



Application Note AN-C-196

Reinheitsquantifizierung von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) mittels IC

Robuste Analyse mit nicht suppressierter Ionenchromatographie

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (auch bekannt als TRIS, THAM oder Tromethamin) ist ein häufiger Bestandteil von Pufferlösungen in den Biowissenschaften. Es hat eine hohe Pufferkapazität zwischen pH 7,2–9,0, einen pK_A von 8,2 (20 °C) und komplexiert mit Metallionen, was TRIS ideal für biochemische und molekularbiologische Anwendungen macht [1]. TRIS-Puffer werden zur DNA-Reinigung, zur Trennung von Proteinen mit SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese) oder zur Trennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese verwendet [2]. TRIS wird auch zur Behandlung einer metabolischen Azidose eingesetzt und kann in seiner nicht-ionisierten Form die Zellmembran durchdringen und fungiert daher als intrazellulärer Puffer [3]. Aus diesen Gründen ist die Kontrolle der Reinheit von TRIS besonders für den Einsatz in der Pharmaindustrie von entscheidender Bedeutung.

Die Kombination einer Metrosep C Supp 2 – 250/4.0-

Säule mit einem Methansulfonsäure (MSA)-Eluenten eignet sich als robuste ionenchromatographische (IC) Methode ideal zur Bestimmung von TRIS und anderen kationischen Verunreinigungen. Das Mikrobore-IC-System (MB) ist mit dem IC-Leitfähigkeitsdetektor MB ausgestattet, der sowohl empfindlich als auch stabil

gegenüber MSA-Eluenten ist. Dies garantiert ein geringes Totvolumen, Langzeitstabilität des Analysesystems und präzise Ergebnisse bei der TRIS-Quantifizierung.

PROBEN UND PROBENVORBEREITUNG

Die Proben wurden aus Trizma®-Basispulver (TRIS) in PA-Qualität (CAS 77-86-1, gekauft von Sigma Aldrich Nr. 93350) hergestellt. Zur Methodenevaluierung

wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von TRIS (10,37 mg/l und 103,7 mg/l) im Eluenten (0,1 % Methansulfonsäure) gelöst.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Der Microbore-Ionenchromatograph 930 Compact IC Flex Oven/DEG/MB wurde mit dem MSA-stabilen IC Conductivity Detector MB (**Abbildung 1**) ausgestattet. Für diesen nicht suppressierten Aufbau wurde ein Eluent bestehend aus 0,1% (v/v) MSA (15 mmol/L MSA) verwendet (**Tabelle 1**). Die Proben wurden mithilfe der intelligenten Partial Loop Injektionstechnik (MiPT, **Abbildung 2**) injiziert. Diese Technik füllt die 250 µL-Probenschleife mit einem genau gemessenen und frei wählbaren Volumen (in dieser Anwendungsstudie von 5 bis 40 µL). Dabei übernimmt ein Dosino mit einer 2-mL-Dosiereinheit die präzise Dosierung. Mittels MiPT wurde eine Kalibrierung in einem Bereich von 5–140 mg/L TRIS mit einem einzigen Standard erstellt.

Die variable Volumenwahl lässt sich auch bei der Probeninjektion anwenden. In solchen Situationen wird beispielsweise für eine hochkonzentrierte Probe ein kleines Injektionsvolumen gewählt und so der manuelle Verdünnungsschritt weggelassen.

Typische anorganische Kationen (z. B. Lithium, Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium) wurden auf die Metrosep C Supp 2-Säule injiziert, um mögliche Coelutionen zu prüfen.



Abbildung 1. Der hier gezeigte IC-Leitfähigkeitsdetektor MB hat ein reduziertes Zellvolumen und ist inert gegenüber Methansulfonsäure.

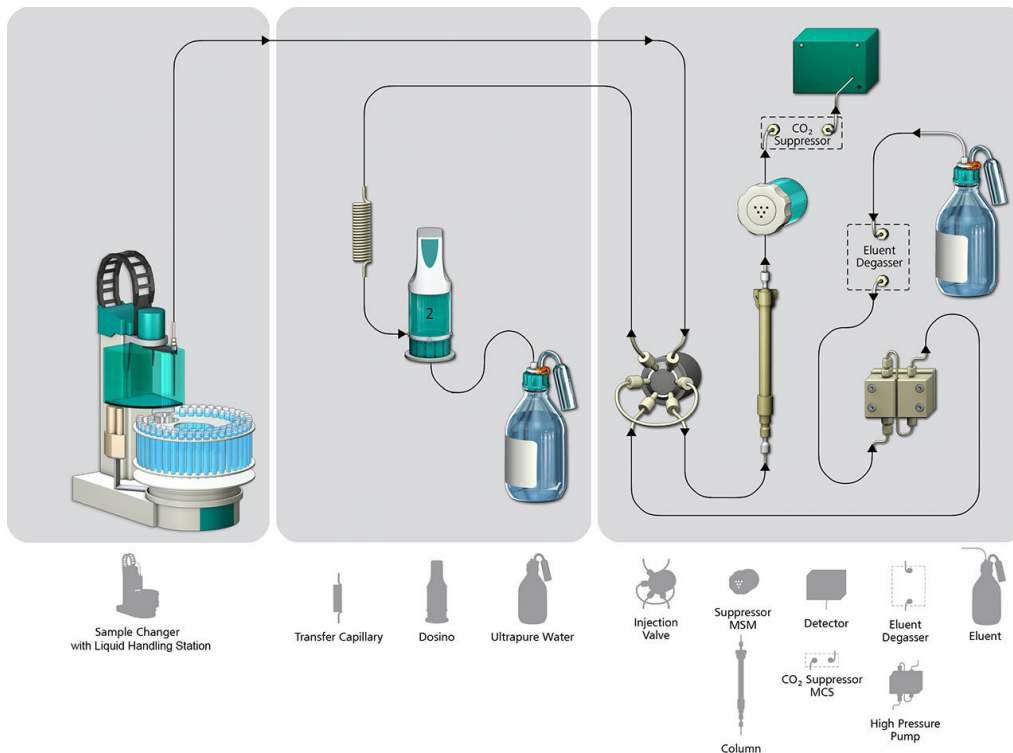


Abbildung 2. Abbildung des Flusspfads der intelligenten Partial Loop Injection Technique (MiPT) von Metrohm. Mithilfe des Dosinos wird die Probe vom Autosampler in eine Pufferschleife überführt, um Kontaminationen und Verschleppungen zu vermeiden. Anschließend füllt der Dosino die Probenschleife präzise mit dem gewünschten Injektionsvolumen im μL -Bereich.

Tabelle 1. IC-Methodenparameter für die Microbore-IC-Analyse kationischer Verunreinigungen in TRIS.

Säule	Metrosep C Supp 2 - 250/4,0
Eluent/Verdünnungsmittel	$c(\text{MSA}) = 0,1 \text{ \% (v/v)}$
Fuss	1,0 ml/min
Temperatur	30 °C
Injektionsvolumen	5–40 μL (MiPT)
Detektion	Direkte Leitfähigkeit

ERGEBNISSE

Die TRIS-Bestimmung erfolgt mittels isokratischer Elution in dem MB IC-System in weniger als 8 Minuten. Die Methode erwies sich hinsichtlich der oben beschriebenen Hauptkationen als störungsfrei. Natrium hatte eine Retentionszeit von 4,1 Minuten. Durch Ändern der Methodenparameter, z. B. durch Verringern der Säulentemperatur auf 20 °C, wird die Auflösung zwischen Natrium und TRIS verbessert. Mit den verwendeten Methodenparametern (Tabelle 1) ist eine genaue Bestimmung durch Auswertung der Peakhöhe möglich. Die Wiederfindungsraten für 100 mg/l TRIS lagen bei 99–103 % mit einer relativen Standardabweichung von <3 %, was die Genauigkeit dieser Methode verdeutlicht.

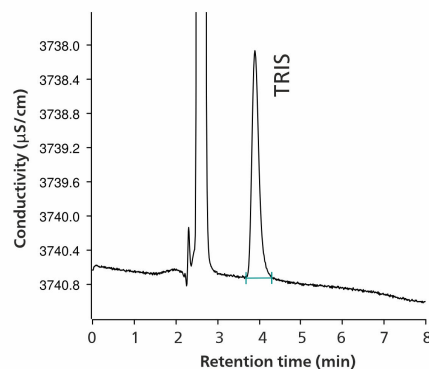


Abbildung 3. Chromatogramm von 100 mg/L TRIS mit 4 µL Injektionsvolumen (MiPT).

FAZIT

In der pharmazeutischen Industrie verwendete Rohstoffe wie Lösungen und Puffer müssen hinsichtlich ihrer exakten Konzentration und Reinheit höchste Qualitätsstandards erfüllen.

Der Aufbau in dieser Anwendungsstudie umfasst ein Microbore-IC-System, einen MSA-stabilen Leitfähigkeitsdetektor und MiPT zur automatischen

Kalibrierung mit einem einzigen Standard und flexibler Auswahl der Probeninjektionsvolumina. Die Methode eignet sich zur Quantifizierung von TRIS im Bereich von 5–200 mg/L. Es gewährleistet auf einfache und präzise Weise eine robuste Bestimmung der gängigen Pufferkomponente TRIS.

REFERENZEN

1. Deutscher, M. P. *Guide to Protein Purification*; Gulf Professional Publishing, 1990.
2. Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*; John Wiley & Sons, 2016.
3. Sirieix, D.; Delayance, S.; Paris, M.; et al. Tris-Hydroxymethyl Aminomethane and Sodium Bicarbonate to Buffer Metabolic Acidosis in an Isolated Heart Model. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, 155 (3), 957–963.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.3.911703>

CONTACT

Metrohm Deutschland
In den Birken 3
70794 Filderstadt

info@metrohm.de

KONFIGURATION



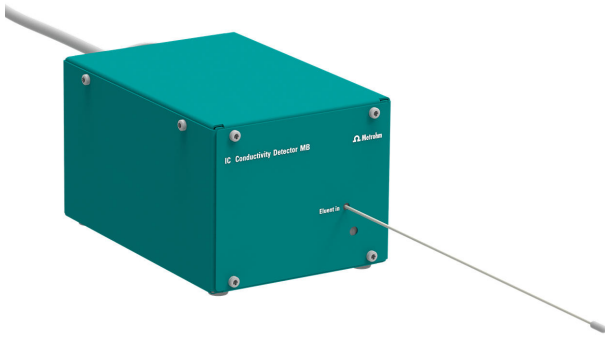
930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg/MB

Der 930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg ist das intelligente Compact-IC-Gerät mit **Säulenofen**, **sequenzieller Suppression** und **Peristaltikpumpe** zur Suppressorregeneration, sowie eingebautem **Degasser**. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- oder Kationenbestimmungen mit sequenzieller Suppression und Leitfähigkeitsdetektion
- Optimierte für Microbore (2mm) Applikationen, ideal geeignet für Kupplungstechniken (IC-MS or IC-ICP/MS)

Unterstützt mit MagIC Net 4.1 und höher



IC Conductivity Detector MB

Kompakter und intelligenter Hochleistungs-Leitfähigkeits-Detektor zu den intelligenten IC Geräten. Optimiert für Microboresäulen. Hervorragende Temperaturkonstanz, die gesamte Signalverarbeitung innerhalb des geschützten Detektorblocks und DSP – Digital Signal Processing – der letzten Generation garantieren höchste Präzision der Messung. Dank dem dynamischen Arbeitsbereich sind keine (auch nicht automatische) Bereichswechsel notwendig.

Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- oder Kationenbestimmungen mit chemischer Suppression, sequenzieller Suppression oder ohne Suppression und Leitfähigkeitsdetektion
- Optimierte für Microbore (2mm) Applikationen, ideal geeignet für Kupplungstechniken (IC-MS or IC-ICP/MS)

Spezifikation auf einen Blick:

- 0 ... 15000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ohne Bereichsumschaltung
- Zellvolumen: 0.3 μL
- Ringförmige Elektroden aus Edelstahl X2CrNiMo17-12-2 (316 L), kompatibel mit MSA
- Maximaler Betriebsdruck: 10.0 MPa (100 bar)
- Zelltemperatur: 20 ... 50 °C in Schritten von 5 °C
- Temperaturstabilität: 0.001 °C
- Basislinienrauschen: 0.2 nS/cm typisch für sequenzielle Suppression
- Kapillaren: ID 0.18 mm

Unterstützt mit MagIC Net 4.1 und höher



Metrosep C Supp 2 - 250/4.0

Die längste Trennsäule der Metrosep C-Supp-2-Familie ist die Metrosep C Supp 2 - 250/4.0. Das Metrosep C-Supp-2-Trennmateriale basiert auf einem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer mit Carboxylgruppen. Dank der optimierten Natrium/Ammonium-Trennung dieses Trennmateriale, ist diese Säule perfekt geeignet für Bestimmungen von kleinsten Ammoniumkonzentrationen neben sehr viel Natrium. Die Säule wird mit sequentieller Suppression eingesetzt. Entsprechend eignet sie sich besonders zur Bestimmung von Konzentrationen im mittleren $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich und darunter.