

Asiklovirin Spektrofotometrik Yöntemle İyonlaşma ve Protonasyon Sabiti Tayininde İki Farklı Yaklaşımın Kullanılması

Y. Doğan DALDAL^{1*} 

Öz

Bu çalışmada herpes simpleks ve varicella zoster virüslerine karşı güçlü antiviral etkiye sahip bir guanin türevi olan asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabiti tayini (pK_a), UV-Vis spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada asiklovirin suda zayıf çözünürlüğünden dolayı, farklı derişimlerdeki asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır. İyonlaşma ve protonasyon sabiti için spektrofotometrik yöntemden belirlenen verilerin değerlendirilmesinde STAR programı ve $\log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH ilişkisi kullanılmış ve bu hesaplama yöntemleriyle farklı asetonitril-su derişimleri için hesaplanan pK_a değerlerinin birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bileşimin sudaki pK_a değerlerinin tayini için asetonitril-su ikili karışımlarında belirlenmiş pK_a değerleri ve çalışılan asetonitril-su ikili karışımlarının makroskopik özellikleri arasındaki ilişkiden yararlanılmıştır. Hesaplama sonucunda, asiklovirin bu çalışmada belirlenen sudaki pK_a değerleri ile literatürdeki değerlerin uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asiklovir, İyonlaşma ve protonasyon sabiti, pK_a , Herpes Simpleks, UV-Vis Spektrofotometri.

Use of Two Different Approaches to Determine The Ionization and Protonation Constants of Aciclovir by Spectrophotometric Method

Abstract

In this study, the determination of the ionization and protonation constant (pK_a) of aciclovir, a guanine derivative with potent antiviral activity against herpes simplex and varicella zoster viruses, was performed using the UV-Vis spectrophotometric method. In the study, due to the poor water solubility of aciclovir, it was studied in binary acetonitrile-water mixtures at different concentrations. The program STAR and the $\log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH relationship were used to evaluate the data obtained by the spectrophotometric method for the ionization and protonation constants, and it was found that the pK_a values determined by these calculation methods were very close for different acetonitrile-water concentrations. To determine the pK_a values of the compound in water, the relationship between the pK_a values determined in binary acetonitrile-water mixtures and the macroscopic properties of the binary acetonitrile-water mixtures studied was used. As a result of the calculation, it was found that the pK_a values of acyclovir in water determined in this study are compatible with the values in the literature.

Keywords: Aciclovir, Ionization and protonation constant, pK_a , Herpes Simplex, UV-Vis Spectrophotometry.

¹Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kahramanmaraş, Türkiye, daldal.dogan@gmail.com

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Geliş/Received: 12.09.2023

Kabul/Accepted: 14.03.2024

Yayın/Published: 15.03.2024

1. Giriş

Asiklovir virüslerde bulunan fakat insanlarda bulunmayan timidin kinaz enzimini seçici olarak inhibe ederek viral replikasyonu durduran bir DNA polimeraz inhibitörüdür (Laurence, 2011; Kayaalp, 2018; Dar, 2019). Asiklovir, DNA sentezinin inhibe eden valasiklovir, valgansiklovir ve gansiklovir gibi diğer antiviral ilaçlar için bir prototiptir ve yapısal olarak asiklik guaninin bir türevidir. Bu ilacın oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür ve bu nedenle, asiklovirin oral biyoyararlanımını artırabilmek için alındıktan sonra tamamen asiklovire dönüşen valasiklovir geliştirilmiştir. Bu sayede asiklovirin oral biyoyararlanımı yaklaşık %60'lara kadar geliştirilebilmiştir (Katzung, 2011). Asiklovirin herpes simpleks ve varicella zoster virüslerine karşı güçlü antiviral etki gösterdiği bilinmektedir ve bu ilacın kullanımı ABD Gıda ve İlaç dairesi (FDA) tarafından genital herpes simpleks ve herpes simpleks ensefalit tedavisi için onaylanmıştır (Arnal ve ark., 2008; Alqahtani ve ark., 2022). Ayrıca günümüzde, herpes simpleks ensefalit tedavisi için uygulanan başka bir ilaç bulunmamaktadır (Alqahtani ve ark., 2022).

Tıbbi ve biyolojik öneme sahip guanin türevleri, birçok farmasötik bileşiklerde fonksiyonel grup olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, başta antiviral ve anti kanser ilaçları olmak üzere, bu fonksiyonel gruba sahip ilaç ya da aday ilaçların fizikokimyasal, fizyolojik ve farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi önemlidir (Singh ve ark., 2020). Bundan dolayı, bu çalışma antiviral ilaçların prototipi olan asiklovirin önemli fizikokimyasal parametrelerinden biri olan iyonlaşma ve protonasyon sabitlerinin tayinine odaklanmıştır. İyonlaşma ve/veya protonasyon sabiti (pK_a) bileşiklerin istenilen bir pH değeri için iyonlaşma durumunu belirlemede kullanılan bir parametre olduğundan ilaç analizleri için önemi uzun yıllardır bilinmektedir (Avdeef, 2003; Manallack, 2007; Kazakevich ve Lobrutto, 2007). Bir ilacın iyonlaşma bilgisi önemlidir çünkü, kan-beyin bariyeri ve çeşitli biyolojik membranlar gibi fizyolojik sistemlerden ilaçların geçişi ve çözünürlüğü, onların iyonlaşma durumuyla çok yakın ilişkilidir (Avdeef, 2003). Ayrıca bileşiklerin farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan adsorbsiyon (biyoyararlanım), dağılım, metabolizma, ekskresyon (atılım) ve toksikolojik (ADMET) özellikleri de iyonlaşmayla doğrudan bağlantılıdır (Manallack, 2007).

Bileşiklerin pK_a değerlerinin belirlenmesi için literatürde birçok analitik yöntem mevcut olsa da günümüzde bu yöntemler içerisinde, ilaç endüstrisi tarafından yüksek doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik gibi önemli özelliklerinden dolayı ters faz sıvı kromatografi (RPLC) ve UV-Vis spektrofotometrik yöntemler çoğunlukla tercih edilmektedir (Kazakevich ve Lobrutto, 2007; Reijnga ve ark., 2013; Daldal ve ark., 2014; Daldal ve Demiralay, 2020). Bu tercihli yöntemlerden RPLC metotta, çok polar bileşiklerin tayininde yeterli alıkonma davranışının elde edilememesi, amfoterik bileşiklerin tayininde ise çok düşük ve yüksek pH değerleriyle çalışmak gerektiğinde,

sıvı kromatografik kolonun çalışma pH aralığının yetmemesi gibi zorluklarla karşılaşılabilir. Böyle durumlarda, sıvı kromatografik yöntemle pK_a tayinine en iyi alternatif metot, UV-Vis spektrofotometrik yöntemdir (Albert, 1984). Ayrıca bu yöntem, uygulama kolaylığından dolayı RPLC yöntemle pK_a tayinine ön bilgi sağladığı için de önemlidir (Daldal ve ark., 2014; Daldal ve ark., 2017; Daldal ve Demiralay, 2020). Polar ve/veya amfoterik bileşiklerin pK_a tayinine bu yöntemle alternatif olarak potansiyometrik yöntemler de düşünülebilir ancak, potansiyometrik yöntemlerin pratik olmasına rağmen uygulanmasında gerekli olan aşırı örnek kullanımı, bu yöntemin kullanılabilirliğini önemli ölçüde sınırlamaktadır (Kazakevich ve Lobrutto, 2007). UV-Vis spektrofotometrik yöntemle pK_a tayini, spektrofotometrik titrasyon ile gerçekleştirilir ve farklı pH değerlerinde farklı ışık absorpsiyonuna sahip bileşiklerin moleküler ve iyonik formları arasındaki oranının doğrudan tayin edilmesi temeline dayanır (Albert, 1984).

Herhangi bir analitik yöntemle bileşiklerin pK_a değerlerinin tayini için ilk olarak bileşiğin uygun bir çözücüde çözülmüş olması gereklidir. Bilindiği gibi, birçok araştırmacı tarafından ilk tercih edilen çözücü sudur. Ancak, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün yetersiz olduğu durumlarda, bu tayinleri gerçekleştirmek oldukça zorlaşmaktadır. Böyle durumlarda sudaki çözünürlüğü yetersiz bileşiklerin pK_a tayinlerini su-organik çözücülerde ($^s pK_a$) gerçekleştirmek iyi bir alternatiftir (Narasimhan ve Barhate, 2011; Canbay ve ark., 2011; Sanli ve ark., 2011). Ayrıca, bileşiklerin su ortamındaki pK_a değerlerinin ($^w pK_a$) tayini için bileşiklerin $^s pK_a$ değerleriyle su-organik çözücü karışımlarının mol kesri (X), dielektrik sabiti (ϵ) gibi makroskopik sabitlerle doğrusal ilişkisini temel alan birçok ekstrapolasyon yöntemi literatürde sunulmuştur (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962; Takács-Novák ve Box, 1997; Avdeef, 2003; Daldal ve Demiralay, 2020). Aday ilaç ya da ilaç bileşikleri canlı vücudunda su ortamıyla etkileşim halinde olduğundan dolayı, onların su ortamındaki iyonlaşma/protonasyon sabiti değerlerinin belirlenmesi, ilaç araştırma ve geliştirme basamaklarında kaçınılmaz bir gerekliliktir (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).

Virüslerin koronavirüs örneğinde olduğu gibi sahip oldukları potansiyel riskler göz önüne alındığında, antiviral ilaçlar üzerine gerçekleştirilen tüm çalışmalar önemlidir. Ancak, asiklovir için literatürde sunulan klinik çalışmalar haricinde, literatürde bulunan çalışmaların çoğunluğu bu ilacın sıvı kromatografik yöntemler kullanılarak ilaç formülasyonunda veya biyolojik sıvılarda tayiniyle alakalıdır (Sayed ve ark., 2018; Malik ve ark., 2019; Mulabagal ve ark., 2019; Urinovska ve ark., 2021; Alqahtani ve ark., 2022). Gerçekleştirilen bu çalışmaların çoğunda, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün zayıflığı ve de polar özellikte oluşunun olumsuz etkileri açıkça görülmektedir. Şöyle ki, bu çalışmaların çoğunluğunda bileşiğin çözünürlüğünü sağlamak için yüksek organik çözücü derişimlerde çalışılmıştır. Ayrıca, çalışmalarda bileşiğin polar özelliğinden dolayı da yeterli alıkonma değerleri elde edilemediğinden (alıkonma faktörü (k) ≥ 1) asiklovir pikinin çözücü pikinden ayrılması tam sağlanamamıştır. Asiklovirin fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleriyle ilgili çalışma ise

literatürde yetersizdir. Asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabitlerinin tayiniyle alakalı literatürde sadece bir çalışma vardır (Soleimani ve ark., 2016). Bu çalışmada, asiklovirin pK_a değerleri tayini spektrofotometrik titrasyon yöntemiyle, bileşiğin çözünürlük sorunundan dolayı bazik ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, bileşiğin farklı iyonik şiddet ve sıcaklık değerlerinin Termodinamik pK_a değerlerine etkisi incelenmiştir.

Literatürdeki asiklovirin pK_a değerleri için veri eksikliğini gidermek amacıyla gerçekleştirilen bu mevcut çalışmada, suda çözünürlüğü yetersiz olan asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabiti tayini asetonitril-su ikili karışımlarında UV-Vis spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma, asetonitril-su ikili karışımlarında bileşiğin $^s pK_a$ değerleri üzerine etkisini belirten ilk çalışma; elde edilen veriler ise ilk verilerdir. Bu çalışmada UV-Vis spektrofotometrik yöntemle elde edilen veriler iki farklı hesaplama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve hesaplanan $^s pK_a$ değerleri birbiriyle kıyaslanabilmiştir. Sonrasında, asiklovirin asetonitril-su ortamları için belirlenen $^s pK_a$ değerleri kullanılarak çeşitli ekstrapolasyon yöntemleriyle asiklovirin $^w pK_a$ değerleri hesaplanmış ve literatür değerleriyle kıyaslanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan 59277-89-3 CAS numarasına sahip sudaki çözünürlüğü zayıf bir bileşik olan asiklovir, Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)'den tedarik edilmiştir. Çalışmada titrisol olarak kullanılan potasyum hidroksit (KOH), iyonik şiddet ayarlamada kullanılan potasyum klorür (KCl), elektrot kalibrasyonunda primer standart madde olarak kullanılan potasyum hidrojen fitalat (KHP) ve organik çözücü olarak kullanılan asetonitril (ACN) (HPLC grade) Merck (Darmstadt, Germany)'den tedarik edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan her kimyasal, herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada spektrofotometrik titrasyon ölçümleri için asiklovirin absorbans değerlerinin ölçümleri Perkin-Elmer LAMBDA 25 spektrofotometresi ile (Waltham, MA, USA) ölçülmüştür. Titrasyonlar 70 mL kapasiteye sahip çift cidarlı hücrede ve sabit $25 \pm 0,1$ °C'de sirkülasyonlu su banyosunda (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik titrasyonlarda çalışılan ACN-su ikili karışımları için Mettler Toledo pH/iyon metre ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrot kullanılmıştır (Switzerland). ACN-su ortamları için elektrot kalibrasyonunda primer standart madde olarak KHP seçilmiştir (0,05 mol.kg⁻¹). Çalışmada kullanılan tüm çözeltilerde kullanılan saf su Direct-Q®3 UV su saflaştırma cihazından elde edilmiştir. (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.3. Metot

Asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabiti tayini %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril içeren ACN-su ikili karışımlarında spektrofotometrik titrasyon ile gerçekleştirilmiştir. Titrasyonlar, sıcaklığı 25 °C’de sabitlenmiş çift cidarlı hücrede ve sabit 0,1 mol.L⁻¹ KCl çözeltisi (iyonik şiddet ayarlayıcı) içeren su-asetonitril ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Her titrasyon için sabit 1x10⁻⁵ mol.L⁻¹ asiklovir çözeltisi titrasyon hücresine eklenmiş ve 1 mol.L⁻¹ HCl çözeltisi ile pH 1’e kadar protonlanmıştır. Titrasyon hücresindeki çözelti, ölçülebilir bir değişim elde edilinceye kadar (yaklaşık 0,2 pH birimi) ayarlı titrant çözeltisi KOH ile titre edilmiştir. Bu titrasyonlar ile mV değerlerinden pH değerlerine geçebilmek için E^o standart potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla kuvvetli asitlere özgü Gran fonksiyonu kullanılmıştır. Her titrant ilavesinden sonra elektrotun dengeye gelmesi için bir süre beklenmiş ve sonrasında 1,0-11,6 pH aralığında alınan çözelti örneklerinin 190-400 nm aralığında UV-Vis spektrum taraması tek tek alınarak kaydedilmiştir.

Elde edilen spektrofotometrik veriler, iki farklı hesaplama yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu hesaplama yöntemlerinden ilki, STAR programıdır. Bu program bileşiğin iyonlaşma/protonasyon sabitini hesaplayabilmek için çoklu dalga boyunda elde edilen spektrofotometrik verilerden yararlanır. Bir doğrusal olmayan regresyon programı olan bu program, deneysel olarak elde edilen absorbans değerleriyle teorik olarak hesaplanan absorbans değerleri arasındaki farkı minimum yapana kadar Gauss-Newton algoritmasını kullanarak bileşiğin iyonlaşma/protonasyon sabitini hesaplamaktadır (Beltrán ve ark., 1993) (Denklem (1)).

$$U = \sum_{i=1}^{n_s} \sum_{j=1}^{n_w} (A_{i,j,den} - A_{i,j,hes})^2 \quad (1)$$

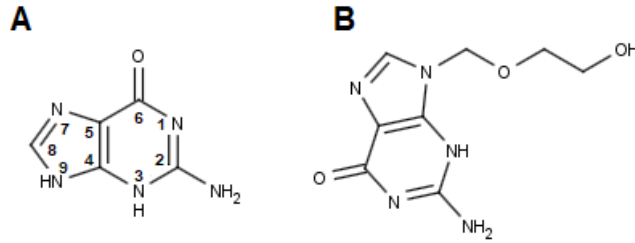
Burada n_s ve n_w sırasıyla spektrum ve dalga boyunun sayısını, $A_{i,j,den}$ ve $A_{i,j,hes}$, spektrum i ' deki j dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbans değerlerini gösterir. Hesaplanan absorbans değerleri üç basamakla elde edilir: Program önce tahmin edilen iyonlaşma/protonasyon sabiti ve deneysel şartlara göre her bir spektrum için kütle denkliklerini çözer. Sonra çoklu lineer regresyon prosedürü, her bir bilinmeyen türün molar absorbansını tayin eder ve son olarak da absorbans

değerleri, tahmin edilen türlerin derişimi ve ilgili olan molar absorpsanslardan tekrar hesaplanır (Beltrán ve ark., 1993)

Çalışmada kullanılan bir diğer yöntem, $\log [A_{HA-A_i}]/(A_i-A_A)$ -pH yaklaşımıdır. Bu yaklaşımda bileşiğin maksimum absorpsans gösterdiği dalga boyunda $\log [A_{HA-A_i}]/(A_i-A_A)$ 'ın pH ile gösterdiği doğrusal ilişkidir. Bu doğrusal ilişkidir elde edilen eşitliğin kesim noktasının eğim noktasına oranlanmasıyla bileşiğin pK_a değeri belirlenir. Bu ilişkide A_{HA} bileşiğin moleküler formunun absorpsans değerini, A_i bileşiğin iyonik formunun absorpsans değerini, A_A ise çalışılan pH değerinde bileşiğin absorpsans değerini ifade etmektedir (Salgado ve Vargas-Hernández, 2014). Bu çalışmada, asiklovirin spektral verilerinden 250 nm'de maksimum absorpsans gösterdiği belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Guanin (2-amino-1H-purin-6(9H)-one) DNA ve RNA nükleik asitlerinde bulunan bir moleküldür ve yapısal olarak iki halkaya sahip pürin sınıfı azotlu bir bazdır. Guaninin yapısındaki pürin halka yapısı, beşgen imidazol halkasının altıgen piridin halkasına bağlanmasıyla oluşur. Guanin halkasından türetilen asiklovir, kimyasal yapısındaki asidik ve bazik fonksiyonel gruplardan dolayı amfoterik özellik göstermektedir (Şekil 1).



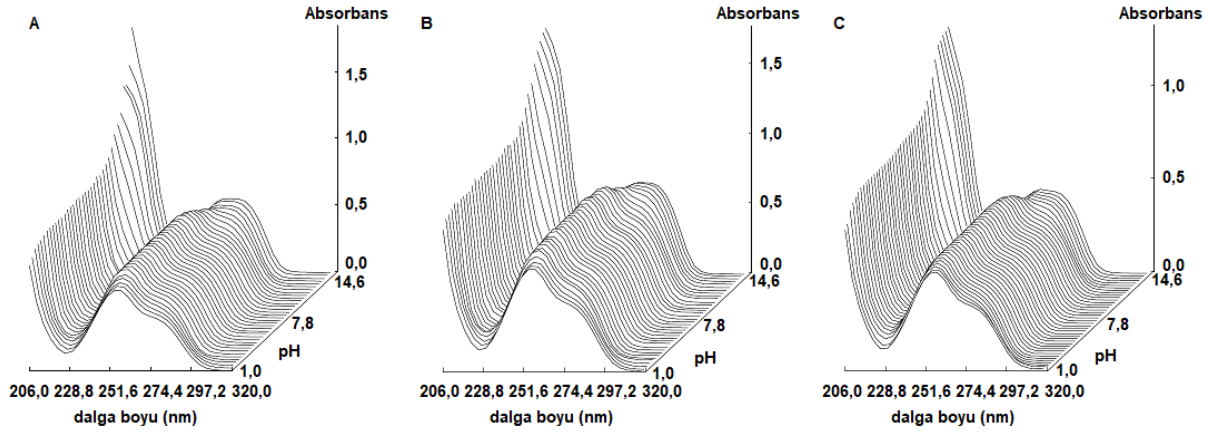
Şekil 1. Bileşiklerin kimyasal yapısı: A) guanin, B) asiklovir.

Asiklovir polar bir bileşik olmasına rağmen ($\log P$: -1,57), farklı farmakopelerde suda çözünürlüğü zayıf olarak belirtilmektedir (Arnal ve ark., 2008; Alqahtani ve ark., 2022). Asiklovir, genellikle yapısında yaklaşık %5 su olan hidrate formunda bulunmaktadır. Ancak çözünürlük çalışmalarında, asiklovir genellikle 150 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda kurutulmuş susuz formunda kullanılır. Asiklovirin bu iki formunun çözünürlüğünde çok bir fark olmamasına rağmen susuz formunun çözünürlüğü daha zayıftır (Arnal ve ark., 2008).

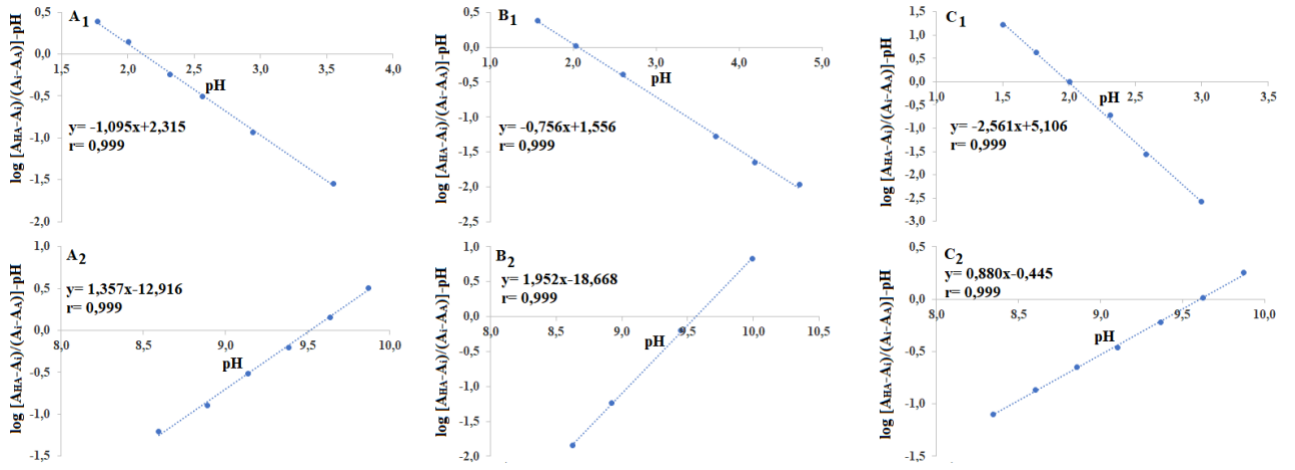
Asiklovirin suda çözünürlüğünün zayıf olmasından dolayı su-organik çözücü karışımlarında çalışılması gereklidir. Sıvı kromatografik yöntemde, asiklovirin çözünmesi için kullanılan yüksek hacimde (% , h/h) organik çözücü ve de bileşiğin polar özellikte olması, onun iyonlaşma ve

protonasyon sabiti tayini için bileşiğin iyonlaşmasından kaynaklanan gerekli sıvı kromatografik davranışın elde edilememesine sebep olmaktadır. Ayrıca, bileşiğin amfoterik özellikte olmasından dolayı da pK_a tayinlerinde sıvı kromatografik kolonlarının birçoğunun çalışma sınırlarının üzerindeki pH'larda çalışmak gereklidir. Böyle durumlarda sıvı kromatografik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilen en iyi yöntem, UV-Vis spektrofotometrik yöntemlerdir (Albert, 1984; Daldal ve ark., 2017; Daldal ve ark., 2014; Daldal ve Demiralay, 2020). Bundan dolayı bu çalışmada, asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabiti tayininde UV-Vis spektrofotometrik yöntem tercih edilmiştir.

Asiklovirin UV-Vis spektrofotometrik olarak pK_a tayininde %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril içeren ACN-su ikili karışımlarında çalışılmıştır. Asiklovir pH 1,0-11,6 aralığında spektrofotometrik olarak titre edilmiş ve her 0,2 pH biriminde bir ölçüm alınarak yaklaşık 50 spektrum taraması yapılmıştır. Elde edilen veriler her pH değeri için 199-400 nm aralığında ve 4 nm hassasiyetle kaydedilmiştir. Spektrofotometrik verilerin değerlendirilmesinde STAR programı ve $\log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH ilişkisi kullanılmıştır. Bu sayede elde edilen verilerden hesaplanan s_pK_a değerleri kıyaslanabilmiştir. STAR programıyla çalışılan ACN-su ikili karışımında elde edilen spektral davranış Şekil 2'de verilmiştir. Ayrıca asiklovirin maksimum absorbans gösterdiği 250 nm'deki $\log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH ilişkisinden elde edilen doğrusal grafikler eşitlikleriyle birlikte Şekil 3'de verilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak hesaplanan asiklovirin s_pK_a değerleri Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 2. Asiklovirin spektral grafikleri: A) %40 ACN-su (h/h), B) %45 ACN-su (h/h), C) %50 ACN-su (h/h)



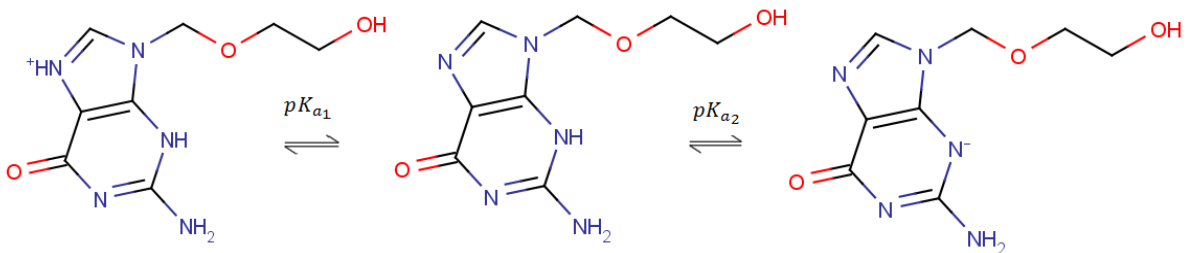
Şekil 3. log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)]-pH ilişkilerinden elde edilen doğrusal grafikler: A) %40 ACN-su (h/h), B) %45 ACN-su (h/h), C) %50 ACN-su (h/h); 1) $s_pK_{a_1}$, 2) $s_pK_{a_2}$

Tablo 1. Asiklovirin çalışılan ACN-su ikili karışımlarında hesaplanan $s_pK_{a_1}$ ve $s_pK_{a_2}$ değerleri.

PARAMETRE	STAR			log [A _{HA} -A _i]/(A _i -A _A)]-pH		
	%40 ACN (h/h)	%45 ACN (h/h)	%50 ACN (h/h)	%40 ACN (h/h)	%45 ACN (h/h)	%50 ACN (h/h)
$s_pK_{a_1}$	2,115	2,059	1,997	2,114	2,059	1,994
$s_pK_{a_2}$	9,519	9,562	9,605	9,517	9,562	9,602

Tablo 1'deki veriler incelendiğinde ACN-su ikili karışımlarındaki ACN hacimce yüzdesinin (% , h/h) değişmesiyle asiklovirin her iki yöntemle de hesaplanan s_pK_a değerlerinde çok az bir kayma olduğu görülmektedir. Bu durum, yapısında guanin halkası bulunduran bileşiklerden beklenen bir durumdur (Jang ve ark., 2003; González-Olvera ve ark., 2015; Daldal ve Demiralay, 2020) ve ACN-su ortamlarındaki ACN'nin hacimce yüzdesinin değişimiyle asiklovirin hidro-organik çözücüdeki solvasyonunun değişmesinden kaynaklanmaktadır (Kazakevich ve Lobrutto, 2009). Ayrıca, her iki yöntemle hesaplanan s_pK_a değerleri arasındaki uyum dikkat çekicidir.

Tablo 1'de verilen $s_pK_{a_1}$ değeri asiklovirin guanin halkasında 7 konumunda bulunan azotun protonasyonundan, $s_pK_{a_2}$ değeri ise asiklovirin guanin halkasında 3 konumunda bulunan azotun iyonlaşmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Bu durum asiklovirin iyonlaşma dengesinde açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Asiklovirin iyonlaşma davranışı.

Bu çalışmada, asiklovirin sudaki çözünürlüğünün yetersiz olmasından dolayı bileşiğin ${}^w pK_a$ değerlerinin belirlenmesi için mol kesri (X_{ACN})- ${}^s pK_a$ ve Yasuda-Shedlovsky yaklaşımlarından yararlanılmıştır (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962; Takács-Novák ve Box, 1997; Avdeef, 2003; Daldal ve Demiralay, 2020). Bu yöntemlerin uygulanabilmesi için en az üç en fazla altı farklı organik çözücü-su ortamlarında belirlenmiş ${}^s pK_a$ değerlerine ihtiyaç duyulur (Herrero-Martínez ve ark., 2008; Daldal ve ark., 2017).

X_{ACN} - ${}^s pK_a$ yönteminde, çalışılan su-organik çözücü karışımlarındaki asetonitrilin mol kesri değerleri (X_{ACN}) ile bu ortamlarda elde edilen ${}^s pK_a$ değerleri arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılır (Takács-Novák ve Box, 1997; Daldal ve ark., 2014; Daldal ve ark., 2017; Daldal ve Demiralay, 2020). Bu doğrusal ilişkiden elde edilen eşitliğin kesim noktası, bileşiğin ${}^w pK_a$ değerini vermektedir. Asiklovirin her iki ${}^s pK_a$ tayin yönteminden elde edilen veriler kullanılarak belirlenen eşitlikler standart sapma değerleriyle birlikte Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Asiklovirin X_{ACN} - ${}^s pK_a$ ilişkisinden elde edilen eşitlikler

Yöntem	${}^w pK_a$	Eşitlik	r
STAR	${}^w pK_{a_1}$	${}^s pK_{a_1} = -1,957(0,024)X + 2,460(0,005)$	0,999
	${}^w pK_{a_2}$	${}^s pK_{a_2} = 1,439(0,035)X + 9,266(0,007)$	0,999
$\log [A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH	${}^w pK_{a_1}$	${}^s pK_{a_1} = -2,004(0,048)X + 2,468(0,010)$	0,999
	${}^w pK_{a_2}$	${}^s pK_{a_2} = 1,412(0,062)X + 9,270(0,013)$	0,999

Tablo 2’de görülen pozitif eğim X_{ACN} değeri arttıkça asiklovirin ${}^s pK_a$ değerinin arttığını, negatif eğim ise X_{ACN} değeri arttıkça asiklovirin ${}^s pK_a$ değerinin azaldığını ifade etmektedir.

Asiklovirin ${}^w pK_a$ değerlerinin hesaplanmasında kullanılan bir diğer yöntem olan Yasuda-Shedlovsky yaklaşımında, çalışılan ACN-su ikili karışımlarının dielektrik sabitlerinin tersi ($1/\epsilon$), çalışılan ACN-su ikili karışımlarında elde edilen bileşiğin ${}^s pK_a$ değeri ve suyun molar konsantrasyonunun logaritması (${}^s pK_a + \log [H_2O]$)’sıyla ilişkilendirilir. Bu yaklaşımda ${}^s pK_a + \log [H_2O]$ değerleri $1/\epsilon$ değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde, doğrusal bir ilişki elde edilir ve bu eşitlikte ilgili yere saf suyun molar konsantrasyonunun logaritmasının ilave edilmesiyle, bileşiğin ${}^w pK_a$ değeri hesaplanır (Denklem (2)) (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962). Asiklovir için Yasuda-Shedlovsky yaklaşımından elde edilen eşitlikler Tablo 3’de verilmiştir.

$$pK_a + \log [H_2O] = a\epsilon^{-1} + b \quad (2)$$

Tablo 3. Asiklovir için Yasuda-Shedlovsky yaklaşımına göre elde edilen eşitlikler

Yöntem	ACN (h/h)	ε	${}^w pK_a$	${}^s pK_a + \log[H_2O] = a_e \varepsilon^{-1} + b_e$		r	N
				a (eğim)	b (kesim)		
STAR	40	62,331	${}^w pK_{a_1}$	-99,691	5,441	0,999	3
	45	60,109	${}^w pK_{a_1}$				
	50	57,914	${}^w pK_{a_2}$	66,871	10,173	0,999	
log $[A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ - pH	40	62,331	${}^w pK_{a_1}$	-102,0	5,479	0,999	3
	45	60,109	${}^w pK_{a_1}$				
	50	57,914	${}^w pK_{a_2}$	65,540	10,194	0,999	

STAR programı ve log $[A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ -pH ilişkisi ile hesaplanan ${}^s pK_a$ değerleri kullanılarak X_{ACN} - ${}^s pK_a$ ve Yasuda-Shedlovsky yaklaşımlarıyla hesaplanan ${}^w pK_a$ değerleri Tablo 4’de literatür değerleriyle birlikte verilmiştir. Buna göre, Tablo 4’deki veriler incelendiğinde, her iki yöntem için her iki yaklaşımdan hesaplanan sonuçların hem birbiriyle hem de literatür değerleriyle uyumu görülmektedir.

Tablo 4. Asiklovirin X_{ACN} - ${}^s pK_a$ ve Yasuda-Shedlovsky yaklaşımlarıyla hesaplanan ${}^w pK_a$ değerleri

Yöntem	${}^w pK_a$	X_{ACN} - ${}^s pK_a$	Yasuda-Shedlovsky	Literatür
STAR	${}^w pK_{a_1}$	2,460	2,424	
	${}^w pK_{a_2}$	9,266	9,283	2,27*
log $[A_{HA}-A_i]/(A_i-A_A)$ - pH	${}^w pK_{a_1}$	2,468	2,432	9,27*
	${}^w pK_{a_2}$	9,270	9,287	

*(Soleimani ve ark., 2016)

4. Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada Herpes simpeks ve varicella zoster virüslerine karşı güçlü antiviral etki gösteren asiklovirin iyonlaşma ve protonasyon sabiti tayini, UV-Vis spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik yöntemde elde edilen verilerin ${}^s pK_a$ tayini için değerlendirilmesinde iki farklı yöntem kullanılmış böylece, hesaplanan ${}^s pK_a$ değerlerinin tutarlılığı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışılan ACN-su ikili karışımları için hesaplanan ${}^s pK_a$ değerlerinin birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bu durum ${}^s pK_a$ değerlerinin güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Ayrıca, bu çalışmada belirlenen ${}^s pK_a$ değerleri asiklovirin organik çözücü-su ortamları için elde edilen literatürdeki ilk verilerdir. Çalışmada asiklovirin yetersiz çözünürlüğünden dolayı ACN-su ikili karışımlarında belirlenen ${}^s pK_a$ değerleri kullanarak Yasuda-Shedlovsky ve X_{ACN} - ${}^s pK_a$ yaklaşımlarıyla, bileşiğin ${}^w pK_a$ değerleri belirlenmiştir. Her iki yöntemden hesaplanan ${}^w pK_a$ değerlerinin birbiriyle ve literatürdeki değerlerle uyumu dikkat çekicidir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, virüslerin sahip olduğu potansiyel riskler göz önüne

alındığında literatürdeki veri eksikliğini gidermek adına, hem ters faz sıvı kromatografik analitik prosedürlerin optimizasyonu çalışmaları için hem de var olan bileşiğin geliştirilmesi veya yeni bileşiklerin sentezlenmesi için gerekli çözünürlük, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım gibi fizikokimyasal davranışlar hakkında çalışmacılara önemli bilgiler sağlayacaktır.

Teşekkür

Yazar, bu çalışmada kullanılan STAR programının tedarigi için Barselona Üniversitesinden Dr. Jose L. Beltrán'a teşekkür eder.

Yazarların Katkısı

Çalışmaya başka bir yazarın katkısı bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yazar, makalenin tüm süreçlerinde “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, karşılaşılabilecek etik ihlallerden Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi ve yayın kurulunun herhangi bir sorumluluğunun bulunmadığını, bu çalışmanın Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi dışında herhangi bir akademik yayın ortamında değerlendirilmediğini beyan ederler.

Kaynaklar

- Albert, A., and Serjeant, E. P. (1984). *The determination of ionization constants a laboratory manual* (1st ed.). USA: Chapman and Hall.
- Alqahtani, S. M., Altharawi, A., Altamimi, M. A., Alossaimi, M. A., Mahdi, W. A., Ramzan, M., and Hussain, A. (2022). Method development, stability, and pharmacokinetic studies of acyclovir-loaded topical formulation in spiked rat plasma. *Processes*, 10(10), 1-17.
- Arnal, J., Gonzalez-Alvarez, I., Bermejo, M., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Kopp, S., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S., Dressman, J. B., and Barends, D.M. (2008). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(12), 5061-5072.
- Avdeef, A. (2003). *Absorption and drug development solubility, permeability, and charge state* (1st ed.). Canada: John Wiley & Sons Inc.

- Beltrán, J. L., Codony, R., and Prat, M. D. (1993). Evaluation of stability constants from multiwavelength absorbance data: program STAR. *Analytica Chimica Acta*, 276, 441–454.
- Canbay, H. S., Demiralay, E. C., Alsancak, G., and Ozkan, S. A. (2011). Chromatographic determination of pKa values of some water-insoluble arylpropionic acids and arylacetic acids in acetonitrile + water media. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(5), 2071-2076.
- Daldal, Y. D., and Demiralay, E. Ç. (2020). Chromatographic and UV–visible spectrophotometric pKa determination of some purine antimetabolites. *Journal of Molecular Liquids*, 317, 1-8.
- Daldal, Y. D., Çakır, C., Yılmaz, H., Demiralay, E. Ç. Özkan, S. A., and Alsancak G. (2014). Liquid chromatographic, spectrophotometric and potentiometric pka determination of ranitidine and famotidine. *Current Drug Therapy*, 9, 277-284 .
- Daldal, Y. D., Demiralay, E. Ç., and Alsancak, G. (2017). Determination of spectrophotometric protonation constant of cholinesterase inhibitors. *International Journal of Chemistry and Technology*, 1, 7-13.
- Dar, B. P. W., Öksüz, Z., ve Algül, Ö. (2019). Antiviral ilaçlardaki gelişmeler ve değerlendirilmesi. *Lokman Hekim Dergisi*, 9(2),160-170.
- González-Olvera, J. C., Martínez-Reyes, J., González-Jasso, E., and Pless, R. C. (2015). Determination of pKa values for deprotonable nucleobases in short model oligonucleotides. *Biophysical Chemistry*, 206, 58-65.
- Herrero-Martínez, J., Repollés, C., Bosch, E., Rosés, M., and Ràfols, C. (2008). Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water. *Talanta*, 74, 1008–1013.
- Jang, Y. H., Goddard, W. A., Noyes, K. T., Sowers, L. C., Hwang, S., and Chung, D. S. (2003). pKa values of guanine in water: density functional theory calculations combined with poisson–boltzmann continuum–solvation model, *Journal of Physical Chemistry B*, 107(1), 344–357.
- Katzung, B. G. (2011). *Basic & clinical pharmacology* (12th ed.). San Francisco: The McGraw-Hill Companies.
- Kayaalp, O. (2000). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (9th ed.). Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.
- Kazakevich, Y., and Lobrutto, R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists* (1st ed.). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Laurence, L. B. (2011). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (12th ed.). New York: McGraw Companies.
- Malik N. S., Ahmad, M., Minhas, M. U., and Khalid, Q. (2019). Determination of acyclovir in rabbit plasma by high performance liquid chromatographic (HPLC) technique. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 76(3), 421-429.
- Manallack, D. T. (2007). The pKa distribution of drugs: application to drug discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25–38.
- Mulabagal, V., Annaji, M., Kurapati, S., Dash, R. P., Srinivas, N. R., Tiwari, A. K., and Babu, R. J. (2020). Stability-indicating HPLC method for acyclovir and lidocaine in topical formulations. *Biomedical Chromatography*, 34(e4751), 1-9.
- Narasimham, L., and Dnyandeo Barhate, V. (2011). Physico-chemical characterization of some beta blockers and anti-diabetic drugs - potentiometric and spectrophotometric pKa determination in different co-solvents. *European Journal of Chemistry*, 2(1), 36-46.
- Reijenga, J., van Hoof, A., van Loon, A., and Teunissen, B. (2013). Development of methods for the determination of pKa Values. *Analytical Chemistry Insights*, 8, 53–71.
- Salgado, L. E., and Vargas-Hernández, V. C. (2014). Spectrophotometric determination of the pKa, isosbestic point and equation of absorbance vs. pH for a universal pH indicator. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5, 1290-1301.
- Sanli, N., Sanli, S., Sizir, U., Gümüştas, M., and Özkan, S. A. (2011). Determination of pK(a) values of cefdinir and cefixime by lc and spectrophotometric methods and their analysis in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 73(11-12), 1171-1176.
- Sayed, R., El-Masry, M., Hassan, W., El-Mammlı, M., Shalaby, A., and Aboul-Enein, H. Y. (2018). Validated HPLC Method for the simultaneous determination of acyclovir and co-administered vitamin B3 and gabapentin in spiked human plasma. *Separation Science Plus*, 1, 475–482.
- Shedlovsky, T. (1962). *The behavior of carboxylic acids in mixed solvents* (1st ed.). London: Pergamon Press.
- Singh, P., Gupta, E., Mishra, N., and Mishra, P. (2020). *Phytochemicals as lead compounds for new drug discovery* (1st ed.). USA: Elsevier.
- Soleimani, F., Karimi, R., and Gharib, F. (2016). Thermodynamic studies on protonation constant of acyclovir at different ionic strengths. *Journal of Solution Chemistry*, 45, 920–931.

- Takács-Novák, K., Box, K. S., and Avdeef, A. (1997). Potentiometric pKa determination of water-insoluble compounds. Validation study in methanol/water mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- Urinovska, R., Kacirova, I., and Sagan, J. (2021). Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanide in human serum by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 44, 3080–3088.
- Yasuda, M. (1959). Dissociation constants of some carboxylic acids in mixed aqueous solvents. *Bulletin of The Chemical Society of Japan*, 32(5), 429-432.