



Application Note AN-C-196

Quantificazione della purezza del tris(idrossimetil)amminometano (TRIS) con IC

Analisi robusta con cromatografia ionica non soppressa

Il tris(idrossimetil)amminometano (noto anche come TRIS, THAM o trometamina) è un componente comune delle soluzioni tampone nelle scienze biologiche. Ha un'elevata capacità tampone tra pH 7,2 e 9,0, un pKa di 8,2 (20 °C) e si complessa con ioni metallici, rendendo il TRIS ideale per applicazioni in biochimica e biologia molecolare [1]. I tamponi TRIS vengono utilizzati per la purificazione del DNA, la separazione di proteine mediante SDS-PAGE

(elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato) o la separazione di acidi nucleici mediante elettroforesi su gel [2]. Il TRIS viene anche utilizzato per trattare l'acidosi metabolica e può penetrare la membrana cellulare nella sua forma non ossidata, fungendo quindi da tampone intracellulare [3]. Per questi motivi, è essenziale controllare la purezza del TRIS, soprattutto per l'uso nell'industria farmaceutica.

Un robusto metodo di cromatografia ionica isocratica (IC) con colonna Metrosep C Supp 2 - 250/4.0 e eluente acido metansolfonico (MSA) è ideale per determinare il TRIS e qualsiasi impurità cationica. Il sistema IC microbore (MB) è dotato del rivelatore di

conduttività IC MB, sensibile e stabile agli eluenti MSA. Ciò garantisce bassi volumi di vuoto, stabilità a lungo termine del sistema analitico e risultati precisi per la quantificazione del TRIS.

CAMPIONE E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni sono stati preparati a partire da polvere di base Trizma® (TRIS) di qualità p.a. (CAS 77-86-1, acquistata da Sigma Aldrich n. 93350). Per la

valutazione del metodo, due diverse concentrazioni di TRIS (10,37 mg/L e 103,7 mg/L) sono state sciolte in un eluente (acido metansolfonico allo 0,1%).

ANALISI

Il cromatografo ionico microbore 930 Compact IC Flex Oven/DEG/MB era dotato del MSA-stable IC Conductivity Detector MB (**Figura 1**). Per questa configurazione non soppressa è stato utilizzato un eluente costituito da MSA allo 0,1% (v/v) (15 mmol/L di MSA) (**Tabella 1**). S I campioni sono stati iniettati utilizzando la tecnica di iniezione parziale intelligente Metrohm (MiPT, **Figura 2**). Questa tecnica riempie il loop di campionamento da 250 µL con un volume misurato con precisione e liberamente selezionabile (da 5 a 40 µL in questo studio applicativo). Durante questo processo, un Dosino con un'unità di dosaggio da 2 mL esegue gli incrementi di dosaggio precisi. La MiPT consente la calibrazione da un singolo standard, che è stata eseguita in questo caso in un intervallo di 5-140 mg/L di TRIS.

La selezione del volume variabile può essere applicata anche all'iniezione del campione. In tali situazioni, si seleziona un volume di iniezione ridotto, ad esempio per un campione altamente concentrato, omettendo così la fase di diluizione manuale.

Tipici cationi inorganici (ad esempio litio, sodio, potassio, magnesio e calcio) sono stati iniettati nella colonna Metrosep C Supp 2 per verificare potenziali problemi di co-eluzione.



Figure 1. Il rivelatore di conduttività IC MB mostrato qui ha un volume cellulare ridotto ed è inerte nei confronti dell'acido metansolfonico.

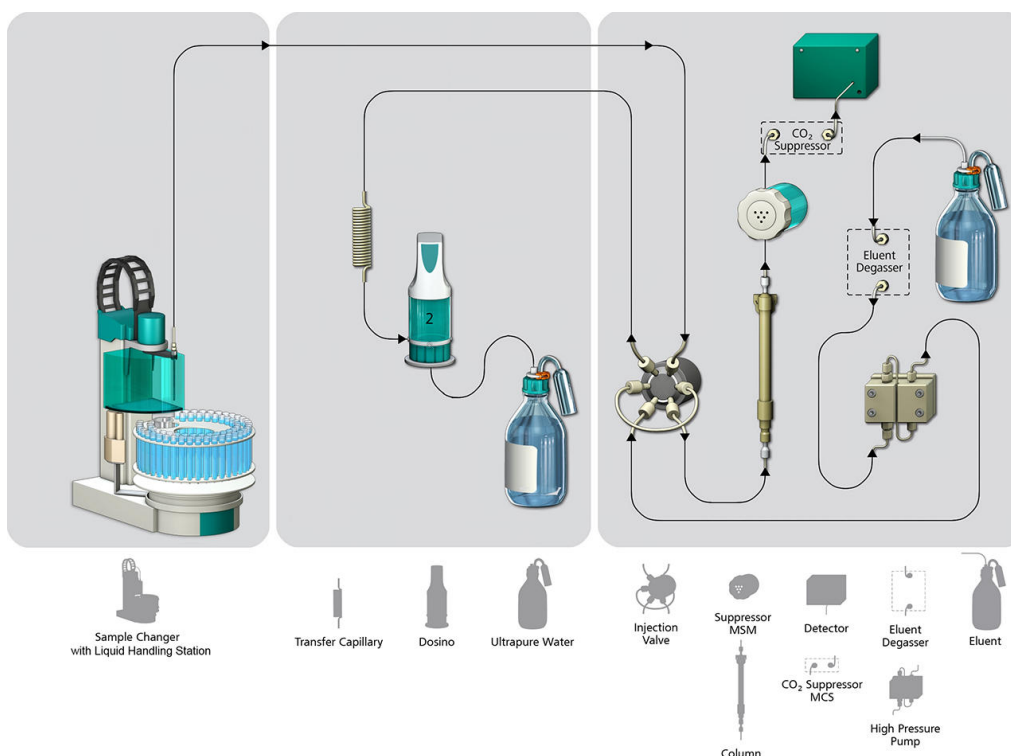


Figure 2. Illustrazione del percorso di flusso della tecnica di iniezione a loop parziale (MiPT) intelligente di Metrohm. Con l'aiuto del Dosino, il campione viene trasferito dall'autocampionatore in un loop tampone per evitare contaminazioni e carryover. Il Dosino riempie quindi con precisione il loop del campione con il volume di iniezione desiderato, nell'ordine dei μL .

Tabella 1. Parametri del metodo IC per l'analisi IC microbore delle impurità cationiche in TRIS.

Colonna	Metrosep C Supp 2 - 250/4.0
Eluente/diluente	$c(\text{MSA}) = 0.1 \text{ \% (v/v)}$
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	30 °C
Injection volume	5–40 μL (MiPT)
Detection	Direct conductivity

RISULTATI

La determinazione TRIS viene eseguita in meno di 8 minuti utilizzando l'eluizione isocratica sul sistema MB IC. Il metodo si è dimostrato privo di interferenze per quanto riguarda i cationi principali, come descritto sopra.

Il sodio ha avuto un tempo di ritenzione di 4,1 minuti. Modificando i parametri del metodo, ad esempio riducendo la temperatura della colonna a 20 °C, si aumenta la risoluzione tra sodio e TRIS. Con i parametri del metodo utilizzati (Tabella 1), è possibile ottenere una determinazione precisa utilizzando l'altezza del picco per la valutazione. I tassi di recupero per 100 mg/L di TRIS sono stati del 99-103% con una deviazione standard relativa <3%, a dimostrazione dell'accuratezza di questo metodo.

CONCLUSIONE

Le materie prime utilizzate nell'industria farmaceutica, come soluzioni e tamponi, devono soddisfare i più elevati standard qualitativi per quanto riguarda la loro esatta concentrazione e purezza.

La configurazione di questo studio applicativo comprende un sistema IC microbore, un rivelatore di conducibilità stabile all'MSA e un MiPT per la

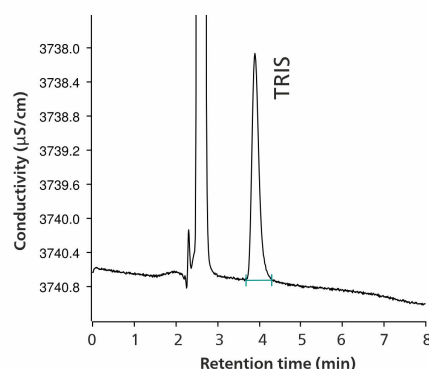


Figure 3. Cromatogramma di 100 mg/L TRIS con volume di iniezione di 4 µL (MiPT).

calibrazione automatica con un singolo standard e una scelta flessibile dei volumi di iniezione del campione. Il metodo è adatto per la quantificazione di TRIS nell'intervallo 5-200 mg/L. Garantisce una determinazione affidabile del componente tampone comune TRIS in modo semplice e preciso.

RIFERIMENTI

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 Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



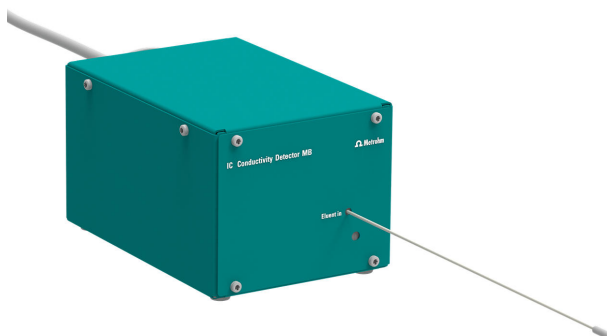
930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg/MB

Il 930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg è lo strumento IC Compact intelligente con **forno per colonna**, **soppressione sequenziale** e **pompa peristaltica** per la rigenerazione del soppressore, nonché **Degasser** integrato. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevazione.

Campi d'impiego tipici:

- Determinazione di anioni o cationi con soppressione sequenziale e rilevazione in conducibilità
- Ottimizzato per le applicazioni Microbore (2 mm), ideale per le tecniche di accoppiamento (IC-MS o IC-ICP/MS)

Supportato da MagIC Net 4.1 e versioni successive



IC Conductivity Detector MB

Rilevatore della conducibilità ad alte prestazioni compatto e intelligente per gli strumenti IC intelligenti. Ottimizzato per le colonne Microbore. Eccellente stabilità di temperatura, la completa elaborazione del segnale all'interno del blocco del rivelatore protetto e DSP – Digital Signal Processing (elaborazione del segnale digitale) – di ultima generazione garantiscono la massima precisione della misura. Grazie al range dinamico di lavoro non sono necessari cambiamenti (anche non automatici) del range di misura.

Campi d'impiego tipici:

- Determinazione di anioni o cationi con soppressione chimica, soppressione sequenziale o senza soppressione e rilevazione in conducibilità
- Ottimizzato per le applicazioni Microbore (2 mm), ideale per le tecniche di accoppiamento (IC-MS o IC-ICP/MS)

Panoramica delle specifiche:

- Da 0 a 15.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ senza commutazione dell'intervallo
- Volume della cella: 0,3 μL
- Elettrodi ad anello in acciaio legato X2CrNiMo17-12-2 (316 L), compatibili con MSA
- Pressione d'esercizio massima: 10,0 MPa (100 bar)
- Temperatura della cella: da 20 a 50 °C in incrementi di 5 °C
- Stabilità della temperatura: 0,001 °C
- Rumore di fondo: 0,2 nS/cm tipico per la soppressione sequenziale
- Capillari: DI 0,18 mm

Supportato da MagIC Net 4.1 e versioni successive



Metrosep C Supp 2 - 250/4.0

La colonna di separazione più lunga della famiglia Metrosep C Supp 2 è la Metrosep C Supp 2 - 250/4.0. Il materiale di separazione della Metrosep C-Supp-2 è basato su un copolimero di polistirene-divinilbenzene con gruppi carbossilici. Grazie alla separazione ottimizzata di sodio/ammonio di questo materiale di separazione, questa colonna è perfetta per la determinazione delle più piccole concentrazioni di ammonio accanto a tanto sodio. La colonna viene impiegata con soppressione sequenziale. Di conseguenza è adatta in particolare alla determinazione di concentrazioni nell'intervallo µg/L medio e al di sotto.