

色谱法和电位法在测定药物苯溴马隆离解常数中的比较

贾沪宁^a, 陆 婷^b, 于清风^a, 倪坤仪^{a*}

(中国药科大学: a. 分析化学教研室; b. 药学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 离解常数是从分子水平深入理解一些药物的吸收、体内分布以及代谢等研究的一个重要参数。以苯溴马隆为样品, 对色谱法在药物离解常数中的应用进行了考察, 并与经典的电位法进行了详细的比较和分析, 还对毛细管电泳法、电位滴定法进行了优化和改进。

关键词: 离解常数; 苯溴马隆; 色谱法; pH 薄层色谱; 高效液相色谱; 毛细管电泳; 电位滴定

中图分类号: O 657.7; R 917 **文献标志码:** A

文章编号: 0367-6358(2011)10-0588-04

A Comparative Study of Chromatography and pH-potentiometry for Determination of Dissociation Constants of Benzbromarone

JIA Hu-ning^a, LU Ting^b, YU Qing-feng^a, NI Kun-yi^{a*}

(China Pharmaceutical University: a. Department of Analytical Chemistry;

b. School of Pharmacy, Jiangsu Nanjing 210009, China)

Abstract: The dissociation constant constitutes important data for a thorough understanding of absorption, transport and receptor binding of some drugs at the molecular level. The pK_a of benzbromarone was determined by chromatography method and compared carefully with potentiometry method. At the same time, the determination of dissociation constant based on capillary electrophoresis and potentiometry was optimized and improved.

Key words: dissociation constant; benzbromarone; chromatography; thin-layer pH-chromatography; liquid chromatography; capillary electrophoresis potentiometry

离解常数是药物的重要理化参数之一, 是影响药物在体内的吸收、代谢过程及药理作用的重要因素。测定离解常数对于新药研究开发、临床药学研究和制定合理的工艺条件等有重要的指导意义^[1]。电位测定法是测定离解常数最经典的方法, 但是这个方法受到样品和试剂纯度的限制, 并且需要相对较高的样品浓度^[2]。目前报道的可以用来测定离解常数的色谱法主要有三种: 1) 薄层色谱 pH 法是由 Bidló-Iglóy M 首先提出^[3], 这种方法对样品浓度要求不高, 所用仪器设备也较简单; 2) 高效液相色谱法也是用来测定 pK_a 值的一种方法, 但是其准确度不高^[4]; 近几年高效毛细管电泳法也被看做是一种

简单而准确的方法用来测量 pK_a ^[5,6], 此法是基于样品电解质在不同 pH 值的电解液中其对应的电泳迁移能力不同的原理。

对于药物苯溴马隆的解离常数的目前尚鲜见报道, 本文中分别采用上述介绍的色谱法及电位法测定了苯溴马隆的解离常数, 并对各种方法进行了详细的分析和比较。

1 实验方法

1.1 试剂与仪器

苯溴马隆由中国药科大学计生中心自制, 所用试剂均为分析纯。

两组不同甲醇-水比例的标准缓冲液, 分别是:

收稿日期: 2011-04-25; 修回日期: 2011-09-15

作者简介: 贾沪宁(1978~), 女, 讲师, 主要从事药物分析的科研和教学。E-mail: jjhnn@tom.com * 联系人

邻苯二甲酸氢钾甲醇-水缓冲液、乙二酸和乙二酸氢钾甲醇-水混合缓冲液^[7]。

电位滴定法: 0.5 mol/L NaCl 溶液(控制溶液中离子强度), 0.025 和 0.05 mol/L NaOH 溶液, 用邻苯二甲酸氢钾为基准物标定。

薄层色谱 pH 法: 实验所需缓冲液的 pH 范围为 2.0~7.0。pH < 2.5 用 0.1 mol/L 柠檬酸和 0.1 mol/L 盐酸溶液混合配制; pH 在 2.5~7.0 的缓冲液用 0.1 mol/L 柠檬酸和 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液混合配制。

高效液相色谱法: 苯溴马隆 0.05 mg/mL 甲醇溶液。流动相: 一系列不同 pH 值的 0.02 mol/L NaOH 的甲醇-水溶液(70:30(V/V)), 其中 pH 3.0~4.2 用甲酸调节, pH 4.6~6.6 再用乙酸调节。根据文献^[8], 流动相的离子强度恒定, 为 0.02。

高效毛细管电泳法: 苯溴马隆 0.5 mg/mL 甲醇溶液。流动相: 在甲醇的体积分数分别为 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 的甲醇-水混合溶液中加入氢氧化钠, 浓度均为 0.03 mol/L, 并用甲酸调节溶液的 pH 值使得在 2.7~5.5 间。各溶液在运行前均用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤器过滤。

仪器:

电位滴定法: pH S-25 type 型酸度计(上海伟业仪器厂), 微量滴定管。

薄层色谱 pH 法: 制备 pH 薄层板, 称取 30 g GF₂₅₄(青岛海洋化工有限公司) 分别于 200 mL pH 值不同的缓冲液, 搅拌后浸泡 1 h, 然后调节悬浮液的 pH 值至缓冲液的原始 pH 值, 静置 1 d, 至悬浮液的 pH 值不变。滤去多余的悬浮液使得剩余约 70 mL 即可, 研磨后铺板, 室温下干燥 1 d 即得。

高效液相色谱法: 岛津 10AT HPLC 仪, SPD-10AT 紫外检测器, 检测波长 254 nm, N2000 色谱工作站(浙江大学), 大连依利特 C₁₈ 柱(200 × 4.6 mm), 流速为 1 mL/min。

高效毛细管电泳法: Beckman P/ACE 5500 毛细管电泳仪, 其配有自动进样器和二极管阵列检测器; 未涂层毛细管柱(河北永年光纤厂), 内径 50 μm, 总长 47 cm, 有效长度 40 cm; 压力进样 3 s, 运行电压 30 kV, 柱温 25 °C; 负极检测, 检测波长 254 nm。

1.2 实验步骤

1.2.1 电位滴定法

取适量苯甲酸加入到甲醇体积比例分别为 40%, 45%, 50%, 55%, 60% (V/V) 的甲醇-水溶液中配制成 3×10^{-3} mol/L 样品溶液。另外加入

NaCl 溶液, 使 NaCl 在每份溶液中的浓度为 0.1 mol/L。

取适量苯溴马隆加入到甲醇体积比例分别为 55%, 60%, 65%, 70% (V/V) 的甲醇-水溶液中配制成 0.5×10^{-3} mol/L 样品溶液。同样加入 NaCl 溶液, 使 NaCl 在每份溶液中的浓度为 0.1 mol/L。

分别用浓度为 0.05 和 0.025 mol/L 的 NaOH 溶液滴定苯甲酸和苯溴马隆溶液, 记录滴定体积及对应的 pH。

对于一元酸来说:

$$\text{p}K_a = -\log[\text{H}^+] - \log r_{A^-} + \log \frac{n_H}{1-n_H} \quad (1)$$

这里, r_{A^-} 是活度系数, 可以根据 Debye-Hückle 公式计算得到。 n_H 为加质子形成函数, 定义为每个酸根 A⁻ (或碱) 上结合的质子数, n_H 的值计算可依据文献[9]。

对每一滴定点的 (pH, n_H) 数据对作图, 得到一条曲线。在这条曲线上 $n_H = 0.5$ 点, 对应的 pH 值即为 $\text{p}K_a + \log r_{A^-}$ 值, 进而可以计算出离解常数。

1.2.2 薄层色谱 pH 法

取适量苯溴马隆溶于甲醇制成 1.0 mg/mL 的溶液, 在不同 pH 值薄层板上点样, 分别于石油醚: 乙酸乙酯(4:1) 的展开剂中展开。挥干后, 在波长为 254 nm 的紫外灯下检测。

利用分配色谱的基本公式能够推导出的 R_f -pH 关系式:

$$R_f = \frac{b}{b + K_0(1 + K_a \cdot 10^{\text{pH}})} \quad (2)$$

这里, b 是常数, K_0 是未离解酸的分配系数, K_a 是酸的离解常数

公式(2)是一元酸的 pH- R_f 曲线的关系式。在曲线上, 随着 $[\text{H}^+]$ 增加, R_f 值趋于常数 $R_{f,0}$, $R_{f,0}$ 表示未解离酸的比移植。经过推导, 当 R_f 值为 $R_{f,0}/(2 - R_{f,0})$ 时, 对应的 pH 即为 $\text{p}K_a$, 故可以从曲线 R_f -pH 上得到 $\text{p}K_a$ 。

1.2.3 高效液相色谱法

对于每一个 pH 值的流动相, 苯溴马隆的保留时间 t_R 和通过甲醇所测得的死时间 t_0 , 都由三次实验测定求平均值。

在 HPLC 中, 一元酸的表现容量因子 $k^{[10]}$ 与解离常数 K_a 关系如下:

$$k = \frac{k_{HA} + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \cdot k_{A^-}}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}} \quad (3)$$

这里, r_{A^-} 为离子的活度系数, k_{HA} 是中性分子 HA

的容量因子, k_A^- 完全离子化离子 A^- 的容量因子, 均为常数。

从上式中可以看出, 利用 Matlab 数据处理软件, 将 k 对 $[H^+]$ 做非线性回归即可得到 K_a 。

1.2.4 高效毛细管电泳法

毛细管在使用前分别用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液冲洗 1 min、再用流动相溶液冲洗 1 min。每个条件的样品溶液重复测定 3 次求平均值。

根据酸在电泳中的淌度表达式^[11]和解离常数 K_a 的定义, 可得到以下关系式

$$\frac{1}{u_e} = \frac{1}{u_{A^-}} + \frac{[H^+]}{K_a \cdot u_{A^-}} \quad (4)$$

其中 r_A^- 为离子的活度系数; u_e 是有效淌度; u_{A^-} 为完全解离的离子 A^- 的有效淌度, 为一常数。

表 1 苯甲酸在 40% (V/V) 的甲醇-水溶液中的滴定数据

体积/mL	0.000	0.130	0.260	0.392	0.530	0.660	0.795	0.940	1.070	1.215	1.350	1.480
pH (-log[H ⁺])	3.57	3.90	4.16	4.37	4.55	4.72	4.90	5.11	5.37	5.70	7.11	10.40
n_H	0.9153	0.8695	0.7966	0.7129	0.6210	0.5334	0.4411	0.3417	0.2520	0.1517	0.0580	< 0

表 2 pH 薄层色谱法中苯甲酸和苯溴马隆在不同比例的甲醇-水混合溶液中的 pK_a 值

甲醇比例 (V/V)/%	40	45	50	55	60	65	70
苯甲酸的 pK_a	4.83	4.91	4.97	5.04	5.11	-	-
苯溴马隆的 pK_a	-	-	-	5.11	5.19	5.31	5.41

对于甲醇-水混合溶剂中 pH 值的测定可用与 IUPAC 中测定水中 pH 值标准相似的方法, 即用已知 pH 值的混合溶剂的标准缓冲液来校正 pH 计^[7], 从而准确测得待测混合溶液的 pH 值。但此法应用于电位滴定法中鲜见报道, 故本文用已知解离常数的苯甲酸做验证, 发现与文献值相一致^[12], 说明此方法准确可行。

活度系数是由离子强度决定的, 但是加入氢氧化钠之后离子强度改变。为了控制离子强度不变, 我们在待测溶液中加入了定量的氯化钠, 其浓度需远大于样品。

2.2 薄层色谱 pH 法

在使用薄层色谱测定解离常数时, 计算出每一块薄层板的 R_f 值, 并对 pH 值做曲线,

从 R_f -pH 曲线上可得 $R_{f,0}$ 值约为 0.644 (见图 1)。进而计算出 R_f 值为 $R_{f,0}/(2 - R_{f,0})$ 即 0.475 时, 此时对应的 pH 值 5.82 即为 pK_a 值。

薄层色谱 pH 法测得的解离常数与电位滴定法所测结果相差较大, 这可能是由于溴苯马隆在水中的溶解度太小所致。同时, 吸附在硅胶上的水也是

将 $\frac{1}{u_e}$ 对 $[H^+]$ 做线性回归即可得到 K_a 。

2 结果与讨论

2.1 电位滴定法

表 1 显示了苯甲酸在 40% (V/V) 的甲醇-水溶液中的一组滴定值, V 为加入的 NaOH 的体积, pH 为待测样品溶液在每次滴入 NaOH 后相应的 pH 值。作 pH- n_H 曲线, 根据曲线得到 pK_a 值。依次再测得其他甲醇比例溶剂中的解离常数。则样品在水中的 pK_a 值可由一系列的不同比例混合溶剂中 pK_a 回归得到。表 2 显示了苯甲酸和苯溴马隆在各个百分比的甲醇-水混合物的 pK_a 值。经过线性回归, 水溶液中苯甲酸、苯溴马隆的 pK_a 值分别为 4.28 和 3.98。

微量, 所以样品的电离被抑制了。

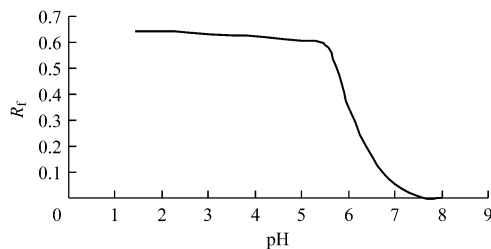


图 1 苯溴马隆的 R_f -pH 曲线图

2.3 高效液相色谱法

为了测定苯溴马隆的 pH 值, 计算出流动相 pH 值为 3.0~6.6 之间的所得的色谱图 (见图 2) 中的容量因子。再将容量因子对溶液 $[H^+]$ 浓度利用非线性最小二乘拟合法, 计算出 pK_a 值为 4.94。

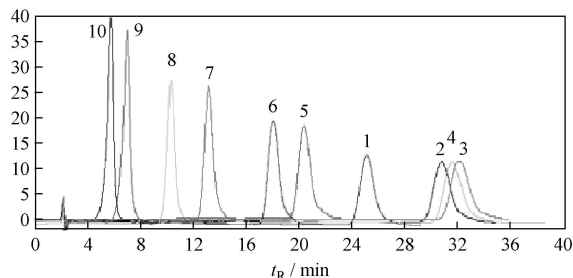


图 2 苯溴马隆在不同 pH 流动相中的色谱图

- 1. 3.03; 2. 3.43; 3. 3.77; 4. 4.21; 5. 4.63; 6. 4.97; 7. 5.36;
- 8. 5.72; 9. 6.21; 10. 6.62

计算过程中发现, 在 pH 3.03 时的数据不能采用, 误差较大。这是由于此时样品完全成分子状态,

保留时间不再随 pH 值变化而不同。

在这个方法中,我们只能测定 70% 甲醇溶液中的离解常数,因为在 60% 甲醇流动相中(pH 值为 3.4 时)的保留时间大于 60 min。这是液相色谱法测定药物离解常数的一个缺陷,很难测定高比例水的流动相中药物的离解常数。另一个缺陷是流动相的 pH 范围受到柱填料的稳定性的限制,因此对所测 pK_a 值也有所限制。

2.4 高效毛细管电泳法

利用高效毛细管电泳法测定 pK_a 值时,记录了 pH, t_{app} (样品迁移时间), t_{eof} (电渗时间) 以及甲醇水混合溶液中所有的离子强度。

在等式 4 中,我们发现在计算中可以 $\frac{1}{t_{app}} - \frac{1}{t_{eof}}$

用代替 μ_e , 原因是 μ_e 和 μ_{A^-} 有相同的部分 $\frac{L_c \cdot L_d}{V}$ 。

这一简化的改进过程将提高此方法的准确性。由 $1/(1/t_{app} - 1/t_{eof})$ 对 $[H^+]$ 进行线性回归,得到了不同百分比有机溶剂中的 pK_a 值,见表 3。再将 pK_a 值对甲醇体积比作图,见图 3。

表 3 毛细管电泳法中苯溴马隆在不同比例的甲醇-水混合溶液中的 pK_a 值

甲醇比例 (V/V)/%	30	40	50	60	70
苯甲酸的 pK_a	4.33	4.38	4.45	4.12	3.98

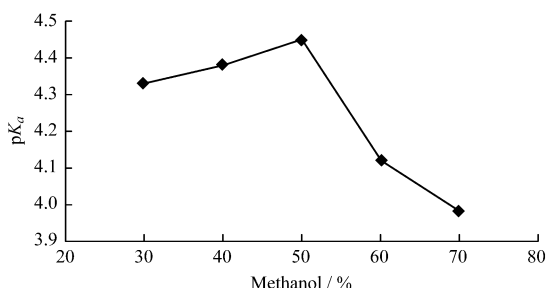


图 3 毛细管电泳法中苯溴马隆的 pK_a -甲醇比例曲线

从图中我们可以看出,当甲醇比例为 30% ~ 50% 时, pK_a 值随着甲醇比例的增加而逐渐增大;从

甲醇比例为 60% 以上, pK_a 值开始变小。

以甲醇 30%, 40%, 50% 的百分比对应的 pK_a 值来回归甲醇比例为 0 时即纯水中苯溴马隆的 pK_a 值为 4.15。

3 结论

从本文结果看,三种色谱法中高效毛细管电泳法测定的苯溴马隆 pK_a 值与电位法结果基本一致。高效液相色谱法最重要的缺陷是当有机溶剂在流动相中比例较低时,由于保留时间太长,无法测定其离解常数。当样品在水中的溶解度很低时,薄层色谱 pH 法不再可取。

参考文献:

- [1] 李玉琴, 张传港, 宗素艳, 等. 药物分析杂志[J], 2008, 28(2): 243-246.
- [2] 管清香, 林天慕, 王恩思. J of Pharm Aceutical Practice[J], 2007, 25(5): 290-291.
- [3] Bidk-Igkby M. Acta Chim Acad Sci Hungaricae[J], 1976, 88(2): 116.
- [4] 张伟, 荣娜娜, 催文博, 等. 云南中医学院学报[J], 2010, 33(5): 28-32.
- [5] 李菲, 丁中涛, 曹秋娥. 中国中药杂志[J], 2007, 32(2): 166-168.
- [6] Anderot M, Nilssona M, Végvári A, et al. J of Chromatog B[J], 2009, 877, 892-896.
- [7] Mussini T, Longhi P, Marcolungo I, et al. Fresenius J Anal Chem[J], 1991, 339: 608-612.
- [8] Gluck S J, Steele K P, Benko M H, J Chromatogr, A[J], 1996, 745: 117-125.
- [9] 王夔, 尘贤萱. 分析实验室[J], 1985, (4): 46.
- [10] Barbosa J, Bergés R, Sanz-Nebot V, et al. Anal Chem Acta[J], 1999, 389: 43-52.
- [11] Barbosa J, Barrón D, Jiménez-Lozano E. J Chromatogr, A[J], 1999, 839, 183-192.
- [12] 于如古, 分析化学, 第二版上册[M], 北京: 人民卫生出版社, 1988: 283.

《化学世界》征订启事

2012 年报刊订阅已经开始, 本刊《化学世界》订价仍为 12 元/本, 全年 144 元。欢迎到各地邮局订阅。本刊邮发代号 4-19。地址: 上海南昌路 203 号, 电话: 021-64733615。