

HPLC sistemlerinde kontaminasyon riskleri; sisteme ve analiz sonuçlarına yansımaları

HPLC sistemleri analitik cihazlar içerisinde belki de en komplike ve kontaminasyon riski en fazla olan sistemlerdir. Bu yüzden kontaminasyon riski oluşturabilecek bütün faktörler detaylı bir şekilde değerlendirilip önlem alınmalıdır.



Serhat KÖSTERELİ
Elektrik-Elektronik Mühendisi
Ant Teknik Servis Müdürü

Analitik sistemlerde yapılan analizlerin güvenilirliğini sağlamak en önde gelen konulardan biridir. Alınan sonuçların doğruluğunu teyit etmek adına bütün etken faktörler teker teker değerlendirilmelidir. HPLC sistemleri analitik cihazlar içerisinde belki de en komplike ve kontaminasyon riski en fazla olan sistemlerdir. Bu yüzden kontaminasyon riski oluşturabilecek bütün faktörler detaylı bir şekilde değerlendirilip önlem alınmalıdır. Kontaminasyon için risk oluşturan faktörler;

Mobil fazda kullanılan su ve solventlerden gelen safsızlıklar:
Kullanılan mobil fazın içindeki su ve solventlerden gelen safsızlıklar,

analiz esnasında özellikle UV dedektörlü sistemlerde yüksek background oluşturarak sonuçların doğruluğunu direkt olarak etkiler. Bu safsızlıklar öncelikle baseline'daki dalgalanmaları artırarak sistemin stabil olmasını engellerler. Alınan sonuçlarda hayalet pik diye tanımladığımız numuneden veya standarttan bağımsız mobil fazdan kaynaklanan ve istenmeyen pikler elde edilebilir.

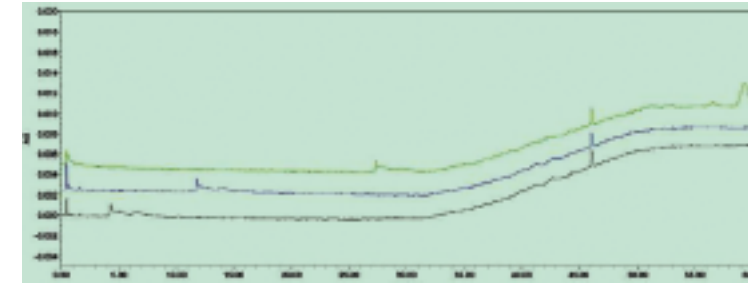
Su, bir laboratuvarında kullanılan en önemli hammaddedir. HPLC analizlerinde de en sık karşılaşılan hata kaynağı, mobil fazın hazırlanmasında kullanılan sudan gelen safsızlıklardır. Su organik ve inorganik maddeler, iyonik ve non-iyonik maddeler ile UV absorbent ve floresan maddeler içerebilmektedir. Sudan gelen safsızlıklar baseline kaymalarına ve hayalet piklere neden olabilmektedir.

Yine düşük kalitede su kullanımı sisteme veya ayırımı gerçekleştiren kolona ciddi zararlara yol açmaktadır. Düşük kalitedeki su, sodyum, kalsiyum, fosfor iyonları veya organik maddeler içerebilir. Kullanımı sonucunda akış yolu üzerindeki malzemelerin tıkanması; check valflerin hassasiyetinin azalması; kolonun tıkanarak cihazın yüksek basınçlara çıkması gibi problemler ile karşılaşılabilir.

Yaşanan bu problemlerin sonucu olarak alıkonma zamanlarındaki farklılıklar ve pik şekillerinin bozukluğu hemen göze çarpmaktadır. Tüm bu problemlerin minimuma indirilmesi açısından, HPLC analizlerinde, laboratuvarında elde edilen ultra saf su (ters ozmoz, iyon exchange membrane, membrane filtrasyon, UV radyasyon vb. işlem görmüş su) veya ticari olarak 'HPLC derecesinde su' adı altında satılan su kullanılması son derece önemlidir. Sağlıklı sonuçlar için, ayrıca mobil faz solventlerinin kalitesi de son derece önemlidir. Örnek olarak en sık kullanılan mobil faz solventlerinden olan asetonitril düşük kalitede olduğunda, propionitril ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$) içerebilir ve bunun so-



SHIMADZU Nexera Yeni Nesil UHPLC Sistemi



Mobil Faz içerisindeki Çözünmemiş Hava Kabarcıklarının Kromatogramı Hayalet Pikler Olarak Yansıması

nuçları yüksek background olarak alınır. Bu sebeplerden ötürü HPLC sistemlerinde kullanılan organik solventlerin de mutlak suretle HPLC derecesinde olması gerekmektedir.

Mobil fazda kullanılan su ve solventlerin safsızlığının yedek parçalar üzerindeki etkisine değinilecek olursa; öncelikli olarak akış yolu üzerindeki check valfler kirlenerek solvent akışını sağlayan pompa ünitesinin performansını düşürür ve akış kararlılığını bozar. Bunun sonucunda ise alıkonma zamanların da tutarsızlıklar ile karşılaşılabilir. Aynı zamanda mobil fazdaki kirlilikler kullanılan kolona ve dedektörün cell ünitesine de zarar verebilirler.

Mobil fazdaki çözünmüş O_2 ve CO_2 :

UV Dedektör üzerindeki etkisi:
Degaze edilmemiş bir solvent kullanımı halinde mutlaka birtakım problemler ile karşılaşılabilir. Bunların başında, özellikle UV dedektör kullanılarak yapılan analizlerde, mobil fazdaki çözünmüş oksijenden kaynaklı yüksek background gelmektedir.



Şırınga Ucu Filtreler



HPLC Sistemlerinde kullanılan Degazer Ünitesi



Emiş Filtreleri

Emiş (Suction) filtresi:

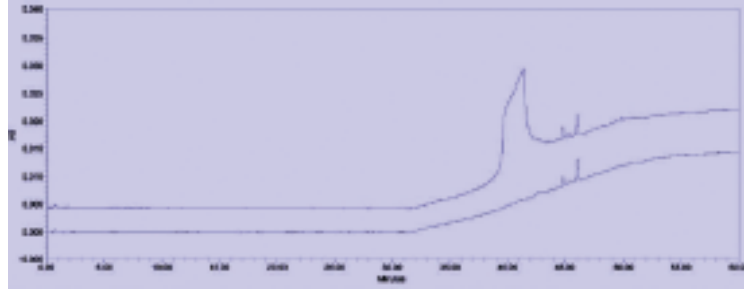
Mobil faz şişesinin içerisinde bulunan ve organik solventler ile direkt temas eden emiş filtrelerinin bakımı ve belirli periyotlar ile değiştirilmesi oldukça önemlidir. Çünkü kullanım ömrünü tamamlamış bu filtreler direkt olarak mobil fazı kontamine eder. Uzun süre temizlenmeyen emiş filtreleri zaman ile paslanabilir. Paslanmış emiş filtresinden çıkan metal iyonları sistemde gürültüye sebebiyet verir.

Özellikle LC-MS sistemlerinde ve iyon kromatografisi sistemlerinde hassasiyetin azalmasına neden olur. Bu sistemlerde seramik emiş filtresi kullanılmamalıdır.

Bazı tampon çözeltiler ise üreme yapmaya oldukça müsaittir. Özellikle amino asit analizlerinde üreme yapan mobil fazın etkisi çözünmüş materyalleri dedekte ederek analiz sonuçlarını negatif bir şekilde etkilenmesi ile görülür.

Numune:

Numune içerisindeki çözünmemiş partiküller akış yolundaki hatlardan birini, otomatik örnekleyici çıkışındaki tubing veya kolonu tıkar. Bu tıkanıklık sistemde yüksek basınçla sebep olarak analiz sonuçlarının doğruluğunu etkiler. Bu tıkanıklık bazı durumlarda cihazda çok yüksek



Filtre edilmiş Asetonitril ve filtre edilmemiş Asetonitril arasındaki farklılığın kromatogramdaki görüntüsü



basıncın oluşması ile sistemin durmasına yol açar. Bu yüzden hazırlanan numuneler mutlaka mobil fazlar gibi filtre edilip süzülmalıdır. Bazı özel durumlarda -numune miktarının çok az olması gibi- numune filtre edilemez. Hat içi filtreler kullanarak bu sorun çözülmeye çalışılabilir.

Cam malzemeler:

Laboratuvarlarda kullanılan cam malzemelerin temizlenmesinde kullanılan deterjan bu malzemelerin

üzerinde kalabilir. Camın üzerinde kalan deterjan özellikle MS analizlerinde sinyal olarak -örnek olarak etilen glikol sinyali olarak- görülebilir. Bu yüzden cam malzemelerin temizliğine çok önem verilmelidir. Akabinde temizlik validasyonunu yaparak kullanılan malzemelerin güvenilirliğini arttırmak gerekmektedir.

Çevresel faktörler:

Ortamda bulunan toz ve kirlilik HPLC modüllerinden özellikle de-

dedektör ünitesine ciddi zararlar verebilir. Dedektörün optik sisteminde bulunan aynalar kontamine olarak hassasiyeti azaltacaktır. Dedektör enerjisinin azalması sonucunda, dedektör modülü ilk açıldığında enerji testini geçmeyecek ve cihaz açılmayacaktır. Bu yüzden laboratuvar havalandırma sistemi çok iyi hava sirkülasyonunun sağlandığı ve ortam sıcaklığını stabil tutabilen bir sistem olmalıdır.

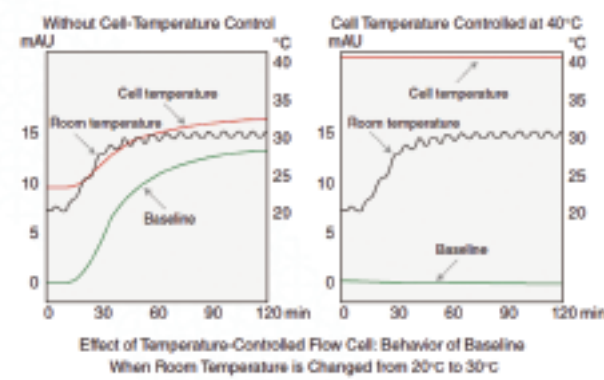
Ortam sıcaklığından öte cihaz içerisindeki sıcaklık değişiklikleri de sistem içerisindeki bazı malzemelerin kontamine olarak analiz sonuçlarının doğruluğunu etkiler.

Örnek verilecek olursa; 40°C kolon fırını sıcaklığı uygulanan bir analizde; kolon içerisinde 40°C sabit sıcaklıkta hareket eden mobil faz kolondan sonra direk olarak oda sıcaklığındaki dedektör hücresine giderek kullanılan mobil fazın buharlaşmasına yol açar.

Buharlaşan mobil faz dedektör içerisindeki materyallerin üzerine yapışarak bu materyallerin zamanla bozulmasına yol açar. Dedektör optik sistemi de doğal olarak zarar görür.

Sadece Shimadzu sistemlerinde olan sıcaklık kontrollü dedektörlerde; dedektör hücre sıcaklığını kolon fırını sıcaklığı ile eşleştirerek mobil fazın farklı sıcaklıklara girmesini engelleyerek yapılan analizin doğruluğundan emin olunur.

Aynı zamanda dedektör optik sisteminde bulunan malzemelerin ve hücre içerisindeki lenslerin ömrünü uzatır. □



Sıcaklık kontrollü akış hücresinde oda sıcaklığının 20°C'den 30°C'ye çıkması durumunda baseline'ın tepkisi