

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

Autora invitada: Genevieve Hodson, Especialista técnica

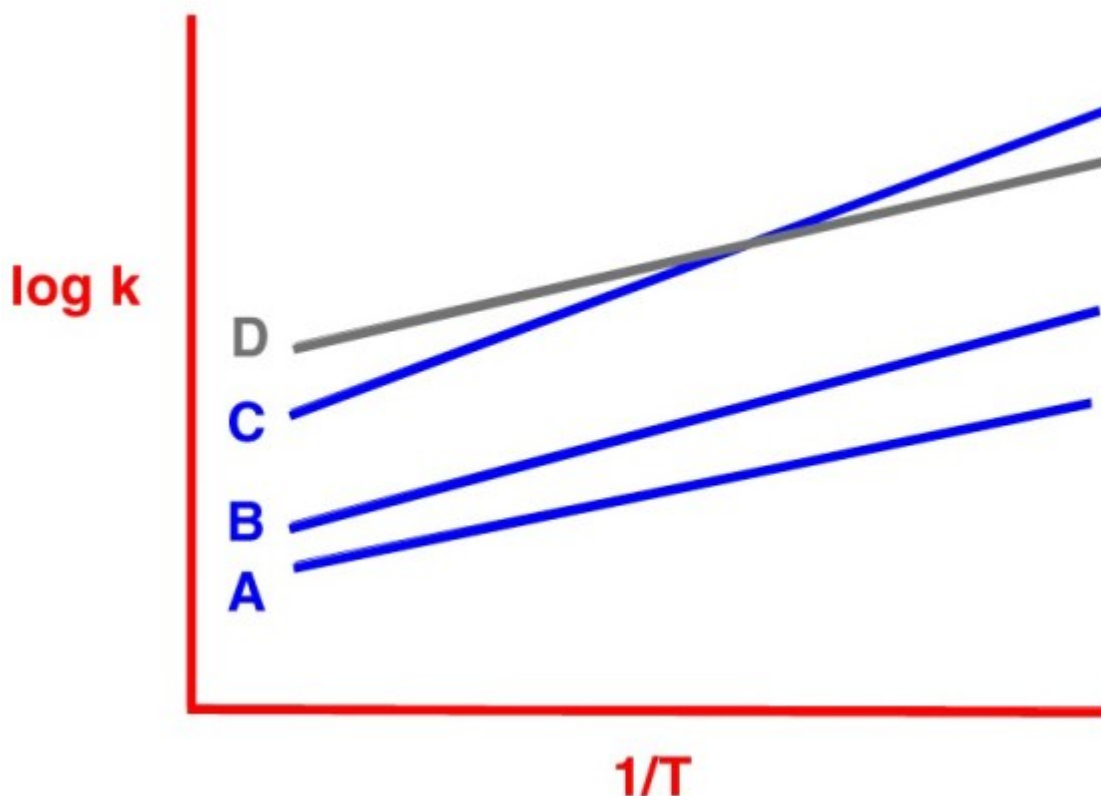
La práctica habitual es dejar las **Columnas de LC** a “temperatura ambiente”, o condiciones de temperatura ambiente, al ejecutar métodos analíticos rutinarios. ¿Entonces por qué las empresas de cromatografía le indican que no lo haga? Recubrir la columna con un horno y configurar la temperatura de los métodos a 25 °C en la columna, que la mayoría de los científicos están de acuerdo que es la temperatura ambiente, puede parecer más trabajo que dejar la columna expuesta a las condiciones de temperatura ambiente del laboratorio. Y si está buscando resultados reproducibles, esto es obligatorio.

Por ejemplo, la temperatura ambiente en un Laboratorio de calidad en Texas durante el verano, cuando el AC está encendido, puede hacer que el DMSO congele sólidos y que los químicos tengan que usar camisetas bajo sus batas de laboratorio, ipero es muy diferente cuando el AC se daña y usted debe realizar los estudios de estabilidad del horno en productos farmacéuticos que se encuentran en los viales! Esto sería un intervalo de T^a entre 19 °C a 37 °C, los cuales no se conocen en Texas. Un cambio de 15 °C puede tener grandes consecuencias sobre la reproducibilidad de los métodos y la vida útil global de las **columnas**. ¿Pero por qué? Sé que se está haciendo esa pregunta; íasí que hablemos al respecto!

Reproducibilidad

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

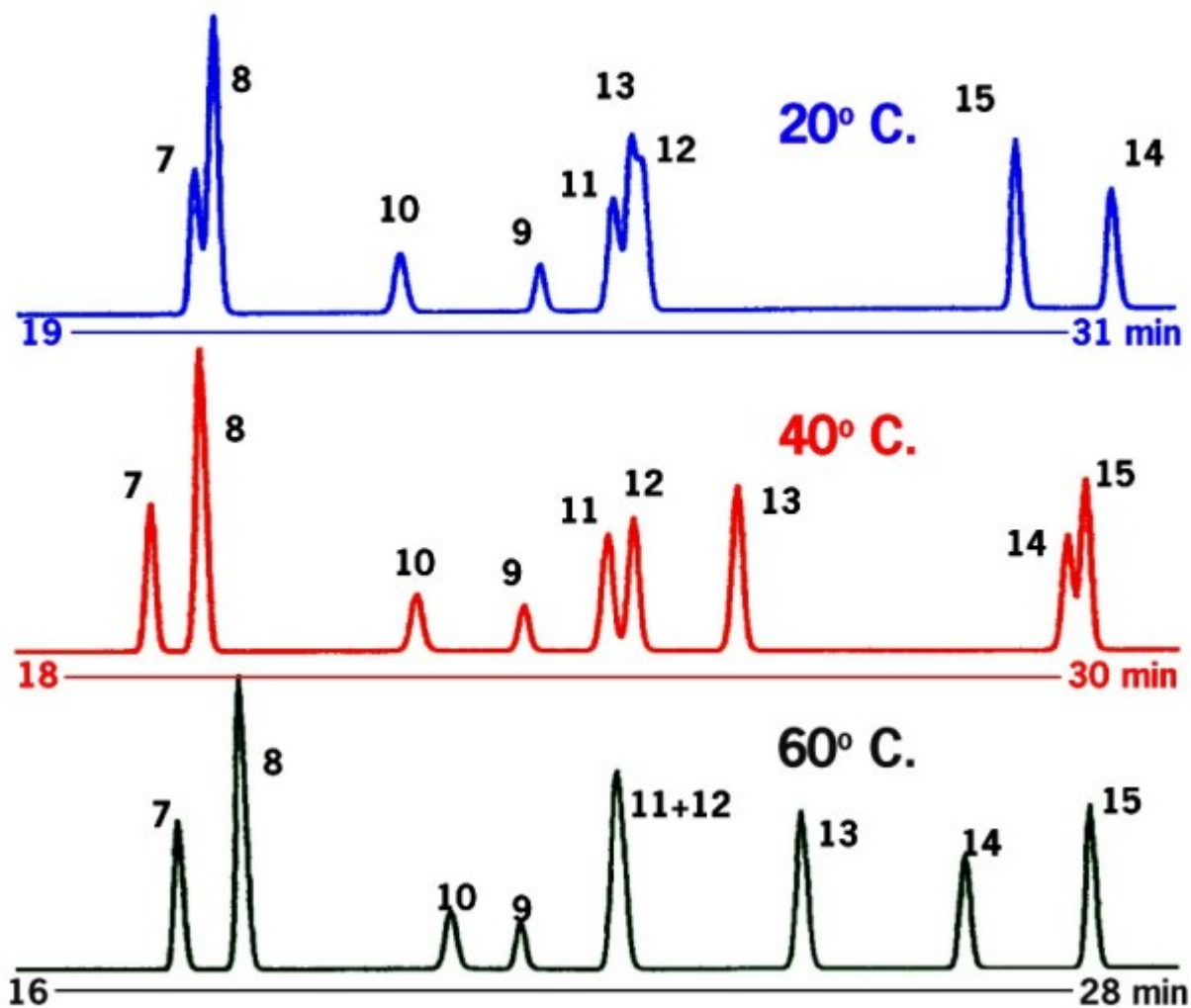
Para los bioquímicos que están leyendo esto, vamos a visitar el viejo territorio de la termodinámica (si creían que ya habían terminado con la clase de física y química, ¡se equivocaron!). A medida que cambia la temperatura, la termodinámica dentro de la columna entre la fase estacionaria y la fase móvil se ve afectada directamente. Ejecutar un método a temperaturas variables puede afectar el factor de capacidad de los analitos (k), o el tiempo durante el cual se conservan los analitos en la columna. A continuación se muestra un gráfico del factor de capacidad aparente frente a la temperatura para algunos analitos teóricos.



Representación del factor de capacidad aparente (k) frente a temperatura

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

A temperaturas elevadas, existe un aumento en la energía cinética tanto de la fase móvil como de los analitos. El aumento de la energía cinética de los analitos los calentará y podría alterar la unión intermolecular que es el mecanismo de separación entre los analitos y la fase estacionaria.. Muchas veces esto provoca que todos los analitos salgan antes de tiempo de la columna, lo que provoca una reducción en el tiempo de retención. Por lo general, esto es más perceptible con cambios de temperatura grandes; en el ejemplo a continuación, la temperatura aumenta a intervalos de 20 °C.



TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

Conditions

Column: RP C8 5µm, 4.6 x 150mm

Elution: 0 – 60% ACN with 0.1%TFA over 60 min at 1 ml/min.

Temperature: As indicated.

Sample: Tryptic digest of human growth hormone.

Reference: Hancock, Chloupek, Kirkland and Snyder, J. Chromatography 686, 31-43 (1994)

Se podrían observar cambios en la temperatura de solo unos pocos grados Celsius que afecten solo a un analito específico en un cromatograma. En este caso, es probable que la pequeña diferencia de temperatura sea suficiente para impedir una interacción favorable con la fase estacionaria o con la fase móvil. Se puede ver en las muestras, ya que solo un analito cambia de retención en comparación con los demás, que mantienen sus tiempos de retención. Como es difícil predecir qué analito, si es que existe, podría verse afectado y cambiar en la retención debido a las pequeñas fluctuaciones de temperatura, la mejor práctica es mantener una temperatura constante encendiendo el calentador de la columna con la cubierta del calentador de la columna puesta.

Los oligonucleótidos proporcionan un ejemplo de temperaturas más altas que causan una reducción general en el tiempo de retención. Teniendo en mente la estructura 3D de esta clase de compuestos, pensemos en lo que ocurre cuando la temperatura cambia y se despliegan parcialmente. El despliegue parcial podría exponer a los grupos hidrofóbicos que pueden haber sido enterrados anteriormente, haciendo que el oligo se retenga más en la columna. Y a la inversa, el despliegue podría exponer a los grupos hidrofílicos, provocando la retención opuesta. Se ha publicado una maravillosa **Nota técnica** sobre esto,

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

referenciada aquí:

APPLICATIONS

Effect of Temperature on Single Stranded Oligonucleotide Analysis

Ivan Lebedev, Dani Xing, Brian Rivera
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501, USA

Overview

Therapeutic oligonucleotides represent a recent breakthrough in the pharmaceutical industry. However, characterization of oligos, specifically by ion-pair reversed phase liquid chromatography (IP-RPLC), can be quite challenging. Oligos are manufactured by solid phase synthesis, where nucleotides are added in a step-wise manner. As such, impurities such as n-1 and n+1 must be characterized, and this may require extensive method development to optimize. Further, it may be necessary for characterization and quantitation of other closely related impurities, such as oxidation of phosphorothioates.

Another challenge is the variation in chromatography seen with oligo analysis. Retention times, peak shapes, and peak area recovery are often variable from injection to injection in any given sequence. One assumed cause of these variations is intramolecular interactions that compromise chromatographic performance. As such, high temperatures, exceeding 60 °C, are often implemented to improve separation. Although this is a requirement when working with double-stranded oligos such as siRNAs, there is still a question of whether this is also necessary for single stranded oligos. Here we present the effect of temperature on two oligos, a 5' conjugated oligo and a phosphorothioate, and how it might be implemented for method development of single stranded oligonucleotides.

Figure 1 illustrates the effect of increasing the method running temperature in 5 °C increments. Retention time for the 5'-Amino C12 oligonucleotide decreases as temperature increases, which is common for any chromatographic method. Often, efficiency and peak shapes are improved at higher temperatures, though that is not observed in this example. Further, in comparing the 45 °C and 65 °C impurity profiles as shown in the insets show little to no differences. One might conclude then that selectivity is not being effected.

To better confirm selectivity changes, mass spectrometry is necessary to identify and characterize impurity peaks. A 22 mer DNA Phosphorothioate, with an unknown sequence was run by high resolution MS. The measured mass for the thioate was 6772.6 Da. The oligo was then run at different temperatures to observe any changes in selectivity for the impurity profiling.

In comparing methods run at 60 and 70 °C (**Figure 2**), as expected, there was a marked decrease in retention for the main peak with the higher temperature running conditions. However, both methods gave similar impurity profiles, with the three earlier eluting impurities observed. The deconvoluted mass spectrum confirmed the same elution order; Impurity Peak 1 was 6443.4 Da, Peak 2 was 6468.4 Da, and Peak 3 was 6170.8 Da. Deconvoluted spectra for Peak 1 with both running conditions are shown in **Figure 3**. Interestingly, Peak 1 and 2 are likely both n-1 impurities, with Peak 1 being target sequence minus guanosine, and Peak 2 being target sequence minus thymidine.

In summary, temperature is often utilized for oligonucleotide analysis. However, for single stranded oligos, there may not be a benefit to running at temperatures exceeding 60 °, as increases in temperature may not improve chromatography nor effect selectivity as one might observe with other macromolecules.

LC Conditions

- Columns:** bioZen™ 2.6 µm Oligo
Dimension: 100 x 2.1 mm (Figure 1) [00D-4790-AN](#)
150 x 2.1 mm (Figures 2,3) [00F-4790-AN](#)
Mobile Phase: Figure 1:
A: 12.5 mM HFIP, 4 mM TEA in Water
B: 12.5 mM HFIP, 4 mM TEA in Methanol
Figures 2,3:
A: 100 mM HFIP, 4 mM TEA in Water
B: 100 mM HFIP, 4 mM TEA in Methanol
Gradient: 5-30 % B in 14 minutes (Figure 1)
25-95 % B in 15 minutes (Figures 2,3)
Flow Rate: 0.3 mL/min
Injection: 1 µL
Temperature: As noted in Figures
Detection: UV @ 260 nm (Figure 1,2)
TOF-MS (Figure 3)
Sample: 5'-Amino C12 Oligo (Figure 1)
DNA 22 mer Phosphorothioate (Figure 2,3)



Limitaciones en las columnas

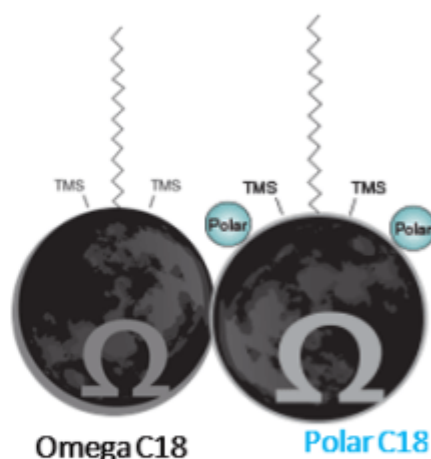
Las temperaturas también pueden afectar la vida útil global de las columnas. El medio/la fase de la columna es lo que impulsa la especificación de la temperatura máxima.

La estabilidad de temperatura de una columna puede diferir dependiendo del disolvente y tampón químico que se utilicen. Puede encontrar un ejemplo en la siguiente tabla para nuestra **Columna marca Luna Omega**. Existe una diferencia notable en la comparación de la C18 con la Polar C18 debido a pequeñas diferencias en el enlace de las fases. Para la mayoría de las columnas de fase reversa, de 60 °C a 90 °C es el intervalo de temperatura máxima más frecuente.

Luna Omega Stability

Mobile Phase	Temperature Limit
0.1% Formic acid	90° C
0.1% TFA	80° C
Phosphate at pH 6	50° C
Phosphate at pH 7.5	50° C/30° C*
Ammonium Bicarbonate pH 8.5	50° C/30° C*

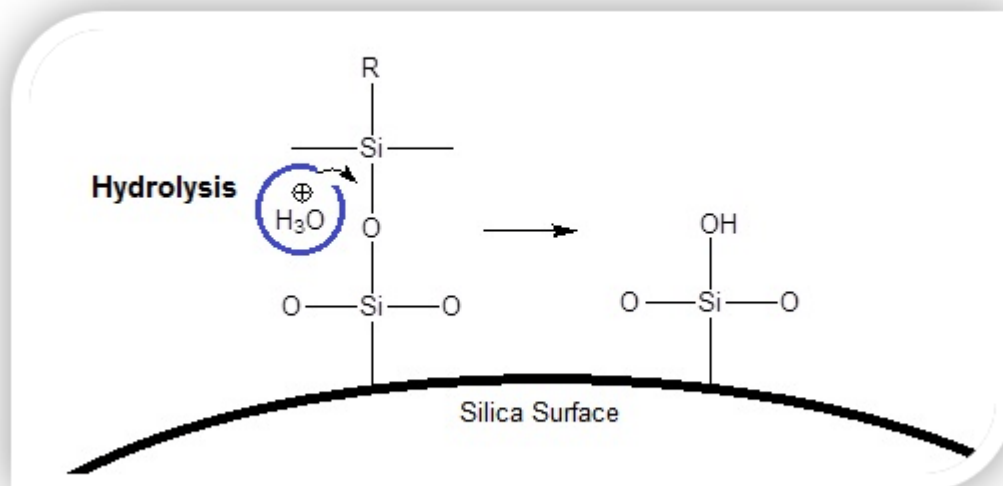
*Luna Omega Polar C18



TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

Las temperaturas elevadas en condiciones ácidas proporcionan condiciones termodinámicas favorables para la hidrólisis del ligando unido a la sílice. La hidrólisis se observa a medida que los tiempos de retención cambian más pronto debido a que hay menos fase para proporcionar interacciones en la fase estacionaria para los analitos. Se produce una pérdida de resolución antes que el cambio global en la retención. Es frecuente ver que la resolución inicial desaparece o que los picos se fusionan, en comparación con una nueva columna con la misma fase. **La mejor práctica es no dejar columnas en el horno cuando está encendido y no dejar solvente circulando por el sistema.** La mayoría de las fases móviles tienen algo de orgánica, que se evaporará más rápido.

Hydrolysis Mechanism:



TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

Si tiene alguna pregunta adicional sobre la temperatura de la columna u otras preguntas cromatográficas, póngase en contacto con nuestros Especialistas técnicos, como Genevieve, a través de nuestro servicio gratuito de chat online- **Chatear ya**.

Podrá hablar con expertos técnicos casi 24/7 sobre cualquier asistencia que pueda necesitar en el laboratorio, así como el desarrollo del método, ayuda con el producto, recomendaciones y mucho más. ¡Haga clic en el enlace o imagen de a continuación para comenzar a chatear hoy! **www.phenomenex.com/chat**



Share with friends and coworkers:

- [Click to email this to a friend \(Opens in new window\)](#)

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: CÓMO MANTENER LA PRECISIÓN Y LA ESTABILIDAD

- [Click to share on Twitter \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Facebook \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Pinterest \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on LinkedIn \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Tumblr \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Reddit \(Opens in new window\)](#)