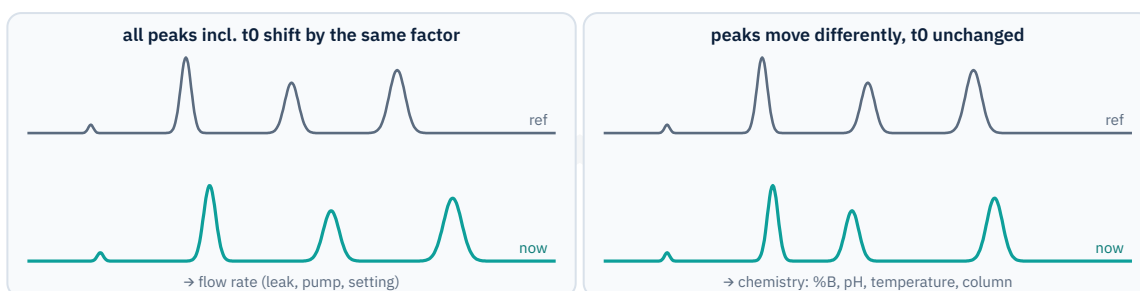
فرانتینگ، دوشاخه شدن و پهن شدن

- **فرانتینگ:** اورلود جرمی (غلظت زیاد) یا حجمی، دایلوئنت قوی‌تر از فاز متحرک، یا در موارد نادر تخریب بستر ستون. کاهش حجم یا غلظت تزریق، آزمون تشخیصی سریع است: اگر شکل بهبود یابد، علت اورلود است.
- **دوشاخه شدن همه پیک‌ها:** مسیر جریان دوگانه در ابتدای ستون (فریت نیمه‌مسدود یا فضای خالی سر بستر). جابه‌جایی جهت جریان (فقط اگر مجاز باشد) یا تعویض گارد ستون یا ستون، تأییدکننده است.



- **دوشاخه شدن فقط پیک‌های ابتدایی:** اثر دایلوئنت قوی (شکل 4-5) یا حجم تزریق زیاد.
- **دوشاخه شدن یک پیک خاص:** کوالویشن دو ترکیب، یا تبدیل دو شکل در حال تعادل (مانند تاتومرها یا ایزومرهای چرخشی) در زمان آنالیز؛ تغییر دما معمولاً این حالت را آشکار می‌کند.
- **پهن شدن همه پیک‌ها:** حجم خارج از ستون (لوله بلند یا پهن، فلوسل بزرگ)، ثابت زمانی بالای دتکتور، دمای پایین، یا افت کارایی ستون.

مشکلات ریتشن تایم



شکل 4-9. تشخیص منشأ تغییر ریتشن تایم (نمایشی). اگر همه پیک‌ها و زمان مرده با یک نسبت جابه‌جا شوند، علت فلوریت است. اگر پیک‌ها به طور نامتناسب جابه‌جا شوند و زمان مرده ثابت بماند، علت شیمیایی است: ترکیب فاز متحرک، pH، دما یا ستون.

نشانه	علل محتمل	بررسی و اقدام
کاهش یا افزایش تدریجی در تزریق‌های ابتدایی	تعادل ناکافی ستون، به ویژه با جفت‌یون یا HILIC	افزایش زمان تعادل و تعریف آن در روش؛ تزریق‌های آماده‌سازی
دریافت تدریجی در طول سکانس	تبخیر جزء فرار فاز متحرک؛ تغییر دمای محیط (ستون بدون کنترل دما)؛ تغییر تدریجی ستون؛ مصرف شدن بافر	پوشاندن مخازن؛ کنترل دمای ستون؛ فاز متحرک تازه
جابه‌جایی ناگهانی	فاز متحرک با ترکیب یا pH اشتباه؛ فلوریت اشتباه؛ نشت؛ خطای تناسب‌ساز پمپ؛ ستون متفاوت	بازبینی سوابق آماده‌سازی؛ اندازه‌گیری حجمی فلوریت؛ آزمون با فاز متحرک پیش‌ساخته
نوسان تصادفی ریتشن تایم	حباب یا چک‌ولو معیوب؛ اختلاط نامناسب؛ نشت متناوب	پایش هم‌زمان فشار؛ نگهداری پمپ
کاهش شدید ریتشن در فاز متحرک بسیار آبی	دی‌وتینگ ستون C18	شستشو با درصد بالای حلال آلی و تعادل مجدد؛ استفاده از ستون سازگار با آب

جدول 4-9. عیب‌یابی مشکلات ریتشن تایم.

مشکلات کمی‌سازی

نشانه	علل محتمل	بررسی و اقدام
%RSD سطح بالا در SST	حباب در سرنگ یا لوپ؛ سوزن مسدود یا آسیب‌دیده؛ سوراخ شدن نامناسب درپوش؛ حجم ناکافی محلول در ویال؛ تبخیر حلال؛ انتگرال‌گیری ناپایدار	بررسی دقت با حلال ساده؛ تعویض سپتوم و ویال؛ کنترل ارتفاع سوزن؛ کاهش دمای سینی؛ بازبینی پارامترهای انتگرال‌گیری



نشانه	علل محتمل	بررسی و اقدام
روند کاهشی پاسخ در طول سکانس	ناپایداری محلول؛ جذب آنالیت به ویال؛ تبخیر یا رسوب	داده پایداری محلول؛ ویال شیشه‌ای غیرفعال یا پلی‌پروپیلن؛ دمای سینی
کری‌اوور	حلال شستشوی ناکارآمد؛ سایش روتور ولو؛ جذب آنالیت در مسیر تزریق	حلال شستشو با قدرت حل‌کنندگی بیشتر؛ شستشوی چندمرحله‌ای؛ تعویض روتور
خطی نبودن در غلظت‌های بالا	اشباع دتکتور؛ اورلود ستون	کاهش غلظت یا حجم؛ طول موج با جذب کمتر در صورت مجاز بودن
خطی نبودن یا بازیابی کم در غلظت‌های پایین	جذب سطحی به شیشه، فیلتر یا مسیر جریان	اشباع‌سازی فیلتر با حجم اولیه؛ ارزیابی سازگاری فیلتر؛ ویال‌های مناسب
بازیابی کم نمونه در مقایسه با استاندارد	استخراج ناقص؛ جذب به فیلتر؛ ناپایداری در ماتریس؛ تداخل	بهینه‌سازی زمان و روش استخراج؛ مقایسه صافش و سانتریفیوژ؛ بررسی اختصاصی بودن

جدول 9-5. عیب‌یابی مشکلات کیفی سازی.

از منابع مرجع: جایگزینی با جزء سالم

منابع عیب‌یابی LC بر آزمون‌هایی تأکید می‌کنند که فرضیه را به‌روشنی تأیید یا رد کنند. مؤثرترین آن‌ها جایگزینی جزء مشکوک با جزء سالم و شناخته‌شده است: ستون مشکوک با ستون مرجع، فاز متحرک با فاز متحرک تازه از مواد دیگر، یا ویال و سپتوم با نمونه نو. اگر مشکل با جایگزینی برطرف شد و با بازگرداندن جزء قبلی دوباره ظاهر شد، علت با اطمینان مشخص شده است. پیش از تعویض قطعات گران‌قیمت، تکرارپذیری خود مشکل نیز تأیید شود.

Based on: Dolan J.W., Snyder L.R. Troubleshooting LC Systems (1989); Dolan J.W. LC Troubleshooting column, LCGC North America

فصل 10

مطالعات موردی عیب‌یابی

Chapter 10 – Troubleshooting case studies

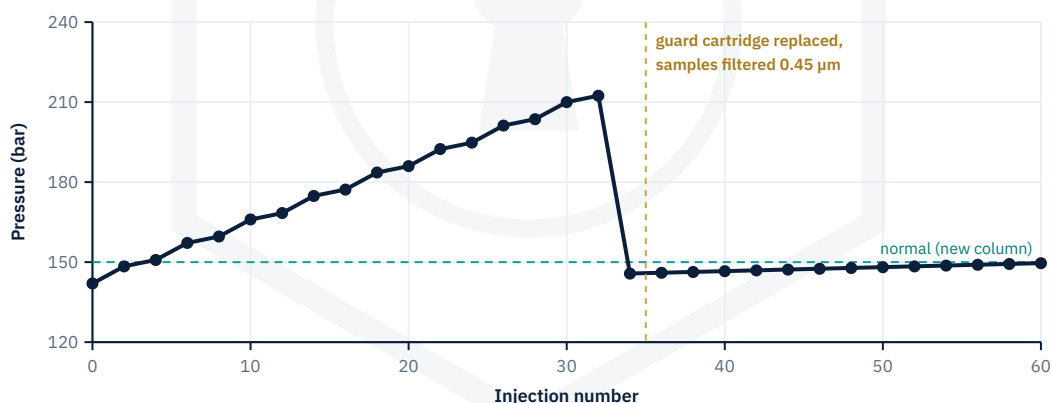
مطالعات موردی این فصل بر پایه الگوهای رایج در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت طراحی شده و داده‌های آن‌ها نمایشی است. ساختار هر مورد، مسیر استاندارد بررسی را نشان می‌دهد: نشانه‌ها، داده‌ها، تحلیل علت ریشه‌ای، آزمون‌های تشخیصی، راهکار و درس کلیدی. پیشنهاد می‌شود پیش از خواندن تحلیل، بر اساس نشانه‌ها و داده‌ها، فرضیه‌های خود را مطرح و آزمون‌های لازم را مشخص کنید.

فشار

مورد 1: افزایش تدریجی فشار در سکانس تعیین مقدار قرص

نشانه‌ها در سکانس 60 تزریقی تعیین مقدار یک قرص روکش‌دار، فشار از 142 به حدود 215 بار رسید. در سکانس‌های قبلی فشار پایدار بود. شکل پیک و ریتنشن تایم تا میانه سکانس تغییر محسوسی نداشت.

داده‌ها آماده‌سازی نمونه از هفته جاری توسط کارشناس جدید انجام می‌شد. در روش، صاف‌کردن با فیلتر سرنگی 0.45 میکرومتر قید شده بود، اما نمونه‌ها فقط سانتریفیوژ شده بودند. با حذف ستون، فشار سیستم طبیعی بود.



شکل 10-1. روند فشار در طول سکانس و بازگشت آن پس از تعویض کارتریج گارد و صاف‌کردن نمونه‌ها (داده‌های نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای ذرات ریز مواد جانبی نامحلول (به‌ویژه مواد روکش و سلولز ریزپلور) که با سانتریفیوژ به‌طور کامل حذف نمی‌شوند، روی کارتریج گارد و فریت ورودی ستون انباشته شده‌اند. علت ریشه‌ای، انحراف از روش در آماده‌سازی نمونه و آموزش ناکافی است، نه نقص ستون.

آزمون‌های تشخیصی جداسازی بخش‌ها: حذف ستون (فشار طبیعی) و سپس حذف کارتریج گارد (فشار ستون نزدیک به مقدار مرجع). مقایسه سوابق آماده‌سازی با متن روش.

راهکار تعویض کارتریج گارد، تزریق مجدد نمونه‌ها پس از صاف‌کردن طبق روش، ثبت انحراف و بازآموزی. ارزیابی اینکه آیا نتایج تزریق‌های میانه سکانس تحت تأثیر قرار گرفته‌اند (SST و استانداردهای کنترلی).

درس کلیدی: پیش از تعویض ستون، منشأ افزایش فشار را با جداسازی بخش‌ها مشخص کنید. ثبت فشار ابتدا و انتهای هر سکانس، تغییرات آماده‌سازی نمونه را زودتر از هر شاخص دیگری آشکار می‌کند.

شکل پیک

مورد 2: تیلینگ پیک ماده مؤثره بازی پس از تعویض ستون

نشانه‌ها تیلینگ فاکتور پیک ماده مؤثره (آمین نوع سوم، pK_a حدود 9.5) با ستون C18 جدید از 1.3 به 2.1 رسید؛ معیار SST حداکثر 2.0 است. پیک ناخالصی خنثی متقارن ماند.

داده‌ها فاز متحرک فسفات 10 میلی‌مولار با pH برابر 6.8 و استونیتریل. ستون جدید از همان برند و کد USP اما سری ساخت متفاوت بود. ستون قبلی پس از حدود 1500 تزریق کنار گذاشته شده بود.



شکل 2-10. مقایسه شکل پیک ماده مؤثره بازی با دو سری ساخت ستون؛ پیک ترکیب خنثی تغییری نکرده است (نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای تیلینگ‌دار شدن فقط پیک بازی، نشانه علت شیمیایی است. در pH برابر 6.8، بخش قابل توجهی از سیلانول‌های باقی‌مانده یونیزه هستند و با آمین پروتونه برهم‌کنش تبادل یونی دارند. تفاوت فعالیت سیلانولی سری‌های ساخت و ظرفیت بافری پایین (10 میلی‌مولار) این حساسیت را آشکار کرده است. روش در مرز مقاومت خود طراحی شده است.

آزمون‌های تشخیصی تزریق یک ترکیب خنثی (مانند تولوئن) برای رد علت فیزیکی؛ آزمون ستون از سری ساخت سوم؛ بررسی گواهی آزمون ستون‌ها از نظر شاخص‌های فعالیت سیلانولی.

راهکار کوتاه‌مدت: استفاده از ستون سری ساخت مناسب پس از تأیید SST و افزایش غلظت بافر در محدوده مجاز ($\pm 10\%$ درصد). بلندمدت: بازنگری روش از طریق کنترل تغییرات، مثلاً کاهش pH به حدود 3 یا ستون با سیلیکای نوع B کم‌فعالیت؛ همراه با صحه‌گذاری لازم.

درس کلیدی: اگر تنها پیک‌های بازی تیلینگ‌دار شوند، علت شیمیایی و اگر همه پیک‌ها تغییر کنند، علت فیزیکی است. روش‌هایی که فقط با یک سری ساخت ستون SST را برآورده می‌کنند، در ارزیابی مقاومت باید شناسایی شوند.

ریتشن تایم

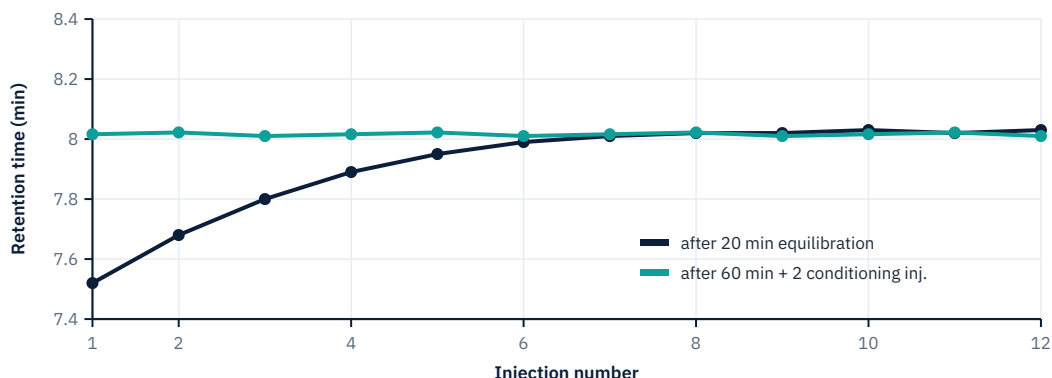
مورد 3: دریافت ریتشن تایم در تزریق‌های ابتدایی روش جفت‌یون

نشانه‌ها در روش جفت‌یون با سدیم اکتان‌سولفونات، ریتشن تایم پیک اصلی در شش تزریق نخست از 7.52 به 7.99 دقیقه رسید و سپس پایدار شد. $RSD\%$ ریتشن تایم در SST از حد مجاز فراتر رفت.



داده‌ها

ستون روز قبل برای روش دیگری بدون جفت‌یون استفاده و با استونیتریل 70 درصد ذخیره شده بود. زمان تعادل پیش از 20، SST، دقیقه با سرعت 1.0 میلی‌لیتر بر دقیقه بود.



شکل 10-3. ریتنشن تایم در تزریق‌های متوالی با دو زمان تعادل متفاوت (نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای

عامل جفت‌یون باید تا رسیدن به تعادل روی فاز ساکن جذب شود؛ این فرایند به حجم زیادی از فاز متحرک نیاز دارد. 20 دقیقه تعادل (حدود 13 حجم ستون) کافی نبوده و ستون در طول تزریق‌های اول همچنان در حال بارگذاری بوده است. استفاده مشترک ستون میان روش‌ها، مشکل را تشدید کرده است.

آزمون‌های تشخیصی

ثبت ریتنشن تایم در تزریق‌های متوالی پس از زمان‌های تعادل مختلف؛ مقایسه رفتار با ستون اختصاصی.

راهکار

تعیین ستون اختصاصی برای روش جفت‌یون؛ تعریف زمان تعادل کافی (در این مثال 60 دقیقه) و دو تزریق آماده‌سازی در روش؛ ذخیره ستون در فاز متحرک بدون بافر با همان درصد آلی طبق توصیه سازنده.

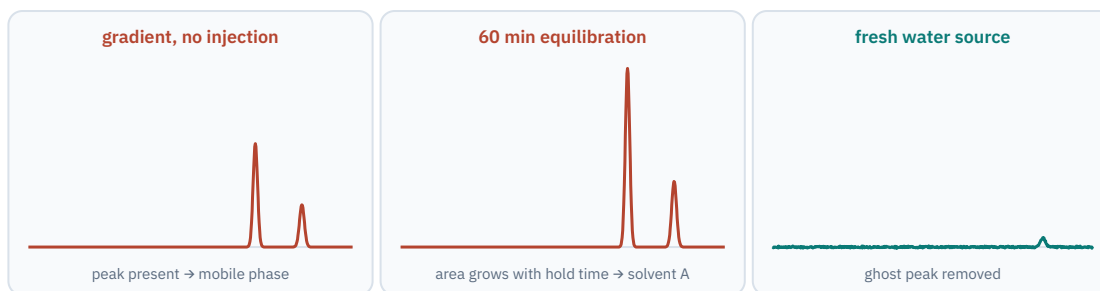
درس کلیدی: روش‌های جفت‌یون و HILIC زمان تعادل طولانی‌تری نیاز دارند؛ کفایت تعادل را با تکرارپذیری ریتنشن تایم بسنجید، نه با پایدار شدن ظاهری فشار یا بیس‌لاین.

بیس‌لاین**مورد 4: گوست پیک در بلانک روش ناخالصی گرادانی****نشانه‌ها**

در کروماتوگرام بلانک روش ناخالصی‌ها (گرادیانی، 220 نانومتر) پیکی در 11.2 دقیقه ظاهر شد که در نمونه‌ها نزدیک به یک ناخالصی مشخص قرار داشت و در محاسبات به عنوان ناخالصی ناشناخته گزارش می‌شد.

داده‌ها

پیک در گرادیان بدون تزریق نیز حضور داشت و سطح آن با افزایش زمان نگهداری در شرایط اولیه گرادیان افزایش می‌یافت. کارتریج سیستم آب خالص یک ماه از موعد تعویض گذشته بود.



شکل 4-10. آزمون‌های تشخیصی منشأ گوست پیک: حضور در گرادیان بدون تزریق، وابستگی به زمان تعادل و حذف با آب تازه (نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای آلاینده‌های آلی آب (TOC بالا) در شرایط آبی ابتدای گرادیان روی ستون متمرکز و با افزایش درصد حلال آلی به صورت پیک شسته می‌شوند. هرچه زمان تماس فاز متحرک A با ستون بیشتر باشد، آلاینده بیشتری متمرکز می‌شود.

آزمون‌های تشخیصی گرادیان بدون تزریق؛ مقایسه زمان‌های تعادل؛ جایگزینی آب با آب بطری‌شده با کیفیت HPLC؛ بررسی سوابق TOC و رسانایی سیستم آب.

راهکار تعویض کارتریج‌ها و تأیید کیفیت آب؛ ثبت انحراف و ارزیابی نتایج گزارش‌شده؛ افزودن الزام تزریق بلانک و بررسی آن پیش از ارزیابی ناخالصی‌ها به روش.

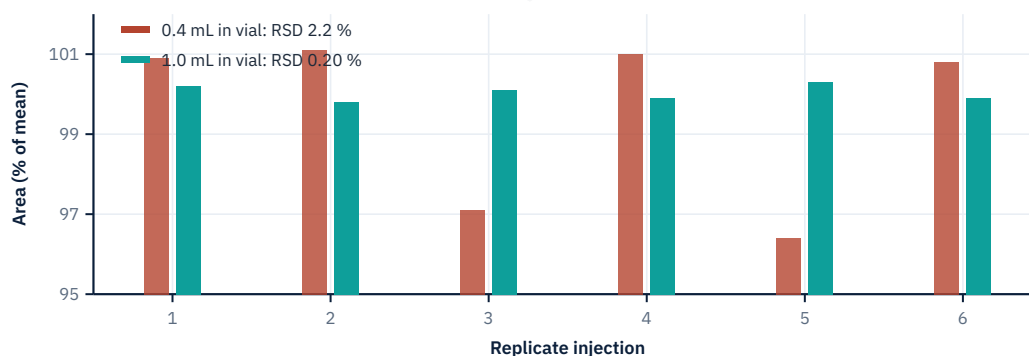
درس کلیدی: گوست پیک‌ها در گرادیان معمولاً از فاز متحرک یا سیستم‌اند، نه از نمونه. ارزیابی بلانک پیش از نسبت‌دادن هر پیک به نمونه، یک الزام کنترلی است.

کفی‌سازی

مورد 5: ناکامی تکرارپذیری SST در تعیین مقدار

نشانه‌ها RSD% سطح شش تزریق استاندارد 2.2 درصد شد (معیار: حداکثر 1.0 درصد). دو تزریق از شش تزریق حدود 4 درصد کمتر از بقیه بود؛ شکل پیک‌ها طبیعی بود.

داده‌ها به دلیل کمبود رفرنس استاندارد، حجم محلول در ویال 0.4 میلی‌لیتر بود. حجم تزریق 20 میکرولیتر و از یک ویال برای شش تزریق برداشت شده بود.



شکل 5-10. سطح تزریق‌های تکراری با دو حجم پُرکردن ویال (نمایشی).



تحلیل علت ریشه‌ای با کاهش سطح مایع در ویال در طول تزریق‌های متوالی، نوک سوزن (با تنظیم ارتفاع پیش‌فرض) در برخی برداشت‌ها هوا مکش کرده است. الگوی «چند تزریق کم در میان تزریق‌های طبیعی» معمولاً نشانه مشکل برداشت نمونه است، نه دتکتور یا انتگرال‌گیری.

آزمون‌های تشخیصی تکرار تزریق‌ها از ویال با حجم کافی؛ بررسی ارتفاع سوزن در تنظیمات اتوسمپلر؛ استفاده از ویال با درج کم حجم (Insert).

راهکار تعیین حداقل حجم پرکردن ویال در SOP بر اساس تعداد برداشت و هندسه ویال؛ استفاده از درج کم حجم در صورت محدودیت محلول؛ تکرار SST طبق روش کار مستند و نه حذف تزریق‌های «نامطلوب».

درس کلیدی: حذف تزریق‌های خارج از روند برای برآورده کردن SST مجاز نیست. الگوی خطا (تصادفی، روندی یا پراکنده) راهنمای تشخیص علت است.

دایلوئنت

مورد 6: دوشاخه شدن پیک‌های ابتدایی پس از تغییر دایلوئنت

نشانه‌ها در روش ناخالصی‌ها، دو پیک ابتدایی (k حدود 1 تا 2) پهن و دوشاخه شدند؛ پیک‌های دیررس طبیعی بودند. تغییر پس از بازنگری روش آماده‌سازی رخ داده بود.

داده‌ها برای افزایش حلالیت، دایلوئنت از فاز متحرک (20 درصد استونیتریل) به متانول خالص تغییر یافته بود؛ حجم تزریق 50 میکرولیتر و ستون 150×4.6 میلی‌متر.

تحلیل علت ریشه‌ای دایلوئنت بسیار قوی‌تر از فاز متحرک است؛ آنالیت‌های کم‌ریتنشن پیش از رقیق شدن دایلوئنت در ابتدای ستون، بخشی از مسیر را با سرعت بیشتری طی می‌کنند. حجم 50 میکرولیتر (حدود 3 درصد حجم مرده ستون) این اثر را تشدید کرده است (شکل 4-5).

آزمون‌های تشخیصی کاهش حجم تزریق به 10 میکرولیتر (بهبود شکل پیک تأییدکننده اثر حلال است)؛ تزریق نمونه در مخلوط ضعیف‌تر.

راهکار انحلال اولیه در حجم کم متانول و رقیق‌سازی نهایی با فاز متحرک یا آب؛ یا کاهش حجم تزریق همراه با ارزیابی حد کمی. تغییر دایلوئنت، تغییر در روش است و باید از طریق کنترل تغییرات و با داده‌های پشتیبان انجام شود.

درس کلیدی: دایلوئنت بخشی از سیستم کروماتوگرافی است. اگر فقط پیک‌های ابتدایی تخریب شده‌اند، پیش از همه به قدرت دایلوئنت و حجم تزریق مشکوک شوید.

پیک دیررس

مورد 7: پیک ناشناخته پراکنده در نمونه‌های پایداری

نشانه‌ها در برخی نمونه‌های پایداری، پیکی پهن در RRT حدود 0.45 مشاهده شد که در تزریق تکراری همان ویال گاهی وجود داشت و گاهی نه. پیک در نمونه‌های پس از تزریق‌های نمونه، و نه پس از استاندارد، دیده می‌شد.



داده‌ها روش ایزوکراتیک با زمان آنالیز 15 دقیقه. پهنای پیک ناشناخته حدود 4 برابر پیک‌های مجاور با ریتنشن تایم مشابه بود.

تحلیل علت ریشه‌ای پهنای غیرعادی پیک نسبت به ریتنشن تایم ظاهری آن، نشانه کلیدی یک پیک دیررس از تزریق قبلی است؛ ترکیبی بسیار آب‌گریز از ماتریس فرآورده (مثلاً یک ماده جانبی چرب یا محصول تخریب آب‌گریز) که حدود 21 دقیقه پس از تزریق شسته می‌شود و در کروماتوگرام تزریق بعدی ظاهر می‌شود.

آزمون‌های تشخیصی افزایش زمان آنالیز یک تزریق نمونه به 45 دقیقه؛ تزریق بلانک بلافاصله پس از نمونه؛ مقایسه پهنای پیک با رابطه N برای ستون.

راهکار افزودن مرحله شستشو با درصد بالای حلال آلی در انتهای هر تزریق (پس از ارزیابی اثر آن بر روش) یا افزایش زمان آنالیز؛ اطمینان از اینکه این ترکیب در روش به‌عنوان ناخالصی مرتبط ارزیابی شده است.

درس کلیدی: پیک بسیار پهن‌تر از همسایگانش، احتمالاً به تزریق قبلی تعلق دارد. زمان آنالیز در توسعه روش باید بر اساس الوشن کامل همه اجزای ماتریس تعیین شود، نه فقط آخرین پیک مشخص.

انتقال روش

مورد 8: ناکامی انتقال روش گرادیانی به آزمایشگاه دیگر

نشانه‌ها در انتقال روش ناخالصی‌ها به آزمایشگاه مقصد، رزولوشن جفت بحرانی ابتدای کروماتوگرام 1.2 شد (معیار: حداقل 2.0) در حالی که در آزمایشگاه مبدأ 2.3 بود. پیک‌های دیررس جابه‌جایی کمتری داشتند.

داده‌ها آزمایشگاه مبدأ: پمپ باینری با حجم تأخیر حدود 0.35 میلی‌لیتر. آزمایشگاه مقصد: پمپ کوآترنری با حجم تأخیر حدود 1.1 میلی‌لیتر. ستون و فاز متحرک یکسان؛ سرعت 1.0 میلی‌لیتر بر دقیقه.



شکل 10-6. اثر حجم تأخیر بر جفت بحرانی ابتدای گرادیان در دو دستگاه (نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای اختلاف حدود 0.75 میلی‌لیتر حجم تأخیر، معادل حدود 45 ثانیه نگهداری ایزوکراتیک اضافه در ابتدای گرادیان است. پیک‌های ابتدایی در این مدت با ترکیب اولیه شسته می‌شوند و فاصله نسبی آن‌ها تغییر می‌کند؛ این تفاوت در پروتکل انتقال پیش‌بینی نشده بود.

آزمون‌های تشخیصی اندازه‌گیری حجم تأخیر هر دو دستگاه؛ برنامه‌ریزی تأخیر در شروع گرادیان در دستگاه با حجم تأخیر کمتر و مشاهده بازتولید نتیجه آزمایشگاه مقصد.

راهکار تنظیم زمان نگهداری اولیه گرادیان برای جبران حجم تأخیر در محدوده مجاز فصل عمومی فارماکوپه و مستندسازی آن؛ یا استفاده از قابلیت تأخیر تزریق (Injection delay) در دستگاه مقصد. ثبت حجم تأخیر در روش

به عنوان اطلاعات حیاتی.

درس کلیدی: حجم تأخیر بخشی از شرایط روش گرادیانی است. در روش‌هایی که پیک‌های بحرانی در ابتدای گرادیان قرار دارند، حجم تأخیر دستگاه توسعه باید در متن روش ذکر شود.

نویز

مورد 9: نویز دوره‌ای بیس‌لاین در 214 نانومتر با TFA

نشانه‌ها در روش گرادیانی با 0.1 درصد TFA در هر دو حلال و دتکشن در 214 نانومتر، نویز سینوسی منظمی با دوره حدود 10 ثانیه ظاهر شد و S/N محلول حد کمی به کمتر از 10 رسید.

داده‌ها دوره نویز با کاهش فلوریت طولانی‌تر می‌شد. با تزریق در شرایط ایزوکراتیک با فاز متحرک پیش‌ساخته، نویز تقریباً از بین می‌رفت.

تحلیل علت ریشه‌ای TFA در طول موج‌های پایین جذب قابل توجه دارد و جذب آن در آب و استونیتریل یکسان نیست. اختلاط ناقص در هر سیکل پمپ، نوسان کوچکی در غلظت TFA و در نتیجه نوسان جذب ایجاد می‌کند. وابستگی دوره نویز به فلوریت، ارتباط آن با سیکل پمپ را تأیید می‌کند.

آزمون‌های تشخیصی مقایسه دوره نویز با زمان سیکل پیستون؛ اجرای ایزوکراتیک پیش‌ساخته؛ بررسی عملکرد چک‌لولوها.

راهکار استفاده از میکسر با حجم بیشتر (با ارزیابی اثر بر حجم تأخیر)؛ متعادل کردن جذب دو حلال با تنظیم غلظت TFA در حلال B (مثلاً حدود 0.085 درصد) در صورت مجاز بودن در روش؛ نگهداری پمپ.

درس کلیدی: نویزی که دوره آن با فلوریت تغییر می‌کند، منشأ پمپ یا اختلاط دارد؛ نویز تصادفی معمولاً به دتکتور یا حباب مربوط است.

ستون

مورد 10: از دست رفتن ناگهانی ریتنشن ترکیب قطبی پس از توقف سیستم

نشانه‌ها در روشی با فاز متحرک 98 درصد بافر آبی روی ستون C18 متداول، پس از تعطیلی آخر هفته (توقف جریان با ستون در فاز متحرک)، ریتنشن تایم ماده مؤثره از 6.5 به 2.1 دقیقه کاهش یافت.

داده‌ها فشار طبیعی بود؛ کارایی کاهش یافته و پیک پهن‌تر شده بود. ستون همان ستون هفته قبل بود.

تحلیل علت ریشه‌ای دی‌وتینگ (Dewetting): با کاهش فشار در زمان توقف، فاز متحرک تقریباً کاملاً آبی از منافذ آب‌گریز C18 خارج شده و سطح در دسترس فاز ساکن به شدت کاهش یافته است.

آزمون‌های تشخیصی شستشوی ستون با حدود 20 حجم ستون استونیتریل 50 تا 100 درصد و سپس تعادل مجدد با فاز متحرک روش؛ بازگشت ریتنشن تایم، تشخیص را تأیید می‌کند.

راهکار تعریف روش شستشو و ذخیره در SOP (عدم توقف جریان در فاز متحرک بسیار آبی)؛ در بلندمدت، استفاده از ستون سازگار با فاز متحرک آبی (AQ یا قطبی‌نهفته) از طریق کنترل تغییرات.



درس کلیدی: کاهش ناگهانی ریتنشن با فشار طبیعی در فاز متحرک بسیار آبی، پیش از آنکه «خرابی ستون» تلقی شود، با شستشوی آلی و تعادل مجدد ارزیابی شود.

آماده سازی نمونه

مورد 11: نتیجه پایین تعیین مقدار ناشی از جذب سطحی فیلتر

نشانه ها نتیجه تعیین مقدار یک قرص با دوز کم 96.5 درصد شد (مشخصات 95.0 تا 105.0 درصد، اما روند تاریخی حدود 99.5 درصد). SST و استانداردهای کنترلی قابل قبول بودند. نتیجه OOT ثبت شد.

داده ها به دلیل اتمام فیلترهای PVDF، فیلتر نایلون استفاده شده بود. غلظت نهایی نمونه 10 میکروگرم بر میلی لیتر و حجم دورریز اولیه 1 میلی لیتر بود.

تحلیل علت ریشه ای نایلون برای برخی ترکیبات (به ویژه ترکیبات دارای گروه های قطبی یا آروماتیک در غلظت پایین) ظرفیت جذب قابل توجهی دارد. در غلظت کم، دورریز 1 میلی لیتر برای اشباع سایت های جذب کافی نبوده است.

آزمون های تشخیصی مقایسه نمونه سانتریفیوژ شده با نمونه های صاف شده با فیلترهای مختلف و حجم های دورریز متفاوت (مثلاً 1، 3 و 5 میلی لیتر).

راهکار استفاده از فیلتر صحنه گذاری شده مطابق روش؛ ثبت تغییر نوع فیلتر به عنوان انحراف؛ گنجاندن نوع فیلتر و حجم دورریز در متن روش و در صورت نیاز تعریف فیلترهای جایگزین ارزیابی شده.

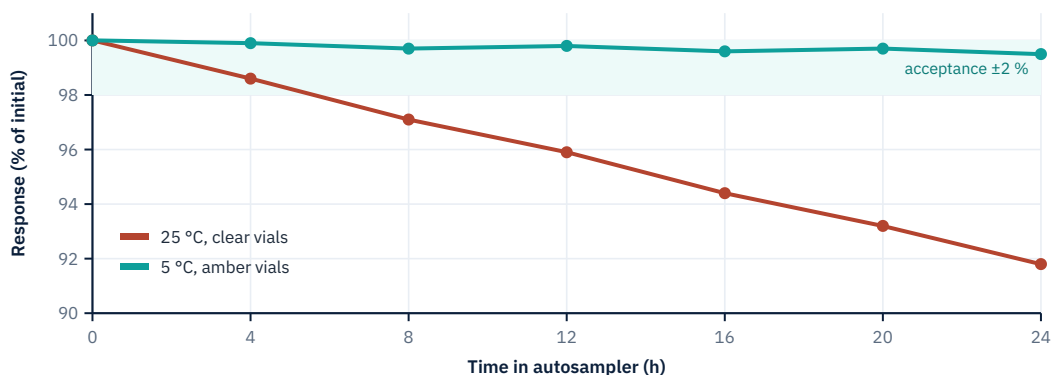
درس کلیدی: فیلتر سرنگی بخشی از روش است؛ تغییر جنس یا برند آن بدون داده سازگاری، می تواند بدون هیچ نشانه ای در SST، نتیجه را جابه جا کند.

پایداری محلول

مورد 12: کاهش تدریجی پاسخ استاندارد در سکانس طولانی

نشانه ها در سکانس 24 ساعته، استانداردهای کنترلی پایانی حدود 6 تا 8 درصد پاسخ کمتری نسبت به استانداردهای ابتدایی داشتند و معیار پذیرش استاندارد کنترلی برآورده نشد.

داده ها سینی اتوسمپلر بدون کنترل دما (حدود 25 درجه سانتی گراد) و ویال ها شفاف بودند. ماده مؤثره به اکسایش و نور حساس است. پیک جدیدی در RRT حدود 0.8 به تدریج رشد می کرد.



شکل 10-7. پاسخ محلول استاندارد در طول زمان نگهداری در اتوسمپلر در دو شرایط (نمایشی).

تحلیل علت ریشه‌ای

ناپایداری محلول در شرایط سینی در طول سکانس؛ مدت پایداری محلول در صحنه‌گذاری فقط برای 8 ساعت در دمای اتاق اثبات شده بود، در حالی که سکانس 24 ساعته طراحی شده بود.

آزمون‌های تشخیصی

تزریق مجدد محلول نخست در پایان سکانس؛ مطالعه پایداری محلول در شرایط مختلف دما و نور.

راهکار

کنترل دمای سینی در 5 درجه سانتی‌گراد و ویال‌های کهربایی؛ طراحی سکانس در محدوده پایداری اثبات‌شده؛ به‌روزرسانی روش با داده پایداری جدید.

درس کلیدی: طول سکانس نباید از مدت پایداری اثبات‌شده محلول‌ها بیشتر باشد. رشد یک پیک جدید همزمان با کاهش پیک اصلی، نشانه تخریب در ویال است.





فصل 11

مسائل محاسباتی حل شده

Chapter 11 – Worked calculations

مسائل این فصل محاسبات رایج روزمره واحد کنترل کیفیت را پوشش می‌دهند. اعداد برای سهولت محاسبه انتخاب شده‌اند؛ در گزارش رسمی، قواعد گردکردن و ارقام معنادار روش و فارماکوپه رعایت شود.

محاسبه

مسئله 1: ریتنشن فاکتور، سلکتیویته و رزولوشن

داده‌ها $t_m = 1.50 \text{ min}$ ، پیک 1: $t_{R1} = 6.00 \text{ min}$ و $w_{h1} = 0.140 \text{ min}$ ؛ پیک 2: $t_{R2} = 6.60 \text{ min}$ و $w_{h2} = 0.150 \text{ min}$

$$k_1 = (6.00 - 1.50) / 1.50 = 3.00 \quad \dots \quad k_2 = (6.60 - 1.50) / 1.50 = 3.40$$

$$\alpha = 3.40 / 3.00 = 1.13$$

$$R_s = 1.18 \times (6.60 - 6.00) / (0.140 + 0.150) = 1.18 \times 0.60 / 0.290 = 2.44$$

پاسخ: $\alpha = 1.13$ ، $k_1 = 3.00$ ، $k_2 = 3.40$ ، $R_s = 2.44$ ؛ جداسازی تا بیس‌لاین با حاشیه اطمینان مناسب.

محاسبه

مسئله 2: تعداد پلیت تئوری و ارتفاع معادل پلیت

داده‌ها ستون $4.6 \text{ mm} \times 150$ با ذرات $5 \mu\text{m}$ ؛ پیک با $t_R = 6.00 \text{ min}$ و $w_h = 0.140 \text{ min}$

$$N = 5.54 \times (6.00 / 0.140)^2 = 5.54 \times 1837 \approx 10\,180$$

$$H = L / N = 150\,000 \mu\text{m} / 10\,180 \approx 14.7 \mu\text{m} \quad \dots \quad h = H / d_p \approx 2.9$$

پاسخ: N حدود 10200، H حدود $14.7 \mu\text{m}$ میکرومتر و ارتفاع کاهش یافته حدود 2.9؛ ستون در وضعیت مطلوب است (برای ستون خوب پرشده، h حدود 2 تا 3 انتظار می‌رود).

محاسبه

مسئله 3: اثر طول ستون بر رزولوشن

داده‌ها رزولوشن جفت بحرانی با ستون 150 میلی‌متری برابر 1.6 است. اگر ستون 250 میلی‌متری با همان فاز و اندازه ذره استفاده شود، رزولوشن و فشار تقریباً چه تغییری می‌کنند؟

رزولوشن با جذر N و N با طول ستون متناسب است؛ فشار با طول ستون به‌طور خطی افزایش می‌یابد.

$$R_{s2} = 1.6 \times \sqrt{(250 / 150)} = 1.6 \times 1.29 \approx 2.07$$

پاسخ: رزولوشن حدود 2.1، فشار و ریتشن تایم حدود 1.67 برابر. افزایش طول، بهبود محدود و پرهزینه‌ای است؛ تغییر سلکتیویته معمولاً مؤثرتر است.

محاسبه

مسئله 4: انتقال روش ایزوکراتیک به ستون کوچک‌تر

داده‌ها روش: ستون 5 μm ، 4.6 mm $\times$ 250، فلوریت 1.5 mL/min، حجم تزریق 20 μL . ستون جدید: 150 $\times$ 3.0 mm، 3 μm

$$L/d_p: 250\ 000 / 5 = 50\ 000 \rightarrow 150\ 000 / 3 = 50\ 000$$

نسبت L/d_p تغییری نکرده است و در محدوده مجاز -25 تا +50 درصد قرار دارد.

$$F_2 = 1.5 \times (3.0^2 \times 5) / (4.6^2 \times 3) = 1.5 \times 45 / 63.48 \approx 1.06 \text{ mL/min}$$

$$V_{inj2} = 20 \times (150 \times 3.0^2) / (250 \times 4.6^2) = 20 \times 1350 / 5290 \approx 5.1 \mu\text{L}$$

پاسخ: فلوریت حدود 1.06 میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق حدود 5 میکرولیتر. مصرف حلال در هر آنالیز، متناسب با حجم ستون، حدود 75 درصد کاهش می‌یابد؛ سیستم سوتیبیلیتی باید با شرایط جدید برآورده و تنظیمات مستند شود.



محاسبه

مسئله 5: حجم تأخیر و اختلاف زمانی شروع گرادیان

داده‌ها دستگاه A حجم تأخیر 0.40 میلی‌لیتر و دستگاه B حجم تأخیر 1.60 میلی‌لیتر دارد؛ فلوریت روش 0.8 میلی‌لیتر بر دقیقه است.

$$t_{D,A} = 0.40 / 0.8 = 0.50 \text{ min} \cdot \cdot \cdot t_{D,B} = 1.60 / 0.8 = 2.00 \text{ min}$$

پاسخ: گرادیان در دستگاه B حدود 1.5 دقیقه دیرتر به ستون می‌رسد. برای بازتولید کروماتوگرام دستگاه B روی دستگاه A، می‌توان 1.5 دقیقه نگهداری ایزوکراتیک اولیه افزود (در محدوده تنظیمات مجاز و با مستندسازی).

محاسبه

مسئله 6: تعیین مقدار با رفرنس استاندارد

داده‌ها رفرنس استاندارد: 25.0 mg در 50 mL، سپس 5 mL به 50 mL (خلوص 99.6 درصد بر مبنای ماده خشک). نمونه: پودر معادل 25.0 mg ماده مؤثره (بر اساس برچسب) به همان ترتیب رقیق شده است. میانگین سطح: استاندارد 1 300 254 و نمونه 1 238 900.

$$C_{std} = 25.0 \times 0.996 \times 5 / (50 \times 50) = 0.04980 \text{ mg/mL} \cdot \cdot \cdot$$

$$C_{s,nominal} = 25.0 \times 5 / (50 \times 50) = 0.05000 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Assay} = (1\ 238\ 900 / 1\ 254\ 300) \times (0.04980 / 0.05000) \times 100 = 0.98772 \times 0.996 \times 100 \approx 98.4 \%$$

پاسخ: محتوای ماده مؤثره حدود 98.4 درصد مقدار برچسب. در گزارش، وزن واقعی پودر و وزن متوسط قرص در محاسبه وارد شود؛ این مثال برای وزن معادل دقیق نوشته شده است.



محاسبه

مسئله 7: ناخالصی با ضریب پاسخ نسبی

داده‌ها محلول رفرنس رقیق: ماده مؤثره با غلظت 0.1 درصد غلظت نمونه؛ سطح پیک آن 5200. سطح ناخالصی B در نمونه 7800 و RRF ناخالصی B برابر 1.30 است.

$$\text{Impurity B (\%)} = (7800 / 5200) \times 0.1 \times (1 / 1.30) = 1.50 \times 0.1 \times 0.769 \approx 0.115 \%$$

پاسخ: ناخالصی B حدود 0.12 درصد. بدون اصلاح RRF، نتیجه 0.15 درصد به دست می‌آید؛ یعنی بیش‌برآورد حدود 30 درصد که می‌تواند تصمیم انطباق را تغییر دهد.

محاسبه

مسئله 8: نسبت سیگنال به نویز و LOQ

داده‌ها محلول 0.05 درصد ماده مؤثره، پیکی با ارتفاع 0.42 mAU ایجاد می‌کند. دامنه نویز (h) در پنجره‌ای به پهنای 5 برابر w_h در کروماتوگرام بلانک برابر 0.070 mAU است.

$$S/N = 2H / h = 2 \times 0.42 / 0.070 = 12$$

پاسخ: S/N برابر 12 است؛ این غلظت معیار LOQ (حداقل 10) را برآورده می‌کند. با فرض خطی بودن، غلظت متناظر با S/N برابر 10 حدود 0.042 درصد برآورد می‌شود که باید با تزریق‌های تکراری تأیید شود.

محاسبه

مسئله 9: حداکثر RSD مجاز در Ph. Eur.

داده‌ها محتوای مجاز ماده مؤثره در مونوگراف 98.5 تا 101.5 درصد است و 6 تزریق تکراری انجام می‌شود (5، 90% t_{90} = 2.015).

$$B = 101.5 - 100 = 1.5 \cdot \cdot \cdot \%RSD_{\max} = 0.349 \times 1.5 \times \sqrt{6} / 2.015 \\ = 0.349 \times 1.5 \times 2.449 / 2.015 \approx 0.64 \%$$

پاسخ: حداکثر RSD% مجاز حدود 0.64 درصد است؛ بسیار سخت‌گیرانه‌تر از معیار عمومی 2.0 درصد.

محاسبه

مسئله 10: حجم مرده ستون و زمان تعادل

داده‌ها ستون $4.6 \text{ mm} \times 150$ ، فلوریت 1.0 mL/min ؛ روش به 15 حجم ستون تعادل نیاز دارد.

$$V_M \approx 0.5 \times L \times d_c^2 = 0.5 \times 15 \times 0.46^2 \approx 1.59 \text{ mL}$$

$$t_{eq} = 15 \times 1.59 / 1.0 \approx 24 \text{ min}$$

پاسخ: حجم مرده حدود 1.6 میلی‌لیتر و زمان تعادل حدود 24 دقیقه. همین محاسبه نشان می‌دهد چرا t_M در این ستون با فلوریت 1.0 حدود 1.6 دقیقه است.

محاسبه

مسئله 11: اثر دما بر ریتنشن تایم

داده‌ها پیکی در 30 درجه سانتی‌گراد ریتنشن فاکتور 5.0 دارد. با فرض کاهش حدود 1.5 درصد k به ازای هر درجه افزایش دما، اگر دمای ستون بدون کنترل به 34 درجه برسد، k و t_R (با $t_M = 1.5 \text{ min}$) چقدر می‌شود؟

$$k_{34} \approx 5.0 \times (1 - 0.015)^4 \approx 4.71 \dots t_R: 1.5 \times (1 + 5.0) = 9.00 \rightarrow 1.5 \times (1 + 4.71) \approx 8.56 \text{ min}$$

پاسخ: ریتنشن تایم حدود 0.44 دقیقه (حدود 5 درصد) کاهش می‌یابد؛ این تغییر ممکن است از پنجره شناسایی پیک در CDS فراتر رود. کنترل دمای ستون برای روش‌های حساس ضروری است.

نکته کاربردی آزمایشگاه

در برگه‌های محاسبه، همه اعداد خام (وزن‌ها، حجم‌ها، خلوص، سطوح) و فرمول‌ها را به گونه‌ای ثبت کنید که بازبین بتواند نتیجه را به‌طور مستقل بازتولید کند. صفحات گسترده (Spreadsheet) مورد استفاده برای محاسبات GMP باید صحه‌گذاری شده، قفل و نسخه‌دار باشند.



پیوست الف

جدول عیب‌یابی سریع

Appendix A – Quick troubleshooting matrix

مشاهده	علل محتمل	آزمون تشخیصی	اقدام
فشار بالا	گرفتگی گارد ستون، فیلتر این‌لاین یا فریت ستون؛ رسوب بافر؛ ویسکوزیته بالا	حذف گام به گام ستون و گارد	تعویض مصرفی؛ فیلتر کردن نمونه؛ شستشوی نمک
فشار پایین	نشست؛ هوا در پمپ؛ چکولو معیوب؛ فلوریت اشتباه	بازرسی اتصالات؛ اندازه‌گیری حجمی فلو	سفت کردن یا تعویض اتصال؛ پرچ؛ سرویس چکولو
نوسان منظم فشار	حباب؛ چکولو؛ سیل فرسوده	مقایسه دوره نوسان با سیکل پیستون	دگازینگ و پرچ؛ تمیز کردن چکولو؛ تعویض سیل
نویز تصادفی بیس‌لاین	لامپ ضعیف؛ فلوسل آلوده؛ حباب	انرژی لامپ؛ نویز با فلو صفر	شستشوی فلوسل؛ تعویض لامپ؛ فشار برگشتی کم
نویز دوره‌ای	ضربان پمپ؛ اختلاط ناکافی (TFA)	وابستگی دوره به فلوریت	سرویس پمپ؛ میکسر بزرگ‌تر؛ متعادل کردن جذب حلال‌ها
دریفت بیس‌لاین	تعادل ناکافی؛ دما؛ اختلاف جذب A و B	پایش بیس‌لاین بدون تزریق	افزایش زمان تعادل؛ کنترل دما؛ هم‌ارز کردن افزودنی‌ها
گوست پیک	آب یا افزودنی آلوده؛ کری‌اوور؛ پیک دیررس	گرادیان بدون تزریق؛ بلانک پس از استاندارد غلیظ؛ افزایش زمان آنالیز	آب تازه؛ حلال شستشوی نیدل مؤثر؛ مرحله شستشو
تیلینگ فقط بازها	سیلانول‌ها؛ pH نامناسب؛ ظرفیت بافری کم	تزریق ترکیب خنثی	pH پایین‌تر یا غلظت بافر بیشتر در محدوده مجاز؛ ستون نوع B
تیلینگ همه پیک‌ها	حجم مرده؛ فضای خالی سر ستون؛ فریت	بازبینی اتصالات؛ آزمون با ستون دیگر	اصلاح اتصال؛ تعویض ستون
فرانتینگ	اورلود جرمی یا حجمی؛ دایلوئنت قوی	کاهش غلظت یا حجم تزریق	تطبیق دایلوئنت؛ کاهش بار
پیک دوشاخه (همه پیک‌ها)	فریت نیمه‌مسدود؛ فضای خالی بستر	تعویض گارد؛ ستون جایگزین	تعویض ستون
پیک دوشاخه (پیک‌های ابتدایی)	دایلوئنت قوی؛ حجم تزریق زیاد	کاهش حجم تزریق	دایلوئنت ضعیف‌تر
پیک‌های پهن	حجم خارج از ستون؛ ثابت زمانی بالا؛ ستون فرسوده	بررسی تنظیمات دتکتور و تیوبینگ	کاهش حجم‌ها؛ تنظیم سرعت داده؛ تعویض ستون
تغییر تناسبی ریتنشن همه پیک‌ها و t_0	فلوریت (نشست، پمپ، تنظیم)	اندازه‌گیری حجمی فلو	رفع نشست؛ سرویس پمپ



مشاهده	علل محتمل	آزمون تشخیصی	اقدام
تغییر نامتناسب ریتشن پیک‌ها	ترکیب یا pH فاز متحرک؛ دما؛ ستون	سوابق آماده‌سازی؛ فاز متحرک تازه	آماده‌سازی مجدد؛ کنترل دما
دریافت ریتشن در تزریق‌های ابتدایی	تعادل ناکافی (جفت‌یون، HILIC)	روند ریتشن تایم در تزریق‌های متوالی	تعادل طولانی‌تر؛ ستون اختصاصی
افت ناگهانی ریتشن در فاز آبی بالا	دی‌وتینگ ستون C18	شستشو با حلال آلی و تعادل مجدد	ستون AQ؛ پرهیز از توقف فلو
RSD سطح بالا	حباب، حجم کم ویال، سپتوم، نیدل، تبخیر	تکرار با ویال پر و حلال ساده	اصلاح حجم و ارتفاع نیدل؛ سپتوم نو؛ کنترل دمای سینی
کاهش تدریجی پاسخ	ناپایداری محلول؛ جذب به ویال	تزریق مجدد محلول اول در پایان	سرمایش سینی؛ ویال کهربایی؛ داده پایداری
بازیابی پایین	استخراج ناقص؛ جذب به فیلتر	مقایسه سانتریفیوژ و فیلتر؛ زمان استخراج	فیلتر صحنه‌گذاری شده؛ بهینه‌سازی استخراج
غیرخطی بودن در غلظت بالا	اشباع دتکتور؛ اورلود ستون	بررسی جذب پیک (AU)	کاهش غلظت یا حجم
ناکامی رزولوشن پس از انتقال روش	حجم تأخیر؛ حجم خارج از ستون؛ دمای فاز متحرک	اندازه‌گیری حجم تأخیر دو دستگاه	تنظیم نگهداری اولیه گرادیان در محدوده مجاز



پیوست ب

پرسش‌های ارزیابی همراه با پاسخ

Appendix B – Assessment questions with answers

1. چرا ریتنشن فاکتور (k) برای مقایسه شرایط مختلف از ریتنشن تایم مناسب‌تر است؟

زیرا k مستقل از فلوریت و ابعاد ستون است و فقط به توزیع آنالیت میان دو فاز وابسته است.

2. مؤثرترین متغیر برای افزایش رزولوشن یک جفت بحرانی کدام است و چرا؟

سلکتیویته (α)؛ زیرا افزایش N رزولوشن را فقط با جذر N بهبود می‌دهد، در حالی که تغییر کوچک α اثر بسیار بزرگ‌تری دارد.

3. دو برابر کردن طول ستون، رزولوشن را چقدر تغییر می‌دهد؟

حدود 41 درصد ($2\sqrt{}$)، با دو برابر شدن زمان آنالیز و فشار.

4. تیلینگ فاکتور در چه ارتفاعی از پیک محاسبه می‌شود و مقدار 1.0 چه معنایی دارد؟

در 5 درصد ارتفاع پیک؛ مقدار 1.0 به معنای تقارن کامل است.

5. اگر فقط پیک‌های بازی تیلینگ‌دار شوند، علت محتمل چیست؟

برهم‌کنش ثانویه با سیلانول‌های یونیزه یا ناخالصی‌های فلزی فاز ساکن؛ یعنی علت شیمیایی و نه فیزیکی.

6. حجم تأخیر چیست و در کدام نوع روش اهمیت دارد؟

حجم مسیر از نقطه اختلاط حلال‌ها تا ورودی ستون؛ در روش‌های گرادیانی، به ویژه برای پیک‌های ابتدای گرادیان.

7. چرا pH بخش آبی فاز متحرک باید پیش از افزودن حلال آلی اندازه‌گیری شود؟

زیرا pH ظاهری مخلوط آبی-آلی با pH آبی قابل مقایسه نیست و کالیبراسیون الکتروود برای محیط آبی است؛ اندازه‌گیری پس از افزودن آلی تکرارپذیری روش را از بین می‌برد.

8. قاعده انتخاب pH برای مقاومت روش نسبت به آنالیت‌های یونیزه‌شونده چیست؟

انتخاب pH حدود 1.5 تا 2 واحد دور از pKa آنالیت‌ها، با بافری که pKa آن حدود 1 واحد از pH مطلوب فاصله دارد.

9. چرا تزریق نمونه در متانول خالص در روشی با 20 درصد استونیتریل مشکل‌ساز است؟

دایلوئنت قوی‌تر از فاز متحرک است؛ آنالیت‌های کم‌ریتنشن پیش از تمرکز در ابتدای ستون جابه‌جا می‌شوند و پیک‌های ابتدایی پهن یا دوشاخه می‌شوند.



10. نشانه تشخیصی یک پیک دیررس از تزریق قبلی چیست؟

پهنای بسیار بیشتر از پیک‌های با ریتنشن تایم مشابه، و ظهور نامنظم آن در تزریق‌های متوالی.

11. آزمون سه مرحله‌ای تشخیص منشأ گوشت پیک را شرح دهید.

گرددان بدون تزریق (فاز متحرک یا سیستم)، تزریق دایلوئنت از ویال تازه (ویال، دایلوئنت یا مسیر تزریق) و بلانک پس از استاندارد غلیظ (کری‌اوور).

12. اگر همه پیک‌ها و زمان مرده با یک نسبت به تأخیر بیفتند، علت چیست؟

کاهش فلوریت واقعی؛ مانند نشت، هوا در پمپ یا تنظیم نادرست.

13. طبق Ph. Eur.، حداکثر RSD% مجاز برای 6 تزریق وقتی $B = 2.0$ باشد چقدر است؟

0.85 درصد.

14. نسبت سیگنال به نویز چگونه محاسبه می‌شود؟

$S/N = 2H/h$ که H ارتفاع پیک و h دامنه نویز در پنجره‌ای حداقل به پهنای 5 برابر پهنای پیک در نیمه ارتفاع است.

15. آیا تغییر طول موج دکتور در یک روش فارماکوپه‌ای جزء تنظیمات مجاز است؟

خیر؛ تغییر طول موج مجاز نیست و فقط خطای در حد دقت دکتور پذیرفته است.

16. محدوده مجاز تغییر pH بخش آبی در تنظیمات فصل عمومی هماهنگ‌شده چقدر است؟

± 0.2 واحد pH.

17. چرا نتیجه «پیک خالص» در DAD اثبات قطعی اختصاصی بودن نیست؟

زیرا ناخالصی با طیف بسیار مشابه، غلظت بسیار کم یا کوالویشن کامل ممکن است تشخیص داده نشود؛ ارزیابی متعامد (ستون دیگر یا MS) لازم است.

18. چه زمانی دی‌وتینگ ستون C18 رخ می‌دهد و چگونه برطرف می‌شود؟

با فاز متحرک تقریباً کاملاً آبی، به ویژه پس از توقف فلو؛ با شستشو با درصد بالای حلال آلی و تعادل مجدد.

19. چرا ستون را نباید مستقیماً از بافر فسفات به استونیتریل خالص منتقل کرد؟

خطر رسوب نمک در منافذ ستون، فریت و تیوبینگ و در نتیجه گرفتگی و افزایش فشار.

20. تفاوت کوالیفیکیشن دستگاه و سیستم سوتیبیلیتی چیست؟

کوالیفیکیشن مناسب بودن دستگاه برای کاربرد را در طول زمان اثبات می‌کند؛ سیستم سوتیبیلیتی عملکرد کل سیستم را در همان آزمون و همان روز تأیید می‌کند. هیچ یک جایگزین دیگری نیست.



21. آیا انتگرال‌گیری دستی مجاز است؟

بله، با شرایط تعریف‌شده در SOP، ثبت دلیل علمی پیش از اصلاح، حفظ نسخه اولیه و بازبینی مستقل؛ استفاده از آن برای رساندن نتیجه به محدوده مشخصات مجاز نیست.

22. چرا تزریق نمونه پیش از شروع رسمی سکانس (تزریق آزمایشی) نقض یکپارچگی داده محسوب می‌شود؟

چون امکان «آزمودن» نتیجه و انتخاب داده را فراهم می‌کند؛ آماده‌سازی سیستم فقط باید با محلول‌های تعریف‌شده در روش انجام شود و همه تزریق‌ها ثبت و حفظ شوند.

23. اگر RRF یک ناخالصی 1.30 باشد و اصلاح نشود، نتیجه چه تغییری می‌کند؟

حدود 30 درصد بیش‌برآورد؛ مثلاً 0.15 درصد به جای 0.115 درصد.

24. نشانه آب‌گیر بودن نیدل در حالت حجم کم ویال در داده‌های SST چیست؟

چند تزریق با سطح به‌طور قابل توجهی کمتر در میان تزریق‌های طبیعی (الگوی پراکنده، نه روند).

25. حجم مرده تقریبی ستون 150×4.6 میلی‌متر چقدر است؟

حدود 1.6 میلی‌لیتر ($V_M \approx 0.5 \cdot L \cdot d_c^2$ با واحد سانتی‌متر).





پیوست ج

واژه نامه فارسی-انگلیسی

Appendix C – Glossary

فارسی	English	فارسی	English
ریتنشن تایم	Retention time	ریتنشن فاکتور	Retention factor (k)
سلکتیویته	Selectivity (α)	رزولوشن	Resolution (Rs)
پلیت تئوری	Theoretical plate (N)	ارتفاع معادل پلیت تئوری	HETP (H)
تیلینگ فاکتور	Tailing factor (T)	ضریب تقارن	Symmetry factor (As)
فرانتینگ	Fronting	کوالوشن	Co-elution
زمان مرده	Hold-up time (t_M)	حجم مرده	Hold-up / dead volume
حجم تأخیر	Dwell volume	حجم خارج از ستون	Extra-column volume
الوشن ایزوکراتیک	Isocratic elution	الوشن گرادینتی	Gradient elution
فاز معکوس	Reversed phase	فاز نرمال	Normal phase
اندکپینگ	End-capping	سیلانول	Silanol
ذرات با پوسته متخلخل	Superficially porous particles	ذرات کاملاً متخلخل	Fully porous particles
گارد ستون	Guard column	فیلتر این لاین	In-line filter
دی ویتینگ	Pore dewetting	پخش گردابی	Eddy diffusion
چک ولو	Check valve	سیل پیستون	Piston seal
دمپر	Pulse damper	ولو تناسب ساز	Proportioning valve
دگازر	Degasser	اتوسمپلر	Autosampler
لوپ نمونه	Sample loop	کری اوور	Carryover
دتکتور	Detector	فلوسل	Flow cell
دتکتور آرایه دیودی	Diode array detector	پیوریته پیک	Peak purity
پهنای باند	Bandwidth	ثابت زمانی	Time constant
بیس لاین	Baseline	دریفت	Drift
گوست پیک	Ghost peak	نسبت سیگنال به نویز	Signal-to-noise ratio
نسبت قله به دره	Peak-to-valley ratio	ضریب پاسخ نسبی	Relative response factor
سیستم سوتیبیلیته	System suitability	تنظیمات مجاز	Allowable adjustments
دایلوئنت	Diluent	اورلود	Overload



فارسی	English	فارسی	English
جفت یون	Ion pairing	تعادلیابی	Equilibration
تخریب اجباری	Forced degradation	موازنه جرم	Mass balance
گستره کاری	Working range	نتیجه قابل گزارش	Reportable result
پروفایل هدف روش	Analytical target profile	انتقال روش	Method transfer
کوالیفیکیشن دستگاه	Analytical instrument qualification	آدیت تریل	Audit trail
انتگرال گیری دستی	Manual integration	نتیجه خارج از مشخصات	Out of specification (OOS)





پیوست د

منابع و مطالعه بیشتر

Appendix D – References and further reading

کتابهای مرجع

1. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. Wiley, 2010.
2. Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed. Wiley, 1997.
3. Dolan J.W., Snyder L.R. *Troubleshooting LC Systems*. Humana Press, 1989.
4. Meyer V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed. Wiley, 2010.
5. Kazakevich Y., LoBrutto R. (eds.) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley, 2007.
6. Dong M.W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*, 2nd ed. Wiley, 2019.
7. Neue U.D. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. Wiley-VCH, 1997.
8. McMaster M.C. *HPLC: A Practical User's Guide*, 2nd ed. Wiley, 2007.

مقالات کلیدی

1. van Deemter J.J., Zuiderweg F.J., Klinkenberg A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
2. Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 77–116.
3. McCalley D.V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858–880.
4. Gritti F., Guiochon G. The van Deemter equation: assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 1–13.
5. Dolan J.W. Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 195–205.
6. Dolan J.W. *LC Troubleshooting* (column series). LCGC North America.

فارماکوپه‌ها و گایدلاین‌ها

1. USP General Chapter <621> Chromatography (harmonized text).
2. Ph. Eur. 2.2.46 Chromatographic separation techniques; 2.2.29 Liquid chromatography.
3. USP General Chapters <1058> Analytical Instrument Qualification; <1220> Analytical Procedure Life Cycle; <1224> Transfer of Analytical Procedures; <1225> Validation of Compendial Procedures; <1226> Verification of Compendial Procedures.
4. ICH Q2(R2) Validation of Analytical Procedures (2023); ICH Q14 Analytical Procedure Development (2023).



5. ICH Q3A(R2) Impurities in New Drug Substances; ICH Q3B(R2) Impurities in New Drug Products.
6. US FDA. Data Integrity and Compliance With Drug CGMP — Questions and Answers. Guidance for Industry, 2018.
7. US FDA. Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production. Guidance for Industry, 2006 (rev. 2022).
8. MHRA. GXP Data Integrity Guidance and Definitions, 2018; PIC/S PI 041-1 Good Practices for Data Management and Integrity in Regulated GMP/GDP Environments, 2021.

یادداشت: کادرهای «از منابع مرجع» خلاصه و بازنویسی مفاهیم منابع فوق‌اند و نقل‌قول مستقیم محسوب نمی‌شوند. همه شکل‌ها برای این هندبوک ترسیم شده‌اند و داده‌های آن‌ها نمایشی است. در تصمیم‌های رسمی، متن نسخه جاری فارماکوپه‌ها و گایدلاین‌ها ملاک است.

PharmaVault – گنجینه اطلاعات داروسازی

هر هفته یک هندبوک تخصصی رایگان · pharmavault.ir

