

Rainbow を用いた溶液中の化合物のイオン化状態のモニタリング

フィジオマキナ株式会社 応用技術研究所 CTO 武田日出夫 Hideo Takeda

【目的】

イオン化可能な官能基を有する化合物は、溶液中で分子形もしくはイオン形の状態で存在し、その存在比は化合物の酸(塩基)解離定数 $pK_a(pK_b)$ に基づいて計算することが可能である。例えば、 pK_a と溶液の pH が等しい場合、分子形とイオン形の存在比は等しく、 pK_a と溶液の pH に 1 の差がある場合、存在比は 1:10 である。このように、計算により存在比を求めることはできるものの、 $pK_a(pK_b)$ 付近の pH の溶液中においては、分子形とイオン形の比率が大きく変動する。さらに、 $pK_a(pK_b)$ はイオン強度、温度、有機溶媒などに影響を受けることが知られており、 pK_a 付近の pH の溶液中において、分子形とイオン形の比率を予測することは難しい。

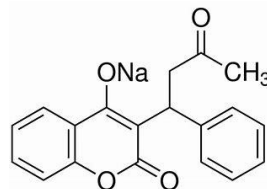
そこで、「溶液中の化合物のイオン化状態を直接的に測定すること」を容易に実現するための手法を開発することを目標として、一連の実験を企画した。

【試薬】

測定化合物として、ワルファリンナトリウム(pK_a 5.0)を用いた。 pK_a は SiriusT3 を用いて、Prisma HT[®] 溶液中、25 °C にて測定した値である。

※Prisma HT (Pion Inc.) : 40 倍に希釈し水酸化ナトリウム溶液を加えることで、pH 3 ~ 11 の任意の pH の溶液を調製することができる pH 調整剤。

ワルファリンナトリウム



MW: 330.31

【手順と結果】

Rainbow を用いたワルファリン(分子形)とワルファリン(イオン形)の UV 吸収スペクトルの取得

<以下の操作では、ファイバー型 UV 計 Rainbow および AuPRO ソフトウェア Version 7.0 を使用した。>

ワルファリン(pK_a 5.0)は、図 1 に示すように、溶液中の pH 5.0 を境に、分子形とイオン形の比率が大きく変化し、pH 1 の溶液中においては 99.99 % が分子形(AH)、pH 9 の溶液中においては、99.99 % がイオン形(A⁻)として存在する。

そこで、5 mg/mL に調製したワルファリンナトリウムの Stock solution (DMSO 溶液) を 0.1 M 塩酸 (pH 1) へ一定量ずつ添加し、Rainbow を用いて分子形のワルファリンの UV 吸収スペクトルをして取得した(図 2)。同様に、pH 9 に調製した PRISMA HT 溶液へ Stock solution を一定量ずつ添加し、イオン形のワルファリンの UV 吸収スペクトルを取得した(図 3)。

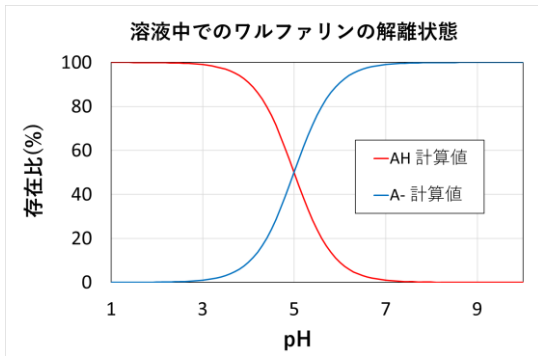


図1 異なる pH の溶液中におけるワルファリンの分子形(AH)、イオン形(A⁻)の存在比

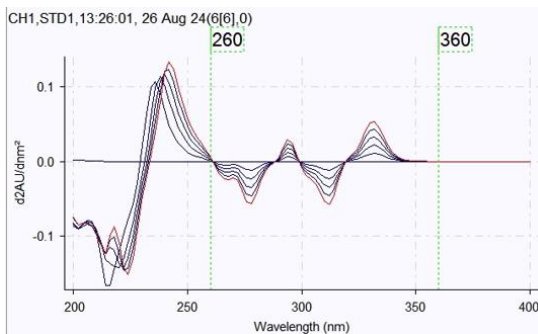


図2 ワルファリン(AH)の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)

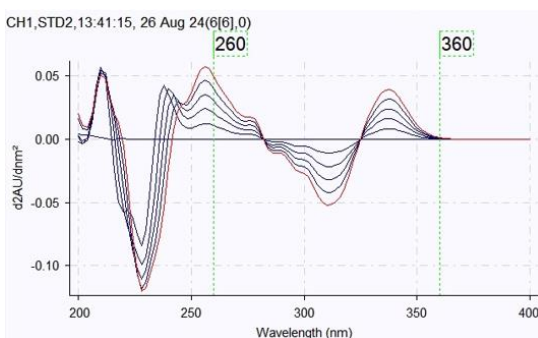


図3 ワルファリン(A⁻)の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)

図2、図3 から、ワルファリンにおいては AH と A⁻ で異なる UV 吸収スペクトルを有していることがわかる。250 nm 以下の波長では Stock solution の調整に使用した DMSO に由来する UV 吸収があるため、以後の解析から除外した。

MC Analysis を用いた溶液中のワルファリンの分子形とイオン形の存在比の計算

AuPRO ソフトウェアは複数成分分析機能(MC Analysis)を備えており、溶液中に複数の異なる化合物が存在する場合に、UV 吸収スペクトルからそれぞれの化合物の濃度を決定することができる。理論上、一つの化合物の分子形とイオン形の両方が溶液中に存在する場合においても、UV 吸収スペクトルは分子形とイオン形のスペクトルがそれぞれの存在比と同じ強度比で足されたスペクトルとなる。

そこで、ワルファリン溶液について、図2、図3の UV 吸収スペクトルを元に、MC Analysis を用いて溶液中の AH と A⁻ の存在比の決定を試みた。

ビーカーに pH 1~9 の試験液 50 mL を用意し、ワルファリン濃度が約 35 µg/mL となるように Stock solution を添加し、各溶液の UV 吸収スペクトルを取得した。図4に、各 pH でのワルファリン溶液の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)を示す。pH 1.1 においては、AH のみが溶液中に存在するため、UV 吸収スペクトルは AH(赤線)と一致している。pH の増加に伴い A⁻(青線)の寄与が大きくなり、pH 9.1 では溶液中に A⁻ のみが存在する状態となった。

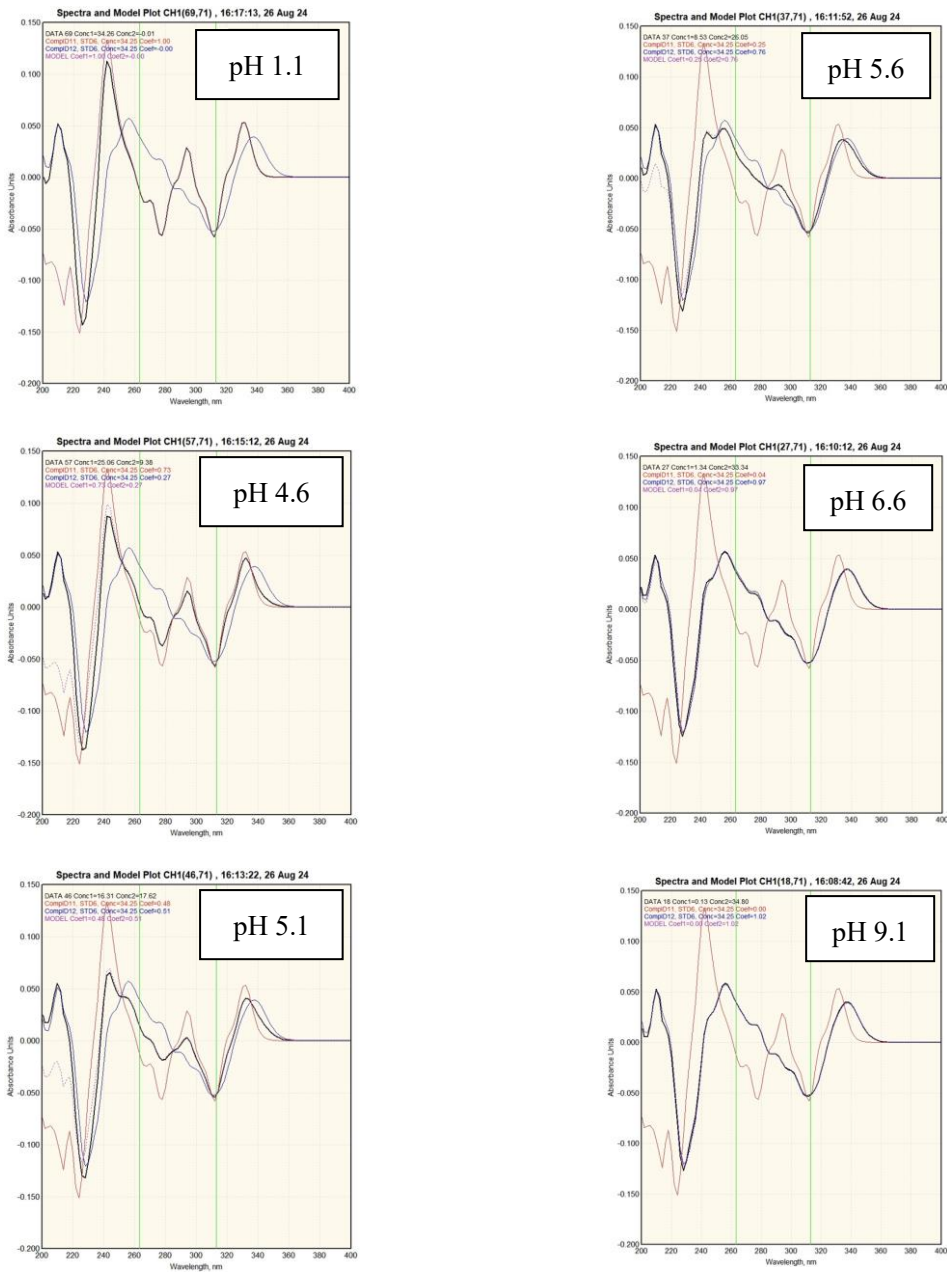


図 4 MC Analysis 解析画面

溶液中の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)を黒色、分子形ワルファリン(AH)の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)を赤色、イオン形ワルファリン(A⁻)の UV 吸収スペクトル(2nd derivative)を青色、MC Analysis で計算された存在比における吸収スペクトル(2nd derivative)を紫色点線で示す。250 nm 以上の波長においては計算値と実測された UV 吸収スペクトルが一致しており、紫色点線は黒色実線と重なっている。

図4のプロットを濃度換算した結果を図5、表1に示す。測定には6チャンネル型のRainbowを使用したため、表1の存在比(%), SDはn=6での平均値と標準偏差である。

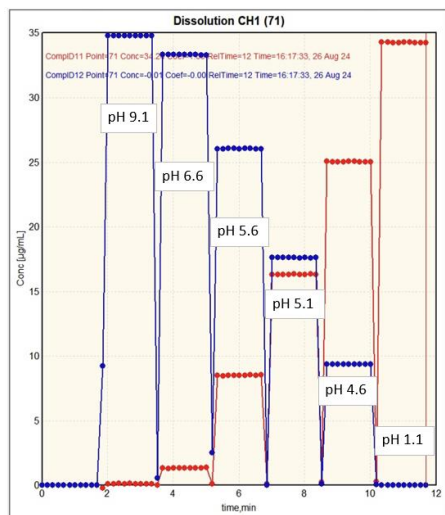


図5 各 pH におけるワルファリンの存在比。分子形(AH)を赤色、イオン形(A-)を青色で示す。各 pH で10秒間隔にて10回のデータ取得を行った。

表1 MC AnalysisにてUV吸収スペクトルから計算したワルファリンの分子形(AH)とイオン形(A-)の存在比。(n=6)

pH	AH		A ⁻	
	存在比(%)	SD	存在比(%)	SD
1.1	100.00	0.04	0.00	0.04
4.6	72.80	0.10	27.20	0.10
5.1	48.11	0.10	51.89	0.10
5.6	24.67	0.09	75.33	0.09
6.6	3.92	0.09	96.08	0.09
9.1	0.39	0.09	99.61	0.09

MC Analysisで計算したワルファリンの存在比を図1のグラフ上にプロットする

と、いずれの pH においても理論曲線と近い値であることが確認できる(図6)。

特に分子形、イオン形の存在比が大きく変動する pK_a 付近においても、理論曲線との一致が得られたことには驚いた。

本実験により、MC Analysisは異なる化合物が存在する場合の定量のみでなく、単一化合物の分子形、イオン形の存在比の決定にも利用できることを確認することが出来た。

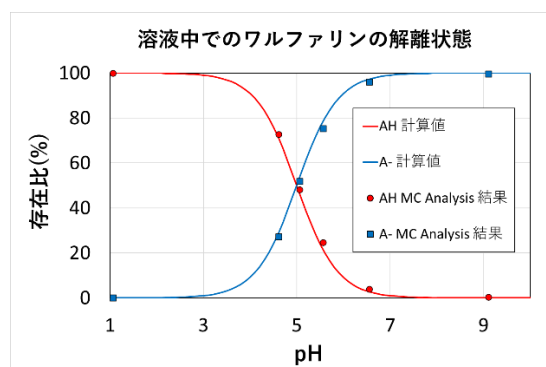


図6 溶液中のワルファリンの分子形、イオン形の存在比。実線は理論曲線、点はMC Analysisによる計算値を示す。

【Next Challenge】

さて、ここまで行った実験は、MC Analysisを用いて分子形とイオン形の定量が可能であることの確認である。Rainbowシステムで実施される溶出試験や膜透過試験においては、模擬腸液や緩衝液が使用される。これらの試験液を用いた場合にMC Analysisによる分子形、イオン形の割り当てが機能するかの検証も進めており、結果は別の機会にて報告予定である。