技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)11-1546-03

利用紫外分光光度法测定罗格列酮游离碱的 pKa 值

吴禄春,甘勇军,方大树,王施韦,胡湘南
(重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立测定胰岛素增敏剂罗格列酮游离碱电离平衡常数值的方法并测定罗格列酮游离碱的电离平衡常数。方法:将 pH1.64、5.76、6.41、6.91、7.14、7.46、10.64 的罗格列酮游离碱甲醇溶液分别在 200～400 nm 处扫描,并在选定波长 312、317、326、330 nm 处测定其吸收度,得到罗格列酮游离碱电离平衡常数值。结果:罗格列酮游离碱的 pKa 值为 7.09。结论:该方法简便易行,适用于测定酸碱 pKa 值在 2～9 之间的药物。

【关键词】胰岛素增敏剂 罗格列酮 电离平衡常数
【中国图书分类法分类号】R977.1+5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-11

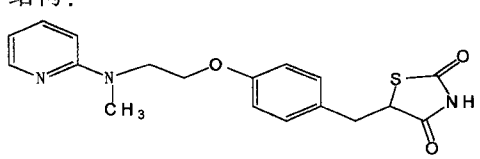
Determination of ionization equilibrium constant for insulin-sensitizer rosiglitazone free base

WU Lu-chun , et al
(*Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method for determination of ionization equilibrium constant of insulin-sensitizer rosiglitazone free base. *Methods*: Methanol solutions of Rosiglitazone free base with pH values of 1.64, 5.76, 6.41, 6.91, 7.14, 7.46 and 10.64 were respectively scanned at the wavelength within the range of 200~400 nm. The absorbance and pKa value of rosiglitazone were determined at the selected wavelength of 312, 317, 326 and 330nm respectively. *Results*: The ionization equilibrium constant value of rosiglitazone free base was 7.09. *Conclusion*: The present method is convenient and applicable for determination of pKa 2~9 of drugs.

【Key words】Insulin-sensitizer; Rosiglitazone; Ionization equilibrium constant

胰岛素增敏剂罗格列酮(Rosiglitazone)[1]游离碱的化学结构:



其化学名是:5-{4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)-氨基)-乙氧基]-苄基}-2,4-噻唑烷二酮,属于噻唑烷二酮类具有胰岛素增敏作用的降糖药,它能通过与过氧化物酶增殖体激活受体 γ 结合而发挥作用,以达到增加组织胰岛素敏感性的作用。在已经上市的产品中,包括了马来酸盐(文迪亚),钠盐(太罗)等。临床疗效显著,需求日益扩大,市场广阔。已经成为口服抗糖尿病药物的新生主力军。

但由于罗格列酮激动活性较强,作用广泛,因而存在较多副作用,诸如体重增加、水肿、舒张压明显下降、增加心血管疾病甚至致死的风险、增加充血性心力衰竭的发生率。还有报道称存在严重的致骨质疏松副作用[2,3]。

为此我们认为有必要对罗格列酮等噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂进行深入的研究,详细了解副作用产生的化学结构原因及可能的改进方法。电离平衡常数 pKa 是研究药物理化性质、构效关系、合成条件、制剂、分析以及药物在体内吸收、分布、代谢等的一个重要参数。因此,了解罗格列酮游离碱的电离平衡常数就变为必要的工作之一。电离平衡常数的测定方法据文献报道有电势滴定法、紫外分光光度法、热力学方法、核磁共振法、毛细管电泳法、薄层色谱法等[4,5]。因紫外分光光度法方便简洁,结果准确,故本文首先采用紫外分光光度法对罗格列

作者介绍:吴禄春(1980-),男,硕士,
研究方向:药物化学。
通讯作者:胡湘南,男,副教授,E-mail:huxiangnan@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2006BB5286)。

酮游离碱的电离平衡常数进行了测定。

1 仪器与试药

紫外分光光度计(日本岛津 UV-3150);pH 酸度计(梅特勒 320);电子天平(瑞士梅特勒—托利多公司 AB204-E);缓冲液:配制 pH1.71、2.32 的盐酸 - 乙酸钠缓冲液 pH5.8、6.4、6.8、7.2、7.6 的磷酸盐缓冲液和 pH10.4、11.0 的氨盐缓冲液,并用氯化钾调节离子强度一致。准确测得 pH 值分别为 1.64、2.24、5.76、6.41、6.91、7.14、7.46、10.64、11.20[6]。

罗格列酮游离碱来源:马来酸罗格列酮(文迪雅)30 片(葛兰素史克公司生产,每片含 4 mg 罗格列酮游离碱,批号 06030014)。在研钵中磨碎,用滤纸包好,放在半微量提取器中用乙醇(95%)提取 12 h,冷却,减压蒸去提取液溶剂,残留物加水 40 ml 用 10% Na_2CO_3 碱化,得混浊液体,用氯仿(3×40)提取,氯仿提取液用水洗至中性,加无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸去氯仿,得残留物,加甲醇 15 ml,加热溶解,放置得结晶约 40 mg,熔点 152~154℃,含量 99%(HPLC 归一化法)。IR:3407(N-H),3056,2933(CH),1743,1700(C=O),1613,1543(苯环,吡啶环),1252(芳醚) cm^{-1}。MS(m/z):358.2 [M+1]。^{1}HNMR(d_6-DMSO) δ:3.06(s,3H),3.04~3.30(m,2H),3.90 (t,2H),4.11 (t,2H),4.84~4.88 (m,1H),6.60(t,1H),6.72(d,1H),6.86(d,2H),7.14(d,2H),7.55(t,1H),8.07(d,1H),12.02(s,1H)。

2 原理、方法与结果

2.1 原理

有机弱酸弱碱性药物在介质中可发生电离。以有机弱酸为例,其电离可简单的表示为:

$HB = H^+ + B^-$

根据质量作用定律,在稀溶液中

$Ka=[H^+][B^-]/[HB]$ ………………………… 1

式 1 中,电离平衡常数 Ka 常用其负对数 pKa 表示。对上式等号两边取负对数,得:

$pKa=pH+lg([HB]/[B])$ ……………………… 2

式中 HB 为共轭酸,B 为共轭碱。

如果 HB 和 B 均有紫外吸收,则可用紫外分光光度法测定其 pKa 值。测定时,可取待测药物,配制成 3 份浓度相等的溶液(编号:1、2、3),通过调节 pH 值,使溶液 1 中的药物,部分为 HB,部分为 B;溶液 2 中的药物以 HB 形式存在;溶液 3 中的药物以 B 的形式存在。在一定的波长处分别测定溶液 1、2、3 的吸收度 A、A_{HB}、A_B。设 3 种溶液中的药物浓度分别为溶液 1 中药物浓度是 C,溶液 2 中浓度是 C_{HB},溶液 3 的浓度是 C_B,因为在同一波长下

$A=A_{HB}+A_B=\varepsilon_{HB}\cdot([H]\cdot C)/(Ka+[H])+\varepsilon_B\cdot(Ka\cdot C)/(Ka+[H])$

$=(\varepsilon_{HB}\cdot[H]\cdot C+\varepsilon_B\cdot Ka.C)/Ka+[H]$

又 $A_{HB}=\varepsilon_{HB}\cdot C$, $AB=\varepsilon_B\cdot C$,代入上式整理得,

$A=(A_{HB}\cdot[H]+A_B\cdot Ka)/(Ka+[H])$

$Ka=[H](A_{HB}-A)/(A-A_B)$

即 $pKa=pH+lg[(A-A_B)/(A_{HB}-A)]$ ………… 3

2.2 方法

2.2.1 测定 pH 值的选择 称取罗格列酮游离碱约 0.025 g,加甲醇溶解并定溶至 100 ml,得罗格列酮游离碱的甲醇溶液。精密量取上述罗格列酮甲醇液 2 ml 于 50 ml 容量瓶中,分别加不同 pH 值的缓冲液稀释至刻度,得不同 pH 值的罗格列酮甲醇液,用 pH 计测量以上各溶液的 pH 值。

分别将不同 pH 值的上述罗格列酮甲醇液置于 1 cm 吸收池中,以相应的缓冲液作为空白,在 200~400 nm 波长范围内进行扫描,得一系列吸收曲线,即为不同 pH 值的罗格列酮甲醇液的吸收谱详见图 1。

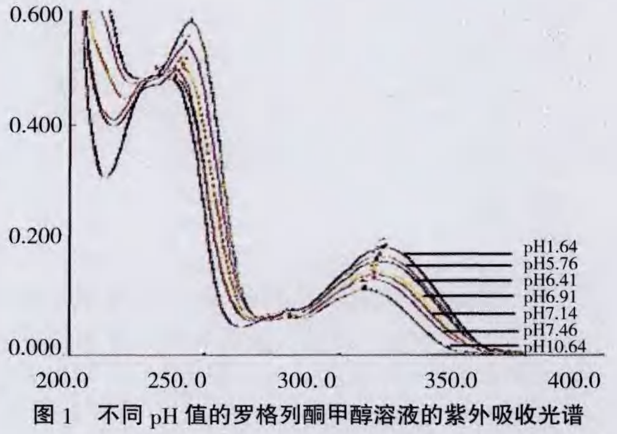


图 1 不同 pH 值的罗格列酮甲醇溶液的紫外吸收光谱

由图 1 可知,由于罗格列酮的离子型和分子型的紫外吸收光谱不同。随着溶液 pH 值的改变,溶液中离子型、分子型药物浓度的比值发生变化,所以产生不同的紫外吸收曲线。但 pH1.64 和 pH2.24 罗格列酮溶液的紫外吸收曲线重合,表明 pH 值在 2.24 以下,药物基本上以离子形式存在;同理,pH=10.64 和 pH11.20 的罗格列酮溶液紫外吸收曲线重合,表明在 pH10.64 之上,药物基本上以分子形式存在。故分别以 pH1.64 和 pH10.64 的罗格列酮甲醇液为溶液 2、3,其吸收度分别为 A_{HB}、A_B,在pH1.64 和 pH10.64 之间的不同 pH 值溶液中,既有离子型又有分子型药物,5 个不同 pH 的溶液pH5.76、6.41、

6.91、7.14、7.46 分别为溶液 1,其吸收度为 A。

2.2.2 测定波长的选择 为了测定结果更加准确,可在多个波长处测定,在 312、317、326、330 nm 处吸收曲线随 pH 值的改变有明显的变化,吸收曲线较平坦,所以选定以上 4 个波长为测定波长。

2.3 结果

2.3.1 不同 pH 值的罗格列酮溶液的吸收度 在选定波长处,分别测定以上溶液的吸收度,结果见表1。

2.3.2 罗格列酮的 pKa 值 按 3 式 $pKa=pH+\lg[(A-A_B)/(A_{HB}-A)]$ 计算,结果见表 2。

由表 2 可知,本法测得罗格列酮游离碱的 pKa 值为 7.09。

表 1 不同 pH 值罗格列酮甲醇溶液的吸收度

序号	pH	吸收度			
		312 nm	317 nm	326 nm	330 nm
1	1.64	0.181	0.185	0.167	0.146
2	5.76	0.178	0.181	0.163	0.142
3	6.41	0.170	0.172	0.150	0.130
4	6.91	0.154	0.152	0.127	0.107
5	7.14	0.144	0.140	0.117	0.095
6	7.46	0.132	0.127	0.098	0.079
7	10.64	0.112	0.103	0.070	0.051

表 2 罗格列酮的测定 pKa 值

序号	pH	312 nm	317 nm	326 nm	330 nm
1	5.76	7.10	7.05	7.13	7.12
2	6.41	7.13	7.13	7.08	7.10
3	6.91	7.10	7.08	7.06	7.07
4	7.14	7.08	7.05	7.11	7.08
5	7.46	7.07	7.08	7.07	7.08
$\bar{x}\pm s$	7.09 ± 0.03				

3 讨 论

应用紫外分光光度法测定 pKa 值,是基于分子型、离子型药物在一定波长处吸收的差异来计算平衡时分子型离子型药物浓度的比值.因此,应用本方法时要求酸(碱)基团在紫外有吸收。从结构上看,这类药物的酸碱基团一般应为生色团的一部分,或直接与生色团相连,这样,其离解可以通过电性效应特别是共轭效应来影响生色团,使吸收光谱发生改变。不具备这类结构条件的药物难以用此法测定 pKa 值。待测药物的酸碱强度以 pKa 值在 2~9 之间为宜。如果值过小或过大,这样溶液的 pH 值会过低或过高,均不利于测定。

一般应选择分子型离子型药物紫外吸收差异大的波长作为测定波长。由计算公式可以知道,应用本法时,不需要知道样品溶液中药物的准确浓度,仅要求各份样品溶液浓度相等。

以上 pKa 值的计算公式仅仅只适用于稀溶液的情况,如果溶液中待测药物或缓冲物质的离子浓度较大,还应对测定结果进行校正。$pKa=pKa-lgf=pKa-0.509Z^2 I^{1/2}/(1+I^{1/2})$ (f:活度系数 Z:离子价数 I:溶液离子强度)。

参 考 文 献

[1] 杜小莉,李大魁. 降血糖新药 - 马来酸罗格列酮[J]. 中国药学杂志, 2002,37(1):70-71.

[2] Meier C, Kraenzlin M E, Bodmer M, et al. Use of thiazolidinediones and fracture risk[J]. Arch Intern Med,2008,168:820-825.

[3] Yihong W,Ling W C,Evans Ronald M. PPAR-γ regulates osteoclastogenesis in mice[J]. Nature Medicine,2007,13 (12):1496-1503.

[4] 胡湘南, 范 博. 紫外分光光度法测定西地那非的电离平衡常数[J]. 中国药房,2006,17(2):134-136.

[5] 王长虹,孙殿甲. 盐酸骆驼蓬碱解离常数的等摩尔浓度分光光度法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2002,33(11):558-559.

[6] 杭州大学化学分析教研室. 分析化学手册[M].第 2 版.北京:化学工业出版社, 1997.335-349.

(责任编辑:冉明会)