HPLC-Tipp Nr. 22

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

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 uns bereits im Tipp Nr. 21 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

Im hiesigen Tipp 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 nur bei früh eluierenden Peaks ***und*** isokratischen Trennungen ***und*** folgenden Säulendaten: ≤ 50 mm, 2,1 mm, ≤ 2-3 µm wirklich wichtig.

Kommen wir direkt zu einigen Beispielen: In Abbildung 22.1 wird eine isokratische Trennung an einer 125 x 4 mm, 5 µm-Säule (links) und einer 50 mm, 2,1 µm, 1,9 µm-Säule (rechts), identisches Material, 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.

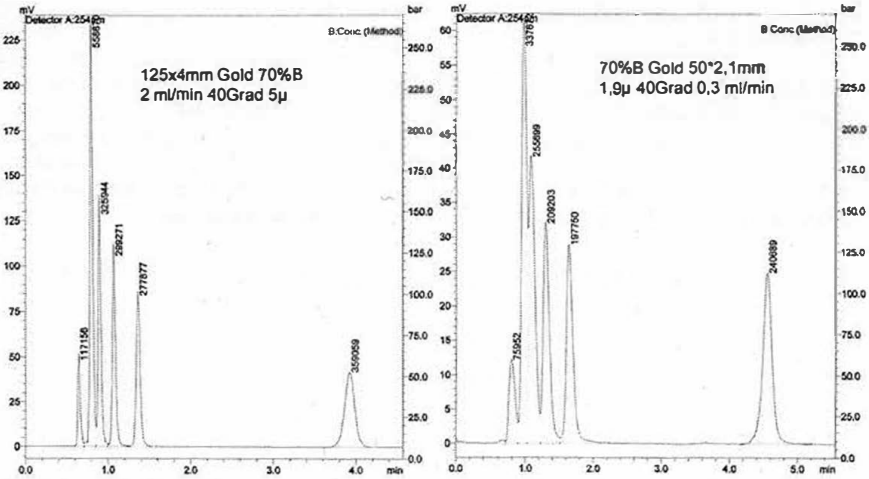

Abbildung 22.1 Peakform von früh eluierenden Peaks an langen und kurzen Säulen, Ursache hier: großes Totvolumen der Apparatur, Details, siehe Text

Abbildung 22.2 zeigt eine Gradiententrennung an der gleichen Apparatur mit der kurzen Säule, die sehr gute Peakform bedarf keines weiteren Kommentars: Totvolumina stören bei Gradiententrennungen kaum.

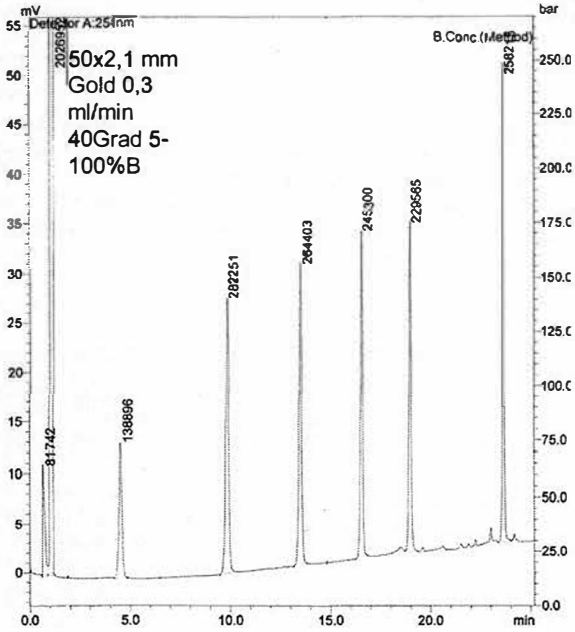

Abbildung 22.2 Peakform an einer kurzen Säule im Gradientenmodus gefahren, Details, siehe Text

Abbildung 22.3 stellt ein Beispiel von Agilent dar: Das obere Chromatogramm ist aufgenommen an einer „üblichen" 1290 Infinity II-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.

Ultralow Dispersion

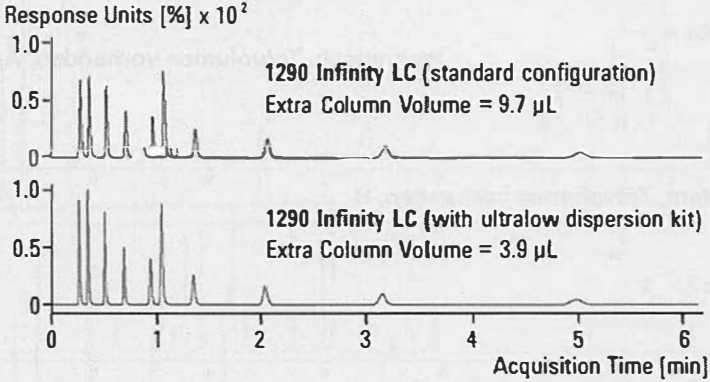

Abb. 22.3 Einfluss eines Optimierungskits zur Reduktion von Totvolumina bei früh und spät eluierenden Peaks, Details, siehe Text

Abbildung 22.4 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 dringendst Handlungsbedarf: Optimiere deine Anlage, wenn du auch bei früh eluirenden Peaks eine gute Peakform möchtest!