

紫外光谱法测定枸橼酸托法替布的解离常数



王金祥^{1,2}, 贺改花^{1,*}

¹ 锦州医科大学药理学系, 辽宁锦州 121001

² 赛乐医药科技有限公司, 上海 201203

摘要: 研究目的: 解决了枸橼酸托法替布解离常数无确凿报道的问题, 该文首次使用紫外光谱法不同解离常数模型算法通过实验测定了枸橼酸托法替布的解离常数, 为药物分析和剂型设计提供重要参考。方法: 用紫外光谱扫描不同枸橼酸托法替布 pH 梯度溶液, 得到枸橼酸托法替布的特征吸收波长, 使用 Adrien Albert 推荐的光谱法中解离常数算法, 根据分子态枸橼酸托法替布和离子化态枸橼酸托法替布的吸光度比值的对数值和 pH 的数据, 计算出枸橼酸托法替布的解离常数。同时, 根据选择不同参比波长和主特征吸收波长的吸光度比值与 pH 的关系曲线图推导出酸性环境下的电离突跃点, 该突跃点即离子和分子态各一半的 pH 值对应值为解离常数。结果: 得出枸橼酸托法替布在酸性条件下的解离常数为 6.0。并且, 使用商业化解离常数推算软件根据枸橼酸托法替布结构式推算出该物质 pKa 与实验结果接近, 佐证了结果的准确性。配制相应的 pH 的缓冲液测试样品, 分析结果情况良好。结论: 使用紫外光谱法测定弱酸弱碱盐-枸橼酸托法替布的解离常数方法简单快捷, 测定结果可信。

关键词: 枸橼酸托法替布; 紫外光谱法; 解离常数; pKa

DOI: [10.57237/j.cse.2024.01.003](https://doi.org/10.57237/j.cse.2024.01.003)

The Dissociation Constant of Tofacitinib Citrate Was Determined by Ultraviolet Spectroscopy

Wang Jinxiang^{1,2}, He Gaihua^{1,*}

¹ Department of Pharmacy, Jinzhou University, Jinzhou 121001, China

² Elite Pharmatechnology (Shanghai) Company, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective: In order to solve the problem that there is no conclusive report of the dissociation constant of tofacitinib citrate, the dissociation constant of tofacitinib citrate was determined for the first time by using the model algorithm of different dissociation constants of ultraviolet spectroscopy. It provides an important reference for the analysis and design of the drug form. Methods: The characteristic absorption wavelengths of tofacitinib citrate were obtained by scanning the pH gradient solutions of different tofacitinib citrate by ultraviolet spectroscopy, and the dissociation constant of tofacitinib citrate was calculated according to the logarithmic value of the absorbance ratio of the molecular tofacitinib citrate and the ionized tofacitinib citrate and the data of pH calculation. At the same time, the

基金项目: 锦州医科大学大学生创新创业训练项目 (基金号: X202210160105); 校级教改项目 (项目编号: 181231203035).

*通信作者: 贺改花, ghHe2020@yeah.net

收稿日期: 2023-12-21; 接受日期: 2024-01-24; 在线出版日期: 2024-03-11

<http://www.chemscieng.com>

ionization hop in the acidic environment is derived according to the relationship between the absorbance ratio and pH of the selected different reference wavelengths and the main characteristic absorption wavelength, and the pH value of the ionic and molecular states is the dissociation constant. Results: The dissociation constant of tofacitinib citrate under acidic conditions was 6.0. In addition, the pKa of the substance was calculated according to the structural formula of tofacitinib citrate using commercial dissolution constant estimation software, which was close to the experimental results. The accuracy of the results is corroborated. Buffer test samples corresponding to pH were prepared, and the results were well analyzed. Conclusion: The method of determining the dissociation constant of weak acid and weak base salt - tofacitinib citrate by ultraviolet spectroscopy is simple and fast, and the determination results are reliable.

Keywords: Tofacitinib Citrate; Ultraviolet Spectroscopy; Dissociation Constant; pKa

1 引言

化合物的电离程度在其吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 特征的表征中起着重要作用。电离形式中, 药物分子比其未电离态 (分子态) 更易溶, 但膜渗透性更低[1]。在水溶性较差的药物的情况下解离常数 (pKa) 的重要性更加凸显, 尤其是在其吸收, 分布和代谢和排泄的药代动力学方面[2]。

和油水分配系数 LogP 类似, 解离常数作为物质的重要特性, 在药物制剂分析及药物剂型设计中起着关键作用。解离常数对于物质在色谱分析中在固定相上中保留, 起着决定性作用。

枸橼酸托法替布作为抗类风湿的一线用药, 其解离常数研究尤显重要, 但关于枸橼酸托法替布解离常数的研究, 目前无相关研究报道, 导致其色谱分析方法中缓冲液选择的多样性和无序性。例如, 枸橼酸托法替布的含量液相测定方法文献报道的不少, 其流动相中的缓冲液各文献报道大相径庭, 有使用 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液的[3], 有使用 0.1% 醋酸铵溶液作为缓冲液的[4]。也有使用 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液使用氢氧化钠调节 pH 7.0 [5]作为缓冲液的。笔者参考当前 pKa 研究的最新方法思路, 使用紫外光谱法[6], 在枸橼酸托法替布的 pH 梯度溶液中测定了其解离常数 pKa 值, 同时使用两种不同方法进行了结果的对比, 同时与计算机软件计算模拟的结果进行了对比, 解决其分析测试中流动相的缓冲盐溶液的选择, 确定了缓冲液的合适 pH 值。同时也为药物制剂的设计提供了参考。

2 材料与方法

2.1 药品试剂与仪器

紫外分光光度计 (Lab solution), pH 计 (FE28) 枸橼酸 (AR 级), 枸橼酸三钠 (AR 级) 枸橼酸托法替布原料 (含量 100%, 批号: 20220301) 盐酸 (AR 级, 批号: 20220901) 去离子水 (临用新制) Marvin Sketch (版本号 20.8.0)。

2.2 方法

2.2.1 不同 pH 缓冲液组成选择

枸橼酸托法替布化合物中含有枸橼酸阴离子, 枸橼酸属于弱酸, 因此, 采用不同组成的枸橼酸-枸橼酸三钠缓冲液配制[7]不同 pH 值的缓冲液的方法来测试, 减少了采用其他阴离子所造成的测试主成分的改变, 同时减少了其他阴离子对结果干扰, 同时 API 的电离稳定性得到保证。(注: pH 1.2 缓冲液使用 0.1N 盐酸溶液配制。)

2.2.2 pH 梯度溶液的光谱扫描

分别配制称取约 20mg 的枸橼酸托法替布原料药数份, 分别用 0.1N 盐酸、pH 3.0、pH 3.2、pH 3.5、pH 3.8、pH 4.0、pH 4.4、pH 5.0、pH 5.4、pH 6.0、pH 6.4 的缓冲液溶解并稀释至 100ml 刻度。在 200nm~400nm 进行紫外扫描 (比色皿厚度 1mm)。光谱图扫描显示, 289nm、220nm 均为其溶液的特征吸收波长, 359nm 为其弱特征吸收波长 (后两者的摩尔吸光系数与 289nm 不同)。(光谱图见图 1)

2.2.3 不同特征波长下枸橼酸托法替布的 pH 梯度缓冲液的吸光度结果测定

因枸橼酸托法替布在不同 pH 缓冲液中不存在二次电离本身性质较为稳定。在 289nm 下，对枸橼酸托法替布在不同 pH 的枸橼酸-枸橼酸三钠溶液进行吸光度测定，记录测定结果见表 2。因单波长测定 pKa 结果可能存在误差[8]，为解决单一波长紫外测定解离常数结果的精密度及准确度[9, 10]，笔者同时测定了 220nm 下不同 pH 梯度样品溶液的吸光度，见表 1、表 2。

2.2.4 解离常数 pKa 确定

1) 公式计算法。根据 Adrien Albert 推荐的解离常数的计算方法[11-13]进行计算。采用公式计算： $pK_a = pH + \log_{10}((dm-d)/(d-di))$ 式中，pH 为该溶液的 pH 值，dm 为游离分子态下该溶液的吸光度（289nm 下取 1.2 介质中测得的吸光度 1.09707），d 为每个不同 pH 梯度溶液中测得的吸光度。di 为离子化状态下测得的吸光度（289nm 下取 0.52413）。计算出枸橼酸托法替布解离常数。结果见表 1、表 2。

2) 曲线推导法。计算选定的参比波长 220nm、359nm 下 pH 3.0 溶液中的摩尔吸光系数。计算吸光度比值。摩尔吸光系数计算公式： $A=kcl$

式中：A 为吸光度值，单位，Au

K 为摩尔吸光系数，单位： $Au \cdot l/g \cdot cm^{-1}$ （每摩尔

该物质在每升溶液在 1cm 的比色皿中的吸光度）；

l 为比色皿厚度，单位：cm

其中 359nm 为枸橼酸托法替布特征末端特征吸收波长。绘制 pH-吸光度比值曲线，在曲线的拐点处确定该物质 pKa 的方法作为对比方法 2 [14]，推算该物质在 3.0~6.4 段的 pKa 结果。见表 3 及图 2、图 3。

2.2.5 使用商业计算机模拟软件推算枸橼酸托法替布不同电离部位的解离常数

使用商用计算机模拟软件根据物质特征结构进行模拟计算 pKa [15]，使用 Marvin Sketch 20.8.0 版本推算不同位点的解离常数结果。结果见图 4。

2.2.6 使用测得的 pKa 进行液相测试色谱分离结果

根据 $pK_a \pm 2$ 以外选择缓冲盐，配制流动相分析样品。结果见图 5。

2.3 结果

2.3.1 特征吸收波长测试结果

按 2.2.2 项下，对不同 pH 梯度溶液在 200~400nm 波长范围内进行扫描，得到枸橼酸托法替布紫外光谱扫描图。

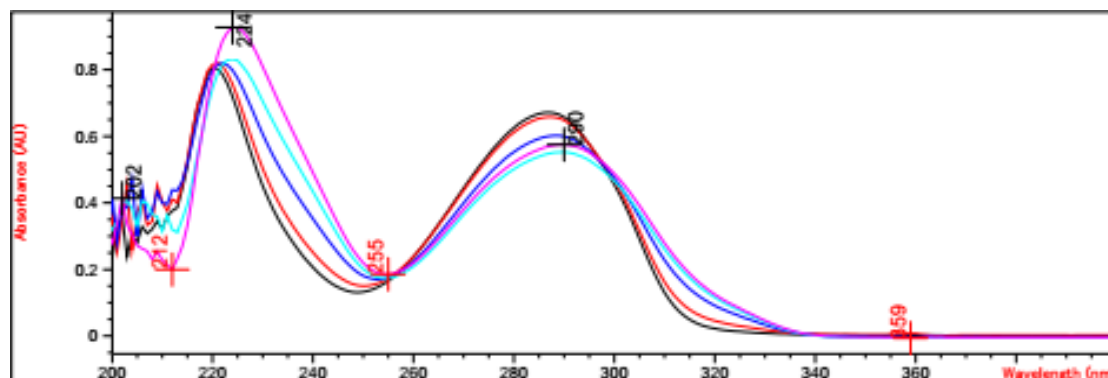


图 1 pH 梯度枸橼酸托法替布的紫外光谱图

结果：枸橼酸托法替布在不同 pH 梯度缓冲液中特征吸收波长不变，289nm、220nm、359nm 均为其特征吸收波长。缓冲液未改变物质的结构，物质也未发生二次电离。

2.3.2 不同 pH 梯度缓冲液的吸光度结果测定

表 1 289nm 下吸光度测定结果

pH 值	289nm 吸收值	分子状态吸收值	完全离子状态吸收值	计算结果	pKa 平均值
1.2	1.09707	1.09707	0.52413	---	5.5
3.0	0.54923			4.34	
3.4	0.54229			4.88	
3.8	0.56783			4.89	
4.0	0.52413			---	
4.4	0.54469			5.83	
5.0	0.59394			5.86	
5.4	0.61871			6.10	
6.0	0.63274			6.63	
6.4	0.65877			6.91	

表 2 220nm 下吸光度测定结果

pH 值	220nm 吸收值	分子态吸收值	完全离子状态吸收值	计算结果	pKa 平均值
1.2	1.79688	1.79688	0.78980	---	6.2
3.0	0.89968			3.91	
3.4	0.81886			4.93	
3.8	0.86311			4.91	
4.0	0.79646			6.18	
4.4	0.78980			---	
5.0	0.83152			6.36	
5.4	0.80839			7.13	
6.0	0.79693			8.15	
6.4	0.79825			8.47	

取表 1 及表 2 所得 pKa 结果, 求均值, 计算得到酸阶段枸橼酸托法替布的解离常数 pKa 结果: 5.9。

2.3.3 pH-吸光度比值曲线推导法测定枸橼酸托法替布的解离常数

按 2.2.4 2) 项下方法计算摩尔吸光系数及吸光度比值, 结果见表 3。

表 3 吸光度比值统计结果

pH/吸光度比值	359*	220**	A ₂₈₉ /A ₃₅₉	A ₂₈₉ /A ₂₂₀
3.0	0.00635	0.92747	90.51	0.62
4.0	0.00674	0.83190	81.93	0.66
5.4	0.00367	0.82011	164.11	0.73
6.0	0.00775	0.82044	84.95	0.80
6.4	0.00133	0.80583	505.04	0.83

“*”表示参比 359nm 下吸收值。该波长下, 枸橼酸托法替布在 pH 3.0 溶液中摩尔吸光系数: 1554457。

“**”表示参比 220nm 下吸收值。该波长下, 枸橼酸托法替布在 pH 3.0 溶液中摩尔吸光系数: 226919794。

注: 289nm 下 pH 3.0 溶液中摩尔吸光系数为 140694823

表 3 统计了不同 pH 梯度溶液, 对应于不同摩尔吸

光系数的参比波长下的吸光度比的情况。

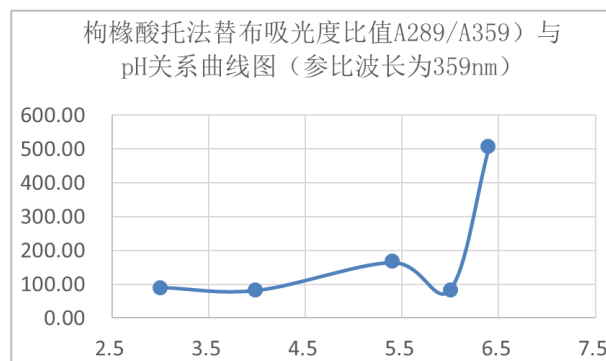


图 2 双波长模式下 pH-吸收度比值曲线图

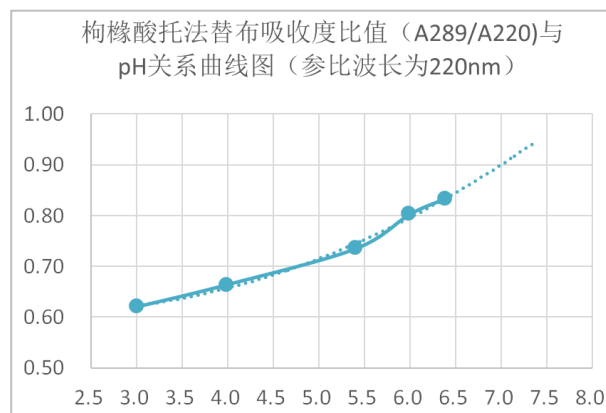


图 3 双波长模式下 pH-吸收度比值曲线图

注: 曲线中虚线部分为多项式函数拟合前推一个周期延伸部分。结果: 由图 2, 图 3 结果可知, S 型曲线拐点处 pH 值即为枸橼酸托法替布的 pKa 值。解离常数为 6.0。

2.3.4 使用 Marvin Sketch PKa 软件推算 pKa 结果图

软件推算枸橼酸托法替布解离常数见图 4。

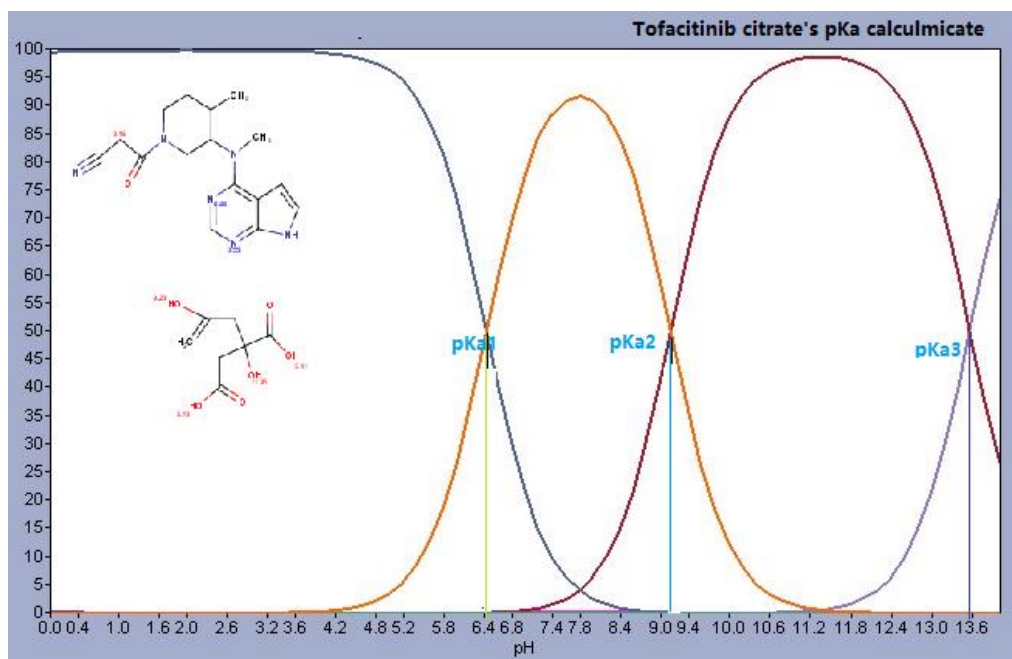


图4 Marvin Sketch 软件推算 pKa 结果图

结果：根据软件对枸橼酸托法替布结构中托法替布不同部位的 N^+ 的电离常数推算及枸橼酸的不同部位电离模型计算，推算出酸性环境下 pKa 结果为 6.4，与笔者的计算结果基本相同。该物质在碱性环境有两个解离常数。

2.3.5 缓冲盐选择及流动相确定

根据所计算得到的解离常数，选择 10mM 甲酸铵[16]溶液作为缓冲液（pH 在 4.0 左右），甲酸铵缓冲液甲酸调节 pH 4.0 与乙腈作为流动相测试枸橼酸托法替布有关物质。使用梯度洗脱。结果枸橼酸托法替布色谱保留性及色谱峰形均良好，重现性良好。见图 5。

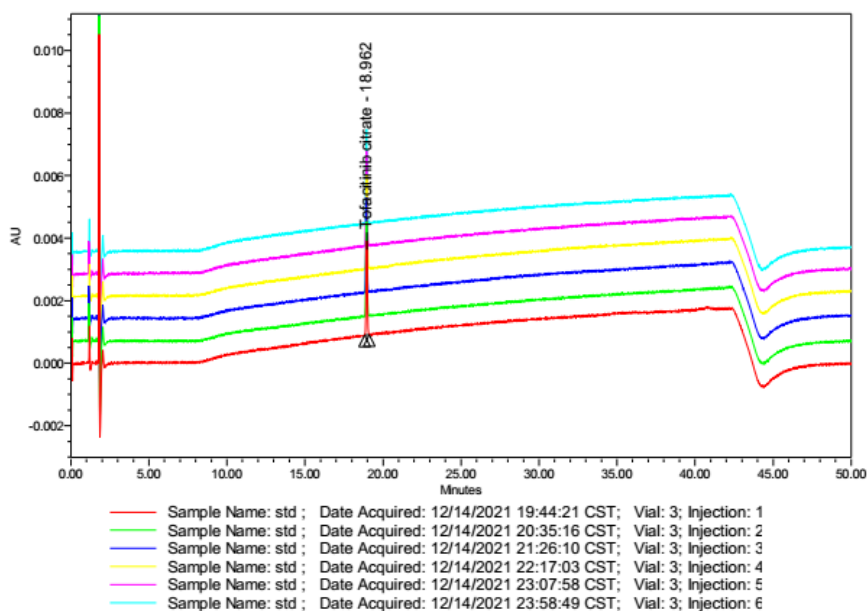


图5 枸橼酸托法替布有关物质对照品溶液系统适用性色谱图

2.3.6 结果分析及说明

使用紫外光谱法, 根据不同 pK_a 的算法, 采用酸阶段游离态和电离离子态下的吸光度进行与 pH 关联的对数函数计算及基于不同摩尔吸光系数的双波长模式吸光度比值和 pH 关系曲线推导法分别计算解离常数, 同时, 结合商业软件测试, 确定了光谱法测定枸橼酸托法替布的解离常数结果, 结果为 6.0。其中, 双波长- pH 曲线法中参比波长选择 359nm 更为合理。

3 结论

该文使用紫外光谱法对枸橼酸托法替布在酸性环境下的解离常数进行了测定, 结果表明其在酸性条件下解离常数约为 6.0。采用三种方法对比研究, 结果基本一致。参考该解离常数配制流动相, 结果色谱峰峰形良好。因枸橼酸托法替布结构中的氨基存在数个电离位点, 因此, 继续在碱性环境下考察其解离情况, 进一步测定托法替布在碱性环境下的解离常数, 可以为全面了解其在 1~12 的 pH 范围内的解离常数奠定更加全面的基础。

参考文献

- [1] G. Volgyi, R. Ruiz, K. Box, J. Comer, E. Bosch, K. Takacs-Novak, Potentiometric and spectrophotometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in a new cosolvent system[J], *Analytica Chimica Acta* 2007, 583(2): 418–428.
- [2] S. Babic, A. J. M. Horvat, D. M. Pavlovic, M. Kastelan-Macan, Determination of pK_a values of active pharmaceutical ingredients [J], *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(11): 1043–1061.
- [3] 陈娇婷, 詹怡飞. HPLC 法测定枸橼酸托法替布的含量 [J], *中国民族民间医药*, 2015, 24(17): 23-24.
- [4] 张群, 戚兰君, 徐凯等, HPLC 法检测设备表面枸橼酸托法替布含量 [J], *特别健康*, 2017, 19: 246-247.
- [5] 孙丽娇, 吕明明, 高爽等. RP-HPLC 法测定枸橼酸托法替布含量及有关物质 [N]. *沈阳药科大学学报*, 2018, 02: 131-137.
- [6] Saranjit Singh, Nishi Sharda, Lalit Mahajan, Spectrophotometric determination of pK_a of nimesulide [J], *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 176(2): 261-264.
- [7] USP Buffer solution [M] USP, 2023: 6223.
- [8] Wigler PW, Wilson LE. Spectrophotometric determination of the acid dissociation constants of 3-hydroxypyridine [J], *Anal Biochem*, 1966, 15(3): 421-5.
- [9] Allen RI, Box KJ, Comer JEA, Peake C, Tam KY. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionisable drugs [J], *Pharm Bio Anal*, 1998, 17: 699-712.
- [10] Takacs-Novak K, Tam KY. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study [J], *Anal Chim Acta*, 2001, 434: 157-67.
- [11] A. Albert E. P. Serjeant. Ionisation Constants of Acids and Bases [M] Methuen & Coltd., London, 1962.
- [12] Adrien Albert, E. P. Serjeant. The Determination of Ionization Constants [M] 1984, Chapter 4: 70-101.
- [13] M. M. Pandey, A. Jaipal, A. Kumar, R. Malik, S. Y. Charde. Determination of pK_a of felodipine using UV-Visible spectroscopy [J], *Spectrochimica Acta A Molecular Biomolecular Spectroscopy* 2013, 115: 887-90.
- [14] Jetse Rei Jenga, Arno van Hoof, Antonie van Loon, and Bram Teunissen, Development of Methods for Determination of pK_a Values [J], 2013, 8: 61.
- [15] Xing L, Glen RC, Clark RD. Predicting $pK(a)$ by molecular tree structured fingerprints and PLS [J], *Chem Inf Comput Sci*, 2000, 43(3): 870–9.
- [16] Loy R., Snyder, Joseph J. Glajch Practical HPLC method development 2nd [M] English language Editon published, Beijing, 1997, 7: 315.