

Favipiravirin Su-Asetonitril İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Değerinin Belirlenmesi ve İki Farklı C18 Kolonun Karşılaştırılması

Ümit Ayhan Arzuoğlu¹, İlkey Konçe², Ebru Çubuk Demiralay³

^{1,3}Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32200, Isparta, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0002-3996-9076>

<https://orcid.org/0000-0003-3542-7090>

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma ve Geliştirme Anabilim Dalı, 32200, Isparta, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0002-6270-7509>

*yazışılan yazar: ebrucubuk@sdu.edu.tr

(Alınış / Received: 20.10.2022, Kabul / Accepted: 05.05.2023, Yayınlanma / Published: 22.06.2023)

Öz: Favipiravir (T-705), RNA virüslerinin RNA'ya bağımlı RNA polimerazını seçici ve güçlü bir şekilde inhibe eden bir anti-viral ajandır. Bu bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizinde en çok ters faz sıvı kromatografi (RPLC) metodu tercih edilmektedir. Bu metot, asidik ve bazik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin iyonlaşma/protonasyon (pK_a) sabitlerinin tayini için çok tercih edilmektedir. pK_a değeri, bileşiklerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini tahmin etmeye yarayan önemli bir parametredir. Bu parametre ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım, toksite (ADMET) karakterizasyonunu da içeren önemli bir veridir. Sunulan bu çalışmada, favipiravirin su-asetonitril ikili karışımında pK_a değerinin tayini için iki farklı özellikteki kromatografik kolonlar kullanılarak RPLC metot geliştirilmiş ve asetonitrilin mobil fazdaki miktarının değişimiyle favipiravirin kromatografik davranışı da belirlenmiştir. Çalışma 37°C kolon sıcaklığında ve sabit akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen alıkonma verileriyle sigmoidal ve doğrusal olmayan modeller kullanılarak bileşiğin pK_a değeri belirlenmiştir. Hidrofilik özellikte olan favipiravirin su ortamındaki pK_a değeri, mobil faz pK_a değerleri ve asetonitrilin makroskopik sabitleri (mol kesri, dielektrik sabiti, vs.) kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu önemli fizikokimyasal parametre literatürdeki deneysel çalışma ile elde edilen ilk veridir.

Anahtar kelimeler: Favipiravir, RPLC, Alıkonma zamanı, İyonlaşma sabiti, Hidrofilik bileşik

Determination of Ionization Constant Value in Water-Acetonitrile Binary Mixtures of Favipiravir and Comparison of Two Different C18 Columns

Abstract: Favipiravir (T-705) is an anti-viral agent that selectively and potently inhibits the RNA-dependent RNA polymerase of RNA viruses. The reverse phase liquid chromatography (RPLC) method is mostly preferred in the qualitative and quantitative analysis of this compound. This method is highly preferred for the determination of ionization/protonation (pK_a) constants of compounds containing acidic and basic functional groups. The pK_a value is important parameter to predict the physicochemical and biological properties of compounds. This parameter is an important data including the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) characterization of drugs. In this study, the RPLC method was developed using two different chromatographic columns for the determination of the pK_a

value of favipiravir in a water-acetonitrile binary mixture, and the chromatographic behavior of favipiravir was determined by changing the amount of acetonitrile in the mobile phase. The study was carried out at 37 °C column temperature and constant flow rates. The pKa value of the compound was determined by using sigmoidal and nonlinear models with the obtained retention data. The pKa value of hydrophilic favipiravir in water was calculated using the mobile phase pKa values and the macroscopic constants (mole fraction, dielectric constant, etc.) of acetonitrile. This important calculated physicochemical parameter is the first data obtained from the experimental study in the literature.

Keywords: Favipiravir, RPLC, Retention time, Ionization constant, Hydrophilic compound

1. Giriş

Favipiravir (T 705), ribonükleik asit (RNA) virüslerinin RNA'ya bağlı RNA polimerazını seçici ve güçlü bir şekilde inhibe eden yeni geniş spektrumlu bir antiviral ilaçtır. İlk olarak 2014 yılında Japonya'da Toyama Chemicals tarafından geliştirilmiş ve üretilmiştir ve çok çeşitli influenza virüslerine ve alt tiplerine karşı etkilidir. Favipiravir yaygın olarak COVID-19 olarak bilinen şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) enfeksiyonlarına karşı ilaç olarak kullanımı nedeniyle 2020 yılında çok ilgi görmüştür [1,2]. Özellikle bu tarihten sonra ilaç endüstrisinde önemli bir yere sahip olan bu ilacın tayini için analitik metotların geliştirilmesi ayrı bir gereklilik kazanmıştır. Yapılan literatür taramasında favipiravirin tayini için yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) [3,4], spektrofotometri [5] ve elektroanalitik yöntemler [6,7] yaygın şekilde kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında ilaç endüstrisinde yaygın şekilde kullanılan HPLC yöntemi, favipiravirin kalitatif ve kantitatif tayini için özellikle tercih edilmektedir [8].

Ters faz yüksek performans sıvı kromatografi metodu (RPLC), sıvı kromatografik tekniklerin içerisinde en popüler olanıdır. Düşük molekül ağırlıklı numunelerin 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 karıştırılarak oluşturulan hidro-organik karışımlarda, miktarındaki değişime bağlı olarak RPLC'de analizlenen bileşiğin alıkonma davranışında etkin bir rol oynamaktadır [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 farmakokinetik (ADME-absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım) özelliklerinin belirlenmesinde de etkin bir parametredir. Bu fizikokimyasal 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. Bu gibi dezavantajların üstesinden gelen RPLC metodu ile pK_a değerlerinin tayini daha çok tercih edilmektedir [11-13].

Çalışılan mobil faz pH'sı (s_pH) ve analit alıkonması arasındaki ilişki kullanılarak hidro-organik karışımlarda analitin yapısındaki belirli fonksiyonel grubun pK_a (s_pK_a) değeri hesaplanabilir. İzokratik metotla gerçekleştirilebilen bu tayinle günümüzde birçok ilaç etken maddenin pK_a değerinin tayini yapılabilmektedir. RPLC metotla yapılan analizlerde su ortamında çözünürlüğü az olan bileşiklerin pK_a tayini hidro-organik karışımlarda yapılmakta ve bu ortamlarda elde edilen s_pK_a verileri kullanılarak su ortamındaki pK_a (w_pK_a) değerleri hesaplanabilmektedir [9,14].

Pürin nükleozid analogu favipiravir hidrofilik özelliği olmasına rağmen yapılan HPLC çalışmaların çoğunda hidro-organik karışımları içeren mobil fazlar kullanılarak RPLC metoduyla analizlenmiştir. Sunulan bu çalışmada favipiravir suca zengin, su-ACN ikili karışımlarında (% 2, 4, 6, v/v) çözülerek RPLC metoduyla analizlenmiştir. Analiz için iki farklı kimyasal yapıya sahip C18 kolon tercih edilmiş ve bileşiğin kromatografik davranışı belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı olan 37°C'de yapılan kromatografik analizler sonucunda favipiravirin mobil fazdaki pH değişimine bağlı olarak alıkonma zamanındaki (t_R) değişim incelenmiştir. pH- t_R arasındaki doğrusal olmayan ilişki kullanılarak favipiravirin %2, 4, 6 (v/v) ACN içeren ACN-su ikili karışımlarındaki s_pK_a değerleri belirlenmiştir. Mobil fazda kullanılan ACN'nin makroskopik özellikleri (mol kesri, dielektrik sabiti) ve s_pK_a değerleri kullanılarak favipiravirin su ortamındaki pK_a (w_pK_a) değeri hesaplanmıştır. 37 °C'de elde edilen bu değer Abraham çözünen parametreleri kullanılarak [15] 25°C için de deneysel bir çalışma yapmadan tahmin edilmiştir. Ayrıca bileşiğin farklı pH değerlerinde iyonlaşma derecesi Henderson-Hasselbach eşitliği ile hesaplanmıştır [16].

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Favipiravir Supelco (St. Louis, USA) firmasından, asetonitril (ACN), sodyum hidroksit (NaOH), o-fosforik asit (o- H_3PO_4), 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]. Favipiravirin su ortamında yeterince çözünürlüğü ($\log S$: -1,42) [18] olmadığından, bileşiğin su-ACN ortamlarında kromatografik davranışının belirlenmesi için % 2, 4, 6 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında çalışma gerçekleştirilmiştir. Bileşik kalitatif analizi için mobil fazda çözülerek, 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde hazırlanmış ve güneş ışığından uzak, +4 °C'de saklanmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar ve Kromatografik Koşullar

Favipiravirin 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 metre 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 iki farklı özellikte C18 kolon tercih edilmiştir. Karbon içeriği sırasıyla %15 ve %14 ve pH çalışma aralığı sırasıyla 2-12 ve 1-12 olan X Terra RP18 kolon (250x4,6 mm, 5 μm ; Waters) ve Gemini NX C18 (250x4,6 mm, 5 μm ; Phenomenex) tercih edilmiştir. % 2, 4, 6 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında hazırlanan mobil faza 40 mM o- H_3PO_4 ilave edilmiş ve istenilen pH değeri 1 M NaOH

çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Mobil faz pH'sı 3,5-7,5 arasında tutularak, favipiravirin iki C18 kolonda kromatografik alıkonma davranışı ve s_pK_a değeri belirlenmiştir. Bileşiğin analizi HPLC pompa basıncının aynı olduğu akış hızı X Terra RP18 kolon da 0,8 mL/dakikada, Gemini NX C18 kolonda 1 mL/dakikada sabitlenmiştir. Bileşik 225 nm'de UV dedektörle ve 37°C kolon sıcaklığında tayin edilmiştir. HPLC sistemine 20 µL enjekte edilen bileşik üç tekrarlı olarak analiz edilmiş ve kesinliği yüksek olan bu analizin bağıl standart sapma değeri %1'nin altında hesaplanmıştır.

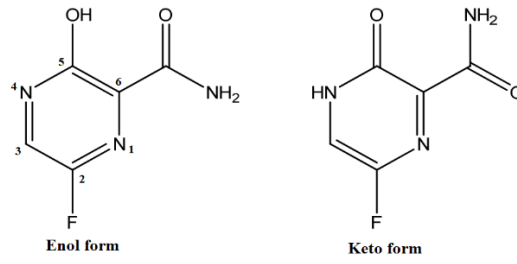
2.3. Teorik Alıkonma Zamanı ve s_pK_a Verilerinin Hesaplanması

Favipiravirin çalışılan hidro-organik ikili karışımlarını içeren mobil faz pH değişimlerine bağlı olarak RPLC metoduyla belirlenmiş, alıkonma zamanı değerleri kullanılarak doğrusal olmayan regresyon programıyla (NLREG) s_pK_a değerleri ve iyonlaşmış ve iyonlaşmamış formlarının uç t_R (HA, A⁻) değerleri hesaplanabilmektedir [19]. Hesaplanan bu veriler kullanılarak teorik t_R değerleri hesaplanmış ve teorik ve deneysel veriler arasındaki uyum artık kareler toplamı ile (RSS) ile verilmiştir.

3. Bulgular

Bu çalışmada favipiravirin (6-floro-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid) analizi için pH çalışma aralığı kısıtlı olan klasik silika esaslı bir kolonla çalışmak yerine modifiye edilmiş C18 kolonlar tercih edilmiştir. X Terra RP18 kolon (250x4,6 mm, 5 µm; Waters) hibrit esaslı, asidik ve bazik bileşiklerin analizi için geliştirilmiş polar gömmeli bir kolondur. Silika ve polimerik esaslı kolonlara göre pH kararlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek bir kolondur. 125 A° gözenek büyüklüğüne sahip küresel yapıdaki parçacıklardan oluşmuştur [20]. Gemini NX C18 (250x4,6 mm, 5 µm; Phenomenex) polimerik silikayı saf silika substrat çekirdeği üzerine dahil eden patentli bir işlemle geliştirilmiştir. Etan ligandları, Silisyum atomları arasında köprü oluşturan polimerik silika içine gömülmüştür. Bu yapı aynı anda oldukça yüksek pH kararlılığı ve mekanik direnç sağlamaktadır. 110 A° gözenek büyüklüğüne sahip küresel yapıdaki parçacıklardan oluşmuştur [21]. Literatürde bu tip kolonlarla favipiravirin sıvı kromatografik analizinde bileşiğin alıkonma davranışı ile ilgili hiçbir veri yoktur. Ayrıca kolonun etkin tabaka sayısının yüksek olması (X Terra için 4933; Gemini NX için 10386) ve kuyruklanma faktörünün (X Terra için 1,073; Gemini NX için 1,046) de 2'den düşük olması bileşiğin simetrisinin ve kolon performansının iyi olduğunu göstermektedir.

Favipiravir hem enol hem de keto formuna sahiptir (Şekil 1). Enol formu bir aromatik fenol benzeri yapıya sahipken, keto formu bir dizi dört konjuge çift bağa sahiptir [22]. Bileşik, hangi tautomerik formunun bir hedef biyomoleküle bağlı olduğunu belirlemek için ilaç tasarımı ve geliştirilmesinde ilgi çekebilecek keto-enol tautomerizmi potansiyeline sahiptir. Yapılan son hesaplamalar enol formunun keto formundan kararlı olduğunu göstermektedir [23-25]. Bileşiğin pK_a değerine yönelik herhangi bir deneysel çalışma yoktur. Deneysel çalışma yerine kimyasal yapı özellikleri göz önüne alınarak hesaplama yapan bazı paket programlarıyla favipiravirin pK_a değerleri hesaplanmıştır. Kuantum-kimyasal hesaplamalar için AB INITIO/6-311G ve DFT-PBEO/6-311G programları kullanılarak favipiravirin yapısında bulunan pirazin halkasının 5 numaralı pozisyonunda bulunan hidroksil grubunun pK_a değeri 13; 6 numaralı pozisyonunda bulunan karboksamid grubundaki primer aminin pK_a değeri 14 olarak hesaplanmıştır [26]. Ayrıca pirazin halkasındaki 1 numaralı azota ait pK_a değeri de 0,6 olarak bulunmuştur [27-28]. Bileşiğin enol formundaki pirazin halkasındaki 4 numaralı azota dair pK_a değeri Yoğunluk fonksiyonel teorisine (DFT) göre 5.1 olarak tahmin edilmiştir [22].



Şekil 1. Favipiravirin enol ve keto formu [22]

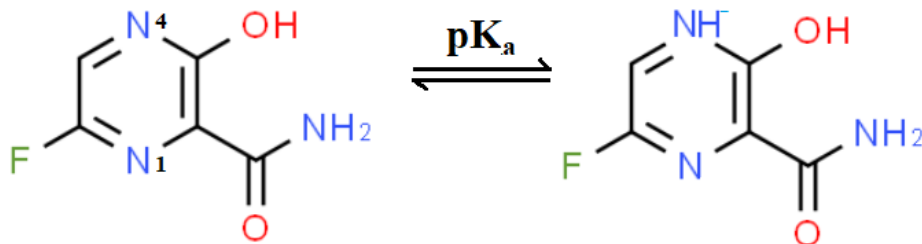
Favipiravirin pK_a değeri ile ilgili hiçbir deneysel çalışma bulunmadığından bu çalışmada seçilen iki farklı özellikteki kolonda, 37°C sıcaklıkta, sabit akış hızında, belirlenen su-ACN ikili karışımlarında hazırlanan mobil fazlarda pH 2 ile 11 arasında bileşiğin alıkonma zamanları belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre pH 3,5-7,5 arasında bileşiğin alıkonma zamanında giderek azalan bir değişim gözlenmiştir. Fakat pH 7,5 ile pH 11 değerleri arasında bileşiğin t_R değerlerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada mobil faz pH aralığı 3,5-7,5 olarak belirlenmiştir. 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 iki kolondan elde edilen deneysel t_R değerleri NLREG programında analizlenmiştir. Elde edilen s_pK_a ve t_{RHA} , t_{RA^-} değerleri standart sapma değerleriyle birlikte Tablo 1’de verilmiştir [19].

Tablo 1. NLREG programı ile hesaplanmış s_pK_a ve t_{RHA} , t_{RA^-} verileri

% ACN (v/v)	X TERRA C18			GEMİNİ NX		
	s_pK_a	t_{RHA}	t_{RA^-}	s_pK_a	t_{RHA}	t_{RA^-}
2	4,802 ± 0,061*	10,937 ± 0,196	4,689 ± 0,107	4,813 ± 0,089*	9,308 ± 0,241	4,055 ± 0,133
4	5,016 ± 0,078	9,129 ± 0,186	3,870 ± 0,086	5,278 ± 0,110	6,679 ± 0,144	3,403 ± 0,131
6	5,239 ± 0,050	8,134 ± 0,097	3,523 ± 0,079	5,807 ± 0,096	5,930 ± 0,109	2,552 ± 0,140

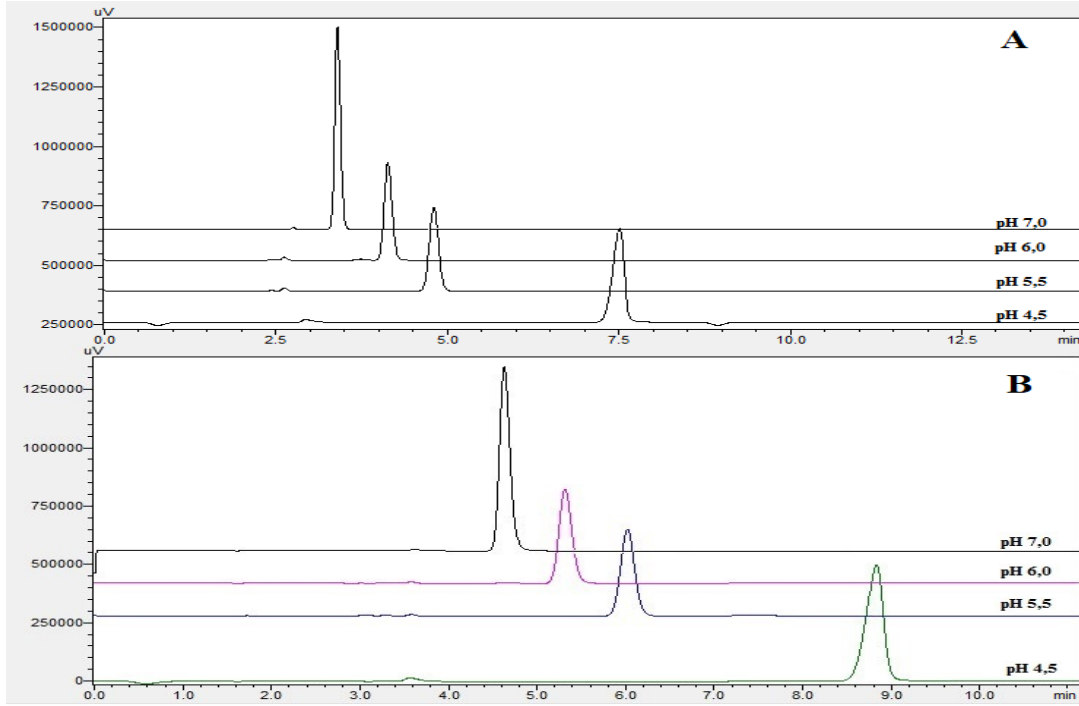
*Standart sapma

Çalışılan her bir ACN yüzdesindeki değişime bağlı olarak değişen s_pK_a değerleri, bileşiğin pirazin halkasındaki 4 numaralı pozisyonunda bulunan azot grubuna aittir. Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 2 de verilmiştir. Tablo 1’de görüldüğü gibi mobil fazdaki ACN miktarı arttıkça bileşiğin s_pK_a değeri artmaktadır. Bu durum asidik özellikteki bu grubun kromatografik davranışıyla uyum içerisinde [9].



Şekil 2. Favipiravirin iyonlaşma dengesi

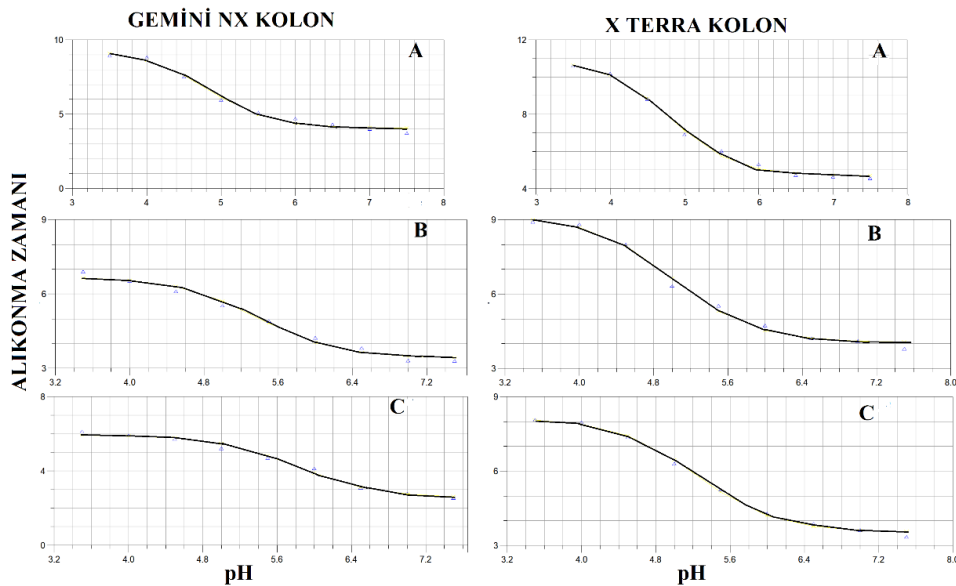
%6 (v/v) ACN içeren ACN-su ikili karışımlarında mobil faz pH'sına bağlı olarak t_R değerinin değişimini gösteren kromatogramlar Şekil 3'te verilmiştir. NLREG programından elde edilen pH- t_R ilişkisi çalışılan üç ortam için Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. pH- t_R ilişkisini gösteren kromatogramlar A) Gemini NX C18 B) X Terra C18

Bu çalışmada favipiravirin sıvı kromatografik davranışı için teorik t_R değerleri de hesaplanarak, deneysel ve teorik değerlerin uyumu artık kareler toplamı (RSS) hesaplanarak gösterilir. Teorik t_R değerleri NLREG programından elde edilen s_pK_a ve t_{RHA} , t_{RA-} değerleri kullanılarak Denklem 1 ile hesaplanmıştır [23].

$$t_{R\text{teorik}} = t_{RHA} \left(\frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \right) + t_{RA-} \left(\frac{K_a}{[H^+] + K_a} \right) \quad (1)$$



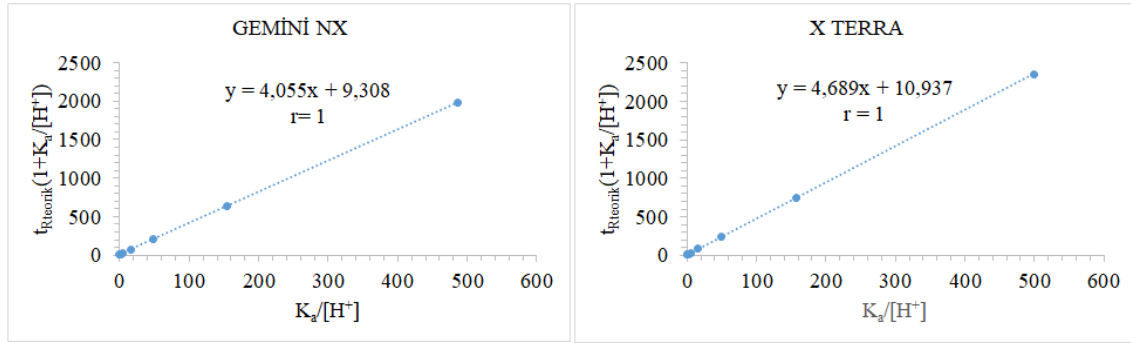
Şekil 4. NLREG programı ile pH- t_R ilişkisi A) %2 (v/v) ACN; B) %4 (v/v) ACN; C) %6 (v/v) ACN içeren ACN-su ikili karışımı

Denklem 1 kullanılarak favipiravirin %2 (v/v) ACN içeren hidro-organik karışımda ve değişen mobil faz pH değerlerindeki $t_{Rteorik}$ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 2’de verilmiştir.

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

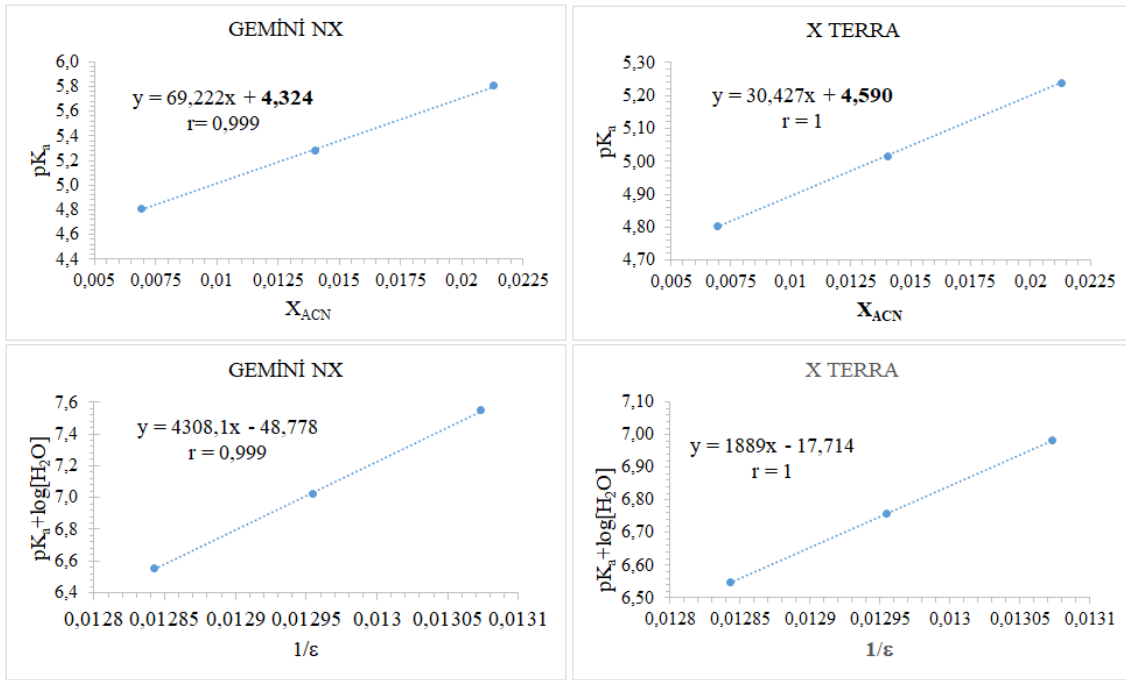
pH	GEMİNİ NX				X TERRA			
	% 2 (v/v) ACN				% 2 (v/v)ACN			
	$t_{Rdeneysel}$	$t_{Rteorik}$	$t_{Rdeneysel}-t_{Rteorik}$	$(t_{Rdeneysel}-t_{Rteorik})^2$	$t_{Rdeneysel}$	$t_{Rteorik}$	$t_{Rdeneysel}-t_{Rteorik}$	$(t_{Rdeneysel}-t_{Rteorik})^2$
3,5	8,951	9,064	-0,113	0,013	10,599	10,640	-0,041	0,002
4	8,824	8,608	0,216	0,047	10,190	10,118	0,072	0,005
4,5	7,509	7,589	-0,080	0,006	8,822	8,919	-0,097	0,009
5	5,947	6,125	-0,178	0,032	6,891	7,179	-0,288	0,083
5,5	5,096	4,951	0,145	0,021	6,012	5,771	0,241	0,058
6	4,706	4,376	0,330	0,109	5,314	5,077	0,237	0,056
6,5	4,292	4,161	0,131	0,017	4,720	4,817	-0,097	0,009
7	3,990	4,089	-0,099	0,010	4,630	4,730	-0,100	0,010
7,5	3,716	4,066	-0,350	0,122	4,555	4,702	-0,147	0,022
			RSS	0,377			RSS	0,255

Tablodaki deneysel t_R veriler arasında 0,5-1,0 dakika arasında farklılıklar görülmektedir. Bunun sebebi de kolonların iç dolgu malzemelerinin kimyasal yapılarının farklı olmasından ileri gelmektedir. Tablo 2 incelendiğinde elde edilen artık kareler toplamının (RSS) oldukça küçük olduğu, deneysel ve teorik değerlerin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Bunun yanında $t_{Rteorik}(1 + K_a/[H^+])$ verilerine karşın $K_a/[H^+]$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrusal fonksiyonun eğim ve kesim değerleri sırasıyla t_{RA^-} , t_{RHA} değerlerini vermektedir. Bu doğrusal ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 5’de verilmiştir. Elde edilen grafik doğrusaldır ($r=1$), eğim ve kesim değerleri de NLREG sonuçlarıyla birebir uyumludur.



Şekil 5. $K_a/[H^+] - t_{Rteorik}(1 + K_a/[H^+])$ doğrusal ilişkisini gösteren grafikler

Favipiravirin su ortamında yeterince çözünürlüğü ($\log S$: -1,42) [18] olmadığından, bileşik % 2, 4, 6 (v/v) ACN içeren su-ACN ikili karışımlarında kromatografik davranışının belirlenmesi amaçlanmış ve bileşiğin s_pK_a değeri NLREG programıyla hesaplanmıştır. Farklı yaklaşımlar kullanarak favipiravirin su ortamındaki pK_a (w_pK_a) değeri de hesaplanmıştır. Bunun için ilk olarak ACN’nin çalışılan hacimce yüzdelere karşılık gelen mol kesri (X_{ACN}) değerleri kullanılmıştır [29]. Bunun için farklı NLREG programıyla belirlenmiş s_pK_a değeri, X_{ACN} değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim değeri favipiravirin su ortamındaki pK_a (w_pK_a) değerini verir (Şekil 6). İkinci yaklaşımda Yasuda-Shedlovsky metodunda $s_pK_a + \log[H_2O]$ değerleri $1/\epsilon$ ’a karşı grafiğe geçirilerek doğrusal bir ilişki ($r=1$) elde edilmiştir [30]. Bu yaklaşımda kullanılan ACN’nin dielektrik sabiti (ϵ) değerleri Barbosa ve ark. tarafından hesaplanmıştır [29].



Şekil 6. ${}^s pK_a$ - X_{ACN} ve Yasuda-Shedlovsky yaklaşımları ile ${}^w pK_a$ değerlerinin hesaplanması

ACN'nin mol kesri kullanılarak yapılan hesaplamalarda doğrusal fonksiyonun kesim değeri favipiravirin ${}^w pK_a$ değerini vermiştir. Yasuda-Shedlovsky metodunda ise doğrusal bir ilişki elde edilen fonksiyonda $1/\epsilon$ değeri yerine ($\epsilon:78,5$) 0,0127 değeri; $\log[H_2O]$ yerine $\log 55,5:1,744$ değeri konularak bileşiğin ${}^w pK_a$ değeri Gemini NX kolon için 4,358 ve X Terra kolon için 4,606 hesaplanmıştır. Her iki yaklaşımla hesaplanan ${}^w pK_a$ değeri arasında en fazla $\pm 0,034$ fark gözlemlenmiştir. Bu da sonuçların birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Deneysel olarak seçilen sıcaklıkta ($37^\circ C$) hesaplanan ${}^w pK_a$ değeri ve asidik gruplar için belirlenmiş Abraham çözünen parametreleri (Tablo 3) Denklem 2 ve Denklem 3'te yerine konulduğunda ΔpK_a değeri ve deneysel bir çalışma yapmadan favipiravirin $25^\circ C$ 'deki ${}^w pK_a$ değeri hesaplanmıştır [15].

$$\Delta pK_a = k_0 pK_a^{37} + c_0 + c_1 \sum \alpha_2^H + c_2 \sum \beta_2^H + c_3 \pi_2 + c_4 R_2 + c_5 V_x \quad (2)$$

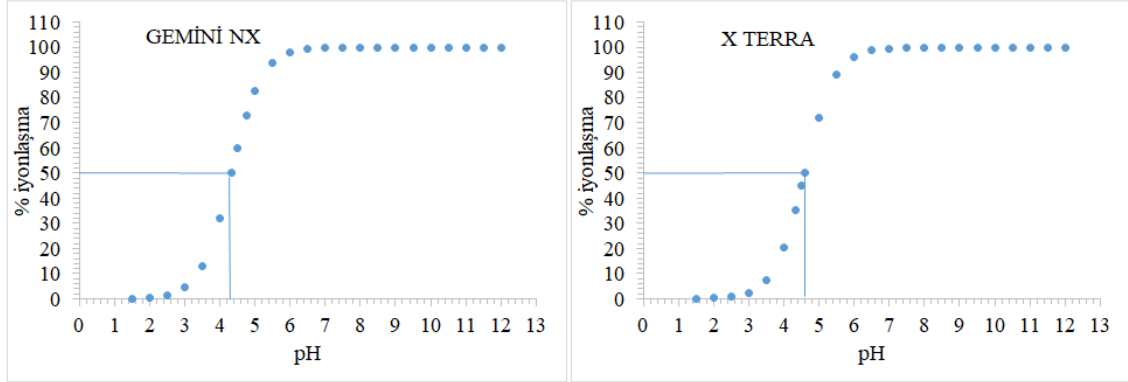
$$\Delta pK_a = pK_a^{37} - pK_a^{25} \quad (3)$$

Tablo 3. Abraham çözünen parametreleri

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

$37^\circ C$ sıcaklıkta ${}^s pK_a$ - X_{ACN} ilişkisi kullanılarak Gemini NX kolon için bulunan ${}^w pK_a = 4,324$ kullanıldığında $25^\circ C$ için ${}^w pK_a = 4,270$ olarak hesaplanmıştır. X Terra kolon için ${}^w pK_a = 4,590$ kullanıldığında $25^\circ C$ için ${}^w pK_a = 4,543$ olarak hesaplanmıştır. Sun ve Avdeef tarafından yapılan çalışma [15] incelendiğinde asidik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin $25^\circ C$ 'deki pK_a değerleri, $37^\circ C$ '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]. Favipiravir için % iyonlaşma, w_pK_a değeri kullanılarak hesaplanmıştır. pH 1,5-12 aralığında % iyonlaşma değerlerini gösteren grafik Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Favipiravirin % iyonlaşma değerleri

Asidik fonksiyonel grubunu içeren favipiravirin %50'sinin iyonlaştığı pH, bileşiğin pK_a değerini vermektedir. Şekil 7'ye göre bu bileşiğin pK_a değerinin yaklaşık 2,5 birim üzerinde iyonlaşmadığı görülmektedir.

4. Sonuç ve Yorum

Favipiravirin COVID-19 tedavisinde önemli bir yeri olmasına rağmen, bileşiğin pK_a değeri ile ilgili literatürde deneysel bir veri yoktur. Kullanılan değerler tahmini değerlerdir. Bunun için elde edilen deneysel veriler, bu konuda yapılmış ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Favipiravirin keto-enol tautomerik dengesinde, literatüre uygun olarak enol formun kararlı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle pK_a hesaplaması enol form kullanılarak yapılmıştır. RPLC ile yapılan çalışmada elde edilen deneysel verinin hangi fonksiyonel gruba ait olduğu, tahmini programlara göre yapılan hesaplamalarla belirlenebilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler favipiravirin 37°C'de belirlenmiş ilk alıkonma 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. Favipiravirin 37°C'de vücut sıvılarında ve bölgelerindeki iyonlaşma yüzdeleri de bu çalışma ile hesaplanabilmiştir. Bu çalışma ile sıvı kromatografik analizlerde metot optimizasyonu çalışmaları için gerekli bir parametre olan pK_a değerinin belirlenmesi, herhangi bir deneme yanılmaya ihtiyaç olmadan favipiravirin RPLC analizlerinde kromatografik koşullarının optimizasyonunu sağlamaktadır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ü. A. Arzuoğlu: Araştırma, Metodoloji, Veri İyileştirme

İ. Konçe: Araştırma, Metodoloji, Kaynak/Materyal/Malzeme Temini, Veri İyileştirme

E. Çubuk Demiralay: Araştırma, Metodoloji, Doğrulama, Denetim/Gözlem/Tavsiye

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir destek ve teşekkür beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Kaynakça

- [1] K. Shiraki, T. Daikoku, "Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections", *Pharmacology & Therapeutics*, 209, 107512, 2020.
- [2] O. S. Reddy, W.-F. Lai, "Tackling COVID-19 Using Remdesivir and Favipiravir as Therapeutic Options". *ChemBioChem*, 22, 939–948, 2021.
- [3] H. M. Marzouk, M. R. Rezk, A. S. Gouda, A. M. Abdel-Megied, "A novel stability-indicating HPLC-DAD method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for COVID-19 treatment; application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling", *Microchemical Journal*, 172, 106917, 2022.
- [4] S. M. Megahed, A. A. Habib, S. F. Hammad, A. H. Kamal, "Chemometric approach based on factorial and Box-Behnken designs for determination of anti-coronavirus drug; favipiravir in bulk and spiked human plasma by green HPLC method", *Turkish Journal of Analytical Chemistry*, 3(2), 70-78, 2021.
- [5] S. M. Megahed, A. A. Habib, S. F. Hammad, A. H. Kamal, "Experimental design approach for development of spectrofluorimetric method for determination of favipiravir; a potential therapeutic agent against COVID-19 virus: Application to spiked human plasma", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 249, 1192412, 2021.
- [6] S. Allahverdiyeva, O. Yunusoglu, Y. Yardım, Z. Sentürk, "First electrochemical evaluation of favipiravir used as an antiviral option in the treatment of COVID-19: A study of its enhanced voltammetric determination in cationic surfactant media using a boron-doped diamond electrode", *Analytica Chimica Acta*, 1159, 338418, 2021.
- [7] P. Talay Pınar, T. Tuluk, Z. Şentürk, "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, 2020.
- [8] M. Mehmandoust, Y. Khoshnavaz, M. Tuzen, N. Erk, "Voltammetric sensor based on bimetallic nanocomposite for determination of favipiravir as an antiviral drug", *Microchimica Acta*, 188, 434, 2021.
- [9] M. Hailat, I. Al-Ani, M. Hamad, Z. Zainab, W. A. Dayyih, "Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma", *Molecules*, 26, 3789, 2021.
- [10] Y. Kazakevich, Y. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, 1st ed. Wiley-Interscience, USA, 2007.
- [11] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed., John Wiley and Sons, United Kingdom, 2010.
- [12] R. Bergés, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, "Modelling Retention in Liquid Chromatography as a Function of Solvent Composition and pH of the Mobile Phase", *Journal of Chromatography A*, 869, 27-39, 2000.
- [13] M. Rosés, E. Bosch, "Influence of Mobile Phase Acid-Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds", *Journal of Chromatography A*, 982, 1-30, 2002.
- [14] H. Seçilmiş, E. Çubuk Demiralay, K. Poturcu, "Determination of chromatographic protonation constants of some imidazole antimycotic drugs in acetonitrile-water binary mixtures", *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(2), 405-417, 2022.
- [15] İ. Konçe, S. Akkoç, Z. Üstün, E. Çubuk Demiralay, "Liquid Chromatographic Determination of pK_a Value of 1-(2-methylbenzimidazole)-3-benzylbenzimidazolium bromide as a Drug Candidate in Acetonitrile-Water Binary Mixtures", *Journal of Research in Pharmacy*, 26(3), 655-662, 2022.
- [16] N. Sun, A. Avdeef, "Biorelevant pK_a (37°C) Predicted from the 2D Structure of the Molecule and its pK_a at 25°C", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 173-182, 2011.
- [17] R. J. Tallarida, R. B. Murray, Henderson-Hasselbalch Equation, Editors: R. J. Tallarida, R. B. Murray, *Manual of Pharmacologic Calculations*, Springer, New York, 1987, pp. 74-75.
- [18] T. Mussini, A. K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, "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, 1985.
- [19] SwissADME program. <http://www.swissadme.ch/index.php>, Accessed: (ie. 25.09.2022).
- [20] NLREG Version 4.0. P.H. Sherrod. <http://www.sandh.com/Sherrod.1991>, Accessed: (ie. 27.09.2022).

- [21] E. M. Borges, D. A. Volmer, "Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography. Part II: Chemical and Thermal Stability", *Journal of Chromatographic Science*, 53, 1107-1122, 2015.
- [22] A. Fanigliulo, D. Cabooter, G. Bellazzi, B. Allieri, A. Rottigni, G. Desmet, "Kinetic performance of reversed-phase C18 high-performance liquid chromatography columns compared by means of the Kinetic Plot Method in pharmaceutically relevant applications", *Journal of Chromatography A*, 1218(21), 3351-3355, 2011.
- [23] G. da Silva, "Protonation, Tautomerism and Base Pairing of the Antiviral Favipiravir (T-705)", *ChemRxiv*, 1-7, 2020.
- [24] L. Antonov, "Favipiravir tautomerism: A short theoretical report", *ChemRxiv*, 1-13, 12115620, 2020.
- [25] L. Antonov, "Favipiravir tautomerism: a theoretical insight", *Theoretical Chemistry Accounts*, 139, 1-7 2020.
- [26] Y. Umar, "Theoretical studies of the rotational and tautomeric states, electronic and spectroscopic properties of favipiravir and its structural analogues: a potential drug for the treatment of COVID-19", *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 1613-1625, 2020.
- [27] V. A. Babkin, D. S. Andreev, Y. A. Vashuta, A. V. Kozhukhova, V. S. Belousova, E. S. Titova, A. R. Titova, A. I. Rakhimov, A. K. Brel, R. O. Boldyrev, M. I. Artsis, G. E. Zaikov, "Theoretical Assessment of Acid Strength of Antiviral Favipiravir Medication", *Fluorine notes*, 5(132), 1-5, 2020.
- [28] A. Albert, J. N. Phillips, "Ionization constants of heterocyclic substances. Part II. Hydroxy-derivatives of nitrogenous six-membered ring-compounds", *Journal of the Chemical Society*, 1254-1304, 1956.
- [29] D. A. Keyworth, "Basicity and Ionization Constants of Some Pyrazine Derivatives", *The Journal of Organic Chemistry*, 1355-1356, 1959.
- [30] J. Barbosa, I. Toro, V. Sanz-Nebot, "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, 1997.
- [31] Y. Motoo, "Dissociation Constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents", 32(5), 429-432, 1959.