

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija R. Popović

**UTICAJ SURFAKTANATA NA
PROTOLITIČKE RAVNOTEŽE I
IZOMERIZACIJU ACE INHIBITORA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija R. Popović

**THE EFFECT OF SURFACTANTS ON
PROTOLYTIC EQUILIBRIA AND
ISOMERIZATION OF ACE INHIBITORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTORI

Dr sc. Gordana Popović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Katarina Nikolić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Živoslav Tešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Dr sc. Slavica Filipić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za farmaceutsku hemiju i Katedri za opštu i neorgansku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i predstavlja deo istraživanja u okviru naučnoistraživačkog projekta „Sinteza, kvantitativni odnosi između strukture i dejstva, fizičko-hemijska karakterizacija i analiza farmakološki aktivnih supstanci“ koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 172033, a čiji je rukovodilac prof. dr Danica Agbaba.

Neizmernu zahvalnost dugujem prof. dr Agbaba Danici koja me je primila na svoj projekat i ukazala mi poverenje, uvek imala razumevanja i pravi način da me podrži i motiviše. Ideje, saveti i ekspeditivnost profesorkine bile su mi dragoceni, a njen naučnički dar, energija i radovi me obavezuju da uvek budem ozbiljan istraživač.

Beskrajno sam zahvalna prof. dr Gordani Popović na praktičnoj i moralnoj podršci, na strpljenju, posvećenosti, temeljnosti, toleranciji, nesebičnom deljenju originalnih ideja, tokom svih faza izrade disertacije. Radeći sa profesorkom Gocom postala sam predaniji istraživač i imala privilegiju da od prave osobe učim šta je intelektualno poštenje.

Ogromnu zahvalnost dugujem doc. dr Katarini Nikolić, na pomoći u toku izrade disertacije, realizacije STSM akcija, na korektnosti, strpljenju i mnogim korisnim savetima potrebnim za pronalaženje u istraživačkoj orijentaciji i profesionalnim izazovima, kao i uzoru koji pruža svojim predanim angažovanjem i profesionalnošću.

Zahvaljujem se prof. dr Živoslavu Tešiću na korektnoj saradnji, stručnim sugestijama i smernicama u završnoj fazi izrade ove disertacije.

Izuzetno sam zahvalna doc. dr Slavici Filipić na toleranciji, strpljenju, na svemu što sam od nje naučila, na nesebično odvojenom dragocenom vremenu u svim fazama izrade ove disertacije, a najviše na prijateljskom odnosu od prvog dana, koji mi je mnogo značio.

Hvala svim kolegama koji su mi pomagali i iskreno me podržali.

Zahvalna sam mojim najdražima koji su srećni i ponosni zbog mene, kao i onima koji bi bili ali ih više nema.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici. Svojim roditeljima, Verici i Miši, zahvalna sam na tome kako su me vaspitali i usmerili, pružili mi slobodu kritičkog mišljenja i izbora, podržali u svim odlukama i hrabro izdržali moje izlive samokritičnosti tokom svih godina školovanja. Hvala mom dragom Peđi jer je uvek bio uz mene, kad je bilo najbolje ali i najteže, na безусловnoj podršci, veri i ohrabivanju da nikad ne odustajem i istrajem u dostizanju svojih i naših ciljeva.

UTICAJ SURFAKTANATA NA PROTOLITIČKE RAVNOTEŽE I IZOMERIZACIJU ACE INHIBITORA

REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitane su protolitičke ravnoteže i ravnoteža (Z)/(E)-izomerizacije devet ACE inhibitora (kaptopril, cilazapril, enalapril, fosinopril, lizinopril, perindopril, ramipril, kvinapril, zofenopril) u micelarnim rastvorima surfaktanata različitog naelektrisanja, anjonskog (natrijum-dodecilsulfat, SDS), katjonskog (cetiltrimetilamonijum-bromid, CTAB) i nejonskog (4-oktilfenolpolietoksilat, TX 100).

ACE inhibitori su lekovi koji inhibiraju angiotenzin konvertujući enzim i koriste se u terapiji hipertenzije, srčane insuficijencije i dijabetičke nefropatije. Ponašanje lekova u biosredini može se razlikovati od očekivanog, ako se predviđanje zasniva na fizičko-hemijskim osobinama definisanim isključivo u vodenom rastvoru. Relevantiji podaci dobijaju se istraživanjem u fiziološki sličnim uslovima. Ne postoji jedinstven model biomembrana već se kao pojednostavljeni simulirajući sistemi koriste micelarni rastvori surfaktanata.

Na osnovu jonizacionih grupa prisutnih u strukturi, ispitani ACE inhibitori predstavljaju kiseline ili amfolite, koji u vodenoj sredini učestvuju u složenim pH-zavisnim ravnotežama. pK_a vrednosti su određene potenciometrijski, bez i u prisustvu surfaktanata, na temperaturi 25 °C i konstantnoj jonskoj sili 0,1 M (NaCl). Za obradu eksperimentalno dobijenih podataka korišćen je kompjuterski program Hyperquad.

Zbog male rastvorljivosti u vodi, bez prisustva surfaktanata, praktične pK_a^* vrednosti fosinopрила određene su u smešama metanola i vode, različitog odnosa, a pK_a vrednost koja odgovara „čisto“ vodenoj sredini izračunata je ekstrapolacijom na 0% metanola. Određivanje pK_a vrednosti fosinopрила u prisustvu surfaktanata, izvedeno je na isti način kao i za ostala jedinjenja, jer su surfaktanti solubilizirajućim efektom doprineli povećanju rastvorljivosti.

Poređenjem pK_a vrednosti određenih bez i u prisustvu surfaktanata uočeno je da surfaktanti značajno utiču na jonizaciju ACE inhibitora (pomeranje pK_a vrednosti od -1,59 do +1,90). Najveći uticaj surfaktanti ispoljavaju na jonizaciju karboksilne grupe (od -0,92 do +1,90), dok anjonski surfaktant SDS ispoljava najizraženiji uticaj na protolitičke ravnoteže ispitanih jedinjenja (od -0,38 do +1,90). Na osnovu određenih pK_a vrednosti izračunati su dijagrami raspodele ravnotežnih oblika ispitanih ACE inhibitora u funkciji pH, kao i procenat ravnotežnih oblika pri pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja: 1,2 (pH kisele sredine želuca); 4,5 i 6,8 (pH u različitim delovima tankog creva); 7,4 (pH krvne plazme). Na osnovu pomeranja pK_a vrednosti predloženi su tipovi interakcija ACE inhibitora sa micelama.

Uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na ravnotežu (*Z*)/(*E*)-izomerizacije pet ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom (enalapril, ramipril, perindopril, kaptopril i lizinopril) ispitan je primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Definisani su optimalni uslovi za razdvajanje diastereoizomera nakon uspostavljanja ravnoteže, uzimajući u obzir i prisustvo surfaktanata u rastvoru. Pikovi su identifikovani na osnovu vremenski zavisnih hromatograma, dobijenih injektovanjem uzoraka odmah nakon rastvaranja, kada je prisutan samo (*Z*)-diastereoizomer, i u kratkim vremenskim intervalima do uspostavljanja ravnoteže. Na osnovu smanjivanja površine pika (*Z*)-diastereoizomera tokom vremena, zaključeno je da kraće retenciono vreme imaju (*E*)-izomeri kaptoprila, enalaprila i perindoprila, i (*Z*)-izomeri lizinoprila i ramiprila. U prisustvu anjonskog (SDS) i katjonskog (CTAB) surfaktanta uočeno je značajno pomeranje (*Z*)/(*E*)-ravnoteže enalaprila, ramiprila i perindoprila. Poređenjem površina pikova u hromatogramima dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata izvršena je kvantitativna procena uticaja surfaktanata na (*Z*)/(*E*)-ravnotežu.

Da bi se objasnila razlika u redosledu eluiranja diastereoizomera dva strukturno slična jedinjenjima, enalaprila i ramiprila, sprovedeno je teorijsko ispitivanje hidrofobnosti (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera primenom *Density functional theory* (DFT). Geometrijska optimizacija parova (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera izvedena je primenom B3LYP/6-31G (d,p) metoda u okviru DFT, pomoću *Gaussian 09* programa, a zatim su molekularni deskriptori optimizovanih struktura izračunati primenom ChemBio3D Ultra 13.0 i Dragon programa. Najznačajniji rezultati dobijeni su za *Connolly Solvent-*

Excluded Volume (SEV) deskriptor. Veće vrednosti SEV deskriptora, koje ukazuju na manju hidrofobnu površinu, dobijene su za (*Z*)-ramipril i (*E*)-enalapril, čime je potvrđena suprotnost u redosledu eluiranja izomera ovih jedinjenja.

Ključne reči: ACE inhibitori, surfaktanti, (*Z*)/(*E*)-diastereoizomerija, protoličke ravnoteže, potenciometrija, Hyperquad, RP-HPLC, DFT

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 615.225:615.011:371.388(043.3)

543.544(043.3)

THE EFFECT OF SURFACTANTS ON PROTOLYTIC EQUILIBRIA AND ISOMERIZATION OF ACE INHIBITORS

ABSTRACT

In this doctoral dissertation the protolytic equilibria and the (*Z*)/(*E*) equilibria of nine ACE inhibitors (captopril, enalapril, cilazapril, lisinopril, perindopril, ramipril, quinapril and zofenopril) were investigated in micellar solutions of differently charged surfactants, anionic (sodium dodecyl sulfate – SDS), cationic (cetyltrimethyl ammonium bromide – CTAB), and nonionic (4-octylphenol polyethoxylate – TX 100).

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors are drugs applied in the treatment of hypertension, coronary insufficiency and diabetic nephropathy. Drug behavior in a bioenvironment may differ from expected if the prediction is based on physico-chemical properties exclusively defined in aqueous solution. More reliable results are obtained in the studies that include physiologically similar conditions. There are no perfect models of biomembranes but micellar solutions of surfactants are used as relatively simple systems that mimic aspects of biological membranes.

Examined ACE inhibitors contain different ionizable groups giving them the properties of acids or ampholytes. In an aqueous medium, ionizable centers participate in complex pH-dependent equilibrium. The pK_a values of the examined compounds in the absence and in the presence of the 10^{-2} M surfactant (SDS, CTAB, and TX 100) were determined by potentiometric titration at 25 °C and constant ionic strength of 0.1 M (NaCl). Hyperquad computer program was used to calculate pK_a values based on experimental results.

Because of a slight fosinopril solubility its apparent pK_a values (pK_a^*) in the absence of surfactants were determined in different methanol-water mixtures and the aqueous pK_a was deduced by extrapolation of the pK_a^* values to zero cosolvent. Fosinopril titrations in the presence of the surfactants were performed by the same

protocol as that used in the case of other examined ACE inhibitors because the solubilizing effect of the surfactants acted to increase the fosinopril solubility.

By comparing the pK_a values determined in the absence and presence of surfactants it has been observed that the surfactants significantly affect the ionization of ACE inhibitors (pK_a values shift from -1.59 to +1.90). The most prominent effect surfactants expressed on the ionization of the carboxyl group (from -0.92 to +1.90). Among the three surfactants employed, anionic surfactant SDS expressed the most conspicuous effect on the shift of acid-base equilibria of the examined ACE inhibitors (from -0.38 to +1.90).

Based on the determined pK_a values distribution diagrams of equilibrium forms as a function of pH were calculated, as well as the percentage of the equilibrium species at a pH of biopharmaceutical significance: 1.2 (pH in the acidic environment of the stomach); 4.5 and 6.8 (pH in different parts of the small intestine); 7.4 (pH in the blood plasma). On the basis of the shifts of pK_a values in the presence of the applied surfactants different ACE inhibitor - micelle interactions were suggested.

The effect of micellar solutions of surfactants on the (*Z*)/(*E*)-equilibria of five ACE inhibitors with proline peptide bond (enalapril, perindopril, ramipril, captopril, lisinopril) was analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Optimal conditions for the separation of diastereomers after equilibration were defined, taking into account the presence of surfactants in solution. The peaks were identified on the basis of time-dependent chromatograms obtained immediately after dissolving ACE inhibitors in water (only the (*Z*)-diastereomer is present in solution) and later on at time intervals from 2 to 6 min. The peak that was decreasing during the time was ascribed to (*Z*)-diastereomer and it was concluded that a shorter retention time have (*E*)-isomers of captopril, enalapril and perindopril, and (*Z*)-isomers of lisinopril and ramipril. In the presence of anionic (SDS), and cationic (CTAB) surfactant (*Z*)/(*E*) equilibria of enalapril, ramipril, and perindopril were significantly changed. Quantitative estimation of surfactants effects on (*Z*)/(*E*) equilibria were made based on peak area.

With an aim of providing a better insight into the differences in order of the diastereomer elutions of enalapril and ramipril, compounds were subjected to the *Density Functional Theory* (DFT) investigation of (*Z*)- and (*E*)-diastereomers

hydrophobicity. Geometry optimizations were performed at the B3LYP/6-31G (d,p) level of the DFT using the *Gaussian 09* program. Molecular descriptors of optimized diastereomers were computed using the ChemBio3D Ultra 13.0 program and Dragon program and the *Connolly Solvent-Excluded Volume* (SEV) was selected as the most significant. Larger SEV values point out to less hydrophobic surface area obtained for the (*Z*)-ramipril and (*E*)-enalapril and confirm the opposite order of the diastereomer elutions.

Keywords: ACE inhibitors, protolytic equilibria, (*Z*)/(*E*)-diastereoisomerism, surfactants, potentiometry, Hyperquad, RP-HPLC, DFT

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medical chemistry and structural analysis

UDK number: 615.225:615.011:371.388(043.3)

543.544(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE inhibitori)	2
1.1.1. Ciljno mesto dejstva i farmakološki efekti ACE inhibitora	3
1.1.2. Otkriće i razvoj ACE inhibitora	4
1.1.3. Veza između strukture i dejstva ACE inhibitora	6
1.1.4. Diastereoizomerija prolinske peptidne veze ACE inhibitora	10
1.2. Značaj poznavanja pK_a vrednosti lekova	12
1.2.1. Metode koje se koriste u određivanju pK_a vrednosti	14
1.2.1.1. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti	15
1.3. Ispitivanje izomerizacije lekova sa prolinskom peptidnom vezom primenom reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom	16
1.3.1. Osnovni principi RP-HPLC sistema	16
1.3.2. Razdvajanje diastereoizomera u RP-HPLC sistemu	17
1.4. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata	19
1.4.1. Micelizacija surfaktanata u vodenom rastvoru	19
1.4.2. Klasifikacija surfaktanata	20
1.4.3. Uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na molekulske osobine farmakološki aktivnih supstanci	21
1.4.4. Osobine micelarnih rastvora surfaktanata kao simulirajućih sistema bioloških membrana	23
1.4.5. Značaj ispitivanja fizičko-hemijskih osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata	23

1.5. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina farmakološki aktivnih supstanci primenom molekuskog modeliranja	24
1.5.1. Metode molekuskog modeliranja	25
1.5.2. Izračunavanje fizičko-hemijskih parametara farmakološki aktivnih supstanci u programu <i>Gaussian</i> primenom DFT metoda	27
2. CILJ RADA	28
3. EKSPERIMENTALNI DEO	31
3.1. Oprema	32
3.2. Hemikalije	32
3.3. Računarski programi	33
3.4. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti ACE inhibitora	34
3.4.1. Standardizacija rastvora natrijum-hidroksida i hlorovodonične kiseline	34
3.4.2. Određivanje korekcionog faktora A	34
3.4.3. Priprema micelarnih rastvora surfaktanata	34
3.4.4. Priprema rastvora za potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti	35
3.4.5. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti bez i u prisustvu surfaktanata	35
3.4.6. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti fosinoprila u smešama metanol-voda	35
3.5. Ispitivanje uticaja surfaktanata na izomerizaciju ACE inhibitora primenom reverzno fazne tečne hromatografije RP-HPLC	36
3.5.1. HPLC sistem	36
3.6. Optimizacija strukture parova diastereoizomera i izračunavanje molekuskih deskriptora	37

4. REZULTATI I DISKUSIJA	38
4.1. Ispitivanje uticaja surfaktanata na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora	39
4.1.1. Određivanje pK_a vrednosti ACE inhibitora	39
4.1.1.1. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene bez prisustva surfaktanata	48
4.1.1.2. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene u prisustvu surfaktanata	50
4.1.2. Raspodela ravnotežnih oblika ACE inhibitora	54
4.2. Ispitivanje uticaja surfaktanata na ravnotežu (Z)/(E)-izomerizacije ACE inhibitora	65
4.2.1. Razdvajanje diastereoizomera	65
4.2.2. Identifikacija pikova i redosled eluiranja diastereoizomera	71
4.3. Teorijska analiza hidrofobnosti (Z)- i (E)-diastereoizomera ACE inhibitora	76
5. ZAKLJUČAK	78
6. LITERATURA	82
7. PRILOG	103
PRILOG A: Eksperimentalni podaci	104
PRILOG B: Spisak publikovanih radova i saopštenja	155
8. BIOGRAFIJA	156

LISTA SKRAĆENICA:

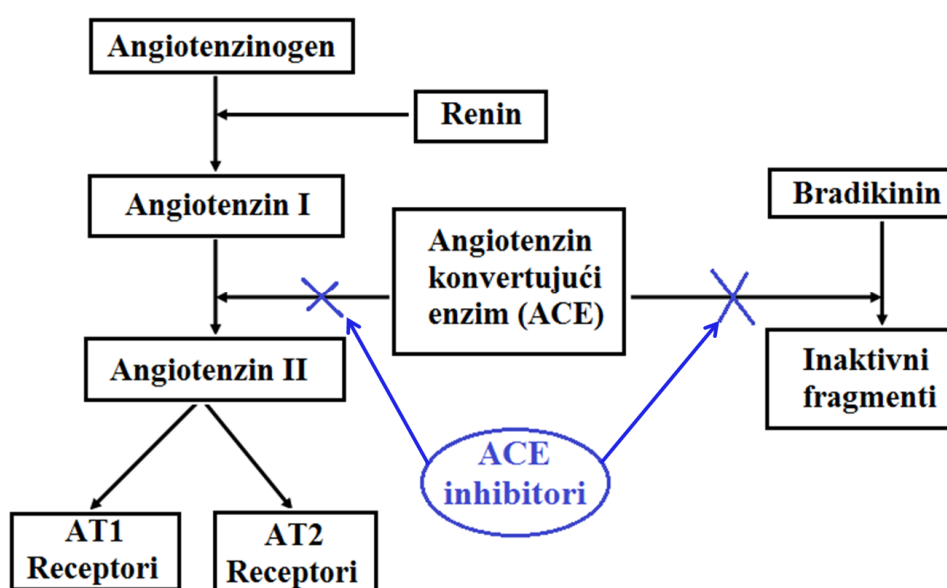
- ACE - *Angiotensin-Converting-Enzyme* (angiotenzin-konvertujući enzim)
- AT - *Angiotensin Receptor* (angiotenzinski receptor)
- B3LYP - *Becke 3-parameter, Lee, Yang and Parr*
- CE - *Capillary Electrophoresis* (kapilarna elektroforeza)
- CIP - *Cahn–Ingold–Prelog*
- cmc - *Critical Micelle Concentration* (kritična micelarna koncentracija)
- CTAB - *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (cetiltrimetilamonijum-bromid)
- DFT - *Density Functional Theory*
- HF - *Hartree–Fock*
- HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital* (najviša popunjena molekulska orbitala)
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
- LC - *Liquid Chromatography* (tečna hromatografija)
- LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (najniža nepopunjena molekulska orbitala)
- NMR – nuklearna magnetna rezonanca
- PCM - *Polarizable Continuum Model*
- QSAR - *Quantitative Structure Activity Relationship* (kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti)
- RP-HPLC - *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (reverzno fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
- SAR – *Structure Activity Relationship* (odnos strukture i aktivnosti)
- SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (natrijum-dodecil-sulfat)
- SEV – *Solvent-Excluded Volume*
- TX 100 – 4-oktilfenol-polietoksilat
- UV – spektrofotometrija u ultraljubičastoj oblasti

1. UVOD

1.1. Inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE inhibitori)

Reverzibilni, kompetitivni inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (*Angiotensin-converting-enzyme inhibitors*, ACE inhibitori) modulišu aktivnost sistema renin-angiotenzin-aldosteron, koji ima ulogu u regulaciji krvnog pritiska u humanom organizmu. Sistem renin-angiotenzin-aldosteron je kompleksan, visoko regulisan put koji predstavlja sastavni deo regulatornog mehanizma kontrole zapremine krvi, elektrolitnog balansa i arterijskog krvnog pritiska.¹ Angiotenzin-konvertujući enzim, koji ima centralnu ulogu u funkcionisanju ovog sistema, katalizuje konverziju angiotenzina II iz angiotenzina I koji nastaje iz endogenog prekursora, angiotenzinogena (Slika 1). Angiotenzin II je snažan vazokonstriktor koji utiče na periferni otpor, renalnu funkciju i kardiovaskularnu strukturu.²

Interakcijom ACE inhibitora sa angiotenzin-konvertujućim enzimom, sprečava se poslednja u nizu kaskadnih reakcija sinteze angiotenzina II i postiže dugotrajna inhibicija njegovog stvaranja (Slika 1).¹⁻³



Slika 1. Inhibicija stvaranja angiotenzina II i degradacije bradikininina pod uticajem ACE inhibitora.

Angiotenzinogen je α_2 -globulin koji sadrži 452 aminokiseline i kontinuirano se sintetise u jetri. Njegovu sintezu stimulišu brojni hormoni, uključujući glukokortikoide, tireoidni hormone i angiotenzin II. Angiotenzinogen se konvertuje u angiotenzin I pod

uticajem renina, koji katalizuje hidrolizu veze Leu 10 - Val 11 na N-terminalnom kraju angiotenzinogena. Renin je aspartil proteaza koja kontroliše brzinu stvaranja angiotenzina II i predstavlja enzim sa većom specifičnošću od ACE enzima. Stimulacija oslobađanja renina je hemodinamski strogo kontrolisana, neurogenim i humoralnim signalima. Pod uticajem ACE enzima hidrolizuje se Phe 8 - His 9 peptidna veza angiotenzina I i nastaje oktapeptid angiotenzin II. Aminopeptidaze katalizuju konverziju angiotenzina II u aktivni heptapeptid, angiotenzin III, eliminacijom N-terminalne aminokiseline arginina. Daljom aktivnošću karboksipeptidaza, aminopeptidaza i endopeptidaza nastaju inaktivni peptidni fragmenti. Pored toga, dejstvom prolilendopeptidaze na angiotenzin I nastaju heptapeptidi, angiotenzin 1-7.⁴

1.1.1. Ciljno mesto dejstva i farmakološki efekti ACE inhibitora

Fiziološka kontrola aktivnosti ACE enzima je značajno manja u odnosu na renin. ACE enzim se klasifikuje i kao cink metaloproteinaza, kininaza II i predstavlja relativno nespecifičnu dipeptidil karboksipeptidazu. Ovaj enzim katalizuje hidrolizu supstrata koji ne sadrže prolin kao preposlednju aminokiselinu u peptidnom nizu. Na ovaj način se može objasniti činjenica da angiotenzin II nije supstrat ACE enzima, jer sadrži prolin na preposlednjem mestu peptidne strukture.⁵

Angiotenzin II je dominantni peptid koji se sintetiše u renin-angiotenzin signalnom putu. Kao snažan vazokonstriktor, angiotenzin II povećava ukupni periferni otpor različitim mehanizmima: direktnom vazokonstrikcijom, stimulacijom oslobađanja kateholamina i stimulacijom neurotransmisije u perifernom nervnom sistemu. Rezultat svih ovih aktivnosti je brz presorni odgovor. Angiotenzin II izaziva i spor presorni odgovor koji dovodi do dugotrajne stabilizacije arterijskog krvnog pritiska. Dugotrajni efekat je povezan sa regulacijom renalne funkcije, jer angiotenzin II direktno povećava i reapsorpciju natrijuma u proksimalnim tubulima i, promenom renalne hemodinamike, izaziva oslobađanje aldosterona iz adrenalnog korteksa. Takođe, angiotenzin II dovodi do hipertrofije i remodelovanja vaskularnih i srčanih ćelija različitim hemodinamskim i nehemodinamskim efektima.⁶

Ostali peptidi, angiotenzin III i angiotenzin 1-7, mogu doprineti ukupnim efektima renin-angiotenzinskog puta.

S obzirom na nespecifičnost i minimalno kontrolisanu aktivnost, ACE enzim je uključen i u bradikininski signalni put. Bradikinin je nonapeptid koji izaziva vazodilataciju, povećava vaskularnu permeabilnost, dovodi do bronhokonstrikcije, stimuliše sintezu prostaglandina i utiče na periferne nociceptore, kao medijator bola. Slično angiotenzinu II, bradikinin nastaje proteolitičkim cepanjem peptida prekursora. Degradacija bradikinina do inaktivnih peptida je rezultat aktivnosti ACE. Na osnovu toga se može reći da ACE enzim ne izaziva samo sintezu snažnog vazokonstriktora, već i inaktivaciju snažnog vazodilatatora.⁵

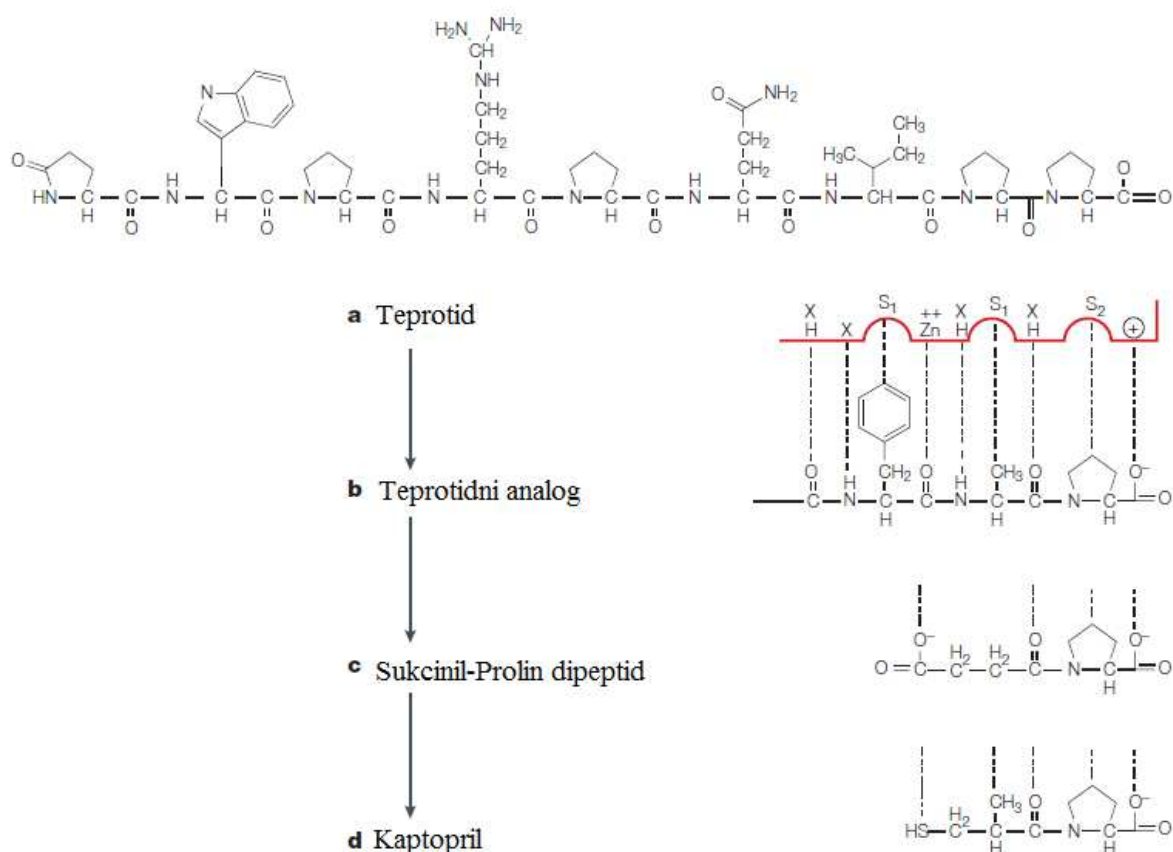
Sistem renin-angiotenzin-aldosteron ima veoma kompleksnu fiziološku ulogu, tako da poremećaji u njegovom funkcionisanju doprinose razvoju različitih kardiovaskularnih bolesti. Posledice hiperaktivnosti ovog sistema su hipertenzija i srčana insuficijencija. Povišen nivo angiotenzina II izaziva hipertenziju brzim i sporim presornim odgovorom, kao i stimulaciju oslobađanja aldosterona, retenciju natrijuma, povećanje sistemskog vaskularnog otpora, ventrikularnu hipertrofiju i remodelovanje. Sve ove posledice vode ka progresiji srčane insuficijencije.⁷

1.1.2. Otkriće i razvoj ACE inhibitora

Jedinjenja koja inhibiraju sintezu ili vezivanje angiotenzina II za AT receptore, utiču na smanjenje aktivnosti sistema renin-angiotenzin-aldosteron. Inhibitori ACE enzima predstavljaju prvu grupu komercijalno dostupnih lekova koji modulišu aktivnost ovog sistema.¹⁻⁷

Fereira je 1965. godine otkrio da otrov južno-američke zmije *Bothrops jararaca* izaziva značajan pad krvnog pritiska jer sadrži jedinjenja koja potenciraju dejstvo bradikinina, što je dovedeno u vezu sa mogućnošću inhibicije enzimske degradacije bradikinina.⁸ Iz zmijskog otrova izolovan je teprotid, jedinjenje peptidne strukture. U *in vivo* uslovima, dejstvo teprotida je trajalo dovoljno dugo da se postigne antihipertenzivni efekat, ali ovaj peptid nije ispoljavao aktivnost nakon oralne primene. Pretklinička i klinička istraživanja pokazala su da jedinjenja koja inhibiraju aktivnost ACE imaju potencijalni značaj za terapijsku primenu. Cilj daljih QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) studija bila je sinteza jedinjenja sa većim afinitetom i boljim farmakokinetičkim osobinama, uključujući apsorpciju nakon oralne primene.

Teprotid je poslužio kao vodeći molekul (Slika 2), zahvaljujući potencijalno dvostrukoj aktivnosti, inhibiciji biosinteze snažnog vazokonstriktora - angiotenzina II i inhibiciji degradacije snažnog vazodilatatora - bradikinina.⁹



Slika 2. Razvoj strukture kaptoprila na osnovu peptida izolovanog iz zmijskog otrova.⁹

Studije teprotida o vezi između strukture i aktivnosti (*Structure Activity Relationship* - SAR) doprinele su sintezi manjih peptidnih analoga (Phe-Ala-Pro) sa minimalnim afinitetom za interakciju sa katalitičkim centrom ACE enzima. Dipeptid Sukcinil-Prolin pokazao je veću selektivnost, ali ne i značajan afinitet prema ACE enzimu. Karboksilna grupa u strukturi Sukcinil-Prolina zamenjena je sulfhidrilnom grupom, čime je povećan afinitet za građenje koordinativne veze sa jonom cinka. Rezultat svih strukturnih izmena je sinteza kaptoprila, prvog ACE inhibitora koji je ispoljavao aktivnost nakon oralne primene (Slika 2).

1.1.3. Veza između strukture i dejstva ACE inhibitora

Razvoj lekova i klinička istraživanja oduvek su tesno povezani. Može se reći da su ACE inhibitori jedna od prvih grupa lekova koji su dizajnirani na osnovu poznavanja strukture kataličkog centra enzima (*Structure-Based Drug Design*).¹⁰⁻¹² Na osnovu analogije sa strukturom aktivnog centra karboksipeptidaze, pristupom racionalnog dizajna sintetisana su jedinjenja koja specifično inhibiraju aktivnost ACE enzima. Strukturnim modifikacijama ACE inhibitora postignuta je efikasna antihipertenzivna aktivnost uz izuzetno nizak nivo sporednih, neželjenih efekata i toksičnosti.¹³

Na osnovu hemijske strukture ACE inhibitori se mogu podeliti u tri podgrupe:

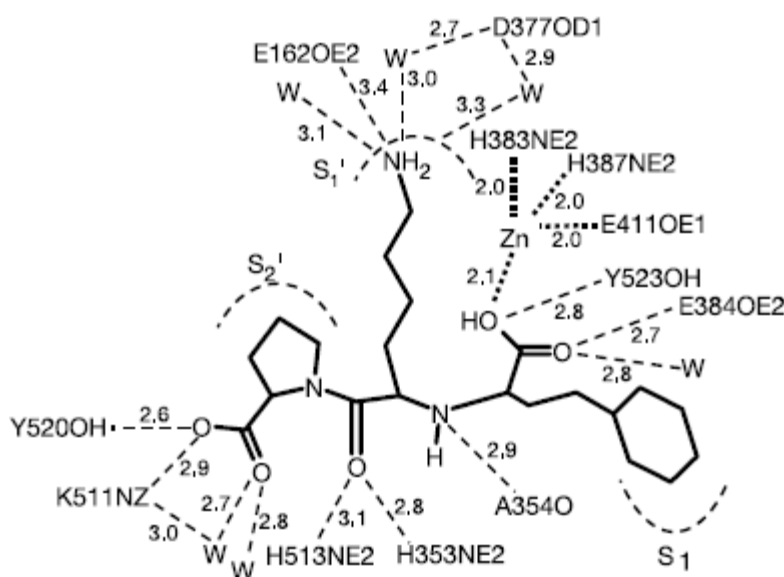
- inhibitori koji sadrže sulfhidrilnu grupu (kaptopril);
- dikarboksilatni inhibitori (cilazapril, enalapril, lizinopril, ramipril, perindopril, kvinapril, zofenopril);
- inhibitori koji sadrže fosfinatnu grupu (fosinopril).

Kaptopril i fosinopril su, za sada, jedini predstavnici svoje hemijske klasifikacije, dok većina ACE inhibitora pripada grupi dikarboksilata. Sva ova jedinjenja efikasno blokiraju konverziju angiotenzina I u angiotenzin II izazivajući slične farmakološke i terapijske efekte, a primarno se razlikuju u afinitetu za enzim i farmakokinetičkom profilu. Sulfhidrilna grupa u kaptoprilu odgovorna je za neželjene efekte koji nisu uočeni kod ostalih jedinjenja.¹⁴

Inhibitori ACE enzima prirodnog porekla sadrže aminokiselinu prolin na C-terminalnom kraju. Zamenom prolina sa drugim aminokiselinama sintetisana su jedinjenja sa manjom aktivnošću, zbog čega je prolin zadržan u strukturi prvih ACE inhibitora.¹⁵ Pokazalo se da se aktivnost zadržava i u prisustvu heterociklusa većih od prolina. Kaptopril, enalapril, lizinopril, fosinopril i zofenopril sadrže pirolidinski prsten prolina, dok su u strukturi ramiprila, perindoprila, kvinaprila i cilazaprila prisutni biciklični sistemi.¹⁶ Hidrofobni biciklični sistemi uvedeni su u strukturu sa ciljem da se poveća afinitet vezivanja za hidrofobni džep u aktivnom centru enzima, ali osim uticaja na aktivnost, ovakve strukturne modifikacije doprinele su razlikama u farmakokinetičkom profilu i fizičko-hemijskim osobinama.^{17,18} Ovaj deo strukture označen je kao N-prsten, za koji mora biti vezana karboksilna grupa koja imitira C-terminalnu karboksilnu grupu endogenih ACE supstrata.^{19,20} Na ovaj način se

obezbeđuje rigidnost molekula koja je neophodna da bi se karboksilna grupa u anjonskom obliku, adekvatno orijentisala za interakciju sa protonovanom amino-kiselinom u strukturi katalitičkog centra enzima (Slika 3).^{21,22} Sekundarna amino grupa u strukturi inhibitora, analogna je azotu peptidne veze ACE supstrata.²³ Atom cinka ostvaruje koordinativnu vezu sa peptidnom grupom i na taj način stabilizuje negativno naelektrisan intermedijer koji nastaje hidrolizom peptida na C-terminalom kraju. Sulfhidrilna (tiolna), karboksilna i fosfinatna grupa mogu učestvovati u građenju koordinativne veze sa cinkom, pri čemu se imitira tranziciono stanje peptidne hidrolize.^{24,25} Najveći afinitet prema vezivanju cinka ispoljava sulfhidrilna grupa. Kaptopril i drugi derivati sa ovom grupom, izazivaju osip na koži i poremećaj ukusa, mogu formirati dimere i disulfide koji smanjuju bioraspoloživost i doprinose skraćanju vremena dejstva.²⁶ Modifikacije u strukturi izvođene su sa ciljem da se eliminacijom sulfhidrilne grupe uklone i sporedni efekti kaptoprila, a zadrži sposobnost helatiranja cinka, potrebna za inhibitornu aktivnost. Na taj način, razvijena je najveća podgrupa ACE inhibitora – dikarboksilatni analozi (enalapril, cilazapril, lizinopril, perindopril, ramipril, kvinapril, trandolapril, benazepril).²⁷

Aromatične i nepolarne aminokiseline u strukturi supstrata, hidrofobnim interakcijama mogu doprineti povećanju afiniteta vezivanja za enzim, ali ne ostvaruju specifične interakcije sa hidrofobnim džepom enzima.^{28,29}



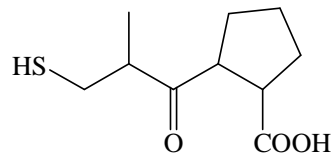
Slika 3. Model interakcije sa ACE enzimom na primeru lizinoprila.¹⁰

Interakcija sa ACE enzimom je stereoselektivna tako da se optimalna aktivnost postiže kada stereochemija inhibitora odgovara stereochemiji L-aminokiselina, prisutnih u fiziološkim supstratima. Utvrđeno je da *S,S,S*-konfiguracija zadovoljava potrebne kriterijume i optimalna je za postizanje enzimske inhibicije.²²

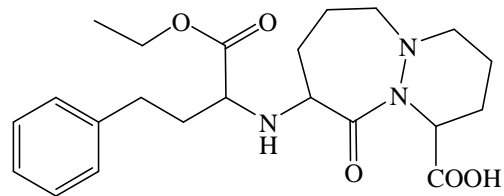
Esterifikacijom karboksilne i fosfinatne grupe nastaju *pro drug* forme lekova, čijom primenom se prevazilazi problem nedovoljne apsorpcije nakon oralne primene i povećava biorasploživost. Svi ACE inhibitori, izuzev kaptoprila i lizinoprila, predstavljaju *pro drug* oblike iz kojih u procesu bioaktivacije, enzimskom hidrolizom odgovarajućih estarskih grupa, nastaju aktivne forme leka.^{22,23}

Zajedničke strukturne karakteristike svih ACE inhibitora su prisustvo amidske veze i karboksilne grupe, vezane za N-prsten. U jonizovanom, anjonskom obliku, karboksilna grupa ostvaruje interakciju sa protonovanom amino grupom arginina u aktivnom centru enzima. Pored karboksilne, u strukturi ACE inhibitora prisutne su i druge grupe koje mogu da jonizuju, kao što su sulfhidrilna, primarna i sekundarna amino grupa.

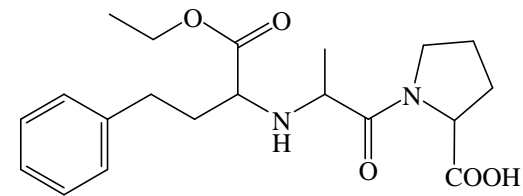
S obzirom na prisutne jonizujuće grupe, ACE inhibitori predstavljaju kiseline i amfolite (Slika 4). Fosinopril i zofenopril sadrže jedan kiseli centar – karboksilnu grupu. Kaptopril sadrži dva kisela centra, karboksilnu i sulfhidrilnu grupu, dok enalapril, perindopril, cilazapril, kvinapril i ramipril, sa jednim kiselim (karboksilna grupa) i jednim baznim centrom (sekundarna amino grupa) predstavljaju amfolite. Lizinopril je složen amfolit jer sadrži četiri jonizujuća centra, dve karboksilne, primarnu i sekundarnu amino grupu. Lizinopril je hemijski jedinstven ACE inhibitor jer jedini sadrži aminokiselinu lizin, za razliku od ostalih u čijoj strukturi je aminokiselina alanin. Takođe, lizinopril nije *pro drug* i ne zahteva bioaktivaciju. Iako sadrži četiri jonizujuća centra i pripada grupi najhidrofilnijih ACE inhibitora, lizinopril ispoljava zadovoljavajuću biorasploživost (25-30%) i aktivnost nakon oralne primene. Fizičko-hemijske osobine doprinose da jonizovane grupe cviterjonskog oblika lizinoprila ostvaruju intramolekulske jonske interakcije, takve da je lek ukupno bez naelektrisanja što olakšava prolaz kroz lipidni dvosloj.^{22,30}



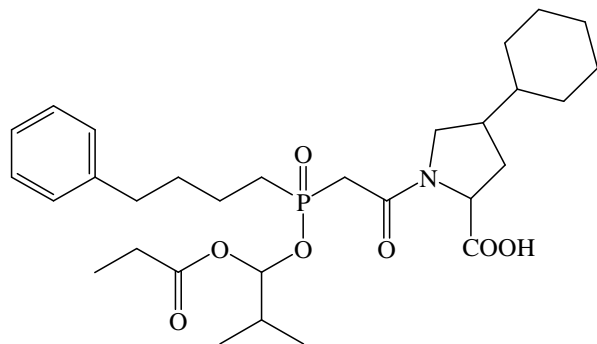
Kaptopril



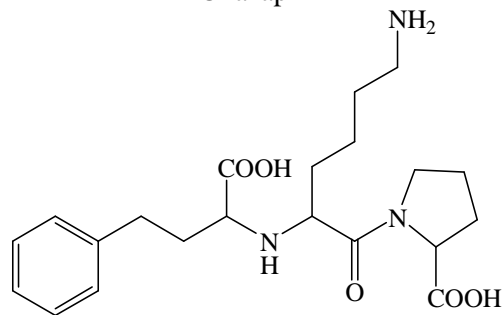
Cilazapril



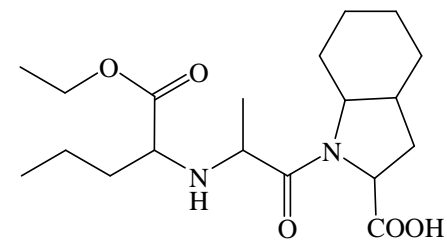
Enalapril



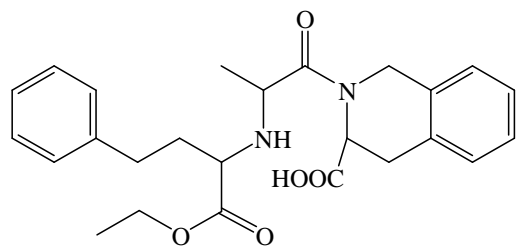
Fosinopril



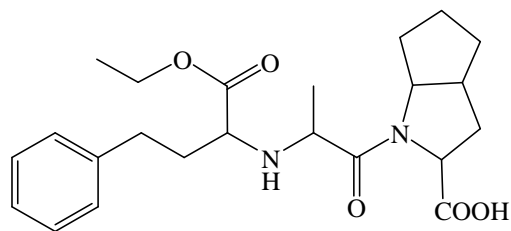
Lizinopril



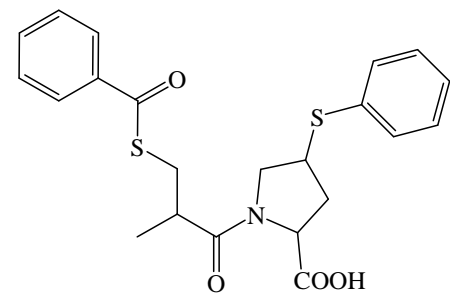
Perindopril



Kvinapril



Ramipril

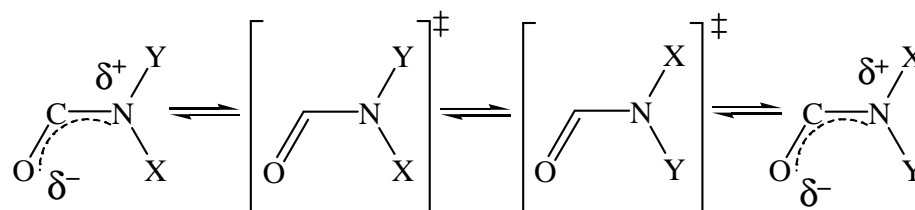


Zofenopril

Slika 4. Hemijske strukture ACE inhibitora.

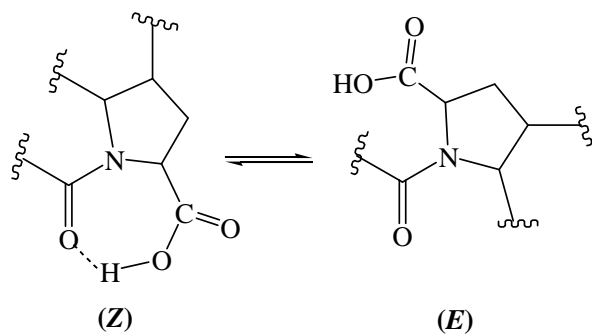
1.1.4. Diastereoizomerija prolinske peptidne veze ACE inhibitora

ACE inhibitori se mogu posmatrati kao dipeptidi koji u svojoj hemijskoj strukturi sadrže prolinsku peptidnu vezu.³¹⁻³³ Peptidna veza je u osnovi amidna funkcionalna grupa koja ispoljava delimičan karakter dvostruke veze usled rezonantne stabilizacije, do koje dolazi konjugacijom sp^2 elektrona heteroatoma (N) sa planarnim π -sistemom ($-C=O$).^{34,35} Potencijalna dekonjugacija sistema heteroatom (N) - σ -veza - ugljenik - π -veza - heteroatom (O) dovodi do preraspodele naelektrisanja, koja doprinosi da jednostruka C-N veza postaje rigidna i planarna, pri čemu se smanjuje karakter dvostruke veze i omogućava interkonverzija (Slika 5).^{36,37}

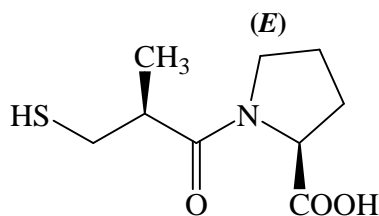


Slika 5. Mehanizam izomerizacije oko amidne grupe sa delimičnim karakterom dvostruke veze.³⁴

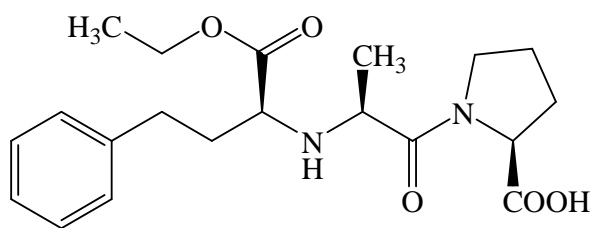
Rigidnost ne dozvoljava slobodnu rotaciju, ali usled niske energetske barijere, molekuli ACE inhibitora mogu zauzeti dve termodinamički najstabilnije (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomerne orijentacije (Slika 6).³⁸⁻⁴¹ Sve dok razlika u energiji dva izomera nije prevelika i energetska barijera interkonverzije nije previsoka, izomeri mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi i mogu se analitički razdvojiti.⁴²⁻⁴⁵ Diastereoizomeri mogu ispoljavati sterne i elektronske razlike koje utiču na inter i intramolekulske interakcije i izazivaju razlike u njihovim analitičkim i farmakokinetičkim osobinama.⁴⁶⁻⁴⁹ Prolinska peptidna veza može imati suštinski značaj u aktivnosti ACE inhibitora i zato je neophodno poznavanje molekularnih mehanizama izomerizacije i različitih stabilnosti odgovarajućih izomera.⁵⁰⁻⁵³ Kao i u slučaju drugih amida, pretpostavlja se da i kod izomera ACE inhibitora, dipol-dipol interakcije i dodatni elektronski efekti favorizuju konfiguraciju (*Z*)-diastereoizomera.⁵⁴⁻⁵⁷



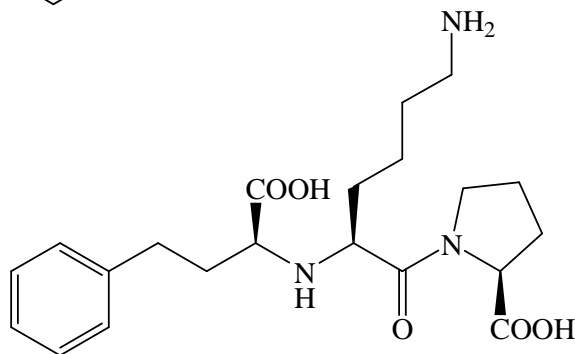
Kaptopril



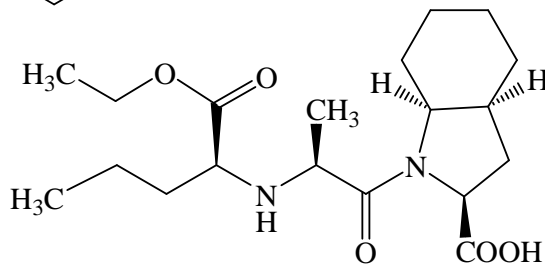
Enalapril



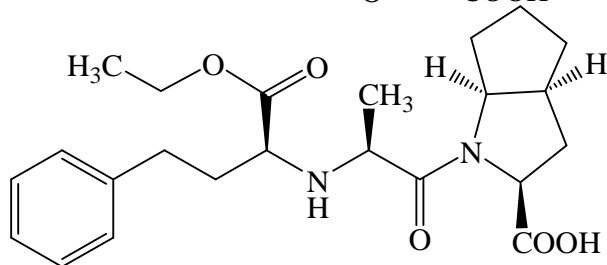
Lizinopril



Perindopril



Ramipril



Slika 6. Izomerija ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom.

Za označavanje izomera u ovom radu primenjeno je CIP (Cahn–Ingold–Prelog) pravilo prioriteta u odnosu na tercijarni amin prolinske peptidne veze, pri čemu su karboksilna grupa i karbonilna veza amidske grupe orijentisane sa iste strane kod (*Z*)- i suprotno kod (*E*)-izomera.^{58,59}

Diastereoizomeri imaju različit hidratacioni potencijal u interakcijama sa molekulima vode, tako da ispitivanje ponašanja ACE inhibitora u vodenom rastvoru ima važnu ulogu u određivanju relativnog (*Z*)/(*E*)-odnosa. Odnos izomera i brzina izomerizacije u rastvoru, zavise od pH vrednosti sredine, jer jonizaciono stanje snažno utiče na elektronsku raspodelu prolinske peptidne veze i može usloviti elektronske prelaze koji dovode do (*Z*)/(*E*)-interkonverzije.⁶⁰⁻⁶⁷

1.2. Značaj poznavanja pK_a vrednosti lekova

Većina farmakološki aktivnih jedinjenja su slabe kiseline ili baze, a mnoge od njih sadrže i kisele i bazne funkcionalne grupe i predstavljaju amfolite. Kako se pK_a definiše kao negativni logaritam konstante jonizacije i može imati bilo koju vrednost, opseg mogućih pK_a vrednosti lekova je veliki. Međutim, samo na osnovu pK_a vrednosti ne može se zaključiti da li je jedinjenje kiselina ili baza, jer mnoge slabo kisele funkcionalne grupe mogu imati pK_a vrednost veću od 7, dok slabo bazne grupe često imaju pK_a vrednost manju od 7. Samo suštinsko ispitivanje i razumevanje hemijske strukture molekula i poznavanje funkcionalnih grupa koje mogu da jonizuju, omogućava adekvatno predviđanje kiselinsko-baznog profila leka.⁶⁸

Stepen jonizacije može se predvideti na osnovu izraza koji se izvode iz Henderson–Hasselbalch-ove jednačine:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{deprotonovan oblik}]}{[\text{protonovan oblik}]}$$

Za monoprotične kiseline i baze procenat jonizovanog i nejjonizovanog oblika, kao i dijagram raspodele na određenoj pH vrednosti može se izračunati iz jednačina:

$$\begin{array}{ll} \text{Za slabe kiseline} & \% \text{ jonizovanog oblika} = \frac{100}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \\ \text{Za slabe baze} & \% \text{ jonizovanog oblika} = \frac{100}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \end{array}$$

Na pH vrednosti rastvora koja je jednaka pK_a vrednosti funkcionalne grupe, u rastvoru će biti zastupljene jednake koncentracije jonizovane i nejonizovane forme. Ako se pH rastvora promeni za jednu pH jedinicu iznad pK_a slabe kiseline, odnosno jednu pH jedinicu ispod pK_a slabe baze, procenat jonizovanog oblika poraste do 90%, dok promena u istom smeru za dve pH jedinice utiče na povećanje jonizacije do 99%. Između pH i pK_a postoji logaritamski odnos koji određuje da svaka sledeća promena za jednu pH povećava jonizaciju do 99,9%; 99,99% i tako redom. Na osnovu ovakve relacije smatra se da se proces jonizacije odvija u pH opsegu koji odgovara vrednostima $pK_a \pm 2$.⁶⁹

U vodenom rastvoru molekuli lekova delimično i postepeno jonizuju pri čemu se uspostavlja ravnoteža između molekulske i jonizovanih (katjonska, anjonska, cviterjonska) formi. Kiselinско-bazni profil leka definiše i njegovu lipofilnost, a samim tim i rastvorljivost, koja je u direktnoj vezi sa pK_a vrednostima jonizujućih grupa. Jonizovanu formu leka karakteriše veća rastvorljivost u vodi, dok nejonizovan, molekularni oblik ispoljava veću permeabilnost kroz biološke membrane usled izraženije lipofilnosti. Od pK_a vrednosti leka i pH telesne tečnosti na mestu primene zavisi stepen jonizacije leka sa slabo kiselim ili baznim grupama. pH vrednost telesnih tečnosti široko varira, ali najznačajniji fiziološki rastvor je krvna plazma čija je normalna pH vrednost oko 7,4.^{22,68,69}

Poznavanje pK_a vrednosti lekova kandidata u ranim fazama otkrića i razvoja, pruža bolji uvid u osobine jedinjenja koja se razmatraju u ovom procesu i omogućava prevazilaženje problema u vezi sa bioraspoloživostu, selektivnošću, metaboličkom stabilnošću i toksičnošću, što povećava verovatnoću uspešnosti konačnog ishoda. Od jonizacionog stanja potencijalnih lekova zavise analitičke i biofarmaceutske osobine, farmakokinetički parametri i interakcije leka sa receptorom.⁷⁰

Stepen jonizacije utiče na rastvorljivost lekova i njegovo predviđanje je neophodno za optimizaciju eksperimentalnih uslova. Definisavanje analitičkih uslova razdvajanja lekova koji mogu da jonizuju, primenom savremenih metoda tačne hromatografije i kapilarne elektroforeze, zahteva podatke o njihovim pK_a vrednostima. U optimizaciji analitičkih postupaka potrebno je razmotriti elektroforetsko ponašanje, zadržavanje na hromatografskoj koloni, uticaj pH vrednosti mobilne faze i udela organske faze na jonizaciju ispitivanih jedinjenja.⁷¹

Za predviđanje biofarmaceutskih karakteristika lekova od fundamentalnog značaja je poznavanje fizičko-hemijskih parametara farmakološki aktivnih jedinjenja kao što su pK_a vrednosti, particioni koeficijent oktanol/voda ($\log P$) i rastvorljivost, koji se moraju uzeti u obzir u svakom pristupu u kome se razmatra razvoj novih i unapređenje postojećih farmaceutskih formulacija.⁷²

Poznavanje pK_a vrednosti lekova je posebno značajno kada se ispituje i predviđa ponašanje lekova u uslovima biosredine. Jonizaciono stanje utiče na brzinu i stepen oslobađanja leka iz doziranih farmaceutskih oblika u želucu, kao i apsorpciju leka u proksimalnom delu tankog creva.⁷³ Pokazalo se da se kiseline sa pK_a vrednošću ispod 3 i baze čija je pK_a iznad 8, apsorbuju u veoma niskom stepenu. Kada se uzme u obzir lipoproteinska struktura biomembrana, generalno se očekuje bolja permeabilnost nejonizovanih i ukupno neutralnih lekova, kod kojih je ovaj proces termodinamički favorizovan u odnosu na jonizovana i naelektrisana jedinjenja.⁷⁴ Difuzija lekova kroz biološke membrane je veoma složen biološki proces koji obuhvata mnoge faktore što značajno ograničava generalizaciju predviđanja ponašanja leka samo na osnovu fizičko-hemijskih osobina definisanih u vodenom rastvoru.^{75,76}

1.2.1. Metode koje se koriste u određivanju pK_a vrednosti

Razvijene su različite metode koje se mogu primeniti za određivanje pK_a vrednosti, kao što su potenciometrija, UV-VIS spektrofotometrija, tečna hromatografija (*Liquid Chromatography* - LC), kapilarna elektroforeza (*Capillary Electrophoresis* - CE), nuklearna magnetna rezonanca (NMR). Zahvaljujući visokom stepenu preciznosti određivanja i reproducibilnosti rezultata potenciometrija je najčešće korišćena tehnika.⁷⁷

Spektroskopske metode su veoma osetljive, što ih čini pogodnim za ispitivanje hemijskih ravnoteža u rastvoru. Ako ravnotežne vrste imaju različite spektralne karakteristike, može se izmeriti njihova koncentracija i jednostavno odrediti pK_a vrednost. UV-VIS spektrofotometrija se može primeniti kod jedinjenja koja su slabo rastvorljiva u vodi i dostupna u malim količinama. Osnovni zahtev je da ispitivano jedinjenje u strukturi sadrži hromofore dovoljno blizu kiselinsko-baznog centra. Ograničavajući faktor primene UV-VIS spektrofotometrije je zahtev za uzorkom

visokog stepena čistoće jer eventualno prisutne nečistoće često interferiraju sa određivanjem pK_a vrednosti ispitivanog jedinjenja.⁷⁸⁻⁸³

Alternativu potencijometriji i spektrofotometriji predstavljaju separacione tehnike, kapilarna elektroforeza⁸⁴⁻⁸⁶ i tečna hromatografija,^{87,88} kao i nuklearna magnetna rezonanca.^{89,90} Ovakve tehnike mogu imati prednost u ispitivanju protolitičkih ravnoteža jedino ako je dostupna samo mala količina supstance (koncentracija manja od 10^{-5} M) i ako je potrebno razdvojiti jedinjenja iz uzorka. Međutim, precizno određivanje moguće je samo pod uslovom da se ravnoteža uspostavlja dovoljno sporo u odnosu na brzinu procesa razdvajanja. U suprotnom, ako je vreme uspostavljanja ravnoteže zanemarljivo u odnosu na vreme potrebno za razdvajanje, pojedinačne ravnotežne vrste se ne mogu odvojeno ispitati, već se u hromatogramu ili elektroferogramu dobija samo jedan pik koji ukazuje na „prosečnu“ jonizaciju svih ravnotežnih oblika prisutnih u sistemu. Drugim rečima, primenom ovih tehnika ne mogu se precizno definisati protolitičke ravnoteže jedinjenja sa većim brojem preklapljenih procesa jonizacije i odrediti pK_a vrednosti svih jonizacionih centara.^{77, 91-93}

1.2.1.1. Potencijometrijsko određivanje pK_a vrednosti

Potencijometrijsko određivanje pK_a vrednosti obuhvata preciznost, jednostavnost i dostupnost uređaja za rutinsku analizu i zasniva se na titraciji uzorka kiselinom ili bazom uz korišćenje pH elektrode za praćenje toka titracije. Koncentracija ispitivanog rastvora trebalo bi da bude najmanje 5×10^{-4} M da bi se detektovale značajne promene u obliku titracione krive. U cilju izbegavanja greške u merenju, naročito u oblasti od neutralne ka višim pH vrednostima, potrebno je koristiti pažljivo pripremljene i standardizovane rastvore bez prisustva ugljen-dioksida. Vrednosti se izračunavaju na osnovu eksperimentalnih podataka, iz dela potencijometrijske krive u kome dolazi do promene oblika, ali ne i skoka.⁹⁴⁻⁹⁷

Kao što je već istaknuto, farmakološki aktivne supstance često sadrže veći broj kiselih i/ili baznih jonizujućih centara, čije pK_a vrednosti mogu biti veoma bliske. To znači da se eksperimentalno ne mogu uvek individualno posmatrati svi procesi jonizacije, već dolazi do njihovog preklapanja i u rastvoru je istovremeno prisutno više

ravnotežnih oblika istog molekula. Za razliku od ostalih pomenutih metoda, precizna evaluacija preklopljenih procesa jonizacije moguća je samo primenom potenciometrije.

U vodenim rastvorima lekova često se dobijaju veoma složeni sistemi čije su protolitičke ravnoteže matematički definisane kompleksnim sistemom jednačina koje je teško rešiti. Za prevazilaženje ovog problema neophodno je primeniti kompjuterske metode, koje od sredine prošlog veka imaju sve veći značaj u evaluaciji eksperimentalno dobijenih potenciometrijskih podataka. U osnovi programa je model ravnoteže koji se zasniva na zakonu o dejstvu masa i jednačinama hemijske ravnoteže, uključujući nelinearnu regresionu analizu metodom najmanjih kvadrata.

Analizom potenciometrijskih podataka u kompjuterskom programu Hyperquad⁹⁸, precizno se mogu odrediti pK_a vrednosti lekova, sa većim brojem jonizacionih centara bliskih vrednosti. Pored toga, ovaj program pruža mogućnost određivanja kiselinsko-baznih konstanti u složenim sistemima koji sadrže više molekula sa jonizujućim centrima. Moguća je i analiza podataka dobijenih iz rastvora lekova dostupnih u obliku soli sa organskim kiselinama ili bazama.

1.3. Ispitivanje izomerizacije lekova sa prolinskom peptidnom vezom primenom reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom

1.3.1. Osnovni principi RP-HPLC sistema

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) pripada separacionim tehnikama koje omogućavaju razdvajanje jedinjenja iz smeše, ali i njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Predstavlja analitičku tehniku koja se svakodnevno primenjuje za analizu smeše farmakološki aktivnih jedinjenja, njihovih nečistoća i pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav doziranih farmaceutskih oblika. Razdvajanje komponenata smeše postiže se na osnovu različitog afiniteta jedinjenja prema stacionarnoj i mobilnoj fazi, interakcijama koje se ostvaruju na dodirnoj površini faza.⁹⁹

Reverzno fazna tečna hromatografija (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) izvodi se u hromatografskom sistemu koji se sastoji iz nepolarne stacionarne i polarne mobilne faze. Eksperimentalni uslovi i sastav mobilne faze podešavaju se tako da obezbeđuju raspodelu molekula iz uzorka adsorpcijom na stacionarnu fazu i desorpcijom u mobilnu fazu, sve dok se ne uspostavi ravnoteža između ova dva procesa.

U RP-HPLC sistemu stacionarnu fazu predstavljaju komercijalno dostupne kolone, dobijene različitim modifikacijama silika gela, u cilju povećanja hidrofobnosti (najčešće ugljovodonicima ravnog niza sa osam ili osamnaest ugljenikovih atoma). S obzirom na lipofilnost velikog broja farmakološki aktivnih supstanci, interakcije analita i stacionarne faze su veoma jake tako da voda, kao polarna mobilna faza, ima slabu elucionu moć bez dodatka organskog modifikatora. Iz tog razloga, u RP-HPLC sistemu se kao mobilna faza koristi smeša vode ili pufera sa polarnim organskim rastvaračem koji se meša sa vodom i povećava njenu elucionu moć. Organski modifikatori koji najčešće ulaze u sastav mobilnih faza su acetonitril, metanol, etanol, izopropanol, dioksan i drugi. Acetonitril omogućava detekciju na nižim talasnim dužinama, ima sposobnost imitiranja membranskih uslova i manje je viskozan od metanola, dok se izopropanol koristi sam ili u kombinaciji sa acetonitriplom pri eluiranju velikih ili hidrofobnih proteina.¹⁰⁰

1.3.2. Razdvajanje izomera u RP-HPLC sistemu

Za ispitivanje konformacionih i konfiguracijskih promena u strukturi organskih molekula,¹⁰¹ koje se mogu detektovati u vremenskom intervalu procesa razdvajanja, kao što su epimerizacija,^{102,103} enantiomerizacija^{104,105} i diastereoizomerizacija^{106,107} koriste se različite hromatografske metode. Primenom reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom moguće je ispitivanje dinamičke ravnoteže izomerizacije jedinjenja sa prolinskom peptidnom vezom. Promene u konfiguraciji peptidne veze, mogu se ispitivati na različitim stacionarnim fazama različitim separacionim pristupima. Sastav i pH vrednost mobilne faze, temperatura kolone i brzina razdvajanja, utiču na dinamičku ravnotežu između diastereoizomera i na taj način definišu njihovu rezoluciju u određenom hromatografskom sistemu. Retenciono vreme (t_R) koje opisuje zadržavanje

analita u koloni, u osnovi zavisi od uspostavljanja ravnoteže procesa raspodele analita između mobilne i stacionarne faze. Kod jedinjenja kod kojih se jedan izomer konvertuje u drugi, u hromatografskom sistemu se uspostavlja i sekundarna ravnoteža, tako da njihova retencija odgovara prosečnom zadržavanju dva izomera. Ako je brzina interkonverzije spora u odnosu na brzinu hromatografskog procesa, u dobijenom hromatogramu mogu se uočiti dva odvojena pika.¹⁰⁸ U zavisnosti od eksperimentalnih uslova, ako se interkonverzija u koloni odvija brzinom koja je poredljiva sa hromatografskim procesom, dobijene eluacione profile ravnotežnih vrsta često karakteriše pojava platoa, cepanje ili širenje pikova. Ovakav izgled hromatograma je obično nepoželjan, a može dovesti i do pogrešne interpretacije jer se dodatni pikovi mogu pripisati eventualno prisutnim nečistoćama.¹⁰⁹ Sa druge strane, ako su eksperimentalni uslovi takvi da pogoduju interkonverziji i njena brzina je veća od brzine procesa razdvajanja, u dobijenom hromatogramu uočava se pojava samo jednog pika.

Diastereoizomerizacija ACE inhibitora je reverzibilan proces koji se može opisati kinetikom prvog reda.^{110,111} Brzina ovog procesa je dovoljno spora, u smislu HPLC vremenske skale, što omogućava razdvajanje u RP-HPLC sistemu. Interkonverzija (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera u koloni odvija se kao posledica smanjene energetske barijere koja dozvoljava delimičnu rotaciju oko prolinske peptidne veze. Ispitivanjem uticaja eksperimentalnih uslova na energetsku barijeru, može se definisati RP-HPLC sistem u kome se postiže razdvajanje diastereoizomera ili njihovo istovremeno eluiranje u obliku jednog oštrog pika. Razdvajanje (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera nekih ACE inhibitora (enalapril, lizinopril i perindopril) uspešno je izvedeno u RP-HPLC sistemu.¹¹²⁻¹¹⁷ Detaljno je ispitivan uticaj polarnosti rastvarača, organskih modifikatora, pH, temperature, brzine protoka i jonske jačine na razdvajanje i kinetiku izomerizacije.^{118,119}

Brzina interkonverzije ACE inhibitora je direktno proporcionalna temperaturi i obrnuto proporcionalna pH vrednosti mobilne faze. Sa porastom temperature smanjuje se barijera i interkonverzija se ubrzava.^{31,109} Sa druge strane, na višim pH vrednostima mobilne faze, C-N veza ima izraženiji karakter dvostruke veze, što otežava rotaciju i povećava njenu energetsku barijeru. Na visokoj temperaturi (80°C) i nižoj pH vrednosti mobilne faze (pH 2) dobijeni su hromatogrami enalapрила i lizinopрила sa jednim oštrim pikom.¹⁰⁹ Na niskoj temperaturi kolone (4°C) i višoj pH vrednosti mobilne faze (pH 7)

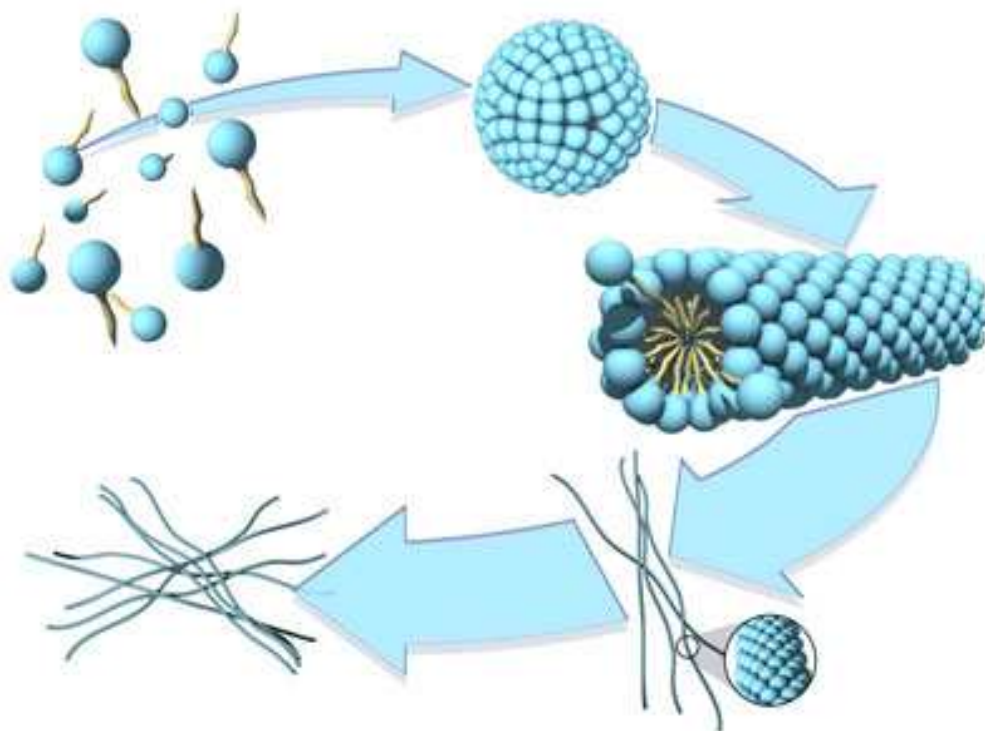
razdvojeni su (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomeri enalapрила.³¹ Analizom uzoraka na sobnoj temperaturi uočeno je širenje i cepanje pikova. Ako je vreme interkonverzije srazmerno retencionom vremenu, pri većoj brzini protoka mobilne faze (4 ml/min) pikovi se razdvajaju, dok sporiji protok (0,3 ml/min) omogućava pojavu jedinstvenog pika.¹¹³⁻¹¹⁷

1.4. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata

1.4.1. Micelizacija surfaktanata u vodenom rastvoru

Surfaktanti su površinski aktivne materije koje se sastoje iz polarnog i nepolarnog regiona. Polarni deo se označava i kao glava molekula i može biti jonski, nejonski ili cviterjonski, dok nepolarni deo predstavlja hidrofobni alkil ili arilalkil ugljovodonični niz. Pri nižim koncentracijama surfaktanti egzistiraju u vodenom rastvoru u obliku monomera i akumuliraju se na granici faza različitih lipofilnosti, smanjujući površinski napon rastvora.¹²⁰ Sa porastom koncentracije do kritične micelarne koncentracije (*Critical Micelle Concentration, cmc*), monomeri surfaktanata se spontano samoorganizuju u agregate koji se zovu micelle (Slika 7). Polarne grupe formiraju spoljašnji omotač micelle koji je u kontaktu sa vodom, dok nepolarni ugljovodonični nizovi ostvaruju hidrofobne interakcije u unutrašnjosti koja predstavlja jezgro micelle. U osnovi procesa micelizacije je ravnoteža između dva efekta, tendencije hidrofobnih nizova da izbegnu kontakt sa vodom i odbojnih interakcija polarnih ili naelektrisanih hidrofilnih regiona koje destabilizuju ovaj proces.¹²¹ Vrednost *cmc* direktno zavisi od prirode hidrofilnih grupa i dužine hidrofobnog niza surfaktanata i eksponencijalno se smanjuje sa porastom broja ugljenikovih atoma. Najznačajniji faktori koji utiču na oblik i veličinu formiranih agregata su priroda i veličina polarne grupe, dužina hidrofobnog niza, temperatura, pH vrednost i jonska sila rastvora.¹²² Sa porastom dužine nepolarnog niza, povećava se hidrofobnost, što dovodi do smanjenja *cmc*. Sa druge strane, *cmc* jonskih surfaktanata je generalno veća u poređenju sa nejonskim surfaktantima. Broj molekula surfaktanata koji formiraju micelu definiše se kao agregacioni broj i koristi se kao parametar koji opisuje veličinu micela. Daljim porastom koncentracije surfaktanata raste broj i veličina micela, ali se broj slobodnih

monomera surfaktanata ne menja. Rast micela sa porastom koncentracije surfaktanata objašnjava se različitim modelima, kojima je zajednička pretpostavka da je slobodna energija surfaktanta veća u micelama sfernog nego u micelama diskoidnog ili cilindričnog oblika.¹²³



Slika 7. Micelizacija surfaktanata u vodenom rastvoru.

(Izvor slike: <http://www.nanowerk.com/news/newsid=11536.php>)

1.4.2. Klasifikacija surfaktanata

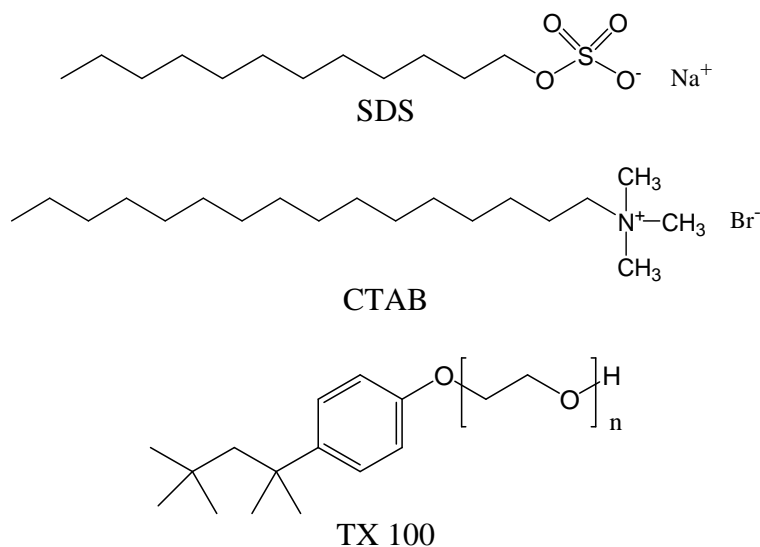
Na osnovu prirode polarnih grupa, surfaktanti mogu biti:

- Jonski
 - Anjonski – u vodenom rastvoru jonizuju na negativno naelektrisani anjon surfaktanta i odgovarajući katjon. Primer je natrijum-dodecilsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate* - SDS)
 - Katjonski – u vodenom rastvoru jonizuju na pozitivno naelektrisani katjon surfaktanta i odgovarajući anjon. Primer je

cetiltrimetilamonijum-bromid (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* - CTAB)

- Nejonski – u polarnom delu sadrže slobodne –OH grupe i polioksietilenske lance različite dužine i usled toga ne jonizuju u vodenom rastvoru. Primer je 4-oktilfenolpolietoksilat (Triton X 100, TX 100)

Na Slici 8 prikazane su hemijske strukture SDS, CTAB i TX 100.



Slika 8. Hemijske strukture anjonskog (SDS), katjonskog (CTAB) i nejonskog (TX 100) surfaktanta.

1.4.3. Uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na molekulske osobine farmakološki aktivnih supstanci

Micele nisu samo organizovani agregati surfaktanata jer hidrofobne i elektrostatičke interakcije snažnim uticajem određuju prirodu različitih tipova micelarnih formacija.¹²⁴⁻¹²⁷ S obzirom na amfilne osobine molekula surfaktanata i njihov afinitet prema vodi i nepolarnim organskim rastvaračima, surfaktanti ispoljavaju solubilizirajući efekat na jedinjenja koja su slabo rastvorljiva u vodi jer omogućavaju njihovo akumuliranje u višim koncentracijama u micelarnim formacijama.¹²⁸ Na taj način, surfaktanti često obezbeđuju rastvorljivost i povećavaju apsorpciju slabo rastvorljivih lekova nakon oralne primene.¹²⁹ Surfaktanti su endogeno prisutni u

gastrointestinalnom traktu, kao što su soli žučnih kiselina, koje su odgovorne za proces digestije i apsorpcije lipida, ali imaju i važnu ulogu u solubilizaciji lipofilnih lekova. Surfaktanti se koriste i kao ekscipijensi u doziranim farmaceutskim oblicima, na čemu se zasniva jedan od osnovnih tehnoloških pristupa kojim se povećava rastvorljivost lekova slabo rastvorljivih u vodi. Iznad kritične micelarne koncentracije, u interakciji sa surfaktantima, slabo rastvorljivi lekovi se mogu inkorporirati u unutrašnjost micle i, osim značajnog povećanja rastvorljivosti, može doći do smanjenja slobodne frakcije leka dostupne za prolaz kroz biološke membrane.¹³⁰⁻¹³⁸

Pokazalo se da surfaktanti različitog naelektrisanja mogu povećati, smanjiti ili ne ispoljavati uticaj na membransku permeabilnost, što zavisi od molekulskih osobina ispitivanih lekova. Na hidrofilne lekove koji se slabo apsorbuju nakon oralne primene, surfaktanti mogu uticati tako što povećavaju intestinalnu membransku permeabilnost, što se objašnjava povećanjem paracelularnog transporta i može indukovati potencijalno toksične efekte. Sa druge strane, kod lipofilnih lekova sa izraženom transcelularnom membranskom permeabilnošću, surfaktanti mogu izazvati smanjenje slobodne frakcije leka, a posledično i smanjenje intestinalne permeabilnosti.¹³⁹

Inkorporiranje lekova u micelarne agregate može dovesti do promene njihovih molekulskih osobina. Važan efekat micelarnih rastvora je i uticaj na brzinu reakcije, kao i prirodu nastalih proizvoda. Pokazalo se da miclele mogu modifikovati spektralne parametre jedinjenja, izazvati povećanje intenziteta i pomeranje apsorpcionih maksimuma.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Osim što mogu ubrzati ili inhibirati reakcione procese, eksperimentalno je potvrđen i uticaj surfaktanata na pomeranje protolitičkih kiselinsko-baznih ravnoteža, usled različitih elektrostatičkih, hidrofobnih i drugih interakcija u micelarnom mikrokruženju u koje se uključuju jonizujući centri lekova.¹⁴⁴⁻¹⁵³ Intenzitet efekta i smer pomeranja ravnoteže, mogu biti povezani sa osobinama surfaktanta i prirodom jonizujućeg centra, tako da anjonski surfaktanti sa negativno naelektrisanom površinom micela imaju veći uticaj na promenu pK_a vrednosti, dok je jonizacija kiselih grupa osetljivija na prisustvo micela, u odnosu na jonizaciju baznih grupa. Međutim, usled složenosti interakcija i strukture molekula lekova, promene u složenim sistemima protolitičkih ravnoteža nemoguće je predvideti i opisati bez eksperimentalnog ispitivanja.¹⁵⁴⁻¹⁵⁸

1.4.4. Osobine micelarnih rastvora surfaktanata kao simulirajućih sistema bioloških membrana

Osobine micela, kao agregacionih formacija surfaktanata, su dobro poznate i proučene na molekulskom nivou, zbog čega se micelarni rastvori surfaktanata primenjuju u savremenim istraživanjima sa ciljem da oponašaju osnovne funkcije ćelijskih membrana.¹⁵⁹ Biološke membrane imaju presudan značaj u organizaciji živog sveta jer regulišu transport i propustljivost endogenih i egzogenih jedinjenja i uključuju se u procese biosinteze, prenosa energije i informacija, kao i ćelijskog prepoznavanja.¹⁶⁰ Dugogodišnja istraživanja pokazala su da kompleksnost strukture i funkcije biomembrana ne mogu biti praktično reprodukovane jedinstvenim model - sistemom, ali da se suštinske funkcije, uključujući osmotsku aktivnost, permeabilnost, fluidnost i mobilnost, mogu pojednostavljeno simulirati. U te svrhe najčešće se koriste micelarni rastvori surfaktanata, upravo zbog mogućnosti inkorporiranja drugih molekula i sposobnosti podele prostora.^{161,162}

1.4.5. Značaj ispitivanja fizičko-hemijskih osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata

Farmakološka aktivnost i biotransformacija lekova su deo složenih procesa u biosredini u koje se molekuli lekova uključuju posredstvom svojih funkcionalnih grupa. Da bi nakon oralne primene stigao do ciljnog mesta dejstva, lek dolazi u kontak sa mnogim biomolekulima. Ponašanje lekova u fiziološkim uslovima, koje se predviđa samo na osnovu fizičko-hemijskih parametara definisanih isključivo za vodeni rastvor, može se značajno razlikovati od očekivanog jer su fiziološki uslovi ekstremno složeni. Na očekivane procese jonizacije ili izomerizacije lekova u fiziološkim uslovima, mogu uticati i drugi molekuli prisutni u telesnim tečnostima i na površini ćelijskih membrana. Kao što je napomenuto, ne postoji idealni model ćelijskih membrana, koji u potpunosti odražava svu njihovu složenost, ali kao pojednostavljeni sistemi, koji ispunjavaju osnovne funkcije biomembrana, primenjuju se micelarni rastvori surfaktanata.¹⁶³⁻¹⁷⁰ Proces micelizacije zasniva se na hidrofobnim, elektrostatičkim, sternim, *Van der Waals*-ovim interakcijama i građenju vodoničnih veza. Ovakve interakcije se na

molekulskom nivou odvijaju i u uslovima biosredine. Zato su za predviđanje biološkog ponašanja i farmakoloških osobina lekova relevantniji podaci koji se dobijaju ispitivanjem fizičko-hemijskih osobina farmakološki aktivnih supstanci u prisustvu rastvora surfaktanata. Njihovo prisustvo može promeniti ne samo brzinu i proizvode reakcije, već i jonizaciju i stereohemiju¹⁷¹⁻¹⁷⁹ u odnosu na one utvrđene u vodenom rastvoru. Kiselinско-bazne ravnoteže lekova ispituju se u prisustvu katjonskih, anjonskih i nejonskih surfaktanata da bi se predvidela jonizacija u fiziološkim uslovima. Od stepena jonizacije u biosredini zavisi rastvaranje leka u telesnim tečnostima, apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta, transport kroz biološke membrane i interakcije sa ciljnim mestom dejstva.¹⁸⁰⁻²⁰⁰

Poznato je da ACE inhibitori ostvaruju stereoselektivnu interakciju sa enzimom, ali još uvek se ne zna da li postoji stereoselektivnost u interakciji sa hepatičnom esterazom koja katalizuje hidrolizu *pro drug* formi ovih jedinjenja.²⁰¹ Proučavanjem interakcija ACE inhibitora sa surfaktantima može se steći bolji uvid u mehanizme koji određuju efekte biosredine na fizičko-hemijske osobine ovih lekova i njihovo ponašanje u fiziološkim uslovima. Ispitivanje osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata omogućava racionalniji dizajn lekova i primenu surfaktanata u razvoju doziranih farmaceutskih oblika kao i predviđanje njihove efikasnosti i bezbednosti.

1.5. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina farmakološki aktivnih supstanci primenom molekulskog modeliranja

Fizičko-hemijska karakterizacija lekova se zasniva na eksperimentalnim određivanjima, ali se molekulski parametri sve više ispituju primenom teorijskih metoda i molekulskog modeliranja. Razvoj teorijskih metoda računarske hemije omogućio je primenu molekulskog modeliranja u ispitivanju strukturnih osobina, molekulske dinamike i termodinamike ispitivanih jedinjenja u analitičkim sistemima i biosistemima. Podaci dobijeni molekulskim modeliranjem predstavljaju značajnu smernicu u planiranju eksperimentalnih postupaka i u analizi eksperimentalno dobijenih rezultata.²⁰² Metodama molekulskog modeliranja, koje opisuju ponašanje molekula u statičkim i dinamičkim uslovima, mogu se dobiti informacije o:

- geometriji i obliku molekula (dužina veze, veličina uglova i diedralnih uglova);
- energiji molekula i prelaznim stanjima (što može ukazati na razlike u stabilnosti izomera i brzini odvijanja reakcije);
- hemijskoj reaktivnosti (na osnovu podataka o delovima molekula u kojima je raspoređeno naelektrisanje i potencijalnim elektrofilnim i nukleofilnim mestima, može se predvideti na koji će se način odvijati reakcija sa različitim tipovima elektrofilnih i nukleofilnih molekula);
- IR, UV i NMR spektrima (njihovim izračunavanjem se može pojednostaviti identifikacija nepoznatih molekula).²⁰³

Posebno značajan za farmaciju je razvoj tehnika molekulskog modeliranja koji je omogućio: izračunavanje fizičko-hemijskih parametara analiziranih jedinjenja, ispitivanje interakcije liganda sa različitim biomolekulima, ispitivanje katalitičke aktivnosti enzima, predviđanje stabilnosti proteina, definisanje konformacionih promena liganada koje utiču na biološku aktivnost. Razvoj teorijskih metoda koje analiziraju interakciju liganda i enzima omogućio je određivanje mehanizma dejstva i dizajn novih lekova.²⁰⁴

1.5.1. Metode molekulskog modeliranja

U molekulskom modeliranju za izračunavanje energije molekula mogu se koristiti različite teorije zasnovane na matematičkim jednačinama koje opisuju položaj i ponašanje elektrona i jezgara. Izbor metode molekulskog modeliranja zavisi od različitih faktora, kao što su broj podataka, složenost ispitivanog sistema i tačnost dobijenih rezultata.

Ab initio izračunavanja se zasnivaju na *Schrodinger*-ovoj jednačini koja fundamentalno opisuje ponašanje elektrona u molekulu i njenim rešavanjem se dobijaju informacije o energiji i talasnoj funkciji koja definiše elektronsku distribuciju i ukazuje na polarnost molekula. Međutim, *Schrodinger*-ova jednačina se ne može egzaktno rešiti za molekul sa više od jednog elektrona, što zahteva primenu aproksimacije. Najčešće se koristi *Born–Oppenheimer*-ova aproksimacija, koja polazi od pretpostavke da su jezgra atoma fiksirana u odnosu na elektrone u toku proračuna i da je brzina njihovog kretanja

zanemarljiva u odnosu na brzinu elektrona. Usled toga, jedini konstantni geometrijski parametri molekula su koordinate jezgra. Za *ab initio* metode se može istaći da su precizne, ali spore i da su pogodne za manje sisteme koji se sastoje od nekoliko desetina atoma. Najčešći oblik *ab initio* proračuna je pomoću različitih baznih setova (STO-3G, 3-21G, 6-31G) u okviru *Hartree–Fock* (HF) metode u programu *Gaussian*.

Empirijski i semiempirijski proračuni se takođe zasnivaju na primeni aproksimativnog rešavanja *Schrodinger*-ove jednačine i HF principima, uz prilagođavanje eksperimentalnim podacima, na osnovu parametrizacije. Primena empirijskih parametara omogućava razmatranje efekata elektronske korelacije, ali uz više aproksimacija, što ove metode čini manje preciznim, ali bržim u odnosu na *ab initio* metode.

Molekulsko-mehaničke metode polaze od modela molekula koji se posmatra kao skup atoma povezanih hemijskim vezama. Ako su poznate vrednosti dužine veza, uglova između njih i energije koja je potrebna za istežanje i savijanje veza, može se izračunati energija datog molekula. Geometrija molekula se menja sve dok se ne dobije geometrijska konfiguracija molekula sa najnižom potencijalnom energijom u procesu koji predstavlja geometrijsku optimizaciju molekula. Proces optimizacije, u kome se definiše ravnotežno stanje, neophodno je primeniti pre svih daljih proračuna kako bi se obezbedila njihova validnost. Molekulsko-mehaničke metode su jednostavne, relativno brze i pogodne za primenu na velikim sistemima koji se sastoje i od nekoliko hiljada atoma.²⁰²⁻²⁰⁴

Density functional theory (DFT) metode pripadaju grupi kvantno-mehaničkih metoda jer se baziraju na aproksimativnom rešavanju *Schrodinger*-ove jednačine koja ne uzima značajno u obzir talasnu funkciju, već se direktno oslanja na teoriju elektronske gustine. Zbog osobina elektronske gustine koje se jednostavno mogu matematički definisati, DFT metode se smatraju značajnom alternativom metodama koje se zasnivaju isključivo na talasnoj funkciji, jer je elektronska gustina samo funkcija položaja, koju definišu tri prostorne koordinate (x, y, z), kao tri promenljive. Talasna funkcija molekula sa n elektrona je funkcija $4n$ promenljive (tri prostorne i jedne koja opisuje rotaciju) za svaki elektron. Sa druge strane, bez obzira na broj elektrona u molekulu, elektronska gustina ostaje samo funkcija tri promenljive. DFT metode se zasnivaju na *Hohenberg–Kohn*-ovim teoremama koje ukazuju da ako se odredi

elektronska gustina, na osnovu nje se mogu predvideti stuktura, energija i druge osobine molekula. Najčešća izračunavanja primenom DFT metoda izvode se na B3LYP nivou primenom različitih baznih setova (STO-3G(d,p)/3-21G(d)/6-31G(d,p)). DFT metode imaju prednost u odnosu na kvantno-mehaničke metode, koje se zasnivaju na talasnoj funkciji, jer omogućavaju dobijanje rezultata u kraćem vremenskom intervalu, na osnovu manjeg broja podataka, uz zadovoljavajuću tačnost i preciznost.²⁰⁵ Literaturni podaci o primeni DFT metoda ukazuju da ne postoji metoda (bazni set) koja je opšte prihvaćena kao najbolja, jer se za svaku osobinu ispitivanog molekula mogu istaći jedan ili više deskriptora koji je bolje determinišu od ostalih.^{206, 207}

1.5.2. Izračunavanje fizičko-hemijskih parametara farmakološki aktivnih supstanci u programu Gaussian primenom DFT metoda

Programski paket koji se najčešće koristi za molekulske modeliranje je *Gaussian*²⁰⁸ jer se po broju i raznovrsnosti implementiranih metoda smatra najbogatijim paketom za molekulske modeliranje. U programu *Gaussian* integrisane su različite molekulske-mehaničke, semiempirijske, *ab initio* i hibridne metode.²⁰⁹ Kao što je istaknuto, DFT metode su primarno usmerene na elektronsku gustinu, a jednodeterminantna talasna fukcija ima samo pomoćnu ulogu. Za proračun energija primenom DFT metoda u *Gaussian*-u integrisani su različiti korelacijski i hibridni funkcionalni postupci u kojima se molekul fragmentiše na grupe atoma, unutar kojih se proračun izvodi na različitim nivoima složenosti i preciznosti. Za osnovnu grupu atoma, primenjuje se proračun na najvišem nivou složenosti, dok se za svaku sledeću grupu atoma, koja ujedno obuhvata i sve prethodne, može primeniti manje tačna i zahtevna metoda. Ovakav pristup pogodan je za proučavanje biomolekula, u kojima se atomske interakcije mogu hijerarhijski determinisati. Nakon geometrijske optimizacije struktura, primenom DFT metoda u *Gaussian* programu mogu se računati različiti molekulske deskriptori (topološki, geometrijski, elektronski, termodinamički, sterna i drugi), kojima se mogu proceniti analitičke osobine i predvideti farmakološka aktivnost lekova.²¹⁰ Iz svega navedenog se može zaključiti da se primenom metoda molekulske modeliranja mogu objasniti eksperimentalno dobijeni podaci, ali i predviđati osobine i ponašanje molekula u eksperimentalno nedostupnim uslovima.²⁰²

2. CILJ RADA

U literaturi nema potpunih podataka o pK_a vrednostima ACE inhibitora koje definišu jonizaciju u vodenom rastvoru, kao ni podataka o proučavanju protolitičkih ravnoteža i diastereoizomerizacije ovih lekova u prisustvu surfaktanata. Uzevši u obzir da se očekivane kiselinsko-bazne ravnoteže i ravnoteža izomerizacije mogu razlikovati u fiziološkim uslovima u odnosu na vodeni rastvor, kao i primenu micelarnih rastvora surfaktanta kao simulirajućih sistema biomembrana, ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Određivanje pK_a vrednosti devet ACE inhibitora (kaptopril, cilazapril, enalapril, lizinopril, fosinopril, perindopril, ramipril, kvinapril i zofenopril) primenom potenciometrijske titracije.
 - Evaluacija preklopljenih kiselinsko-baznih ravnoteža, na osnovu potenciometrijskih podataka, primenom kompjuterskog programa Hyperquad za izračunavanje pK_a vrednosti.
 - Određivanje pK_a vrednosti u složenim sistemima dve komponente (enalapril-maleat i perindopril-erbumin), kada je u rastvoru prisutno više supstanci sa jonizujućim centrima.
 - Određivanje pK_a vrednosti, jedinjenja slabo rastvorljivih u vodi, u smešama vode i odgovarajućeg organskog rastvarača, u različitim odnosima, i izračunavanje vrednosti koja odgovara vodenoj sredini ekstrapolacijom na 0 % organskog rastvarača.
- Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti ACE inhibitora u prisustvu micelarnih rastvora surfaktanata, anjonskog (SDS), katjonskog (CTAB) i nejonskog (TX-100)
 - Procena uticaja micelarnih rastvora surfaktanata na protolitičke ravnoteže definisane u vodenom rastvoru.
 - Predviđanje tipova interakcija sa micelama različitog naelektrisanja odgovornih za uticaj na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora.
- Ispitivanje uticaja surfaktanata na ravnotežu geometrijske izomerizacije ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom.

- Definisanje optimalnih hromatografskih uslova za razdvajanje diastereoizomera, nakon uspostavljanja ravnoteže u rastvorima bez i u prisustvu surfaktanata.
 - Identifikacija pikova i redosleda eluiranja diastereoizomera.
 - Ispitivanje hromatografskog ponašanja izomera strukturno sličnih jedinjenja.
 - Procena osetljivosti ravnoteže geometrijske izomerizacije ACE inhibitora u prisustvu micelarnih rastvora surfaktanata različitog naelektrisanja.
- Teorijsko ispitivanje redosleda eluiranja (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera primenom DFT metoda.
 - Geometrijska optimizacija (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera ispitanih ACE inhibitora primenom B3LYP/6-31G (d,p) metoda u okviru *Density Functional Theory* (DFT), pomoću *Gaussian 09* programa.
 - Izračunavanje molekulskih deskriptora parova diastereoizomera primenom ChemBio3D Ultra 13.0 i Dragon programa.
 - Procena razlike u hidrofobnosti diastereoizomera upoređivanjem rezultata eksperimentalne i teorijske studije.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Oprema

- Sistem za titraciju 798 MPT Titrino Metrohm (Herisau, Švajcarska) sa kombinovanom elektrodom (LL unitrode Pt1000, Metrohm)
- HPLC uređaj Agilent Technologies 1200 Series system (Santa Clara, CA, USA) binarna pumpa; 20 µl manuelni injektor Rheodyne; 1100A UV detektor
- Kolona Chromolith Performance RP-18e column; 100 mm x 4,6 mm; 2 µm (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Analitička vaga Sartorius (Sartorius AG, Goettingen, Nemačka)
- Ultrazvučno kupatilo, J.P. Selecta (Barselona, Španija)
- TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka)
- Sistem za održavanje temperature Polistat CC2 (Huber, Nemačka)

3.2. Hemikalije

- Standardi ispitivanih supstanci: kaptopril ((2*S*)-1-[(2*S*)-2-metil-3-sulfanilpropanoil]pirolidin-2-karboksilna kiselina), cilazapril ((1*S*,9*S*)-9-[(2*S*)-(1-ethoksi-1-okso-4-fenilbutan-2-il)amino]-10-okso-oktahidro-1*H*-piridazino [1,2-*a*][1,2]diazepin-1-karboksilna kiselina), enalapril-maleat ((2*S*)-1-[(2*S*)-2-[[2*S*)-1-etoksi-1-okso-4-fenil-2-butil]amino]propanoil]pirolidin-2-karboksilna kiselina, maleat), fosinopril-natrijum (natrijum-(2*S*,4*S*)-4-cikloheksil-1-(2-{[2-metil-1-(propanoiloksi)propoksi](4-fenilbutil)fosforil} acetil)pirolidin-2-karboksilat), lizinopril-dihidrat ((2*S*)-1-[(2*S*)-6-amino-2-[(1*S*)-1-karboksi-3-fenilpropil]amino]heksanoil]pirolidin-2-karboksilna kiselina, dihidrat), perindopril-erbumin (terc-butil-amonijum-(2*S*,3*aS*,7*aS*)-1-[(2*S*)-2-[[2*S*)-1-ethoksi-1-okso-2-pent-il]amino]propanoil]-oktahidro-1*H*-indole-2-karboksilna kiselina), ramipril ((2*S*,3*aS*,6*aS*)-1-[(2*S*)-2-[[2*S*)-1-etoksi-1-okso-4-fenil-2-butil]amino]propanoil]oktahidro-cikloheksil-ciklopenta[b]pirol-2-karboksilna kiselina), kvinapril-hidrohlorid ((3*S*)-2-[(2*S*)-2-[[2*S*)-1-etoksi-1-okso-4-

fenilbutan-2-il]amino }propanoil]-1,2,3,4-tetrahidroizohinolin-3-karboksilna kiselina, hidroklorid), zofenopril-kalcijum (kalcijum-(2*S*,4*S*)-1-((*S*)-3-(benzoiltio)-2-metilpropanoil)-4-(feniltio)pirolidin-2-karboksilat), maleinska kiselina ((*Z*)-1,2-etilen-dikarboksilna kiselina), (dobijeni od Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd, Srbija)

- Natrijum-dodecilsulfat (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Cetiltrimetilamonijum-bromid (Acros Organic, Geel, Belgija)
- Triton X 100 (Acros Organic, Geel, Belgija)
- Natrijum-hidroksid Titrisol[®] (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Hlorovodonična kiselina Titrisol[®] (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Acetonitril HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Standardni rastvor pufera pH 4,005 (Radiometer, Villeurbanne Cedex, Francuska)
- Standardni rastvor pufera pH 7,000 (Radiometer, Villeurbanne Cedex, Francuska)
- Standardni rastvor pufera pH 9,180 (Radiometer, Villeurbanne Cedex, Francuska)
- Kalijum-hidrogenftalat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hlorid (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dikalijum-hidrogen fosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- 85 % ortofosforna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)

3.3. Računarski programi

- Hyperquad software 2008
- OriginPro 8 SRO, MA, SAD, 2007
- Microsoft Office Excel, Microsoft Corporation, SAD, 2003
- ChemDrawUltra 7.0.0, Cambridge Soft Corporation, MA, SAD, 2002
- Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, SAD, 2009

- Dragon 6.0 program, Talete srl, DRAGON (Software for Molecular Descriptor Calculation), Version 6.0 – 2010
- Cambridge Soft Corporation. 2012. ChemBio3D Ultra, Version 13.0 Cambridge, MA, USA

3.4. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti ACE inhibitora

3.4.1. Standardizacija rastvora natrijum-hidroksida i hlorovodonične kiseline

Za standardizaciju rastvora natrijum-hidroksida korišćena je primarna standardna supstanca kalijum-hidrogenftalat. Koncentracija standardnog rastvora natrijum-hidroksida određena je potenciometrijski, na osnovu tri nezavisne titracije rastvora kalijum-hidrogenftalata. Standardizovan rastvor natrijum-hidroksida korišćen je za standardizaciju rastvora hlorovodonične kiseline.

3.4.2. Određivanje korekcionog faktora A

Za preračunavanje izmerenih pH vrednosti u p_{cH} vrednosti ($p_{cH} = -\log [H^+]$) eksperimentalno je određen korekциони faktor A. Vrednosti korekcionog faktora A za vodeni rastvor i smeše metanol - voda (40%, 45%, 50% i 55%), određene su titracijom rastvora HCl ($2,518 \times 10^{-3}$ M – $2,560 \times 10^{-3}$ M; I = 0,1 M NaCl) standardnim rastvorom NaOH (0,09920 M - 0,09970 M) (Tabele 11-15 u Prilogu). Na osnovu izmerenih pH vrednosti izračunate su p_{cH} vrednosti primenom relacije $p_{cH} = pH - A$.

3.4.3. Priprema micelarnih rastvora surfaktanata

Rastvor anjonskog surfaktanta natrijum-dodecilsulfata koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl): izmereno je 2,8838 g natrijum-dodecilsulfata i 5,8440 g natrijum-hlorida, preneto u odmerni sud od 1000 ml i dopunjeno do crte redestilovanom vodom.

Rastvor katjonskog surfaktanta cetiltrimetilamonijum-bromida koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl): izmereno je 3,6445 g cetiltrimetilamonijum-bromida i 5,8440 g natrijum-hlorida, preneto u odmerni sud od 1000 ml i dopunjeno do crte redestilovanom vodom.

Rastvor nejonskog surfaktanta 4-oktilfenolpolietoksilata koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl): izmereno je 6,06 ml 4-oktilfenolpolietoksilata i 5,8440 g natrijum-hlorida, preneto u odmerni sud od 1000 ml i dopunjeno do crte redestilovanom vodom.

3.4.4. Priprema rastvora za potencimetrijsko određivanje pK_a vrednosti

Standardni rastvori hlorovodonične kiseline (0,1007 M - 0,1024 M) pripremljeni su prenošenjem sadržaja ampule Titrisol[®] u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem do crte redestilovanom vodom. Standardni rastvori natrijum-hidroksida (0,09920 M - 0,09970 M) pripremljeni su prenošenjem sadržaja ampule Titrisol[®] u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem do crte redestilovanom vodom bez ugljen-dioksida.

3.4.5. Potencimetrijsko određivanje pK_a vrednosti bez i u prisustvu surfaktanata

pK_a vrednosti ACE inhibitora određene su potencimetrijski, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata (SDS, CTAB i TX 100). Za merenje pH korišćena je elektroda, regularno kalibrisana standardnim rastvorima pufera (pH 4,005; 7,000 i 9,180).^{211,212} Eksperimentalno je utvrđeno da dodatak surfaktanata u ispitivanoj koncentraciji nema značajnog uticaja na pH vrednost pufera (promene su bile manje od $\pm 0,01$ jedinice).

Potencimetrijske titracije izvedene su na temperaturi 25°C i pri konstantnoj jonskoj sili 0,1 M (NaCl). U 39 ml rastvora ispitivanih ACE inhibitora koncentracije 10^{-3} M dodato je 0,5 - 1 ml rastvora HCl (0,1007 M - 0,1024 M) i titrovano standardnim rastvorom NaOH (0,09920 M - 0,09970 M) alikvotima od 0,02 ml. HCl je dodavana u titrovane rastvore da bi se suzbila disocijacija karboksilne grupe.

3.4.6. Potenciometrijsko određivanje pK_a vrednosti fosinopрила u smešama metanol - voda

Jedini izuzetak u odnosu na protokol primenjen u izvođenju potenciometrijskih titracija je određivanje pK_a vrednosti fosinopрила bez prisustva surfaktanata. Zbog slabe rastvorljivosti u vodi, i taloženja supstance u rastvoru koncentracije 10^{-3} M nakon dodatka 1 ml HCl, nije bilo moguće direktno odrediti pK_a vrednost fosinopрила u odsustvu surfaktanata.^{75,213,214} Praktične pK_a vrednosti (pK_a^*) određene su titracijom fosinopрила u smešama metanol - voda u različitim odnosima (45% - 55%, m/m). Ekstrapolacijom pK_a^* vrednosti na 0% metanola, izračunata je pK_a vrednost fosinopрила.

3.5. Ispitivanje uticaja surfaktanata na izomerizaciju ACE inhibitora primenom reverzno fazne tečne hromatografije

Rastvori 0,200 – 2,000 mg/ml ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom (kaptopril, enalapril, lizinopril, perindopril i ramipril) pripremljeni su rastvaranjem svake supstance u vodi za HPLC, bez i u prisustvu surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100) u koncentraciji 0,01 M.

U cilju ispitivanja uticaja surfaktanata na ravnotežu izomerizacije, svi uzorci su pripremljeni pod istim uslovima i čuvani na sobnoj temperaturi najmanje 1 h, do uspostavljanja ravnoteže.

Za dobijanje vremenski zavisnih hromatograma, rastvori ACE inhibitora pripremljeni su u vodi za HPLC i analizirani odmah nakon rastvaranja, a zatim u vremenskim intervalima od 2 do 6 minuta.

3.5.1. HPLC sistem

Hromatografska analiza izvedena je na uređaju Agilent Technologies 1200 Series system (Santa Clara, CA, USA), koji sadrži degazer, binarnu pumpu i detektor. Svi uzorci su uvođeni u sistem injektovanjem kroz Rheodyne injekcionu petlju, u

zapremeni 20 μ l. Diastereoizomeri ACE inhibitora razdvojeni su na koloni Chromolith Performance RP-18e (100 mm \times 4,6 mm, Merck), pri protoku 2 ml/min (kaptopril, lizinopril) ili 4 ml/min (enalapril, perindopril, ramipril) i različitom sastavu mobilne faze (acetonitril i 20 mM kalijum-fosfatni pufer pH 7). Razdvajanja su izvedena na temperaturi kolone 18°C i signali detektovani na talasnoj dužini 210 nm.

3.6. Optimizacija strukture parova diastereoizomera i izračunavanje molekulskih deskriptora

Prolinska peptidna veza u strukturama ispitivanih ACE inhibitora podešena je u odgovarajuću (*Z*)- ili (*E*)-orijentaciju pre geometrijske optimizacije. U skladu sa eksperimentalno određenim pK_a vrednostima ($pK_a(\text{COOH})=1,43-3,48$ i $pK_a(\text{NH})=5,41-9,99$) oba izomerna oblika svih ispitivanih jedinjenja, pri definisanim hromatografskim uslovima (fosfatni pufer pH 7), zastupljena su uglavnom u obliku anjona.

Geometrijska optimizacija dominantnih jonskih oblika (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera ispitivanih ACE inhibitora, izvedena je primenom B3LYP/6-31G (d,p) metoda^{215,216} u okviru *Density Functional Theory* (DFT), pomoću *Gaussian 09* programa.²⁰⁸ Molekulski deskriptori svih parova diastereoizomera optimizovanih u *Gaussian 09* programu, izračunati su primenom ChemBio3D Ultra 13.0²¹⁷ i Dragon programa.²¹⁸ Funkcija B3LYP sa baznim setom 6-31G (d,p)^{water} u vodenom rastvoru^{215,216} (*Polarizable Continuum Model*, PCM)²¹⁹ primenjena je za izračunavanje energije najviše popunjene molekulske orbitale (*Highest Occupied Molecular Orbital Energy*, HOMO), energije najniže nepopunjene molekulske orbitale (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital Energy*, LUMO), hemijskog potencijala (μ), elektronegativnosti (χ), otpornosti na transfer elektrona (*hardness*, η), hemijske reaktivnosti (*softness*, S), indeksa elektrofilnosti (ω), dipola i naelektrisanja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

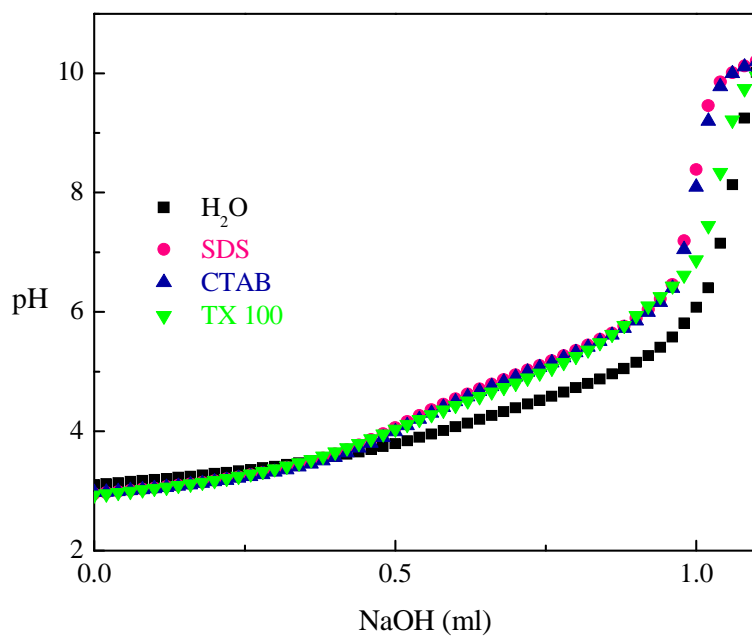
4.1. Ispitivanje uticaja surfaktanata na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora

4.1.1. Određivanje pK_a vrednosti ACE inhibitora

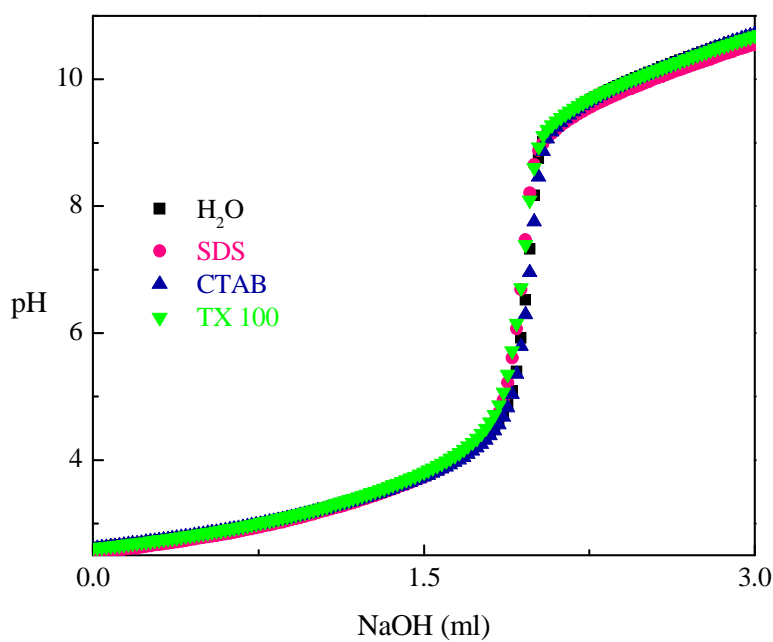
S obzirom na jonizujuće centre prisutne u hemijskoj strukturi, ispitivani ACE inhibitori se mogu podeliti na kiseline i amfolite (Slika 4). Fosinopril i zofenopril sadrže samo jedan jonizujući centar, terminalnu, prolinsku karboksilnu grupu i u vodenom rastvoru se ponašaju kao monoprotične kiseline. Pored karboksilne grupe, kaptopril sadži još jedan kiseli centar, sulfhidrilnu (tio) funkcionalnu grupu. Cilazapril, enalapril, kvinapril, ramipril i perindopril su amfoliti sa jednim kiselim (karboksilna grupa) i jednim baznim (sekundarna amino grupa) jonizujućim centrom. Lizinopril je složeni amfolit u čijoj su hemijskoj strukturi prisutne četiri jonizujuće grupe, dve karboksilne grupe (označene kao proksimalna i terminalna) i dve amino grupe (primarna i sekundarna).

Usled relativno dobre rastvorljivosti ispitanih ACE inhibitora (izuzev fosinopрила), pK_a vrednosti jonizujućih grupa bilo je moguće odrediti u vodenom rastvoru, primenom potenciometrijske titracije. Rastvori ACE inhibitora, koncentracije 10^{-3} M, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata (SDS, CTAB, TX 100), titrovani su standardnim rastvorom NaOH pri konstantnoj jonskoj sili (0,1 M NaCl) i temperaturi 25°C . U ispitivane rastvore, pre titracije, dodat je standardni rastvor HCl u cilju suzbijanja jonizacije karboksilne grupe i prevođenja svih jonizujućih centara u protonovanu formu. Odgovarajuće titracione krive prikazane su na Slikama 9-17. Eksperimentalni podaci prikazani su u Tabelama 16-24 u Prilogu.

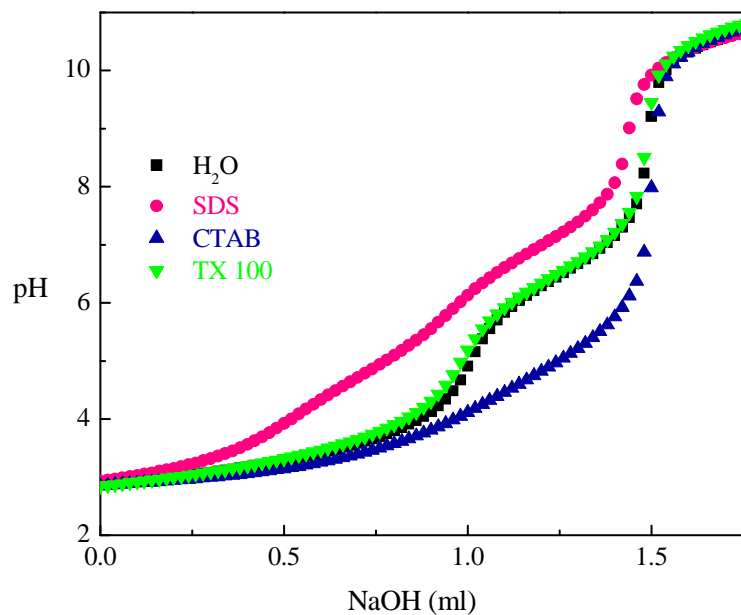
Koncentracija primenjenih rastvora surfaktanata bila je značajno iznad vrednosti odgovarajućih kritičnih micelarnih koncentracija, tako da se može zanemariti uticaj ostalih supstanci prisutnih u rastvoru, na kritičnu micelarnu koncentraciju.



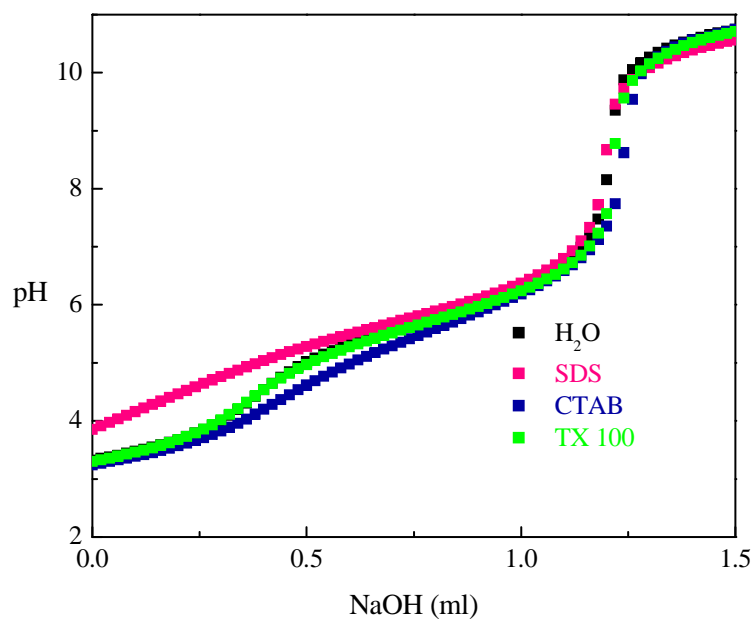
Slika 9. Potenciometrijske krive titracije rastvora zofenopрила bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.



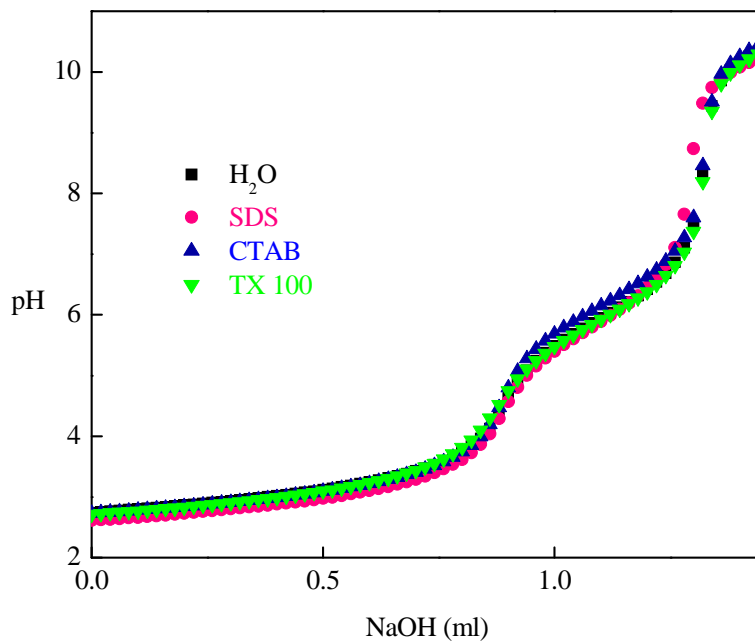
Slika 10. Potenciometrijske krive titracije rastvora kaptopрила, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.



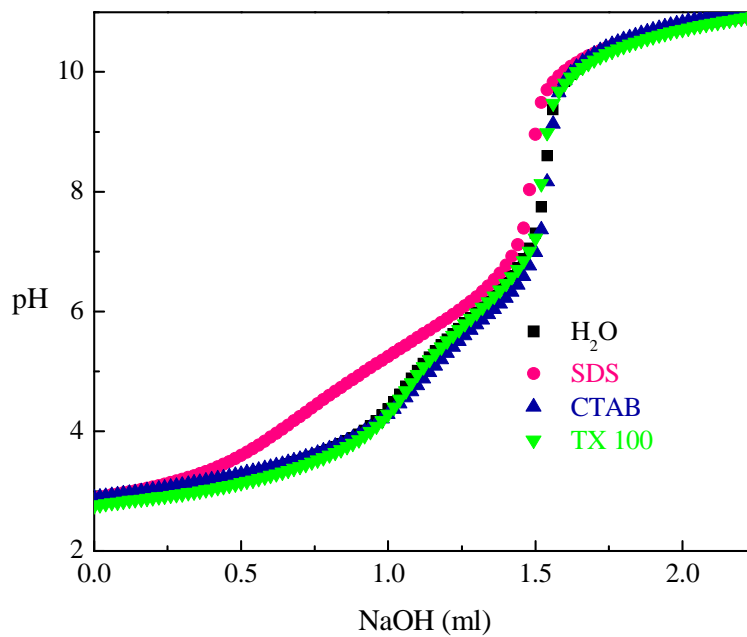
Slika 11. Potenciometrijske krive titracije rastvora cilazaprila, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.



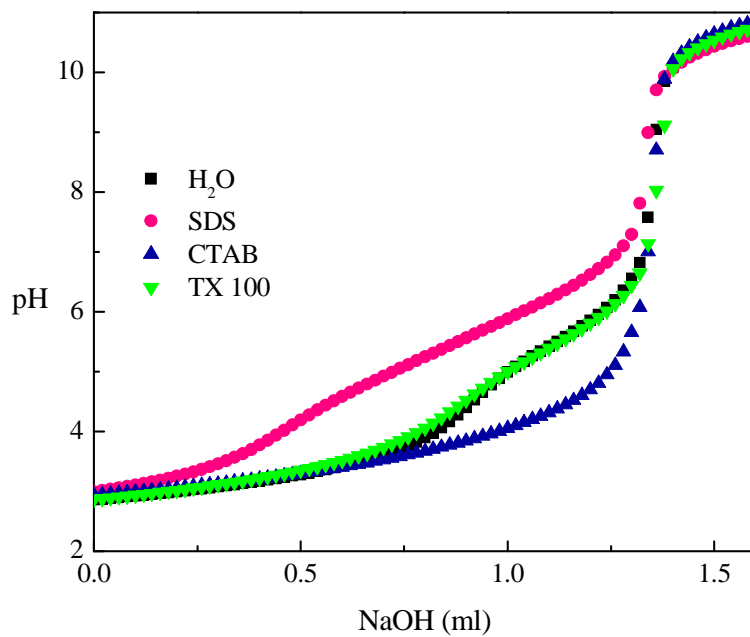
Slika 12. Potenciometrijske krive titracije rastvora enalapril-maleata, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.



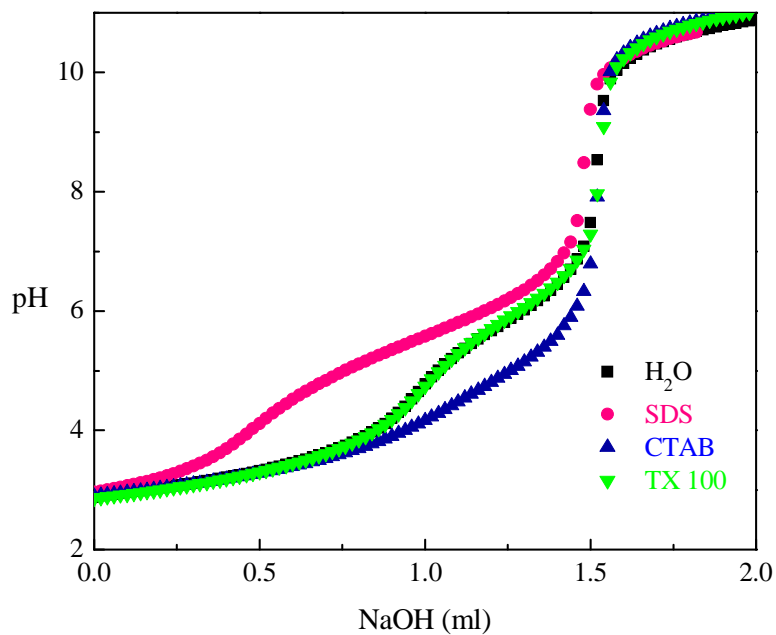
Slika 13. Potenciometrijske krive titracije rastvora maleinske kiseline, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I=0,1\text{ M}(\text{NaCl}), t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



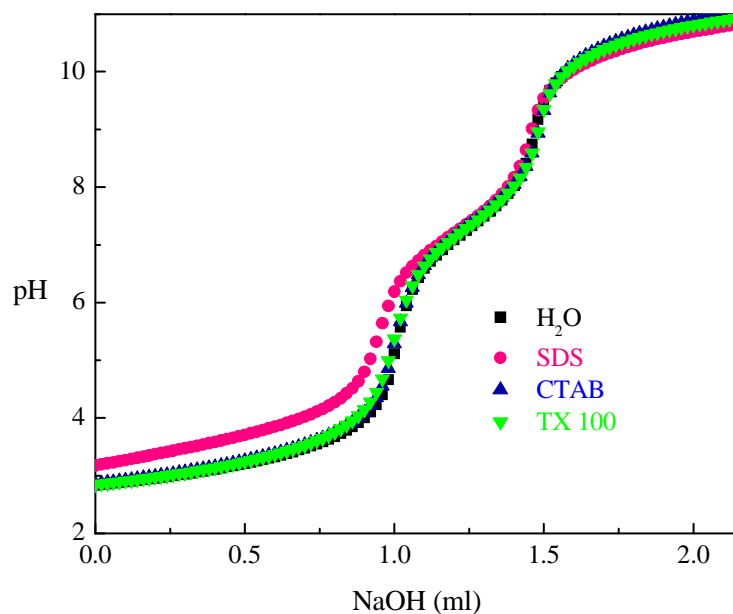
Slika 14. Potenciometrijske krive titracije rastvora perindopрила bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1\text{ M} (\text{NaCl}), t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 15. Potenciometrijske krive titracije rastvora kvinaprila, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.



Slika 16. Potenciometrijske krive titracije rastvora ramiprila, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.

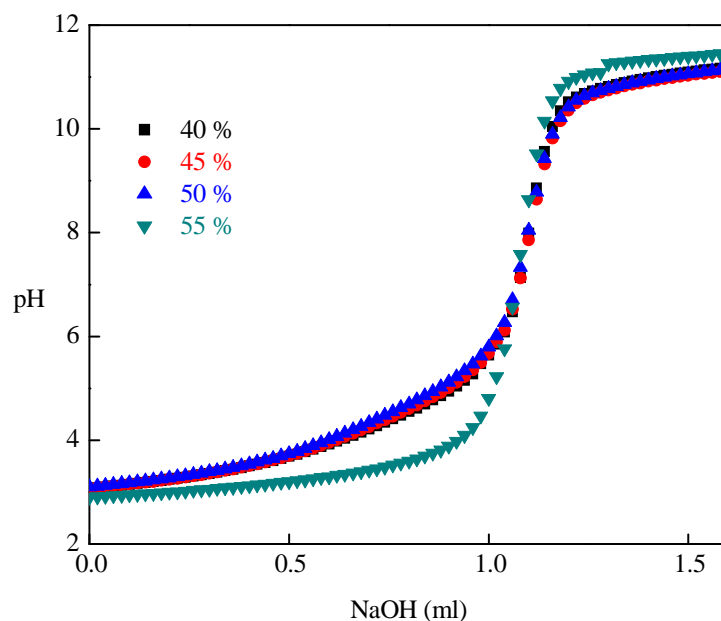


Slika 17. Potenciometrijske krive titracije rastvora lizinopрила, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata, titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1$ M (NaCl), $t = 25$ °C.

Kompjuterski program Hyperquad primenjen je za izračunavanje pK_a vrednosti na osnovu eksperimentalnih podataka dobijenih u potenciometrijskim titracijama (Slike 37-47 u Prilogu). Pored mogućnosti evaluacije preklopljenih kiselinsko-baznih ravnoteža pojedinačnih supstanci u rastvoru, Hyperquad pruža mogućnost određivanja pK_a vrednosti u kompleksnim sistemima sa više jedinjenja koja mogu da jonizuju.⁹⁸ Primena ovog programa je omogućila određivanje pK_a vrednosti enalapрила i perindopрила, na osnovu eksperimentalnih podataka dobijenih potenciometrijskom titracijom rastvora enalapril-maleata i perindopril-erbumina. U slučaju enalapril-maleata, pK_a vrednosti maleinske kiseline, nezavisno određene pod istim uslovima, korišćene su kao ulazni parametri za izračunavanje pK_a vrednosti enalapрила.

Fosinopril je ACE inhibitor sa fosfinatnom grupom i u odnosu na dikarboksilatne derivate u strukturi sadrži jedan ugljenikov atom više u nizu koji razdvaja prolinski azot i hidrofobni benzenov prsten. Ovakvim strukturnim modifikacijama u razvoju fosfinatnih derivata ACE inhibitora postignuta je bolja aktivnost, ali i veća lipofilnost, tako da fosinopril predstavlja najlipofilnije jedinjenje iz ove grupe lekova.²² Za razliku od ostalih ispitanih jedinjenja, fosinopril karakteriše slaba rastvorljivost u vodi koja dovodi do taloženja u rastvoru koncentracije 10^{-3} M, nakon dodatka rastvora HCl. Zbog slabe rastvorljivosti i taloženja u kiseloj sredini, nije moguće odrediti pK_a vrednost fosinoprila titracijom vodenog rastvora, bez prisustva surfaktanata, primenom protokola koji je definisan za ostale ACE inhibitore. U takvim slučajevima, ako se pojava taloga tokom titracije ne uzme u obzir, prilikom analize rezultata dobile bi se vrednosti koje ukazuju na veću kiselost kiselih, kao i manju baznost baznih funkcionalnih grupa, u odnosu na stvarne pK_a vrednosti.²¹³ Da bi se prevazišlo ovo ograničenje i odredila pK_a vrednost koja adekvatno definiše jonizaciju fosinoprila u vodi, bilo je potrebno izvesti titracije fosinoprila u smeši vode i organskog rastvarača različitog odnosa. Metanol je primenjen kao korastvarač jer je eksperimentalno utvrđeno da ispoljava najpribližniji solvatacioni efekat kao i voda.⁷⁵ U rastvorima bez prisustva surfaktanata, pK_a vrednosti fosinoprila (pK_a^*) određene su titracijom smeše vode i metanola u odnosima 40% - 55% (m/m) (Slika 18) i pK_a vrednost, koja odgovara „čistom“ vodenom rastvoru, izračunata je ekstrapolacijom na 0% metanola (Tabela 1, Slika 19).²¹⁴ Eksperimentalni podaci prikazani su u Tabeli 25 u Prilogu.

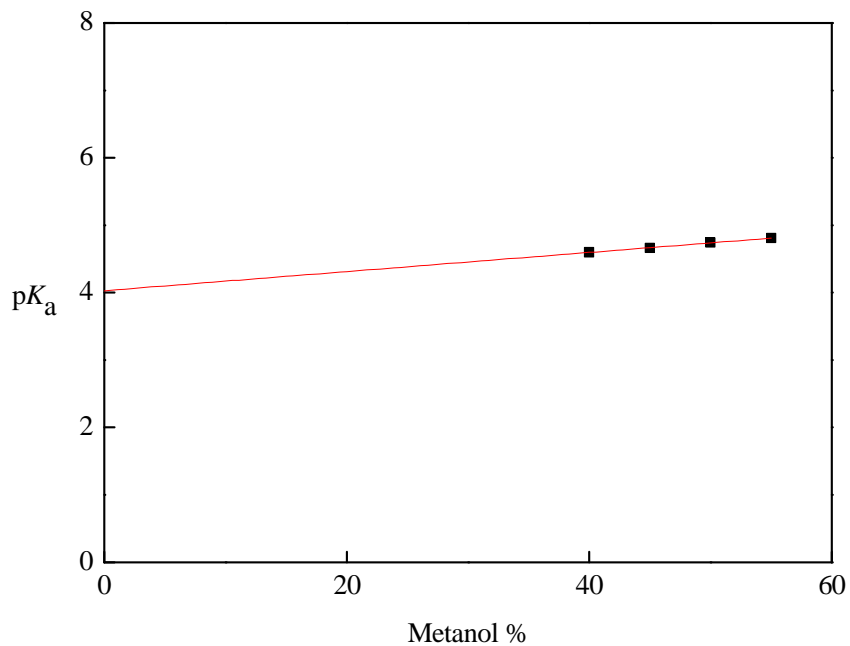
Potenciometrijske titracije rastvora fosinoprila u prisustvu surfaktanata sprovedene su po istom protokolu kao i kod ostalih ispitanih ACE inhibitora, jer je solubilizirajući efekat surfaktanata doprineo povećanju rastvorljivosti fosinoprila pri datim uslovima. Titracione krive rastvora fosinoprila, dobijene u prisustvu surfaktanata, prikazane su na Slici 20. Eksperimentalni podaci prikazani su u Tabeli 26 u Prilogu.



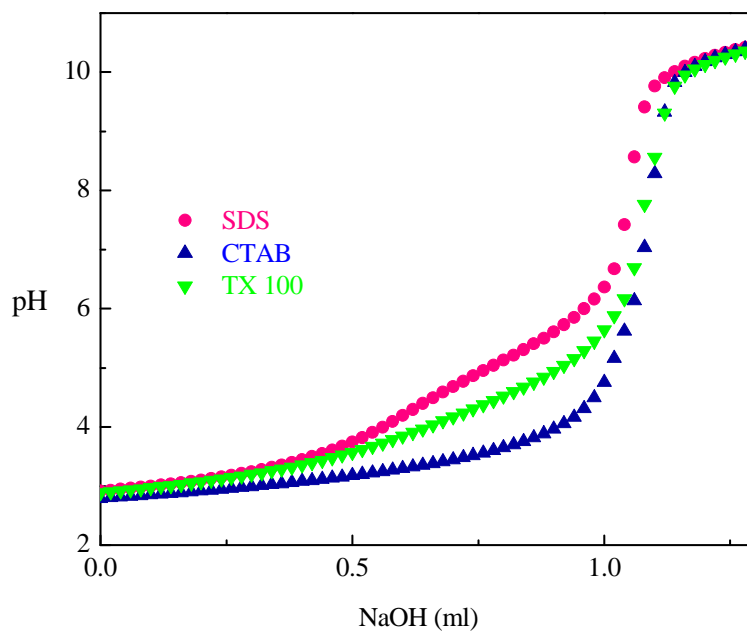
Slika 18. Potenciometrijske krive titracije rastvora fosinopril-natrijuma u smeši metanol – voda 40 % - 55 % (m/m) titrovanog standardnim rastvorom NaOH. $I = 0,1 \text{ M (NaCl)}$, $t = 25^\circ\text{C}$.

Tabela 1. pK_a vrednosti fosinopрила potentiometrijski određene u smešama vode i metanola u različitom odnosu. $I = 0.1 \text{ M (NaCl)}$ and $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Smeša metanol - voda % (m/m)	pK_a
40	4,60
45	4,66
50	4,74
55	4,81



Slika 19. Izračunavanje pK_a vrednosti fosinopрила ekstrapolacijom vrednosti određenih potenciometrijski, titracijom smeša metanol – voda 40% - 55% m/m.



Slika 20. Potenciometrijske krive titracije rastvora fosinopril-natrijuma u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata titrovanih standardnim rastvorom NaOH. $I=0,1$ M(NaCl), $t=25$ °C.

4.1.1.1. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene bez prisustva surfaktanata

Potenciometrijski određene pK_a vrednosti ACE inhibitora u vodenom rastvoru prikazane su u Tabeli 2. Za pK_a karboksilne grupe (pK_{a1} i pK_{a2} lizinopрила i pK_{a1} ostalih ACE inhibitora) određene konstante imaju vrednosti u opsegu 1,43 – 4,72. S obzirom na hemijsku strukturu lizinopрила u kojoj su prisutne dve karboksilne grupe, terminalna i proksimalna, pK_{a1} 1,43 može se pripisati proksimalnoj karboksilnoj grupi sa izraženijom kiselošću. Za pK_a sekundarne amino grupe (pK_{a2} za cilazapril, enalapril, kvinapril, perindopril i ramipril, i pK_{a3} za lizinopril) dobijene su vrednosti u opsegu 5,40 – 7,20. Najveće pK_a vrednosti određene su za primarnu amino grupu lizinopрила pK_{a4} 10,90 i sulfhidrilnu grupu kaptopрила pK_{a2} 9,99.

Uporedo sa potenciometrijski određenim konstantama, u Tabeli 2 prikazani su i literaturni podaci (eksperimentalno određene i izračunate pK_a vrednosti). Upoređivanjem se može zaključiti da postoji dobro slaganje pK_a vrednosti kaptopрила i enalapрила određenih u ovom radu sa eksperimentalno određenim vrednostima iz literature. Relativno dobro podudaranje postoji i sa većinom pK_a vrednosti izračunatih primenom kompjuterskih programa. Međutim, bitno neslaganje konstanti određenih u ovom doktoratu i izračunatih vrednosti iz literature utvrđeno je kod pK_{a1} kaptopрила i pK_{a2} cilazapрила (razlike veće od 1 pK - jedinice).

Tabela 2. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene potenciometrijski u ovom radu i literaturni podaci (eksperimentalno određeni i izračunati).

ACE inhibitori	Potenciometrijski podaci ^a				Literaturni podaci				
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}	reference
Fosinopril	4,03±0,03				4,38				220
					3,8				221
Zofenopril	4,46±0,03								
Kaptopril	3,50±0,01	9,99±0,01			4,51	9,55			220
					3,90 ^b	10,03 ^b			222
Cilazapril	3,37±0,01	6,47±0,01			3,26	4,49			220
					3,3	5,9			221
Enalapril	2,94±0,02	5,41±0,02			3,74	5,15			220
					3,8	5,5			221
					2,85 ^b	5,37 ^b			223
					2,92 ^b	5,42 ^b			224
					3,04 ^b	5,49 ^b			225
					3,71	5,12			220
Kvinapril	3,12±0,04	5,40±0,01			3,3	5,4			221
					3,78	5,33			220
Perindopril	3,48±0,02	5,91±0,02			3,7	5,7			221
Ramipril	3,35±0,02	5,77±0,02			3,74	5,15			220
					3,7	5,5			221
Lizinopril	1,43±0,04	3,15±0,01	7,20±0,01	10,90±0,01	1,62	3,66	6,07	10,33	220
					2,2	3,8	7,6	10,5	221
					1,40 ^b	3,00 ^b	7,10 ^b	10,78 ^b	226
					1,68 ^b	3,29 ^b	7,01 ^b	11,12 ^b	225
					2,5 ^b	4,0 ^b	6,7 ^b	10,1 ^b	227

^aI=0,1 M NaCl, t=25 °C; ^beksperimentalno određene vrednosti.

4.1.1.2. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene u prisustvu surfaktanata

U Tabeli 3 prikazane su pK_a vrednosti ACE inhibitora određene u prisustvu surfaktanata, anjonskog SDS, katjonskog CTAB, i nejonskog TX 100 u koncentraciji 0,01 M. Takođe, u Tabeli 3 prikazane su i ΔpK_a vrednosti koje predstavljaju pomeranje u odnosu na vrednosti određene bez surfaktanata, pod istim uslovima (Tabela 2). Posmatranjem ΔpK_a može se zaključiti da u prisustvu micela sva tri primenjena surfaktanta dolazi do promene kiselinsko-baznih konstanti koje definišu jonizaciju ACE inhibitora u vodenom rastvoru. Uočene promene pK_a vrednosti, u opsegu od -1,59 do +1,90 ukazuju da micelarni rastvori surfaktanata, kao simulirajući sistemi biomembrana, utiču na pomeranje protolitičkih ravnoteža ACE inhibitora.

Uočeno je da je jonizacija karboksilne grupe (-0,92 do +1,90) najviše izmenjena u prisustvu micela različitog naelektrisanja.

Generalno posmatrano, od primenjenih surfaktanata najveći uticaj na pomeranje kiselinsko-baznih ravnoteža ispoljava SDS. Pomeranja pK_a vrednosti kreću se u opsegu od -0,38 (primarna amino grupa lizinopрила) do +1,90 (karboksilna grupa kvinapрила). Smanjenja kiselosti karboksilne grupe i povećanja baznosti sekundarne amino grupe ispitanih ACE inhibitora (izuzev kaptopрила) mogu se objasniti elektrostatičkim interakcijama na površini negativno naelektrisanih SDS micela (odbijanje anjona i privlačenje katjona). Kod kaptopрила SDS dovodi do povećanja kiselosti obe kisele funkcionalne grupe, karboksilne i sulfhidrilne.

Tabela 3. pK_a vrednosti ACE inhibitora određene potenciometrijski u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata.

ACE inhibitor	pK_{a1}	ΔpK_{a1}	pK_{a2}	ΔpK_{a2}	pK_{a3}	ΔpK_{a3}	pK_{a4}	ΔpK_{a4}
SDS								
Fosinopril	5,37±0,07							
Zofenopril	5,29±0,09	+0,83						
Kaptopril	3,35±0,04	-0,15	9,67±0,03	-0,32				
Cilazapril	4,96±0,04	+1,59	7,12±0,03	+0,65				
Enalapril	4,57±0,03	+1,63	5,46±0,02	+0,05				
Kvinapril	5,02±0,02	+1,9	6,27±0,02	+0,87				
Perindopril	4,75±0,08	+1,27	6,15±0,08	+0,24				
Ramipril	5,18±0,02	+1,83	6,01±0,03	+0,24				
Lizinopril	3,26±0,06	+1,83	3,89±0,07	+0,74	7,39±0,05	+0,19	10,52±0,02	-0,38
CTAB								
Fosinopril	3,18±0,01							
Zofenopril	5,27±0,03	+0,81						
Kaptopril	3,49±0,01	-0,01	10,05±0,01	+0,06				
Cilazapril	3,10±0,05	-0,27	5,03±0,05	-1,44				
Enalapril	2,99±0,09	+0,05	5,28±0,06	-0,13				
Kvinapril	3,54±0,07	+0,42	3,81±0,11	-1,59				
Perindopril	3,59±0,04	+0,11	5,63±0,04	-0,28				
Ramipril	3,39±0,05	+0,04	4,84±0,05	-0,93				
Lizinopril	1,69±0,12	+0,26	3,28±0,04	+0,13	7,27±0,04	+0,07	11,60±0,03	+0,70
TX 100								
Fosinopril	4,68±0,02							
Zofenopril	5,22±0,08	+0,76						
Kaptopril	3,55±0,01	+0,05	10,00±0,01	+0,01				
Cilazapril	3,46±0,01	+0,09	6,50±0,01	+0,03				
Enalapril	3,20±0,02	+0,26	5,55±0,01	+0,14				
Kvinapril	3,27±0,02	+0,15	5,36±0,02	-0,04				
Perindopril	3,37±0,03	-0,11	5,89±0,02	-0,02				
Ramipril	3,34±0,01	-0,01	5,88±0,01	+0,11				
Lizinopril	0,51±1,03	-0,92	3,28±0,01	+0,13	7,24±0,01	+0,04	11,15±0,01	+0,76

Negativno naelektrisana površina anjonskih micela sa kiselim funkcionalnim grupama ispitivanih jedinjenja, može ostvariti interakciju na dva načina. Odbijanje između negativno naelektrisane površine micela i karboksilatnog anjona koji nastaje deprotonovanjem karboksilne grupe, otežava deprotonovanje i dovodi do smanjenja kiselosti. Sa druge strane, negativno naelektrisane anjonske micide mogu izazvati stabilizaciju H^+ jona i, u tom slučaju, stimulisati jonizaciju karboksilne grupe, što za posledicu ima povećanje kiselosti i smanjenje pK_a vrednosti. Da li će se pK_a vrednost povećati ili smanjiti, odnosno, u kom smeru će se pomeriti protolitička ravnoteža, zavisi od ukupnog efekta koji preovlađuje.¹⁴⁴⁻¹⁵⁸ Relativno veliko povećanje pK_a vrednosti karboksilne grupe ACE inhibitora u prisustvu SDS micela ukazuje i na mogućnost obrazovanja intramolekulske vodonične veze između vodonikovog atoma karboksilne grupe i elektronskog para kiseonika karbonilne grupe. Formiranje intramolekulske vodonične veze moguće je samo kod (*Z*)-oblika, što navodi na zaključak da je reverzibilna (*Z*)/(*E*) interkonverzija, koja postoji u vodenom rastvoru ACE inhibitora, u prisustvu SDS micela usmerena u pravcu (*Z*)-izomera.

Baznost sekundarne amino grupe lizinopрила povećana je pod uticajem SDS micela, dok sa druge strane, SDS izaziva smanjenje baznosti primarne amino grupe lizinopрила. Favorizovanje nejonizovanog oblika ove grupe, u prisustvu anjonskog SDS ukazuje na verovatne hidrofobne interakcije unutrašnjosti micide i lipofilnog ugljovodoničnog niza, koji razdvaja primarnu amino grupu od ostatka molekula lizinopрила.

Katjonski surfaktant CTAB nema značajan uticaj na jonizaciju kiselih funkcionalnih grupa kaptopрила, kao i na jonizaciju karboksilne grupe strukturno najbližnjih enalapрила i ramipрила. Na jonizaciju karboksilnih grupa ostalih ACE inhibitora CTAB utiče na dva načina, povećava (fosinopril i cilazapril) ili smanjuje (zofenopril, kvinapril, perindopril, lizinopril) jonizaciju. U prisustvu katjonskog surfaktanta jonizovana anjonska forma karboksilne grupe može ostvariti interakciju sa pozitivno naelektrisanom površinom CTAB micela, pri čemu se, stabilizacijom anjonskog oblika povećava jonizacija karboksilne grupe, a povećanje kiselosti se može izmeriti na osnovu smanjenja pK_a vrednosti. Sa druge strane, kiselost se može smanjiti usled građenja intramolekulske vodonične veze sa kiseonikom karbonilne grupe, što otežava jonizaciju.

Promene pK_a vrednosti karboksilnih grupa u prisustvu CTAB micela navode na zaključak da kod fosinopрила i cilazapрила preovlađuju privlačne sile između suprotnih naelektrisanja, dok u slučaju zofenopрила, kvinapрила, perindopрила i lizinopрила smanjenju kiselosti doprinosi građenje intramolekulske vodonične veze.

Iako se u drugim istraživanjima¹⁴⁴ pokazalo da katjonski surfaktant CTAB snažno stabilizuje negativno naelektrisane anjonske forme, u ovom slučaju, katjonske micelle su pokazale izraženiji uticaj na jonizaciju sekundarne amino grupe (pK_{a2}) u odnosu na jonizaciju karboksilne grupe (pK_{a1}) ACE inhibitora koji predstavljaju amfolite. U uslovima određivanja pK_{a1} vrednosti, odnosno jonizacije karboksilne grupe na nižim pH vrednostima, amino gupa je dominantno prisutna u protonovanom katjonskom obliku i ukupno naelektrisanje molekula je neutralno, što može biti jedan od razloga izraženijeg uticaja CTAB micela na jonizaciju amino grupe.

U prisustvu CTAB micela smanjuje se baznost sekundarne amino grupe ispitivanih ACE inhibitora (do -1,59). U interakcijama pozitivno naelektrisane površine katjonskih micela i protonovane amino grupe, dominiraju elektrostatičke sile odbijanja koje favorizuju nejionizovani, molekulski oblik amino grupe, što dovodi do povećanja njene kiselosti. Izuzetak je sekundarna amino grupa lizinopрила čija je kiselost blago povećana (+0,07). Verovatno je primarna amino grupa lizinopрила hidrofobnim interakcijama izolovana od naelektrisane površine micela i njena baznost je povećana (+0,70).

U slučaju micelarnih rastvora TX 100, uočeno pomeranje pK_a vrednosti ukazuje na relativno slab uticaj nejonskog surfaktanta na jonizaciju ACE inhibitora, osim na jonizaciju karboksilne grupe fosinopрила (+0,65), jonizaciju karboksilne grupe zofenopрила (+0,76) i jonizaciju primarne amino grupe lizinopрила (+0,76). Fosinopril i zofenopril su molekuli sa najizraženijom lipofilnošću među ispitanim ACE inhibitorima i verovatno je da visoka lipofilnost omogućava penetraciju nejionizovane, molekulske forme leka u unutrašnjost micelle, čime se mogu objasniti njihove veće vrednosti pomeranja pK_a u odnosu na ostala jedinjenja. Međutim, ne može se pouzdano tvrditi koja interakcija preovlađuje kada je u pitanju smanjenje pK_{a1} vrednosti proksimalne karboksilne grupe lizinopрила (-0,92) zbog nepouzdanosti određivanja ovog parametra, u prisustvu TX 100, u jako kiseloj sredini (Tabela 3).

Smanjenje kiselosti karboksilne grupe ispitanih ACE inhibitora u prisustvu TX 100 micela ukazuje na dominantne hidrofobne interakcije u koje su uključeni hidrofobni delovi molekulske strukture, ali delimično može biti i rezultat formiranja intermolekulskih vodoničnih veza između vodonika karboksilne grupe ACE inhibitora i kiseonikovih atoma polioksietilenskih grupa na površini TX 100 micela. Veliki broj ovih grupa u hidrofilnom, palisadnom sloju nejonskih micela verovatno utiče i na stabilizaciju protonovane primarne amino grupe lizinoprila što dovodi do povećanja pK_a vrednosti i povećanja baznosti.

4.1.2. Raspodela ravnotežnih oblika ACE inhibitora

Bioraspoloživost leka je u direktnoj korelaciji sa distribucijom ravnotežnih formi u biosredini. Međutim, biodistribucija ravnotežnih oblika leka koji obezbeđuju rastvorljivost na mestu primene, difunduju kroz biološke membrane i interakciju sa ciljnim mestom dejstva, može se razlikovati od vrednosti koja se predviđa samo na osnovu jonizacije u vodenom rastvoru. Na osnovu potencimetrijski određenih pK_a vrednosti i jednačina prikazanih u Tabeli 4 izračunati su dijagrami raspodele ravnotežnih oblika ispitanih ACE inhibitora, bez i u prisustvu primenjenih surfaktanata (Slike 21-30). Sa dijagrama se jasno može videti uticaj surfaktanata na kiselinsko-bazne ravnoteže.

Tabela 4. Jednačine za izračunavanje procenta ravnotežnih vrsta ACE inhibitora u funkciji pH.

fosinopril, zofenopril

$$x_{\text{molekulski}} = \frac{100}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}$$

$$x_{\text{anjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}$$

kaptopril

$$x_{\text{molekulski}} = \frac{100}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

$$x_{\text{anjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

$$x_{\text{dianjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

cilazapril, enalapril, perindopril,
kvinapril, ramipril

$$x_{\text{katjonski}} = \frac{100}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

$$x_{\text{cviterjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

$$x_{\text{anjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}$$

lizinopril

$$x_{\text{dikatjonski}} = \frac{100}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}} + 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}} + 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}$$

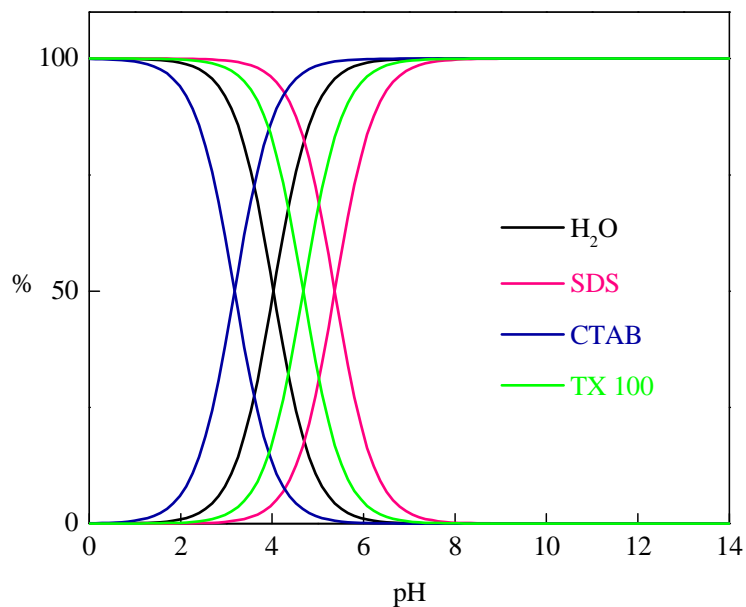
$$x_{\text{katjonski-cviterjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}} + 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}} + 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}$$

$$x_{\text{cviterjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}} + 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}} + 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}$$

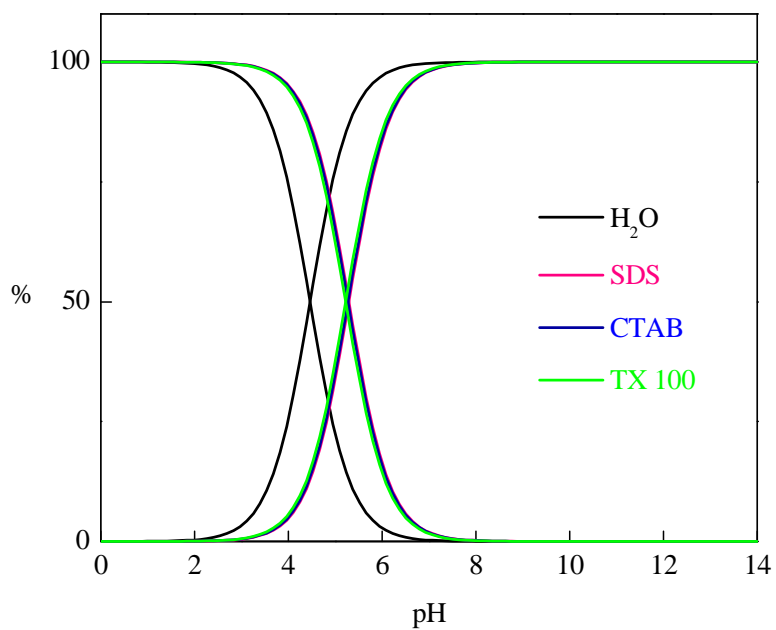
$$x_{\text{anjonski-cviterjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}} + 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}} + 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}$$

$$x_{\text{dianjonski}} = \frac{100 \cdot 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a1}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2}} + 10^{3\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3}} + 10^{4\text{pH} - \text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} - \text{p}K_{a3} - \text{p}K_{a4}}}$$

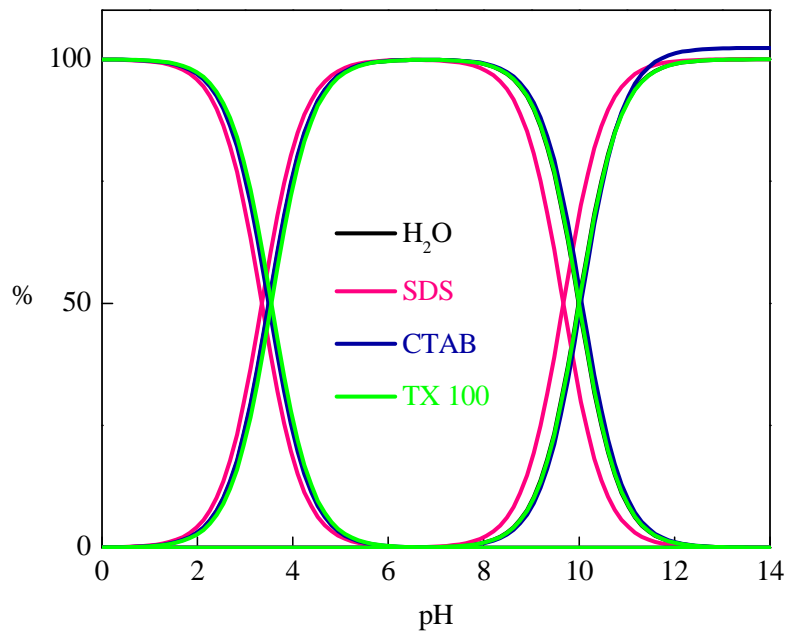
x = molska frakcija (%)



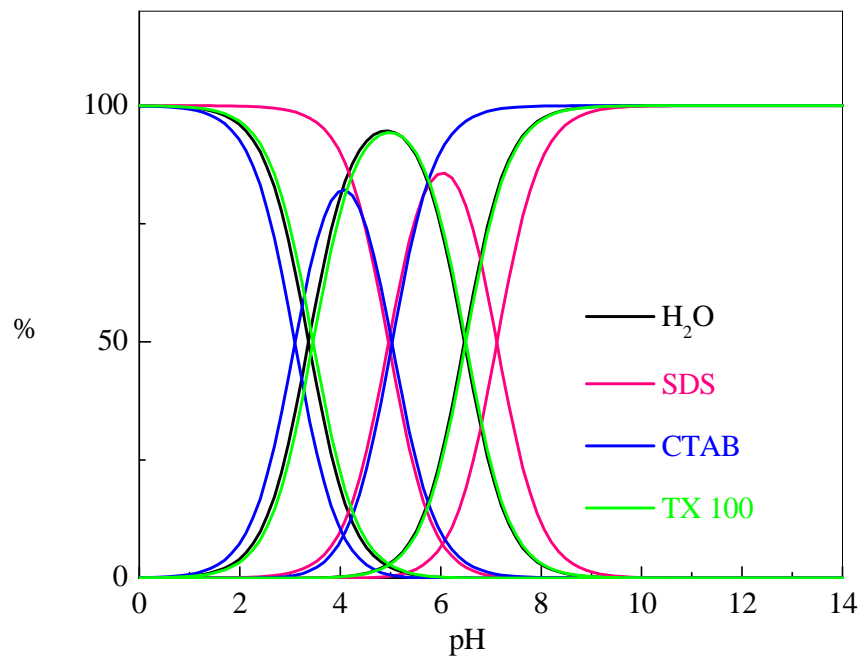
Slika 21. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika fosinopрила u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



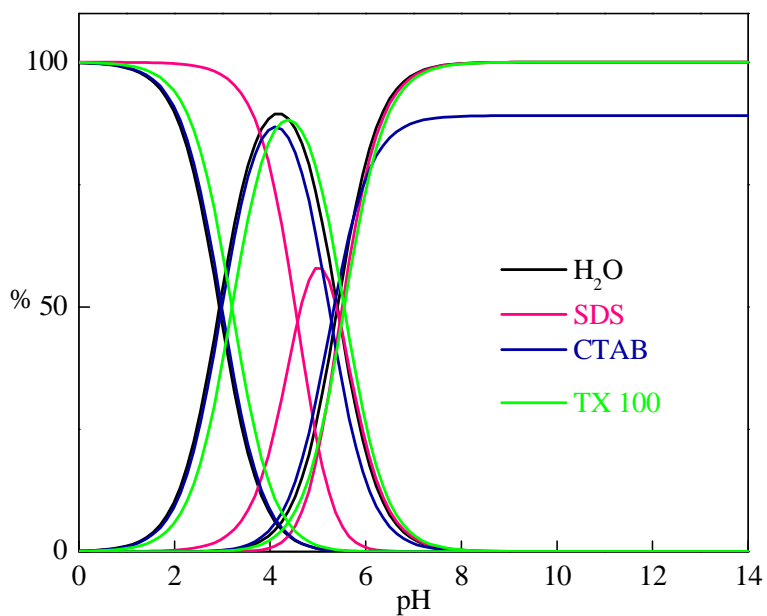
Slika 22. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika zofenopрила u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



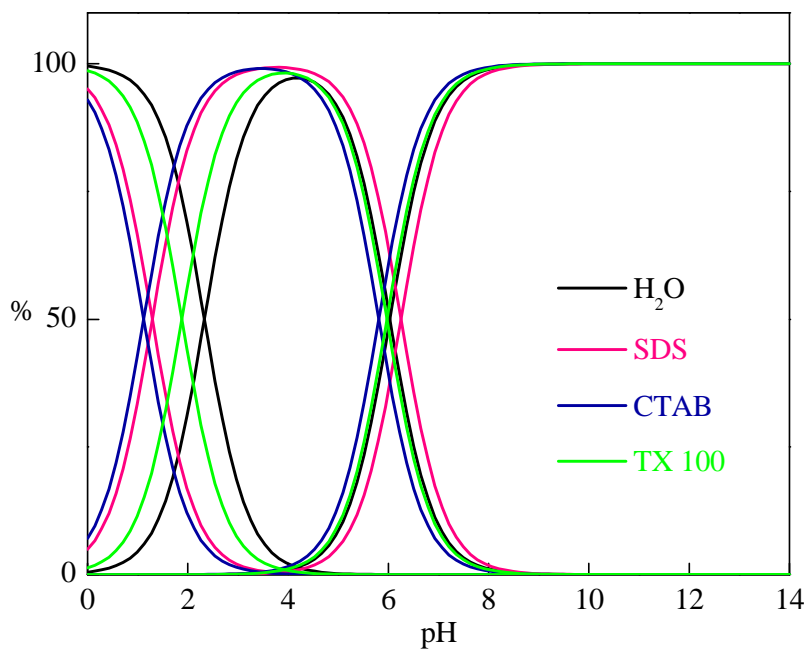
Slika 23. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika kaptoprila u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



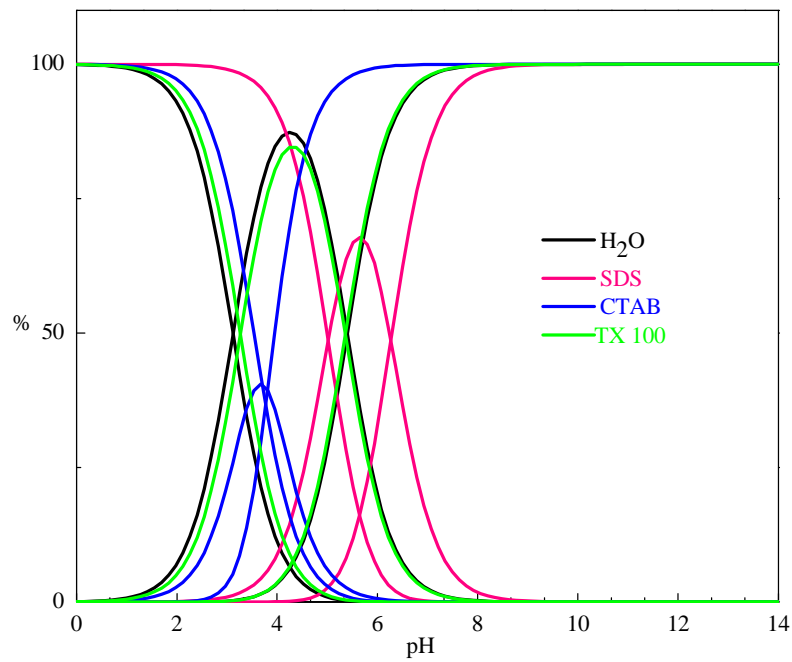
Slika 24. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika cilazaprila u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



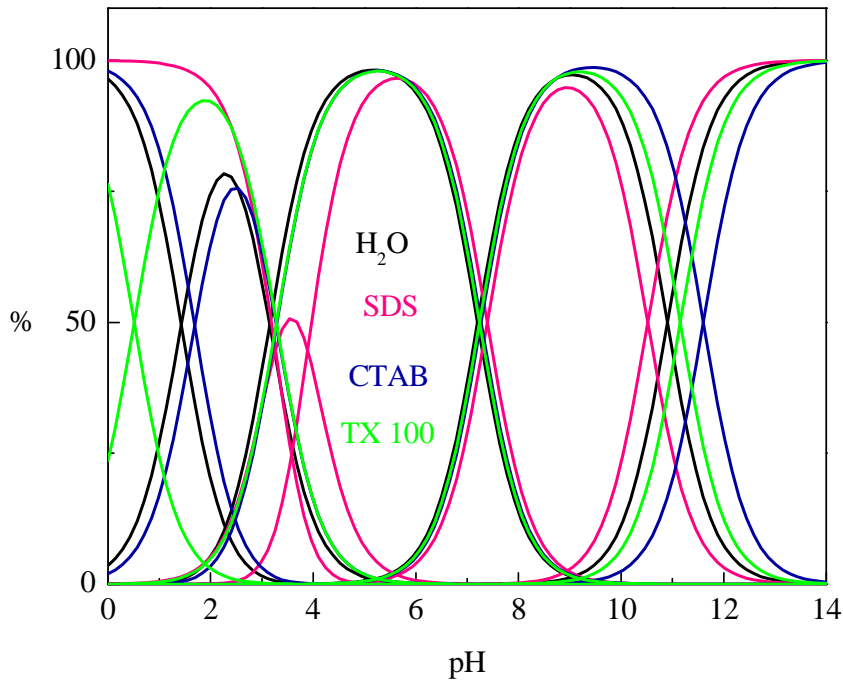
Slika 25. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika enalapрила u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



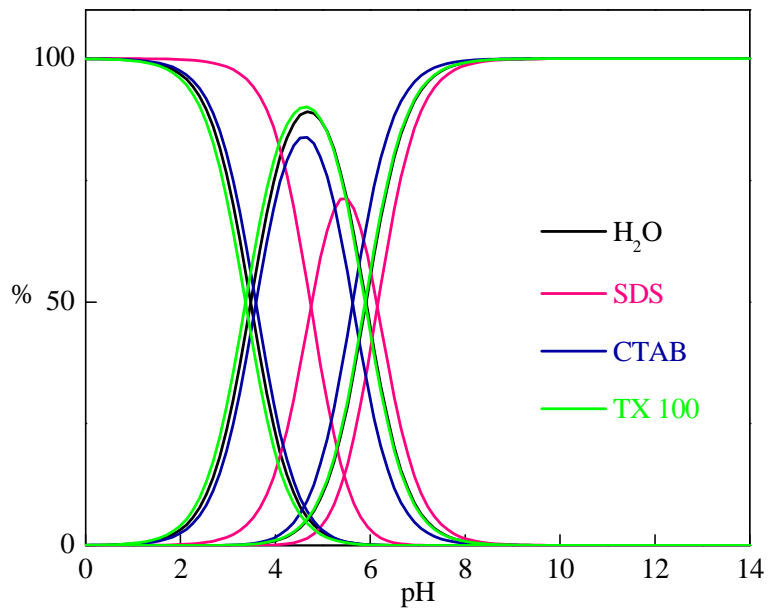
Slika 26. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika maleinske kiseline u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



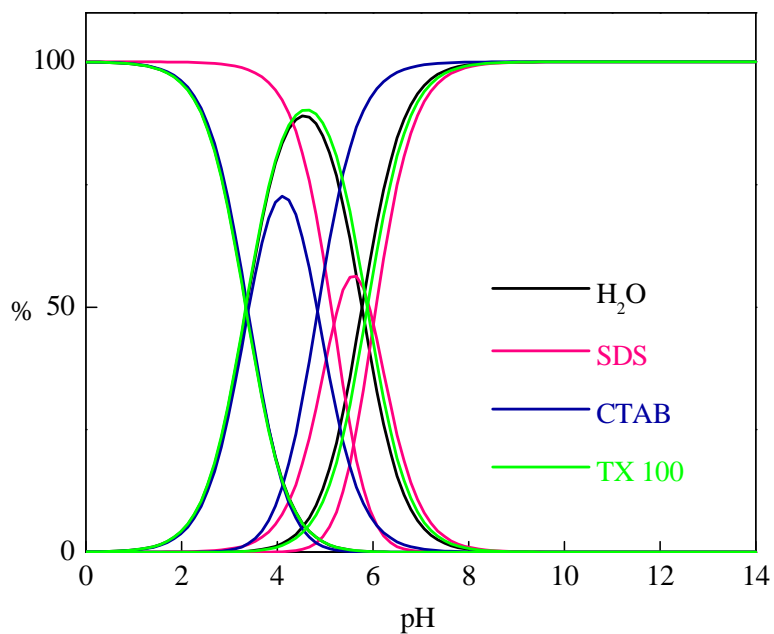
Slika 27. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika kvinaprila u funkciji pH, bez prisustvu surfaktanata.



Slika 28. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika lizinoprila u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



Slika 29. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika perindoprila u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.



Slika 30. Dijagram raspodele ravnotežnih oblika ramiprila u funkciji pH, bez i u prisustvu surfaktanata.

Na osnovu pK_a vrednosti izračunat je procenat ravnotežnih oblika ACE inhibitora, bez i u prisustvu micelarnih rastvora surfaktanata, pri pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja (Tabele 5-7). Uslovima u kiseloj sredini želuca odgovara pH vrednost 1,2; vrednosti 4,5 i 6,8 su analogne uslovima u različitim delovima tankog creva, dok vrednost 7,4 odgovara krvnoj plazmi.

Pri pH vrednostima 1,2 i 7,4 nije uočen značajan uticaj micela na procenat zastupljenosti ravnotežnih oblika. Međutim, izuzetak je lizinopril kod koga se najveća razlika u raspodeli primećuje na pH 1,2 koja odgovara fiziološkim uslovima u kojima dolazi do oslobađanja leka iz odgovarajućeg farmaceutskog oblika, nakon oralne primene. Sadržaj dikatjonske forme lizinoprila se smanjuje za 46% u prisustvu TX 100 i povećava za 36% u prisustvu SDS, dok cviterjonska forma nije zastupljena na ovoj pH vrednosti. Micele ne utiču na promenu raspodele lizinoprila na pH vrednostima 4,5 i 6,8 pri kojima dominira cviterjonski oblik. Analogno tome, može se potvrditi da je u uslovima apsorpcije u gastrointestinalnom traktu lizinopril prostorno orijentisan tako da interakcija između pozitivno i negativno naelektrisanih grupa obezbeđuje ukupnu neutralnost molekula. Cviterjonski oblik lizinoprila, odgovoran za povoljnu permeabilnost, očigledno je stabilizovan naelektrisanjima molekula u biosredini duodenuma i tankog creva, što potvrđuje činjenicu da lizinopril ne zahteva transformisanje u *pro drug* formu.

Najveći uticaj surfaktanata na promenu raspodele ravnotežnih vrsta, prisutan je na pH 4,5 i 6,8 kod ispitanih ACE inhibitora koji po sadržaju jonizujućih grupa predstavljaju amfolite. Na pH 4,5 SDS ima najveći uticaj na porast sadržaja katjonskih formi perindoprila za 75% i ramiprila za 76%. Pri istim uslovima, na sadržaj ravnotežnih formi kvinaprila SDS utiče tako što doprinosi povećanju katjonske forme za 74%, a CTAB smanjenju cviterjonske forme za 69%. Takođe, na pH 4,5 sadržaj molekuskog oblika fosinoprila, koji ima samo jedan kiseli centar, smanjuje se za 57% pod uticajem CTAB što se može dovesti u vezu sa njegovom usporenom apsorpcijom u prisustvu hrane, kao i niskom bioraspoloživošću.²²

Tabela 5. Procenat ravnotežnih oblika ACE inhibitora koji predstavljaju amfolite na pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata (SDS, CTAB i TX 100). (K, katjonska forma; C, cviterjonska forma; A, anjonska forma).

ACE inhibitor		pH 1,2			pH 4,5			pH 6,8			pH 7,4		
		K	C	A	K	C	A	K	C	A	K	C	A
Cilazapril	H ₂ O	99	1	0	7	92	1	0	32	68	0	11	89
	SDS	100	0	0	74	26	0	1	67	32	0	34	66
	CTAB	99	1	0	3	75	22	0	2	98	0	0	100
	TX 100	99	1	0	8	91	1	0	33	67	0	11	89
Enalapril	H ₂ O	98	2	0	2	87	11	0	4	96	0	1	99
	SDS	100	0	0	51	44	5	0	4	96	0	1	99
	CTAB	98	2	0	3	83	14	0	3	97	0	1	99
	TX 100	99	1	0	4	88	8	0	5	95	0	1	99
Perindopril	H ₂ O	99	1	0	8	88	4	0	11	89	0	3	97
	SDS	100	0	0	83	17	0	1	29	70	0	10	90
	CTAB	100	0	0	10	84	6	0	6	94	0	2	98
	TX 100	99	1	0	6	90	4	0	11	89	0	3	97
Kvinapril	H ₂ O	99	1	0	3	86	11	0	4	96	0	1	99
	SDS	100	0	0	77	23	0	0	23	77	0	7	93
	CTAB	100	0	0	2	17	81	0	0	100	0	0	100
	TX 100	99	1	0	5	84	11	0	4	96	0	1	99
Ramipril	H ₂ O	99	1	0	6	89	5	0	9	91	0	2	98
	SDS	100	0	0	82	17	1	0	14	86	0	4	96
	CTAB	99	1	0	5	65	30	0	1	99	0	0	100
	TX 100	99	1	0	6	90	4	0	11	89	0	3	97

Tabela 6. Procenat ravnotežnih oblika ACE inhibitora koji predstavljaju kiseline na pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata (SDS, CTAB i TX 100). (M, molekulska forma; MA, monoanjonska forma; DA, dianjonska forma; A, anjonska forma).

ACE inhibitor		pH 1,2			pH 4,5			pH 6,8			pH 7,4		
		M	MA	DA	M	MA	DA	M	MA	DA	M	MA	DA
Kaptopril	H ₂ O	100	0	0	9	91	0	0	100	0	0	100	0
	SDS	99	1	0	7	93	0	0	100	0	0	99	1
	CTAB	99	1	0	9	91	0	0	100	0	0	100	0
	TX	100	0	0	10	90	0	0	100	0	0	100	0
		pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8		pH 7,4					
		M	A	M	A	M	A	M	A				
Fosinopril	H ₂ O	100	0	62	38	1	99	0	100				
	SDS	100	0	88	12	4	96	1	99				
	CTAB	99	1	5	95	0	100	0	100				
	TX	100	0	60	40	1	99	0	100				
Zofenopril	H ₂ O	100	0	48	52	0	100	0	100				
	SDS	100	0	86	14	3	97	1	99				
	CTAB	100	0	85	15	3	97	1	99				
	TX	100	0	84	16	3	97	1	99				

Tabela 7. Procenat ravnotežnih oblika lizinopрила na pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja, bez i u prisustvu 10^{-2} M surfaktanata (SDS, CTAB i TX 100). (DK, dikatjonska forma; KC, katjonsko-cviterjonska forma; C, cviterjonska forma; AC, anjonsko-cviterjonska forma; DA, dianjonska forma).

pH		DK	KC	C	AC	DA
1,2	H ₂ O	63	37	0	0	0
	SDS	99	1	0	0	0
	CTAB	76	24	0	0	0
	TX 100	17	82	1	0	0
4,5	H ₂ O	0	4	96	0	0
	SDS	1	20	79	0	0
	CTAB	0	6	94	0	0
	TX 100	0	6	94	0	0
6,8	H ₂ O	0	0	72	28	0
	SDS	0	0	80	20	0
	CTAB	0	0	75	25	0
	TX 100	0	0	73	27	0
7,4	H ₂ O	0	0	39	61	0
	SDS	0	0	49	51	0
	CTAB	0	0	43	57	0
	TX 100	0	0	41	59	0

4.2. Ispitivanje uticaja surfaktanata na ravnotežu (Z)/(E)-izomerizacije ACE inhibitora

4.2.1. Razdvajanje diastereoizomera

Sa ciljem da se ispita uticaj katjenskog, anjonskog i nejonskog surfaktanta na ravnotežu (Z)/(E)-izomerizacije pet ACE inhibitora (kaptopril, enalapril, perindopril, ramipril i lizinopril) u vodenom rastvoru, za svaku supstancu pripremljeni su rastvori istih koncentracija, bez i u prisustvu surfaktanata (10^{-2} M). Surfaktanti su primenjeni u koncentraciji koja je značajno iznad kritične micelarne koncentracije, tako da se može zanemariti uticaj ispitivanih ACE inhibitora na *cmc*. Nakon ekvibracije (najmanje 1 h) rastvori su analizirani primenom tečne hromatografije u RP-HPLC sistemu. Kod izbora optimalnih uslova za razdvajanje izomera vodilo se računa o mogućoj interkonverziji diastereoizomera u koloni čime bi se narušilo ravnotežno stanje uspostavljeno neposredno pre injektovanja uzoraka u kolonu. Na osnovu fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja i karakteristika prolinske peptidne veze, podešeni su eksperimentalni uslovi u kojima se povećava energetska barijera rotacije. Temperatura kolone utiče na kinetiku interkonverzije tako što se sniženjem temperature interkonverzija usporava. Iz tog razloga razdvajanja su izvedena na temperaturi kolone koja je niža od sobne temperature (18°C). Brzina interkonverzije može zavisiti i od pH vrednosti mobilne faze, koja utiče na jonizaciono stanje kiselih i baznih centara u blizini amidске veze, a time i na distribuciju elektrona u amidskoj vezi. Na pH 7 karboksilna grupa je potpuno jonizovana i ne učestvuje u građenju intramolekulske vodonične veze. Ovakvo jonizaciono stanje izaziva drugačiju raspodelu elektronske gustine zbog čega prolinska peptidna veza ima izraženiji karakter dvostruke veze, što otežava rotaciju oko nje i usporava kinetiku interkonverzije. Dodatni faktor koji se morao uzeti u obzir pri izboru optimalnih uslova je i prisustvo surfaktanata u koloni nakon injektovanja rastvora ACE inhibitora sa surfaktantima. Bez obzira na malu količinu surfaktanata (20 μ L 10^{-2} M) koji se na ovaj način unose u kolonu zajedno sa ispitivanim jedinjenjima, postavljen je uslov da surfaktanti imaju kraće retenciono vreme od diastereoizomera. Na ovaj način izbegnut je njihov eventualni uticaj na razdvajanje diastereoizomera i

omogućena je poredljivost rezultata dobijenih hromatografskom analizom rastvora, sa i bez surfaktanata.

Zbog svega navedenog, izbor optimalnih uslova ispitivanja, koji se odnose na brzinu protoka i sastav mobilne faze, zasnivao se na dobijanju hromatografskog profila u kome bi zadržavanje diastereoizomera u koloni bilo što kraće i prvo se eluirali surfaktanti, a u slučaju enalapril-maleata i maleatni anjon.

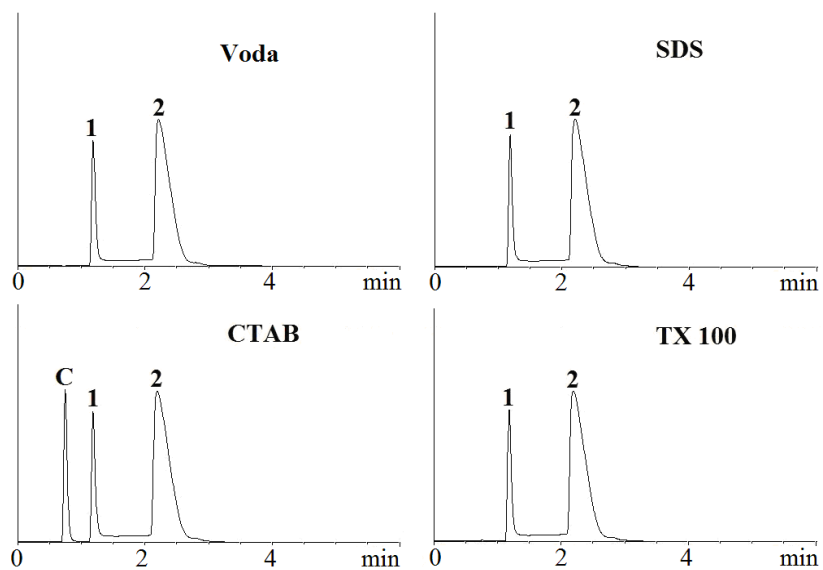
Izborom mobilne faze koja se sastoji iz smeše fosfatni pufer pH 7,0 – acetonitril (Tabela 8) i brzinom protoka od 2 ml/min (kaptopril, lizinopril) ili 4 ml/min (enalapril, perindopril, ramipril) postignuto je eluiranje surfaktanata i maleata za približno 0,5 minuta, a bržeg diastereoizomera za oko 1 minut (Slike 31-35). Pikovi surfaktanata i maleata identifikovani su paralelnim injektovanjem rastvora SDS, CTAB, TX-100 i maleinske kiseline, pripremljenih pod istim uslovima, bez prisustva ispitivanih ACE inhibitora. (Hromatogrami su prikazani na Slici 48 u Prilogu)

Odgovarajuće vrednosti retencionog vremena diastereoizomera lizinoprila iznosile su 0,9 i 1,2 minuta. Kod enalaprila, kaptoprila i lizinoprila retenciono vreme sporijeg diastereoizomera iznosilo je manje od 2,5 minuta. Bazna linija između pikova koji potiču od diastereoizomera enalaprila, kaptoprila i lizinoprila ukazuje da nema značajne diastereoizomerne interkonverzije tokom zadržavanja u hromatografskom sistemu.

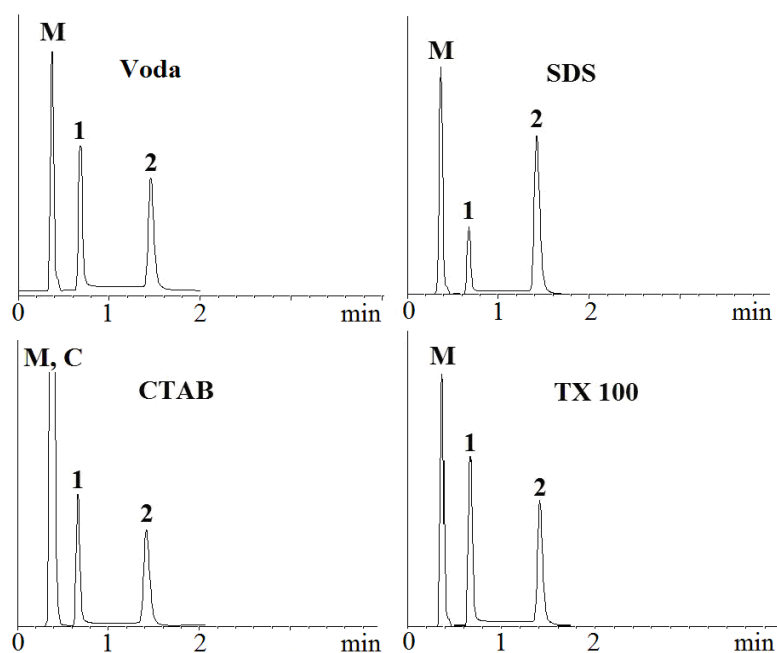
U slučaju ramiprila i perindoprila, produženo zadržavanje sporijeg diastereoizomera u koloni, koje traje više od 3 minuta, uslovalo je pojavu platoa između pikova, usled interkonverzije sporijeg izomera u brži. Brži diastereoizomer perindoprila pojavljuje se u obliku oštrog pika sa retencionim vremenom 0,9 minuta, a oko 0,5 minuta kasnije, na hromatogramu se može uočiti zona interkonverzije. Na osnovu vremena pojave platoa, može se zaključiti da diastereoizomerizacija u koloni nema uticaja na površinu pika „bržeg” izomera i da se na osnovu ove površine može kvantitativno proceniti uticaj surfaktanata na ravnotežu (*Z*)/(*E*)-izomerizacije perindoprila. U skladu sa optimalnim eksperimentalnim uslovima razdvajanja, koji su zahtevali kratko retenciono vreme pikova surfaktanata kao i dovoljnu razdvojenost od pika bržeg izomera, u slučaju ramiprila nije bilo moguće izbeći pojavu platoa između pikova diastereoizomera, što je uslovalo približnu kvantitativnu procenu sadržaja (*Z*)- i (*E*)-izomera.

Tabela 8. Sastav mobilne faze korišćene za razdvajanje diastereoizomera ACE inhibitora u RP-HPLC sistemu i retenciono vreme izomera (1 i 2).

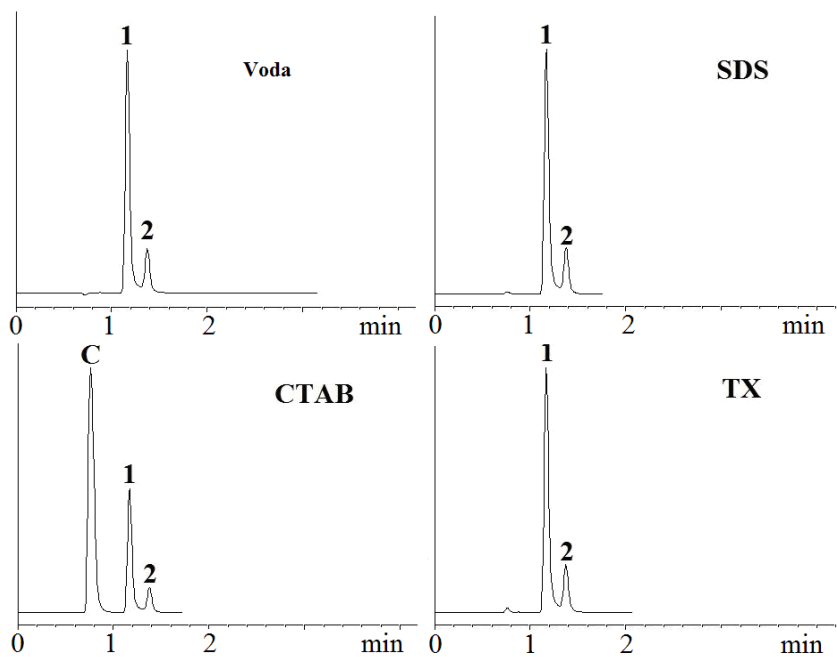
ACE inhibitori	Mobilna faza	Retenciono vreme min	
		1	2
	Fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) - acetonitril, v/v		
Kaptopril	95:5	1,18	2,19
Enalapril	77:23	0,68	1,44
Lizinopril	90:10	1,16	1,37
Perindopril	83:17	0,92	4,73
Ramipril	77:23	1,13	3,43



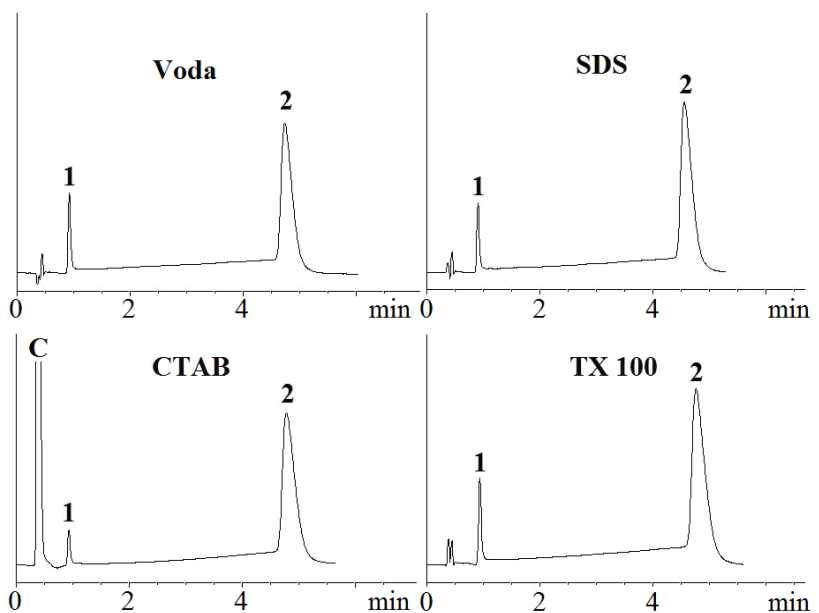
Slika 31. Hromatogrami rastvora kaptoprila dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata SDS, CTAB i TX-100. (1) i (2), diastereoizomeri kaptoprila; (C), CTAB. Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (95:5, v/v).



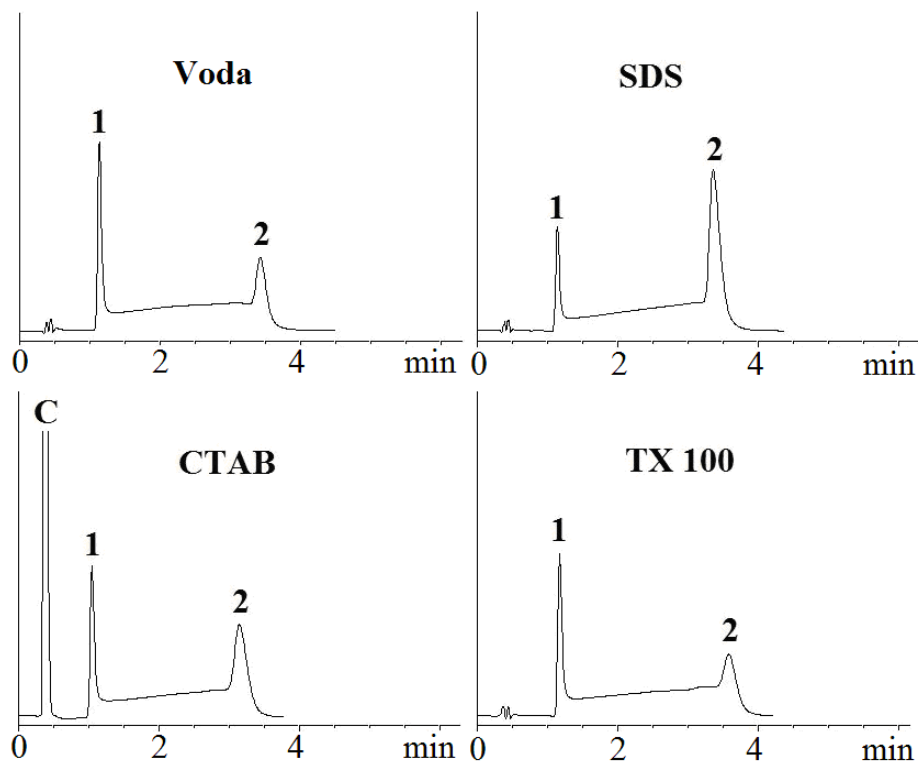
Slika 32. Hromatogrami rastvora enalaprila dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata SDS, CTAB i TX-100. (1) i (2), diastereoizomeri enalaprila; (M), maleat; (C), CTAB. Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (77:23, v/v).



Slika 33. Hromatogrami rastvora lizinopрила dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata SDS, CTAB i TX-100. (1) i (2), diastereoizomeri lizinopрила; (C), CTAB. Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (90:10, v/v).



Slika 34. Hromatogrami rastvora perindopрила dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata SDS, CTAB i TX-100. (1) i (2), diastereoizomeri perindopрила; (C), CTAB. Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (83:17, v/v).



Slika 35. Hromatogrami rastvora ramiprila dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata SDS, CTAB i TX-100. (1) i (2), diastereoizomeri ramiprila; (C), CTAB. Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (77:23, v/v).

4.2.2. Identifikacija pikova i redosled eluiranja diastereoizomera

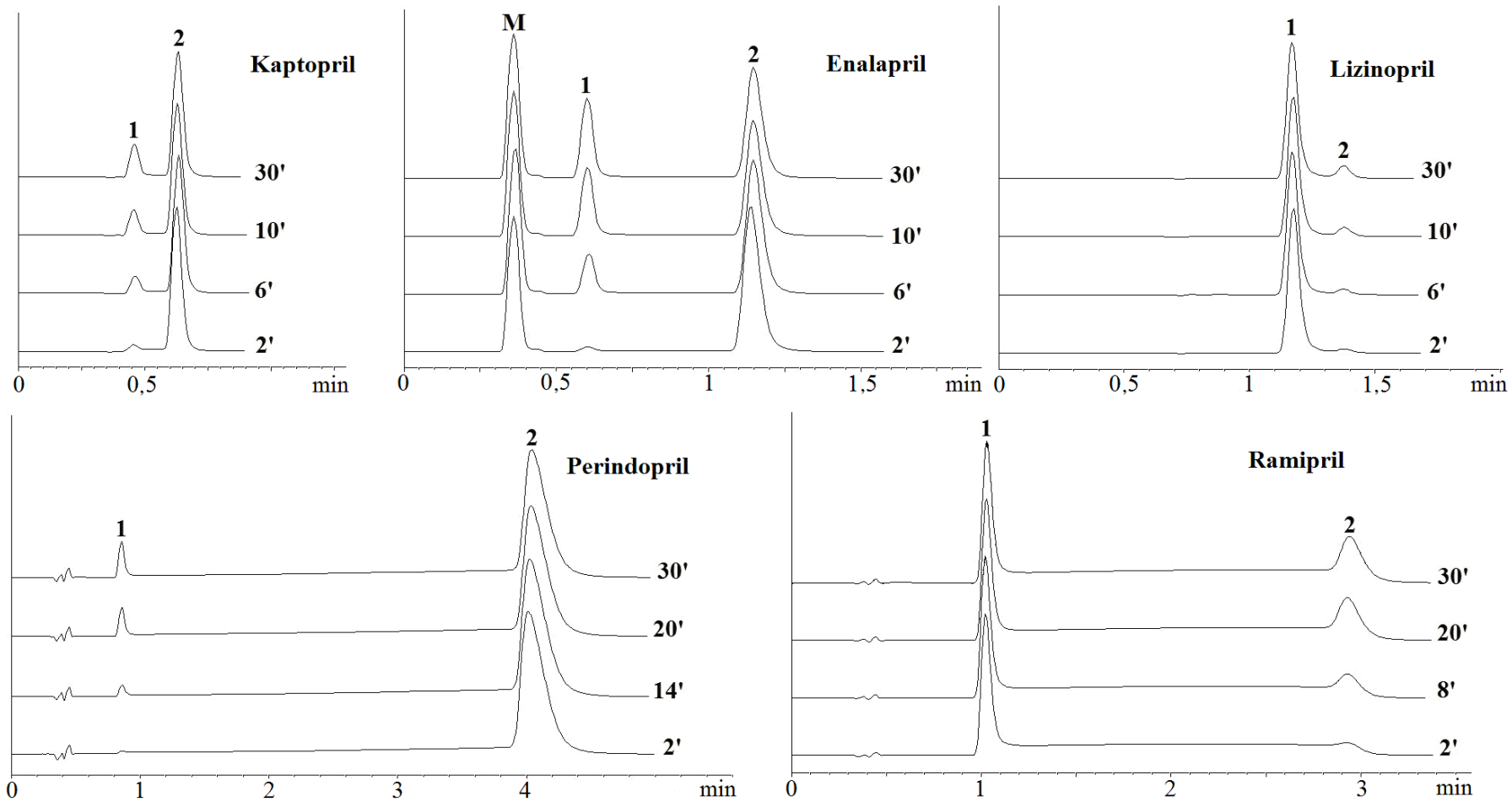
Hemijske strukture ispitanih ACE inhibitora sadrže 2-5 asimetričnih ugljenikovih atoma koji predstavljaju hiralne centre. Svi hiralni centri u kristalnoj formi ovih jedinjenja zastupljeni su u (*S*) apsolutnoj konfiguraciji koja odgovara geometrijskoj orijentaciji (*Z*)-diastereoizomera.²²⁸⁻²³³ Na osnovu toga se može zaključiti da je, neposredno nakon rastvaranja u vodi, u rastvoru prisutan samo (*Z*)-diastereoizomer i da se izomerizacijom njegov sadržaj vremenom smanjuje, sve dok ne dostigne konstantnu vrednost usled uspostavljanja (*Z*)/(*E*)-ravnoteže. Zahvaljujući relativno sporom procesu interkonverzije jednog diastereoizomera u drugi, u uslovima HPLC vremenske skale, bilo je moguće identifikovati pikove na osnovu hromatograma dobijenih injektovanjem uzoraka odmah nakon rastvaranja ACE inhibitora u vodi, a zatim i u vremenskim intervalima 2-6 minuta (Slika 36). Pik, čija se površina smanjivala tokom vremena, označen je kao (*Z*)-diastereoizomer. Na osnovu toga moglo se zaključiti da kraće retenciono vreme imaju (*E*)-izomeri kaptoprila, enalaprila i perindoprila, i (*Z*)-izomeri lizinoprila i ramiprila.

Redosled pojavljivanja pikova u hromatogramima uslovljen je razlikom u lipofilnosti (*Z*)- i (*E*)-izomera. Diastereoizomer veće hidrofobne površine ispoljava izraženiju lipofilnost i ostvaruje snažnije interakcije sa stacionarnom fazom, zbog čega se duže zadržava u koloni. U skladu sa tim, ako se posmatraju hromatogrami strukturno sličnih ACE inhibitora enalaprila, perindoprila i ramiprila može se zaključiti da su (*Z*)-izomeri enalaprila i perindoprila lipofilniji od odgovarajućih (*E*)-izomera, dok je u slučaju ramiprila uočen obrnut redosled eluiranja koji ukazuje na izraženiju hidrofobnu površinu (*E*)-izomera. Identifikacija pikova izomera enalaprila i ramiprila u ovoj disertaciji u skladu je sa ranije objavljenim podacima (enalapril)¹³ i (ramipril)¹⁰⁸ koji su takođe dobijeni upotrebom acetonitrila u mobilnoj fazi.

Hemijska struktura ramiprila sadrži oktahidro-ciklopenta[b]pirol po čemu se razlikuje u odnosu na enalapril koji sadrži pirolidin. Biciklični sistem doprinosi povećanju lipofilnosti ramiprila, ali utiče i na moguće prolin-aromatične intramolekulske interakcije koje, pored vodonične veze, dovode do razlika u stabilizaciji i lipofilnosti između diastereoizomera. Obrnut redosled eluiranja (*Z*)- i (*E*)-izomera enalaprila i ramiprila ukazuje na razlike u lipofilnosti dominantnih diastereoizomera

ovih jedinjenja. Kako je lipofilnost jedan od ključnih parametara koji definiše ne samo farmakokinetičko ponašanje već i inhibitornu aktivnost leka, ovakvi podaci mogu poslužiti i za poređenje njihovih aktivnosti jer samo (*Z*)-izomer ispoljava farmakološki efekat usled stereoselektivne interakcije sa enzimom.

Površine pikova “bržih” izomera ACE inhibitora dobijenih na osnovu separacionih profila nakon uspostavljanja ravnoteže u rastvoru bez i u prisusvu surfaktanata prikazane su u Tabeli 9. Na osnovu vremenski zavisnih hromatograma, kao izomeri sa kraćim retencionim vremenom identifikovani su (*E*)-izomeri kaptoprila, enalaprila i perindoprila i (*Z*)-izomeri lizinoprila i ramiprila. U Tabeli 9 je uporedo prikazano smanjenje ili povećanje površine ovih pikova (u %) dobijenih analizom rastvora sa surfaktantima u odnosu na rastvor bez surfaktanata. Površina pika “bržeg” izomera uzeta je za procenu uticaja surfaktanata na (*Z*)/(*E*)-izomerizaciju jer predstavlja približnije stanje ravnoteže neposredno pre injektovanja rastvora, obzirom da produženo vreme zadržavanja u koloni povećava i mogućnost interkonverzije.



Slika 36. Vremenski zavisni hromatogrami ACE inhibitora na osnovu kojih je izvedena identifikacija izomera. (1) i (2), diastereoizomeri ACE inhibitora; (M), maleat. Sastav mobilnih faza prikazan je u Tabeli 8.

Rezultati u Tabeli 9 pokazuju da nijedan od primenjenih surfaktanata nema značajnog uticaja na ravnotežu (*Z*)/(*E*)-izomerizacije lizinopрила. Lizinopril je ACE inhibitor sa jedinstvenom strukturom koja je zastupljena u dicviterjonskom obliku pri pH 7 mobilne faze. Dve karboksilne, primarna i sekundarna amino grupa u jonizovanoj formi, ostvaruju intramolekulsku interakciju kojom se stabilizuje ukupno neutralna forma leka i kojom se može objasniti zanemarljiv uticaj micela na ravnotežu izomerizacije.

Kod ostalih ispitivanih ACE inhibitora ovaj uticaj je relativno snažan. U odnosu na rastvor bez surfaktanata, u prisustvu anjonskog SDS površina pika (*E*)-izomera se smanjuje kod enalapрила (59%) i perindopрила (15%) što odgovara pomeranju ravnoteže u smeru (*Z*)-izomera. Suprotan efekat SDS ima kod kaptopрила i ramipрила gde se ravnoteža pomera u smeru (*E*)-izomera. Kod kaptopрила ovo povećanje površine (*E*)-izomera iznosi 14%. Kod ramipрила smanjenje površine pika (*Z*)-izomera u prisustvu SDS za 43% ukazuje na značajno pomeranje ravnoteže u smeru stvaranja (*E*)-izomera.

Katjonski surfaktant CTAB izaziva pomeranje (*Z*)/(*E*)-ravnoteže enalapрила, perindopрила i ramipрила u istom smeru kao i SDS, a razlika je u magnitudi tog uticaja. Površina pika (*E*)-izomera se smanjuje kod enalapрила 18%, perindopрила 46%, dok je kod ramipрила površina (*Z*)-izomera u prisustvu CTAB smanjena za 21%. Na ravnotežu kaptopрила CTAB nema značajnog uticaja.

Uticaj nejonskog surfaktanta TX-100 zanemarljiv je kod ispitivanih ACE inhibitora, izuzev kod perindopрила gde se površina (*E*)-diastereoizomera povećala za 16%.

Kada se posmatra uticaj surfaktanata na strukturno slične ACE inhibitore enalapril, perindopril i ramipril može se zaključiti da SDS ima najveći uticaj na ravnotežu ramipрила i enalapрила, ali u suprotnom smeru. Katjonski surfaktant CTAB ima najveći uticaj na (*Z*)/(*E*)-ravnotežu perindopрила.

Tabela 9. Površine pikova „bržeg“ diastereoizomera ACE inhibitora bez (P_{H_2O}) i u prisustvu (P_s) surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100). U zagradi je prikazano povećanje ili smanjenje (%) površine pika u prisustvu surfaktanata u odnosu na vodeni rastvor.

ACE inhibitor	Izomer	P_{H_2O}	$P_s, \left(\frac{P_s}{P_{H_2O}} \times 100\right)$					
			SDS		CTAB		TX 100	
Kaptopril	(E)	5882	6207	(+5)	6222	(+6)	6199	(+5)
Enalapril	(E)	555	224,8	(-59)	456,7	(-18)	553,4	(-1)
Perindopril	(E)	68,93	58,67	(-15)	37,2	(-46)	80.3	(+16)
Ramipril	(Z)	376,6	215,5	(-43)	296,7	(-21)	356,7	(-5)
Lizinopril	(Z)	3082	3175	(+3)	3198	(+4)	3066	(-1)

Molekuli lekova ostvaruju interakcije sa micelama elektrostatičkim i hidrofobnim efektima. Od hidrofobnosti i naelektrisanja ispitivanih jedinjenja i surfaktanata, zavisi tip interakcija koji preovlađuje i ukupan efekat na ravnotežu izomerizacije.¹⁴⁴ Ispitani ACE inhibitori su amfoliti ili kiseline, a njihovi kiseli i bazni centri su delimično jonizovani u vodenom rastvoru, tako da hidrofilni delovi strukture mogu biti uključeni u elektrostatičke interakcije sa naelektrisanom površinom micela. Nasuprot tome, kod jedinjenja koja imaju izraženiju hidrofobnu površinu, očekuje se da u interakcijama sa micelama hidrofobni efekat ima dominantnu ulogu u odnosu na elektrostatički. Pored toga, za razliku od katjonskih (CTAB), anjonski surfaktanti (SDS) ostvaruju izraženije hidrofobne interakcije sa lekovima, čime se može objasniti efekat koji ima SDS na ispitivane ACE inhibitore sa hidrofobnim, fenilbutiril estarskim delom strukture, kao što su enalapril i ramipril. Moguće je da se ovaj deo molekula inkorporira u micelu koja hidrofobnim efektima favorizuje termodinamički stabilniju konfiguraciju, pomerajući ravnotežu u smeru izomera sa većom hidrofobnom površinom. Do konverzije dolazi na površini između micela i vode.

Micelle koje formira nejonski surfaktant TX-100 nemaju naelektrisanje, ali zahvaljujući prisustvu slobodnih –OH grupa, sadrže polarni površinski sloj koji je uključen u interakcije sa ispitivanim jedinjenjima.

4.3. Teorijska analiza hidrofobnosti (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera ACE inhibitora

Da bi se objasnile razlike u redosledu eluiranja diastereoizomera i mogući molekularni mehanizmi retencije, sprovedena je teorijska studija. Geometrijska optimizacija struktura (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera ACE inhibitora pri pH vrednosti 7 izvedena je primenom B3LYP/6-31G (d,p) metode u okviru *Density Functional Theory* (DFT), pomoću *Gaussian 09* programa (Slike 49 i 50 u Prilogu). Molekularni deskriptori svih parova diastereoizomera izračunati su primenom ChemBio3D Ultra 13.0 i Dragon programa. *Connolly Solvent-Excluded Volume* (SEV)²¹⁷ je molekularni deskriptor koji je izdvojen kao najznačajniji među izračunatim parametrima. *Connolly Solvent-Excluded Volume* pripada stereo grupi molekularnih deskriptora i definiše se kao zapremina prostora iz koje se rastvarač isključuje usled prisustva rastvorenog molekula, odnosno predstavlja rastvaraču nedostupnu zapreminu.²³⁴ Ovaj parametar se izračunava kao zapremina unutar kontaktne površine molekula koja je okružena površinom dostupnom rastvaraču i može se koristiti za opisivanje lipofilno/hidrofilnih i geometrijskih osobina molekula.²³⁵

Najznačajnije razlike u SEV vrednostima dobijene su za strukturno najbližija jedinjenja, enalapril i ramipril (Tabela 10), sa obrnutim redosledom eluiranja diastereoizomera. U svakom paru diastereoizomera enalapрила i ramipрила, veća vrednost SEV parametra odgovara izomeru sa kraćim retencionim vremenom koji se prvi eluira na hromatografskoj koloni. (*Z*)-ramipril i (*E*)-enalapril imaju veće SEV vrednosti od svojih parova, što ukazuje na slabije interakcije sa hidrofobnom površinom stacionarne faze i kao posledica toga, eluiraju se brže u odnosu na (*E*)-diastereoizomer ramipрила i (*Z*)-diastereoizomer enalapрила.

Tabela 10. Vrednosti Connolly Solvent - Excluded Volume deskriptora (*Z*)/(*E*)-enalaprila i ramiprila.

Diastereoizomeri	Connolly Solvent - Excluded Volume/Å ³
(<i>Z</i>)-Enalapril	351,881
(<i>E</i>)-Enalapril	353,001
(<i>Z</i>)-Ramipril	397,256
(<i>E</i>)-Ramipril	393,886

5. ZAKLJUČAK

- Određene su pK_a vrednosti devet ACE inhibitora (kaptopril, cilazapril, enalapril, fosinopril, lizinopril, ramipril, perindopril, kvinapril, zofenopril) metodom potenciometrijske titracije.
 - Primenom kompjuterskog programa Hyperquad za izračunavanje pK_a vrednosti na osnovu potenciometrijskih podataka, postignuta je evaluacija preklopljenih kiselinsko-baznih ravnoteža, a konstante su određene i u složenim sistemima dve komponente (enalapril-maleat i perindopril-erbumin) kada je u rastvoru prisutno više supstanci sa jonizujućim grupama.
 - Zbog slabe rastvorljivosti u vodi, pK_a vrednost fosinoprila određena je u smešama vode i metanola, u različitim odnosima, i ekstrapolacijom na 0 % metanola izračunata je vrednost koja odgovara vodenoj sredini.
 - Za pK_a karboksilne grupe (pK_{a1} i pK_{a2} lizinoprila i pK_{a1} ostalih ACE inhibitora) određene vrednosti konstanti su u opsegu 1,43 – 4,72.
 - Za pK_a sekundarne amino grupe (pK_{a2} za cilazapril, enalapril, kvinapril, perindopril i ramipril, i pK_{a3} za lizinopril) određene vrednosti konstanti su u opsegu 5,40 – 7,20.
 - Najveće pK_a vrednosti dobijene su za primarnu amino grupu lizinoprila pK_{a4} 10,90 i sulfhidrilnu grupu kaptoprila pK_{a2} 9,99.

- Potenciometrijski su određene pK_a vrednosti devet ACE inhibitora u micelarnim rastvorima surfaktanata 10^{-2} M (anjonskog SDS, katjonskog CTAB i nejonskog TX-100) i ispitan je uticaj micela različitog naelektrisanja na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora.
 - U prisustvu micela sva tri primenjena surfaktanta dolazi do pomeranja pK_a vrednosti koje definišu jonizaciju ACE inhibitora u vodenom rastvoru (od -1,59 do +1,90), na osnovu čega se može zaključiti da micelarni rastvori surfaktanata, kao modeli biomembrana, značajno utiču na pomeranje protolitičkih ravnoteža ACE inhibitora.
 - Od prisutnih jonizujućih grupa, jonizacija karboksilne grupe je najviše izmenjena u prisustvu micela različitog naelektrisanja (od -0,92 do +1,90),

što ukazuje na favorizovanje intramolekulskih interakcija i formiranje intramolekulske vodonične veze.

- Anjonski surfaktant SDS ispoljava najveći uticaj na pomeranje kiselinsko-baznih ravnoteža ACE inhibitora (od -0,38 do +1,90) zbog dominantnih elektrostatičkih interakcija na površini micela.
 - Na osnovu pomeranja pK_a vrednosti u prisustvu micelarnih rastvora surfaktanata, izvedeni su zaključci o tipovima interakcija ACE inhibitora i micela. Suprotna naelektrisanja jonizujućih kiselih i baznih grupa, delimično preklopljene kiselinsko-bazne ravnoteže, kao i reverzibilna (*Z*)/(*E*) interkonverzija u vodenom rastvoru, ukazuju na složene elektrostatičke i hidrofobne, inter- i intramolekulske interakcije u prisustvu micela.
 - Podaci o pomeranju protolitičkih ravnoteža ACE inhibitora u prisustvu micela kao simulirajućih sistema biomembrana mogu doprineti boljoj proceni biofarmaceutskog i farmakokinetičkog ponašanja ovih lekova.
- Primenom reverzno-fazne tečne hromatografije ispitana je osetljivost ravnoteže (*Z*)/(*E*)-izomerizacije pet ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom na promene okruženja u rastvoru nastalog formiranjem micela anjonskih, katjonskih i nejonskih surfaktanata.
- Utvrđeni su optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje diastereoizomera, nakon uspostavljanja ravnoteže u rastvorima bez i u prisustvu surfaktanata. Pikovi su identifikovani na osnovu vremenski-zavisnih hromatograma i uočene su razlike u redosledu eluiranja izomera strukturno sličnih jedinjenja, enalapрила i ramipрила.
 - Dobijeni rezultati jasno ukazuju da izomeri pojedinačno stupaju u interakciju sa micelama i da posledično dolazi do pomeranja ravnoteže u rastvoru između (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera.
 - U prisustvu anjonskog surfaktanta SDS, uočeno je najveće pomeranje ravnoteže između (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera strukturno sličnih jedinjenja, kao što su enalapril, ramipril i perindopril, ali u suprotnom smeru.

- Katjonski surfaktant CTAB ispoljava najveći uticaj na ravnotežu izomerizacije perindopрила, dok nejonski surfaktant TX-100 nema značajnog uticaja na izomerizaciju ispitanih jedinjenja.
- Sprovedena je teorijska studija da bi se objasnile razlike u redosledu eluiranja diastereoizomera.
 - Molekulski deskriptori svih parova diastereoizomera izračunati su primenom ChemBio3D Ultra 13.0 i Dragon programa i najznačajniji rezultati dobijeni su za *Connolly Solvent-Excluded Volume* (SEV) deskriptor.
 - Vrednosti SEV potvrdile su potpuno suprotno hromatografsko ponašanje enalapрила i ramipрила, strukturno najbližnjih jedinjenja sa obrnutim redosledom eluiranja diastereoizomera. Veće vrednosti ovog deskriptora, koje ukazuju na slabije interakcije sa stacionarnom fazom, dobijene su za (*Z*)-diastereoizomer ramipрила i (*E*)-diastereoizomer enalapрила, što je u skladu sa eksperimentalno dobijenim rezultatima.
 - Može se zaključiti da postoji značajna razlika u hidrofobnoj površini i lipofilnosti između diastereoizomera, koja omogućava razdvajanje u hromatografskom HPLC sistemu.

6. LITERATURA

1. Bernstein K.E., Ong F.S., Blackwell W.B., Shah K.H., Giani J.F., Gonzalez-Villalobos R.A., Shen X.Z., Fuchs S. A. Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1–46
2. Brown N.J., Vaughan D.E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* **1998**, *97*, 1411-1420.
3. Cushman D.W., Ondetti M. A. Control of blood pressure by angiotensin blockade. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1980**, *1*, 260-263.
4. Smith A.I., Turner A.J. What's new in the renin-angiotensin system? *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2675–2676.
5. Danilczyka U., Eriksson U., Oudit G.Y., Penningera J.M. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2714–2719.
6. Sturrock E.D., Natesh R., van Rooyen J.M., Acharya K.R. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2677–2686.
7. Warner F.J., Smith A.I., Hooper N.M., Turner A.J. Angiotensin-converting enzyme-2: A molecular and cellular perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2704–2713.
8. Ferreira S.H., Bartelt D.C., Greene L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* **1970**, *9*, 2583-2593.
9. Lewis R.J., Garcia M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 790-802.
10. Natesh R., Schwager S.L.U., Sturrock E.D., Acharya, K.R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **2003**, *421*, 551–554.
11. Natesh R., Schwager S.L., Evans H.R., Sturrock E.D., Acharya K.R. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8718-8724.
12. Kim H.M., Shin D.R., Yoo O.J., Lee H., Lee J.O. Crystal structure of *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril. *FEBS Lett.* **2003**, *538*, 65-70.
13. Cushman D.W., Ondetti M.A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 1871-1877.
14. Cushman D.W., Ondetti M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **1991**, *17*, 589-592.

15. Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin - converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* **1977**, *196*, 441–444.
16. Acharya K.R., Sturrock E.D., Riordan J.F., Ehlers M.R.W. ACE revisited: A new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 2891–902.
17. Wyvratt M.J., Patchett A.A. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Med. Res. Rev.* **1985**, *5*, 483-531.
18. Andrews P.R., Carson J.M., Caselli A., Spark M.J., Woods R. Conformational analysis and active site modeling of angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 393–399.
19. Patchett A.A., Harris E., Tristram E.W., Wyvratt M.J., Wu M.T., Taub D., Peterson E.R., Ikeler T.J., ten Broeke J., Payne L.G., Ondeyka D.L., Thorsett E.D., Greenlee W.J., Lohr N.S., Hoffsommer R.D., Joshua H., Ruyle W.V., Rothrock J.W., Aster S.D., Maycock A.L., Robinson F.M., Hirschmann R., Sweet C.S., Ulm E.H., Gross D.M., Vassil T.C., Stone C.A. A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature* **1980**, *288*, 280–283
20. Hassall C.H., Kröhn A., Moody C.J., Thomas W.A.. The design and synthesis of new triazolo, pyrazolo-, and pyridazo-pyridazine derivatives as inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 155-164.
21. Gomez C., Berteina-Raboin S., De Nanteuil G., Guillaumet G. Perindopril and ramipril phosphonate analogues as a new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7216-7221.
22. Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W. Foyes' Principles of Medicinal Chemistry, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, **2013**.
23. Block J.H., Beale J.M. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, **2004**.
24. Gupta S.P. Quantitative structure-activity relationship studies on zinc-containing metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3042-3087.
25. Bünning P., Riordan J. F. The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme: implications for the enzyme mechanism. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *24*, 183-198.
26. Spyroulias G.A., Galanis A.S., Pairas G., Manessi-Zoupa E., Cordopatis, P. Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites:

conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 403-429.

27. Krapcho J., Turk C., Cushman D.W., Powell J.R., DeForrest J.M., Spitzmiller E.R., Karanewsky D.S., Duggan M., Rovnyak G., Schwartz J., Natarajan S., Godfrey J.D., Ryono D.E., Neubeck R., Atwal K.S., Petrillo E.W. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. Mercaptan, carboxyalkyl dipeptide, and phosphinic acid inhibitors incorporating 4-substituted prolines. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1148-1160.
28. Ranadive S.A., Chen A.X., Serajuddin A.T. Relative lipophilicities and structural-pharmacological considerations of various angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1480-1486.
29. Vovk I., Popović G., Simonovska B., Albrecht A., Agbaba D. Ultra-thin-layer chromatography mass spectrometry and thin-layer chromatography mass spectrometry of single peptides of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3089-3094.
30. Saran A., Srivastava S., Coutinho E. Conformation and macromolecular interaction of ACE inhibitors enalapril and lisinopril by NMR. *Eur. Journal. Pharm. Sci.* **1994**, *1*, 181-188.
31. Shoji A., Yanagida A., Shindo H., Ito Y., Shibusawa Y. Counter-current chromatographic estimation of hydrophobicity of *Z*-(*cis*) and *E*-(*trans*) enalapril and kinetics of *cis/trans* isomerization. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 101-107.
32. Ledger R., Stellwagen E. The sensitivity of the *cis/trans*-isomerization of enalapril and enalaprilat to solvent conditions. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 845-850.
33. Stellwagen E., Ledger R. Analysis of the isomeric composition of the proline peptide bond in an angiotensin-converting enzyme inhibitor using capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 167-173.
34. Dugave C., Demange L. *Cis-trans* isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475-2532.
35. Dugave C. *Cis-trans* Isomerization in Biochemistry. John Wiley & Sons, Weinheim, **2006**.
36. Sukumaran D.K., Prorok M., Lawrence D.S. A molecular constraint that generates a *cis* peptide bond. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 706-707.
37. Fischer S., Dunbrack Jr R.L., Karplus M. *Cis-trans* imide isomerization of the proline dipeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11931-11937.

38. Sui Q., Borchardt D., Rabenstein D.L. Kinetics and equilibria of *cis/trans* isomerization of backbone amide bonds in peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12042-12048.
39. Harrison R.K., Stein, R.L.. Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl *cis-trans* isomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3464-3471.
40. Wedemeyer W.J., Welker E., Scheraga H.A. Proline *cis-trans* isomerization and protein folding. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14637-14644.
41. Eberhardt E.S., Loh S.N., Raines R.T. Thermodynamic origin of prolyl peptide bond isomers. *Tetrahedron lett.* **1993**, *34*, 3055-3056.
42. Hasdenteufel F. Twenty Years of Separation of *Cis-Trans* (*Z*)-(*E*) Isomers. *Sep. Purif. Rev.* **2006**, *35*, 193-221.
43. Moore Jr A.W., Jorgenson J.W. Resolution of *cis* and *trans* isomers of peptides containing proline using capillary zone electrophoresis. *Anal. chem.* **1995**, *67*, 3464-3475.
44. Otani Y., Nagaie O., Naruse Y., Inagaki S., Ohno M., Yamaguchi K., Yamamoto G., Uchiyama M., Ohwada, T. An evaluation of amide group planarity in 7-azabicyclo [2.2.1] heptane amides. Low amide bond rotation barrier in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15191-15199.
45. Trapp O., Trapp G., Schurig V. Determination of the *cis-trans* isomerization barrier of enalaprilat by dynamic capillary electrophoresis and computer simulation. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 318-323.
46. Trapp O. Direct calculation of interconversion barriers in dynamic chromatography and electrophoresis: Isomerization of captopril. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 487-493.
47. Hansen S.H., Bjørnsdottir I., Tjørnelund J. Separation of cationic *cis-trans* (*Z-E*) isomers and diastereoisomers using non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1997**, *792*, 49-55.
48. Evans C.A., Rabenstein D.L. Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. II. Dependence of the acidity of the C-terminal carboxyl group on the conformation of the C-terminal peptide bond. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7312-7317.
49. Schiene-Fischer C., Fischer G. Direct measurement indicates a slow *cis/trans* isomerization at the secondary amide peptide bond of glycylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6227-6231.

50. Hur S., Bruice T.C. The mechanism of cis-trans isomerization of prolyl peptides by cyclophilin. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7303-7313.
51. Tzakos A.G., Gerothanassis I.P. Domain - Selective Ligand - Binding Modes and Atomic Level Pharmacophore Refinement in Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6*, 1089-1103.
52. Tzakos A.G., Naqvi N., Comporozos K., Pierattelli R., Theodorou V., Husain A., Gerothanassis I.P. The molecular basis for the selection of captopril cis and trans conformations by angiotensin I converting enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5084-5087.
53. Pascard C., Guilhem J., Vincent M., Remond G., Portevin B., Laubie M. Configuration and preferential solid-state conformations of perindoprilat (S-9780). Comparison with the crystal structures of other ACE inhibitors and conclusions related to structure-activity relationships. *J. Med. chem.* **1991**, *34*, 663-669.
54. Corradi H.R., Schwager S.L., Nchinda A.T., Sturrock E.D., Acharya K.R.. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 964-974.
55. Masuyer G., Schwager S.L., Sturrock E.D., Isaac R.E., Acharya K.R. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 717.
56. Mariappan S.S., Rabenstein D.L. Kinetics and thermodynamics of cis-trans isomerization of captopril and related compounds. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6675-6678.
57. Matsubara T., Ueta C. Computational Study of the Effects of Steric Hindrance on Amide Bond Cleavage. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 8664-8675.
58. Cahn R.S., Ingold C., Prelog V. Specification of molecular chirality. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1966**, *5*, 385-415.
59. Cahn R.S., Ingold C.K., Prelog V. The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. *Experientia* **1956**, *12*, 81-94.
60. Thuncke F., Kálmán A., Kálmán F., Ma S., Rathore A.S., Horváth C. Kinetic study on the cis-trans isomerization of peptidyl-proline dipeptides. *J. Chromatogr. A* **1996**, *744*, 259-272.
61. Nguyen K., Iskandar M., Rabenstein D.L. Kinetics and equilibria of cis/trans isomerization of secondary amide peptide bonds in linear and cyclic peptides. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3387-3392.

62. Breznik M., Grdadolnik S.G., Giester G., Leban I., Kikelj D. Influence of chirality of the preceding acyl moiety on the *cis/trans* ratio of the proline peptide bond. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7044-7050.
63. Jacobson J., Melander W., Vaisnys G., Horvath C. Kinetic study on *cis-trans* proline isomerization by high-performance liquid chromatography. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4536-4542.
64. Kang Y.K., Byun B.J. Conformational preferences and *cis-trans* isomerization of azaproline residue. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5377-5385.
65. Orlandini S., Gotti R., Giannini I., Pasquini B., Furlanetto S. Development of a capillary electrophoresis method for the assay of ramipril and its impurities: an issue of *cis-trans* isomerization. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2611-2617.
66. Skoglöf A., Nilsson I., Gustafsson S., Deinum J., Göthe P.O. *Cis-trans* isomerization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. An enzyme kinetic and nuclear magnetic resonance study. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1041*, 22-30.
67. Rabenstein D.L., Theriault Y. A nuclear magnetic resonance study of the formation and conformational equilibria of symmetrical and mixed disulfides of captopril. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 33-39.
68. Fei Z., Zhao D., Geldbach T.J., Scopelliti R., Dyson P.J. Brønsted acidic ionic liquids and their zwitterions: synthesis, characterization and pK_a determination. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4886-4893.
69. Cairns D. Essentials of pharmaceutical chemistry, 4th ed., Pharmaceutical Press, Great Britain, **2012**.
70. Manallack D.T., Prankerd R.J., Nassta G.C., Ursu O., Oprea T.I., Chalmers, D.K. A Chemogenomic Analysis of Ionization Constants—Implications for Drug Discovery. *Chem. Med. Chem.* **2013**, *8*, 242-255.
71. Peters J.U., Hert J., Bissantz C., Hillebrecht A., Gerebtzoff G., Bendels S., Tillier F., Migeon J., Fischer H., Guba W., Kansy M. Can we discover pharmacological promiscuity early in the drug discovery process? *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 325-335.
72. Manallack D.T. The acid–base profile of a contemporary set of drugs: implications for drug discovery. *SAR QSAR Environ. Res.* **2009**, *20*, 611-655.
73. Manallack D.T., Prankerd R.J., Yuriev E., Oprea T.I., Chalmers D.K. The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 485-496.

74. Manallack D.T. The pK_a distribution of drugs: application to drug discovery. *Perspect. Med. Chem.* **2007**, *1*, 25-38.
75. Avdeef A. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state, 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2012**.
76. Pagliara A., Carrupt P.A., Caron G., Gaillard P., Testa B. Lipophilicity profiles of ampholytes. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3385-3400.
77. Babić S., Horvat A.J., Pavlović D.M., Kaštelan-Macan M. Determination of pK_a values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 1043-1061.
78. Beltran J.L., Sanli N., Fonrodona G., Barron D., Özkan G., Barbosa J. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *484*, 253-264.
79. Kong X., Zhou T., Liu Z., Hider R.C. pH indicator titration: a novel fast pK_a determination method. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2777-2783.
80. Pfindt L.B., Popović G.V. A spectrophotometric method for the determination of equilibrium constants of the reversible 1, 4-benzodiazepine ring-opening reaction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1994**, *2*, 1845-1848.
81. Vojić M.P., Popović G.V., Sladić D.M., Pfindt L.B. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets. *J. Serb. Chem. Soc.* **2005**, *70*, 67-78.
82. Martínez C.H.R., Dardonville C. Rapid Determination of Ionization Constants (pK_a) by UV Spectroscopy Using 96-Well Microtiter Plates. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *4*, 142-145.
83. Batistela V.R., Pellosi D.S., de Souza F.D., da Costa W.F., de Oliveira Santin S.M., Souza V. R., Caetano W., Moises de Oliveira H.P., Scarminio I.S., Hioka N. pK_a determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV–Vis spectrophotometric data. *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *79*, 889-897.
84. Foulon C., Duhal N., Lacroix-Callens B., Vaccher C., Bonte J.P., Goossens J.F. Determination of pK_a values of benzoxa-, benzothia- and benzoselenazolinone derivatives by capillary electrophoresis: Comparison with potentiometric titration and spectrometric data. *Eur. Journal Pharm. Sci.* **2007**, *31*, 165-171.

85. Caliaro G.A., Herbots C.A. Determination of pK_a values of basic new drug substances by CE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 427-434.
86. Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T., Kajima T., Asakawa N. A rapid method for pK_a determination of drugs using pressure - assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 933-942.
87. Chaminade P., Baillet A., Ferrier D., Bourguignon B., Massart D.L. Efficient determination of the pK_a values of six chlorinated phenols by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *280*, 93-101.
88. Erdemgil F.Z., Şanlı S., Şanlı N., Özkan G., Barbosa J., Guiteras J., Beltran, J.L. Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta* **2007**, *72*, 489-496.
89. Gómez-Zaleta B., Ramírez-Silva M.T., Gutiérrez A., González-Vergara E., Güizado-Rodríguez M., Rojas-Hernández A. UV/vis, ^1H , and ^{13}C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pK_a values. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *64*, 1002-1009.
90. Bezencon J., Wittwer M.B., Cutting B., Smiesko M., Wagner B., Kansy M., Ernst B. pK_a determination by ^1H NMR spectroscopy - an old methodology revisited. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *93*, 147–155.
91. Andrasi M., Buglyo P., Zekany L., Gaspar A. A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 1040-1047.
92. Qiang Z., Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Res.* **2004**, *38*, 2874-2890.
93. Box K., Bevan C., Comer J., Hill A., Allen R., Reynolds D. High-throughput measurement of pK_a values in a mixed-buffer linear pH gradient system. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 883-892.
94. Martínez V., Maguregui M.I., Jiménez R.M., Alonso R.M. Determination of the pK_a values of β -blockers by automated potentiometric titrations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 459-468.
95. Jovanović M.S., Popović G., Kapetanović V., Orlić M., Vladimirov S. Determination of the ionization constants of 4-iodo-2, 6 - dimethylphenylcarbonylmethyl iminodiacetic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 1257-1261.

96. Crespo G.A., Ghahraman Afshar M., Bakker E. Direct detection of acidity, alkalinity, and pH with membrane electrodes. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10165-10169.
97. Aleksić M., Savić V., Popović G., Burić N., Kapetanović V. Acidity constants of cefetamet, cefotaxime and ceftriaxone; the effect of the substituent at C3 position. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 752-756.
98. Gans P., Sabatini A., Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
99. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to modern liquid chromatography, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2010**.
100. Corradini D. Handbook of HPLC, 2nd ed., Boca Raton, CRC Press, **2010**.
101. Lu K.P., Finn G., Lee T.H., Nicholson L.K. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 619-629.
102. Péter A., Tóth G. Chromatographic methods for the separation of enantiomers and epimers of β -alkyl amino acids and peptides containing them. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *352*, 335-356.
103. Ilisz I., Pataj Z., Aranyi A., Péter A. High-performance liquid chromatography of biologically important, small epimeric peptides and their l, d-amino acid content. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 287-298.
104. Krupcik J., Oswald P., Majek P., Sandra P., Armstrong D.W. Determination of the interconversion energy barrier of enantiomers by separation methods. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 779-800.
105. Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Péter A. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 28-41.
106. Wuttea A., Gübitz G., Friebe S., Krauss G.J. High-performance liquid chromatography of cis-trans isomers of proline-containing dipeptides: III. Comparative studies with different stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1994**, *677*, 186-191.
107. Melander W.R., Jacobson J., Horváth C. Effect of molecular structure and conformational change of proline-containing dipeptides in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A* **1982**, *234*, 269-276.

108. Gustafsson S., Eriksson B.M., Nilsson I. Multiple peak formation in reversed-phase liquid chromatography of ramipril and ramiprilate. *J. Chromatogr. A* **1990**, 506, 75-83.
109. Kocijan A., Kocjan D., Zupančič-Kralj L. Effect of column temperature on the behaviour of some angiotensin converting enzyme inhibitors during high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, 755, 229-235.
110. Trapp O. The unified equation for the evaluation of first order reactions in dynamic electrophoresis. *Electrophoresis* **2006**, 27, 534-541.
111. Trapp O. Unified equation for access to rate constants of first-order reactions in dynamic and on-column reaction chromatography. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 189-198.
112. Rabenstein D.L., Isab A.A. Conformational and acid-base equilibriums of captopril in aqueous solution. *Anal. Chem.* **1982**, 54, 526-529.
113. Bouabdallah S., Trabelsi H., Bouzouita K., Sabbah S. Reversed-phase liquid chromatography of lisinopril conformers. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, 54, 391-405.
114. Bouabdallah S., Trabelsi H., Dhia M.B., Hamida N.B. Kinetic Study on the Isomerization of Perindopril by HPLC. *Chromatographia* **2012**, 75, 1247-1255.
115. Bouabdallah S., Trabelsi H., Dhia T.B., Sabbah S., Bouzouita K., Khaddar R. RP-HPLC and NMR study of cis–trans isomerization of enalaprilat. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 31, 731-741.
116. Trabelsi H., Bouabdallah S., Sabbah S., Raouafi F., Bouzouita K. Study of the cis–trans isomerization of enalapril by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, 871, 189-199.
117. Šalamoun J., Šlais K. Elimination of peak splitting in the liquid chromatography of the proline-containing drug enalapril maleate. *J. Chromatogr. A* **1991**, 537, 249-257.
118. Zacharis C.K., Karakosta T.D., Tzanavaras P.D., Rigas P.G., Themelis D.G. Chromatographic behavior of the biologically active proline derivative captopril on particulate, monolithic and core–shell narrow bore columns. *Anal. Methods* **2012**, 4, 4373-4377.
119. Hanyšová L., Vaclavkova M., Dohnal J., Klimeš J. Stability of ramipril in the solvents of different pH. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 1179-1183.

120. Myers D. Surfactant science and technology. 3rd ed., Wiley- Interscience: Hoboken, NJ, **2006**.
121. Zana R. Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases (Vol. 125). Boca Raton, CRC press, **2005**.
122. Cui X., Mao S., Liu M., Yuan H., Du Y. Mechanism of surfactant micelle formation. *Langmuir* **2008**, *24*, 10771-10775.
123. Feng Y., Chu Z., Dreiss C.A. Smart Wormlike Micelles: Design, Characteristics and Applications. Springer, Berlin Heidelberg, **2015**.
124. Manzo G., Carboni M., Rinaldi A.C., Casua, M., Scorciapino M.A. Characterization of sodium dodecylsulphate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51*, 176–183.
125. MacKerell Jr A.D. Molecular dynamics simulation analysis of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution: decreased fluidity of the micelle hydrocarbon interior. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1846-1855.
126. Mosquera V., del Rí J.M., Attwood D., Garcí M., Jones M.N., Prieto G., Suarez M.J., Sarmiento F. A study of the aggregation behavior of hexyltrimethylammonium bromide in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *206*, 66–76.
127. Bruce C.D., Berkowitz M.L., Perera L., Forbes M.D. Molecular dynamics simulation of sodium dodecyl sulfate micelle in water: micellar structural characteristics and counterion distribution. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3788-3793.
128. Rangel-Yagui C.O., Pessoa Jr A., Tavares L.C. Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2005**, *8*, 147-163.
129. Han H.K., Amidon G.L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharm. Sci.* **2000**, *2*, 48-58.
130. Rao V.M., Nerurkar M., Pinnamaneni S., Rinaldi F., Raghavan K. Co-solubilization of poorly soluble drugs by micellization and complexation. *Int. J. Pharm.* **2006**, *319*, 98-106.
131. Sarkar D., Ghosh D., Das P., Chattopadhyay N. Electrostatic pushing effect: a prospective strategy for enhanced drug delivery. *J. Physical Chem. B* **2010**, *114*, 12541-12548.

132. Oakes J., Gratton P. Solubilisation of dyes by surfactant micelles. Part 1; Molecular interactions of azo dyes with nonionic and anionic surfactants. *Color. Technol.* **2003**, *119*, 91-99.
133. Chakraborty S., Shukla D., Jain A., Mishra B., Singh S. Assessment of solubilization characteristics of different surfactants for carvedilol phosphate as a function of pH. *J. Colloid Interf. Sci.* **2009**, *335*, 242-249.
134. Iwunze M.O. Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. *J. Mol. Liq.* **2004**, *111*, 161-165.
135. De Castro B., Gameiro P., Guimarães C., Lima J.L., Reis S. Fluorimetric and solubility studies of nadolol and atenolol in SDS micelles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 573-577.
136. Jain A., Ran Y., Yalkowsky S.H. Effect of pH-sodium lauryl sulfate combination on solubilization of PG-300995 (an anti-HIV agent): a technical note. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2004**, *5*, 65-67.
137. Waters L.J., Hussain T., Parkes G.M. Titration calorimetry of surfactant–drug interactions: Micelle formation and saturation studies. *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *53*, 36-41.
138. Vautier-Giongo C., Yihwa C., Moreira P.F., Lima J.C., Freitas A.A., Alves M., Quina F.H., Maçanita A.L. Manipulation of the reactivity of a synthetic anthocyanin analogue in aqueous micellar media. *Langmuir* **2002**, *18*, 10109-10115.
139. Khosravi D. Drug-surfactant interactions: effect on transport properties. *Int. J. Pharm.* **1997**, *155*, 179-190.
140. Tatikolov A.S., Costa S.M. Effects of normal and reverse micellar environment on the spectral properties, isomerization and aggregation of a hydrophilic cyanine dye. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *346*, 233-240.
141. Caetano W., Tabak M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies. *J. Colloid Int. Sci.* **2000**, *225*, 69-81.
142. Caetano W., Tabak M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, *55*, 2513-2528.
143. Enache M., Volanschi E. Spectroscopic investigations of the molecular interaction of anticancer drug mitoxantrone with non - ionic surfactant micelles. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 688-696.

144. Jaiswal P.V., Ijeri V.S., Srivastava A.K. Effect of surfactants on the dissociation constants of ascorbic and maleic acids. *Colloid. Surface. B* **2005**, *46*, 45-51.
145. Popović G., Čakar M., Agbaba D. Acid–base equilibria and solubility of loratadine and desloratadine in water and micellar media. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 42-47.
146. Lima J.C., Vautier-Giongo C., Lopes A., Melo E., Quina F.H., Maçanita A.L. Color stabilization of anthocyanins: Effect of SDS micelles on the acid-base and hydration kinetics of malvidin 3-glucoside (Oenin). *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5851-5859.
147. Gerakis A.M., Koupparis M. A., Efstathiou C.E. Micellar acid–base potentiometric titrations of weak acidic and/or insoluble drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 33-41.
148. Xi J., Guo R. Acid–base equilibrium of puerarin in CTAB micelles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 111-118.
149. De Castro B., Domingues V., Gameiro P., Lima J.L., Oliveira A., Reis S. Acid–base properties and solubility of pindolol, diazepam and chlordiazepoxide in SDS micelles. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 67-75.
150. De Castro B., Gameiro P., Guimarães C., Lima J.L., Reis S. Acid/base properties of β - blockers and benzodiazepines in sodium dodecyl sulfate micelles. A spectrophotometric and potentiometric study. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 356-359.
151. De Castro B., Gameiro P., Lima J.L., Matos C., Reis S. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid–base and solubility studies. *Mat. Sci. Eng. C* **2001**, *18*, 71-78.
152. Niazi A., Ghalie M., Yazdanipour A., Ghasemi J. Spectrophotometric determination of acidity constants of Alizarine Red S in water, water-Brij-35 and water-SDS micellar media solutions. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *64*, 660-664.
153. Gholivand M.B., Ghasemi J.B., Saaidpour S., Mohajeri A. Spectrophotometric study of the effects of surfactants and ethanol on the acidity constants of fluorescein. *Spectrochim. Acta, Part A* **2008**, *71*, 1158-1165.
154. Underwood A. L. Acid–base titrations in aqueous micellar systems. *Anal. Chim. Acta* **1977**, *93*, 267-273.
155. Pelizzetti E., Pramauro E. Acid-base titrations of substituted benzoic acids in micellar systems. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *117*, 403-406.

156. Morrow B.H., Wang Y., Wallace J.A., Koenig P.H., Shen J.K. Simulating pH titration of a single surfactant in ionic and nonionic surfactant micelles. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14980-14990.
157. Bunton C.A., Minch M.J. Micellar effects on the ionization of carboxylic acids and interactions between quaternary ammonium ions and aromatic compounds. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 1490-1498.
158. Tiwari S., Ghosh K.K., Marek J., Kuca K. Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Some Oxime-Based r-Nucleophiles *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 1153–1157.
159. Fendler J.H. Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 877-899.
160. Fendler J.H. Microemulsions, micelles, and vesicles as media for membrane mimetic photochemistry. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1485-1491.
161. Garavito R.M., Ferguson-Miller S. Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32403-32406.
162. Dürr U.H., Soong R., Ramamoorthy A. When detergent meets bilayer: birth and coming of age of lipid bicelles. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2013**, *69*, 1-22.
163. Mahiuddin S., Zech O., Raith S., Touraud D., Kunz W. Catanionic micelles as a model to mimic biological membranes in the presence of anesthetic alcohols. *Langmuir* **2009**, *25*, 12516–12521.
164. Avellone G., Bongiorno D., Ceraulo L., Ferrugia M., Liveri V.T. Interactions of tryptophan and serotonin with biomembrane models: binding to reversed micellar systems of ionic and non ionic surfactants. *Boll. Chim. Farm.* **2001**, *140*, 254–257.
165. Yushmanov V.E., Perussi J.R., Imasato H., Tabak M. Interaction of papaverine with micelles of surfactants with different charge studied by ¹H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1994**, *1189*, 74–80.
166. Pereira-Leite C., Nunes C., Reis S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: in vitro assessment and relevance for their biological actions. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 571-584.
167. Pereira-Leite C., Carneiro C., Soares J.X., Afonso C., Nunes C., Lúcio M., Reis S. Biophysical characterization of the drug–membrane interactions: The case of propranolol and acebutolol. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 183-191.

168. Pinheiro M., Silva A.S., Pisco S., Reis S. Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *183*, 184-190.
169. Ghosh D., Chattopadhyay N. Equilibrium and dynamic effects on ligand binding to biomacromolecules and biomimetic model systems. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *32*, 435-466.
170. Gierasch L.M., Lacy J.E., Anderle G., Lalancette R., Mendelsohn R. Spectroscopic studies of a hydrophobic peptide in membranelike environments. *Biopolymers* **1983**, *22*, 381-385.
171. Bruch M.D., Rizo J., Gierasch L.M. Impact of a micellar environment on the conformations of two cyclic pentapeptides. *Biopolymers*, **1992**, *32*, 1741-1754.
172. Nunes C., Brezesinski G., Lopes D., Lima J.L., Reis S., Lúcio M. Lipid–drug interaction: biophysical effects of tolmetin on membrane mimetic systems of different dimensionality. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12615-12623.
173. De Maria P., Fontana A., Gasbarri C., Siani G. The effects of cationic and zwitterionic micelles on the keto–enol interconversion of 2-phenylacetylfuran and 2-phenylacetylthiophene. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7176-7183.
174. Kirkpatrick F.H., Howard E.S. Effect of anionic surfactants, nonionic surfactants and neutral salts on the conformation of spin-labeled erythrocyte membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1973**, *298*, 209-218.
175. Gao X., Wong T.C. NMR studies of adrenocorticotropin hormone peptides in sodium dodecylsulfate and dodecylphosphocholine micelles: proline isomerism and interactions of the peptides with micelles. *Biopolymers* **2001**, *58*, 20-32.
176. Kramer M.L., Fischer G. FKBP - like catalysis of peptidyl - prolyl bond isomerization by micelles and membranes. *Biopolymers* **1997**, *42*, 49-60.
177. Vinogradov A.M., Tatikolov A.S., Costa S.M. The effect of anionic, cationic and neutral surfactants on the photophysics and isomerization of 3, 3' diethylthiacarbocyanine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4325-4332.
178. Iglesias E. Enolization of Benzoylacetone in aqueous surfactant Solutions: a novel method for determining enolization constants. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12592-12599.
179. O'Connor C.J., Fendler E.J., Fendler J.H. Catalysis by reversed micelles in nonpolar solvents. Trans-cis isomerization of bis (oxalato) diaquochromate (III). *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 370-375.

180. Dignam J.D., Qu X., Ren J., Chaires J.B. Daunomycin binding to detergent micelles: a model system for evaluating the hydrophobic contribution to drug-DNA interactions. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11576-11584.
181. Schreier S., Malheiros S.V., de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2000**, *1508*, 210-234.
182. Taboada P., Attwood D., Ruso J.M., García M., Sarmiento F., Mosquera V. Influence of molecular structure on the ideality of mixing in micelles formed in binary mixtures of surface-active drugs. *Journal of colloid and interface science*, **1999**, *216*, 270-275.
183. Attwood D., Mosquera V., Lopez-Fontan J.L., Garcia M., Sarmiento F. Self-association of phenothiazine drugs: influence of the counterion on the mode of association. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184*, 658-662.
184. Caetano W., Tabak M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225*, 69-81.
185. Mahajan S., Mahajan R.K. Interactions of phenothiazine drugs with surfactants: a detailed physicochemical overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2013**, *199*, 1-14.
186. Alam M.S., Naqvi A.Z., Kabir-ud-Din. Surface and micellar properties of some amphiphilic drugs in the presence of additives. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 1326-1331.
187. Sarkar A., Banerjee P., Bhattacharya S.C. Substituent effect on the emission behavior of thiazolidinedione derivatives in cationic and anionic micellar media. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *329*, 160-166.
188. Kaushal D., Rana D.S., Chauhan M.S., Umar A., Chauhan S. The effect of sodium dodecyl sulphate on Furosemide—A cardiovascular drug in water-methanol at different temperature. *J. Mol. Liq.* **2013**, *188*, 237-244.
189. Chauhan S., Chauhan M.S., Kaushal D., Syal V.K., Jyoti J. Study of micellar behavior of SDS and CTAB in aqueous media containing furosemide—a cardiovascular drug. *J. Solution Chem.* **2010**, *39*, 622-638.
190. Kumar B., Ghosh K.K., Dafonte P.R. Comparative study of the cationic surfactants and their influence on the alkaline hydrolysis of acetylsalicylic acid. *Int. J. Chem. Kinet.* **2011**, *43*, 1-8.

191. Kaushal D., Rana D.S., Chauhan M.S., Chauhan S. A physicochemical study of SDS in aqueous solution of Furosemide: Effect of DMSO on surfactant-Furosemide interaction. *Fluid Phase Equilibr.* **2013**, 355, 123-129.
192. Mehta S.K., Bhasin K.K., Kumar A., Dham S. Micellar behavior of dodecyldimethylethyl ammonium bromide and dodecyltrimethylammonium chloride in aqueous media in the presence of diclofenac sodium. *Colloids Surf. A* **2006**, 278, 17-25.
193. Liu W., Guo R. Interaction between flavonoid, quercetin and surfactant aggregates with different charges. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 302, 625-632.
194. Balgavý P., Devínsky F. Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, 66, 23-63.
195. Alam M.S., Mandal A.B. Thermodynamic studies on mixed micellization of amphiphilic drug amitriptyline hydrochloride and nonionic surfactant Triton X-100. *J. Mol. Liq.* **2012**, 168, 75-79.
196. Leis D., Barbosa S., Attwood D., Taboada P., Mosquera V. Influence of the pH on the complexation of an amphiphilic antidepressant drug and human serum albumin. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 9143-9150.
197. Alam M.S., Ghosh G., Mandal A.B. Aggregation behavior and interaction of an amphiphilic drug imipramine hydrochloride with cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide: Light scattering studies. *Colloids Surf. B* **2011**, 88, 779-784.
198. Bai G., Santos L.M., Nichifor M., Lopes A., Bastos M. Thermodynamics of the interaction between a hydrophobically modified polyelectrolyte and sodium dodecyl sulfate in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 405-413.
199. Chakraborty H., Sarkar M. Interaction of piroxicam with micelles: effect of hydrophobic chain length on structural switchover. *Biophys. Chem.* **2005**, 117, 79-85.
200. Caetano W., Barbosa L.R., Itri R., Tabak M. Trifluoperazine effects on anionic and zwitterionic micelles: a study by small angle X-ray scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 260, 414-422.
201. Abu-Zahra T.N., Wolkoff A.W., Kim R.B., Pang K.S. Uptake of enalapril and expression of organic anion transporting polypeptide 1 in zonal, isolated rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, 28, 801-806.
202. Cramer C.J. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. John Wiley & Sons. **2013**.

203. Lewars E. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer Science & Business Media. **2010**.
204. Hinchliffe A. Chemical modelling: applications and theory (Vol. 5). Royal Society of Chemistry, Great Britain, **2008**.
205. Koch W., Holthausen M.C., Holthausen M.C. A chemist's guide to density functional theory (Vol. 2). Weinheim: Wiley-Vch, **2001**.
206. Politzer P., Seminario J.M. Modern density functional theory: a tool for chemistry: a tool for chemistry. Elsevier, **1995**.
207. Kohanoff J., Gidopoulos N.I. Density functional theory: basics, new trends and applications. Handbook of molecular physics and quantum chemistry 2, Wiley, West Sussex, **2003**, 532-568
208. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Calabrese J.R., Montgomery Jr J.A., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Oldham H.N., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Choi J.H., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Van Der Molen M.K., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Bakken V., Macera C.A., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Aquino A.J.A., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Lee K.M., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Li S.D., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Han D.K.M., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Zakrzewski J.V.O., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B.W.C., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc, Wallingford, **2004**.
209. Shi J.Q., Choi, T. Gaussian process regression analysis for functional data. Taylor and Francis: CRC Press, **2011**.
210. Todeschini R., Consonni V. Molecular Descriptors for Chemoinformatics, Volume 41, John Wiley & Sons, Weinheim, **2009**.
211. Irving H.M., Miles M.G., Pettit L.D. A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal. Chim. Acta* **1967**, 38, 475-488.
212. Albert A., Serjeant E.P. The Determination of Ionization Constants, 3rd ed., Chapman and Hall: London, **1984**.

213. Wróbel R., Chmurzyński L. Potentiometric pK_a determination of standard substances in binary solvent systems. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *405*, 303-308.
214. Völgyi G., Ruiz R., Box K., Comer J., Bosch E., Takács-Novák K. Potentiometric and spectrophotometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in a new cosolvent system. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 418-428.
215. Becke A.D. Density - functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
216. Lee C., Yang W., Parr R.G. Colle-Savetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
217. ChemBio3D Ultra, Version 13.0 CambridgeSoft Corporation. Cambridge, **2012**.
218. DRAGON (Software for Molecular Descriptor Calculation) Version 6.0 **2010** Talete srl; <http://www.talete.mi.it/>
219. Cossi M., Scalmani G., Rega N., Barone V. New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 43-54.
220. Remko M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors. *Chem. Pap.* **2007**, *61*, 133-141.
221. Hillaert S., Van den Bossche, W. Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin converting enzyme. *J. Chromatogr. A* **2000**, *895*, 33-42.
222. Niazi A., Ghasemi N. PARAFAC and PLS applied to determination of captopril in pharmaceutical preparation and biological fluids by ultraviolet spectrophotometry. *Ann. Chim., Rome* **2007**, *97*, 845-858.
223. Gikas S., Tsopelas F., Giaginis C., Dimitrakopoulos J., Livadara T., Archontaki H., Tsantili-Kakoulidou A. Chromatographic behavior of zwitterionic enalapril - exploring the conditions for lipophilicity assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 739-743.
224. Avdeef A., Berger C.M. pH-Metric solubility. 3. Dissolution titration template method for solubility determination. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 281-291.
225. Bennion C., Brown R.C., Cook A.R., Manners C.N., Payling D.W., David H., Robinson D.H. Design, synthesis, and physicochemical properties of a novel, conformationally restricted 2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazole-containing angiotensin converting enzyme inhibitor which is preferentially eliminated by the biliary route in rats *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 439-447

226. Gonzalez E.B., Farkas E., Soudi A.A., Tan T., Yanovsky A.I., Nolan K.B. Metal complexes of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril. Solution studies and the crystal and molecular structure of a dimeric copper(II)–lisinopril complex. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2377–2379.
227. Ip D.P., De Marco J.D., Brooks M.A. Lisinopril. Analytical Profiles of Drug Substances **1992**, 21, 223–276.
228. Kiang Y.H., Huq A., Stephens P.W., Xu W. Structure determination of enalapril maleate form II from high - resolution X - ray powder diffraction data. *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, 1844-1853.
229. Qin X.Z., Ip D.P., Tsai, E.W. Determination and rotamer separation of enalapril maleate by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1992**, 626, 251-258.
230. Sorrenti M., Catenacci L., Cruickshank D.L., Caira M.R. Lisinopril Dihydrate: Single - Crystal X - Ray Structure and Physicochemical Characterization of Derived Solid Forms. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102, 3596-3603.
231. Fujii K., Uekusa H., Itoda N., Yonemochi E., Terada K. Mechanism of dehydration–hydration processes of lisinopril dihydrate investigated by ab initio powder X-ray diffraction analysis. *Cryst. Growth Des.* **2012**, 12, 6165-6172.
232. Sakamoto Y., Ishii T., Oonishi I., Ohmoto, T. Conformational analysis of Ramipril (HOE 498) in a solution by NMR. *J. Mol. Struct.* **1991**, 245, 379-389.
233. Remko M., Bojarska J., Ježko P., Sieroń L., Olczak A., Maniukiewicz W. Crystal and molecular structure of perindopril erbumine salt. *J. Mol. Struct.* **2011**, 997, 103-109.
234. Connolly M.L. Computation of molecular volume. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 1118-1124.
235. Richmond T.J. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins: Analytical equations for overlapping spheres and implications for the hydrophobic effect. *J. Mol. Biol.* **1984**, 178, 63-89.

7. PRILOG

PRILOG A: Eksperimentalni podaci

Tabela 11: Određivanje korekcionog faktora A potenciometrijskom titracijom rastvora jonske sile 0,1 M NaCl ($V=40$ ml, temperatura 25 °C), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M).

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,00	2,89	2,66
0,02	2,90	2,67
0,04	2,91	2,68
0,06	2,92	2,69
0,08	2,93	2,70
0,10	2,94	2,71
0,12	2,95	2,72
0,14	2,96	2,73
0,16	2,97	2,74
0,18	2,98	2,75
0,20	2,99	2,76
0,22	3,00	2,77
0,24	3,01	2,78
0,26	3,02	2,79
0,28	3,03	2,80
0,30	3,05	2,82
0,32	3,06	2,83
0,34	3,07	2,84
0,36	3,08	2,85
0,38	3,10	2,87
0,40	3,11	2,88
0,42	3,13	2,90
0,44	3,14	2,91
0,46	3,16	2,93
0,48	3,17	2,94
0,50	3,19	2,96
0,52	3,21	2,98
0,54	3,23	2,99
0,56	3,25	3,01
0,58	3,27	3,03
0,60	3,29	3,05
0,62	3,31	3,07
0,64	3,33	3,10
0,66	3,36	3,12
0,68	3,39	3,15
0,70	3,41	3,17
0,72	3,44	3,20
0,74	3,48	3,23
0,76	3,51	3,27
0,78	3,55	3,30
0,80	3,59	3,34

Tabela 11 nastavak:

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,82	3,63	3,39
0,84	3,68	3,44
0,86	3,74	3,49
0,88	3,81	3,55
0,90	3,88	3,62
0,92	3,98	3,71
0,94	4,10	3,81
0,96	4,27	3,96
0,98	4,53	4,17
1,00	5,16	4,56
1,02	5,87	5,22
1,04	7,46	6,06
1,06	9,16	7,38
1,08	9,53	8,83
1,10	9,71	9,76
1,12	9,83	10,12
1,14	9,94	10,23
1,16	10,02	10,31
1,18	10,09	10,38

Tabela 12. Određivanje korekcionog faktora A potenciometrijskom titracijom smeše metanol - voda (40:60 w/w), kojoj je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). ($V=40$ ml, jonska sila 0,1 M NaCl, temperatura 25 °C).

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,00	2,84	2,84
0,02	2,85	2,85
0,04	2,86	2,86
0,06	2,87	2,87
0,08	2,88	2,88
0,10	2,89	2,89
0,12	2,90	2,89
0,14	2,91	2,90
0,16	2,92	2,91
0,18	2,93	2,93
0,20	2,94	2,94
0,22	2,95	2,95
0,24	2,96	2,96
0,26	2,97	2,97
0,28	2,98	2,98
0,30	3,00	2,99
0,32	3,01	3,01
0,34	3,02	3,02
0,36	3,04	3,03
0,38	3,05	3,05
0,40	3,06	3,06
0,42	3,08	3,07
0,44	3,09	3,09
0,46	3,11	3,11
0,48	3,12	3,12
0,50	3,14	3,14
0,52	3,16	3,15
0,54	3,18	3,17
0,56	3,20	3,19
0,58	3,22	3,21
0,60	3,24	3,23
0,62	3,26	3,26
0,64	3,28	3,28
0,66	3,31	3,30
0,68	3,33	3,33
0,70	3,36	3,36
0,72	3,39	3,38
0,74	3,42	3,42
0,76	3,46	3,45
0,78	3,50	3,49
0,80	3,54	3,53
0,82	3,58	3,57
0,84	3,63	3,62

Tabela 12 nastavak:

ml	pH	
NaOH	proba 1	proba 2
0,86	3,69	3,68
0,88	3,75	3,74
0,90	3,83	3,82
0,92	3,92	3,91
0,94	4,04	4,02
0,96	4,20	4,17
0,98	4,44	4,39
1,00	4,82	4,74
1,02	5,25	5,15
1,04	5,85	5,70
1,06	6,80	6,56
1,08	7,91	7,67
1,10	9,05	8,83
1,12	9,87	9,72
1,14	10,38	10,31
1,16	10,67	10,64
1,18	10,81	10,80
1,20	10,88	10,87
1,22	10,93	10,92
1,24	10,97	10,96
1,26	11,01	11,00
1,28	11,04	11,04

Tabela 13. Određivanje korekcionog faktora A potenciometrijskom titracijom smeše metanol - voda (45:55 w/w), kojoj je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH (c=0,09920 M). (Zapremina 40 ml, jonska sila 0,1 M NaCl, temperatura 25 °C).

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,00	2,83	2,83
0,02	2,84	2,84
0,04	2,85	2,85
0,06	2,86	2,86
0,08	2,87	2,87
0,10	2,88	2,88
0,12	2,89	2,89
0,14	2,90	2,90
0,16	2,91	2,91
0,18	2,92	2,92
0,20	2,93	2,93
0,22	2,94	2,94
0,24	2,95	2,95
0,26	2,97	2,97
0,28	2,98	2,98
0,30	2,99	2,99
0,32	3,00	3,00
0,34	3,02	3,02
0,36	3,03	3,03
0,38	3,04	3,04
0,40	3,06	3,06
0,42	3,07	3,07
0,44	3,09	3,09
0,46	3,10	3,10
0,48	3,12	3,12
0,50	3,13	3,13
0,52	3,15	3,15
0,54	3,17	3,17
0,56	3,19	3,19
0,58	3,21	3,21
0,60	3,23	3,23
0,62	3,25	3,25
0,64	3,27	3,27
0,66	3,30	3,30
0,68	3,32	3,32
0,70	3,35	3,35
0,72	3,38	3,38
0,74	3,41	3,41
0,76	3,44	3,44
0,78	3,48	3,48
0,80	3,52	3,52
0,82	3,57	3,57
0,84	3,61	3,61

Tabela 13 nastavak:

ml	pH	
	NaOH	proba 1 proba 2
0,86	3,67	3,67
0,88	3,73	3,73
0,90	3,80	3,80
0,92	3,89	3,89
0,94	4,00	4,00
0,96	4,15	4,15
0,98	4,36	4,36
1,00	4,68	4,68
1,02	5,12	5,12
1,04	5,66	5,66
1,06	6,52	6,52
1,08	7,66	7,66
1,10	8,80	8,80
1,12	9,70	9,70
1,14	10,26	10,26
1,16	10,55	10,55
1,18	10,70	10,70

Tabela 14. Određivanje korekcionog faktora A potenciometrijskom titracijom smeše metanol - voda (50:50 m/m), kojoj je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH (c=0,09920 M). (Zapremina 40 ml, jonska sila 0,1 M NaCl, temperatura 25 °C).

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,00	2,85	2,85
0,02	2,86	2,86
0,04	2,87	2,87
0,06	2,88	2,88
0,08	2,89	2,89
0,10	2,90	2,90
0,12	2,91	2,91
0,14	2,92	2,92
0,16	2,93	2,93
0,18	2,94	2,94
0,20	2,95	2,95
0,22	2,96	2,96
0,24	2,97	2,97
0,26	2,98	2,98
0,28	2,99	3,00
0,30	3,01	3,01
0,32	3,02	3,02
0,34	3,03	3,03
0,36	3,05	3,05
0,38	3,06	3,06
0,40	3,07	3,07
0,42	3,09	3,09
0,44	3,10	3,10
0,46	3,12	3,12
0,48	3,13	3,14
0,50	3,15	3,15
0,52	3,17	3,17
0,54	3,19	3,19
0,56	3,21	3,21
0,58	3,23	3,23
0,60	3,25	3,25
0,62	3,27	3,27
0,64	3,29	3,29
0,66	3,32	3,32
0,68	3,34	3,34
0,70	3,37	3,37
0,72	3,40	3,40
0,74	3,43	3,43
0,76	3,46	3,46
0,78	3,50	3,50
0,80	3,54	3,54
0,82	3,59	3,59
0,84	3,63	3,64

Tabela 14 nastavak:

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,86	3,69	3,69
0,88	3,75	3,75
0,90	3,83	3,83
0,92	3,91	3,92
0,94	4,03	4,02
0,96	4,17	4,17
0,98	4,39	4,39
1,00	4,72	4,72
1,02	5,15	5,15
1,04	5,70	5,70
1,06	6,53	6,56
1,08	7,57	7,59
1,10	8,67	8,67
1,12	9,57	9,58
1,14	10,17	10,14
1,16	10,52	10,49
1,18	10,70	10,69

Tabela 15. Određivanje korekcionog faktora A potenciometrijskom titracijom smeše metanol - voda (55:45 m/m), kojoj je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH (c=0,09920 M). (Zapremina 40 ml, jonska sila 0,1 M NaCl, temperatura 25 °C).

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,00	2,90	2,90
0,02	2,91	2,91
0,04	2,92	2,92
0,06	2,93	2,93
0,08	2,94	2,94
0,10	2,95	2,95
0,12	2,96	2,95
0,14	2,97	2,96
0,16	2,98	2,97
0,18	2,99	2,99
0,20	3,00	3,00
0,22	3,01	3,01
0,24	3,03	3,02
0,26	3,04	3,03
0,28	3,05	3,04
0,30	3,06	3,06
0,32	3,07	3,07
0,34	3,09	3,08
0,36	3,10	3,09
0,38	3,11	3,11
0,40	3,13	3,12
0,42	3,14	3,14
0,44	3,16	3,15
0,46	3,17	3,17
0,48	3,19	3,18
0,50	3,21	3,20
0,52	3,22	3,22
0,54	3,24	3,24
0,56	3,26	3,26
0,58	3,28	3,28
0,60	3,30	3,30
0,62	3,32	3,32
0,64	3,35	3,34
0,66	3,37	3,37
0,68	3,40	3,39
0,70	3,42	3,42
0,72	3,45	3,45
0,74	3,49	3,48
0,76	3,52	3,52
0,78	3,56	3,56
0,80	3,60	3,60
0,82	3,64	3,64
0,84	3,69	3,69

Tabela 15 nastavak:

ml NaOH	pH	
	proba 1	proba 2
0,86	3,75	3,75
0,88	3,81	3,81
0,90	3,89	3,89
0,92	3,98	3,98
0,94	4,09	4,09
0,96	4,24	4,24
0,98	4,46	4,46
1,00	4,79	4,80
1,02	5,21	5,22
1,04	5,75	5,76
1,06	6,56	6,56
1,08	7,61	7,58
1,10	8,70	8,63
1,12	9,63	9,52
1,14	10,27	10,15
1,16	10,65	10,54
1,18	10,84	10,78
1,2	10,929	10,91
1,22	10,984	10,99
1,24	11,028	11,04
1,26	11,068	11,08
1,28	11,104	11,08

Tabela 16. Potenciometrijska titracija rastvora zofenopril-kalcijuma ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	H ₂ O		SDS		CTAB		TX 100
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1
0,00	2,90	2,88	2,95	2,98	2,74	2,72	2,93
0,02	2,92	2,90	2,97	2,98	2,75	2,74	2,95
0,04	2,93	2,92	2,99	2,99	2,77	2,75	2,97
0,06	2,95	2,93	3,01	3,01	2,78	2,76	2,99
0,08	2,97	2,95	3,03	3,02	2,79	2,77	3,02
0,10	2,99	2,97	3,05	3,04	2,80	2,79	3,04
0,12	3,00	2,99	3,07	3,06	2,82	2,80	3,06
0,14	3,02	3,00	3,09	3,08	2,83	2,81	3,09
0,16	3,04	3,03	3,12	3,10	2,85	2,82	3,12
0,18	3,06	3,05	3,14	3,13	2,86	2,84	3,15
0,20	3,08	3,07	3,17	3,16	2,88	2,85	3,18
0,22	3,11	3,09	3,20	3,18	2,90	2,87	3,21
0,24	3,13	3,11	3,23	3,21	2,91	2,89	3,25
0,26	3,16	3,14	3,27	3,25	2,93	2,90	3,29
0,28	3,18	3,17	3,30	3,28	2,95	2,92	3,33
0,30	3,21	3,19	3,34	3,32	2,97	2,94	3,37
0,32	3,24	3,22	3,39	3,36	2,98	2,95	3,42
0,34	3,27	3,25	3,44	3,40	3,00	2,97	3,47
0,36	3,30	3,28	3,49	3,45	3,02	2,99	3,52
0,38	3,34	3,32	3,55	3,51	3,04	3,01	3,59
0,40	3,38	3,35	3,62	3,57	3,06	3,03	3,65
0,42	3,42	3,39	3,69	3,64	3,08	3,05	3,72
0,44	3,46	3,43	3,77	3,72	3,11	3,07	3,80
0,46	3,50	3,48	3,86	3,80	3,13	3,10	3,87
0,48	3,55	3,52	3,96	3,90	3,15	3,12	3,95
0,50	3,60	3,57	4,06	4,00	3,18	3,14	4,03
0,52	3,65	3,62	4,16	4,10	3,20	3,17	4,12
0,54	3,70	3,68	4,26	4,20	3,23	3,19	4,20
0,56	3,76	3,73	4,36	4,31	3,26	3,22	4,28
0,58	3,82	3,79	4,45	4,40	3,28	3,25	4,35
0,60	3,88	3,85	4,54	4,50	3,31	3,28	4,43
0,62	3,94	3,91	4,63	4,58	3,34	3,31	4,51
0,64	4,00	3,98	4,71	4,67	3,37	3,34	4,58
0,66	4,07	4,04	4,79	4,75	3,41	3,38	4,66
0,68	4,13	4,11	4,87	4,83	3,44	3,41	4,73
0,70	4,19	4,17	4,94	4,91	3,48	3,45	4,81
0,72	4,26	4,23	5,02	4,99	3,52	3,49	4,89
0,74	4,32	4,30	5,10	5,07	3,56	3,53	4,97
0,76	4,38	4,37	5,18	5,15	3,61	3,58	5,06
0,78	4,45	4,44	5,27	5,24	3,66	3,63	5,15
0,80	4,52	4,51	5,35	5,32	3,71	3,68	5,26
0,82	4,59	4,58	5,44	5,41	3,77	3,74	5,36
0,84	4,67	4,66	5,54	5,51	3,83	3,80	5,49
0,86	4,75	4,74	5,64	5,61	3,90	3,88	5,62

Tabela 16 nastavak:

NaOH	H₂O		SDS		CTAB		TX 100
ml	pH						
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1
0,88	4,84	4,83	5,76	5,73	3,98	3,96	5,78
0,90	4,93	4,93	5,89	5,85	4,07	4,05	5,94
0,92	5,04	5,05	6,04	5,99	4,19	4,18	6,10
0,94	5,17	5,18	6,22	6,16	4,33	4,33	6,26
0,96	5,33	5,36	6,46	6,40	4,53	4,55	6,43
0,98	5,53	5,59	7,19	7,05	4,84	4,92	6,62
1,00	5,77	5,85	8,38	8,10	5,31	5,49	6,87
1,02	6,06	6,18	9,46	9,20	5,86	6,20	7,45
1,04	6,73	6,93	9,85	9,78	6,80	7,40	8,34
1,06	7,64	7,91	10,01	10,00	8,02	8,83	9,22
1,08	8,71	9,03	10,12	10,11	9,20	9,69	9,74
1,10	9,55	9,79	10,21	10,20	9,87	9,98	9,95
1,12	10,03	10,16	10,28	10,27	10,13	10,11	10,07
1,14	10,28	10,33	10,35	10,34	10,24	10,21	10,16
1,16	10,40	10,41	10,41	10,36	10,33	10,29	10,24

Tabela 17. Potencijometrijska titracija rastvora kaptoprila ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,62	2,63	2,53	2,56	2,60	2,62	2,61	2,62
0,02	2,63	2,64	2,54	2,57	2,61	2,63	2,62	2,62
0,04	2,63	2,64	2,55	2,57	2,62	2,64	2,63	2,63
0,06	2,64	2,65	2,56	2,58	2,63	2,65	2,63	2,64
0,08	2,65	2,66	2,57	2,59	2,64	2,66	2,64	2,65
0,10	2,66	2,67	2,58	2,60	2,65	2,66	2,65	2,66
0,12	2,66	2,67	2,58	2,61	2,65	2,67	2,66	2,66
0,14	2,67	2,68	2,59	2,61	2,66	2,68	2,67	2,67
0,16	2,68	2,69	2,60	2,62	2,67	2,69	2,68	2,68
0,18	2,69	2,70	2,61	2,63	2,68	2,70	2,69	2,69
0,20	2,70	2,71	2,62	2,64	2,69	2,70	2,69	2,70
0,22	2,71	2,72	2,63	2,65	2,70	2,71	2,70	2,71
0,24	2,72	2,72	2,64	2,66	2,71	2,72	2,71	2,72
0,26	2,72	2,73	2,65	2,66	2,72	2,73	2,72	2,73
0,28	2,73	2,74	2,66	2,67	2,72	2,74	2,73	2,73
0,30	2,74	2,75	2,67	2,68	2,73	2,75	2,74	2,74
0,32	2,75	2,76	2,68	2,69	2,74	2,76	2,75	2,75
0,34	2,76	2,77	2,69	2,70	2,75	2,77	2,76	2,76
0,36	2,77	2,78	2,70	2,71	2,76	2,78	2,77	2,77
0,38	2,78	2,79	2,71	2,73	2,77	2,79	2,78	2,78
0,40	2,79	2,80	2,72	2,74	2,78	2,80	2,79	2,79
0,42	2,80	2,81	2,73	2,75	2,79	2,81	2,80	2,81
0,44	2,81	2,82	2,74	2,76	2,80	2,82	2,81	2,82
0,46	2,82	2,83	2,76	2,77	2,81	2,83	2,82	2,83
0,48	2,83	2,84	2,77	2,78	2,82	2,84	2,83	2,84
0,50	2,84	2,85	2,78	2,79	2,84	2,85	2,85	2,85
0,52	2,85	2,86	2,79	2,80	2,85	2,86	2,86	2,86
0,54	2,86	2,87	2,80	2,82	2,86	2,87	2,87	2,87
0,56	2,87	2,88	2,81	2,83	2,87	2,88	2,88	2,88
0,58	2,89	2,90	2,83	2,84	2,88	2,89	2,89	2,90
0,60	2,90	2,91	2,84	2,85	2,89	2,91	2,90	2,91
0,62	2,91	2,92	2,85	2,86	2,90	2,92	2,92	2,92
0,64	2,92	2,93	2,86	2,87	2,92	2,93	2,93	2,93
0,66	2,94	2,94	2,88	2,89	2,93	2,94	2,94	2,95
0,68	2,95	2,96	2,89	2,91	2,94	2,96	2,96	2,96
0,70	2,96	2,97	2,90	2,92	2,95	2,97	2,97	2,97
0,72	2,97	2,98	2,92	2,93	2,97	2,98	2,98	2,99
0,74	2,99	3,00	2,93	2,95	2,98	3,00	3,00	3,00
0,76	3,00	3,01	2,95	2,96	2,99	3,01	3,01	3,02
0,78	3,02	3,03	2,96	2,97	3,01	3,03	3,03	3,03
0,80	3,03	3,04	2,98	2,99	3,02	3,04	3,04	3,05
0,82	3,04	3,05	2,99	3,01	3,04	3,05	3,06	3,06
0,84	3,06	3,07	3,01	3,02	3,05	3,07	3,07	3,08
0,86	3,08	3,08	3,03	3,04	3,07	3,08	3,09	3,10

Tabela 17 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	3,09	3,10	3,04	3,05	3,08	3,10	3,11	3,11
0,90	3,11	3,12	3,06	3,07	3,10	3,12	3,12	3,13
0,92	3,12	3,13	3,08	3,09	3,11	3,13	3,14	3,15
0,94	3,14	3,15	3,10	3,11	3,13	3,15	3,16	3,16
0,96	3,16	3,17	3,11	3,13	3,15	3,16	3,18	3,18
0,98	3,17	3,18	3,13	3,15	3,17	3,18	3,19	3,20
1,00	3,19	3,20	3,15	3,16	3,18	3,20	3,21	3,22
1,02	3,21	3,22	3,17	3,18	3,20	3,22	3,23	3,24
1,04	3,23	3,24	3,19	3,20	3,22	3,24	3,25	3,26
1,06	3,24	3,26	3,21	3,23	3,23	3,26	3,27	3,28
1,08	3,26	3,27	3,23	3,25	3,25	3,27	3,29	3,30
1,10	3,28	3,29	3,25	3,27	3,27	3,30	3,31	3,32
1,12	3,30	3,31	3,27	3,29	3,29	3,32	3,33	3,34
1,14	3,32	3,33	3,29	3,31	3,31	3,34	3,35	3,36
1,16	3,34	3,35	3,31	3,33	3,33	3,36	3,37	3,38
1,18	3,36	3,38	3,33	3,35	3,35	3,38	3,39	3,40
1,20	3,39	3,40	3,35	3,38	3,37	3,40	3,42	3,43
1,22	3,41	3,42	3,37	3,40	3,39	3,42	3,44	3,45
1,24	3,43	3,44	3,40	3,42	3,42	3,44	3,46	3,47
1,26	3,45	3,46	3,42	3,45	3,44	3,46	3,48	3,49
1,28	3,47	3,48	3,44	3,47	3,46	3,49	3,51	3,52
1,30	3,49	3,51	3,47	3,50	3,48	3,51	3,53	3,54
1,32	3,52	3,53	3,49	3,52	3,50	3,54	3,56	3,57
1,34	3,54	3,55	3,52	3,55	3,53	3,56	3,58	3,59
1,36	3,57	3,58	3,54	3,57	3,55	3,59	3,61	3,62
1,38	3,59	3,60	3,57	3,60	3,58	3,61	3,63	3,65
1,40	3,62	3,63	3,59	3,63	3,60	3,64	3,66	3,67
1,42	3,64	3,66	3,62	3,66	3,63	3,67	3,69	3,70
1,44	3,67	3,68	3,65	3,69	3,65	3,69	3,72	3,73
1,46	3,70	3,71	3,68	3,72	3,68	3,72	3,75	3,76
1,48	3,73	3,74	3,71	3,75	3,71	3,75	3,78	3,79
1,50	3,76	3,77	3,74	3,78	3,74	3,78	3,81	3,83
1,52	3,79	3,80	3,77	3,82	3,77	3,81	3,84	3,86
1,54	3,82	3,83	3,80	3,86	3,80	3,84	3,88	3,89
1,56	3,85	3,86	3,83	3,90	3,83	3,88	3,91	3,93
1,58	3,88	3,89	3,87	3,94	3,86	3,91	3,95	3,97
1,60	3,92	3,93	3,91	3,98	3,89	3,95	3,99	4,00
1,62	3,95	3,97	3,95	4,02	3,93	3,99	4,03	4,05
1,64	3,99	4,00	3,99	4,07	3,97	4,03	4,07	4,09
1,66	4,03	4,04	4,03	4,12	4,01	4,07	4,12	4,14
1,68	4,08	4,09	4,08	4,18	4,05	4,12	4,17	4,19
1,70	4,12	4,14	4,14	4,24	4,09	4,17	4,22	4,24
1,72	4,17	4,19	4,19	4,31	4,14	4,22	4,28	4,31
1,74	4,23	4,24	4,25	4,39	4,20	4,28	4,35	4,37

Tabela 17 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
1,76	4,28	4,30	4,32	4,49	4,25	4,34	4,42	4,45
1,78	4,35	4,37	4,40	4,60	4,31	4,42	4,50	4,53
1,80	4,42	4,44	4,49	4,75	4,38	4,50	4,60	4,63
1,82	4,50	4,53	4,61	4,95	4,47	4,60	4,72	4,75
1,84	4,60	4,64	4,75	5,22	4,56	4,72	4,87	4,90
1,86	4,72	4,77	4,95	5,60	4,68	4,87	5,07	5,10
1,88	4,88	4,95	5,22	6,03	4,82	5,07	5,35	5,35
1,90	5,09	5,22	5,61	6,59	5,04	5,35	5,72	5,65
1,92	5,40	5,64	6,07	7,34	5,36	6,01	6,15	5,99
1,94	5,93	6,16	6,69	8,07	5,80	6,53	6,71	6,41
1,96	6,53	6,82	7,47	8,58	6,30	7,24	7,39	6,92
1,98	7,32	7,64	8,21	8,86	6,96	8,05	8,09	7,51
2,00	8,17	8,41	8,66	9,01	7,75	8,64	8,61	8,12
2,02	8,76	8,86	8,88	9,10	8,46	8,97	8,93	8,59
2,04	9,01	9,06	9,00	9,17	8,86	9,13	9,11	8,92
2,06	9,13	9,16	9,08	9,23	9,06	9,22	9,21	9,12
2,08	9,22	9,24	9,15	9,29	9,17	9,29	9,28	9,25
2,10	9,28	9,31	9,21	9,34	9,25	9,36	9,34	9,33
2,12	9,35	9,37	9,27	9,39	9,32	9,41	9,40	9,39
2,14	9,41	9,43	9,32	9,44	9,38	9,46	9,45	9,45
2,16	9,46	9,48	9,37	9,48	9,44	9,51	9,50	9,50
2,18	9,51	9,53	9,41	9,52	9,49	9,56	9,54	9,54
2,20	9,56	9,57	9,45	9,56	9,54	9,61	9,59	9,59
2,22	9,60	9,62	9,49	9,60	9,59	9,65	9,63	9,63
2,24	9,65	9,66	9,53	9,64	9,63	9,69	9,67	9,67
2,26	9,69	9,69	9,57	9,67	9,67	9,72	9,70	9,70
2,28	9,72	9,73	9,61	9,71	9,71	9,73	9,74	9,74
2,30	9,76	9,77	9,64	9,74	9,74	9,77	9,77	9,77
2,32	9,80	9,80	9,67	9,77	9,78	9,80	9,81	9,81
2,34	9,83	9,84	9,71	9,80	9,82	9,84	9,84	9,84
2,36	9,86	9,87	9,74	9,83	9,85	9,87	9,87	9,87
2,38	9,90	9,90	9,77	9,87	9,88	9,90	9,90	9,90
2,40	9,93	9,93	9,80	9,90	9,91	9,94	9,93	9,93
2,42	9,96	9,96	9,83	9,92	9,94	9,97	9,96	9,97
2,44	9,99	9,99	9,85	9,95	9,97	10,00	9,99	9,99
2,46	10,02	10,02	9,88	9,98	10,00	10,03	10,02	10,02
2,48	10,05	10,05	9,91	10,01	10,03	10,06	10,04	10,05
2,50	10,08	10,08	9,94	10,04	10,06	10,09	10,07	10,08
2,52	10,11	10,11	9,97	10,07	10,09	10,12	10,10	10,11
2,54	10,14	10,13	10,00	10,09	10,12	10,15	10,13	10,14
2,56	10,16	10,16	10,02	10,12	10,15	10,17	10,15	10,16
2,58	10,19	10,19	10,05	10,15	10,17	10,20	10,18	10,19
2,60	10,22	10,21	10,07	10,17	10,20	10,23	10,20	10,22
2,62	10,24	10,24	10,10	10,20	10,23	10,26	10,23	10,24

Tabela 17 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
2,64	10,27	10,27	10,13	10,22	10,25	10,29	10,26	10,26
2,66	10,30	10,29	10,15	10,25	10,28	10,31	10,28	10,29
2,68	10,32	10,32	10,18	10,27	10,31	10,34	10,31	10,31
2,70	10,35	10,34	10,20	10,30	10,34	10,37	10,33	10,34
2,72	10,37	10,37	10,22	10,32	10,36	10,40	10,36	10,37
2,74	10,40	10,39	10,25	10,35	10,39	10,42	10,38	10,40
2,76	10,43	10,42	10,27	10,37	10,42	10,45	10,41	10,42
2,78	10,45	10,44	10,30	10,40	10,44	10,47	10,43	10,45
2,80	10,48	10,47	10,32	10,42	10,47	10,50	10,46	10,47
2,82	10,50	10,49	10,35	10,44	10,49	10,53	10,48	10,50
2,84	10,52	10,51	10,37	10,47	10,52	10,55	10,50	10,52
2,86	10,55	10,54	10,40	10,49	10,55	10,57	10,53	10,54
2,88	10,57	10,56	10,42	10,51	10,57	10,60	10,55	10,57
2,90	10,59	10,58	10,44	10,53	10,59	10,62	10,58	10,59
2,92	10,62	10,60	10,47	10,55	10,62	10,65	10,60	10,61
2,94	10,64	10,62	10,49	10,57	10,64	10,67	10,62	10,64
2,96	10,66	10,64	10,51	10,59	10,67	10,69	10,64	10,66
2,98	10,68	10,67	10,53	10,61	10,69	10,71	10,66	10,68
3,00	10,70	10,69	10,55	10,63	10,71	10,74	10,68	10,70
3,02	10,72	10,70	10,57	10,65	10,73	10,76	10,70	10,72
3,04	10,74	10,72	10,59	10,67	10,75	10,78	10,72	10,74
3,06	10,76	10,74	10,61	10,69	10,77	10,80	10,74	10,76
3,08	10,78	10,76	10,63	10,71	10,80	10,82	10,76	10,78
3,10	10,80	10,78	10,65	10,72	10,82	10,84	10,78	10,80
3,12	10,81	10,80	10,67	10,74	10,83	10,86	10,80	10,81
3,14	10,83	10,81	10,69	10,76	10,85	10,87	10,82	10,83
3,16	10,85	10,83	10,70	10,77	10,87	10,89	10,83	10,85
3,18	10,87	10,85	10,72	10,79	10,89	10,91	10,85	10,87
3,20	10,88	10,86	10,74	10,81	10,91	10,93	10,87	10,88
3,22	10,90	10,88	10,75	10,82	10,92	10,94	10,88	10,90
3,24	10,91	10,89	10,77	10,84	10,94	10,96	10,90	10,91
3,26	10,93	10,90	10,78	10,85	10,96	10,97	10,91	10,93
3,28	10,94	10,92	10,80	10,86	10,97	10,99	10,93	10,94
3,30	10,96	10,93	10,81	10,88	10,99	11,00	10,94	10,96
3,32	10,97	10,95	10,83	10,89	11,00	11,02	10,96	10,97
3,34	10,98	10,96	10,84	10,90	11,02	11,03	10,97	10,98
3,36	11,00	10,97	10,86	10,91	11,03	11,05	10,98	11,00
3,38	11,01	10,98	10,87	10,93	11,05	11,06	11,00	11,01
3,40	11,02	11,00	10,88	10,94	11,06	11,07	11,01	11,02
3,42	11,03	11,01	10,90	10,95	11,07	11,08	11,02	11,03
3,44	11,05	11,02	10,91	10,96	11,09	11,10	11,03	11,03

Tabela 18. Potencijometrijska titracija rastvora cilazaprila ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,87	2,86	2,93	2,90	2,85	2,73	2,84	2,86
0,02	2,88	2,88	2,95	2,92	2,86	2,74	2,86	2,87
0,04	2,89	2,89	2,97	2,94	2,87	2,76	2,87	2,89
0,06	2,90	2,90	2,99	2,96	2,88	2,78	2,89	2,90
0,08	2,92	2,92	3,01	2,98	2,89	2,79	2,90	2,92
0,10	2,93	2,93	3,03	3,00	2,90	2,81	2,92	2,93
0,12	2,94	2,94	3,05	3,03	2,91	2,83	2,93	2,94
0,14	2,96	2,96	3,07	3,05	2,92	2,85	2,95	2,96
0,16	2,97	2,97	3,10	3,07	2,93	2,88	2,97	2,97
0,18	2,99	2,99	3,13	3,10	2,94	2,91	2,98	2,99
0,20	3,00	3,00	3,15	3,13	2,94	2,93	3,00	3,01
0,22	3,02	3,02	3,18	3,16	2,95	2,96	3,02	3,02
0,24	3,03	3,03	3,21	3,19	2,96	2,98	3,03	3,04
0,26	3,05	3,05	3,25	3,22	2,97	3,01	3,05	3,06
0,28	3,07	3,07	3,28	3,26	2,99	3,03	3,07	3,08
0,30	3,08	3,08	3,32	3,30	3,00	3,06	3,09	3,10
0,32	3,10	3,10	3,36	3,34	3,01	3,08	3,11	3,12
0,34	3,12	3,12	3,40	3,38	3,02	3,11	3,13	3,13
0,36	3,14	3,14	3,45	3,43	3,03	3,14	3,15	3,16
0,38	3,16	3,16	3,51	3,49	3,05	3,16	3,17	3,18
0,40	3,18	3,18	3,56	3,54	3,06	3,18	3,19	3,20
0,42	3,20	3,20	3,63	3,61	3,08	3,20	3,22	3,22
0,44	3,22	3,22	3,69	3,67	3,09	3,23	3,24	3,24
0,46	3,24	3,24	3,76	3,75	3,11	3,25	3,27	3,27
0,48	3,27	3,26	3,84	3,82	3,13	3,27	3,29	3,30
0,50	3,29	3,29	3,92	3,90	3,15	3,29	3,32	3,32
0,52	3,31	3,31	4,00	3,98	3,17	3,32	3,35	3,35
0,54	3,34	3,34	4,09	4,06	3,19	3,34	3,37	3,38
0,56	3,37	3,37	4,17	4,15	3,21	3,36	3,40	3,40
0,58	3,39	3,39	4,25	4,23	3,23	3,39	3,43	3,43
0,60	3,42	3,42	4,33	4,31	3,26	3,42	3,47	3,47
0,62	3,45	3,45	4,41	4,39	3,28	3,44	3,50	3,50
0,64	3,48	3,48	4,49	4,46	3,31	3,47	3,53	3,53
0,66	3,52	3,51	4,57	4,54	3,34	3,50	3,57	3,57
0,68	3,55	3,55	4,64	4,61	3,37	3,53	3,61	3,61
0,70	3,59	3,58	4,71	4,68	3,40	3,56	3,65	3,65
0,72	3,63	3,62	4,79	4,75	3,43	3,60	3,69	3,69
0,74	3,67	3,66	4,86	4,83	3,46	3,63	3,74	3,74
0,76	3,71	3,71	4,94	4,90	3,50	3,67	3,79	3,79
0,78	3,76	3,75	5,02	4,98	3,54	3,71	3,84	3,84
0,80	3,81	3,80	5,10	5,06	3,58	3,75	3,90	3,90
0,82	3,86	3,85	5,18	5,14	3,62	3,79	3,96	3,96
0,84	3,92	3,91	5,27	5,22	3,66	3,83	4,03	4,03
0,86	3,98	3,98	5,36	5,31	3,71	3,88	4,11	4,11
0,88	4,06	4,05	5,45	5,41	3,76	3,93	4,20	4,19
0,90	4,14	4,13	5,56	5,51	3,81	3,98	4,31	4,30
0,92	4,24	4,23	5,67	5,61	3,87	4,03	4,43	4,42

Tabela 18 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,94	4,35	4,34	5,78	5,73	3,92	4,09	4,58	4,56
0,96	4,50	4,49	5,90	5,84	3,98	4,15	4,76	4,73
0,98	4,70	4,68	6,02	5,96	4,05	4,21	4,98	4,93
1,00	4,94	4,91	6,13	6,08	4,11	4,27	5,19	5,13
1,02	5,19	5,16	6,24	6,18	4,18	4,34	5,38	5,32
1,04	5,41	5,38	6,34	6,28	4,25	4,40	5,55	5,49
1,06	5,58	5,56	6,43	6,37	4,32	4,47	5,69	5,63
1,08	5,73	5,71	6,52	6,46	4,39	4,54	5,81	5,76
1,10	5,86	5,83	6,61	6,55	4,46	4,61	5,92	5,87
1,12	5,96	5,94	6,69	6,63	4,53	4,68	6,01	5,98
1,14	6,06	6,04	6,76	6,71	4,60	4,75	6,10	6,07
1,16	6,15	6,13	6,84	6,79	4,67	4,82	6,18	6,15
1,18	6,23	6,21	6,91	6,86	4,75	4,89	6,26	6,23
1,20	6,31	6,29	6,99	6,94	4,82	4,96	6,34	6,31
1,22	6,38	6,37	7,07	7,01	4,90	5,04	6,41	6,38
1,24	6,46	6,44	7,14	7,09	4,97	5,11	6,49	6,46
1,26	6,53	6,52	7,22	7,17	5,05	5,19	6,56	6,53
1,28	6,61	6,60	7,31	7,25	5,13	5,27	6,64	6,61
1,30	6,69	6,67	7,39	7,34	5,21	5,35	6,71	6,68
1,32	6,77	6,76	7,49	7,44	5,30	5,44	6,79	6,77
1,34	6,86	6,84	7,60	7,54	5,40	5,53	6,88	6,85
1,36	6,95	6,94	7,72	7,67	5,51	5,64	6,98	6,94
1,38	7,05	7,04	7,87	7,81	5,62	5,75	7,09	7,05
1,40	7,17	7,16	8,07	8,01	5,76	5,88	7,21	7,16
1,42	7,32	7,30	8,39	8,34	5,92	6,03	7,36	7,30
1,44	7,49	7,47	9,01	8,96	6,12	6,21	7,55	7,47
1,46	7,74	7,70	9,51	9,46	6,37	6,45	7,83	7,69
1,48	8,31	8,23	9,76	9,72	6,87	6,79	8,51	8,17
1,50	9,32	9,21	9,92	9,88	7,98	7,73	9,45	9,06
1,52	9,84	9,79	10,04	9,99	9,29	9,14	9,92	9,79
1,54	10,03	10,01	10,13	10,09	9,89	9,97	10,11	10,08
1,56	10,16	10,14	10,22	10,17	10,11	10,22	10,24	10,22
1,58	10,25	10,24	10,29	10,24	10,23	10,34	10,35	10,33
1,60	10,33	10,32	10,35	10,30	10,32	10,44	10,43	10,41
1,62	10,40	10,38	10,40	10,35	10,40	10,52	10,50	10,49
1,64	10,46	10,44	10,45	10,40	10,46	10,58	10,56	10,55
1,66	10,51	10,49	10,49	10,44	10,52	10,64	10,61	10,60
1,68	10,56	10,54	10,53	10,48	10,57	10,69	10,66	10,65
1,70	10,60	10,58	10,56	10,52	10,62	10,73	10,70	10,69
1,72	10,64	10,62	10,60	10,55	10,66	10,77	10,74	10,73
1,74	10,67	10,65	10,63	10,58	10,70	10,80	10,78	10,77
1,76	10,70	10,68	10,66	10,61	10,73	10,84	10,81	10,80
1,78	10,73	10,71	10,68	10,64	10,76	10,87	10,84	10,83
1,80	10,76	10,74	10,71	10,66	10,79	10,90	10,87	10,86

Tabela 19. Potencijometrijska titracija rastvora enalapril-maleata ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodato 0,5 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	3,29	3,30	3,87	3,85	3,24	3,25	3,31	3,30
0,02	3,31	3,32	3,93	3,91	3,27	3,28	3,34	3,33
0,04	3,34	3,35	3,99	3,97	3,30	3,31	3,37	3,36
0,06	3,37	3,38	4,05	4,03	3,33	3,34	3,40	3,39
0,08	3,40	3,41	4,11	4,10	3,36	3,37	3,44	3,42
0,10	3,42	3,44	4,17	4,16	3,39	3,40	3,47	3,46
0,12	3,46	3,47	4,23	4,22	3,42	3,43	3,51	3,50
0,14	3,49	3,51	4,29	4,28	3,45	3,46	3,55	3,53
0,16	3,52	3,55	4,35	4,34	3,49	3,49	3,59	3,58
0,18	3,56	3,59	4,41	4,40	3,53	3,53	3,64	3,62
0,20	3,60	3,63	4,47	4,46	3,57	3,57	3,69	3,67
0,22	3,65	3,68	4,52	4,52	3,61	3,62	3,74	3,73
0,24	3,70	3,73	4,58	4,59	3,66	3,66	3,81	3,79
0,26	3,75	3,79	4,64	4,65	3,71	3,71	3,87	3,86
0,28	3,80	3,85	4,70	4,70	3,77	3,76	3,95	3,93
0,30	3,87	3,92	4,76	4,76	3,83	3,82	4,04	4,02
0,32	3,94	4,00	4,81	4,82	3,89	3,88	4,13	4,11
0,34	4,01	4,09	4,86	4,87	3,96	3,95	4,23	4,21
0,36	4,10	4,19	4,92	4,93	4,03	4,02	4,33	4,32
0,38	4,20	4,30	4,97	4,98	4,11	4,10	4,44	4,43
0,40	4,31	4,42	5,03	5,04	4,20	4,17	4,55	4,54
0,42	4,42	4,54	5,08	5,09	4,28	4,26	4,65	4,64
0,44	4,53	4,65	5,13	5,14	4,37	4,34	4,74	4,73
0,46	4,63	4,75	5,17	5,19	4,45	4,42	4,82	4,82
0,48	4,73	4,85	5,22	5,24	4,53	4,50	4,90	4,90
0,50	4,82	4,93	5,26	5,28	4,61	4,58	4,98	4,97
0,52	4,90	5,01	5,31	5,32	4,69	4,66	5,04	5,04
0,54	4,98	5,08	5,35	5,37	4,77	4,74	5,11	5,10
0,56	5,05	5,15	5,39	5,41	4,84	4,81	5,17	5,16
0,58	5,12	5,21	5,43	5,45	4,91	4,88	5,22	5,22
0,60	5,18	5,27	5,47	5,49	4,98	4,95	5,28	5,27
0,62	5,23	5,32	5,51	5,53	5,05	5,02	5,33	5,32
0,64	5,29	5,38	5,55	5,57	5,11	5,09	5,38	5,37
0,66	5,34	5,43	5,59	5,61	5,17	5,15	5,43	5,42
0,68	5,39	5,48	5,63	5,65	5,24	5,22	5,48	5,47
0,70	5,44	5,53	5,66	5,69	5,29	5,28	5,53	5,52
0,72	5,49	5,58	5,70	5,73	5,35	5,34	5,58	5,56
0,74	5,54	5,62	5,74	5,77	5,41	5,40	5,62	5,61
0,76	5,58	5,67	5,78	5,81	5,47	5,46	5,67	5,65
0,78	5,63	5,71	5,81	5,85	5,53	5,52	5,72	5,70
0,80	5,67	5,76	5,85	5,89	5,59	5,58	5,76	5,75
0,82	5,72	5,81	5,88	5,93	5,65	5,63	5,81	5,79
0,84	5,76	5,85	5,92	5,97	5,70	5,69	5,86	5,83
0,86	5,80	5,90	5,96	6,02	5,76	5,75	5,90	5,88

Tabela 19 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	5,85	5,94	6,00	6,06	5,82	5,81	5,95	5,93
0,90	5,89	5,99	6,04	6,11	5,88	5,87	6,00	5,97
0,92	5,94	6,04	6,08	6,15	5,94	5,93	6,05	6,02
0,94	5,98	6,09	6,12	6,20	6,00	5,99	6,11	6,07
0,96	6,03	6,14	6,16	6,26	6,06	6,06	6,16	6,13
0,98	6,08	6,20	6,20	6,31	6,13	6,12	6,22	6,18
1,00	6,13	6,25	6,25	6,38	6,19	6,19	6,28	6,24
1,02	6,18	6,31	6,30	6,44	6,26	6,26	6,35	6,30
1,04	6,24	6,38	6,35	6,52	6,33	6,33	6,42	6,37
1,06	6,29	6,45	6,40	6,60	6,41	6,41	6,51	6,44
1,08	6,35	6,53	6,46	6,69	6,49	6,49	6,60	6,52
1,10	6,42	6,62	6,53	6,80	6,58	6,59	6,70	6,61
1,12	6,49	6,72	6,60	6,93	6,69	6,69	6,82	6,72
1,14	6,58	6,84	6,68	7,10	6,81	6,81	6,97	6,85
1,16	6,67	6,99	6,76	7,33	6,95	6,96	7,17	7,01
1,18	6,77	7,19	6,87	7,72	7,12	7,14	7,44	7,24
1,20	6,90	7,48	6,99	8,67	7,35	7,39	8,04	7,57
1,22	7,06	8,16	7,14	9,46	7,74	7,84	8,99	8,78
1,24	7,28	9,35	7,35	9,73	8,62	8,83	9,72	9,56
1,26	7,61	9,87	7,66	9,88	9,54	9,70	10,01	9,87
1,28	8,48	10,05	8,42	9,99	9,98	10,01	10,14	10,03
1,30	9,52	10,17	9,34	10,09	10,15	10,16	10,24	10,15
1,32	9,93	10,27	9,73	10,17	10,27	10,28	10,32	10,25
1,34	10,10	10,35	9,91	10,23	10,36	10,37	10,39	10,33
1,36	10,22	10,42	10,03	10,29	10,44	10,44	10,45	10,40
1,38	10,31	10,48	10,13	10,34	10,51	10,50	10,50	10,46
1,40	10,39	10,53	10,21	10,39	10,57	10,56	10,55	10,52
1,42	10,45	10,57	10,28	10,43	10,58	10,61	10,59	10,56
1,44	10,51	10,61	10,34	10,47	10,63	10,65	10,62	10,61
1,46	10,56	10,65	10,40	10,50	10,67	10,69	10,66	10,64
1,48	10,60	10,69	10,45	10,54	10,71	10,73	10,69	10,68
1,50	10,64	10,72	10,48	10,56	10,75	10,76	10,72	10,71

Tabela 20. Potenciometrijska titracija rastvora maleinske kiseline ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,76	2,74	2,71	2,67	2,73	2,73	2,72	2,71
0,02	2,77	2,75	2,72	2,68	2,74	2,74	2,73	2,73
0,04	2,78	2,77	2,73	2,69	2,75	2,75	2,74	2,74
0,06	2,79	2,78	2,74	2,70	2,76	2,76	2,75	2,75
0,08	2,80	2,79	2,76	2,72	2,77	2,77	2,76	2,76
0,10	2,81	2,80	2,77	2,73	2,78	2,78	2,78	2,77
0,12	2,82	2,81	2,78	2,75	2,79	2,79	2,79	2,78
0,14	2,83	2,83	2,80	2,76	2,81	2,81	2,80	2,79
0,16	2,85	2,84	2,81	2,78	2,82	2,82	2,81	2,80
0,18	2,86	2,85	2,82	2,79	2,83	2,83	2,82	2,82
0,20	2,87	2,87	2,84	2,81	2,84	2,84	2,84	2,83
0,22	2,89	2,88	2,86	2,82	2,86	2,86	2,85	2,84
0,24	2,90	2,89	2,87	2,84	2,87	2,87	2,87	2,86
0,26	2,91	2,91	2,89	2,85	2,88	2,88	2,88	2,87
0,28	2,93	2,92	2,91	2,87	2,90	2,90	2,90	2,89
0,30	2,94	2,94	2,92	2,89	2,91	2,91	2,91	2,90
0,32	2,96	2,95	2,94	2,90	2,93	2,93	2,93	2,92
0,34	2,97	2,97	2,96	2,92	2,94	2,94	2,94	2,94
0,36	2,99	2,98	2,98	2,94	2,96	2,96	2,96	2,95
0,38	3,01	3,00	3,00	2,96	2,98	2,98	2,98	2,97
0,40	3,03	3,02	3,03	2,98	3,00	3,00	3,00	2,99
0,42	3,04	3,04	3,05	3,00	3,01	3,01	3,02	3,01
0,44	3,06	3,06	3,07	3,02	3,03	3,03	3,04	3,03
0,46	3,08	3,08	3,10	3,05	3,05	3,05	3,06	3,05
0,48	3,11	3,10	3,13	3,08	3,07	3,07	3,08	3,07
0,50	3,13	3,12	3,16	3,11	3,10	3,10	3,11	3,09
0,52	3,15	3,14	3,19	3,14	3,12	3,12	3,13	3,12
0,54	3,18	3,17	3,22	3,17	3,14	3,14	3,16	3,15
0,56	3,20	3,19	3,26	3,21	3,17	3,17	3,19	3,17
0,58	3,23	3,22	3,30	3,25	3,20	3,20	3,21	3,20
0,60	3,26	3,25	3,34	3,29	3,23	3,23	3,25	3,23
0,62	3,29	3,28	3,39	3,34	3,26	3,26	3,28	3,27
0,64	3,32	3,31	3,45	3,40	3,29	3,29	3,32	3,30
0,66	3,36	3,35	3,51	3,46	3,33	3,33	3,36	3,35
0,68	3,40	3,39	3,58	3,54	3,37	3,37	3,41	3,39
0,70	3,45	3,43	3,67	3,62	3,41	3,41	3,46	3,44
0,72	3,49	3,48	3,77	3,73	3,46	3,46	3,52	3,49
0,74	3,55	3,53	3,90	3,87	3,52	3,52	3,58	3,55
0,76	3,61	3,59	4,08	4,04	3,58	3,58	3,65	3,63
0,78	3,69	3,66	4,32	4,29	3,66	3,66	3,75	3,71
0,80	3,78	3,74	4,59	4,57	3,75	3,75	3,86	3,81
0,82	3,88	3,84	4,83	4,81	3,86	3,85	3,99	3,94
0,84	4,02	3,97	5,03	5,00	4,00	4,00	4,17	4,10
0,86	4,21	4,13	5,19	5,16	4,21	4,19	4,38	4,30

Tabela 20 nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	4,45	4,36	5,32	5,29	4,49	4,47	4,60	4,52
0,90	4,73	4,63	5,44	5,40	4,81	4,80	4,82	4,75
0,92	4,97	4,89	5,55	5,51	5,08	5,07	5,00	4,94
0,94	5,15	5,09	5,65	5,61	5,28	5,28	5,16	5,11
0,96	5,31	5,25	5,75	5,71	5,44	5,44	5,29	5,25
0,98	5,44	5,38	5,84	5,80	5,57	5,57	5,41	5,37
1,00	5,55	5,49	5,93	5,89	5,69	5,69	5,51	5,47
1,02	5,65	5,59	6,03	5,99	5,79	5,79	5,60	5,57
1,04	5,74	5,69	6,13	6,09	5,89	5,89	5,70	5,67
1,06	5,83	5,78	6,23	6,19	5,97	5,97	5,78	5,75
1,08	5,92	5,87	6,35	6,31	6,06	6,06	5,86	5,84
1,10	6,00	5,95	6,49	6,45	6,15	6,15	5,95	5,92
1,12	6,09	6,04	6,65	6,62	6,23	6,23	6,03	6,01
1,14	6,18	6,13	6,85	6,83	6,32	6,32	6,12	6,09
1,16	6,27	6,22	7,12	7,11	6,42	6,42	6,21	6,18
1,18	6,37	6,31	7,64	7,66	6,52	6,52	6,31	6,28
1,20	6,48	6,42	8,65	8,74	6,63	6,63	6,42	6,38
1,22	6,61	6,54	9,45	9,49	6,75	6,75	6,54	6,50
1,24	6,75	6,69	9,77	9,75	6,89	6,89	6,68	6,64
1,26	6,94	6,86	9,92	9,89	7,06	7,05	6,86	6,81
1,28	7,19	7,10	10,02	9,99	7,28	7,27	7,09	7,03
1,30	7,62	7,48	10,11	10,08	7,60	7,60	7,45	7,37
1,32	8,67	8,35	10,18	10,16	8,44	8,46	8,31	8,19
1,34	9,63	9,44	10,25	10,22	9,50	9,51	9,39	9,35
1,36	9,93	9,85	10,30	10,27	9,96	9,97	9,86	9,80
1,38	10,08	10,03	10,35	10,32	10,14	10,14	10,04	9,99
1,40	10,18	10,16	10,40	10,37	10,26	10,26	10,16	10,11
1,42	10,27	10,26	10,44	10,41	10,36	10,35	10,26	10,21
1,44	10,34	10,34	10,47	10,45	10,44	10,43	10,33	10,30
1,46	10,40	10,41	10,51	10,49	10,51	10,50	10,40	10,37

Tabela 21. Potenciometrijska titracija rastvora perindopril-erbumina ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH						
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1
0,00	2,83	2,87	3,04	2,89	2,89	2,90	2,76
0,02	2,85	2,88	3,06	2,90	2,90	2,91	2,77
0,04	2,87	2,89	3,07	2,92	2,92	2,92	2,79
0,06	2,89	2,90	3,08	2,94	2,93	2,93	2,81
0,08	2,90	2,92	3,09	2,96	2,95	2,95	2,82
0,10	2,92	2,93	3,11	2,97	2,96	2,96	2,83
0,12	2,93	2,94	3,12	2,99	2,97	2,97	2,84
0,14	2,95	2,95	3,13	3,01	2,99	2,98	2,86
0,16	2,96	2,97	3,15	3,03	3,00	3,00	2,87
0,18	2,98	2,98	3,17	3,05	3,01	3,01	2,88
0,20	2,99	2,99	3,19	3,07	3,03	3,03	2,89
0,22	3,01	3,00	3,20	3,09	3,04	3,04	2,90
0,24	3,02	3,02	3,22	3,12	3,06	3,06	2,92
0,26	3,04	3,03	3,23	3,14	3,07	3,07	2,93
0,28	3,06	3,05	3,26	3,17	3,09	3,09	2,94
0,30	3,07	3,06	3,28	3,20	3,11	3,10	2,96
0,32	3,09	3,08	3,30	3,23	3,12	3,12	2,97
0,34	3,10	3,10	3,33	3,26	3,14	3,14	2,99
0,36	3,12	3,11	3,36	3,29	3,16	3,15	3,00
0,38	3,14	3,13	3,40	3,33	3,17	3,17	3,02
0,40	3,16	3,15	3,43	3,36	3,19	3,19	3,04
0,42	3,18	3,16	3,47	3,41	3,21	3,21	3,06
0,44	3,19	3,18	3,51	3,45	3,23	3,23	3,08
0,46	3,21	3,20	3,56	3,50	3,25	3,25	3,10
0,48	3,23	3,22	3,61	3,54	3,27	3,27	3,12
0,50	3,26	3,24	3,66	3,60	3,29	3,29	3,14
0,52	3,28	3,26	3,71	3,65	3,31	3,31	3,16
0,54	3,30	3,29	3,77	3,71	3,33	3,34	3,19
0,56	3,32	3,31	3,84	3,77	3,36	3,36	3,21
0,58	3,35	3,33	3,90	3,83	3,38	3,39	3,24
0,60	3,37	3,36	3,97	3,90	3,40	3,42	3,26
0,62	3,40	3,38	4,04	3,97	3,43	3,44	3,29
0,64	3,43	3,41	4,10	4,04	3,46	3,47	3,32
0,66	3,46	3,44	4,18	4,11	3,48	3,50	3,35
0,68	3,48	3,47	4,25	4,18	3,51	3,53	3,38
0,70	3,52	3,50	4,32	4,25	3,54	3,56	3,41
0,72	3,55	3,53	4,39	4,32	3,57	3,60	3,45
0,74	3,58	3,56	4,46	4,39	3,60	3,64	3,48
0,76	3,62	3,60	4,52	4,46	3,64	3,67	3,52
0,78	3,66	3,64	4,59	4,53	3,68	3,71	3,56
0,80	3,70	3,68	4,66	4,60	3,71	3,76	3,60
0,82	3,74	3,72	4,73	4,67	3,75	3,80	3,65
0,84	3,79	3,77	4,79	4,73	3,80	3,85	3,69
0,86	3,84	3,82	4,86	4,80	3,84	3,91	3,74

Tabela 21 nastavak:

NaOH ml	pH						
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1
0,88	3,89	3,87	4,92	4,87	3,89	3,96	3,80
0,90	3,95	3,93	4,99	4,93	3,94	4,03	3,86
0,92	4,02	4,00	5,05	5,00	4,00	4,10	3,93
0,94	4,09	4,07	5,12	5,06	4,06	4,18	4,00
0,96	4,18	4,15	5,18	5,13	4,13	4,26	4,08
0,98	4,27	4,25	5,24	5,19	4,21	4,36	4,18
1,00	4,37	4,36	5,30	5,25	4,29	4,47	4,28
1,02	4,49	4,48	5,37	5,32	4,37	4,58	4,40
1,04	4,62	4,61	5,43	5,38	4,46	4,70	4,54
1,06	4,76	4,75	5,49	5,44	4,56	4,82	4,67
1,08	4,89	4,89	5,55	5,50	4,66	4,94	4,81
1,10	5,01	5,02	5,61	5,56	4,77	5,05	4,95
1,12	5,13	5,14	5,68	5,63	4,88	5,16	5,08
1,14	5,24	5,25	5,74	5,69	4,99	5,26	5,19
1,16	5,34	5,36	5,81	5,76	5,09	5,35	5,30
1,18	5,44	5,46	5,87	5,82	5,20	5,44	5,41
1,20	5,54	5,56	5,94	5,89	5,30	5,53	5,51
1,22	5,63	5,65	6,00	5,95	5,41	5,62	5,61
1,24	5,72	5,74	6,07	6,02	5,50	5,70	5,70
1,26	5,81	5,83	6,14	6,09	5,60	5,79	5,79
1,28	5,90	5,92	6,22	6,17	5,69	5,88	5,88
1,30	5,98	6,01	6,30	6,25	5,78	5,96	5,98
1,32	6,08	6,10	6,38	6,34	5,87	6,06	6,07
1,34	6,17	6,20	6,47	6,43	5,95	6,15	6,16
1,36	6,27	6,29	6,57	6,53	6,04	6,25	6,26
1,38	6,37	6,39	6,69	6,64	6,13	6,36	6,36
1,40	6,48	6,50	6,82	6,77	6,22	6,47	6,47
1,42	6,60	6,62	6,97	6,93	6,33	6,59	6,58
1,44	6,73	6,75	7,16	7,12	6,45	6,73	6,71
1,46	6,88	6,90	7,44	7,39	6,59	6,89	6,85
1,48	7,06	7,07	8,09	8,04	6,76	7,08	7,01
1,50	7,31	7,31	9,01	8,96	6,99	7,34	7,23
1,52	7,75	7,75	9,54	9,49	7,37	7,86	8,13
1,54	8,60	8,60	9,75	9,70	8,17	8,67	8,98
1,56	9,37	9,36	9,88	9,83	9,13	9,40	9,48
1,58	9,69	9,69	9,98	9,93	9,66	9,76	9,68
1,60	9,85	9,84	10,06	10,02	9,86	9,91	9,81
1,62	9,96	9,95	10,14	10,09	9,99	10,02	9,92
1,64	10,05	10,05	10,20	10,16	10,09	10,10	10,00
1,66	10,13	10,12	10,26	10,21	10,17	10,18	10,08
1,68	10,20	10,19	10,31	10,27	10,24	10,24	10,14
1,70	10,26	10,25	10,35	10,31	10,31	10,30	10,20
1,72	10,31	10,30	10,39	10,36	10,36	10,35	10,25

Tabela 21 nastavak:

NaOH ml	pH						
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1
1,74	10,36	10,35	10,43	10,40	10,42	10,39	10,30
1,76	10,40	10,40	10,47	10,44	10,46	10,43	10,35
1,78	10,45	10,44	10,50	10,47	10,51	10,47	10,39
1,80	10,49	10,48	10,53	10,50	10,54	10,51	10,43
1,82	10,52	10,51	10,56	10,53	10,58	10,55	10,46
1,84	10,55	10,55	10,59	10,56	10,61	10,58	10,50
1,86	10,58	10,58	10,61	10,59	10,64	10,61	10,53
1,88	10,61	10,61	10,64	10,61	10,67	10,64	10,56
1,90	10,64	10,64	10,66	10,64	10,70	10,66	10,59
1,92	10,67	10,67	10,68	10,66	10,73	10,69	10,62
1,94	10,69	10,69	10,71	10,69	10,76	10,72	10,64
1,96	10,72	10,72	10,73	10,71	10,78	10,74	10,66
1,98	10,74	10,74	10,75	10,73	10,81	10,76	10,69
2,00	10,76	10,76	10,77	10,75	10,83	10,78	10,71
2,02	10,78	10,78	10,78	10,77	10,85	10,80	10,73
2,04	10,80	10,80	10,80	10,78	10,87	10,82	10,75
2,06	10,82	10,82	10,82	10,80	10,89	10,84	10,77
2,08	10,84	10,84	10,83	10,82	10,91	10,86	10,79
2,10	10,86	10,86	10,85	10,83	10,93	10,88	10,81
2,12	10,88	10,88	10,86	10,85	10,95	10,90	10,83
2,14	10,90	10,90	10,88	10,87	10,97	10,91	10,85
2,16	10,91	10,92	10,89	10,88	10,99	10,93	10,86
2,18	10,93	10,93	10,91	10,90	11,00	10,95	10,88
2,20	10,94	10,95	10,92	10,91	11,02	10,96	10,90
2,22	10,96	10,96	10,93	10,92	11,03	10,98	10,91
2,24	10,97	10,98	10,95	10,94	11,05	10,99	10,93
2,26	10,99	10,99	10,96	10,95	11,06	11,00	10,94

Tabela 22. Potenciometrijska titracija rastvora kvinapril-hidrohlorida ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	3,25	3,26	4,22	4,19	3,25	3,24	3,33	3,38
0,02	3,27	3,28	4,30	4,28	3,27	3,26	3,36	3,41
0,04	3,30	3,31	4,39	4,36	3,29	3,28	3,39	3,44
0,06	3,32	3,33	4,47	4,44	3,32	3,30	3,42	3,48
0,08	3,35	3,36	4,55	4,51	3,34	3,32	3,45	3,52
0,10	3,38	3,39	4,63	4,59	3,36	3,34	3,48	3,55
0,12	3,41	3,42	4,70	4,66	3,38	3,36	3,51	3,59
0,14	3,44	3,46	4,77	4,73	3,41	3,38	3,55	3,64
0,16	3,48	3,49	4,84	4,79	3,43	3,41	3,59	3,68
0,18	3,51	3,53	4,91	4,86	3,45	3,43	3,63	3,73
0,20	3,55	3,57	4,98	4,93	3,48	3,45	3,67	3,79
0,22	3,59	3,61	5,04	4,99	3,51	3,48	3,72	3,85
0,24	3,64	3,66	5,11	5,06	3,53	3,50	3,76	3,91
0,26	3,69	3,71	5,17	5,12	3,56	3,53	3,82	3,98
0,28	3,74	3,76	5,24	5,18	3,59	3,55	3,87	4,06
0,30	3,80	3,83	5,30	5,25	3,62	3,58	3,93	4,14
0,32	3,86	3,90	5,36	5,31	3,65	3,61	4,00	4,23
0,34	3,93	3,97	5,43	5,37	3,69	3,64	4,07	4,32
0,36	4,01	4,06	5,49	5,44	3,72	3,67	4,15	4,42
0,38	4,10	4,16	5,56	5,50	3,75	3,71	4,23	4,52
0,40	4,21	4,27	5,62	5,56	3,79	3,74	4,32	4,63
0,42	4,32	4,40	5,68	5,63	3,83	3,77	4,41	4,72
0,44	4,44	4,53	5,75	5,69	3,87	3,81	4,51	4,82
0,46	4,56	4,65	5,81	5,76	3,91	3,84	4,60	4,91
0,48	4,68	4,78	5,88	5,82	3,95	3,88	4,69	5,00
0,50	4,79	4,89	5,94	5,89	3,99	3,92	4,78	5,08
0,52	4,89	4,99	6,00	5,95	4,04	3,96	4,87	5,16
0,54	4,99	5,09	6,07	6,02	4,09	4,01	4,94	5,24
0,56	5,08	5,18	6,13	6,08	4,14	4,05	5,02	5,32
0,58	5,16	5,26	6,20	6,15	4,19	4,10	5,09	5,39
0,60	5,24	5,34	6,27	6,22	4,25	4,15	5,17	5,47
0,62	5,32	5,43	6,35	6,29	4,31	4,20	5,24	5,55
0,64	5,39	5,51	6,42	6,37	4,37	4,26	5,31	5,63
0,66	5,47	5,59	6,51	6,44	4,44	4,32	5,37	5,72
0,68	5,54	5,68	6,59	6,53	4,51	4,38	5,44	5,81
0,70	5,62	5,76	6,69	6,62	4,60	4,45	5,51	5,91
0,72	5,70	5,86	6,79	6,72	4,69	4,52	5,58	6,01
0,74	5,79	5,96	6,91	6,83	4,80	4,61	5,66	6,13
0,76	5,88	6,07	7,05	6,95	4,93	4,70	5,74	6,27
0,78	5,98	6,20	7,22	7,10	5,08	4,81	5,82	6,44
0,80	6,09	6,36	7,58	7,30	5,28	4,95	5,91	6,65
0,82	6,21	6,56	8,51	7,82	5,54	5,11	6,01	7,14
0,84	6,36	6,82	9,42	8,99	5,88	5,33	6,12	8,03
0,86	6,55	7,58	9,84	9,71	6,46	5,66	6,25	9,12

Tabela 22. nastavak:

NaOH ml	pH							
	H ₂ O		SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	6,79	9,05	10,00	9,93	8,70	6,08	6,40	10,06
0,90	7,37	9,85	10,12	10,07	9,92	7,00	6,59	10,23
0,92	8,87	10,08	10,21	10,17	10,20	8,70	6,85	10,33
0,94	9,85	10,20	10,29	10,25	10,33	9,89	7,55	10,41
0,96	10,08	10,29	10,36	10,32	10,44	10,19	8,77	10,48
0,98	10,21	10,37	10,42	10,38	10,52	10,33	9,70	10,54
1,00	10,31	10,44	10,47	10,44	10,59	10,43	10,07	10,59
1,02	10,39	10,50	10,52	10,48	10,64	10,52	10,21	10,64
1,04	10,46	10,54	10,56	10,53	10,69	10,58	10,32	10,68
1,06	10,51	10,59	10,59	10,57	10,74	10,64	10,40	10,72
1,08	10,56	10,63	10,63	10,60	10,78	10,70	10,47	10,75
1,10	10,61	10,63	10,66	10,63	10,81	10,74	10,53	10,79

Tabela 23. Potenciometrijska titracija rastvora ramiprila ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	H ₂ O			SDS		CTAB		TX 100	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,88	2,86	2,86	3,04	2,97	2,91	2,90	2,86	2,83
0,02	2,90	2,87	2,87	3,06	2,98	2,92	2,91	2,87	2,84
0,04	2,92	2,88	2,89	3,08	3,00	2,93	2,92	2,89	2,86
0,06	2,93	2,90	2,90	3,11	3,03	2,94	2,94	2,90	2,88
0,08	2,95	2,91	2,91	3,13	3,05	2,96	2,95	2,91	2,89
0,10	2,96	2,92	2,92	3,16	3,07	2,97	2,96	2,93	2,91
0,12	2,97	2,93	2,94	3,18	3,10	2,98	2,97	2,94	2,92
0,14	2,99	2,95	2,95	3,21	3,12	2,99	2,99	2,95	2,94
0,16	3,00	2,96	2,96	3,24	3,15	3,01	3,00	2,97	2,95
0,18	3,02	2,98	2,98	3,28	3,18	3,02	3,01	2,98	2,97
0,20	3,03	2,99	2,99	3,31	3,21	3,04	3,03	3,00	2,99
0,22	3,05	3,01	3,01	3,35	3,24	3,05	3,04	3,02	3,00
0,24	3,07	3,02	3,02	3,39	3,28	3,07	3,06	3,03	3,02
0,26	3,08	3,04	3,04	3,44	3,31	3,08	3,07	3,05	3,04
0,28	3,10	3,05	3,05	3,48	3,36	3,10	3,09	3,07	3,05
0,30	3,12	3,07	3,07	3,53	3,40	3,11	3,10	3,09	3,07
0,32	3,14	3,09	3,09	3,59	3,45	3,13	3,12	3,10	3,09
0,34	3,15	3,10	3,10	3,65	3,50	3,15	3,13	3,12	3,11
0,36	3,17	3,12	3,12	3,72	3,56	3,16	3,15	3,14	3,13
0,38	3,19	3,14	3,14	3,79	3,62	3,18	3,17	3,17	3,15
0,40	3,21	3,16	3,16	3,86	3,69	3,20	3,19	3,19	3,17
0,42	3,23	3,18	3,18	3,95	3,77	3,22	3,20	3,21	3,19
0,44	3,25	3,20	3,20	4,03	3,85	3,24	3,22	3,23	3,22
0,46	3,28	3,22	3,22	4,11	3,94	3,25	3,24	3,25	3,24
0,48	3,30	3,24	3,24	4,20	4,03	3,28	3,26	3,28	3,26
0,50	3,32	3,26	3,27	4,28	4,12	3,30	3,28	3,30	3,29
0,52	3,35	3,29	3,29	4,35	4,20	3,32	3,30	3,33	3,31
0,54	3,38	3,31	3,31	4,43	4,29	3,34	3,33	3,35	3,34
0,56	3,40	3,34	3,34	4,50	4,37	3,36	3,35	3,38	3,37
0,58	3,43	3,36	3,36	4,57	4,45	3,39	3,37	3,41	3,39
0,60	3,46	3,39	3,39	4,63	4,52	3,41	3,40	3,44	3,42
0,62	3,49	3,42	3,42	4,70	4,59	3,44	3,42	3,47	3,46
0,64	3,52	3,45	3,45	4,76	4,66	3,46	3,45	3,50	3,49
0,66	3,55	3,48	3,48	4,81	4,72	3,49	3,48	3,54	3,52
0,68	3,59	3,51	3,51	4,87	4,78	3,52	3,50	3,57	3,56
0,70	3,63	3,54	3,54	4,92	4,84	3,55	3,53	3,61	3,59
0,72	3,66	3,58	3,58	4,98	4,90	3,58	3,56	3,65	3,63
0,74	3,71	3,62	3,62	5,03	4,96	3,61	3,59	3,69	3,68
0,76	3,75	3,66	3,66	5,08	5,01	3,64	3,63	3,74	3,72
0,78	3,80	3,70	3,70	5,13	5,06	3,68	3,66	3,79	3,77
0,80	3,85	3,75	3,75	5,18	5,11	3,71	3,70	3,84	3,82
0,82	3,91	3,80	3,80	5,22	5,16	3,75	3,73	3,89	3,88
0,84	3,97	3,85	3,85	5,27	5,21	3,79	3,77	3,96	3,94
0,86	4,04	3,91	3,91	5,31	5,26	3,83	3,81	4,02	4,01

Tabela 23 nastavak:

NaOH ml	H ₂ O			SDS		CTAB		TX 100	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	4,12	3,97	3,98	5,36	5,30	3,88	3,86	4,10	4,08
0,90	4,20	4,04	4,05	5,40	5,35	3,92	3,90	4,18	4,17
0,92	4,30	4,12	4,13	5,44	5,40	3,97	3,95	4,28	4,26
0,94	4,41	4,22	4,22	5,49	5,44	4,02	4,00	4,38	4,36
0,96	4,53	4,32	4,33	5,53	5,49	4,07	4,05	4,49	4,48
0,98	4,65	4,44	4,44	5,57	5,53	4,13	4,11	4,61	4,60
1,00	4,78	4,56	4,57	5,61	5,58	4,19	4,17	4,74	4,72
1,02	4,90	4,69	4,70	5,66	5,62	4,24	4,23	4,86	4,85
1,04	5,01	4,82	4,83	5,70	5,67	4,30	4,29	4,98	4,97
1,06	5,11	4,95	4,95	5,74	5,72	4,36	4,35	5,09	5,08
1,08	5,21	5,06	5,06	5,78	5,76	4,43	4,41	5,19	5,18
1,10	5,30	5,17	5,17	5,83	5,81	4,49	4,48	5,29	5,29
1,12	5,38	5,26	5,26	5,87	5,86	4,55	4,54	5,38	5,38
1,14	5,46	5,35	5,35	5,92	5,90	4,62	4,61	5,47	5,47
1,16	5,53	5,44	5,43	5,96	5,95	4,68	4,68	5,55	5,56
1,18	5,60	5,52	5,51	6,01	6,00	4,75	4,74	5,63	5,64
1,20	5,67	5,59	5,59	6,05	6,05	4,81	4,81	5,70	5,72
1,22	5,74	5,67	5,67	6,10	6,11	4,88	4,87	5,78	5,80
1,24	5,81	5,74	5,74	6,15	6,17	4,94	4,94	5,85	5,87
1,26	5,88	5,81	5,81	6,21	6,23	5,01	5,01	5,92	5,94
1,28	5,95	5,88	5,89	6,26	6,29	5,08	5,08	5,99	6,02
1,30	6,02	5,96	5,97	6,32	6,36	5,16	5,15	6,06	6,09
1,32	6,09	6,04	6,05	6,38	6,43	5,23	5,23	6,14	6,17
1,34	6,17	6,12	6,13	6,45	6,51	5,32	5,31	6,22	6,25
1,36	6,26	6,20	6,22	6,53	6,61	5,41	5,40	6,30	6,34
1,38	6,35	6,29	6,31	6,61	6,71	5,50	5,49	6,38	6,42
1,40	6,45	6,40	6,42	6,70	6,83	5,61	5,60	6,48	6,53
1,42	6,57	6,51	6,55	6,80	6,97	5,74	5,76	6,59	6,63
1,44	6,70	6,65	6,70	6,92	7,16	5,88	5,90	6,71	6,76
1,46	6,87	6,81	6,89	7,07	7,52	6,06	6,09	6,86	6,91
1,48	7,09	7,03	7,15	7,26	8,49	6,29	6,33	7,04	7,08
1,50	7,49	7,39	7,92	7,66	9,38	6,68	6,79	7,29	7,41
1,52	8,54	8,53	9,20	8,72	9,80	7,65	7,92	7,97	8,12
1,54	9,53	9,63	9,80	9,56	9,97	8,98	9,36	9,10	9,13
1,56	9,89	9,93	9,99	9,87	10,08	9,83	10,02	9,84	9,84
1,58	10,04	10,07	10,11	10,01	10,17	10,20	10,22	10,10	10,14
1,60	10,15	10,17	10,20	10,12	10,24	10,33	10,33	10,23	10,27
1,62	10,24	10,26	10,28	10,20	10,30	10,43	10,42	10,33	10,37
1,64	10,31	10,33	10,34	10,27	10,36	10,51	10,49	10,42	10,44
1,66	10,37	10,39	10,40	10,33	10,41	10,57	10,56	10,49	10,51
1,68	10,43	10,45	10,45	10,39	10,45	10,62	10,61	10,55	10,56
1,70	10,48	10,49	10,49	10,44	10,49	10,67	10,66	10,60	10,62
1,72	10,52	10,54	10,53	10,48	10,53	10,72	10,70	10,65	10,66
1,74	10,56	10,57	10,57	10,52	10,57	10,76	10,74	10,69	10,70

Tabela 23 nastavak:

NaOH ml	H ₂ O			SDS pH		CTAB		TX 100	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
1,76	10,60	10,61	10,60	10,56	10,60	10,79	10,77	10,73	10,74
1,78	10,63	10,64	10,63	10,59	10,62	10,82	10,80	10,76	10,77
1,80	10,66	10,67	10,66	10,62	10,65	10,86	10,83	10,79	10,80
1,82	10,69	10,70	10,69	10,64	10,68	10,88	10,86	10,82	10,83

Tabela 24. Potenciometrijska titracija rastvora lizinopril-dihidrata ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1007 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09920$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH								
	H ₂ O			SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,84	2,84	2,83	3,12	3,18	2,78	2,86	2,84	2,84
0,02	2,85	2,85	2,84	3,14	3,19	2,79	2,87	2,86	2,86
0,04	2,86	2,86	2,86	3,16	3,21	2,80	2,88	2,87	2,87
0,06	2,87	2,87	2,87	3,18	3,23	2,81	2,90	2,88	2,88
0,08	2,88	2,88	2,88	3,20	3,25	2,83	2,91	2,89	2,89
0,10	2,90	2,90	2,89	3,22	3,27	2,84	2,92	2,90	2,91
0,12	2,91	2,91	2,90	3,24	3,29	2,85	2,93	2,92	2,92
0,14	2,92	2,92	2,92	3,26	3,31	2,86	2,95	2,93	2,93
0,16	2,93	2,93	2,93	3,28	3,33	2,88	2,96	2,94	2,95
0,18	2,95	2,95	2,94	3,30	3,35	2,89	2,98	2,96	2,96
0,20	2,96	2,96	2,96	3,32	3,37	2,90	2,99	2,97	2,97
0,22	2,98	2,98	2,97	3,34	3,39	2,92	3,00	2,99	2,99
0,24	2,99	2,99	2,98	3,36	3,41	2,93	3,02	3,00	3,01
0,26	3,00	3,00	3,00	3,38	3,43	2,95	3,03	3,02	3,02
0,28	3,02	3,02	3,01	3,40	3,45	2,96	3,05	3,03	3,04
0,30	3,03	3,04	3,03	3,42	3,47	2,98	3,07	3,05	3,05
0,32	3,05	3,05	3,04	3,44	3,50	3,00	3,08	3,06	3,07
0,34	3,07	3,07	3,06	3,47	3,52	3,01	3,10	3,08	3,09
0,36	3,08	3,08	3,08	3,49	3,54	3,03	3,12	3,10	3,10
0,38	3,10	3,10	3,09	3,51	3,56	3,05	3,14	3,12	3,12
0,40	3,12	3,12	3,11	3,53	3,59	3,07	3,16	3,14	3,14
0,42	3,14	3,14	3,13	3,56	3,61	3,09	3,18	3,16	3,16
0,44	3,16	3,16	3,15	3,58	3,63	3,11	3,20	3,18	3,18
0,46	3,17	3,18	3,17	3,61	3,66	3,13	3,22	3,20	3,20
0,48	3,19	3,20	3,19	3,63	3,68	3,15	3,24	3,22	3,22
0,50	3,22	3,22	3,21	3,66	3,71	3,17	3,26	3,24	3,24
0,52	3,24	3,24	3,23	3,68	3,73	3,19	3,28	3,26	3,27
0,54	3,26	3,26	3,25	3,71	3,76	3,22	3,31	3,29	3,29
0,56	3,28	3,29	3,28	3,74	3,79	3,24	3,33	3,31	3,32
0,58	3,31	3,31	3,30	3,77	3,82	3,27	3,36	3,34	3,35
0,60	3,33	3,34	3,33	3,80	3,85	3,29	3,38	3,37	3,37
0,62	3,36	3,36	3,35	3,83	3,88	3,32	3,41	3,39	3,40
0,64	3,39	3,39	3,38	3,86	3,91	3,35	3,44	3,42	3,43
0,66	3,42	3,42	3,41	3,90	3,95	3,38	3,47	3,46	3,47
0,68	3,45	3,45	3,44	3,93	3,98	3,41	3,50	3,49	3,50
0,70	3,48	3,49	3,48	3,97	4,02	3,45	3,54	3,53	3,54
0,72	3,52	3,52	3,51	4,01	4,06	3,48	3,57	3,56	3,58
0,74	3,55	3,56	3,55	4,06	4,11	3,52	3,61	3,61	3,62
0,76	3,59	3,60	3,59	4,11	4,16	3,56	3,65	3,65	3,66
0,78	3,64	3,64	3,63	4,16	4,21	3,61	3,70	3,70	3,71
0,80	3,68	3,69	3,68	4,22	4,27	3,66	3,75	3,75	3,77
0,82	3,73	3,74	3,73	4,29	4,34	3,71	3,80	3,81	3,83
0,84	3,79	3,80	3,79	4,37	4,42	3,77	3,86	3,88	3,90

Tabela 24 nastavak:

NaOH ml	pH								
	H ₂ O			SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,86	3,85	3,87	3,85	4,46	4,52	3,83	3,93	3,95	3,98
0,88	3,92	3,94	3,92	4,58	4,64	3,91	4,01	4,04	4,07
0,90	4,00	4,03	4,00	4,73	4,80	4,00	4,10	4,14	4,18
0,92	4,10	4,13	4,10	4,95	5,02	4,10	4,21	4,27	4,32
0,94	4,22	4,26	4,23	5,24	5,32	4,24	4,35	4,44	4,50
0,96	4,38	4,45	4,40	5,56	5,64	4,42	4,55	4,67	4,74
0,98	4,63	4,74	4,66	5,86	5,94	4,70	4,86	4,99	5,04
1,00	5,03	5,21	5,11	6,11	6,19	5,10	5,28	5,37	5,37
1,02	5,49	5,63	5,57	6,32	6,37	5,50	5,67	5,73	5,69
1,04	5,86	5,98	5,94	6,47	6,52	5,83	5,99	6,04	5,97
1,06	6,15	6,25	6,23	6,60	6,63	6,11	6,26	6,29	6,22
1,08	6,38	6,45	6,43	6,71	6,73	6,34	6,48	6,49	6,43
1,10	6,55	6,61	6,59	6,80	6,82	6,51	6,65	6,64	6,61
1,12	6,68	6,73	6,72	6,89	6,91	6,64	6,78	6,76	6,74
1,14	6,79	6,83	6,82	6,97	6,98	6,76	6,89	6,86	6,86
1,16	6,89	6,93	6,92	7,05	7,06	6,86	6,98	6,95	6,96
1,18	6,97	7,01	7,00	7,13	7,13	6,94	7,07	7,04	7,04
1,20	7,06	7,09	7,09	7,21	7,20	7,03	7,15	7,12	7,13
1,22	7,14	7,17	7,17	7,29	7,28	7,10	7,23	7,20	7,21
1,24	7,22	7,25	7,25	7,37	7,35	7,18	7,32	7,28	7,29
1,26	7,29	7,33	7,33	7,45	7,43	7,26	7,39	7,36	7,37
1,28	7,37	7,41	7,41	7,54	7,50	7,33	7,47	7,44	7,45
1,30	7,45	7,49	7,49	7,63	7,59	7,41	7,55	7,52	7,53
1,32	7,53	7,58	7,58	7,73	7,68	7,49	7,64	7,60	7,62
1,34	7,62	7,67	7,68	7,85	7,77	7,57	7,73	7,69	7,71
1,36	7,71	7,77	7,78	7,99	7,88	7,66	7,83	7,79	7,80
1,38	7,81	7,87	7,89	8,16	8,01	7,76	7,93	7,90	7,91
1,40	7,93	8,00	8,03	8,40	8,17	7,86	8,05	8,02	8,04
1,42	8,06	8,15	8,19	8,75	8,36	7,98	8,19	8,16	8,18
1,44	8,22	8,35	8,41	9,13	8,65	8,11	8,36	8,34	8,37
1,46	8,43	8,64	8,74	9,39	9,02	8,28	8,59	8,59	8,63
1,48	8,75	9,05	9,17	9,56	9,33	8,50	8,94	8,96	9,02
1,50	9,16	9,41	9,48	9,69	9,54	8,82	9,33	9,35	9,40
1,52	9,48	9,63	9,67	9,79	9,68	9,21	9,63	9,62	9,67
1,54	9,67	9,78	9,81	9,88	9,80	9,52	9,83	9,79	9,84
1,56	9,81	9,89	9,91	9,95	9,89	9,77	9,96	9,91	9,96
1,58	9,92	9,98	10,00	10,02	9,97	9,88	10,06	10,02	10,05
1,60	10,01	10,06	10,07	10,07	10,04	9,98	10,15	10,10	10,13
1,62	10,08	10,12	10,14	10,12	10,10	10,06	10,22	10,17	10,19
1,64	10,15	10,18	10,19	10,17	10,15	10,13	10,28	10,23	10,25
1,66	10,20	10,24	10,24	10,21	10,20	10,20	10,34	10,29	10,31
1,68	10,26	10,28	10,29	10,25	10,25	10,25	10,39	10,34	10,36

Tabela 24 nastavak:

NaOH ml	pH								
	H ₂ O			SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 3	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
1,70	10,30	10,33	10,33	10,29	10,29	10,31	10,44	10,39	10,40
1,72	10,34	10,37	10,37	10,33	10,33	10,36	10,49	10,43	10,44
1,74	10,39	10,41	10,41	10,36	10,36	10,40	10,53	10,47	10,48
1,76	10,42	10,44	10,44	10,39	10,40	10,45	10,57	10,50	10,52
1,78	10,46	10,47	10,48	10,42	10,43	10,49	10,60	10,54	10,55
1,80	10,49	10,50	10,51	10,45	10,46	10,53	10,63	10,57	10,58
1,82	10,52	10,53	10,53	10,47	10,49	10,56	10,66	10,60	10,61
1,84	10,55	10,56	10,56	10,50	10,52	10,59	10,69	10,62	10,64
1,86	10,58	10,59	10,59	10,52	10,54	10,62	10,72	10,65	10,66
1,88	10,60	10,61	10,61	10,55	10,57	10,65	10,75	10,68	10,69
1,90	10,63	10,63	10,63	10,57	10,59	10,68	10,78	10,70	10,71
1,92	10,65	10,66	10,66	10,59	10,61	10,71	10,80	10,72	10,73
1,94	10,67	10,68	10,68	10,61	10,64	10,74	10,82	10,75	10,76
1,96	10,69	10,70	10,70	10,63	10,66	10,76	10,85	10,77	10,78
1,98	10,71	10,72	10,72	10,65	10,68	10,78	10,87	10,79	10,80
2,00	10,73	10,74	10,74	10,67	10,70	10,81	10,89	10,81	10,82
2,02	10,75	10,76	10,75	10,68	10,71	10,83	10,91	10,82	10,83
2,04	10,77	10,78	10,77	10,70	10,73	10,85	10,93	10,84	10,85
2,06	10,79	10,79	10,79	10,72	10,75	10,87	10,95	10,86	10,87
2,08	10,81	10,81	10,81	10,74	10,77	10,89	10,97	10,88	10,89
2,10	10,82	10,82	10,82	10,75	10,79	10,91	10,98	10,89	10,90
2,12	10,84	10,84	10,84	10,77	10,80	10,93	11,00	10,91	10,92
2,14	10,85	10,86	10,85	10,78	10,82	10,95	11,02	10,93	10,93
2,16	10,87	10,87	10,87	10,80	10,83	10,96	11,03	10,94	10,95
2,18	10,88	10,88	10,88	10,81	10,84	10,98	11,05	10,95	10,96
2,20	10,90	10,90	10,89	10,82	10,86	11,00	11,07	10,97	10,98

Tabela 25. Potenciometrijska titracija rastvora fosinopril-natrijuma u smeši metanol – voda (m/m), ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1024 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09970$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	40% Metanol		45% Metanol		50% Metanol		55% Metanol	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	3,07	3,07	3,07	3,07	3,10	3,10	2,90	2,90
0,02	3,08	3,09	3,09	3,08	3,12	3,11	2,91	2,91
0,04	3,10	3,11	3,10	3,10	3,13	3,13	2,92	2,92
0,06	3,12	3,12	3,12	3,12	3,15	3,14	2,93	2,93
0,08	3,13	3,14	3,13	3,13	3,16	3,16	2,94	2,94
0,10	3,15	3,16	3,15	3,15	3,18	3,18	2,95	2,95
0,12	3,17	3,17	3,17	3,17	3,20	3,19	2,96	2,95
0,14	3,18	3,19	3,18	3,18	3,21	3,21	2,97	2,96
0,16	3,20	3,21	3,20	3,20	3,23	3,23	2,98	2,97
0,18	3,22	3,23	3,22	3,22	3,25	3,25	2,99	2,99
0,20	3,24	3,25	3,24	3,24	3,27	3,27	3,00	3,00
0,22	3,26	3,27	3,26	3,26	3,30	3,29	3,01	3,01
0,24	3,29	3,29	3,29	3,29	3,32	3,31	3,03	3,02
0,26	3,31	3,31	3,31	3,31	3,34	3,34	3,04	3,03
0,28	3,33	3,34	3,33	3,33	3,36	3,36	3,05	3,04
0,30	3,36	3,36	3,36	3,36	3,39	3,39	3,06	3,06
0,32	3,38	3,39	3,39	3,38	3,42	3,41	3,07	3,07
0,34	3,41	3,42	3,41	3,41	3,44	3,44	3,09	3,08
0,36	3,44	3,45	3,44	3,44	3,47	3,47	3,10	3,09
0,38	3,47	3,48	3,47	3,47	3,51	3,50	3,11	3,11
0,40	3,50	3,51	3,51	3,50	3,54	3,54	3,13	3,12
0,42	3,54	3,54	3,54	3,54	3,58	3,57	3,14	3,14
0,44	3,57	3,58	3,58	3,58	3,61	3,61	3,16	3,15
0,46	3,61	3,62	3,62	3,61	3,65	3,65	3,17	3,17
0,48	3,65	3,66	3,66	3,65	3,70	3,69	3,19	3,18
0,50	3,69	3,70	3,70	3,70	3,74	3,73	3,21	3,20
0,52	3,73	3,74	3,74	3,74	3,79	3,78	3,22	3,22
0,54	3,77	3,79	3,79	3,79	3,84	3,83	3,24	3,24
0,56	3,82	3,84	3,84	3,84	3,89	3,89	3,26	3,26
0,58	3,87	3,89	3,90	3,89	3,95	3,94	3,28	3,28
0,60	3,92	3,94	3,95	3,95	4,01	4,00	3,30	3,30
0,62	3,98	4,00	4,01	4,01	4,07	4,06	3,32	3,32
0,64	4,04	4,06	4,07	4,07	4,14	4,12	3,35	3,34
0,66	4,09	4,11	4,13	4,13	4,20	4,19	3,37	3,37
0,68	4,15	4,18	4,19	4,19	4,27	4,26	3,40	3,39
0,70	4,21	4,24	4,26	4,25	4,34	4,33	3,42	3,42
0,72	4,28	4,30	4,32	4,32	4,41	4,40	3,45	3,45
0,74	4,34	4,37	4,39	4,39	4,48	4,47	3,49	3,48
0,76	4,41	4,44	4,46	4,45	4,55	4,54	3,52	3,52
0,78	4,48	4,51	4,53	4,53	4,63	4,61	3,56	3,56
0,80	4,55	4,58	4,60	4,60	4,70	4,69	3,60	3,60
0,82	4,62	4,65	4,68	4,67	4,77	4,76	3,64	3,64
0,84	4,70	4,73	4,75	4,75	4,86	4,84	3,69	3,69

Tabela 25 nastavak:

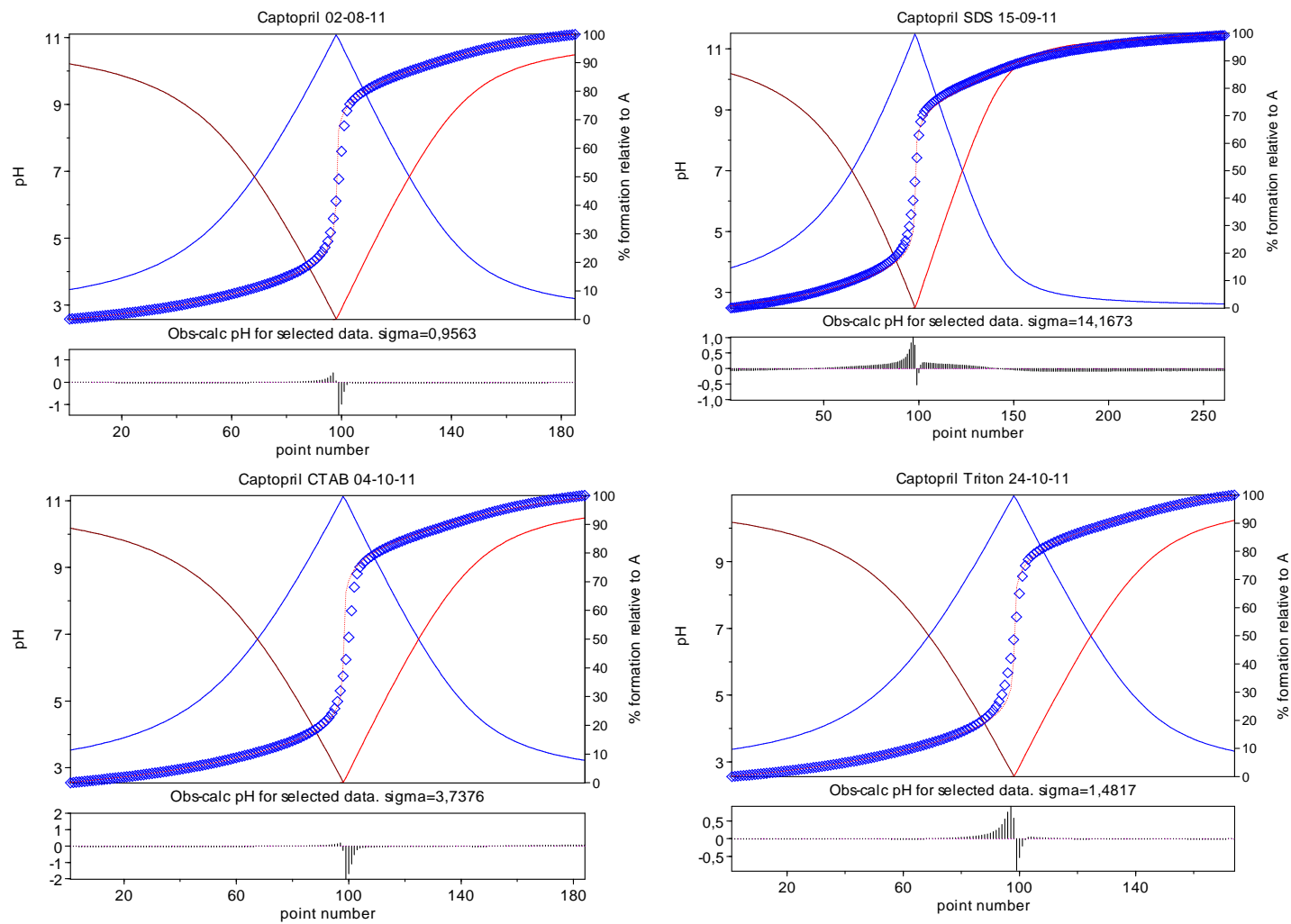
NaOH ml	pH							
	40% Metanol		45% Metanol		50% Metanol		55% Metanol	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,86	4,77	4,82	4,83	4,83	4,94	4,92	3,75	3,75
0,88	4,86	4,90	4,92	4,91	5,02	5,01	3,81	3,81
0,90	4,95	5,00	5,01	5,00	5,12	5,11	3,89	3,89
0,92	5,04	5,10	5,11	5,11	5,22	5,21	3,98	3,98
0,94	5,15	5,22	5,23	5,22	5,34	5,32	4,09	4,09
0,96	5,27	5,35	5,35	5,34	5,47	5,46	4,24	4,24
0,98	5,47	5,51	5,50	5,49	5,62	5,61	4,46	4,46
1,00	5,64	5,80	5,67	5,66	5,80	5,79	4,79	4,80
1,02	5,85	5,99	5,89	5,86	6,01	6,00	5,21	5,22
1,04	6,09	6,27	6,12	6,10	6,27	6,26	5,75	5,76
1,06	6,48	6,78	6,52	6,48	6,71	6,70	6,56	6,56
1,08	7,13	7,52	7,12	7,06	7,33	7,32	7,61	7,58
1,10	7,99	8,37	7,86	7,78	8,04	8,05	8,70	8,63
1,12	8,86	9,15	8,64	8,53	8,78	8,77	9,63	9,52
1,14	9,56	9,77	9,32	9,22	9,43	9,42	10,27	10,15
1,16	10,04	10,18	9,82	9,74	9,90	9,90	10,65	10,54
1,18	10,34	10,42	10,15	10,09	10,21	10,21	10,84	10,78
1,20	10,52	10,58	10,36	10,32	10,42	10,41	10,93	10,91
1,22	10,61	10,64	10,50	10,47	10,55	10,54	10,98	10,99
1,24	10,68	10,70	10,59	10,57	10,63	10,62	11,03	11,04
1,26	10,73	10,75	10,65	10,64	10,69	10,68	11,07	11,08
1,28	10,78	10,80	10,70	10,69	10,73	10,73	11,10	11,08

Tabela 26. Potenciometrijska titracija rastvora fosinopril-natrijuma ($c=10^{-3}$ M, $V=40$ ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora 0,1024 M HCl, standardnim rastvorom NaOH ($c=0,09970$ M). Temperatura 25 °C; jonska sila 0,1 M NaCl.

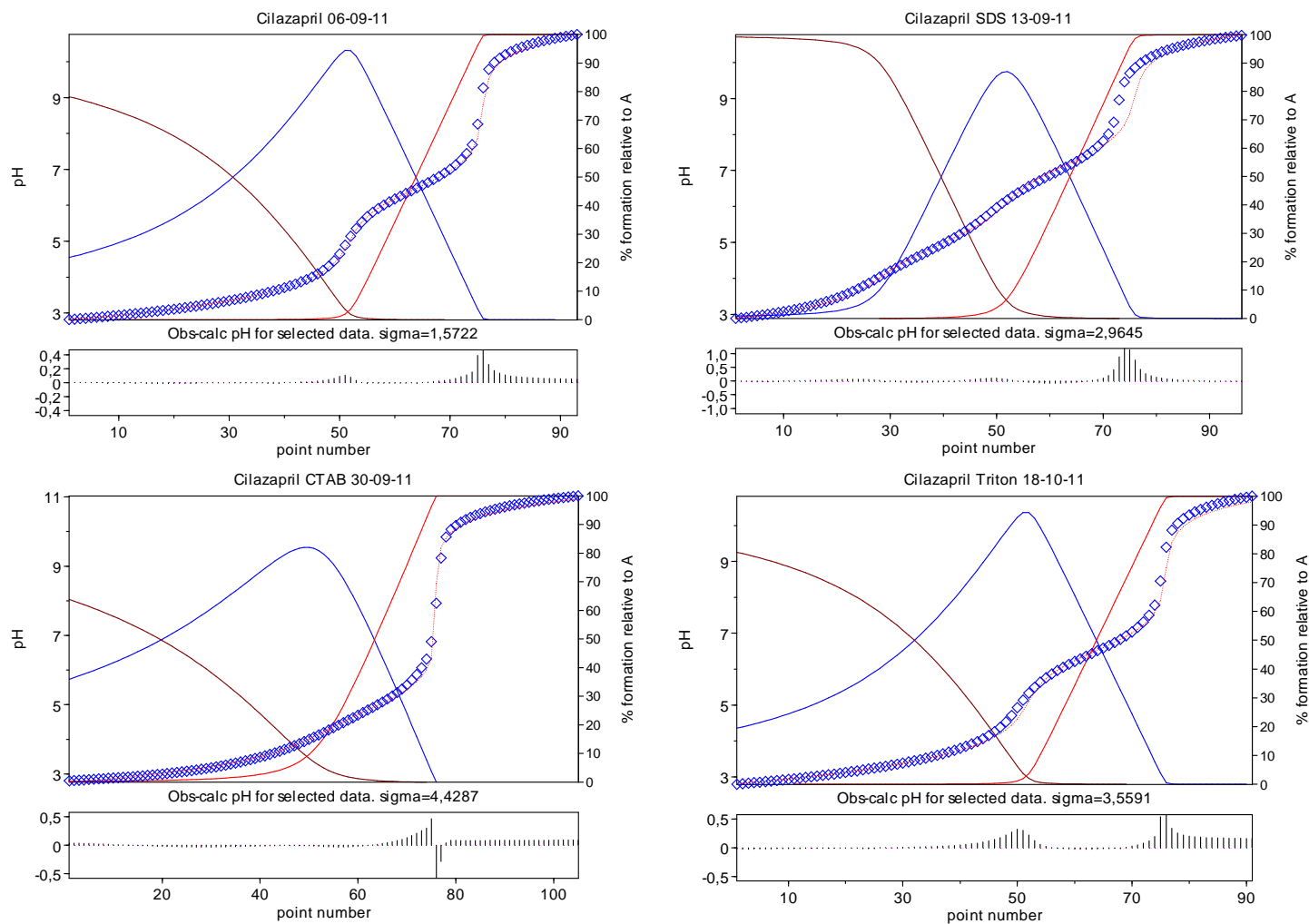
NaOH ml	pH					
	SDS 10^{-2} M		CTAB 10^{-2} M		TX 100 10^{-2} M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,92	2,90	2,50	2,79	2,90	2,90
0,02	2,93	2,91	2,57	2,80	2,92	2,92
0,04	2,95	2,93	2,62	2,82	2,94	2,93
0,06	2,96	2,95	2,67	2,83	2,95	2,95
0,08	2,98	2,97	2,70	2,84	2,97	2,97
0,10	3,00	2,99	2,74	2,85	2,99	2,99
0,12	3,02	3,01	2,77	2,87	3,01	3,00
0,14	3,04	3,03	2,80	2,88	3,03	3,02
0,16	3,06	3,05	2,82	2,89	3,04	3,04
0,18	3,08	3,07	2,84	2,91	3,07	3,06
0,20	3,10	3,10	2,87	2,92	3,09	3,09
0,22	3,13	3,13	2,89	2,93	3,11	3,11
0,24	3,16	3,15	2,90	2,95	3,14	3,13
0,26	3,18	3,18	2,92	2,96	3,16	3,16
0,28	3,21	3,21	2,94	2,98	3,19	3,18
0,30	3,25	3,25	2,96	2,99	3,22	3,21
0,32	3,28	3,28	2,98	3,01	3,24	3,24
0,34	3,32	3,32	2,99	3,03	3,27	3,27
0,36	3,36	3,36	3,01	3,04	3,31	3,30
0,38	3,40	3,40	3,03	3,06	3,34	3,34
0,40	3,45	3,45	3,05	3,08	3,38	3,37
0,42	3,50	3,50	3,07	3,10	3,42	3,41
0,44	3,55	3,56	3,09	3,12	3,46	3,45
0,46	3,61	3,62	3,11	3,14	3,50	3,49
0,48	3,67	3,68	3,13	3,16	3,55	3,54
0,50	3,74	3,76	3,16	3,18	3,59	3,59
0,52	3,82	3,84	3,18	3,20	3,65	3,63
0,54	3,91	3,92	3,20	3,22	3,70	3,69
0,56	4,00	4,02	3,23	3,25	3,76	3,74
0,58	4,09	4,11	3,25	3,27	3,81	3,80
0,60	4,20	4,22	3,28	3,30	3,87	3,86
0,62	4,30	4,32	3,31	3,33	3,94	3,93
0,64	4,40	4,42	3,34	3,35	4,00	3,99
0,66	4,49	4,52	3,37	3,38	4,07	4,06
0,68	4,59	4,61	3,40	3,41	4,14	4,12
0,70	4,69	4,70	3,43	3,45	4,20	4,19
0,72	4,77	4,79	3,47	3,48	4,27	4,26
0,74	4,87	4,88	3,51	3,52	4,34	4,26
0,76	4,95	4,97	3,55	3,56	4,41	4,28
0,78	5,04	5,06	3,59	3,60	4,48	4,36
0,80	5,13	5,15	3,64	3,65	4,56	4,43
0,82	5,22	5,24	3,69	3,70	4,63	4,50
0,84	5,31	5,33	3,74	3,76	4,71	4,58
0,86	5,40	5,43	3,80	3,82	4,80	4,65

Tabela 26 nastavak:

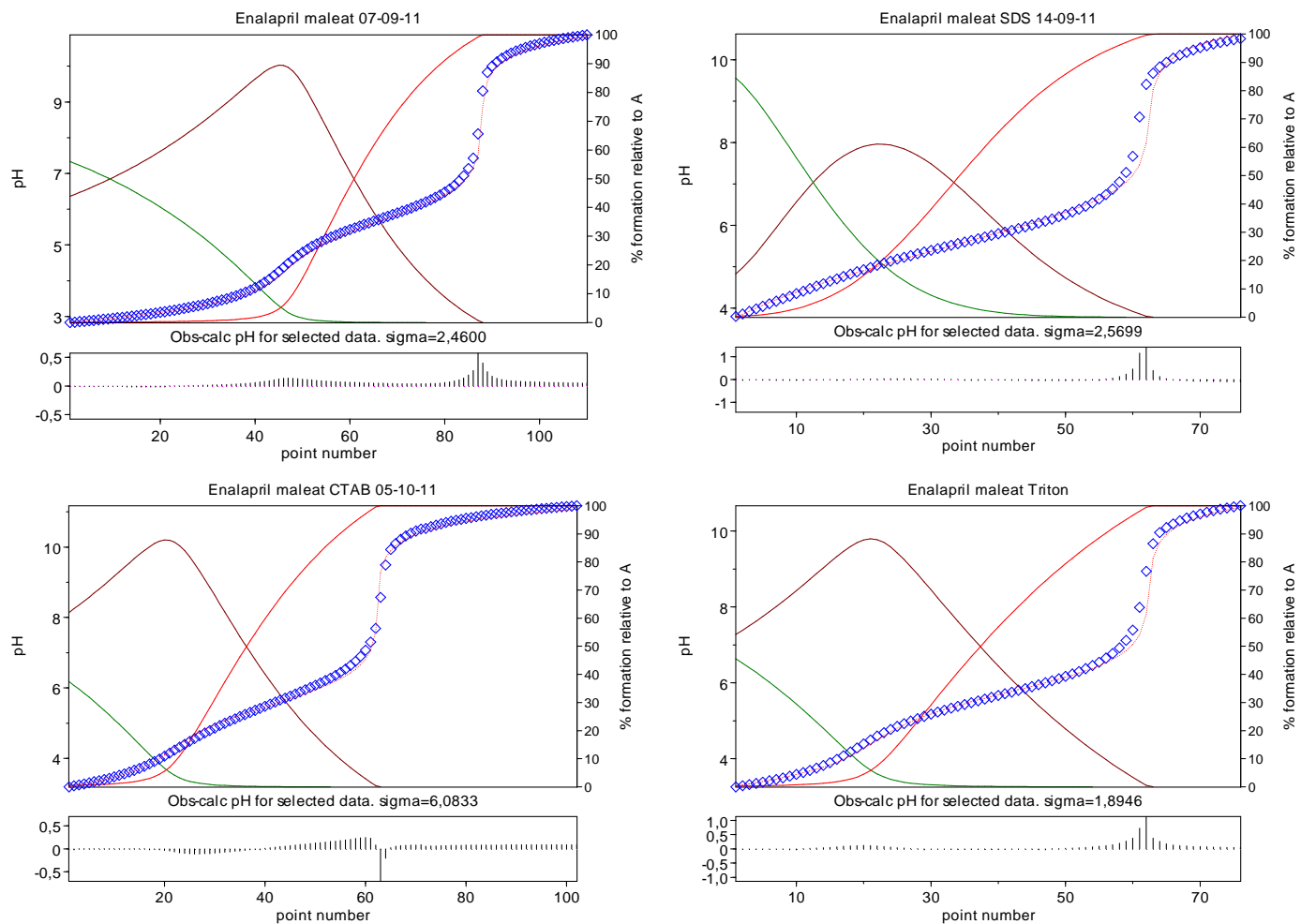
NaOH ml	pH					
	SDS 10 ⁻² M		CTAB 10 ⁻² M		TX 100 10 ⁻² M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	5,50	5,53	3,87	3,89	4,88	4,73
0,90	5,61	5,64	3,95	3,97	4,98	4,81
0,92	5,73	5,76	4,04	4,06	5,08	4,90
0,94	5,86	5,90	4,15	4,17	5,20	4,99
0,96	6,00	6,05	4,29	4,31	5,33	5,09
0,98	6,17	6,23	4,46	4,50	5,49	5,20
1,00	6,36	6,44	4,72	4,76	5,68	5,33
1,02	6,67	6,85	5,10	5,16	5,90	5,47
1,04	7,42	7,75	5,54	5,62	6,16	5,63
1,06	8,57	8,90	6,01	6,14	6,75	5,81
1,08	9,41	9,58	6,80	7,04	7,74	6,04
1,10	9,76	9,81	7,93	8,29	8,90	6,47
1,12	9,91	9,94	9,05	9,33	9,63	7,18
1,14	10,01	10,03	9,69	9,83	9,90	8,14
1,16	10,10	10,11	9,96	10,00	10,01	9,05
1,18	10,17	10,18	10,07	10,10	10,10	9,66
1,20	10,23	10,24	10,16	10,18	10,17	9,97
1,22	10,29	10,30	10,23	10,25	10,23	10,10
1,24	10,34	10,34	10,29	10,30	10,28	10,18
1,26	10,38	10,39	10,34	10,35	10,33	10,24
1,28	10,42	10,43	10,39	10,40	10,38	10,29



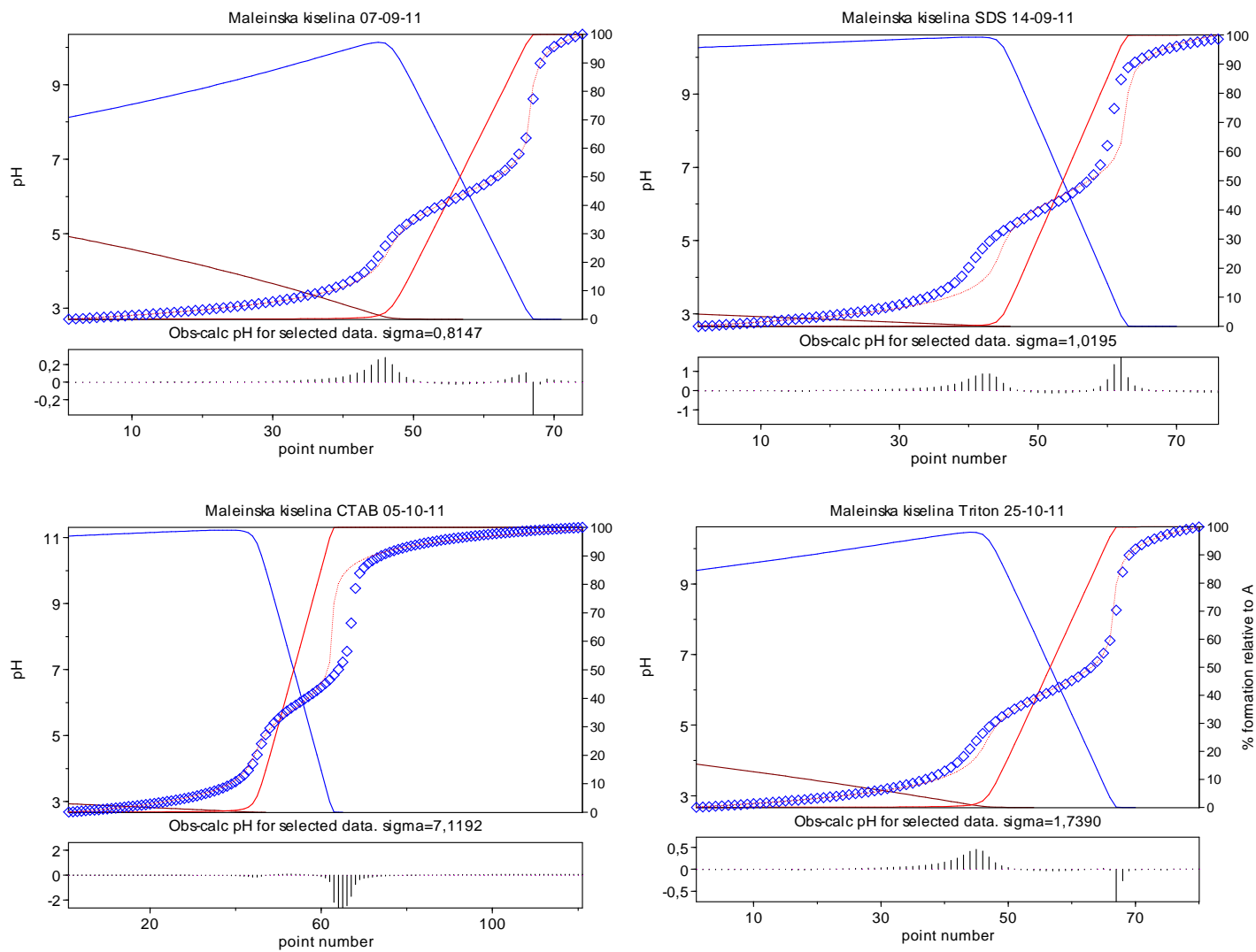
Slika 37. Izračunavanje pK_a vrednosti kaptoprila na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



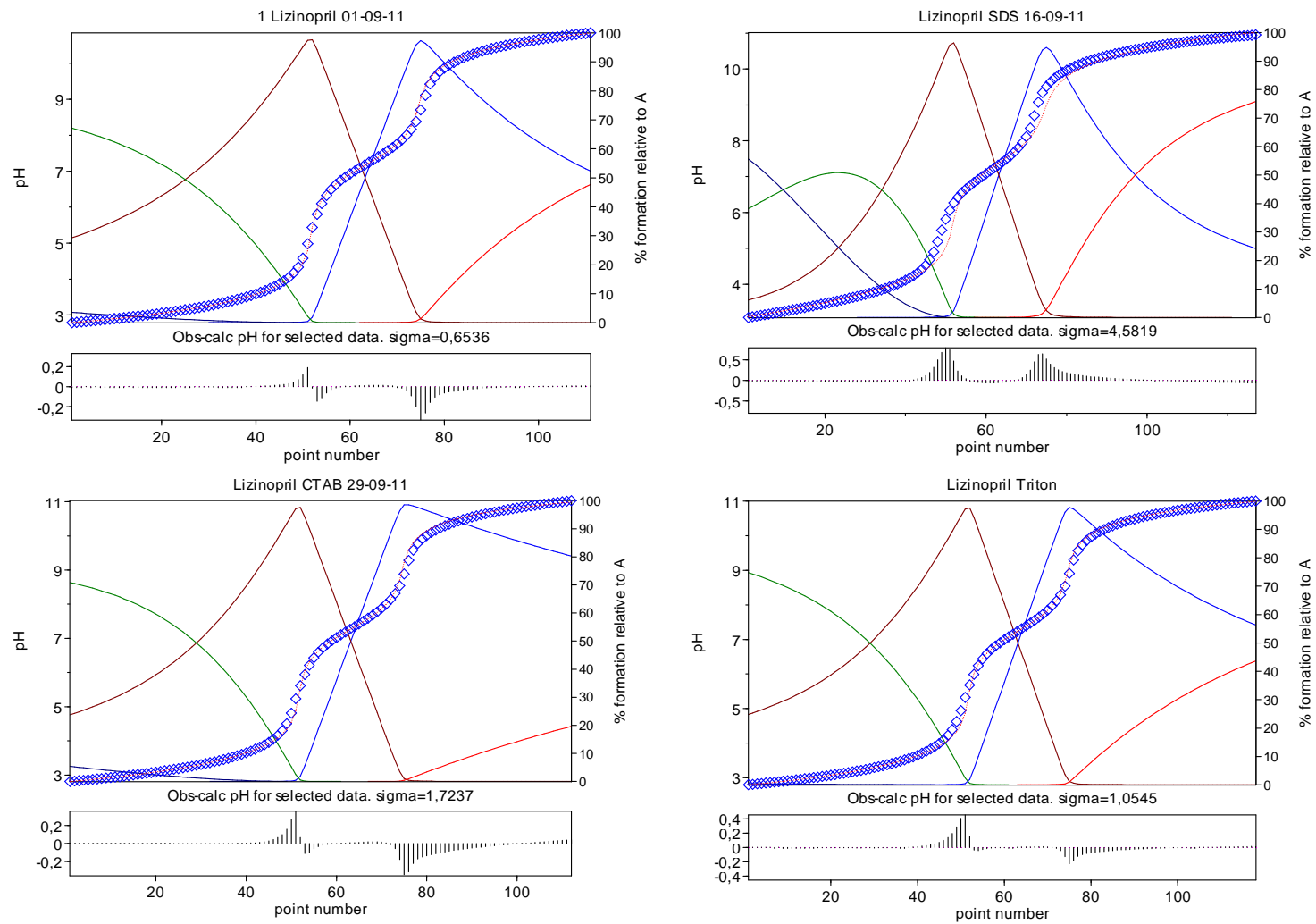
Slika 38. Izračunavanje pK_a vrednosti cilazaprila na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



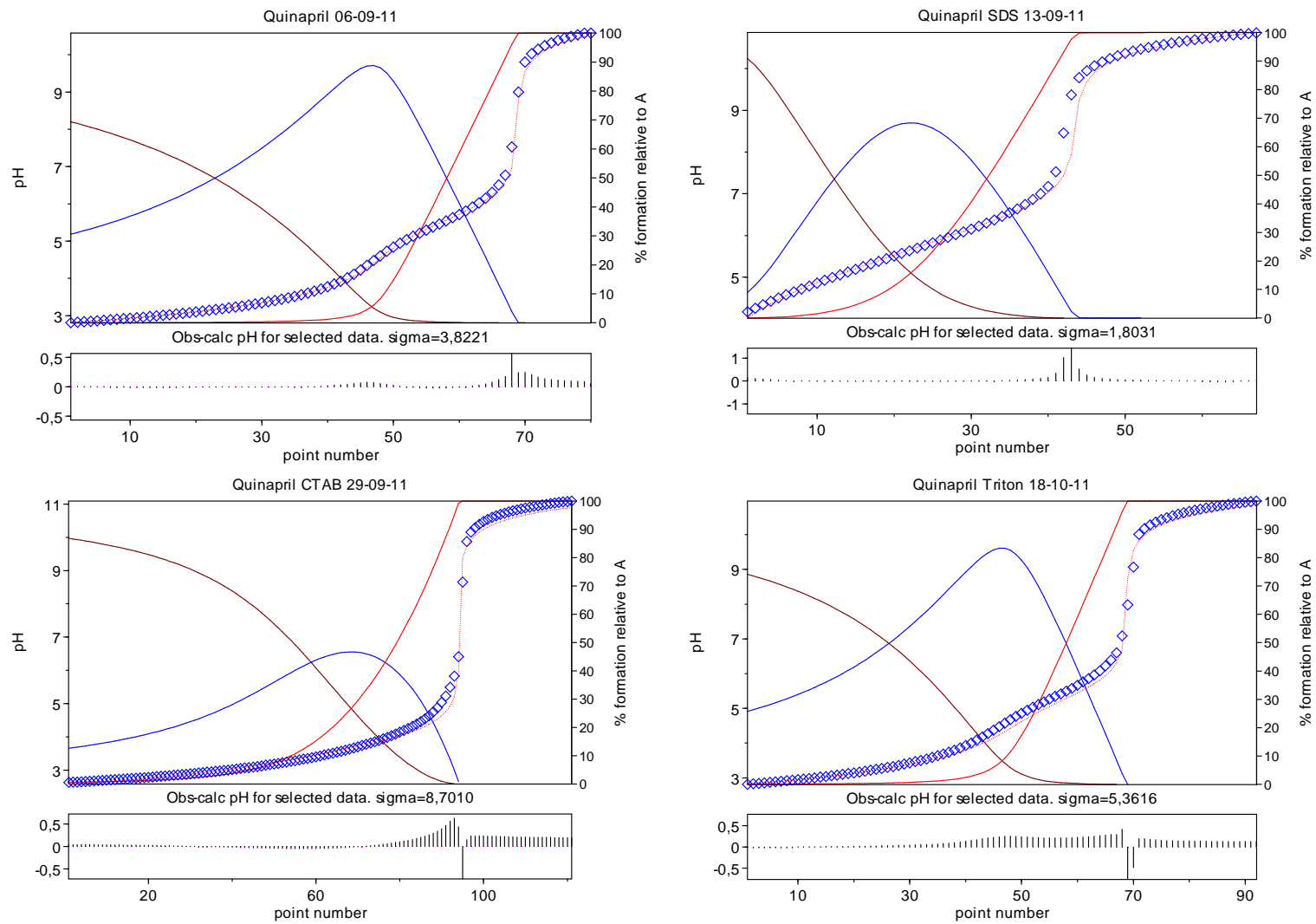
Slika 39. Izračunavanje pK_a vrednosti enalapрила na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



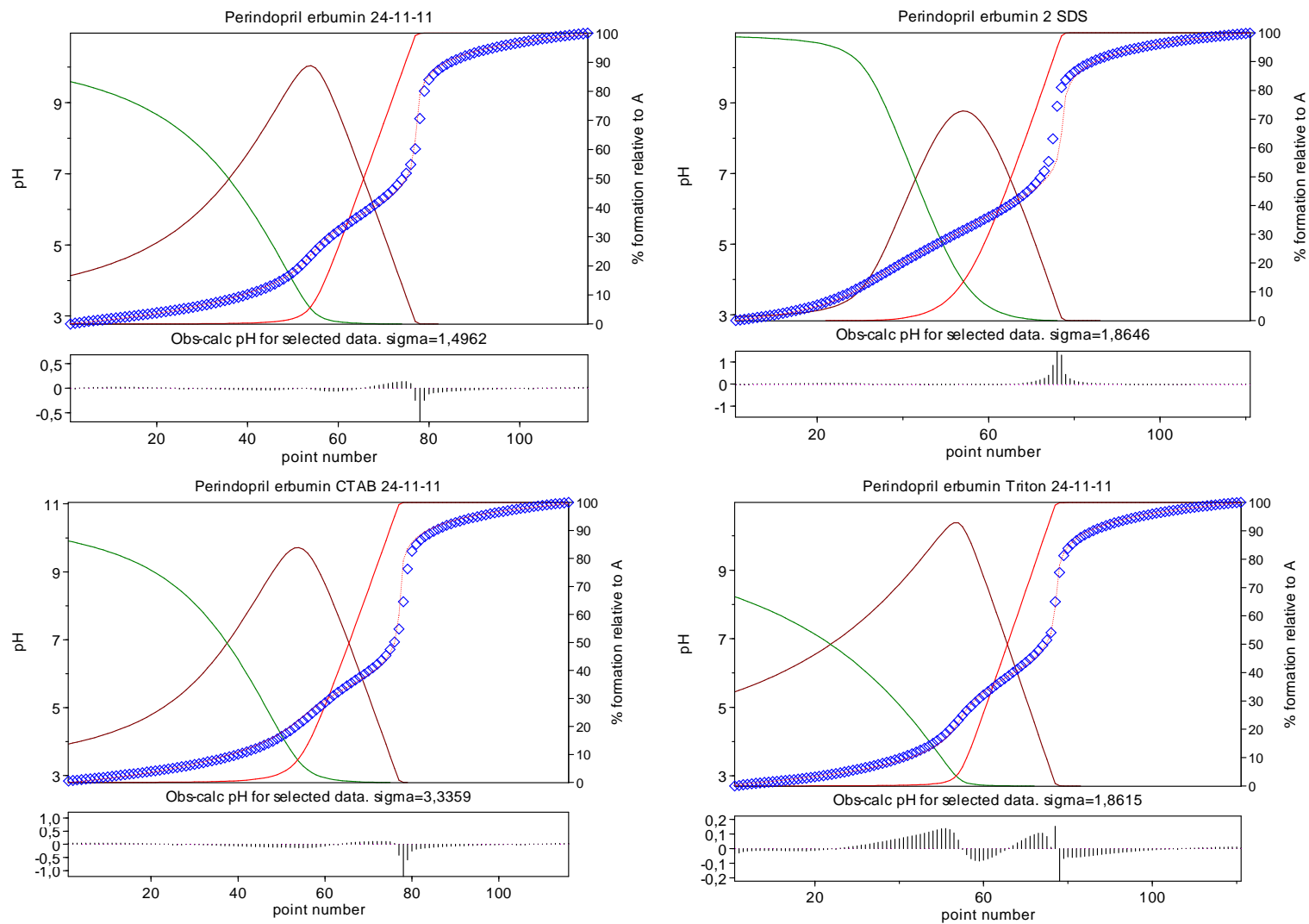
Slika 40. Izračunavanje pK_a vrednosti maleinske kiseline na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



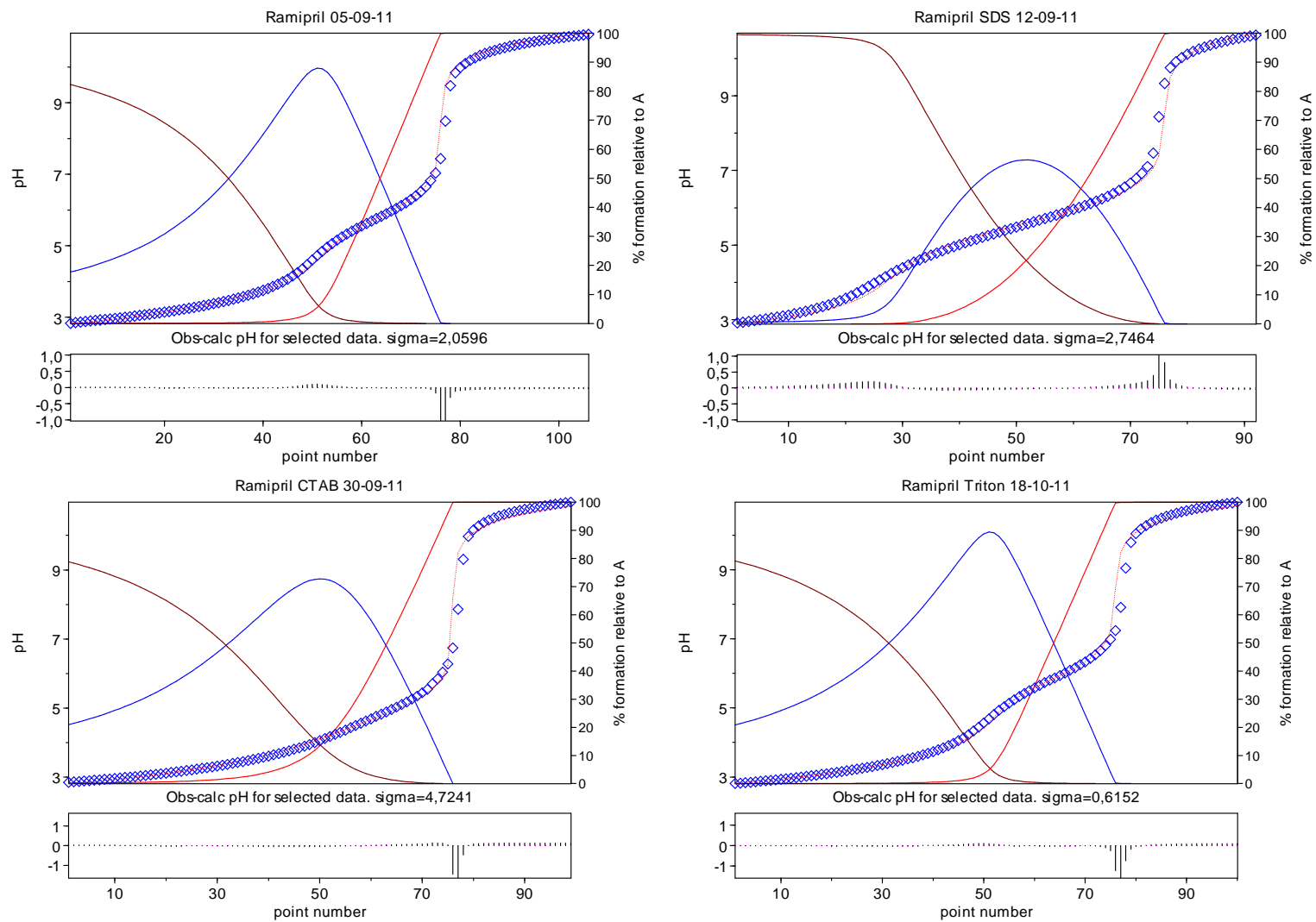
Slika 41. Izračunavanje pK_a vrednosti lizinoprila na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



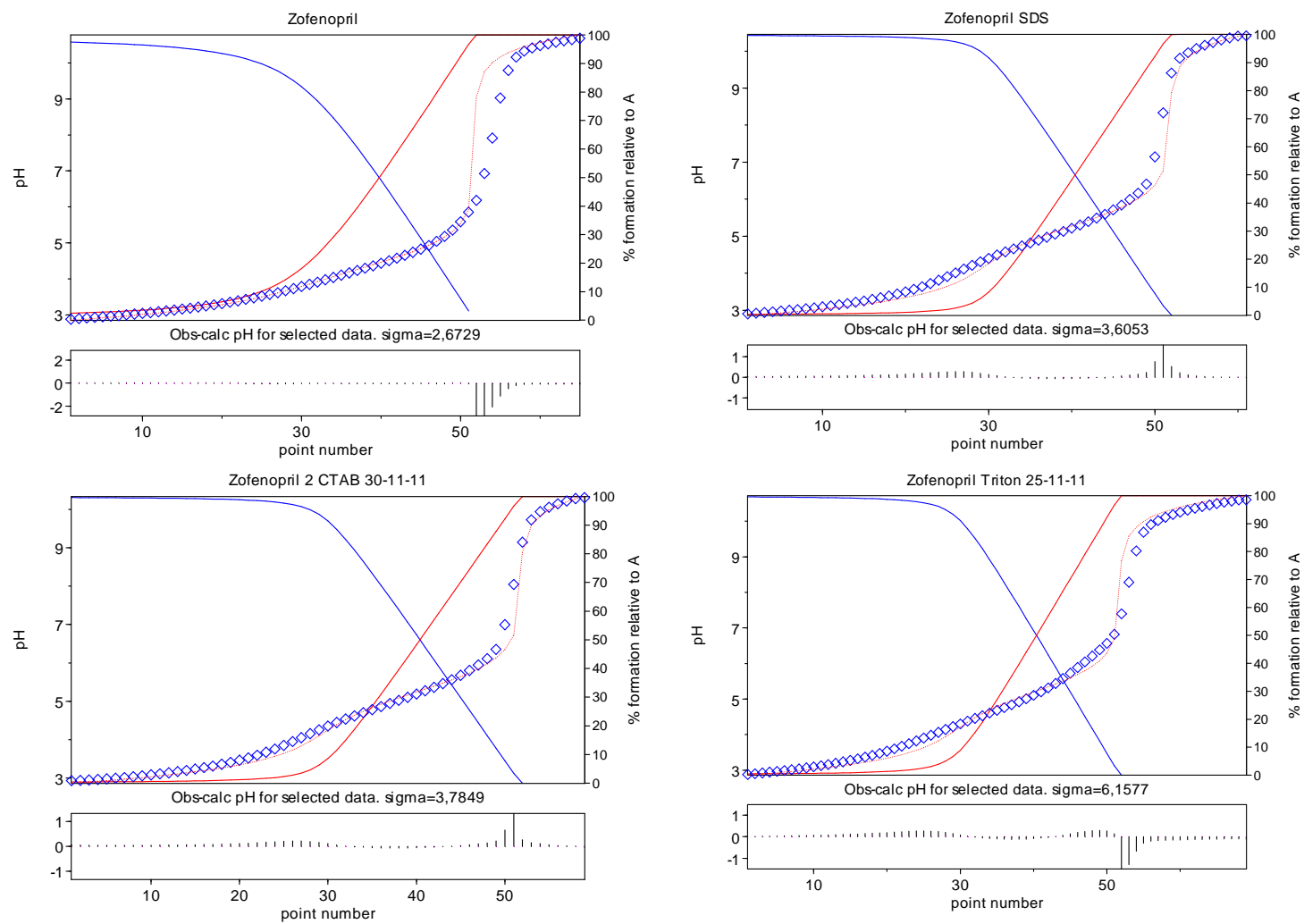
Slika 42. Izračunavanje pK_a vrednosti kvinaprila na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



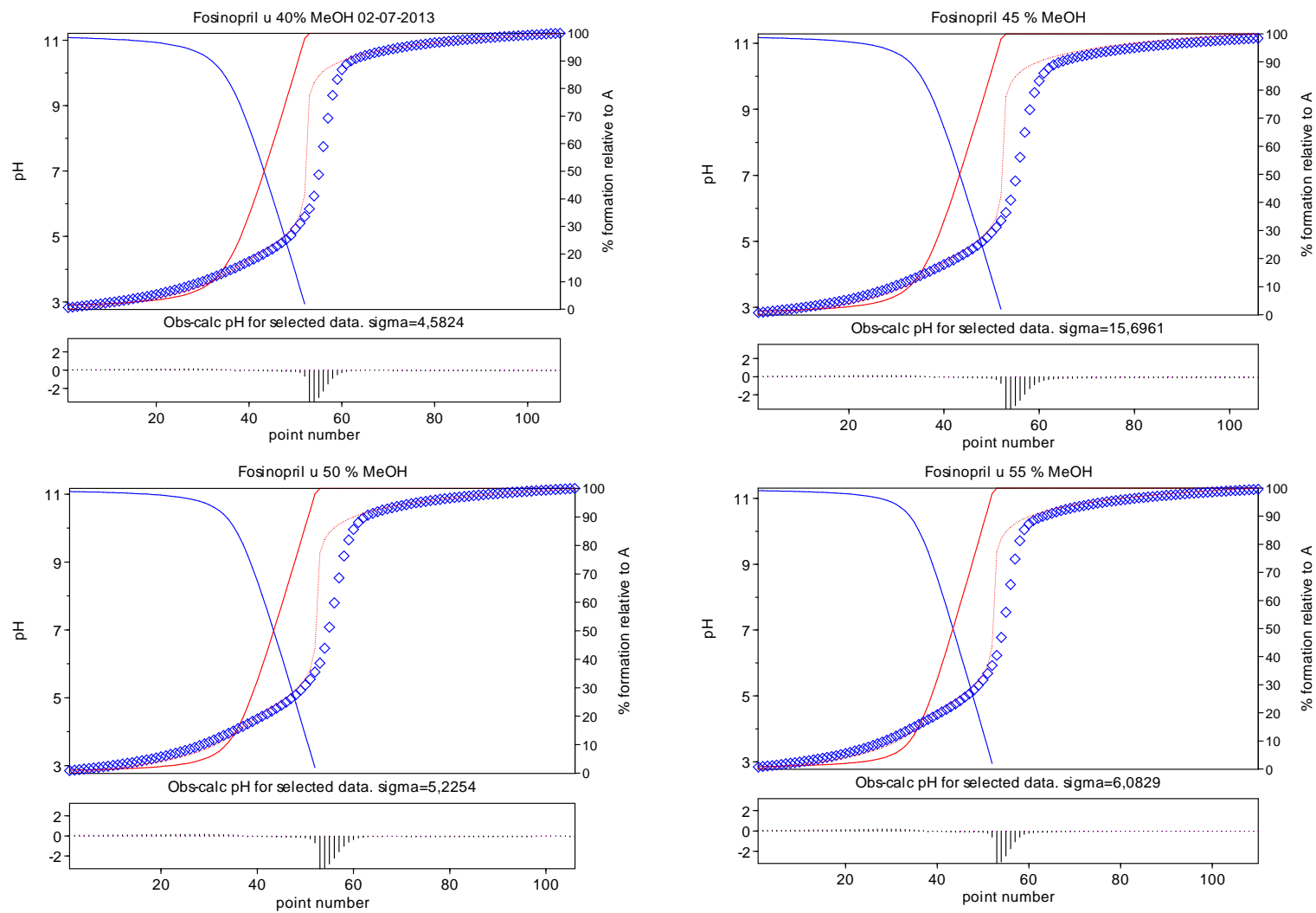
Slika 43. Izračunavanje pK_a vrednosti perindopрила na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



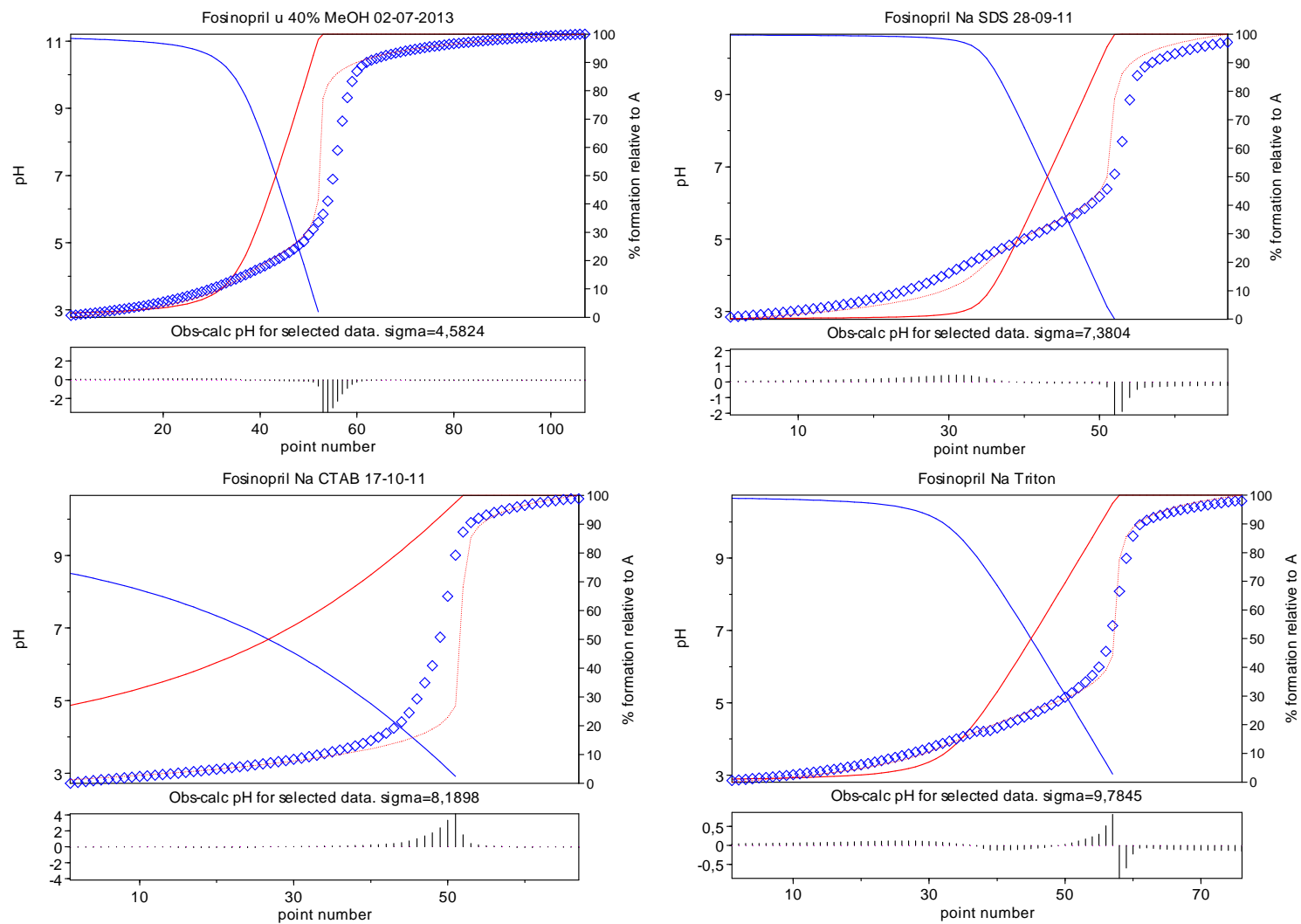
Slika 44. Izračunavanje pK_a vrednosti ramiprila na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



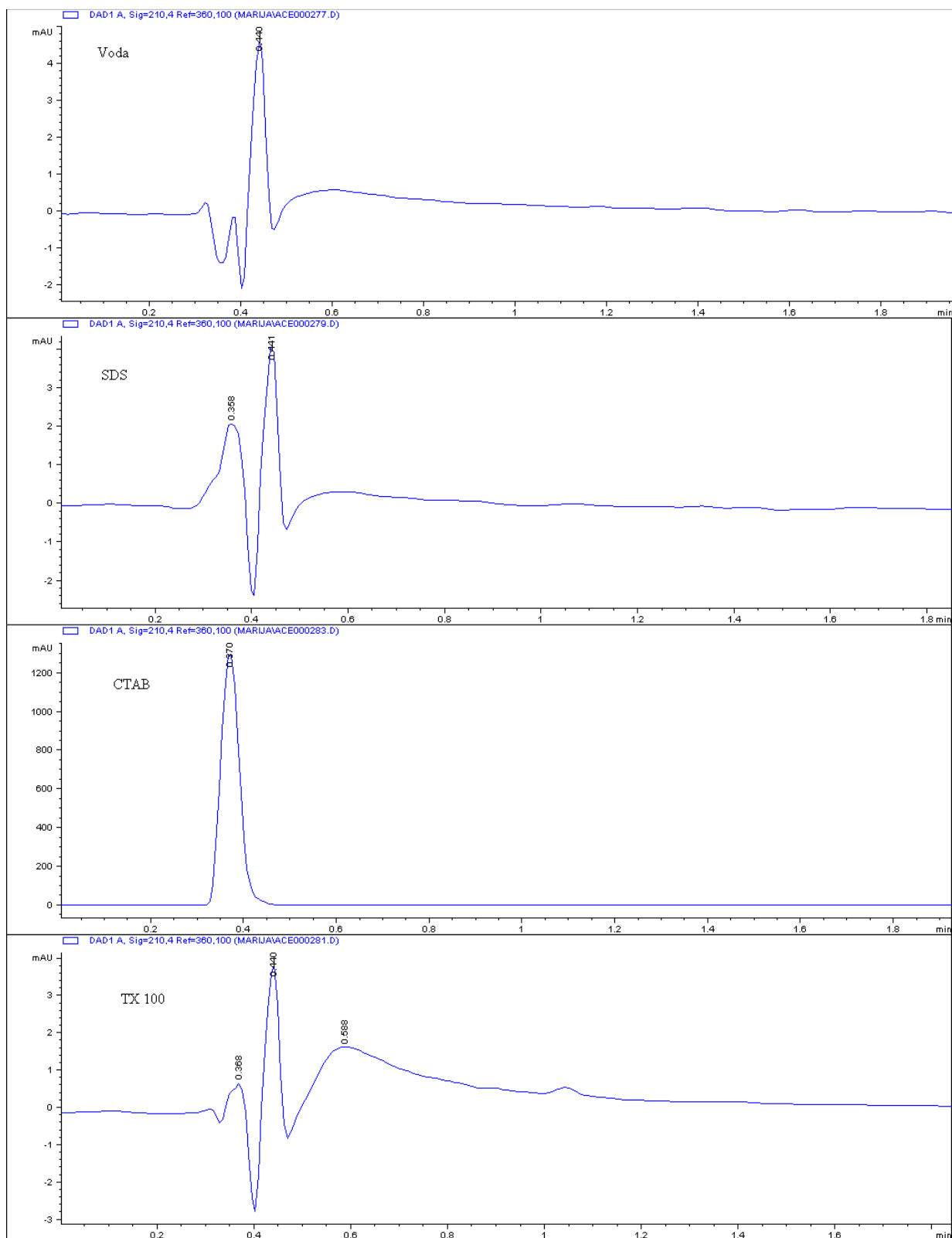
Slika 45. Izračunavanje pK_a vrednosti zofenopрила na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



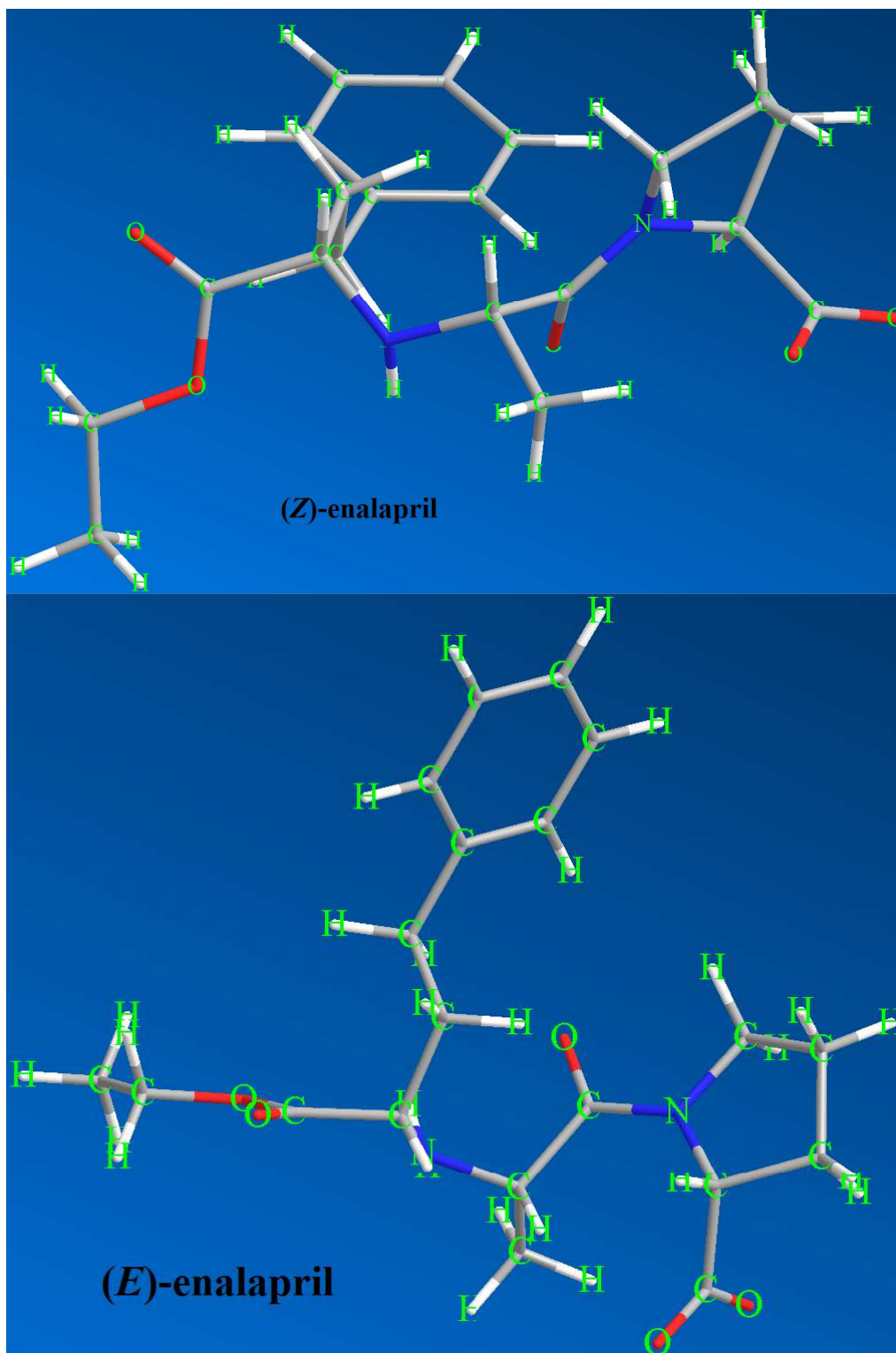
Slika 46. Izračunavanje pK_a vrednosti fosinopрила na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih u smešama metanol – voda 40 – 55 % u kompjuterskom programu Hyperquad



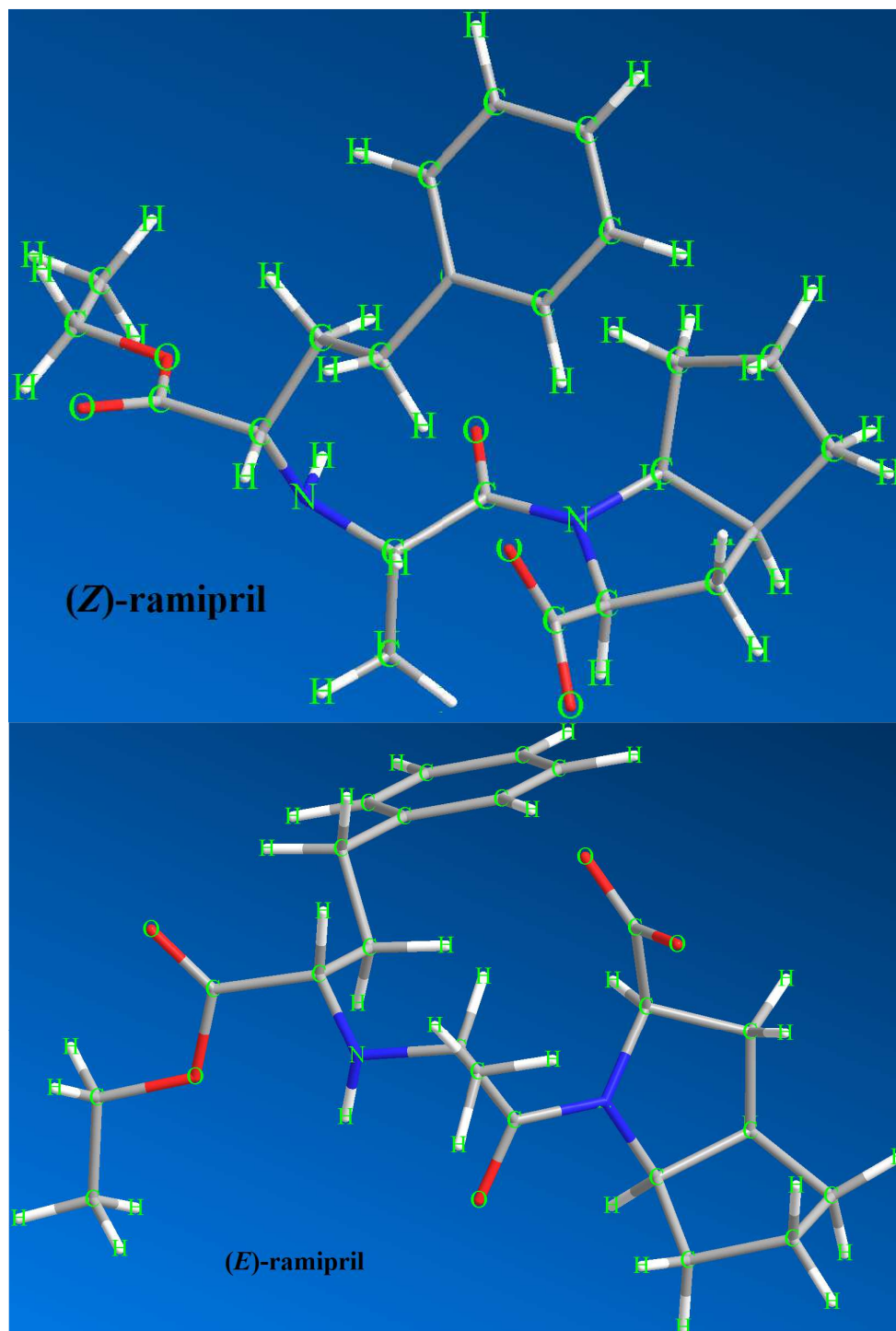
Slika 47. Izračunavanje pK_a vrednosti fosinopрила na osnovu potenciometrijskih podataka dobijenih bez i u prisustvu surfaktanata, u kompjuterskom programu Hyperquad



Slika 48. Reprezentivni hromatogrami dobijeni injektovanjem rastvora pripremljenih pod istim uslovima bez prisustva ispitivanih ACE inhibitora (voda, SDS, CTAB, TX 100). Mobilna faza: fosfatni pufer (20 mM, pH 7,0) – acetonitril (77:23, v/v).



Slika 49. Geometrijski optimizovane strukture (Z)- i (E)-diastereoizomera enalaprila primenom B3LYP/6-31G (d,p) metoda u okviru *Density Functional Theory* (DFT), pomoću Gaussian 09 programa.



Slika 50. Geometrijski optimizovane strukture (Z)- i (E)-diastereoizomera ramiprila primenom B3LYP/6-31G (d,p) metoda u okviru *Density Functional Theory* (DFT), pomoću Gaussian 09 programa.

PRILOG B: Spisak publikovanih radova i saopštenja

Publikovani radovi

1. **Popović M.R.**, Popović G.V., Agbaba D.D. The effects of anionic, cationic, and nonionic surfactants on acid–base equilibria of ACE inhibitors. *J. Chem. Eng. Data* **2013**, *58*, 2567-2573.
2. **Popović M.R.**, Popović G.V., Filipić S.V., Nikolić K.M., Agbaba D.D. The effects of micelles of differently charged surfactants on the equilibrium between (*Z*)- and (*E*)-diastereomers of five ACE inhibitors in aqueous media. *Monatsh. Chem.* **2015**, *146*, 913-921.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu

1. **Marija R. Popović**, Gordana V. Popović, Danica D. Agbaba. Potentiometric determination of pK_a values of ACE inhibitors. *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013.
2. **Marija Popović**, Gordana Popović, Slavica Filipić, Katarina Nikolić, Danica Agbaba. RP-HPLC and DFT study on separation of enalapril and ramipril (*Z*)- and (*E*)-diastereomers. *21st International Symposium on Separation Sciences*, Ljubljana, Slovenia, June 30th – July 3rd, 2015. (Prihvaćeno za poster sekciju)

Usmeno izlaganje na skupu nacionalnog značaja

1. **Marija Popović**, Gordana Popović, Danica Agbaba. Uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora/The Effects of Micellar Solutions of Surfactants on Protolytic Equilibria of ACE inhibitors. *VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učesćem*, Beograd, Srbija, 15-19. oktobar 2014.

8. Biografija

Marija Popović je rođena 19.10.1984. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Petrovcu na Mlavi kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine i diplomirala 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,58. Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska hemija, upisala je školske 2010/2011. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od januara 2011. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 172033, čiji je rukovodilac prof. dr Danica Agbaba. Nakon postupka sprovedenog na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, 26.12.2013. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik.

Doktorsku disertaciju pod nazivom **”Uticaj surfaktanata na protolitičke ravnoteže i izomerizaciju ACE inhibitora”** uradila je pod rukovodstvom prof. dr Gordane Popović i prof. dr Danice Agbaba. Autor je i koautor 2 rada štampana u časopisima od međunarodnog značaja, koji čine deo doktorske teze i 9 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, od kojih su 3 rezultati iz doktorske disertacije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Поповић

број уписа 30/10

Изјављујем

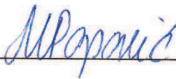
да је докторска дисертација под насловом

„Утицај сурфактаната на протолитичке равнотеже и изомеризацију АЦЕ
инхибитора“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.06.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Марија Поповић
Број уписа	30/10
Студијски програм	Фармацеутска хемија
Наслов рада	„Утицај сурфактаната на протолитичке равнотеже и изомеризацију АЦЕ инхибитора“
Ментор	др сц. Гордана Поповић, редовни професор и др сц. Даница Агбаба, редовни професор
Потписани	Марија Поповић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05.06.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај сурфактаната на протолитичке равнотеже и изомеризацију АЦЕ инхибитора“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.06.2015.