

Pravastatinin Su ve Su-Asetonitril İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Değerinin RPLC Metoduyla Belirlenmesi

Mehmet Emre TANRIKULU¹, İlkay KONÇE², Ebru ÇUBUK DEMİRALAY^{*1}

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma ve Geliştirme Anabilim Dalı, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 02.10.2022, Kabul / Accepted: 25.11.2022, Online Yayınlanma / Published Online: 25.04.2023)

Anahtar Kelimeler

RPLC,
Karboksilik asit grubu,
İyonlaşma sabiti,
Hidrofilik bileşik

Öz: Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi asidik ve bazik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin iyonlaşma/protonasyon (pK_a) sabitlerinin tayini için tercih edilmektedir. pK_a değeri, ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım, toksitite (ADMET) özelliklerini tahmin etmeye yarayan önemli bir parametredir. Sunulan bu çalışmada, pravastatinin su-asetonitril ikili karışımında pK_a değerinin tayini için RPLC metot geliştirilmiş ve asetonitrilin mobil fazdaki miktarının değişimiyle pravastatinin kromatografik davranışı da belirlenmiştir. Çalışma Nucleosil C4 (250×4,6 mm, 5 μ m) kolonda, 37°C'de ve 1 mL/dakika sabit akış hızında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen alıkonma verileriyle doğrusal olmayan model kullanılarak bileşiğin pK_a değeri belirlenmiştir. Hidrofilik özellikte olan pravastatinin su ortamındaki pK_a değeri farklı organik modifiyer-su karışımlarında tayin edilen mobil faz pK_a değerleri ve asetonitrilin makroskopik sabitleri (mol kesri, dielektrik sabiti, vs.), çözücü-çözünen arasındaki spesifik solvasyon etkileşim parametreleri kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu önemli fizikokimyasal parametrenin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Determination of Ionization Constant Value of Pravastatin in Water and Water-Acetonitrile Binary Mixtures by RPLC Method

Keywords

RPLC,
Carboxylic acid group,
Ionization constant,
Hydrophilic compound

Abstract: Reverse phase liquid chromatography (RPLC) is preferred for the determination of ionization/protonation (pK_a) constants of compounds containing acidic and basic functional groups. The pK_a value is an important parameter to predict the absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity (ADMET) properties of drugs. In this study, RPLC method was developed for the determination of pK_a value of pravastatin in water-acetonitrile binary mixture and the chromatographic behavior of pravastatin was determined by changing the amount of acetonitrile in the mobile phase. The study was carried out in Nucleosil C4 (250×4,6 mm, 5 μ m) column, at 37°C and at a constant flow rate of 1 mL/min. With the obtained retention data, the pK_a of the compound was determined using nonlinear model. The pK_a value of hydrophilic pravastatin in water was calculated using the mobile phase pK_a values determined in different organic modifier-water mixtures and the macroscopic constants (mole fraction, dielectric constant, etc.) of acetonitrile, specific solvation interaction parameters between the solvent and the solute. It has been observed that this important physicochemical parameter calculated is compatible with the literature data.

1. Giriş

Statin grubunu içeren ilaçlar dislipidemi tedavisinde kullanılan en etkili ve tolere edilebilen ajanlardır. Ayrıca Dünya'da en yaygın kullanılan farmasötik ilaç gruplarından birisidir. Bu ilaçlar 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktazın kompetitif inhibitörleridir [1]. Pravastatin, statin

sınıfına ait bir kolesterol düşürücü ajandır ve şu anda hiperkolesterolemiyi tedavi etmek ve koroner kalp hastalığı ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltmak için kullanılan en sık ve etkili reçeteli ilaçlar arasındadır [2]. Dünyada artan jenerik ilaç endüstrisi pazarı nedeniyle, bu ilaçların tayini için analitik metotların geliştirilmesi gereklidir. Yapılan literatür taramasında pravastatinin tayini için yüksek

performans sıvı kromatografi (HPLC) [3-5], kapiler elektroforez [6], elektroanalitik yöntemler [7-8] yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında ilaç endüstrisinde yaygın şekilde kullanılan HPLC yöntemi, pravastatinin kalitatif ve kantitatif tayini için tercih edilmektedir.

Ters faz HPLC metodu (RPLC), sıvı kromatografik tekniklerin içerisinde en popüler olanıdır. Düşük molekül ağırlıklı numune analizlerinin neredeyse %80-90'ı bu metot kullanılarak gerçekleştirilmektedir [9]. Hem alıkonma hem de seçiciliği aynı anda sağlayarak asidik, bazik ve nötral yapıdaki bileşiklerin tayini gerçekleştirilebilmektedir. Bu kromatografik tayin kimyasal olarak modifiye edilmiş sabit fazlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İlaç endüstrisinde ters faz sıvı kromatografi ayırmaları için yapılan uygulamalarda silika esaslı dolgu materyalleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında başarılı bir ayırma için mobil fazdaki organik modifiyerin tipi, eluent bileşimi, pH ve tampon derişimindeki değişim sağlanmalıdır. Tayin edilen bileşik iyonlaşabilir ise mutlaka mobil faz pH'sı, sıcaklık ve mobil fazdaki organik çözücü derişimindeki değişimden etkilenir. Mobil fazın gücü sadece organik çözücünün derişimine bağlı değil aynı zamanda kullanılan çözücünün tipine de bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan asetonitril (ACN), polar aprotik bir çözücüdür ve hem suda hem de polar çözücülerde çözünme özelliğine sahiptir. Su ile farklı hacimlerde organik çözücü karıştırılarak oluşturulan hidroorganik karışımlarda, çözücü miktarındaki değişime bağlı olarak RPLC'de analizlenen bileşiğin alıkonma davranışında etkin bir değişiklik gözlenebilir [9-10]. Bunun yanında iyonlaşan bileşiklerin analizinde, analitlerin iyonlaşma/protonasyon (pK_a) değerlerinden en az bir birim uzaklıktaki mobil faz pH'ı kromatografik tayin için tercih edilebilir. pK_a önemli bir fizikokimyasal parametredir. Analitin pK_a değerleri, iyonlaşan bileşiklerin çözünürlüğünü etkilediği gibi farmokinetik (ADME-absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım) özelliklerinin belirlenmesinde de etkin bir parametredir. Bu parametrenin tayini için kullanılan potansiyometrik titrasyonlar ve spektrofotometrik analizler, eğer bileşik saf değilse suda az çözünüyorsa, belirgin bir kromofor grubu yoksa ve miktarı azsa sorun teşkil edebilir. Analizlenen iyonlaşan bileşiklerde çok az miktarın yeterli olması, bileşiğin saflığının ve çözünürlüğünün yeterli olması şartı gerekmediğinden RPLC metodu pK_a değerlerinin tayininde daha çok tercih edilmektedir [11-13].

Çalışılan mobil faz pH'sı (ξpH) ve analit alıkonması arasındaki ilişki kullanılarak hidroorganik karışımlarda analitin yapısındaki belirli fonksiyonel grubun pK_a (ξpK_a) değeri hesaplanabilir. İzokratik metotla gerçekleştirilebilen bu tayinle günümüzde birçok ilaç etken maddenin pK_a tayini yapılabilmektedir. RPLC metotla yapılan analizlerde su ortamında çözünürlüğü az olan bileşiklerin pK_a

tayini hidroorganik karışımlarda yapılmakta ve bu ortamlarda elde edilen ξpK_a verileri kullanılarak su ortamındaki pK_a ($^w pK_a$) değerleri hesaplanabilmektedir [9,14].

Statin grubu bileşiklerden birisi olan pravastatin hidrofilik özellikte olup suda tamamen çözünmediğinden, hidroorganik karışımları içeren mobil fazlar kullanılarak RPLC metoduyla analizlenebilmektedir. Bu bileşik için sınırlı sayıda yapılan pK_a çalışmalarında elde edilen veriler yüksek organik çözücülerin bulunduğu ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Sunulan bu çalışmada pravastatin seçilen su-ACN ikili karışımlarında (%25, 30, 35, v/v) çözümler RPLC metoduyla analizlenmiştir. Analiz için C4 kolon tercih edilmiş ve sabit akış hızında 1 mL/dakikada gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 37°C'de yapılan kromatografik analizler sonucunda bileşiğin mobil fazdaki pH değişimine bağlı olarak alıkonma zamanındaki (t_R) değişim incelenmiştir. pH- t_R arasındaki doğrusal olmayan ilişki kullanılarak pravastatinin %25, 30, 35 (v/v) ACN içeren ACN-su ikili karışımlarındaki ξpK_a değerleri belirlenmiştir. Mobil fazda kullanılan asetonitrilin makroskopik sabitleri (mol kesri, dielektrik sabiti), çözücü-çözünen ilişkisinin kullanıldığı spesifik solvasyon etkileşimindeki farklılıklara bağlı olan parametreler ve ξpK_a değerleri kullanılarak hidrofilik bileşik pravastatinin $^w pK_a$ değeri hesaplanmıştır. 37°C'de elde edilen bu değer Abraham çözünen parametreleri kullanılarak [15], 25 °C için de deneysel bir çalışma yapılmadan tahmin edilmiştir. Ayrıca bileşiğin farklı pH değerlerinde iyonlaşma derecesi Henderson-Hasselbach eşitliği ile belirlenmiştir [16].

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar ve standart çözeltilerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmamıştır. Pravastatin (%98 saflıkta) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından, asetonitril, sodyum hidroksit (NaOH), o-fosforik asit (o-H₃PO₄) ve potasyum hidrojen ftalat (KHP) ise Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

pH analizleri için yapılan elektrot kalibrasyonunda, KHP çözeltisi 0,05 mol/kg derişimde çalışılan su-ACN ikili karışımlarında çözülerek hazırlanmıştır [17]. Pravastatin su ortamında çözünürlüğü (logS: -4,75) [18] az olduğundan çalışılan %25, 30, 35 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında çözülmüş, 100 µg/mL derişimde hazırlanmıştır. Bileşik güneş ışığından uzak, +4°C'de saklanmıştır.

2.2. Kullanılan cihazlar ve kromatografik koşullar

Pravastatinin kromatografik analizleri için Shimadzu HPLC cihazı kullanılmıştır (Kyoto, Japan). Kullanılan

sistem UV dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20A), pompa (LC20AD), degazer (DGU-20A3) ve manuel enjeksiyon sisteminden oluşmaktadır. Mobil faz pH analizleri için Mettler Toledo marka pH analiz cihazı (Schwerzenbach, Switzerland) kullanılmıştır. Çalışma boyunca kullanılan ultra saf su Direct-Q3 UV su saflaştırma sisteminden (Millipore, Bedford, MA, USA) temin edilmiştir.

Bileşiğin kromatografik analizi için karbon içeriği %2 ve pH çalışma aralığı 2-8 olan Nucleosil C4 kolon (250x4,6 mm, 5 µm; Macherey-Nagel) tercih edilmiştir. %25, 30, 35 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında hazırlanan mobil faza 30 mM o-H₃PO₄ ilave edilmiş ve istenilen pH değeri 1 M NaOH çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Mobil faz pH'sı 3,5-8,0 arasında tutularak, pravastatinin kromatografik alıkonma davranışı ve s_pK_{a1} değeri belirlenmiştir. Bileşik 239 nm'de UV dedektörle analizlenmiş ve 1 mL/dakika akış hızında; 37°C'de tayin edilmiştir. HPLC sistemine 20 µL enjekte edilen bileşik üç tekrarlı olarak analizlenmiş ve kesinliği yüksek olan bu analizin bağıl standart sapma değeri %1'nin altında hesaplanmıştır.

2.3. Teorik alıkonma zamanı ve s_pK_a verilerinin hesaplanması

Pravastatinin çalışılan hidroorganik ikili karışımlarını içeren mobil faz pH değişimlerine bağlı olarak t_R değerleri RPLC metoduyla belirlenmiş ve bu veriler kullanılarak doğrusal olmayan regresyon programıyla (NLREG) s_pK_a değerleri ve iyonlaşmış ve iyonlaşmamış formlarının uç t_R (HA, A⁻) değerleri hesaplanabilmektedir [19]. NLREG programıyla hesaplanan bu veriler kullanılarak teorik t_R değerleri hesaplanmıştır. Teorik ve deneysel veriler arasındaki uyum artık kareler toplamı ile (RSS) ile verilmiştir.

3. Bulgular

Oktadesil silika kolonlar (C18) çoğunlukla hidrofobik bileşiklerin analizlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin analizi için seçilen bu kolonlar gereksiz çözücü kullanımına sebep olmakta ayrıca analiz zamanını gereksiz yere uzatmaktadır. Bunun önüne geçmek için analizlenen bileşiği kolonda daha az tutma özelliği olan kolonlar tercih edilmelidir. Bileşiğin lipofilisite sabiti logP_{o/w}:3,01'dir [18]. Kimyasal yapısındaki hidroksil grubundan dolayı diğer statin grubu bileşiklere göre orta derecede hidrofilik bir bileşik olan pravastatinin kolonda daha az tutunması için Nucleosil C4 kolon (250x4,6 mm, 5 µm; Macherey-Nagel) tercih edilmiştir. Bu kolon orta yoğunlukta monomerik bütül (C4) grubu ile modifiye edilmiş silika esaslı bir kolondur. Tamamı gözenekli (300 Å), küresel yapıdaki parçacıklardan oluşmuştur. Kolon bu tip özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir. Ayrıca kolonun etkin tabaka sayısının yüksek olması (7601) ve kuyruklanma faktörünün (1,403) de 2'den düşük olması bileşiğin simetrisinin iyi olduğunu göstermektedir.

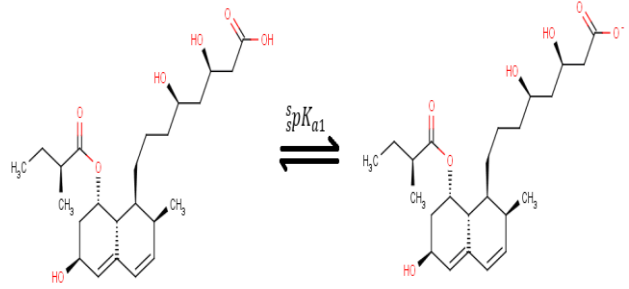
Bu çalışmada seçilen kolonda, 37°C sıcaklıkta, sabit akış hızında pravastatin analizlenmiştir. Çalışılan her bir mobil faz pH değerinde bileşiğin t_R değeri üç tekrarlı olarak belirlenmiş ve ortalama t_R değeri kullanılmıştır. Mobil fazdaki ACN ve pH değişimine bağlı olarak elde edilen deneysel t_R değerleri NLREG programında analizlenmiştir. Elde edilen s_pK_{a1} ve t_{RHA}, t_{RA⁻} değerleri standart sapma değerleriyle birlikte Tablo 1'de verilmiştir [19].

Tablo 1. NLREG programı ile hesaplanmış s_pK_{a1} ve t_{RHA}, t_{RA⁻} verileri

% ACN (v/v)	s_pK_{a1}	t _{RHA}	t _{RA⁻}
25	5,296 ± 0,046*	14,831 ± 0,186*	5,331 ± 0,136*
30	5,488 ± 0,065*	7,859 ± 0,103*	3,870 ± 0,086*
35	5,697 ± 0,099*	5,360 ± 0,065	3,619 ± 0,062*

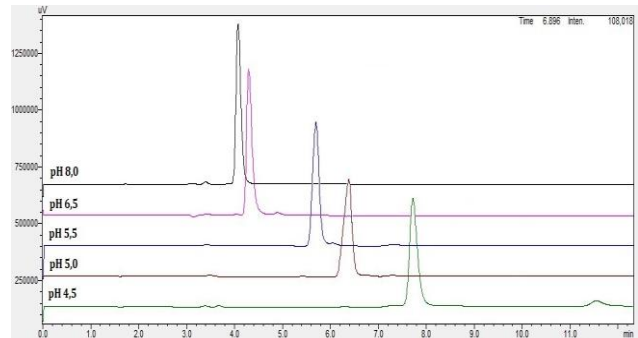
*Standart sapma

Bileşiğin iyonlaşma dengesi, Şekil 1'de gösterilmiştir. Çalışılan her bir ACN yüzdesindeki değişime bağlı olarak değişen s_pK_{a1} değerleri, bileşiğin yapısındaki karboksilik asit grubuna aittir. Bu fonksiyonel grup, diğer statin grubu bileşiklere göre daha hidrofilik özellik sağlamaktadır.



Şekil 1. Pravastatinin iyonlaşma dengesi [20]

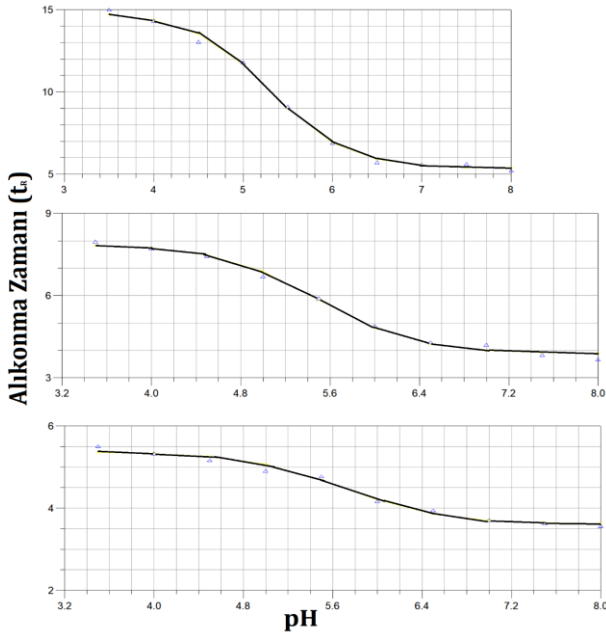
Pravastatinin çekirdek yapısında bulunan -OH grubuna ait s_pK_{a2} değeri, kolonun çalışma aralığının dışında olduğundan bu değer tayin edilememiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi mobil fazdaki ACN miktarı arttıkça bileşiğin s_pK_{a1} değeri de artmaktadır. Bu durum asidik özellikteki bileşiğin pK_a değerinin tayininde literatürdeki benzer karboksilik asit grubu içeren bileşiklerin verileriyle uyum içerisindedir [14, 21,22]. %30 ACN (v/v) içeren asetonitril-su ikili karışımlarında mobil faz pH'sına bağlı olarak t_R değerinin değişimini gösteren kromatogram Şekil 2'de verilmiştir. NLREG programından elde edilen pH- t_R ilişkisi çalışılan üç ortam için Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 2. pH-t_R ilişkisini gösteren kromatogram

Tablo 2. Pravastatin için deneysel ve hesaplanmış teorik alıkonma zamanı değerleri

% 25 ACN (v/v)			% 30 ACN (v/v)			% 35 ACN (v/v)		
$t_{Rdeneysel}$	$t_{Rteorik}$	$(t_{Rdeneysel} - t_{Rteorik})^2$	$t_{Rdeneysel}$	$t_{Rteorik}$	$(t_{Rdeneysel} - t_{Rteorik})^2$	$t_{Rdeneysel}$	$t_{Rteorik}$	$(t_{Rdeneysel} - t_{Rteorik})^2$
15,009	14,681	0,107	7,959	7,818	0,020	5,506	5,349	0,025
14,321	14,374	0,003	7,721	7,733	0,000	5,326	5,326	0,000
13,046	13,521	0,226	7,442	7,487	0,002	5,165	5,256	0,008
11,795	11,640	0,024	6,690	6,880	0,036	4,911	5,069	0,025
9,112	8,986	0,016	5,893	5,837	0,003	4,775	4,683	0,008
6,882	6,899	0,000	4,885	4,808	0,006	4,169	4,197	0,001
5,715	5,890	0,031	4,292	4,224	0,005	3,944	3,856	0,008
5,566	5,515	0,003	4,198	3,989	0,044	3,711	3,702	0,000
5,594	5,390	0,042	3,820	3,908	0,008	3,628	3,646	0,000
5,212	5,350	0,019	3,665	3,882	0,047	3,572	3,628	0,003
	RSS	0,470		RSS	0,171		RSS	0,078

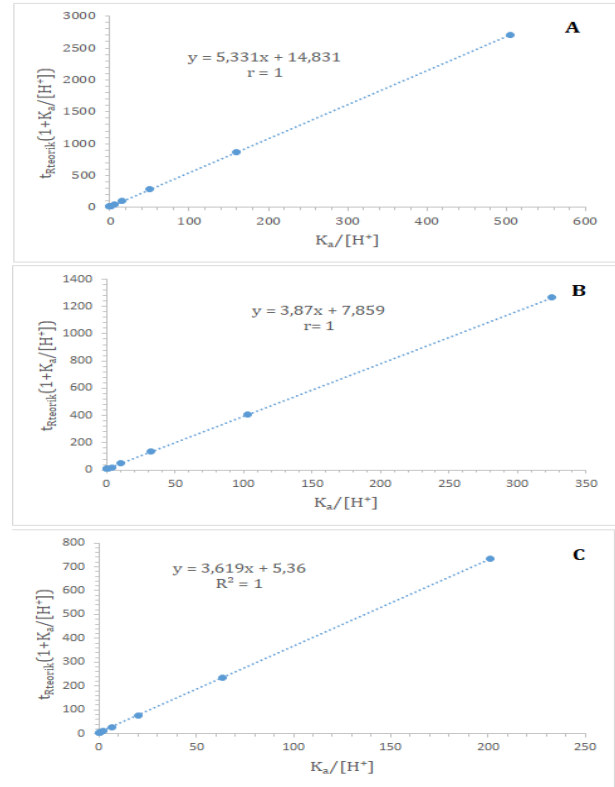
**Şekil 3.** NLREG programı ile pH- t_R ilişkisi

NLREG programından elde edilen ${}^s pK_{a1}$ ve t_{RHA} , t_{RA}^- değerleri kullanılarak teorik t_R değerleri Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır [23].

$$t_{Rteorik} = t_{RHA} \left(\frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \right) + t_A \left(\frac{K_a}{[H^+] + K_a} \right) \quad (1)$$

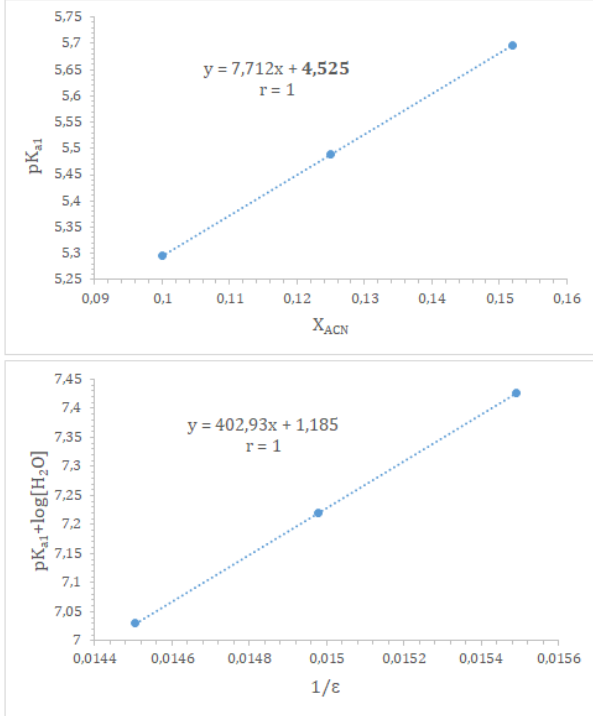
Bu eşitlik kullanılarak pravastatinin çalışılan hidroorganik karışımlardaki ve pH değerlerindeki $t_{Rteorik}$ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2 incelendiğinde elde edilen artık kareler toplamının (RSS) oldukça küçük olduğu, deneysel ve teorik değerlerin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Bunun yanında $K_a/[H^+]$ verilerine karşın $t_{Rteorik}(1 + K_a/[H^+])$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrusal fonksiyonun eğim ve kesim değerleri sırasıyla t_{RA}^- , t_{RHA} değerlerini vermektedir. Bu doğrusal ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 4'de verilmiştir. Elde edilen eğim ve kesim değerleri de NLREG sonuçlarıyla birebir uyumludur.

**Şekil 4.** $K_a/[H^+] - t_{Rteorik}(1 + K_a/[H^+])$ doğrusal ilişkisini gösteren grafikler A) %25 ACN-su, B) %30 ACN-su, C) %35 ACN-su ortamı

Pravastatinin su ortamında çözünürlüğü ($\log S$: -4,75) [18] az olduğundan, çalışılan %25, 30, 35 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında RPLC metoduyla analizlenmiş ve bileşiğin ${}^s pK_{a1}$ değeri NLREG programıyla hesaplanmıştır. Bileşik su ortamında çözünemediğinden RPLC'de su ortamda analizlenmesi mümkün değildir. Bunun için farklı yaklaşımlar kullanarak pravastatinin su ortamındaki pK_a (${}^w pK_a$) değeri hesaplanabilmektedir. İlk olarak çalışılan ACN'nin hacimce yüzdelerine karşılık gelen mol kesri (X_{ACN}) değerleri kullanılmıştır [24]. NLREG programıyla belirlenmiş ${}^s pK_{a1}$ değeri, X_{ACN} değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim değeri pravastatinin su ortamındaki pK_a (${}^w pK_{a1}$) değerini vermektedir (Şekil

5). İkinci yaklaşımda Yasuda-Shedlovsky (YS) metodunda ${}^s pK_{a1} + \log[H_2O]$ değerleri, $1/\epsilon$ 'a karşı grafiğe geçirilerek doğrusal bir ilişki elde edilmiştir [25]. Bu yaklaşımda kullanılan asetonitrilin dielektrik sabiti (ϵ) değerleri Barbosa ve ark. tarafından hesaplanmıştır [24].



Şekil 5. ${}^s pK_{a1}$ - X_{ACN} ve Yasuda-Shedlovsky yaklaşımları ile ${}^w pK_{a1}$ değerlerinin hesaplanması

Üçüncü yaklaşımda ise alifatik karboksilik asit grubu içeren bileşiğin, % ACN(v/v) ortamlarında hesaplanmış a_s ve b_s değerleri kullanılarak, pravastatinin su ortamındaki ${}^w pK_{a1}$ değeri hesaplanabilmektedir (Eşitlik 2) [26].

$${}^s pK_{a1} = a_s \cdot {}^w pK_{a1} + b_s \quad (2)$$

Hesaplamalarda kullanılan a_s ve b_s değerleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Hesaplamalarda kullanılan a_s ve b_s değerleri [26]

%ACN (v/v)	%25	%30	%35
a_s	1,107	1,118	1,228
b_s	0,180	0,289	0,317

b_s , çözücü ve su arasındaki çözünene; a_s ise, çözünen ve çözücüye bağlı olan spesifik solvasyon etkileşimleri arasındaki farklılıklara bağlı olan parametrelerdir [26]. Bu üç yaklaşım kullanılarak pravastatin için hesaplanan ${}^w pK_{a1}$ değerleri Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4'teki veriler incelendiğinde 37°C için hesaplanmış ${}^w pK_{a1}$ değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Deneysel olarak seçilen sıcaklıkta (37°C) hesaplanan ${}^w pK_{a1}$ değeri ve asidik gruplar için belirlenmiş Abraham çözünen parametreleri (Tablo 5) Eşitlik 3 ve Eşitlik 4'te yerine

konulduğunda ΔpK_a değeri ve deneysel bir çalışma yapmadan pravastatinin 25°C'deki ${}^w pK_{a1}$ değeri hesaplanabilmektedir [15].

Tablo 4. Pravastatin için farklı yaklaşımlarla hesaplanmış ${}^w pK_{a1}$ değerleri

	${}^s pK_{a1}$ - X_{ACN} ilişkisi	Yasuda-Shedlovsky metodu	3. yaklaşım
${}^w pK_{a1}$	4,525	4,574	4,551

$$\Delta pK_a = k_0 pK_a^{37} + c_0 + c_1 \sum \alpha_2^H + c_2 \sum \beta_2^H + c_3 \pi_2 + c_4 R_2 + c_5 V_x \quad (3)$$

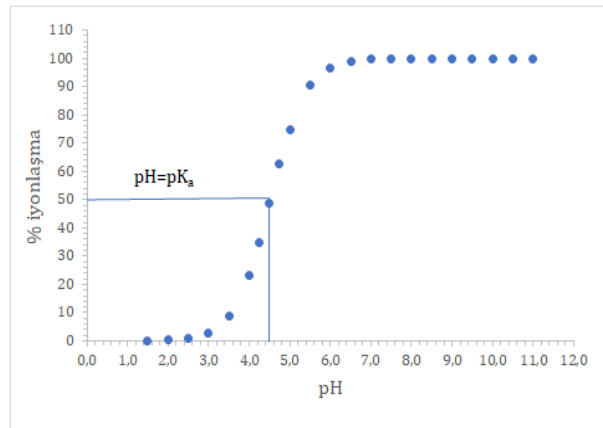
$$\Delta pK_a = pK_a^{37} - pK_a^{25} \quad (4)$$

Tablo 5. Abraham çözünen parametreleri

	k_0	c_0	$c_1 \sum \alpha_2^H$	$c_2 \sum \beta_2^H$
Asitler	-0,022	0,123	0,093	0,045
	$c_3 \pi_2$	$c_4 R_2$	$c_5 V_x$	
	-0,145	0,004	0,028	

37°C sıcaklıkta ${}^s pK_{a1}$ - X_{ACN} ilişkisi kullanılarak bulunan ${}^w pK_{a1} = 4,525$ kullanıldığında 25°C için ${}^w pK_{a1} = 4,475$ olarak hesaplanmıştır. Sun ve Avdeef tarafından yapılan çalışma [15] incelendiğinde asidik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin 25°C'deki pK_a değerleri, 37°C'de hesaplanan pK_a değerlerine göre daha azdır. Bu sonuç yapılan hesaplamaların doğruluğunu desteklemektedir.

Bir ilacın iyonlaşma derecesi, ADME özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İyonlaşmayan ilaçlar hücre membranını kolaylıkla geçebildiğinden, ortam pH'sı değiştikçe ilacın nasıl iyonlaştığının anlaşılması gerekmektedir. Bir ilacın belirli pH değerlerinde iyonlaşıp iyonlaşmadığı formların belirlenebildiği iyonlaşma yüzdesi Henderson-Hasselbach denklemi ile hesaplanabilir [16]. Pravastatin için % iyonlaşma, ${}^w pK_{a1}$ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. pH 1,5-11 aralığında % iyonlaşma değerlerini gösteren grafik Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Pravastatinin % iyonlaşma değerleri

Asidik fonksiyonel grubunu içeren pravastatinin %50'sinin iyonlaştığı pH, pK_a değerini vermektedir. Şekil 6'ya göre bu bileşiğin pK_a değerinin yaklaşık 2 birim altında iyonlaşmadığı görülmektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada seçilen bileşik pravastatin, diğer statin grubu bileşiklere göre yapısındaki hidroksil gruplarından dolayı daha hidrofilik özellikte olmasına rağmen yapılan ters faz sıvı kromatografik çalışmalarda yüksek organik çözücü içeren mobil fazlarda analizlenmiştir. Bu bileşiğin RPLC metotla pK_a analizinde Talay ve ark. [27] tarafından yapılan çalışmada % 40-50 ACN (%v/v) içeren ACN-su ikili karışımlarında kapasite faktörleri tayin edilmiştir. Çalışılan pH ve kapasite faktörü ilişkisi kullanılarak su-ACN ikili karışımlarındaki pK_a değerleri ve bu değerler kullanılarak su ortamındaki pK_a değeri belirlenmiştir. Çalışma C18 kolonla, 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan w_pK_a değeri (4,429), bu çalışmadaki $^w_pK_{a1}$ değeri ile uyumludur. Canseven ve arkadaşları [28] tarafından yapılan çalışma 25°C'de, % 50-65 metanol (%v/v) içeren metanol-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan ortamlardaki pK_a değerleri RPLC metotla belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak su ortamındaki pK_a değeri hesaplanmıştır. w_pK_a değeri (4,564), bu çalışmadaki $^w_pK_{a1}$ değeri ile uyumludur. Ishihama ve ark. tarafından kapiler elektroforez metoduyla pravastatinin pK_a değeri (4,360) belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler pravastatinin 37°C'de belirlenmiş ilk alikonma verileridir. Ayrıca literatürde yapılan çalışmalara göre daha az miktarda organik çözücü kullanılmıştır. Bunun dışında herhangi bir deneysel çalışma yapmadan Abraham çözünen parametrelerini kullanarak bileşiğin 25°C'deki su ortamındaki pK_a değeri de tahmin edilmiştir. Pravastatinin 37°C'de vücut sıvılarında ve bölgelerindeki iyonlaşma yüzdeleri de bu çalışma ile hesaplanabilmektedir. Bu çalışma ile belirlenen verilerin herhangi bir deneme yanılmaya ihtiyaç olmadan sıvı kromatografik analizlerde metot optimizasyonu çalışmaları için öngörü niteliği taşımaktadır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Süzer, Ö. ed. 2009. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2017s.
- [2] Brain-Isasi, S., Requena, C., Alvarez-Lueje, A. 2008. Stability Study of Pravastatin Under

Hydrolytic Conditions Assessed by HPLC. Journal of the Chilean Chemical Society, 53(4), 1684-1688.

- [3] Prasanthi, T., Lakshmana, R. A., Reshma, P., Susanthi, P., Merwin, P., Ajay, P. 2022. Novel RP-HPLC Method Development and Validation for Estimation of Pravastatin in Pure and Pharmaceutical Formulation. Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research, 4(3), 13-17.
- [4] Shinde, A. C., Devhadrao, N. D., Bansode, A. S., Bansode, A. S. 2019. Analytical Method Development and Validation of Assay Test of Pravastatin Sodium Tablets. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 9(2), 70-75.
- [5] Maree, S., Preez, J. L., Plessis, L. H., Plessis, J., Gerber, M. 2020. A Novel HPLC Method Developed and Validated for the Detection and Quantification of Atorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin and Pravastatin During Transdermal Delivery Studies. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 75(5), 164-166.
- [6] Suntornsuk, L., Anurukvorakun, O. 2022. Sensitivity Enhancement in Capillary Electrophoresis and Their Applications for Analyses of Pharmaceutical and Related Biochemical Substances. Electrophoresis, 43, 939-954.
- [7] Talay Pınar, P., Tuluk, T., Şentürk, Z. 2020. Determination of Pravastatin Drug Formulation by Squarewave Voltammetry on Glassy Carbon Elektrode. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 22(64), 29-35.
- [8] Antal, I., Koneracka, M., Zavisova, V., Kubovcikova, M., Kormosh, Z., Kopcansky, P. 2017. Statins Determination: A Review of Electrochemical Techniques. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 47(6), 474-489.
- [9] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists, First ed., Wiley-Interscience, USA, 1140s.
- [10] Meyer, V.R. 2010. Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fifth ed., John Wiley and Sons, United Kingdom, 428s.
- [11] Bergés, R., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J. 2000. Modelling Retention in Liquid Chromatography as a Function of Solvent Composition and pH of the Mobile Phase. Journal of Chromatography A, 869, 27-39.
- [12] Rosés, M., Bosch, E. 2002. Influence of Mobile Phase Acid-Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds. Journal of Chromatography A, 982, 1-30.

- [13] Konçe, İ., Demiralay, E. Ç., Ortak, H. Y. 2019. Chromatographic Determination of Thermodynamic Acid Dissociation Constants of Tetracycline Antibiotics and Their Epimers. *Journal of Chromatographic Science*, 57(8), 745-750.
- [14] Demiralay, E. Ç., Üstün, Z., Daldal, Y. D. 2014. Estimation of Thermodynamic Acidity Constants of Some Penicillinase-resistant Penicillins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91(25), 7-11.
- [15] Sun, N., Avdeef, A. 2011. Biorelevant pKa (37°C) Predicted from the 2D Structure of the Molecule and its pKa at 25°C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 173-182.
- [16] Tallarida, R. J., Murray, R. B. 1987. Henderson-Hasselbalch Equation, in: R.J. Tallarida, R.B. Murray (Eds.), *Manual of Pharmacologic Calculations*, Springer, New York, 74-75.
- [17] Mussini, T., Covington, A. K., Longhi, P., Rondinini, S. 1985. Criteria for Standardization of pH Measurements in Organic Solvents and Water + Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure and Applied Chemistry*, 57(6), 865-876.
- [18] SwissADME program 2022. [http://www.swissadme.ch /index.php](http://www.swissadme.ch/index.php) (Erişim Tarihi: 25.09.2022).
- [19] NLREG Version 4.0. P.H. 2022. Sherrod. <http://www.sandh.com/Sherrod.1991> (Erişim Tarihi: 27.09.2022).
- [20] Chemicalize, 2018. Kimyasal Hesaplama <https://chemicalize.com/#/calculation> (Erişim Tarihi: 21.03.2018).
- [21] Demiralay, E. Ç., Koç, D., Daldal, Y. D., Çakır, C. 2012. Determination of Chromatographic and Spectrophotometric Dissociation Constants of Some Beta Lactam Antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 139-143.
- [22] Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V. 1998. Retention Behaviour of Quinolone Derivatives in High-Performance Liquid Chromatography Effect of pH and Evaluation of Ionization Constants. *Journal of Chromatography A*, 823, 411-422.
- [23] Poole, C. F., Poole, S. K. 1991. *Chromatography Today*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, First Edition. 715s.
- [24] Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V. 1997. Acid-Base Behaviour of Tripeptides in Solvents Used in Liquid Chromatography. Correlation Between pK Values and Solvatochromic Parameters of Acetonitrile-Water Mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 347(3), 295-304.
- [25] Motoo, Y. 1959. Dissociation Constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 32(5), 429-432.
- [26] Espinosa, S., Bosch, E., Rosés, M. 2002. Retention of Ionizable Compounds in High-Performance Liquid Chromatography 14. Acid-Base pK Values in Acetonitrile-Water Mobile Phases. *Journal of Chromatography A*, 964, 55-66.
- [27] Talay, A., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z. 2015. Investigation of Thermodynamic Acidity Constants of Some Statins with RPLC Method. *Journal of Molecular Liquids*, 208, 286-290.
- [28] Canseven, V., Demiralay, E. Ç., Üstün, Z., Daldal, Y. D., Özkan, S. A., Alsancak, G. 2016. Measurements of Thermodynamic Acid Dissociation Constants for Three HMG-CoA Reductase Inhibitors by using RPLC and Study of Validation in Pharmaceutical Tablets. *Current Pharmaceutical Analysis*, 12, 1-8.
- [29] Ishihama, Y., Nakamuro, M., Miwa, T., Kajima, T., Asakawa, N. 2002. A Rapid Method for pKa Determination of Drugs Using Pressure Assisted Capillary Electrophoresis with Photodiode Array Detection in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(4), 933-942.