



Application Note AN-C-196

イオンクロマトグラフ法によるTRIS (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメ タン)の純度定量

ノン酸プレッサー型イオンクロマトグラフィーによるロバスト な分析法

トリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、別名TRIS、THAM、トロメタミン)は、ライフサイエンス分野における緩衝液の一般的な成分です。pH 7.2~9.0の範囲で高い緩衝能を持ち、20° CにおけるpKaは8.2です。また、金属イオンと錯体を形成するため、トリスは生化学や分子生物学の用途に最適です[1]。トリス緩衝液は、DNA精製、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動)によるタンパク質分離、またはゲル電気泳動による核酸分離に使用されます[2]。さらに、トリスは代謝性アシドーシスの治療にも用いられ、非イオン化形態で細胞膜を透過できるため、細胞内緩衝剤としても機能します[3]。これらの理由から、特に製薬分野での使用にあたっては、トリスの純度管理が非常に重要です。

Metrosep C Supp 2 - 250/4.0カラムとメタン酸

(MSA)溶離液を用いた堅牢なアイソクラティック・イオンクロマトグラフィー(IC)法は、トリスおよびカチオン性不純物の測定に理想的な方法です。この microbore IC system (MB) は、MSA溶離液に対して感度が高く安定したIC導電率検出器MBを搭載

しており、低空隙容量、分析システムの長期安定性、およびトリス定量における高精度な結果をもたらします。

サンプルと前処理

サンプルは、分析試薬(p.a.)品質のTrizma®ベース (TRIS) (CAS番号77-86-1) 粉末から調製しました。方法評価のため、2種類の異なるTRIS濃度(10.37

mg/Lおよび103.7 mg/L)を溶離液(0.1%メタン酸)に溶解しました。

測定

マイクロボアイオンクロマトグラフ 930 コンパクトIC Flex オープン/DEG/MBは、メタン酸 (MSA) に対して安定なIC導電率検出器MBを搭載しており(図1)、ノンサプレッサー型の測定系として、0.1%(v/v)(15 mmol/L)のメタン酸(MSA)を含む溶離液が使用されました(表1を参照)。サンプルはMetrosepのインテリジェント部分ループ注入技術(MIPT、図2)を用いて注入されました。この技術では、250 μ Lのサンプルループに正確に計量された、自由に選択可能な体積(本検討では5~40 μ L)が充填されます。注入量の精密な制御は、2 mLドージングユニットを備えたDosinoにより行われます。MIPTにより、単一の標準液から校正を行うことが可能であり、本試験では5~140 mg/LのTRIS範囲で校正が実施されました。

可変注入量の選択は、サンプル注入にも適用可能です。そのような場合、例えば高濃度の試料に対しては、手動による希釈工程を省略するために少注入量を選択します。

典型的な無機カチオン(リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム)をMetrosep C Supp 2カラムに注入し、共溶出の可能性がないか確認しました。



図 1. IC導電率検出器MBは、セル容量が小さく、メタン酸に対して不活性です。

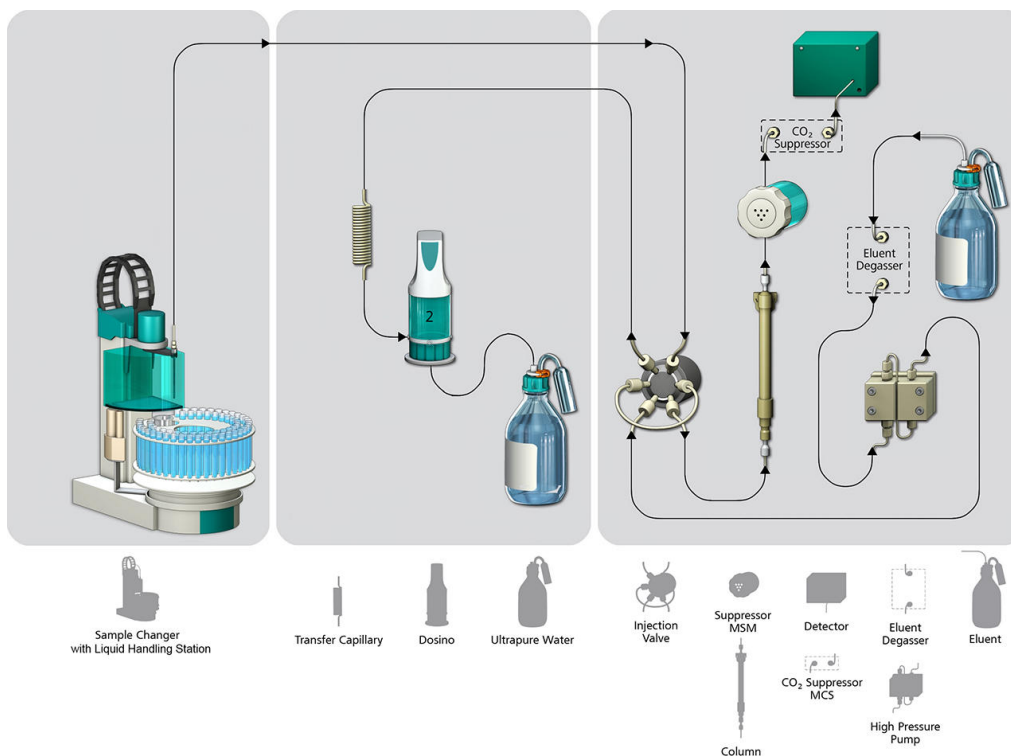


図 2. Metrosepインテリジェント部分ループ注入技術 (MiPT) の流路図：Dosinoにより、サンプルはオートサンプラーからバッファーループに移送され、これにより汚染やキャリーオーバーを防ぎます。その後、Dosinoが μL 単位で希望する注入量を正確にサンプルループに充填します

表 1. TRIS中のカチオン性不純物をマイクロボア・イオンクロマトグラフィーで分析する際のIC法パラメーター

カラム	Metrosep C Supp 2 - 250/4.0
溶離液/希釈液	c(MSA) = 0.1 % (v/v)
流量	1.0 mL/min
温度	30 ° C
注入量	5–40 μL (MiPT)
検出器	電気伝導度検出器

測定結果

TRISの定量は、MB ICシステムを用いたアイソクラティック測定により8分未満で行われます。前述の通り、本手法は主要なカチオンに関して干渉がないことが確認されています。

ナトリウムの保持時間は4.1分でした。例えばカラム温度を20°Cに下げるなど、測定条件を変更することで、ナトリウムとTRISの分離能を向上させることが可能です。本研究で用いた測定条件(表1)では、ピーク高を評価指標として用いることで、精密な定量が可能です。100 mg/LのTRISにおける回収率は99~103%で、相対標準偏差は3%未満であり、本法の高い精度が示されました。

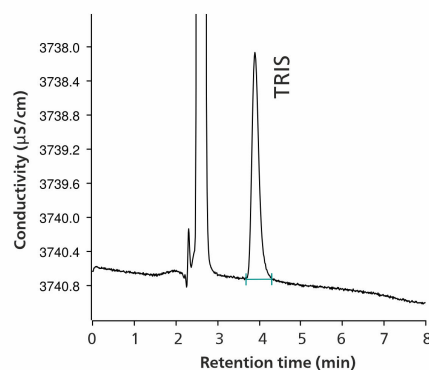


図 3. 100 mg/L TRISを4 µLの注入量 (MiPT) で測定したクロマトグラム

結論

医薬品産業で使用される原材料である溶液やバッファは、その正確な濃度および純度に関して、最高水準の品質基準を満たさなければなりません。

本応用研究の測定系は、マイクロポアイオンクロマトグラフィーシステム、MSAに対して安定な導電率検出器、および単一標準液による自動校正と柔軟な

試料注入量の選択を可能にするMiPTを組み合わせたものです。本手法は、5~200 mg/Lの範囲でTRISの定量に適しており、一般的なバッファ成分であるTRISを簡便かつ精密に、かつ安定して測定することを可能にします。

参考文献

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.155.3.9117032>.

CONTACT

メトロームジャパン株式会社
143-0006 東京都大田区平和島6-1-1
null 東京流通センター アネックス9階

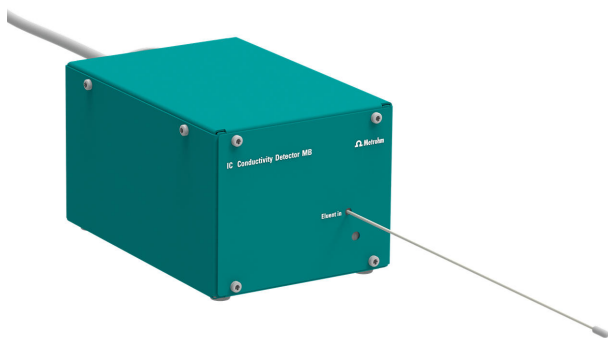
metrohm.jp@metrohm.jp

装置構成



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

The 930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg is the intelligent Compact IC instrument with column oven, sequential suppression, a peristaltic pump for suppressor regeneration and a built-in degasser. The instrument can be used with any separation and detection methods. Typical areas of application: Anion or cation determinations with sequential suppression and conductivity detection; Optimized for microbore (2 mm) applications, ideally suitable for coupling techniques (IC-MS or IC-ICP/MS); Supported with MagIC Net 4.1 and higher



IC Conductivity Detector MB

Compact and intelligent high performance conductivity detector for intelligent IC instruments. Optimized for microbore columns. Outstanding temperature stability, the complete signal processing within the protected detector block and the latest generation of DSP – Digital Signal Processing – guarantee the highest precision of the measurement. No change of measuring ranges (not even automatic ones) is required, due to the dynamic working range. Typical areas of application: Anion or cation determinations with chemical suppression, sequential suppression or without suppression and conductivity detection; Optimized for microbore (2 mm) applications, ideally suitable for coupling techniques (IC-MS or IC-ICP/MS); Specification at a glance: 0–15000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ without range switching; Cell volume: 0.3 μL ; Ring-shaped electrodes made of stainless steel X2CrNiMo17-12-2 (316 L), compatible with MSA; Maximum operating pressure: 10.0 MPa (100 bar); Cell temperature: 20–50 °C in increments of 5 °C; Temperature stability: 0.001 °C; Baseline noise: 0.2 nS/cm typical for sequential suppression; Capillaries: ID 0.18 mm; Supported with MagIC Net 4.1 and higher



Metrosep C Supp 2 - 250/4.0

The longest separation column in the Metrosep C Supp 2 product range is the Metrosep C Supp 2 - 250/4.0. The Metrosep C Supp 2 separation material is based on a polystyrene-divinylbenzene copolymer with carboxyl groups. Thanks to the optimized sodium/ammonium separation of this separation material, this column is perfectly suitable for determination of the smallest concentrations of ammonium in addition to a large amount of sodium. The column is used with sequential suppression. So it is particularly suitable for determining concentrations in the middle $\mu\text{g}/\text{L}$ range and lower.