

Der HPLC-Tipp im Mai

## **Das Totvolumen: Wie kritisch ist es wirklich? Und: Ist ein solches „schlimmer“ vor oder nach der Säule?**

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

### **Der Fall**

Totvolumen ist das Volumen der Apparatur außerhalb der Säule in dem die Probe sich befindet; also, das Volumen vom Probengeber bis einschließlich Detektor – eben ohne Säule. Wir haben an dieser Stelle uns bereits mit dem Thema beschäftigt. Dennoch wird jenes insbesondere im Kontext mit Miniaturisierung und UHPLC weiterhin intensiv diskutiert, deswegen möchte ich es erneut aufgreifen. Wie wichtig, wie „schlimm“ ist das Totvolumen nun tatsächlich?

### **Die Lösung**

Heute möchte ich wenig schreiben, dafür umso mehr Bilder zeigen.

Merke direkt folgendes, was gleichzeitig bereits als Fazit der ganzen Diskussion gelten kann:

Das Totvolumen ist wirklich wichtig nur bei früh eluierenden Peaks **und** isokratischen Trennungen **und** folgenden Säulendaten:  $\leq 50$  mm, 2,1 mm,  $\leq 2-3$   $\mu\text{m}$ .

Kommen wir direkt zu einigen Beispielen: In Abb. 1 wird eine isokratische Trennung mit einer 125 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ -Säule (links) und einer 50 mm, 2,1  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$ -Säule (rechts) gezeigt. Der Fluss bei der langen Säule wurde bewusst ungünstig gewählt (rechts vom Minimum der Van-Deemter Gleichung), bei der Kurzen umgekehrt optimal – trotzdem: Das Totvolumen der Apparatur ist zu groß im Vergleich zum Säulenvolumen der kurzen Säule, Ergebnis, dort breite Peaks.

Abb. 1

Abb. 1 Peakform von früh eluierenden Peaks an langen und kurzen Säulen, Ursache hier: großes Totvolumen der Apparatur, Details, s. Text

Abb. 2 zeigt eine Gradiententrennung an der gleichen Apparatur mit der kurzen Säule, die sehr gute Peakform bedarf keines weiteren Kommentars: Totvolumina stören bei Gradiententrennungen kaum.

Abb. 2

Abb. 2 Peakform an einer kurzen Säule, im Gradientenmodus betrieben, Details, s. Text

Abb. 3 stellt ein Beispiel von Agilent dar: Das obere Chromatogramm ist aufgenommen an einer „üblichen“ 1290-Anlage (Totvolumen: 9,7 µl), unten nach Verwendung eines Optimierungskits (Totvolumen nun: 3,9 µl). Bei den Peaks, die früher als ca. 1 min eluieren, ist ein Unterschied in der Peakbreite schon merklich, ab 1 min kaum, d. h.: Ein Optimierungskit „bringt“ für Trennungen, bei denen die Peaks später als ca. 1 min eluieren, kaum eine nennenswerte Verbesserung.

Abb. 3

Abb. 3 Einfluss eines Optimierungskits zur Reduktion von Totvolumina bei früh und spät eluierenden Peaks, Details, s. Text

Abb. 4 zeigt ein sehr schönes Beispiel von Monika Dittmann, entnommen aus (1): Ein Totvolumen macht eine isokratische Trennung von vielen, früh eluierenden Peaks an einer Säule mit einem sehr kleinen Volumen zunichte (oberes Chromatogramm, „A“). Im Falle eines Gradientenlaufs lässt die Peakform – trotz des Totvolumens – kaum zu wünschen übrig (mittleres Chromatogramm, „B“). Die Eliminierung des Totvolumens führt schließlich auch unter isokratischen Bedingungen zu einer zufriedenstellenden Peakform (unteres Chromatogramm, „C“). Merke: Führst Du (auch) isokratische Trennungen unter Bedingungen wie hier beschrieben durch? In diesem Fall bestünde dringendster Handlungsbedarf: Optimiere Deine Anlage, wenn Du auch bei früh eluierenden Peaks eine gute Peakform möchtest!

Abb. 4

Abb. 4 Zum Einfluss von Totvolumina im Falle von isokratischen bzw. Gradiententrennungen, Details, s. Text

Im letzten Beispiel (Abb. 5) wurden zwei kontraproduktive Parameter gewählt, die additiv zu einander stehen und sich dadurch noch negativer bemerkbar machen: Einerseits ein „riesiges“ Totvolumen der Apparatur von 120 µl und andererseits ein „winziges“ Säulenvolumen von ca. 250 µl. Trotzdem ist die Peakform bei Gradientenläufen OK, s. dazu das untere, gezoomte Chromatogramm eines 2-Min-Gradientenlaufs. Vereinfacht gesagt: Es ist „schwierig“, bei Gradiententrennungen keine gute Peakform zu bekommen...

Abb. 5

Abb. 5 Kleinvolumige Säulen liefern auch bei kurzen Gradienten Peaks mit einer guten Peakform, Details, s. Text

Nun, zum letzten Aspekt: Ein Totvolumen nach der Säule – nachdem ja die Trennung bereits erfolgt ist – ist kritischer als vor der Säule, s. dazu ein Beispiel von Frank Steiner, Abb. 6: Ein um Faktor 2 größeres Zellvolumen führt zu einer merklichen Verschlechterung der Auflösung.

## Abb. 6

Abb. Einfluss eines größeren Volumens nach der Säule auf die Auflösung, Details, s. Text

### **Das Fazit**

Ich kann nur das am Anfang Gesagte wiederholen: Verschwende im Falle von Gradienten bzgl. Totvolumina keine Gedanken. Führst Du dagegen anspruchsvolle isokratische Trennungen durch, d. h. Trennungen mit „vielen“, sehr früh eluierenden, evtl. noch dazu kleinen Peaks an kurzen/dünnen Säulen mit  $\leq$  ca. 2  $\mu\text{m}$ -Teilchen? Es besteht wahrscheinlich dringender Handlungsbedarf, denn: bei jeder kommerziellen, auch modernsten HPLC/UHPLC-Anlage ergibt sich ohne Hardwareoptimierung in solchen Fällen ein Effizienzverlust von ca. 30-40%! Das geben übrigens die Geräte-Hersteller (jedenfalls einige...) offen zu.

- (1) Monika Dittmann, „Das Problem der externen Bandenverbreiterung in einer HPLC/UHPLC-Anlage“ in Stavros Kromidas (Hrsg.) „Der HPLC-Experte II – so nutze ich meine HPLC/UHPLC optimal!“, Wiley-VCH Verlag, 2015