



Application Note AN-C-196

Cuantificación de pureza de tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) con IC

Análisis robusto con cromatografía iónica

El tris (hidroximetil) aminometano (también conocido como TRIS, THAM o trometamina) es un componente común de las soluciones tampón en las ciencias biológicas. Tiene una alta capacidad tampón entre pH 7,2 y 9,0, un pK_a de 8,2 (20 °C) y complejos con iones metálicos, lo que hace que TRIS sea ideal para aplicaciones de bioquímica y biología molecular [1]. Los tampones TRIS se utilizan para la purificación del ADN, la separación de proteínas con SDS-PAGE

(electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida), o separación de ácidos nucleicos con electroforesis en gel [2]. TRIS también se usa para tratar la acidosis metabólica y puede penetrar la membrana celular en su forma sindicalizada, por lo que funciona como un amortiguador intracelular[3]. Por estos motivos, es fundamental controlar la pureza de TRIS, especialmente para su uso en la industria farmacéutica.

Un método robusto de cromatografía iónica (IC) isocrática con una columna Metrosep C Supp 2 - 250/4.0 y un eluyente de ácido metanosulfónico (MSA) es ideal para determinar TRIS y cualquier impureza catiónica. El sistema IC de microperforación

(MB) está equipado con el detector de conductividad IC MB, que es sensible y estable frente a eluyentes MSA. Esto garantiza volúmenes vacíos bajos, estabilidad a largo plazo del sistema analítico y resultados precisos para la cuantificación TRIS.

MUESTRA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se prepararon a partir de polvo base Trizma® (TRIS) con calidad pa (CAS 77-86-1, adquirido de Sigma Aldrich No. 93350). Para la evaluación del

método, se disolvieron dos concentraciones diferentes de TRIS (10,37 mg/l y 103,7 mg/l) en eluyente (ácido metanosulfónico al 0,1%).

EXPERIMENTO

El cromatógrafo iónico de microcalibre 930 Compact IC Flex Oven/DEG/MB estaba equipado con el detector de conductividad IC MB (**Figura 1**). Para esta configuración no suprimida se utilizó un eluyente que consistía en MSA al 0,1 % (v/v) (15 mmol/l de MSA). **tabla 1**). Las muestras se inyectaron utilizando la técnica inteligente de inyección de bucle parcial de Metrohm (MiPT, **Figura 2**). Esta técnica llena el bucle de muestra de 250 µL con un volumen medido con precisión y libremente seleccionable (de 5 a 40 µL en este estudio de aplicación). Durante este proceso, un Dosino con una unidad de dosificación de 2 ml realiza los incrementos de dosificación precisos. MiPT permite la calibración a partir de un único estándar, que se realizó aquí en un rango de 5 a 140 mg/L TRIS. La selección de volumen variable también se puede aplicar a la inyección de muestra. En tales situaciones, se selecciona un volumen de inyección pequeño, por ejemplo, para una muestra altamente concentrada, omitiendo así el paso de dilución manual.

Se inyectaron cationes inorgánicos típicos (es decir, litio, sodio, potasio, magnesio y calcio) en la columna Metrosep C Supp 2 para comprobar posibles problemas de coelución.



Figure 1. El detector de conductividad IC MB que se muestra aquí tiene un volumen de celda reducido y es inerte frente al ácido metanosulfónico.

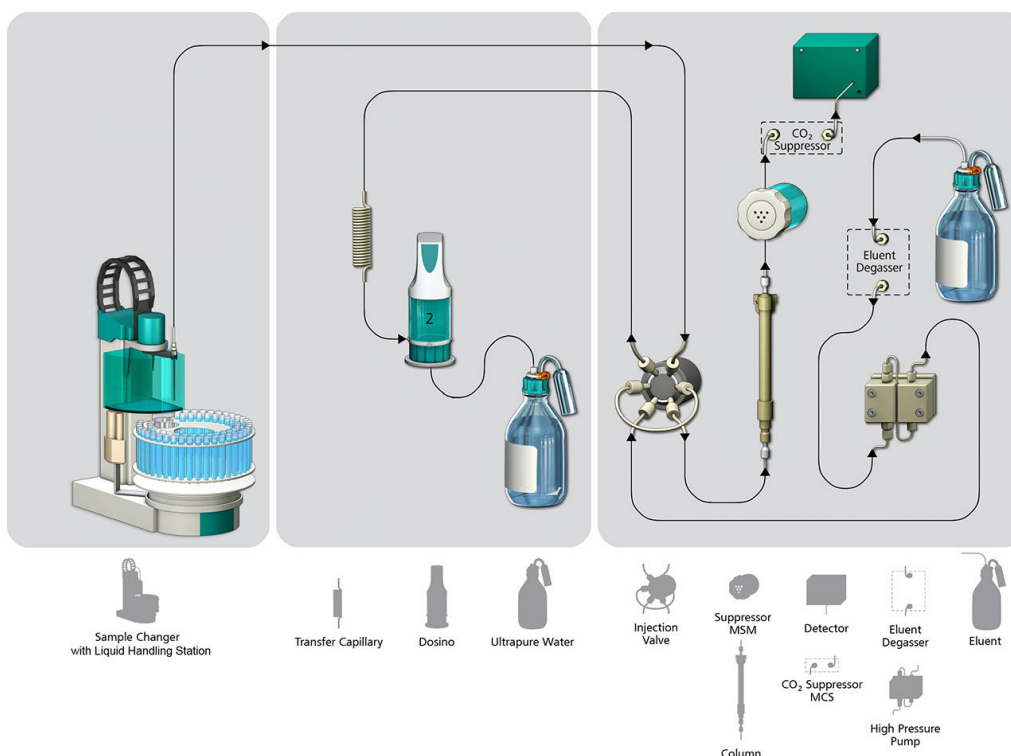


Figure 2. Ilustración de la ruta de flujo de la técnica inteligente de inyección de bucle parcial (MiPT) de Metrohm. Con la ayuda del Dosino, la muestra se transfiere del muestreador automático a un circuito de tampón para evitar la contaminación y el arrastre. Luego, el Dosino llena con precisión el bucle de muestra con el volumen de inyección deseado en el rango de μL .

Tabla 1. Parámetros del método IC para el análisis IC de microcalibre de impurezas catiónicas en TRIS.

Columna	Metrosep C Supp 2 - 250/4.0
Eluyente/diluyente	$c(\text{MSA}) = 0,1 \text{ \% (v/v)}$
Tasa de flujo	1,0 ml/min
Temperatura	30 °C
Volumen de inyección	5–40 μL (MiPT)
Detección	Conductividad directa

RESULTADOS

La determinación de TRIS se realiza en menos de 8 minutos mediante elución isocrática en el sistema MB IC. Se demostró que el método no presenta interferencias con respecto a los cationes principales, como se describe anteriormente.

El sodio tuvo un tiempo de retención de 4,1 minutos. Cambiar los parámetros del método, por ejemplo, disminuir la temperatura de la columna a 20 °C, aumentará la resolución entre sodio y TRIS. Con los parámetros del método utilizado (tabla 1), es posible una determinación precisa utilizando la altura del pico para la evaluación. Las tasas de recuperación para 100 mg/L de TRIS fueron del 99 al 103 % con una desviación estándar relativa de <3 %, lo que revela la precisión de este método.

CONCLUSIÓN

Las materias primas utilizadas en la industria farmacéutica, como soluciones y tampones, deben cumplir los más altos estándares de calidad con respecto a su concentración exacta y pureza.

La configuración en este estudio de aplicación comprende un sistema IC de microcalibre, un detector de conductividad estable MSA y MiPT para calibración

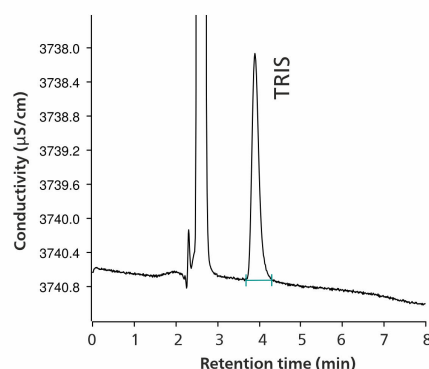


Figure 3. Cromatograma de TRIS de 100 mg/L con volumen de inyección de 4 µL (MiPT).

automática con un único estándar y una elección flexible de volúmenes de inyección de muestra. El método es adecuado para la cuantificación de TRIS en el rango de 5 a 200 mg/l. Garantiza una determinación sólida del componente tampón común TRIS de una manera fácil y precisa.

REFERENCIAS

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 Hispania
Calle Aguacate 15
28044 Madrid

mh@metrohm.es

CONFIGURACIÓN



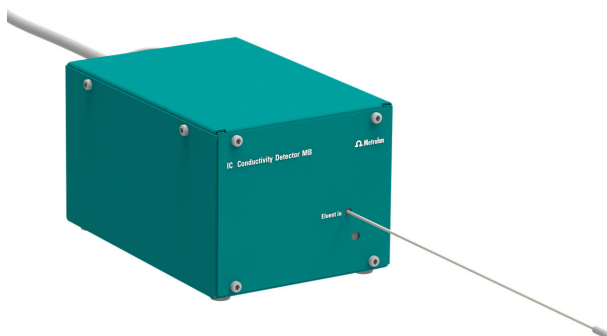
930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg/MB

El 930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg es el aparato Compact IC inteligente con **horno para columnas, supresión secuencial** y **bomba peristáltica** para la regeneración de supresores, y con **desgasificador** incorporado. Este aparato puede emplearse con cualquier método de separación o de detección.

Ámbitos típicos de aplicación:

- Determinaciones de cationes o aniones con supresión secuencial y detección de conductividad
- Optimizado para aplicaciones microbore (2 mm), ideal para técnicas de acoplamiento (IC-MS o IC-ICP/MS)

Compatible con MagIC Net 4.1 y versiones superiores



IC Conductivity Detector MB

Detector de conductividad de alto rendimiento, inteligente y compacto para aparatos CI inteligentes. Optimizado para columnas microbore. La extraordinaria constancia de temperatura, el tratamiento completo de la señal dentro del bloque detector protegido y DSP (tratamiento digital de la señal) de última generación garantizan la máxima precisión de la medida. Gracias a la zona de trabajo dinámica, no es necesario el cambio de la zona (ni siquiera automático).

Ámbitos típicos de aplicación:

- Determinaciones de cationes o aniones con supresión química, supresión secuencial o sin supresión y detección de conductividad
- Optimizado para aplicaciones microbore (2 mm), ideal para técnicas de acoplamiento (IC-MS o IC-ICP/MS)

Resumen de la especificación:

- 0...15 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sin conmutación de gama
- Volumen de celda: 0,3 μL
- Electrodo de forma anular de acero fino X2CrNiMo17-12-2 (316 L), compatibles con MSA
- Presión máxima de servicio: 10,0 MPa (100 bar)
- Temperatura de la celda: 20...50 °C en pasos de 5 °C
- Estabilidad térmica: 0,001 °C
- Ruido de la línea de base: 0,2 nS/cm típico en la supresión secuencial
- Capilares: d. i. 0,18 mm

Compatible con MagIC Net 4.1 y versiones superiores



Metrosep C Supp 2 - 250/4.0

La columna más larga de la familia Metrosep C Supp 2 es la Metrosep C Supp 2 - 250/4.0. El material de separación de la Metrosep C Supp 2 está basado en un copolímero de divinilbenceno-poliestireno con grupos carboxilo. Gracias a la separación optimizada de sodio y amonio que ofrece este material de separación, esta columna es perfectamente adecuada para la determinación de concentraciones muy bajas de amonio, además de una gran cantidad de sodio. La columna se usa con supresión secuencial. Por lo tanto, es especialmente adecuada para la determinación de concentraciones en la gama media de $\mu\text{g/L}$ e inferiores.