



VarioPrep Säulen

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können.

Mit der VarioPrep Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt erworben, das speziell für den Einsatz in der präparativen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie entwickelt wurde. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Entsprechend dem spezifischen Trennvermögen der gepackten stationären Phase, kann dieses Produkt zur präparativen Trennung zahlreicher Gemische eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der präparativen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Trennsystems, also präparative Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Trennbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Aufgabenstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service bzw. die technische Produktberatung.

Inhaltsübersicht

- Sicherheitshinweise
 - Beschreibung des VP Säulensystems
 - Installation
 - Vorsäulen
 - Probe
- Trennbedingungen
 - Detektion
 - Equilibrierung
 - Säulenaufbewahrung
- Behebung eines mögl. Totvolumens
 - Behebung möglicher weiterer Fehler
 - Wichtige Hinweise für das Öffnen
 - Zusammenfassung

Sicherheitshinweise

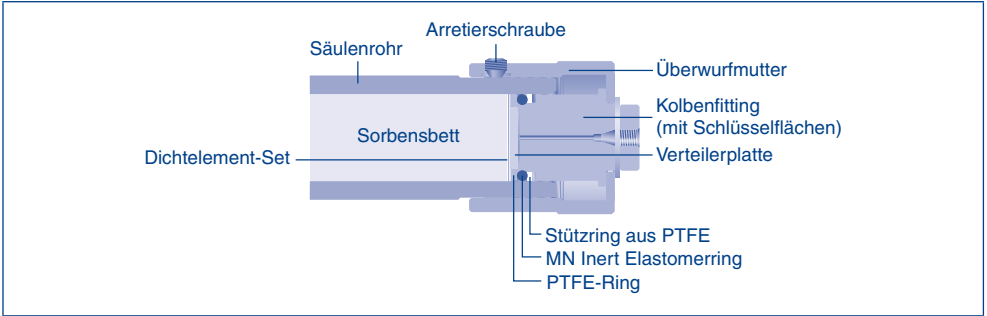
Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Mobilphasensysteme (z.B. Acetonitril oder Methanol) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z.B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (Beschädigen des Säulenbettes durch unsachkundiges Öffnen der Säule) Folgeschäden auftreten.

Beschreibung des VarioPrep Säulensystems

VarioPrep Säulen sind mit modifizierten oder unmodifizierten, sphärischen Kieselgelen (NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® etc.) gepackt. Detaillierte Informationen über diese stationäre Phase und zu deren Handhabung finden Sie auf www.mn-net.com, im MN Chromatographie-Katalog oder in den Gebrauchsanweisungen der entsprechenden analytischen Säulen.

Das Säulensystem der VarioPrep Säulen zeichnet sich durch die Möglichkeit der axialen Nachjustierung von beiden Endteilen (Endfittings) aus. Das erlaubt den einfachen und schnellen Ausgleich von Totvolumen, das nach einiger Betriebszeit am Säulenkopf entstehen kann, ohne die Säule öffnen zu müssen.

Aufbau des justierbaren Endfittings:



Bei der Entwicklung des VarioPrep Säulensystems wurde speziell darauf geachtet, nur höchstwertige, vollständig inerte Materialien einzusetzen. Das Dichtungssystem besteht aus einem MN Inert Elastomerring und Dichtringen aus PTFE. Die Verteilung des Flüssigkeitsstroms wird durch die Verteilerplatte erzielt. Die Fixierung der Kolbenfittings auf dem Sorbensbett wird durch die Überwurfmutter gewährleistet, die ihrerseits mittels der Arretierschraube gegen Verdrehen gesichert wird. Die Dichtung der Säule erfolgt durch Vorspannen des Elastomerringes; d.h. die Kraft, mit welcher die Überwurfmutter angezogen wird, hat keinen Effekt auf die Dichtigkeit des Systems. Diese Kraft hat aber direkten Einfluss auf den Druck, mit dem das Packungsmaterial in der Säule komprimiert wird. Die Überwurfmuttern werden demnach nur zur Fixierung der HPLC-Packung zwischen den VP Kolbenfittings verwendet. Zieht man sie zu stark an, kann die HPLC-Packung beschädigt werden!

Installation

Der Einbau der VarioPrep Säule sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Die Justierbarkeit beider Endfittings (Ausgleich von möglichem Totvolumen) erlaubt ein häufiges Spülen auch unter Flussumkehr. Die VP Säule wird mit gerädetypischen 1/16" Kapillaren und Verschraubungen angeschlossen. Konstruktionsbedingt sind bei der Montage der Kapillaran Anschlüsse die Kolbenfittings mit einem Maulschlüssel zu kontern, um eine Drehbewegung zu verhindern.

Vorsäulen

Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule sollten Vorsäulen verwendet werden. Die Filterelemente und das Sorbens der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Der Anschluss der Vorsäule an die Trennsäule erfolgt mittels Vorsäulenhalter (siehe hierzu www.mn-net.com oder MN Chromatographie-Katalog). Ein Wechsel der Vorsäule ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendruckes und/oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

Probe

Die Probe wird in der Regel im Eluenten gelöst und vor der Aufgabe auf die Säule durch die Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters (z. B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) gereinigt. Falls trotz Filtration noch trübe Proben in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Die aufzugebende Probenmenge kann durch Überladung der präparativen Säule erhöht werden, um so eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. Typische Probenmengen für RP-Phasen können der folgenden Up-scaling-Tabelle entnommen werden:

Up-scaling								
ID x Länge [mm]	4 x 250	8 x 250	10 x 250	16 x 250	21 x 250	32 x 250	40 x 250	50 x 250
Säulenvolumen [mL]	3	13	20	50	87	201	314	491
Linearer Scale-up Faktor	1	4	6,25	16	27,6	64	100	156,3
Typische Probenmenge* [mg]	0,02–2	0,08–8	0,13–13	0,3–35	0,6–60	1,3–130	2–210	3–350
Typischer Fluss [mL/min]	0,5–1,5	2–6	3–9	8–24	14–40	32–96	50–150	80–250
* bezogen auf RP-Material; die hier angegebenen Maximalmengen sind natürlich immer abhängig vom Trennproblem und der Probenzusammensetzung. In einigen Fällen kann schon die Hälfte dieser Angabe zu einer drastischen Überladung führen, in anderen Fällen führen die maximale oder sogar höhere Mengen durchaus noch zu akzeptablen Trennungen.								

Trennbedingungen (Eluent, Flussrate, Druck, Temperatur)

Die VP Säulen werden mit einem auf die stationäre Phase abgestimmten Eluenten ausgeliefert (siehe Säulenzertifikat). Als mobile Phase sollten nur die für die vorliegende Säule geeigneten Eluenten verwendet werden. Die Auswahl und Zusammensetzung des Eluenten sollte idealerweise durch eine vorherige analytische Methodenentwicklung festgelegt werden, sofern keine präparative Applikationsvorschrift vorliegt. (Informationen zur Eluentenauswahl finden sich in den Gebrauchsanweisungen der entsprechenden analytischen Säulen; siehe www.mn-net.com).

Die typische Flussrate ist u.a. durch den Innendurchmesser der Säule bestimmt (siehe Up-scaling-Tabelle). Sie beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Ferner ist sie durch den maximalen Säulenrückdruck begrenzt, der die in der Tabelle dargestellten Grenzwerte nicht überschreiten sollte.

		Maximaler Druck [bar]						
Kieselgel	Innendurchmesser [mm]:	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® bis 120 Å, NUCLEODEX		400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 300 Å		300	300	300	300	300	300	300
NUCLEOSIL® 500 Å		250	250	250	250	250	250	250
NUCLEOSIL® 1000 Å, 4000 Å		200	200	200	200	200	200	200
NUCLEOGEN®			200					
NUCLEOCEL		150	150	150				

Wir empfehlen den Rückdruck regelmäßig zu überprüfen. Wenn bei der Benutzung der Säule unter normalen Flussraten ein erhöhter Rückdruck resultiert, deutet dieses im Allgemeinen auf eine Verunreinigung des Packungsmaterials hin, die entfernt werden muss (siehe Behebung möglicher weiterer Fehler).

Die maximalen Säulentemperaturen sind ebenfalls durch die stationäre Phase festgelegt. Durch Variation der Temperatur wird die Retentionszeit, der Rückdruck und die Peakform beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

Detektion

Mit den päparativen Säulen können spektralphotometrische, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden.

Equilibrierung

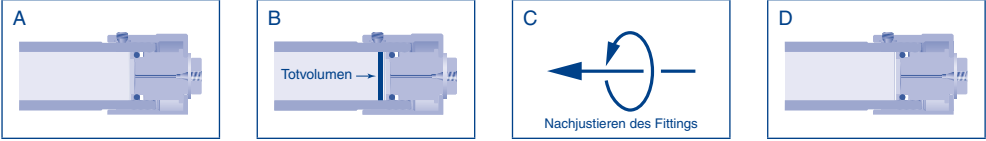
Bevor Proben injiziert werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden. Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist.

Säulenaufbewahrung

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent (siehe Säulenzertifikat) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten. Auch Methanol empfiehlt sich aufgrund möglicher Verunreinigung mit Metallionen (z. B. Eisen(III)) nicht für eine längere Lagerung. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit ca. 10 Säulenvolumina des Lagereluenten.

Behebung eines möglichen Totvolumens (VarioPrep Prinzip)

Durch eine spezielle Packtechnik werden VarioPrep Säulen mit einer hohen Packqualität und Packdichte gefertigt (A). Sollte sich dennoch durch starke chemische oder mechanische Beanspruchung des Säulenmaterials das Sorbensbett senken (B), kann durch Nachjustieren der Fittings (C; Drehen der Überwurfmutter im Uhrzeigersinn) das Totvolumen der Säule beseitigt werden (D).



Vorgehen für das Nachjustieren eines Kolbenfittings zur Beseitigung eines Totvolumens in der Säule (gemäß C):

1. Testen Sie die Säule mit einem Standard-Testgemisch (z. B. dem sog. „Aromatentest“).
2. Stellen Sie die HPLC-Pumpe ab → Säule muss druckfrei sein.
3. Entfernen Sie die Kapillaren.
4. Lösen Sie die Arretierschraube in der Überwurfmutter.
5. Drehen Sie die Überwurfmutter mit der Hand im Uhrzeigersinn, so lange, bis Sie einen geringen Widerstand spüren. Bitte achten Sie darauf, dass Sie nicht zu stark drehen!
6. Ziehen Sie die Arretierschraube wieder an und schließen Sie die Kapillare an. Kontern Sie dabei das Kolbenfiting mit einem Maulschlüssel, um eine Drehbewegung zu unterdrücken.
7. Überprüfen Sie die Qualität der VarioPrep Säule wiederum mit dem oben erwähnten Standard-Testgemisch. Wenn Sie zufrieden sind, können Sie mit Ihrer Arbeit fortfahren. Wenn Sie noch immer unzufrieden sind, wiederholen Sie die obige Prozedur solange, bis Sie entweder ein zufriedenstellendes Resultat erhalten oder das Ende der Verstellmöglichkeit dieser Säulen erreicht haben. (Vorsicht, nicht zu stark anziehen!)

Behebung möglicher weiterer Fehler (Säulenergenierung)

Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. VP Säulen, insbesondere auf Kieselgelbasis sind naturgemäß sehr robust und halten bei korrekter Pflege und Behandlung ihre Trennleistung über lange Zeiträume aufrecht. Durch das VarioPrep Prinzip kann die Lebensdauer darüber hinaus verlängert werden (siehe oben). Jedoch können Säulenausfälle auch auf eine Verunreinigung des Sorbensbettes zurückgeführt werden. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbehandlung verhindern meist diese Probleme. Sollte es dennoch zu einem Leistungsabfall kommen, so geben die phasenspezifischen Gebrauchsanweisungen der analytischen Säulen wichtige Hinweise zur Behebung möglicher Fehler und zur Säulenergenierung (siehe www.mn-net.com).

Wichtige Hinweise für das Öffnen der VarioPrep Säulen

Wird ein Wechsel der Dichtelemente (z. B. wegen Verunreinigung) und/oder der Dichtringe (z. B. wegen Undichtigkeit) notwendig, so sollten folgende Hinweise für ein sachgemäßes Öffnen der VP Säulen beachtet werden:

1. Testen Sie die Säule mit einem Standard-Testgemisch vor dem Öffnen.
 2. Entfernen Sie die Kapillaren.
 3. Bewegen Sie den Kolbenfiting nur vorsichtig. Sitzt er fest, so füllen Sie die Spalte zwischen Kolbenfiting und Säulenrohr mit z. B. Methanol. Führen Sie die Zugbewegung am Kolbenfiting derart aus, dass Sie ihn gleichzeitig drehen (dadurch entsteht eine schraubenförmige Bewegung).
 4. Möchten Sie die Phasen-Abdichtungselemente (REF 718931 für 10 mm ID-Säule, REF 718853 für 21 mm ID-Säule, für Säulen mit anderen ID auf Anfrage) austauschen, so achten Sie darauf, dass die Packung dabei nicht beschädigt wird.
 5. Zeigt die Säule Undichtigkeiten, so muss die VP MN Inert Dichtungskombination ausgetauscht werden (REF 718848 für 10 mm ID-Säule, REF 718870 für 21 mm ID-Säule, für Säulen mit anderen ID auf Anfrage). Vor dem Einbau sollte sie und die Rohrrinnenwand mit Methanol befeuchtet werden. Bitte achten Sie sehr darauf, dass beim Einführen des Kolbenfittings der MN Inert Elastomerring nirgends beschädigt wird! Achten Sie auch darauf, dass die Oberfläche der Packung vor dem neuen Einsetzen des Phasen-Abdichtungselements völlig plan ist und im rechten Winkel zur Säulenachse steht.
 6. Ziehen Sie die Überwurfmutter nur von Hand solange fest, bis Sie einen festen Widerstand spüren.
 7. Testen Sie die Säule nach diesen Eingriffen mit dem identischen Verfahren wie am Anfang.
- Ist die VarioPrep Säule nach diesem Austausch und dem Nachjustieren der Kolbenfittings (noch) nicht dicht, sollten Sie sich mit MACHEREY-NAGEL in Verbindung setzen.

Zusammenfassung

Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:

1. Als Eluenten werden phasenspezifische Eluentensysteme empfohlen (Informieren Sie sich ggf. an Hand der Gebrauchsanweisung der entsprechenden analytischen Säule, www.mn-net.com). Die Eluenten sollten durch eine 0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. Proben vor der Injektion mit einem 0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter filtrieren.
3. Verwenden Sie zum Schutz von Verschmutzungen eine Vorsäule.
4. Typische Flussraten können der Up-scaling-Tabelle entnommen werden.
5. Stellen Sie die Flussrate so ein, daß der maximale Rückdruck Ihrer Säule nicht überschritten wird.
6. Lagern Sie die Säule (nach Entfernen des Puffers) im Auslieferungseluenten.
7. Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p.A. Qualität und Lösungsmittel in HPLC-Qualität.
8. Beachten Sie die Hinweise zum VarioPrep Prinzip und zum Öffnen der VarioPrep Säulen.

Informieren Sie sich über alle MACHEREY-NAGEL Chromatographie-Produkte: www.mn-net.com/chromatographie



... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: ChromaAppDB.mn-net.com oder kontaktieren Sie uns unter: support@mn-net.com



VarioPrep columns

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column.

VarioPrep columns are quality products. They are especially developed for HPLC analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. Depending on the specific separation potential of the packed stationary phases, this product can be used for preparative separation of numerous mixtures. It must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire chromatography system (column and equipment) must be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) must be adapted to the preparative application. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this manual, please call our service or technical support.

Table of contents

- Safety indication
 - Description of VP column system
 - Installation
 - Guard columns
 - Sample
- Separation conditions
 - Detection
 - Equilibration
 - Column storage
- Repair of a possible dead volume
 - Troubleshooting
 - Important instructions for opening
 - Abstract

Safety indication

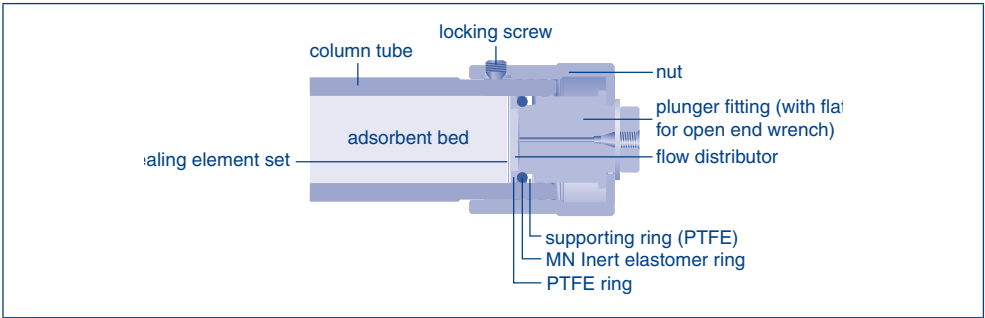
Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., acetonitrile, methanol) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and /or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially exposure of the column bed by not inadequate opening of the column).

Description of VarioPrep column system

VarioPrep columns are packed with modified or unmodified, spherical silica gels (NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® etc.). Detailed information about these stationary phases and about their use can be found on www.mn-net.com, in the MN chromatography catalog or in the instruction leaflets of the respective analytical columns.

The system of VarioPrep columns features the possibility to axially adjust both end parts (end fittings). This allows the easy and fast compensation of a dead volume, which could result at the column inlet after some time of operation at demanding conditions, without need for opening the column.

Design of the adjustable end fitting:



When designing these columns special care was taken to use only highest quality and completely inert materials. The sealing system is built up of an MN Inert elastomer ring and sealing rings from PTFE. Distribution of the liquid stream is effected by the flow distributor. The plunger fitting is fixed on the adsorbent bed by the nut, which is locked against torsion with the locking screw. Sealing of the column is achieved by prestretching the elastomer ring; consequently the force, with which the nut is tightened, does not have any effect on the tightness of the system. However, this force has a direct influence on the pressure, with which the packing material is compressed in the column. Thus the nuts are only used for retaining the HPLC material between the VP plunger fittings. If it is tightened too strongly, the HPLC packing can be damaged!

Installation

The VarioPrep column should be installed in the flow direction indicated on the column label. The adjustability of both endfittings (compensation of a possible dead volume) allows a frequent use of back-flushing techniques. The VP column is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments. Due to the design of the end parts the plunger fitting has to be held with an open end wrench when connecting the capillary fittings in order to prevent turning.

Guard columns

For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with guard columns. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see www.mn-net.com or MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and /or loss of performance is observed.

Sample

Sample solutions, generally solved in eluent should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. The sample amount to be injected can be increased by overloading of the preparative column. Thus, a high yield is possible. Typical sample masses for RP columns are shown in the up-scaling table below:

Up-scaling								
ID x length [mm]	4 x 250	8 x 250	10 x 250	16 x 250	21 x 250	32 x 250	40 x 250	50 x 250
Column volume [mL]	3	13	20	50	87	201	314	491
Linear scale-up factor	1	4	6.25	16	27.6	64	100	156.3
Typical sample mass* [mg]	0.02–2	0.08–8	0.13–13	0.3–35	0.6–60	1.3–130	2–210	3–350
Typical flow rate [mL/min]	0.5–1.5	2–6	3–9	8–24	14–40	32–96	50–150	80–250
* For RP material; the maximum amounts given here always depend on the separation problem and on the sample composition. In some cases half of the amount given can cause drastic overload, in other cases the maximum amounts can be even higher still giving acceptable separations.								

Separation conditions (eluent, flow rate, pressure, temperature)

VP columns are supplied with an eluent, matched with the stationary phase (see column certificate). For the column in hand only suitable eluents should be used as mobile phase. The selection and composition of the eluent should be ideally determined by a prior analytical method development, if no preparative application note is available. (Information about the selection of eluent can be found in the instruction leaflets of the respective analytical columns; see www.mn-net.com.)

The typical flow rate is given inter alia by the inner diameter of the column (see up-scaling table). It influences the time needed for separation, the resolution and the column lifetime. Furthermore it is limited by the maximum column back pressure, which should not exceed the limits listed in the table below.

		Maximum pressure [bar]						
Silica	Inner diameter [mm]:	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® up to 120 Å, NUCLEODEX		400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 300 Å		300	300	300	300	300	300	300
NUCLEOSIL® 500 Å		250	250	250	250	250	250	250
NUCLEOSIL® 1000 Å, 4000 Å		200	200	200	200	200	200	200
NUCLEOGEN®			200					
NUCLEOCEL		150	150	150				

We recommend to control the back pressure regularly. If a high pressure results from the use of the column at nominal flow rates, this usually indicates that some contaminants have become deposited on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

The maximum column temperatures are also determined by the stationary phase. Variation of the temperature influences retention times and especially the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

Detection

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the preparative columns.

Equilibration

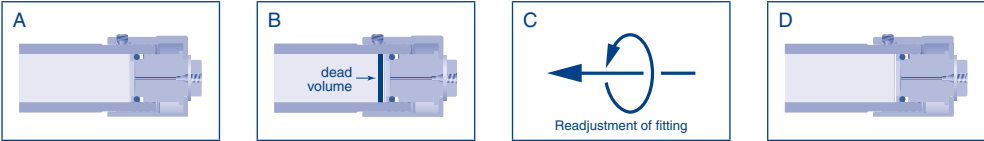
Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift.

Column storage

The original eluent (see column certificate) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended. Methanol is also not recommended for a longer storage, because of a possible impurity with metal ions (e.g. iron(III)). For column storage be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. Under these circumstances rinse the column with ca. 10 column volumes of the eluent of storage.

Repair of a possible dead volume (VarioPrep principle)

Based on a special packing procedure VarioPrep columns are produced with highest packing quality and bed density (A). Due to intensive chemical and /or mechanical strain of the column adsorbent, shrinking of the column bed could occur (B). In this case readjustment of the VarioPrep column fitting (C; turning the nut at column inlet clockwise) will eliminate a possible dead volume (D).



Procedure for readjusting a plunger fitting in order to remove a dead volume in the column (Fig. C):

1. Test the column with a standard test mixture (e.g., the so-called aromatics test).
 2. Turn off the HPLC pump → the column has to be pressure-free.
 3. Remove the capillaries.
 4. Loosen the locking screw of the nut.
 5. Turn the nut clockwise by hand, until you feel a slight resistance. Please, take care not to turn too far!
 6. Tighten the locking screw and connect the capillary again. Hold the plunger fitting with an open end wrench in order to prevent turning.
 7. Check the quality of the column with the above-mentioned standard test mixture.
- If you are satisfied, you can proceed with your work. If you are not satisfied, repeat the above procedure, until you get the required results or until you reach the end of the adjustment length of your column. (Take care – do not tighten the nut too strongly!)

Troubleshooting (column regeneration)

All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. VP columns, especially those based on silica, are robust and hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. Additionally, the lifetime can be extended by the VarioPrep principle (see above). According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks. However, if a performance loss is observed, the phase specific instruction leaflets of the analytical columns give important instructions for troubleshooting and column regeneration (see www.mn-net.com).

Important instructions for opening the VarioPrep columns

If a replacement of the sealing elements (e.g., due to impurities) and /or of the sealing rings (e.g., due to leaking) should be necessary, please note the instructions below for proper opening of the VP columns:

1. Test your column with a standard test mixture prior to opening.
2. Remove the capillaries.
3. Move the plunger fitting only carefully. If it is stuck, fill the space between the plunger fitting and the column wall with, e.g., methanol. Pull the plunger fitting, while turning it at the same time (this will result in a screw-shaped movement).
4. If you wish to replace the phase sealing elements (REF 718931 for 10 mm ID columns, REF 718853 for 21 mm ID columns, for columns with other IDs on request), please take care not to damage the packing.
5. If you have problems with the tightness of the column, you need to replace the MN Inert sealing combination (718848 for 10 mm ID columns, 718870 for 21 mm ID columns, for columns with other IDs on request). It should be wetted with methanol before. It is important to take care, that the MN Inert elastomer ring is not damaged, when the plunger fitting is introduced! Please take care, that the surface of the column packing is completely level, before you insert the new phase sealing elements. Of course, the surface has to be perpendicular to the column axis.
6. Tighten the nut by hand, until you feel a clear resistance.
7. After these procedures, test the column under the same conditions as above.

If after this replacement and the readjustment of the plunger fittings, the VarioPrep column is not yet tight, please contact MACHEREY-NAGEL for support.

Abstract

To extend column lifetime, please keep in mind the following:

1. As eluents, phase specific eluent systems are recommendable. (If necessary, please inform yourself with the instruction leaflet of the respective analytical column, www.mn-net.com.) Eluents should be filtered through a 0.45 µm membrane and degassed.
2. Filter samples through a 0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
3. Use a guard column for protection against impurities.
4. Typical flow rates are given in the up-scaling table.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of your column.
6. Store the column in the original eluent (after removal of buffer salts).
7. Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work.
8. Note the instructions for the VarioPrep principle and for opening the VarioPrep columns.

Please check the full range of MACHEREY-NAGEL chromatography products: www.mn-net.com/chromatography



... for applicative support please visit our application database with more than 3000 chromatography applications: ChromaAppDB.mn-net.com or contact us: support@mn-net.com



Columnas VarioPrep

Nota: Todas las columnas de HPLC de MACHEREY-NAGEL se suministran con un certificado que incluye las especificaciones y los resultados de prueba de la columna. Las columnas VarioPrep son productos de calidad. Están especialmente diseñadas para el análisis por HPLC. Si se utiliza con cuidado y de forma adecuada, se pueden obtener excelentes resultados cromatográficos y una larga vida útil de la columna. En función del potencial de separación específico de las fases estacionarias rellenas, este producto se puede utilizar para la separación preparativa de numerosas mezclas. Se debe utilizar exclusivamente de conformidad con las normas de laboratorio y los métodos de trabajo de HPLC universalmente aceptados. Antes de utilizar la columna, el operador debe revisar minuciosamente todo el sistema de cromatografía (columna y equipo). Las condiciones cromatográficas (fase móvil, caudal, temperatura, etc.) se deben adaptar a la aplicación preparativa. MACHEREY-NAGEL no ofrece garantía alguna y no se responsabiliza del éxito de una separación o aplicación. Si tiene dudas tras leer este manual, llame a nuestro servicio técnico o de asistencia técnica.

Índice

- Indicación de seguridad

· Descripción del sistema de columnas VP

· Instalación

· Columnas de protección

· Muestra
- Condiciones de separación

· Detección

· Equilibrado

· Almacenamiento de la columna
- Corrección de un posible volumen muerto

· Resolución de problemas

· Instrucciones de apertura importantes

· Resumen

Indicación de seguridad

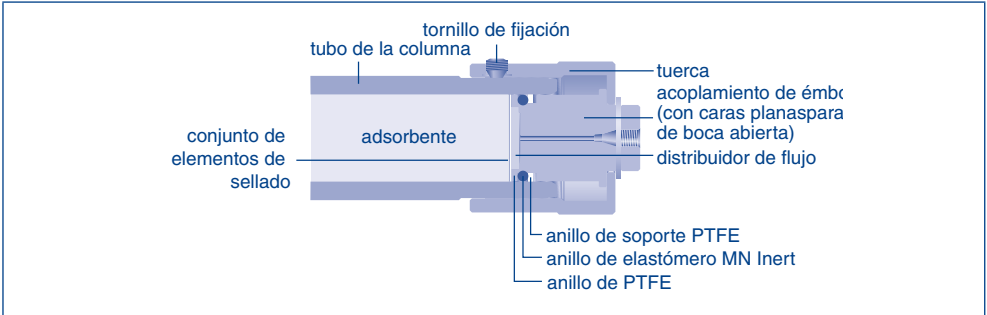
Observe las instrucciones de seguridad generales para la manipulación de disolventes de HPLC utilizados como fases móviles (p. ej., acetonitrilo, metanol) y tome las precauciones necesarias para evitar cualquier tipo de lesión o daño a la salud (p. ej., protección de la piel y los ojos en caso de rotura de los capilares). La eliminación de las columnas de HPLC usadas se debe realizar de conformidad con la normativa de protección medioambiental internacional, nacional y local. El uso de columnas de HPLC solo está permitido al personal cualificado en su ámbito de especialización. Mantenga las columnas de HPLC fuera del alcance de los niños. MACHEREY-NAGEL rechaza y excluye toda garantía de cualquier tipo o naturaleza, y MN no se responsabilizará de ningún daño (ya sea directo, indirecto, previsible, incidental, compensatorio, consecuente o especial), ya sea por garantía, contrato, responsabilidad civil extracontractual o responsabilidad objetiva, si se producen daños o pérdidas causados por un uso, mantenimiento, negligencia o tratamiento inadecuados (en particular, la exposición del lecho de la columna debido a una apertura inadecuada de la misma).

Descripción del sistema de columnas VarioPrep

Las columnas VarioPrep están rellenas de geles de sílice esférica, modificados o sin modificar (NUCLEODUR®, NUCLEOSIL®, etc.). Puede encontrar información detallada sobre estas fases estacionarias y su uso en www.mn-net.com, en el catálogo de cromatografía de MN o en los folletos de instrucciones de las respectivas columnas analíticas.

El sistema de columnas VarioPrep permite ajustar axialmente ambos extremos (racores). Así se puede compensar de forma fácil y rápida el volumen muerto que podría formarse en la entrada de la columna tras un tiempo de funcionamiento en condiciones exigentes, sin necesidad de abrir la columna.

Diseño del racor ajustable:



Al diseñar estas columnas, se prestó especial atención a utilizar únicamente materiales de la más alta calidad y totalmente inertes.

El sistema de sellado está compuesto por un anillo de elastómero inerte MN y anillos de sellado de PTFE. La distribución del flujo de líquido se realiza mediante el distribuidor de flujo. El racor de émbolo se fija al lecho del adsorbente mediante la tuerca, que se bloquea contra la torsión con el tornillo de bloqueo. El sellado de la columna se consigue mediante el preestiramiento del anillo de elastómero; por lo tanto, la fuerza con la que se aprieta la tuerca no influye en la estanqueidad del sistema. Sin embargo, esta fuerza influye directamente en la presión con la que se comprime el material de relleno en la columna. Por lo tanto, las tuercas solo se utilizan para retener el material de HPLC entre los racores del émbolo VP. Si se aprieta en exceso, se puede dañar el relleno de HPLC.

Instalación

La columna VarioPrep se debe instalar en la dirección de flujo indicada en la etiqueta de la columna. La posibilidad de ajustar ambos racores (compensación de un posible volumen muerto) permite el uso frecuente de técnicas de retrolavado. La columna VP se conecta mediante capilares y racores de 1/16", habituales en los instrumentos de HPLC. Debido al diseño de los extremos, es necesario sujetar el racor de émbolo con una llave de boca abierta al conectar los racores capilares, para evitar que gire.

Columnas de protección

Para garantizar la protección y prolongar la vida útil de la columna, esta se debe utilizar siempre junto con columnas de protección. Los elementos de filtro y el adsorbente de la columna de protección retienen los contaminantes de la muestra o del eluyente. La conexión de la columna de protección con la columna de separación se establece mediante un soporte adecuado para la columna de protección (ver www.mn-net.com o el catálogo de cromatografía MN). Es necesario sustituir el cartucho cuando se observe un aumento de la presión de la columna o una pérdida de rendimiento.

Muestra

Las soluciones de muestra, generalmente disueltas en el eluyente, se deben hacer pasar a través de un filtro de jeringa (p. ej., CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) antes de introducirlas en la columna. Si las soluciones de muestra inyectadas siguen estando turbias incluso después de la filtración, la vida útil de la columna puede verse reducida de forma significativa. La cantidad de muestra que se va a inyectar se puede aumentar mediante la sobrecarga de la columna preparativa. Por lo tanto, es posible obtener un alto rendimiento. En la tabla de ampliación siguiente se indican las masas típicas de las muestras para las columnas de RP:

Ampliación								
DI x longitud [mm]	4 × 250	8 × 250	10 × 250	16 × 250	21 × 250	32 × 250	40 × 250	50 × 250
Volumen de columna [mL]	3	13	20	50	87	201	314	491
Factor de ampliación lineal	1	4	6,25	16	27,6	64	100	156,3
Masa típica de la muestra* [mg]	0,02–2	0,08–8	0,13–13	0,3–35	0,6–60	1,3–130	2–210	3–350
Caudal típico [mL/min]	0,5–1,5	2–6	3–9	8–24	14–40	32–96	50–150	80–250
* En el caso del material de RP, las cantidades máximas aquí indicadas dependen siempre del problema de separación y de la composición de la muestra. En algunos casos, la mitad de la cantidad administrada puede provocar una sobrecarga drástica; en otros, las cantidades máximas pueden ser incluso superiores y seguir ofreciendo separaciones aceptables.								

Condiciones de separación (eluyente, caudal, presión, temperatura)

Las columnas VP se suministran con un eluyente adecuado para la fase estacionaria (ver certificado de la columna). Para la columna en cuestión, solo se deben utilizarse eluyentes adecuados como fase móvil. Lo ideal es que la selección y la composición del eluyente se determinen mediante un desarrollo previo del método analítico, en caso de que no se disponga de una nota de aplicación preparativa. (Se puede encontrar información sobre la selección del eluyente en los folletos de instrucciones de las respectivas columnas analíticas; ver www.mn-net.com.)

El caudal típico viene determinado, entre otras cosas, por el diámetro interior de la columna (ver tabla de ampliación). Influye en el tiempo necesario para la separación, en la resolución y en la vida útil de la columna. Además, está limitado por la contrapresión máxima de la columna, que no debe superar los límites indicados en la tabla siguiente.

		Presión máxima [bar]						
Sílice	Diámetro interior [mm]:	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR®, NUCLEOSIL® hasta 120 Å, NUCLEODEX		400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 300 Å		300	300	300	300	300	300	300
NUCLEOSIL® 500 Å		250	250	250	250	250	250	250
NUCLEOSIL® 1000 Å, 4000 Å		200	200	200	200	200	200	200
NUCLEOGEN®			200					
NUCLEOCEL		150	150	150				

Recomendamos comprobar la contrapresión periódicamente. Si se produce una presión elevada al utilizar la columna a caudales nominales, esto suele indicar que se han depositado algunos contaminantes en el material de relleno, por lo que es necesario eliminarlos (ver «Resolución de problemas»).

Las temperaturas máximas de la columna también vienen determinadas por la fase estacionaria. Las variaciones de temperatura influyen en los tiempos de retención y, sobre todo, en la forma de los picos. Las temperaturas óptimas para lograr separaciones satisfactorias se deben determinar de forma empírica.

Detección

Con las columnas preparativas se pueden utilizar espectrofotómetros, refractómetros y detectores electroquímicos.

Equilibrado

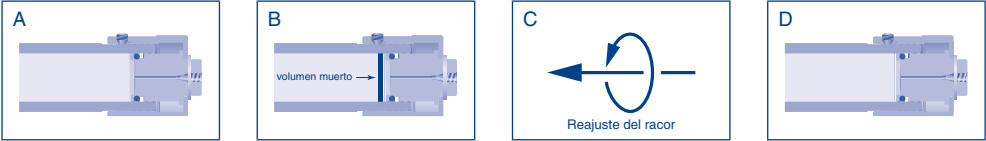
Antes de analizar las muestras, la columna se debe enjuagar con el eluyente a la misma velocidad de flujo y la misma temperatura que las del método que se vaya a aplicar. La columna se habrá equilibrado cuando los valores de referencia del detector ya no presenten desviaciones.

Almacenamiento de la columna

Se recomienda utilizar el eluyente original (ver certificado de la columna) para el almacenamiento. Para el almacenamiento a largo plazo, no se recomienda el uso de fases móviles que contengan sales inorgánicas. Tampoco se recomienda metanol para un almacenamiento prolongado, debido a la posible presencia de impurezas en forma de iones metálicos (p. ej., hierro [III]). Para el almacenamiento de la columna, asegúrese de que los racores estén herméticamente sellados con tapones para columna, ya que el almacenamiento sin estos puede provocar que el material de relleno se seque. En estas circunstancias, lave la columna con aprox. 10 volúmenes de columna del eluyente de conservación.

Corrección de un posible volumen muerto (principio VarioPrep)

Gracias a un procedimiento especial de relleno, las columnas VarioPrep se fabrican con la máxima calidad de relleno y densidad del lecho (A). Debido a la intensa agresión química o mecánica a la que está sometido el adsorbente de la columna, podría producirse una contracción del lecho de la columna (B). En este caso, el reajuste del racor de la columna VarioPrep (C; girando la tuerca de la entrada de la columna en el sentido de las agujas del reloj) eliminará un posible volumen muerto (D).



Procedimiento para reajustar un racor de émbolo con el fin de eliminar el volumen muerto de la columna (Fig. C):

- Compruebe la columna con una mezcla de ensayo estándar (p. ej., la denominada prueba de compuestos aromáticos).
- Apaga la bomba de HPLC → la columna debe estar despresurizada.
- Retire los capilares.
- Afloja el tornillo de bloqueo de la tuerca.
- Gira la tuerca con la mano en el sentido de las agujas del reloj hasta percibir una ligera resistencia. ¡Preste atención de no girarla excesivamente!
- Apriete el tornillo de bloqueo y vuelva a conectar el capilar. Sujeta el racor de émbolo con una llave de boca abierta para evitar que gire.
- Compruebe la calidad de la columna con la mezcla de ensayo estándar mencionada anteriormente. Si está satisfecho, puede continuar con el trabajo. Si no queda satisfecho, repita el procedimiento anterior hasta obtener los resultados deseados o hasta llegar al final del recorrido de ajuste de la columna. (Preste atención – ¡no apriete en exceso la tuerca!)

Resolución de problemas (regeneración de la columna)

Todas las columnas están sujetas a la estricta regulación y control de nuestro sistema de garantía de calidad. Las columnas VP, en particular las columnas a base de sílice son resistentes y mantienen su eficacia de separación durante largos periodos de tiempo si se les aplica un mantenimiento y un tratamiento adecuados. Además, la vida útil se puede prolongar gracias al principio VarioPrep (ver arriba). Según la experiencia, los fallos en las columnas se deben principalmente a la entrada de contaminantes en el lecho de adsorbente. El uso de una columna de protección, así como un pretratamiento adecuado de la muestra, ayudarán a minimizar estos riesgos. No obstante, si se observara una pérdida de rendimiento, los folletos de instrucciones específicos de cada fase de las columnas analíticas proporcionan indicaciones importantes para la resolución de problemas y la regeneración de la columna (ver www.mn-net.com).

Instrucciones importantes relativas a la apertura de las columnas VarioPrep

Si fuera necesario sustituir los elementos de sellado (p. ej., debido a la presencia de impurezas) o las juntas de estanqueidad (p. ej., debido a fugas), tenga en cuenta las instrucciones siguientes relativas a la apertura correcta de las columnas VP:

- Compruebe la columna con una mezcla de ensayo estándar antes de abrirla.
- Retire los capilares.
- Mueva el racor de émbolo solo con sumo cuidado. Si está atascado, rellene el espacio entre el racor de émbolo y la pared de la columna con, p. ej., metanol. Tire del racor de émbolo mientras lo gira simultáneamente (esto producirá un movimiento en forma de rosca).
- Si desea sustituir los elementos de sellado de fase (REF. 718931 para columnas con un DI de 10 mm, REF. 718853 para columnas con un DI de 21 mm; para columnas con otros DI, previa solicitud), tenga cuidado de no dañar el relleno.
- Si tiene problemas con la estanqueidad de la columna, deberá sustituir el conjunto de sellado MN Inert (718848 para columnas con un DI de 10 mm, 718870 para columnas con un DI de 21 mm; para columnas con otros DI, previa solicitud). Se debe humedecer previamente con metanol. ¡Es importante prestar atención de no dañar el anillo de elastómero MN Inert al introducir el racor de émbolo! Asegúrese de que la superficie del relleno de la columna esté completamente nivelada antes de introducir los nuevos elementos de sellado de fase. Por supuesto, la superficie debe estar perpendicular al eje de la columna.
- Apriete la tuerca con la mano hasta percibir una ligera resistencia.
- Una vez realizados estos procedimientos, compruebe la columna en las mismas condiciones que las indicadas anteriormente.

Si, tras esta sustitución y el reajuste de los racores de émbolo, la columna VarioPrep todavía no es estanca, solicite asistencia a MACHEREY-NAGEL.

Resumen

Para prolongar la vida útil de la columna, tenga en cuenta lo siguiente:

- Como eluyentes se recomiendan los sistemas de eluyentes específicos para cada fase. (Si fuera necesario, consulte el folleto de instrucciones de la columna analítica correspondiente, www.mn-net.com.) Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,45 µm y desgasificar.
- Filtre las muestras a través de un filtro de jeringa CHROMAFIL® Xtra PET de 0,45 µm antes de la inyección.
- Utilice una columna de protección para evitar las impurezas.
- Los caudales habituales se indican en la tabla de ampliación.
- Ajuste el caudal para mantener la presión de la columna por debajo del valor máximo de la misma.
- Almacene la columna en el eluyente original (tras eliminar las sales tampón).
- Utilice reactivos de calidad analítica y disolventes de calidad para HPLC en todos los trabajos.
- Tenga en cuenta las instrucciones relativas al principio VarioPrep y a la apertura de las columnas VarioPrep.

Consulte la gama completa de productos de cromatografía de MACHEREY-NAGEL: www.mn-net.com/cromatografia



... para encontrar aplicaciones de referencia, visite nuestra base de datos de aplicaciones, que cuenta con más de 3000 aplicaciones de cromatografía: ChromaAppDB.mn-net.com o contáctenos: support@mn-net.com