

## T3による低溶解性化合物のpKa測定

フィジオマキナ株式会社 白濱茜

### 【目的】

医薬品等の有効成分におけるpKa値の把握は、成分の化学的特性の決定や、各種試験におけるアプローチの検討に必要な重要項目である。Pion社のT3では、測定対象物が溶解した状態で自動電位差滴定とUV分光滴定の組み合わせによる測定を行うことにより、pKaを算出することができる。

本アプリケーションノートでは、溶解性の低い化合物におけるpKaをT3にて測定する手法を紹介する。

### 【測定手法】

今回、測定を実施した測定手法を以下に示す。いずれの測定手法も試験液として0.15M塩化カリウム溶液（以下、KCl）を用い、0.5M水酸化カリウム溶液（以下、KOH）及び0.5M塩酸で滴定を行う。

使用したワルファリン（図1）はUV吸収を持つが、UV吸収を持たないサンプルの場合を想定して、pH-metric法での測定を実施した。なお、いずれの測定も滴定方向はHigh to low pHとし、3回滴定にて行った。

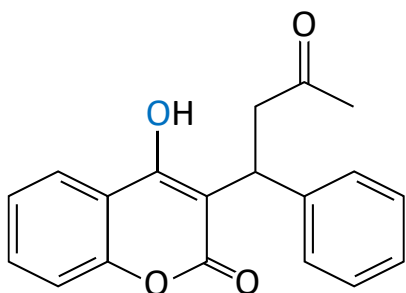


図1 ワルファリン

### ①pH-metric pKa

UV吸収を持たないサンプルのpKa測定可能な測定手法。pH電極を使用して、pH変化の滴定中に溶液中のH<sup>+</sup>イオン濃度を測定する。

### ②pH-metric psKa

溶解性の低いサンプルを測定する際に、共溶媒を使用してpH-metric pKaと同様に溶液中のH<sup>+</sup>イオン濃度変化を測定する。

### 【試料の調製】

測定試料は次の通り調製し、各測定手法にてpKa測定を実施した。

#### A：紛体

A1：ワルファリン 1 mg を T3 バイアルに秤量した。

A2：ワルファリン 0.2 mg を T3 バイアルに秤量した。

#### B：事前溶解試料溶液

ワルファリン 3 mg に 0.5M KOH 130  $\mu$ L<sup>\*1</sup> と 0.15M KCl を加えて溶かし 25 mL とした。この液 1.5 mL<sup>\*2, 3</sup> を T3 バイアルに添加した。

#### C：Stock Solution

C1：ワルファリン 5 mg にジメチルスルホキシド（以下、DMSO）500  $\mu$ L を加えて溶解させた。この液 100  $\mu$ L<sup>\*4</sup> を T3 バイアルに添加した。

C2 : ワルファリン 2 mg に DMSO 1 mL を加えて溶解させた。この液 100  $\mu$ L<sup>※2</sup> を T3 バイアルに添加した。

- ※1 0.15M KCl のみではワルファリンが溶解しなかったため添加
- ※2 ワルファリン 0.2 mg 相当量
- ※3 pH-metric pKa 測定における標準的な 0.15M KCl 添加量
- ※4 ワルファリン 1 mg 相当量

## 【結果】

各手法にて得られた結果を表 1 に示す。pKa 測定において、適切な pKa 値を得るためには、滴定時に析出が発生しないことが条件となるため、得られた pKa だけではなく析出の有無も含めて、採用の可否を判断した。

表 1 各測定手法にて得られた pKa まとめ

測定手法	投入試料	pKa (S.D.)	析出	採用
理論 pKa		4.94	—	
pH-metric pKa	紛体 1 mg	5.77 (—)	有	×
	紛体 0.2 mg	5.15 (0.08)	有	×
	Stock Solution (0.15M KCl)	5.58 (0.33)	無	×
	Stock Solution (DMSO) 1 mg 相当	4.99 (0.02)	有	×
	Stock Solution (DMSO) 0.2 mg 相当	5.12 (0.04)	無	○
pH-metric psKa (共溶媒使用)	紛体 1 mg	4.99 (0.07)	有	×
	Stock Solution (DMSO) 1 mg 相当	4.93 (0.08)	無	○

- ・ pKa : 理論 pKa  $\pm$ 0.3 の範囲を超えたものを赤字で表記  
(理論 pKa は Performance Qualification Procedure ; Pion 社より抜粋)
- ・ 析出 : n=3 の内 1 回以上析出が認められた場合に「有」と表記
- ・ 採用 : ○…採用, ×…不採用

### ①pH-metric pKa

紛体 1 mg では、析出は認められ、pKa も理論値から大きく外れた値となった。

紛体測定にて、析出しない程度の濃度にするため、秤取量を 0.2 mg に変更して測定をしたところ、ごくわずかな秤取量の差で析出の有無が変わった。

事前溶解試料溶液では、0.15M KCl にサンプルが溶解しなかったため、サンプルの溶解しやすい塩基性に調整することで溶解

させたが、得られた pKa 値は理論 pKa  $\pm$  0.3 の範囲を超えており、バラつきも大きかった。

Stock Solution (DMSO) では、サンプル濃度に関わらず、理論 pKa  $\pm$ 0.3 の範囲に入る結果が得られたものの、濃度が高いものは、析出を認めた。

pH-metric pKa における、標準的な測定手法 (紛体 1mg) では滴定時に析出して、正

確に測定できているのか判断できない可能性が高いと言える。そこで、測定に使用するサンプル量を減らすと、析出はしにくくなるものの、少しの秤取誤差で析出の有無が変わる可能性があり、安定して測定することが難しい。

あらかじめサンプルを溶解させておいた Stock Solution を添加する方法にて、溶解能力の高い DMSO を使用すると、比較的溶解しやすく、測定濃度を下げることで、析出せずに測定することができた。

## ②pH-metric pKa

共溶媒としてメタノールを使用する pH-metric pKa では、3 回滴定における共溶媒比率が pKa 算出に大きく影響するため、混合比率に影響を与える可能性のある事前溶解試料溶液中での測定は行わなかった。

紛体 1 mg では、バラつきが小さく、pKa も理論値に近い値が得られたが、析出を認めた。

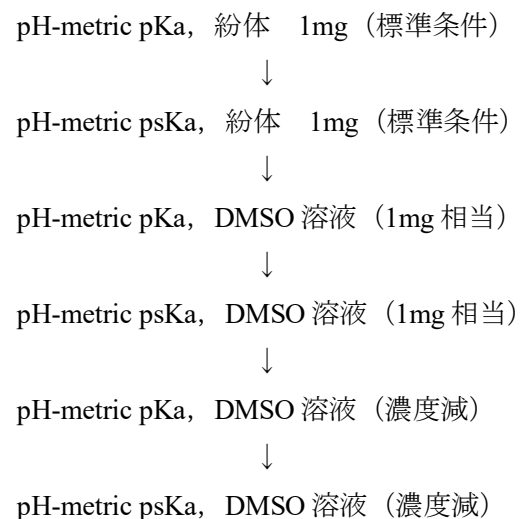
Stock Solution では、析出を認めず、pKa も理論値と同等の値が得られ、測定試料間によるバラつきも小さかった。

pH-metric pKa における、標準的な測定手法（紛体 1mg）では析出が見られたものの、DMSO に溶解させた Stock Solution を添加することで、析出せずに測定することができた。

## 【結論】

今回、ワルファリンを用いて試料の投入方法や共溶媒の使用有無等を変更して pKa 測定を行った。Stock Solution の調製に用いた DMSO が滴定結果に影響を及ぼす可能性が考えられたが、今回の添加量（試料溶液中の最大濃度：約 7%）ではスペクトルの大きな変化は特になく、測定間によるバラつきも小さかったため、影響は大きくなかったと判断した。

各測定の結果を確認したところ、溶媒を使用せずに測定することは困難であり、以下のフローで測定を進め、析出を観察しなくなったタイミングでの結果を確認することがよいと考えられる。



なお、上記のフローは一例であり、測定化合物ごとに、スペクトルの変化や滴定曲線のフィッティングレベル等を確認して、結果の採用可否を判断する必要がある。