

報 文

CZEによる電気泳動移動度測定に基づくヒドロクロロチアジドとその分解生成物の酸解離定数の決定

高柳 俊夫^{*1,2,3}, 磯田 昌志², 伊藤 大地³, 水口 仁志^{1,2,3}

チアジド系利尿剤の一つであるヒドロクロロチアジドは水中で加水分解により徐々に4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドを生成する。酸解離定数 (pK_a) などの物理化学定数の決定において分解生成物等の存在は好ましくないが、キャピラリーゾーン電気泳動法では分解生成物を分離することで分解物を含む共存物質の問題を回避して解析することが可能である。本研究では、泳動緩衝液のpHに伴う電気泳動移動度の変化から分解条件下でヒドロクロロチアジドの pK_a を決定したところ、分解生成物の共存下で二段階の $pK_{a1}=8.95\pm 0.04$, $pK_{a2}=10.66\pm 0.07$ が得られた。また、分解生成物である4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドについても電気泳動移動度の変化から二段階の pK_a を決定することができ、 $pK_{a1}=9.27\pm 0.06$, $pK_{a2}=10.79\pm 0.10$ が得られた。

1 緒 言

ヒドロクロロチアジド (hydrochlorothiazide, HCT, Fig. 1, 1) は尿管中で Na^+ , Cl^- の再吸収を阻害することにより尿排泄を増加させるチアジド系利尿剤として広く用いられている¹⁾。HCT がプロトン解離性の弱酸であることから一級のスルホンアミド基も含めて Na^+ との交換反応により利尿作用があるとされている¹⁾。また、 Na^+ の排泄促進から降圧剤としてアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme, ACE) 阻害剤と併用されることもあることから、キャピラリーゾーン電気泳動法 (capillary zone electrophoresis, CZE) による HCT の分離定量法が検討され、ACE 阻害剤との同時定量²⁾³⁾、電場増幅試料スタッキングによる感度増加と尿試料中の HCT の定量⁴⁾ が報告されている。HCT 及びその類縁体のクロロチアジド (chlorothiazide, CT, Fig. 1, 2) はスルホンアミド基のプロトン解離に基づく酸解離平衡を有する。分子内に一級、二級の二つのスルホンアミド基を有するが二級のスルホンアミド基で酸性が強いことが知られ、Fig. 1 の二段階の酸解離平衡で示される¹⁾。HCT の二段階の酸解離定数 (pK_{a1} , pK_{a2}) として専門書では $pK_{a1}=7.0$, $pK_{a2}=9.2$ と引用されている¹⁾ 一方で、光度滴定法により $pK_{a1}=9.5$, $pK_{a2}=11.3$ ^{5)~7)} が報

告されている。二つの酸解離定数が十分離れていないので、光度滴定ではモノアニオン種のスペクトル/モル吸光係数を知ることができないためにこの報告値は信頼性が低い。他の解析法としては電位差滴定により $pK_{a1}=8.53$, $pK_{a2}=9.78$ ⁸⁾、あるいは $pK_{a1}=8.75$, $pK_{a2}=9.88$ ⁹⁾ の値も報告されている。また、キャピラリー等電点電気泳動法 (capillary isoelectric focusing, cIEF) により $pK_a=9.08$ の報告もある¹⁰⁾ が、一つの pK_a 値が報告されているだけであり cIEF の手法を二塩基酸に適用するのは問題がある。酸解離定数を基礎として臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルへの HCT の結合定数¹¹⁾ が決定されているが、信頼性のある pK_a 値を用いなければ正しいミセル結合定数を決定することは困難である。

HCT はアルカリ性水溶液中¹²⁾¹³⁾、高温水中¹²⁾¹³⁾、あるいは、照射下¹⁴⁾ で加水分解して4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミド (Fig. 2, 3) を生成することが知られている。この反応は徐々に進行して平衡に達する反応であり¹²⁾、ヘキサメチレンテトラミンからアンモニアとホルムアルデヒドを生成する反応に類似した反応である¹⁵⁾。水中では HCT の分解反応が伴うので、コール酸ミセルと γ -シクロデキストリンを用いるミセル動電クロマトグラフィーにより HCT と分解生成物との分離定量¹⁶⁾ が報告されている。また、HCT の熱分解に伴う HCT と分解生成物の量的変化を CZE により追跡した研究が報告されているが、両者の分離が良くないのでフーリエ変換による解析を併用している¹⁷⁾。薬物としての HCT の結合反応に関しては、先端分析法-キャピラリー電気泳動法による人血清アルブミンとの結合定数¹⁸⁾、超遠心分離-CZE 定量による牛

* E-mail: toshio.takayanagi@tokushima-u.ac.jp

¹⁾ 徳島大学大学院理工学研究部: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

²⁾ 徳島大学工学部化学応用工学科: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

³⁾ 徳島大学大学院先端技術科学教育部: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

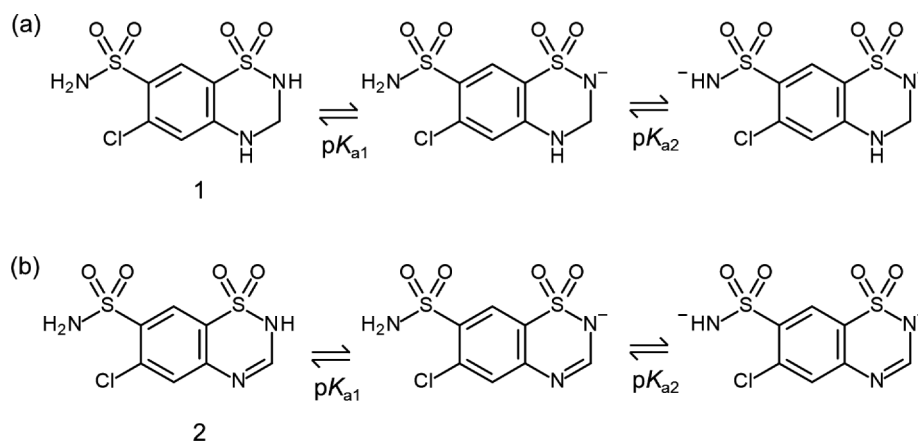


Fig. 1 Structures and acid-base equilibria of hydrochlorothiazide (1, HCT) and chlorothiazide (2, CT)

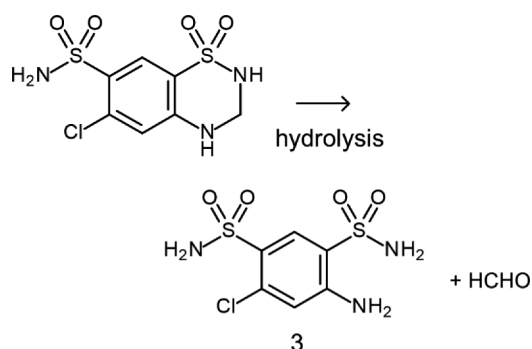


Fig. 2 Degradation of HCT by hydrolysis

血清アルブミンとの結合定数¹⁹⁾が決定されている。HCTに関して諸定数が決定されているが、HCTの分解性を考慮した分析法でなければ得られる結果、諸定数は満足なものとは言えない。

本研究では、HCTの分解性を考慮して酸解離定数を決定するために、キャピラリーゾーン電気泳動法を用いて解析した。電位差滴定、光度滴定などの解析法は均一溶液系における単一成分を主な対象としており、分解物が生成する系においては分解に伴う測定対象物質の物質質量減少が平衡物性の解析を困難にし、分解に伴い生成する共存物のプロトン授受や光吸収特性が測定の妨害となる²⁰⁾。一方、分離分析の手法であるCZEでは、水溶液一相系での測定が可能なことに加えて、共存物や分解生成物が電気泳動分離されるのでそれら共存物質の影響を排除して測定対象となる物質の迅速な平衡反応を有効電気泳動移動度の測定を通して解析することが可能である²⁰⁾。特に酸塩基平衡に関しては、フェノールフタレインの解析例でみられるようにCZEは易分解性物質に対して強力な解析手法であることが示されている²¹⁾。本研究では易分解性物質としてHCTを取り上げ、CZEの分離を活用する分析法を用いて分解条件下でのHCTの酸解離平衡を解析するとともに、分解生成物で

ある4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドの酸解離平衡の解析を行った。

2 実験

2.1 試薬

HCT及びCTは東京化成工業製のものをを用いた。それぞれをエタノールに溶解して $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ の溶液を調製し、精製水で希釈して用いた。泳動緩衝液として 10 mmol L^{-1} MES-NaOH (pH 5.5~6.5), 10 mmol L^{-1} HEPES-NaOH (pH 6.5~8.1), 10 mmol L^{-1} H_3BO_3 -NaOH (pH 8.1~9.5), 10 mmol L^{-1} CAPS-NaOH (pH 9.5~11.2), あるいは 10 mmol L^{-1} NaOH (pH 12.0)によりpHを調整した。緩衝液成分は無電荷あるいは両性の一塩基酸であり、NaOHの添加量に応じて緩衝液成分は+1価-1価の塩になる(例えば、 $\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{BO}_3^-$)ので、これに陽イオンの総濃度、陰イオンの総濃度がそれぞれ 0.010 mol L^{-1} になるように必要量のNaClを添加してイオン強度を 0.010 mol L^{-1} に調整した。電気泳動移動度を測定する際の基準物質として、水溶液中において広いpH範囲で1価の陰イオンとして存在し一定の電気泳動移動度を有するナフタレン-1-スルホン酸イオン(naphthalene-1-sulfonate ion, 1-NS, Na^+ 塩)を内標準物質として試料液に添加して用いた。

実験に使用した水は、メルクミリポア製のMilli-Q Gradient A10により精製したものをを用いた。

2.2 装置

キャピラリー電気泳動装置として、アジレントテクノロジー製の^{3D}CEを用い、付属のフォトダイオードアレイ検出器により吸光検出した。溶融シリカキャピラリーはGLサイエンス製の内径 $50 \mu\text{m}$ 、外径 $375 \mu\text{m}$ のものを全長 64.5 cm に切断して用いた。吸光検出部分は注入端から 56 cm の位置のポリイミド被覆を焼却除去して作製した。pH

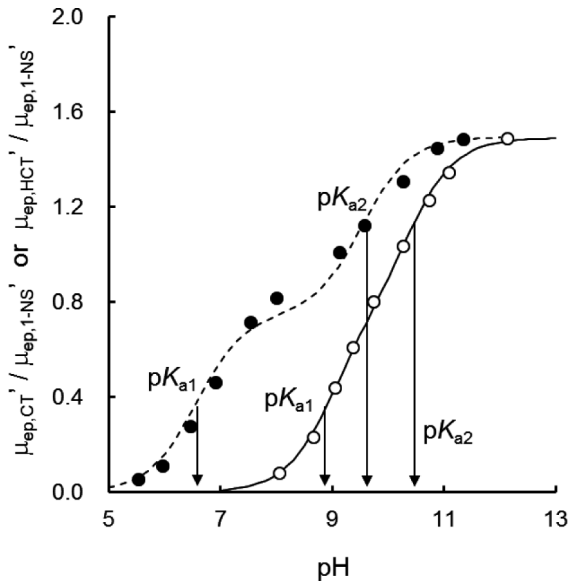


Fig. 3 Changes in the standardized electrophoretic mobility of HCT and CT with pH.

The curves are the simulated results of the analysis based on Eq. (3). ○, HCT at $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; ●, CT at $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. CZE conditions: applied voltage, 25 kV; sample injection period, 250 mbar·s; detection wavelength, 220 nm; capillary temperature, 25 °C. Ionic strength of the separation buffers: 0.010 mol L^{-1} .

メーターは東亜ディーケーケー製のHM-25Gに複合ガラス電極を装着し、pH標準溶液を用いて校正したのちに用いた。保存溶液の加熱分解にはアドバンテック東洋製の定温乾燥機FS-420あるいは三菱電機製のクールインキュベーターCN-25Cを用い、60 °Cあるいは25 °Cで所定時間恒温とした。

2.3 測定

HCTの電気泳動移動度は既報²⁰⁾²¹⁾に準じて測定した。pHとイオン強度を調整した泳動緩衝液をアノード側、カソード側の両バイアルにセットしたのち、加圧法によりキャピラリー内を泳動緩衝液で満たした。アノード側から加圧法により $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ のHCTと $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ の1-NSを含む溶液を250 mbar·sでキャピラリー内に注入し、25 kVの直流電圧を印加して電気泳動分離を行った。HCTは220 nmにて吸光検出した。電気浸透流は試料液に添加した2% (v/v)のエタノールにより検出した。測定中、キャピラリーは25 °Cに温調したキャピラリーカセットの中に保持した。

HCTの分解生成物の測定では、精製水に溶解した $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ のHCT溶液を60 °Cあるいは25 °Cに設定した恒温槽内に保持し、所定時間経過後に採取、希釈後にCZE測定を行った。

2.4 酸解離定数の決定

HCTは二塩基酸であり、Fig. 1 (a)の酸解離平衡反応、あるいは式(1)及び式(2)の二段階の酸解離定数で示される。



式中の H_2L は無解離型ノニオン種のHCTであり、 HL^- 、 L^{2-} はそれぞれモノアニオン、ジアニオンの化学種を示す。HCTの有効電気泳動移動度(μ_{ep}')は無解離型、モノアニオン、ジアニオンの存在分率を反映した以下の式(3)で示される。

$$\mu_{ep}' = \frac{[\text{H}^+]^2 \mu_{ep,\text{H}_2\text{L}} + [\text{H}^+] K_{a1} \mu_{ep,\text{HL}} + K_{a1} K_{a2} \mu_{ep,\text{L}}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2}} \quad (3)$$

$\mu_{ep,\text{H}_2\text{L}}$ 、 $\mu_{ep,\text{HL}}$ 、 $\mu_{ep,\text{L}}$ はそれぞれ H_2L 、 HL^- 、 L^{2-} の電気泳動移動度であり、 $\mu_{ep,\text{H}_2\text{L}}$ は無電荷の化学種であるためゼロとなる。また、 $\mu_{ep,\text{HL}}$ は HL^- 、 L^{2-} の電荷を考慮し、近似値として $\mu_{ep,\text{L}}$ の半分の値を用いた²¹⁾。 μ_{ep}' の測定では再現性を確かめるために各pH条件で複数回測定し、その平均値を用いた。実験により得られる一連のpH条件と μ_{ep}' の値を式(3)に代入し、Rプログラム(Ver. 3.3.2)²²⁾を用いる非線形最小二乗解析²³⁾²⁴⁾によるフィッティングから pK_{a1} 、 pK_{a2} 、 $\mu_{ep,\text{L}}$ を決定した。

HCTの分解生成物、CTについても各pH条件下における有効電気泳動移動度の測定を通して pK_{a1} 、 pK_{a2} を決定した。

3 結果と考察

3.1 CZEによるCT及びHCTの酸解離定数の決定

分解性を有するHCTの測定に先立ち、分解性の低いCTを用いてCZEによりFig. 1 (b)に示す二段階の酸解離定数を決定した。試料液として $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ のCTと $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ の1-NSを含む溶液を用い、イオン強度を 0.010 mol L^{-1} に調整した泳動緩衝液を用いてCTの有効電気泳動移動度を測定した。泳動緩衝液のpHに伴うCTの有効電気泳動移動度(μ_{ep}')をFig. 3に示す。なお、解析に際しては1-NSの電気泳動移動度により規格化した値を用いた。Fig. 3の結果から、弱酸性領域では有効電気泳動移動度がゼロで無電荷のCTが、泳動緩衝液のpHの上昇に

Table 1 pK_a values of hydrochlorothiazide and its related substances determined by the CZE analyses

Substance	pK_{a1}	pK_{a2}
Chlorothiazide	6.56 ± 0.08	9.53 ± 0.11
	6.8^a	9.5^a
	6.7^b	9.5^b
Hydrochlorothiazide	8.96 ± 0.03	10.39 ± 0.05
	(8.95 ± 0.04)	(10.66 ± 0.07)
	7.0^a	9.2^a
	9.5^c	11.3^c
	8.75^d	9.88^d
4-amino-6-chloro- <i>m</i> -benzenedisulfonamide (Degradant from Hydrochlorothiazide)	—	—
	(9.27 ± 0.06)	(10.79 ± 0.10)

Values in the parentheses are determined under the degraded conditions at 60 °C. Uncertainty: standard error. a: Ref. 1; b: Ref. 25; c: Refs. 5 and 6 by spectrophotometry; d: Ref. 9 by potentiometry.

伴い二段階でプロトン解離することがわかる。式(3)により酸解離定数を決定したところ、Table 1に示すように二段階の酸解離定数、 $pK_{a1} = 6.56 \pm 0.08$ 、 $pK_{a2} = 9.53 \pm 0.11$ (不確かさ: 標準誤差) が得られた。これらの値は既報値¹⁾²⁵⁾に近い値である。

HCTについても溶液調製後の新鮮な溶液を用いてCZE測定により二段階の酸解離定数を決定した。この溶液ではHCTの分解が進行していないので、エレクトロフェログラム上で検出されたHCTのシグナルは一つであった。泳動緩衝液のpHに伴うHCTの有効電気泳動移動度をFig. 3に併せて示す。pH上昇とともに μ_{ep} が単調に増加している。これは二段階の pK_a 値が近接しているためだと考えられる。アルカリ性領域におけるHCTの有効電気泳動移動度は分子量がほぼ等しいCTのそれと同程度の値になっており、HCTにおいてもジアニオン種が生成していることがわかる。式(3)に基づいて二段階の酸解離定数を解析したところ、 $pK_{a1} = 8.96 \pm 0.03$ 、 $pK_{a2} = 10.39 \pm 0.05$ (不確かさ: 標準誤差) が得られた。光度滴定⁵⁾⁶⁾、電位差滴定⁹⁾で得られた値と異なっているが、連続した酸解離定数の場合、光度滴定ではモノアニオンのスペクトル/吸光度が不確かなために二段階の正しい pK_a 値を決定することは困難である。電位差滴定法においては半当量点のpHが pK_a 値に対応するので、有効電気泳動移動度の測定値がノニオン種とモノアニオン種の間、モノアニオン種とジアニオン種の間で pK_a 値に対応するCZEによる本解析法と対応しており、比較的近い値となっているが、電位差滴定法は均一溶液中での測定であり共存物質の影響を受けることから、アルカリ性溶液中で分解するHCTに対して分解物の影響を考慮して当量点、半当量点を求められているか

疑問が残る。CZEによる解析法では迅速な平衡反応に関与する化学種の情報(有効電気泳動移動度)から酸解離定数を決定するので、共存物や分解生成物の影響を受けることなく pK_a を決定できたと考えている。

CZEにより求められたCTとHCTの pK_a 値を比較するとCTで酸性が強く、両者の pK_{a1} には約2.4の差、 pK_{a2} には約0.9の差と、 pK_{a1} でその差が大きくなっている。CTでは二重結合に隣接する二級のスルホンアミド基で酸性が強まったとみるのが妥当である。Hennigら⁶⁾はHCTのNMRの化学シフト及び置換基効果からFig. 1(a)に示す二級のスルホンアミド基を第一解離と考察しており、HCTとCTとの酸解離定数の比較からもFig. 1(a)の二段階の酸解離平衡を理解することができる。

3・2 HCTの加熱分解と分解生成物のCZE分離

HCTはアルカリ性条件下¹²⁾¹³⁾、加熱条件下¹²⁾¹³⁾、照射¹⁴⁾で分解しFig. 2に示すように4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドを生成して平衡状態になることが知られている。本研究では、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ のHCTを60 °C、25 °Cの水中で保存することにより加水分解した。恒温槽に保存後、所定時間経過ごとにその少量を採取し、50倍に希釈してCZEによりHCTを定量した。HCTの定量では泳動緩衝液に10 mmol L⁻¹ホウ酸緩衝液(pH 9.0)を用い、 $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ の1-NSを内標準物質として用い、エレクトロフェログラム上のピーク面積により定量した。60 °Cの加熱条件下では、24時間経過以降に残存するHCTは約60%程度でほぼ一定となり、分解生成物に対応するピークも観測された。一方、25 °C下では、72時間経過後も90%以上のHCTが残存し、その後も徐々に減少した。したがって、分解条件下でのHCTの酸解離平衡の解析に際しては、60 °Cで24時間以上保存した溶液を用いてCZE測定を行った。

3・3 分解条件下でのHCT及び分解生成物の酸解離定数の決定

60 °C下で24時間以上熱分解した $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ のHCT溶液を50倍に希釈したのちに、CZEにより電気泳動移動度を測定した。分解条件下でのHCT及びその分解生成物の酸解離定数を決定するために、一連のpH条件下で測定したエレクトロフェログラムをFig. 4に示す。HCTに加えて分解生成物のシグナルが観測されている。分解生成物もpHの上昇に伴い負の電気泳動移動度が増加していることがわかる。

酸解離定数を決定するために、各pH条件下におけるHCT及びその分解生成物の有効電気泳動移動度を求めた結果をFig. 5に示す。なお、Fig. 5では1-NSの電気泳動移動度により規格化した値を用いている。HCT、分解生成物

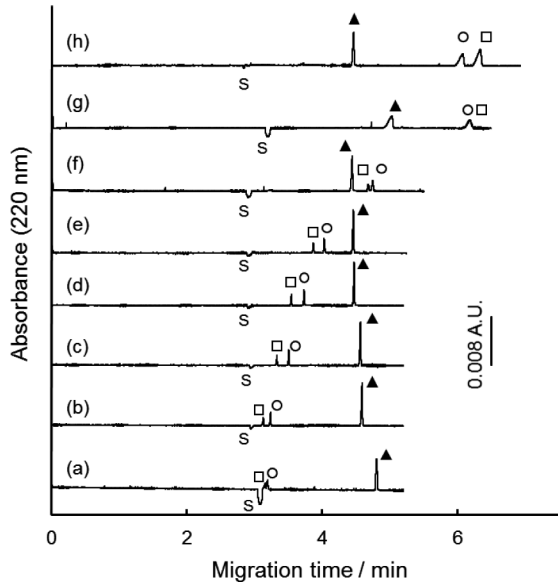


Fig. 4 Electropherograms for hydrochlorothiazide after degradation under 60 °C. ○, HCT; □, degradant from HCT; ▲, 1-NS (internal standard). S, sample solvent (2 % (v/v) ethanol). The CZE conditions are written in the text. pH conditions: (a), 8.10; (b), 8.65; (c), 9.08; (d), 9.42; (e), 10.03; (f), 10.65; (g), 11.07; (h), 12.07.

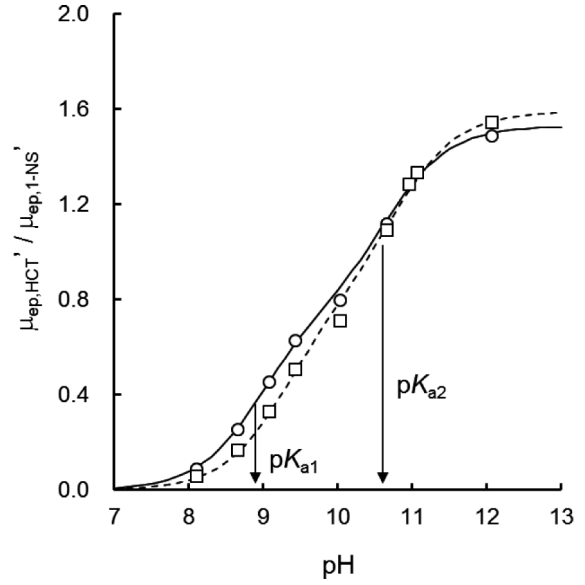


Fig. 5 Changes in the standardized electrophoretic mobility of HCT and its degradant with pH. The curves are the simulated results of the analysis based on Eq. (3). ○, HCT; □, degradant from HCT.

示された。

4 結 言

酸解離定数をはじめとする迅速な平衡反応の解析においては、CZEによる有効電気泳動移動度の測定が有効な解析手段である。本研究においては、熱分解性を有するHCTについて、分解条件下でHCTの酸解離定数の決定が可能であることを例示し、その分解生成物である4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドについても酸解離定数を決定することができた。

謝 辞

本研究の一部は、JSPS科学研究費助成事業(26410154)の支援で進められた。

文 献

- 1) T. L. Lemke, D. A. Williams, V. F. Roche, S. W. Zito : "Foye's Principles of Medicinal Chemistry", pp. 728-730 (2008), (Lippincott Williams & Wilkins).
- 2) S. Hillaert, K. De Grauwe, W. Van den Bossche : *J. Chromatogr. A*, **924**, 439 (2001).
- 3) M. M. Salim, W. M. Ebeid, N. El-Enany, F. Belal, M. Walash, G. Patonay : *J. Sep. Sci.*, **37**, 1206 (2014).
- 4) X. Zheng, M. Lu, L. Zhang, Y. Chi, L. Zheng, G. Chen : *Talanta*, **76**, 15 (2008).
- 5) U. G. G. Hennig, L. G. Chatten, R. E. Moskalyk, C. Ediss : *Analyt.*, **106**, 557 (1981).
- 6) U. G. G. Hennig, R. E. Moskalyk, L. G. Chatten, D. L. Rabenstein : *Analyt.*, **106**, 565 (1981).
- 7) R. Ventura, J. Segura : *J. Chromatogr. B*, **687**, 127

とも pH の上昇に伴って無電荷の化学種から陰イオン性化学種が生成していることがわかる。HCT について式(3)に基づいて二段階の酸解離定数を決定したところ、 $pK_{a1} = 8.95 \pm 0.04$, $pK_{a2} = 10.66 \pm 0.07$ が得られた。Table 1 にまとめたように、調製直後の溶液で得られた値と近い値であった。 pK_{a2} 値については調製直後の HCT 溶液で得られた値からやや外れているが、Fig. 4 (g) のエレクトロフェログラムに示されるように HCT の CZE シグナルが pH 11 付近で分解生成物のそれと重なっているため、HCT の μ_{ep}' の精確さに影響していることが一因と考えられる。いずれにせよ、分解生成物の共存下でも pK_a の解析が可能であることが示された。

加水分解反応による分解生成物は4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドであることが知られており¹²⁾¹³⁾、この物質も二つのスルホンアミド基に対応する酸解離定数を有する。アルカリ性溶液中の有効電気泳動移動度は HCT のそれと同程度であることからジアニオン種の生成が示唆される。また、分解生成物のジアニオン種の電気泳動移動度は HCT よりも大きくなっており、HCT の分解による分子量減少を反映したものと考えられる。式(3)に基づく解析により得られた二段階の酸解離定数は $pK_{a1} = 9.27 \pm 0.06$, $pK_{a2} = 10.79 \pm 0.10$ (不確かさ: 標準誤差) が得られた (Table 1 に併記)。この物質が分解生成物であるためか pK_a の報告値は無い。CZE による酸解離定数の解析は、分解生成物の解析においても有効であることが

- (1996).
- 8) A. Avdeef, O. Tsinman : *Pharmaceut. Res.*, **25**, 2613 (2008).
 - 9) M. Stuart, K. Box : *Anal. Chem.*, **77**, 983 (2005).
 - 10) S. Romand, J. Schappler, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, S. Martel : *Eur. J. Pharm. Sci.*, **63**, 14 (2014).
 - 11) O Čudina, K. Karljiković-Rajić, I. Ruvarac-Bugarčić, I. Janković : *Colloid Surface A*, **256**, 225 (2005).
 - 12) 山名月中, 水上勇三 : 薬学雑誌 (*Yakugaku Zasshi*), **85**, 1057 (1965).
 - 13) A. A. Mahajan, A. K. Thaker, K. Mohanraj : *J. Braz. Chem. Soc.*, **23**, 445 (2012).
 - 14) M. Brigante, M. Della Greca, L. Previtiera, M. Rubino, F. Temussi : *Environ. Chem. Lett.*, **2**, 195 (2005).
 - 15) J. M. Dreyfors, S. B. Jones, Y. Sayed : *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **50**, 579 (1989).
 - 16) B. Pasquini, S. Orlandini, C. Caprini, M. Del Bubba, M. Innocenti, G. Brusotti, S. Furlanetto : *Talanta*, **160**, 332 (2016).
 - 17) H. M. Maher : *Biomed. Chromatogr.*, **28**, 573 (2014).
 - 18) J. J. Martínez-Pla, M. A. Martínez-Gómez, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, M. J. Medina-Hernández : *Electrophoresis*, **25**, 3176 (2004).
 - 19) N. Zhou, Y.-Z. Liang, B. Wang, P. Wang, X. Chen, M.-M. Zeng : *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 223 (2008).
 - 20) 高柳俊夫 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **64**, 105 (2015).
 - 21) T. Takayanagi, S. Motomizu : *Chem. Lett.*, **30**, 14 (2001).
 - 22) The R Project for Statistical Computing, available from <<https://www.r-project.org/>>, (accessed 2017-2-1).
 - 23) T. Takayanagi, D. Itoh, H. Mizuguchi : *Chromatography*, **37**, 105 (2016).
 - 24) T. Takayanagi, N. Shimakami, M. Kurashina, H. Mizuguchi, T. Yabutani : *Anal. Sci.*, **32**, 1327 (2016).
 - 25) J. Barbosa, D. Barrón, J. L. Beltrán, S. Butí : *Talanta*, **45**, 817 (1998).

Determination of Acid Dissociation Constants of Hydrochlorothiazide and Its Degradant through Measurement of the Effective Electrophoretic Mobilities in CZE

Toshio TAKAYANAGI^{*1,2,3}, Masashi ISODA², Daichi ITOH³ and Hitoshi MIZUGUCHI^{1,2,3}

* E-mail : toshio.takayanagi@tokushima-u.ac.jp

¹ Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Technology, Tokushima University, 2-1, Minamijyousanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

² Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Tokushima University, 2-1, Minamijyousanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

³ Department of Chemical Science and Technology, Graduate School of Advanced Technology and Science, Tokushima University, 2-1, Minamijyousanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

(Received February 18, 2017; Accepted March 28, 2017)

Hydrochlorothiazide, one of the popular diuretics, is degradable in an aqueous solution by hydrolysis, gradually forming 4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide. Upon determining the physicochemical constants such as acid dissociation constant (pK_a), the coexistence of any degraded species is not desirable. However, equilibrium analysis with the effective electrophoretic mobility measured by capillary zone electrophoresis (CZE) can allow the coexistence of such degraded substances. In this study, acid dissociation constants were determined by CZE with hydrochlorothiazide (HCT) under its degraded conditions. Two steps of the successive acid-dissociation constants have been determined with HCT as $pK_{a1} = 8.95 \pm 0.04$ and $pK_{a2} = 10.66 \pm 0.07$; the values agree well with those determined with a freshly prepared HCT solution. Further, two steps of the successive acid-dissociation constants were also determined with the degradant from HCT, 4-amino-6-chloro-*m*-benzenedisulfonamide, by the CZE analysis utilizing the resolution of the degradant from HCT; $pK_{a1} = 9.27 \pm 0.06$ and $pK_{a2} = 10.79 \pm 0.10$ were determined. The potential of the equilibrium analysis by CZE was demonstrated with the degradable HCT.

Keywords: hydrochlorothiazide; degradant; chlorothiazide; capillary zone electrophoresis; acid dissociation constant.