

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Maja V. Grujić

**ISPITIVANJE UTICAJA MICELA  
SURFAKTANATA RAZLIČITOG  
NAELEKTRISANJA NA PROTOLITIČKE  
RAVNOTEŽE I RASTVORLJIVOST SARTANA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Maja V. Grujić

**THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF  
MICELLES OF DIFFERENTLY CHARGED  
SURFACTANTS ON PROTOLYTIC  
EQUILIBRIA AND SOLUBILITY OF SARTANS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

## MENTORI

---

Dr Gordana Popović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Marija Popović Nikolić, naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## ČLANOVI KOMISIJE

---

Dr Danica Agbaba, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Živoslav Tešić, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija urađena je na 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.*

*Izrazila bih zahvalnost svom mentoru prof. dr Gordani Popović na saradnji, razumevanju i značajnim diskusijama tokom ove doktorske disertacije. Hvala Vam na prenetom znanju, detaljnim odgovorima na sva moja pitanja i što ste uvek imali vremena za mene.*

*Dr Mariji Popović - Nikolić svom mentoru dugujem na zahvalnost na angažovanju, prijateljskim savetima i značajnim sugestijama koji su pomogli obličenje ove disertacije.*

*Zahvalnost dugujem prof. dr Danici Agbabi na ukazanom poverenju, dragocenim razgovorima, saradnji, dostupnosti tokom izrade ove doktorske disertacije. Vaše reči ohrabrenja su bile dragocene na ovom životnom poduhvatu.*

*Dr sc Katarini Nikolić dugujem zahvalnost za savete pri izradi doktorske disertacije.*

*Dr Živoslavu Tešiću se zahvaljujem za sugestije tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Zahvalila bih se svojoj porodici na ljubavi, pažnji i razumevanju. Vama posvećujem ovu disertaciju.*

# ISPITIVANJE UTICAJA MICELA SURFAKTANATA RAZLIČITOG NAELEKTRISANJA NA PROTOLITIČKE RAVNOTEŽE I RASTVORLJIVOST SARTANA

## REZIME

Protolitičke ravnoteže sartana (irbesartana, losartana i valsartana) ispitane su bez i u prisustvu surfaktanata različitog naelektrisanja: anjonskog (natrijum-dodecilsulfat - SDS), katjanskog (cetiltrimetilamonijum-bromid - CTAB) i nejonskih (4-oktilfenolpolietoksilat - TX-100 i polioksietilen (23) lauril etar - Brij 35).

Sartani su antagonisti angiotenzinskih AT<sub>1</sub> receptora koji se koriste u terapiji hipertenzije, srčane insuficijencije i dijabetičke nefropatije. Fizičko-hemijski parametri lekova  $pK_a$  i rastvorljivost, neophodni za procenu farmakološkog i farmakokinetikog ponašanja, u biosredini mogu imati različite vrednosti u poređenju sa "čisto" vodenom sredinom. Ispitivanjem ovih parametara u uslovima koji su sličniji fiziološkim, stiče se bolji uvid u jonizaciju i rastvorljivost lekova u biosredini. Kao pojednostavljeni simulirajući sistemi za biomembrane u ovom radu su korišćeni rastvori surfaktanata čije micelle podražavaju osnovne strukturne i funkcionalne karakteristike biomembrana.

U hemijskom pogledu, irbesartan i losartan su amfoliti koji sadrže jedan kiseli centar (tetrazol) i jedan bazni centar (imidazol), dok valsartan sadrži dva kisela centra (tetrazol i karboksilna grupa). Jonizacione konstante su određene potencimetrijski pri konstantnoj jonskoj sili (0,1 M NaCl) i temperaturi 25°C, bez i u prisustvu surfaktanata. Potencimetrijski podaci analizirani su primenom kompjuterskog programa Hyperquad. Zbog male rastvorljivosti sartana u vodi,  $pK_a^w$  vrednosti koje odgovaraju „čisto“ vodenoj sredini (bez prisustva surfaktanata) dobijene su ekstrapolacijom praktičnih  $pK_a^*$  vrednosti određenih u smešama metanola i vode, različitog odnosa. Zbog solubilizirajućih efekata surfaktanata, za određivanje jonizacionih konstanti u micelarnoj sredini nisu korišćeni korastvarači.

Uticaj surfaktanata na protolitičke ravnoteže procenjen je na osnovu pomeranja  $pK_a^{app}$  vrednosti određenih u micelarnoj sredini u odnosu na  $pK_a^w$  vrednosti određenih u „čisto“ vodenoj sredini. U prisustvu anjonskih SDS micela došlo je do porasta  $pK_a^{app}$  vrednosti sartana (do +1,72 pK jedinice), dok je u prisustvu katjonskih CTAB micela uočen suprotan efekat i smanjenje  $pK_a^{app}$  vrednosti (do -1,44 pK jedinice). Na osnovu rezultata ove studije pretpostavljeno je da su jonizujući centri ispitanih sartana uključeni u elektrostatičke interakcije sa površinskim Sternovim slojem jonskih micela. Pomeranje  $pK_a^{app}$  vrednosti pod uticajem nejonskih surfaktanata (od -0,86 do +1,30) posledica je interakcija sartana sa hidrofilnim, palisadnim slojem nejonskih TX-100 i Brij 35 micela. Najveće promene u dijagramima raspodele ravnotežnih oblika ispitanih sartana u prisustvu micela (od -44% do +80%) uočene su na biofarmaceutski značajnoj pH vrednosti 4,5 (odgovara pH vrednosti u proksimalnom delu tankog creva) i mogu se razmatrati u kontekstu potencijalnog uticaja na intestinalnu apsorpciju i bioraspoloživost.

Teorijska studija je izvedena sa ciljem da se stekne bolji uvid u preklapljenе protolitičke ravnoteže irbesartana, losartana i valsartana, kao i u interakcije njihovih ravnotežnih oblika sa micelama kao simulirajućim sistemima biomembrana. S obzirom na prisustvo dva jonizaciona centra u molekulu ispitivanih sartana i na bliske vrednosti njihovih jonizacionih konstanti, u teorijskoj studiji ispitani su redosled jonizacije irbesartana, losartana i valsartana u vodenoj sredini, kao i mogući načini interakcije njihovih ravnotežnih oblika sa micelama surfaktanata. Izračunavanje energije

optimizovanih struktura svih ravnotežnih oblika koji mogu biti prisutni u rastvoru izvedeno je *Density Functional Theory* (DFT) metodom, primenom B3LYP/6-31G (d,p) baznog seta. Rezultati teorijske studije pomogli su u pripisivanju eksperimentalno određenih  $pK_a$  vrednosti odgovarajućim jonizacionim centrima i potvrdili pretpostavku da se kod svih ispitanih jedinjenja veće  $pK_a$  vrednosti mogu pripisati jonizaciji tetrazola. Vrednosti molekulskih deskriptora pokazale su da ispitani sartani ostvaruju interakciju pretežno sa površinom micela. Ravnotežni oblici irbesartana i losartana (amfoliti) ispoljavaju veći afinitet prema micelama u poređenju sa ravnotežnim oblicima valsartana (diprotična kiselina). Pored toga, rezultati su pokazali da su nenaelektrisani molekulski oblici amfolita lipofilniji od odgovarajućih cviterjonskih oblika.

Rastvorljivost dva strukturno slična jedinjenja, irbesartana i losartana, ispitana je na pH 4,5 (acetatni pufer), bez i u prisustvu  $10^{-3}$  M nejonskih surfaktanata Brij 35 i TX-100. Utvrđeno je da je rastvorljivost oba jedinjenja istog reda veličine u "čisto" vodenoj sredini. Sa druge strane, nejonski surfaktanti doprineli su značajnom porastu rastvorljivosti losartana (više od 100 puta), ali su malo uticali na rastvoljivost irbesartana (samo 2 puta). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je imidazolski supstituent, na kome se mogu uočiti jedine razlike u hemijskoj strukturi irbesartana i losartana, odgovoran za interakcije sa nejonskim micelama.

**Ključne reči:** sartani, surfaktanti, jonizacione konstante, rastvorljivost, potenciometrija, Hyperquad, DFT

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

**UDK broj:**

# THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MICELLES OF DIFFERENTLY CHARGED SURFACTANTS ON PROTOLYTIC EQUILIBRIA AND SOLUBILITY OF SARTANS

## ABSTRACT

Protolytic equilibria of sartans (irbesartan, losartan, and valsartan) were investigated with and without the presence of differently charged surfactants: anionic (sodium dodecyl sulfate - SDS), cationic (cetyltrimethylammonium bromide - CTAB), and nonionic (4-octylphenol polyethoxylate - TX-100 and polyoxyethylene (23) lauryl ether - Brij 35).

Sartans are angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists used in therapy of hypertension, heart failure, and diabetic nephropathy. The most important physicochemical properties of drugs, the pK<sub>a</sub> values and solubility, necessary for estimation of pharmacological and pharmacokinetic behavior, may have different values in bioenvironment as compared to the "pure" aqueous solution. By examining these parameters under conditions more similar to physiological ones, a better insight in *in vivo* ionization and solubility of drugs could be achieved. In this work, micellar solutions of surfactants were used as a simplified biomembrane mimetic systems, because of their nature to mimic the most essential structural and functional properties of biomembranes.

From the chemical point of view, irbesartan and losartan are ampholytes containing one acidic center (tetrazole) and one basic center (imidazole), whereas valsartan contains two acidic centers (tetrazole and carboxyl group). The ionization constants were determined potentiometrically at a constant ionic strength (0.1 M NaCl) and temperature 25 °C, with and without the presence of surfactants. Potentiometric data were analyzed using the computer program Hyperquad. Due to the poor water solubility of sartans, the pK<sub>a</sub><sup>w</sup> values, corresponding to a "pure" aqueous media (without the presence of surfactants) were obtained by extrapolating the pK<sub>a</sub><sup>\*</sup> values determined in the different methanol - water mixtures (30% - 55% methanol, wt/wt). Protolytic equilibria in the presence of micelles were examined without the use of cosolvent because the surfactants contributed to increasing solubility thereof.

The effect of surfactants on protolytic equilibria was estimated based on the shift in the pK<sub>a</sub><sup>app</sup> values determined in micellar media, in a relation to the pK<sub>a</sub><sup>w</sup> values determined in "pure" water. In the presence of anionic SDS micelles, the pK<sub>a</sub><sup>app</sup> values of sartans are increased (up to +1.72 pK units), while in the presence of cationic CTAB micelles, the opposite effect was observed and the pK<sub>a</sub><sup>app</sup> values are decreased (up to -1.44 pK units). On the basis of results in this study, it was assumed that the ionizable centers of the investigated sartans are involved in electrostatic interactions with the surface Stern layer of ionic micelles. The shift in pK<sub>a</sub><sup>app</sup> values in the presence of nonionic surfactants (-0.86 to +1.30) is a consequence of the interaction of sartans with the hydrophilic, palisade layer of nonionic TX-100 and Brij 35 micelles. The biggest shift in distribution of equilibrium forms of investigated sartans in the presence of micelles (from -44% to + 80%) were observed at a biopharmaceutically significant pH value of 4.5 (corresponding to the pH value in the proximal part of the small intestine) and could be considered in terms of influence on intestinal absorption and bioavailability.

Considering the presence of two ionizable centers in the molecule of irbesartan, losartan and valsartan, close values of their ionization constants and overlapped protolytic equilibria, the theoretical study was performed to get better insight in order of their ionization in aqueous media, as well as possible ways of interaction of their equilibrium forms with the micelles. The energy calculations of the optimized structures of all equilibrium forms that may be present in the solution were performed

by the Density Functional Theory (DFT) method, using the B3LYP/6-31G (d, p) basis set. The results of the theoretical study helped in attribution of the experimentally determined  $pK_a$  values to the corresponding ionizable centers and confirmed the assumption that in all investigated sartans higher  $pK_a$  values could be attributed to ionization of tetrazole. Values of molecular descriptors indicated that the investigated sartans interact predominantly with the micelle surface. Equilibrium forms of irbesartan and losartan (ampholytes) exhibit greater affinity for micelles compared to equilibrium forms of valsartan (diprotic acid). In addition, the results showed that uncharged molecular forms of ampholytes were more lipophilic than the corresponding zwitterionic forms.

The solubility of two structurally similar sartans, irbesartan and losartan, were investigated at pH 4.5 (acetate buffer) in surfactant free media and in the presence of  $10^{-3}$  M nonionic surfactants Brij 35 and TX-100. The solubility of both compounds is of the same order of magnitude in surfactant free media. On the other hand, the nonionic surfactants caused significant increase in losartan solubility (more than 100 times) but very slight increase in irbesartan solubility (only 2 times). The obtained results point out that imidazole moiety, where the main difference between chemical structures of examined sartans can be observed, could be responsible for interaction with the micelles of nonionic surfactants.

**Keywords:** sartans, surfactants, ionization constants, solubility, potentiometry, Hyperquad, DFT

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

**UDK number:**



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Antagonisti angiotenzinskih II receptora tipa 1 (AT<sub>1</sub>R) - sartani</b>	2
1.1.1. Sistem renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS)	2
1.1.2. Razvoj antagonista AT <sub>1</sub> receptora	6
1.1.3. Veza između strukture i dejstva sartana	7
1.1.4. Razlike u terapijskoj primeni i razvoj novih sartana	10
<b>1.2. Značaj poznavanja interakcija leka i ćelijskih membrana</b>	11
1.2.1. Simulirajući sistemi ćelijskih membrana	13
1.2.2. Micele kao simulirajući sistemi bioloških membrana	13
<b>1.3. Konstanta jonizacije – pK<sub>a</sub> vrednost</b>	16
<b>1.3.1. Značaj poznavanja pK<sub>a</sub> vrednosti lekova</b>	16
1.3.1.1. Uticaj pK <sub>a</sub> vrednosti na ADMET osobine	17
1.3.1.2. Uticaj pK <sub>a</sub> vrednosti na razvoj formulacija farmaceutskih oblika	17
<b>1.3.2. Određivanje pK<sub>a</sub> vrednosti</b>	18
1.3.2.1. Potenciometrijsko određivanje pK <sub>a</sub> vrednosti	18
1.3.2.2. Ostale metode za određivanje pK <sub>a</sub> vrednosti	19
1.3.2.3. Određivanje pK <sub>a</sub> vrednosti u nevodenoj sredini	19
<b>1.4. Rastvorljivost</b>	20
1.4.1. Metode za određivanje rastvorljivosti	24
<b>1.5. DFT (<i>Density Functional Theory</i>) metoda</b>	24
1.5.1. Geometrijska optimizacija	25
1.5.2. Solvatacioni efekat	25
<b>1.6. Literaturni podaci o fizičko-hemijskoj karakterizaciji sartana</b>	26
<b>2. CILJ RADA</b>	27
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	29
3.1. Oprema	30
3.2. Hemikalije	30
3.3. Računarski programi	30
3.4. Potenciometrijsko određivanje pK <sub>a</sub> vrednosti irbesartana, losartana i valsartana	31
3.4.1. Standardizacija rastvora natrijum hidroksida i hlorovodonične kiseline	31
3.4.2. Priprema micelarnih rastvora surfaktanata	31
3.4.3. Određivanje korekcionog faktora A	31
3.4.4. Ispitivanje stabilnosti sartana pri različitim pH vrednostima	31
3.4.5. Potenciometrijske titracije sartana u rastvorima bez i u prisustvu surfaktanata	32
3.5. Određivanje rastvorljivosti irbesartana i losartana na pH 4,5 bez i u prisustvu nejonskih surfaktanata (TX-100, Brij 35)	32
3.6. Optimizacija strukture ravnotežnih oblika sartana i izračunavanje molekulskih deskriptora	33
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	34
<b>4.1. Ispitivanje uticaja micelarnih rastvora surfaktanata na jonizaciju sartana</b>	35
4.1.1. Određivanje pK <sub>a</sub> <sup>w</sup> vrednosti irbesartana, losartana i valsartana bez prisustva surfaktanata	35
4.1.2. Određivanje pK <sub>a</sub> vrednosti irbesartana, losartana i valsartana	40

u micelarnim rastvorima surfaktanata različitog naelektrisanja	
4.1.3. Procena uticaja micela na raspodelu ravnotežnih oblika irbesartana, losartana i valsartana na biofarmaceutski značajnim pH vrednostima	47
<b>4.2. Teorijska studija jonizacije irbesartana, losartana i valsartana i interakcije ravnotežnih oblika sa micelama</b>	49
<b>4.3. Ispitivanje uticaja micela nejonskih surfaktanata (TX-100 i Brij 35) na rastvorljivost irbesartana i valsartana na pH 4,5</b>	56
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	59
<b>6. LITERATURA</b>	61
<b>7. PRILOG</b>	71
<b>PRILOG A:</b> Eksperimentalni podaci	72
<b>PRILOG B:</b> Spisak publikovanih radova i saopštenja	88
<b>8. BIOGRAFIJA</b>	89

## Lista skraćenica:

ADME - Apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija  
ACE - Angiotenzin-konvertujući enzim  
ACE 2 - Angiotenzin konvertujući enzim homolog  
ACEI - Inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima  
AT - Angiotenzinski receptor  
Ang I - Angiotenzin I  
Ang II - Angiotenzin II  
Brij 35 - Polioksietilen (23) lauril etar  
B3LYP - 3 parametar Lee, Yang, Paar  
cmc - Kritična micelarna koncentracija  
CTAB - Cetiltrimetilamonijum-bromid  
CYP 450 - Citohrom P450  
DFT - Teorija funkcionala gustine  
DMSO - Dimetilsulfoksid  
EMA - Evropska agencija za lekove  
FDA - Američka agencija za hranu i lekove  
HOMO - Energija najniže nepopunjene orbitale  
HPLC - Visoko efikasna tečna hromatografija  
LUMO - Energija najviše popunjene orbitale  
Log S - Negativan logaritam rastvorljivosti  
MAS - receptor vezan za G protein za koji se vezuje Ang 1-7  
NADPH- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
NF- $\kappa$ B - Nuklearni faktor rasta kapa B  
NMR - Nuklearna magnetna rezonanca  
NCE - New chemical entity  
PAI - Inhibitor aktivacije trombocita  
PLC- Fosfolipaza C  
PLA<sub>2</sub> - Fosfolipaza A<sub>2</sub>  
PRP - Prorenin receptor  
pK<sub>a</sub> - Negativan logaritam konstante disocijacije  
pH - Negativan logaritam koncentracije H<sup>+</sup> jona  
PAM - Površinski aktivna supstanca  
RAAS - Renin angiotenzin aldosteronski sistem  
SDS - Natrijum dodecilsulfat  
TX-100 - 4-oktilfenil polietoksilat  
PCM - Polarisable Continuum Model  
UV- Spektrofotometrija ultraljubičaste svetlosti

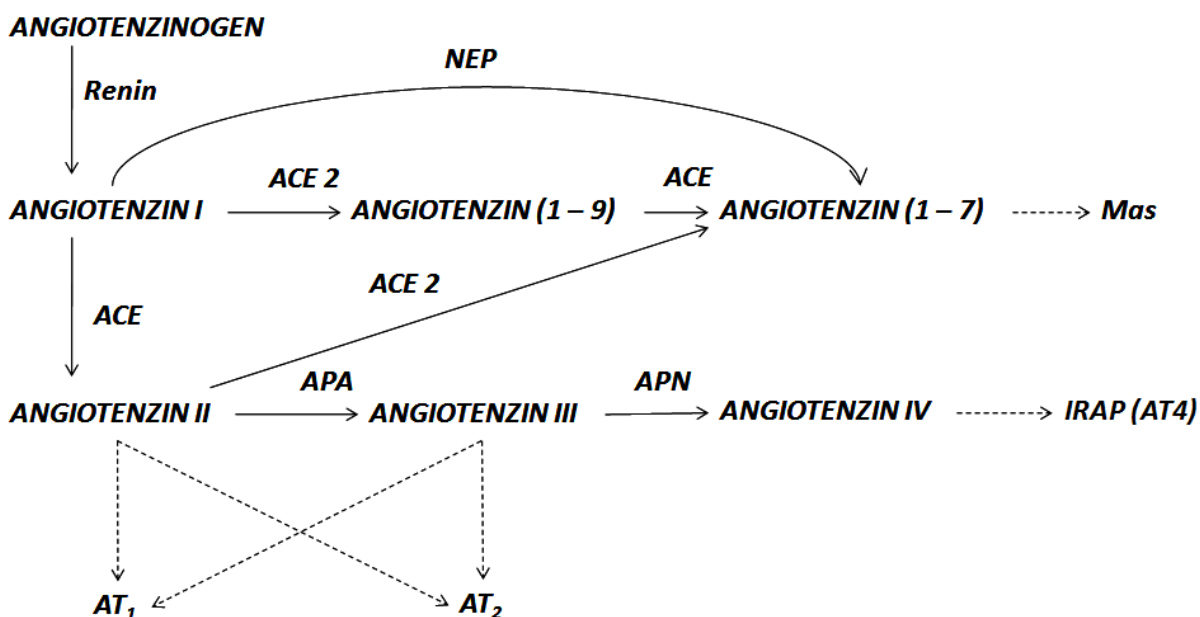
# **1. UVOD**

## 1.1. Antagonisti angiotenzinskih II receptora tipa 1 (AT<sub>1</sub>R) - sartani

### 1.1.1. Sistem renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS)

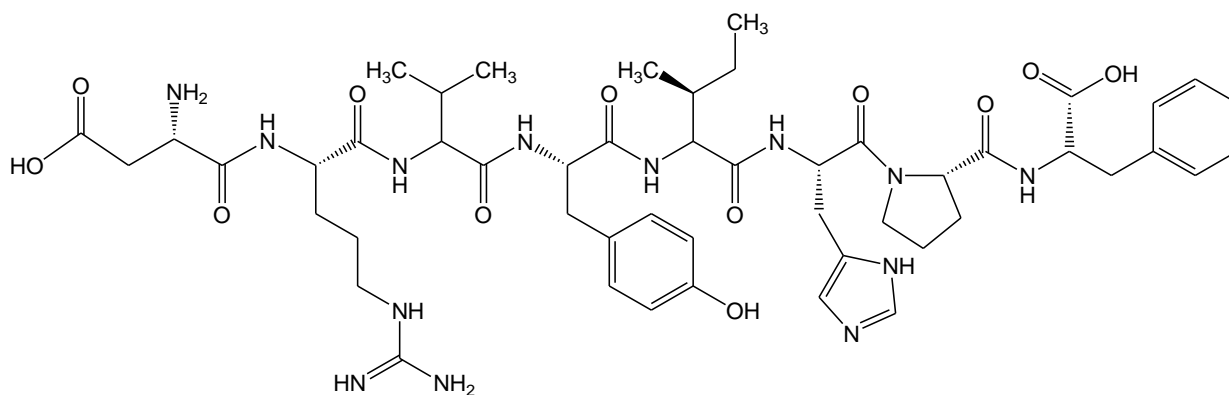
Blokatori angiotenzinskih receptora (ARB), poznati i kao antagonisti angiotenzinskih AT<sub>1</sub> receptora ili sartani, razvijeni su tokom osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka. Danas imaju važno mesto u terapiji hipertenzije, srčane insuficijencije i dijabetičke nefropatije<sup>1-6</sup>. U terapiji se mogu koristiti sami ili u kombinaciji sa diureticima i drugim antihipertenzivima. U poređenju sa inhibitorima angiotenzin konvertujućeg enzima (ACEI) pokazuju istu efikasnost u prevenciji šloga i srčane insuficijencije, a istu ili manju efikasnost u smanjenju rizika od infarkta miokarda i smrti kardiovaskularnog porekla<sup>7</sup>. Primena sartana u odnosu na ACEI je povezana sa manjom incidencom kašlja i angioneurotskog edema, uz prisutan veći rizik od hipotenzije<sup>7</sup>.

Sistem RAAS je fiziološki mehanizam koji ima važnu ulogu u kontroli krvnog pritiska uticajem na vaskularni tonus, zapreminu tečnosti, homeostazu elektrolita (**Slika 1**)<sup>8-15</sup>.



**Slika 1.** Šematski prikaz puta renin-angiotenzinogen (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 14)

U jukstaglomerularnim ćelijama sintetiše se prorenin. Od prorenina se može formirati renin uklaňanjem prosegmenta od 43 aminokiseline. Prorenin se može aktivirati i bez uklaňanja prosegmenta vezivanjem za prorenin receptor (PRR) što uslovljava pomeranje prosegmenta sa katalitičkog mesta enzima<sup>8</sup>. Ovaj vid aktivacije je značajan sa aspekta mogućeg učešća PRR u formiranju lokalnog angiotenzina II (Ang II)<sup>8</sup>. Renin katalizuje hidrolizu peptidne veze na N terminalnom delu angiotenzinogena (Leu10-Val11), pri čemu nastaje angiotenzin I (Ang I). Enzim dovodi do hidrolize peptidne veze angiotenzina I (Phe8-Hys9) dovodeći do formiranja oktapeptida angiotenzina II (**Slika 2**). U pojedinim tkivima (mozak, srce, masno tkivo, bubreg, oko) postoje i lokalni renin-angiotenzin sistemi (tkivni RAS)<sup>9-11</sup>. Tkivni angiotenzin II ispoljava autokrinu i parakrinu kontrolu što je od značaja u patološkim stanjima: hipertenziji, aterosklerozi, kardiovaskularnoj hipertrofiji i srčanoj insuficijenciji<sup>9</sup>. Postoje ispitivanja koja ukazuju na formiranje intracelularnog angiotenzina II na nivou različitih ćelija<sup>9</sup>.



**Slika 2.** Struktura angiotenzina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-Hys-Pro-Phe)

Angiotenzin II se može formirati i nezavisno od dejstva ACE enzima alternativnim putevima koji uključuju delovanje katepsina G, himostatin-osetljivog angiotenzin formirajućeg enzima (*eng. chymostatin-sensitive ang II generating enzyme*), himaze<sup>6,9,12</sup>. Od angiotenzina II delovanjem aminopeptidaze A (APA) i aminopeptidaze N (APN) nastaju angiotenzin III i angiotenzin IV (**Slika 1**). Daljim delovanjem peptidaza nastaju inaktivni peptidni fragmenti.

Enzim ACE je metalopeptidaza iz porodice M2. Kod ljudi su zastupljene dve izoforme: somatski (sACE) i germinalni ACE (gACE)<sup>13</sup>. Različiti tipovi endotelijalnih i epitelih ćelija sadrže sACE, dok se gACE nalazi u germinalnim ćelijama muškaraca<sup>13</sup>. Enzim ACE se može naći kao integralni membranski protein tip I ili kao solubilna forma u ekstracelularnim tečnostima (plazma, cerebrospinalna tečnost)<sup>13</sup>. Pored prevođenja Ang I u Ang II, ACE katalizuje hidrolizu Ang (1-9) do Ang (1-7) i kasniju degradaciju Ang (1-7) do inaktivnih fragmenata<sup>13,14</sup>. Takođe, ACE katalizuje degradaciju bradikininina do inaktivnih peptida. Bradikinin nastaje od kininogena dejstvom kalikreina i aminopeptidaze i dovodi do vazodilatacije, povećavanja vaskularne permeabilnosti i stimulacije sinteze prostaglandina<sup>4</sup>. Za razliku od ACEI, prilikom primene sartana ne dolazi do nakupljanja bradikininina i prostaglandina koji mogu izazvati kašalj. Smatra se da ACE može imati određen uticaj na funkcije mozga i digestivnog sistema s obzirom na mogućnost razgradnje neuropeptida (enkefalina, supstance P, neurotenzina) i peptidnih hormona holecistokinina i gastrina<sup>13</sup>.

Angiotenzin konvertujući enzim homolog (ACE 2) je transmembranski glikoprotein tip I koji pripada M2 familiji metaloproteaza<sup>13</sup>. Nalazi se u bubregu, srcu, mozgu, gastrointestinalnom traktu (GIT)<sup>12,15</sup>. Dejstvom ACE 2 od Ang I nastaje Ang (1-9), dok se Ang II prevodi u Ang (1-7)<sup>13,14</sup>. Enzim poseduje 400 puta veću katalitičku efikasnost za formiranje Ang (1-7) u odnosu na formiranje Ang (1-9)<sup>13</sup>. Na ovaj enzim ne utiču ACEI.

Angiotenzinski receptori se mogu podeliti u četiri podtipa: AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>3</sub>, AT<sub>4</sub><sup>9,12,16-25</sup>. AT<sub>1</sub> receptori su lokalizovani u bubrezima, srcu, vaskularnom glatkom mišiću, mozgu, nadbubrežnoj žlezdi, jetri<sup>9,16,17,18</sup>. AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> receptori su receptori vezani za G proteine, pri čemu pokazuju 30% sličnosti u strukturi. Kristalna struktura AT<sub>1</sub> receptora u kompleksu sa selektivnim antagonistom ZD 7155 i olmesartanom određena je tek 2015. godine (**Tabela 1**)<sup>19,20,21</sup>.

Ispitivanja su potvrdila da AT<sub>1</sub> receptor ima sedam transmembranskih domena  $\alpha$  heliksne strukture, tri ekstracelularne i tri intracelularne petlje, pri čemu je C terminalni kraj visoko neuređen<sup>19</sup>. Nakon vezivanja Ang II za AT<sub>1</sub> receptor može doći do aktivacije različitih signalnih puteva<sup>8,9,23</sup>. Ang II može dovesti do nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta aktivacijom enzima NADPH oksidaze u

vaskulaturi. Aktivacija AT<sub>1</sub> receptora može usloviti prenošenje signala mehanizmima koji su zavisni i nezavisni od G proteina<sup>8,9</sup>.

**Tabela 1.** Hronologija događaja važnih za RAS sistem <sup>8</sup>

Otkrića	Godina
Otkriće Ang I, Ang II i ACE (prethodno su poznati kao hipertenzin I, hipertenzin II, hipertenzin konvertujući enzim)	1956
Sinteza i farmakološka aktivnost angiotonina II	1957
Page i Braun-Menéndez su predložili termin angiotenzin umesto hipertenzin i angiotonin	1958
Razvoj peptidnog antagoniste AT <sub>1</sub> receptora saralasin	1970-1980
Identifikovani su angiotenzinski receptori	1970
Teprotid koji je izolovan iz zmijskog otrova je identifikovan kao ACEI koji potencira dejstvo bradikina	1965-1970
Miguel Ondetti je sintetisao prvi ACE inhibitor - kaptopril	1977
FDA je odobrila primenu kaptoprila	1981
Razvoj nepeptidnih antagonista AT <sub>1</sub> receptora	1982-1990
Definisano je da Ang (1-7) ostvaruje efekte na nivou ćelije koje se razlikuju od Ang II	1987
FDA je odobrila primenu prvog antagonista AT <sub>1</sub> receptora, losartana	1991
Donoghue je otkrio da ACE-2 prevodi Ang I u Ang (1-9)	1995
Nguyen je otkrio (pro) renin receptor	2002
FDA je odobrila upotrebu aliskirena (inhibitor renina)	2007
Azilsartan je odobren za primenu	2011

\*FDA - Food and Drug Administration

Aktivacija AT<sub>1</sub> receptora dovodi do gotovo svih fizioloških i patofizioloških efekata angiotenzina II, uključujući vazokonstrikciju, brzi i spori hipertenzivni efekat, sekreciju aldosterona, oslobađanje kateholamina, izraženiju noradrenalinu neurotransmisiju i tonus simpatikusa<sup>2</sup>. Do aktivacije AT<sub>1</sub> receptora može doći i u odsustvu angiotenzina II, tj. mogu je usloviti mehanički stres, autoimuna AT<sub>1</sub> antitela i mutacije receptora<sup>20</sup>. Do ovakvog tipa aktivacije može doći kod hipertenzije, preeklampsije ili kardioloških bolesti kod kojih postoji opterećenje volumenom<sup>20</sup>. Aktivacija receptora usled mehaničkog stresa javlja se jer mehanički stres uslovljava promenu konformacije i aktivaciju receptora. Preterana aktivacija AT<sub>1</sub> receptora može dovesti do kardiovaskularnog remodelovanja, hipertrofije, endotelne disfunkcije ili depozicije ekstracelularnog matriksa i značajna je u patogenezi hipertenzije, ateroskleroze, srčane insuficijencije i dijabetičke nefropatije<sup>8,9</sup>. Formiranje ekstracelularnog matriksa se razlikuje u zavisnosti od tkiva<sup>9</sup>.

AT<sub>1</sub> receptor ne postoji samo kao monomer, već može formirati homodimerne receptore kao i ATR<sub>1</sub>-GPCR heterodimere, što može uticati na prenošenje signala (**Tabela 2**). AT<sub>1</sub> receptor formira heterodimere sa  $\alpha_1$ D adrenergičkim receptorom,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  adrenergičkim receptorom, bradikininim receptorom B<sub>2</sub>, dopaminskim receptorom D<sub>1</sub>, prostaglandinskim F receptorom, P2Y purinergičkim receptorom, oksidovanim receptorom lipoproteina niske gustine OxLDL, receptorom epidermalnog faktora rasta EGFR<sup>20,23</sup>. Formiranje heterodimera može imati određenu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih bolesti.

**Tabela 2.** Prikaz efekata AT<sub>1</sub>-GPCR heterodimerizacije<sup>23</sup>

Tip receptora	Osnovna funkcija receptora	Funkcija receptora povezana sa heterodimerizacijom	
<b>Receptori vezani za G proteine</b>	$\alpha_1$ D adrenergički receptor	rast/proliferacija	razvoj preeklampsije
	$\beta_1$ adrenergički receptor	povećanje srčanog outputa	povećana signalizacija AT <sub>1</sub> receptora
	$\beta_2$ adrenergički receptor	vazodilatacija	povećana signalizacija AT <sub>1</sub> receptora
	bradikininski receptor B <sub>2</sub>	vazodilatacija	povećavna aktivacija G <sub>q</sub> i G <sub>i</sub> proteinskih subjedinica
	dopaminski receptor D <sub>1</sub>	natriureza, vazorelaksacija	renalna vaskularna rezistencija/transport natrijuma
	prostaglandinski F receptor	vazokonstrikcija	povećana vazokonstrikcija
	P2Y purinergički receptor 6	vazokonstrikcija	posredovanje u vaskularnom remodelovanju
	<b>Ostali receptori</b>	EGFR	rast/proliferacija
OxLDL receptor		nastanak ateroskleroze	AT <sub>1</sub> aktivacija

AT<sub>2</sub> receptori se nalaze u srcu, mozgu, miometriju, fetusu i oštećenom tkivu<sup>12,17,22</sup>. Učestvuju u regulaciji natriureze, telesne temperature, embrionalnog razvoja, ćelijske diferencijacije, obnove tkiva i programirane ćelijske smrti<sup>12</sup>. AT<sub>2</sub> receptori su eksprimirani u fetalnom tkivu, dok se nakon rođenja njihov broj smanjuje<sup>19,22</sup>. Ushodna regulacija AT<sub>2</sub> receptora se javlja u slučaju oštećenja tkiva (infarkt miokarda, moždani udar, vaskularne povrede)<sup>12,22</sup>.

AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> receptori ostvaruju suprotne efekte na nivou ćelija, aktivacija AT<sub>1</sub> receptora dovodi do ćelijske proliferacije, vazokonstrikcije i hipertrofije, dok se preko AT<sub>2</sub> receptora izaziva smanjenje proliferacije i hipertrofije, vazodilatacija i indukcija apoptozu. Ang II i Ang III ostvaruju svoje dejstvo na nivou AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> receptora. Ang III se na nivou bubrega vezuje za AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> receptore, pri čemu krajnji efekat (eliminacija ili zadržavanje natrijuma) može biti dozno zavistan<sup>10</sup>. Ang III povećava oslobađanje vazopresina, žeđ i krvni pritisak ukoliko se centralno primeni<sup>10</sup>. U literaturi se mogu naći podaci o postojanju AT<sub>3</sub> receptora, ali postojanje gena za ovaj receptor nije potvrđeno<sup>19</sup>.

Ang IV ostvaruje svoje dejstvo preko insulin regulisanog aminopeptidnog receptora - AT<sub>4</sub> receptora (IRAP) (**Slika 1**). AT<sub>4</sub> receptori se prvenstveno nalaze u mozgu, dok su u različitom obimu zastupljeni u srcu, bubregu, nadbubrežnoj žlezdi i krvnim sudovima<sup>9,19,24</sup>. Efekti uključuju bubrežnu vazodilataciju, aktivaciju NF- $\kappa$ B, uz povećanu ekspresiju inhibitora aktivacije trombocita (PAI-1), monocitnog hemotaksičnog proteina 1 (MCP-1), interleukina 6 i TNF- $\alpha$ <sup>6</sup>. Pokazalo se da je angiotenzin IV važan za regulaciju učenja i memorije kod pacova, poboljšanje memorije u animalnim modelima amnezije<sup>18,24</sup>.



Ang (1-7) se može formirati delovanjem ACE 2, prolil endopeptidaze i neprilina (NEP)<sup>25</sup> (**Slika 1**). Ang (1-7) ostvaruje svoje dejstvo preko Mas receptora i ispoljava efekte suprotne Ang II (vazodilatacija, natriureza, diureza, smanjenje ćelijske proliferacije)<sup>6,12</sup>. Mas receptori se mogu naći u bubregu, srcu, jetri, retini i krvnim sudovima. U moždanom tkivu se može uočiti velika ekspresija ovih receptora, što je od značaja za kardiovaskularnu regulaciju<sup>19</sup>. Smanjenjem koncentracije Ang II i povećavanjem koncentracije Ang (1-7), ACE 2 ostvaruje kontrolu aktivnosti ACE i doprinosi održavanju odgovarajuće ravnoteže između ACE 2/Ang (1-7)/Mas i ACE/Ang II/ AT<sub>1</sub><sup>13,15</sup>.

### 1.1.2. Razvoj antagonista AT<sub>1</sub> receptora

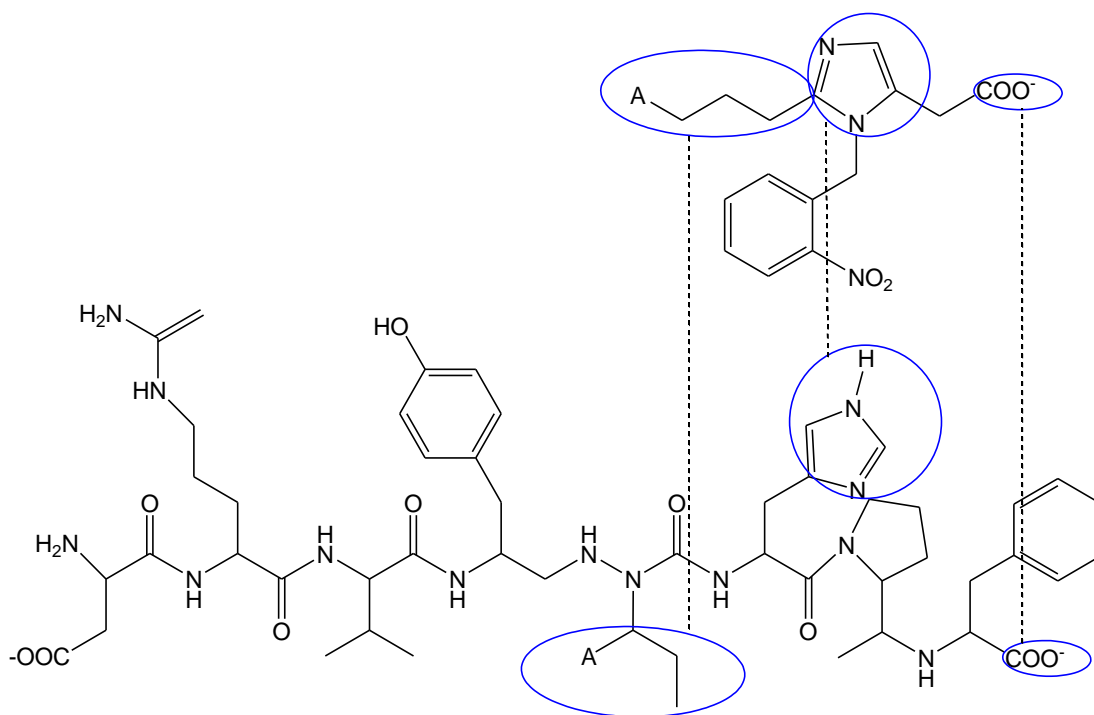
Antagonisti AT<sub>1</sub> receptora su visoko selektivni lekovi koji ostvaruju afinitet za AT<sub>1</sub> receptore koji je i 10000 puta veći u poređenju sa afinitetom ka AT<sub>2</sub> receptorima. Razvoj sartana predstavlja uspešan primer primene racionalnog dizajna u razvoju lekova<sup>26-32</sup>. U cilju razvoja antagonista AT<sub>1</sub> receptora istraživanja su bila usmerena na razvoj peptidnih antagonista AT<sub>1</sub> receptora, ali ovaj pristup nije bio uspešan. Istraživanjem se došlo do strukture saralasin (Sar1Val5Ala8 Ang II) peptidnog antagonista angiotenzinskog receptora. Peptidni antagonisti dobijeni su zamenom određenih aminokiselina u angiotenzinu II. Saralasin je pokazivao nisku biološku raspoloživost, kratko vreme delovanja, kao i parcijalno agonističku aktivnost.

Veliki napredak u razvoju nepeptidnih antagonista angiotenzinskih receptora napravio je Furukawa i njegove kolege u kompaniji *Takeda Chemical Industry* otkrićem da 1-benzilimidazol-5-sirćetna kiselina i njeni derivati kao što su S-8307 i S-8308 blokiraju angiotenzinske receptore<sup>26-32</sup>. Ova jedinjenja su pokazivala određene nedostatke, nisku biološku raspoloživost i kratko trajanje dejstva. Prednost ovih jedinjenja je što nisu pokazivala parcijalno agonističku aktivnost. Usled veoma slabog afiniteta za AT<sub>1</sub> receptore kompanija *Takeda Chemical Industry* je odustala od daljeg razvoja ovih molekula.

Dalji razvoj nepeptidnih antagonista AT<sub>1</sub> receptora nastavila je *Du Point* grupa. Slučajnom greškom tokom ispitivanja aktivnosti, primenom visoke doze, otkrivena je selektivnost ovih molekula za AT<sub>1</sub> receptore pri visokoj dozi, pa je uprkos obeshrabrujuće malog afiniteta nastavljen rad sa ovim molekulima. Kao *lead* molekuli korišćeni su S-8307 i S-8308 za razvoj nove grupe lekova.

Poređenjem struktura S-8308 i angiotenzina II primenom molekuskog modelovanja uočene su sledeće sličnosti (**Slika 3**)<sup>4</sup>:

- jonizovana karboksilna grupa S-8308 i jonizovana karboksilna grupa fenilalanina na položaju 8 angiotenzina II,
- imidazolska grupa S-8308 i imidazolski prsten histidina na položaju 6 angiotenzina II,
- n-butil grupa S-8308 i alkilni niz izoleucina u strukturi angiotenzina II.



**Slika 3.** Sličnost struktura angiotenzina II i *lead* molekula S-8308 (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 4)

Cilj daljeg istraživanja bio je povećanje afiniteta i biološke raspoloživosti nakon *per-os* primene. Na benzimidazolskoj strukturi dodata je karboksilna grupa što je povećalo aktivnost, ali je nastalo jedinjenje imalo nisku biološku raspoloživost. Daljim promenama hemijske strukture<sup>27</sup>:

- formiran je amid ftaliminske kiseline u cilju povećanja veličine molekula,
- uvedena je bifenilna struktura i metoksi karbonilmetil grupa zamenjena je sekundarnom alkoholnom grupom da bi se dobilo jedinjenje za *per-os* primenu,
- postignuta je veća biološka raspoloživost i produženo je vreme trajanja dejstva zamenom karboksilne grupe tetrazolom.

Pomenutim strukturnim modifikacijama sintetisan je losartan. Daljim promenama u hemijskoj strukturi losartana nastali su ostali sartani: valsartan, irbesartan, olmesartan, telmisartan, kandesartan.

### 1.1.3. Veza između strukture i dejstva sartana

Većina sartana sadrži istu farmakoforu, tako da na razlike u fizičko-hemijskim osobinama ili farmakološkom efektu utiču razlike u prisutnim supstituentima (**Slika 4**). Zajedničke strukturne karakteristike sartana su<sup>4,5</sup>:

- kiselna grupa, koja može biti karboksilna, fenil-tetrazolna ili fenil-karboksilna grupa,
- karboksilna grupa ili tetrazol u *orto* položaju bifenila,
- n-butil grupa, koja omogućava hidrofobno vezivanje i može biti zamenjena etiloksi ili n-propil grupom (telmisartan, kandesartan, olmesartan),
- imidazolski prsten ili odgovarajuća bioizosterna zamena,
- različite grupe na položaju R (karboksilna, hidroksimetil grupa, keton, benzimidazolski prsten) koje ostvaruju elektrostatičke, jon-dipol i dipol-dipol interakcije sa AT<sub>1</sub> receptorom.

**Losartan** je prvi registrovan oralni, nepeptidni sartan dugog dejstva. Iako podleže intezivnom metabolizmu prvog prolaza kroz jetru i ima poluvreme eliminacije dva sata, duži efekat se ostvaruje zahvaljujući aktivnom metabolitu. Sekundarna alkoholna grupa se pod dejstvom enzima prevodi u karboksilnu grupu pri čemu nastaje EXP3174, aktivni metabolit sa dužim trajanjem dejstva<sup>4,30</sup>. Međutim, zbog niske biološke raspoloživosti EXP3174, na tržištu se može naći samo losartan<sup>30</sup>.

**Valsartan** u hemijskoj strukturi sadrži tetrazol, bifenilni sistem, alifatični azot i ostatak aminokiseline valina umesto imidazolskog prstena. Amidaska karbonilna grupa je izosterna zamena imidazolskog azota losartana. Karbonilna grupa poput imidazolskog azota losartana funkcioniše kao akceptor vodonične veze<sup>4</sup>.

**Olmesartan** se primenjuje kao *pro drug* forma, olmesartan medoksomil, koja brzo podleže hidrolizi u GIT-u. Kod ovog molekula na položaju 4 imidazola nalazi se 1-hidroksi-1metil-etil grupa. Uvođenjem tercijarne alkoholne grupe postignuto je povećanje afiniteta u odnosu na molekul sa nesupstituisanim alkil ostatkom, ali uvođenjem voluminoznijih hidroksialkil grupa došlo bi do smanjenja antagonističke aktivnosti<sup>33</sup>.

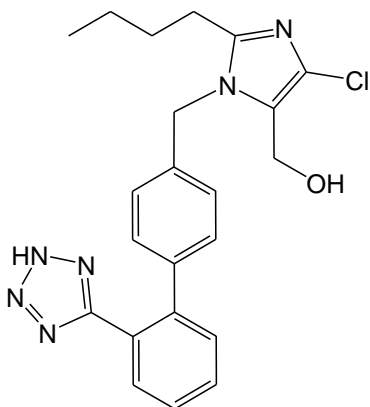
**Irbesartan** na imidazolskom prstenu sadrži spirociklopentil i karbonilnu grupu. Karbonilna grupa se ponaša kao akceptor vodonične veze, dok spirociklopentil grupa ostvaruje hidrofobne interakcije<sup>4</sup>. U poređenju sa losartanom, irbesartan pokazuje 10 puta veći afinitet prema vezivanju za AT<sub>1</sub> receptor<sup>4</sup>.

**Kandesartan** se na tržištu nalazi kao *pro drug* forma, kandesartan cileksetil. Umesto imidazola u strukturi se nalazi benzimidazol koji ima estar na položaju 7. Prisustvo benzimidazolskog prstena omogućava izraženije hidrofobne interakcije u vezivanju za receptor<sup>4</sup>. Hidroliza estera se odvija tokom resorpcije iz GIT-a.

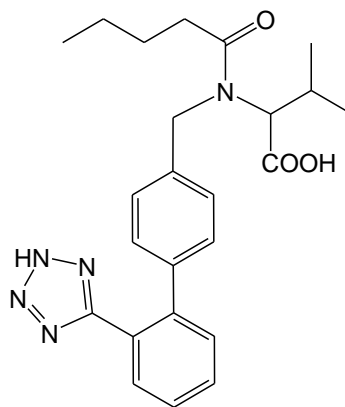
**Telmisartan** u svojoj strukturi sadrži dve benzimidazolne strukture i karboksilnu grupu umesto tetrazola. Telmisartan je najlipofilniji sartan, pri čemu je log P 3,2 (n-oktanol/pufer)<sup>34,35</sup>. Visoka lipofilnost omogućava apsorpciju, prolazak kroz tkiva i ćelije (čak i kroz krvno-moždanu barijeru) i veoma visok volumen distribucije od 500 L<sup>35</sup>. Telmisartan je parcijalni agonista PPAR $\gamma$  receptora. Smatra se da zbog visoke lipofinosti telmisartan može difundovati u nukleus i ostvariti 25-30% PPAR $\gamma$  agonističke aktivnosti<sup>35</sup>. Telmisartan ima najduže poluvreme eliminacije.

**Azilsartan** je nastao modifikacijom hemijske strukture kandesartana i pripada novijoj generaciji sartana. Umesto tetrazola u hemijskoj strukturi sadrži 5-okso-1,2,4-oksadiazol. Ovakvom modifikacijom postignuta je manja kiselost i veća lipofilnost u odnosu na kandesartan<sup>36</sup>. Koristi se kao *pro drug* forma, azilsartan medoksomil.

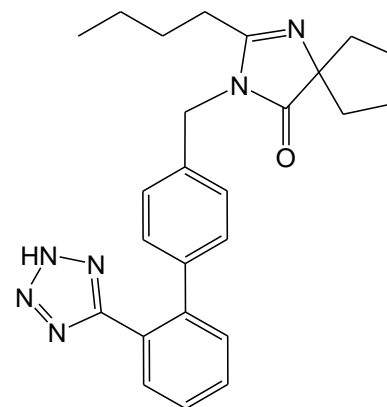
**Eprosartan** je prvi sartan koji u svojoj strukturi ne sadrži bifenil tetrazolnu grupu. U terapiji se koristi u obliku soli, kao eprosartan mesilat koji ima poluživot od 5-9 sati i mora se primenjivati dva puta dnevno.



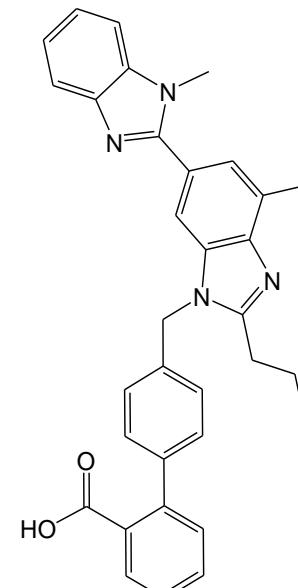
**Losartan**



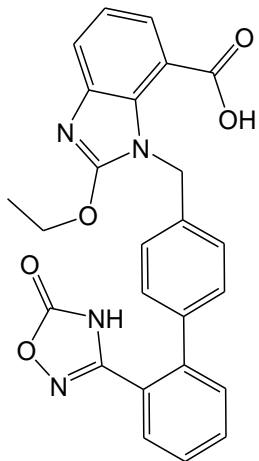
**Valsartan**



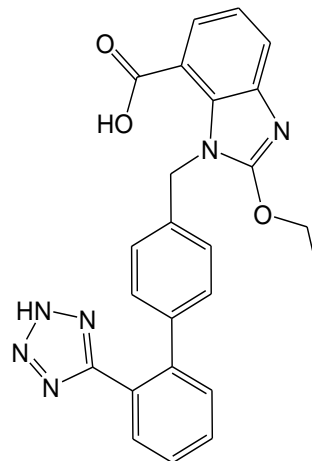
**Irbesartan**



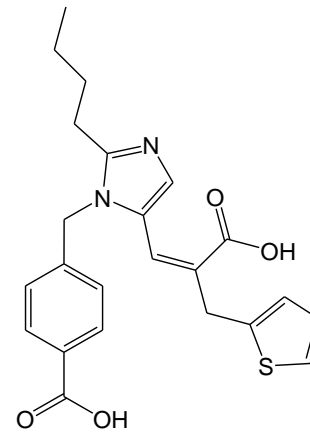
**Telmisartan**



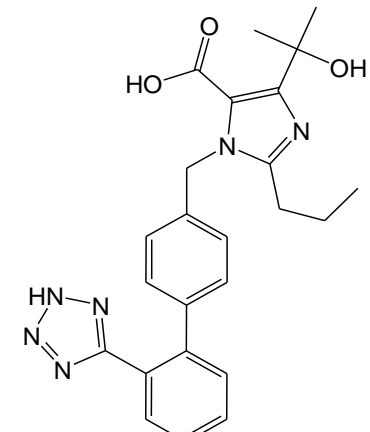
**Azilsartan**



**Kandesartan**



**Eprosartan**



**Olmesaratan**

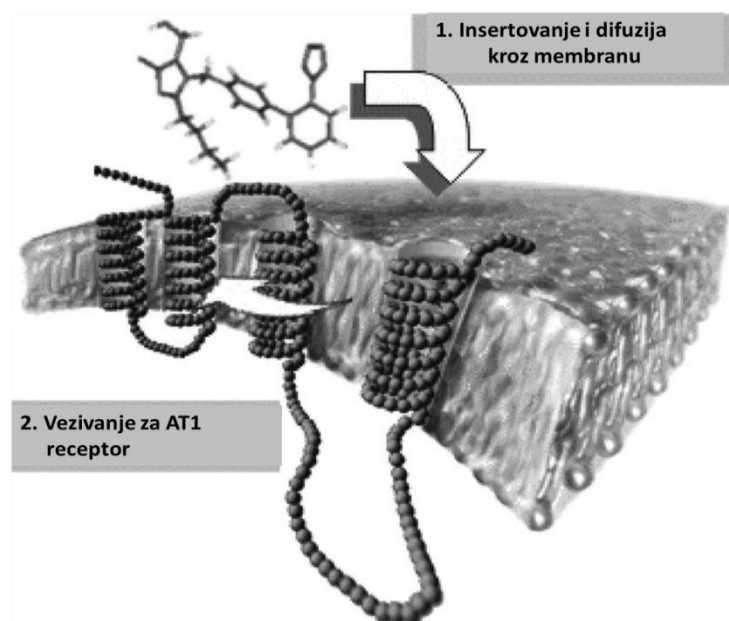
**Slika 4.** Hemijske strukture sartana koji se najčešće koriste u terapiji

Na osnovu podataka iz literature o farmakokinetičkim osobinama<sup>4</sup> može se zaključiti da se svi sartani u visokom stepenu vezuju za proteine plazme, ali da se razlikuju u biološkoj raspoloživosti i poluvremenu eliminacije<sup>4</sup>. Biološka raspoloživost može biti 15% kod kandesartana i eprosartana, dok sa druge strane može dostići 60-80% za irbesartan<sup>4</sup>. Poluvreme eliminacije sartana kod većine je dovoljno dugo da omogućava režim doziranja jednom do dva puta dnevno.

#### 1.1.4. Razlike u terapijskoj primeni i razvoj novih sartana

Na osnovu velikog broja kliničkih ispitivanja ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u kontroli krvnog pritiska pri korišćenju maksimalnih doza sartana<sup>37-39</sup>. Uočeno je da se terapijska efikasnost sartana kod kardiovaskularnih oboljenja razlikuje. Primena sartana zavisi od profila pacijenata. Valsartan, kandesartan, losartan se mogu koristiti kod srčane insuficijencije, dok se valsartan može primeniti kod srčane insuficijencije ili kod pacijenata sa asimptomatskom sistolnom disfunkcijom leve komore nakon nedavnog infakta miokarda.<sup>38,40</sup> Kod hipertenzivnih pacijenata koji imaju povećani rizik za šlog indikovana je primena losartana, dok je primena telmisartana povezana sa značajnim smanjenjem ponovne pojave paroksizma atrijalne fibrilacije<sup>40</sup>. Losartan i irbesartan se mogu koristiti u dijabetesnoj nefropatiji u cilju usporavanja progresije bolesti<sup>40</sup>. Telmisartan u poređenju sa ostalim sartanima pokazuje značajno smanjenje nivoa glukoze natašte i povećanje nivoa adiponektina<sup>40</sup>. Kandesartan, valsartan, irbesartan, telmisartan smanjuju incidencu nastanka šećerne bolesti kod pacijenata sa visokim kardiovaskularnim rizikom i/ili hipertenzijom<sup>40</sup>.

Uzrok razlika u terapijskoj efikasnosti sartana nije u potpunosti poznat. Angiotenzin II se vezuje i za ekstracelularne i intracelularne delove AT<sub>1</sub> receptora, dok sartani deluju samo na transmembranski deo AT<sub>1</sub> receptora. Na osnovu kompetitivnosti koja postoji između sartana i angiotenzina II može se zaključiti da se vezuju na preklapajućim vezujućim mestima AT<sub>1</sub> receptora<sup>37</sup>. Način na koji sartani dolaze do AT<sub>1</sub> receptora nije u potpunosti ispitan. Do sada nije poznato da li se sartani direktno vezuju za receptore ili prvo dolazi do prelaska sartana u membranu i naknadne lateralne difuzije do odgovarajućeg aktivnog mesta receptora (Slika 5)<sup>41</sup>.

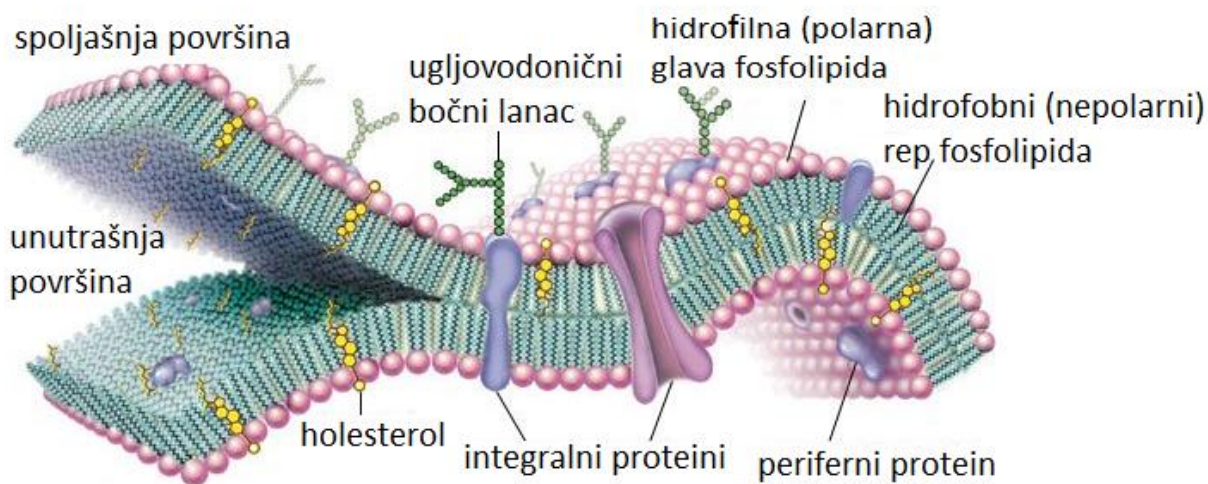


**Slika 5.** Pretpostavljeni dvostepeni mehanizam delovanja losartana (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 42)

U cilju procene uticaja membrane na mehanizam delovanja sartana ispitivane su interakcije sartana i membrane. Na osnovu dostupnih podataka može se zaključiti da svaki AT<sub>1</sub> antagonist ostvaruje jedinstven uticaj na membranu<sup>43-46</sup>. Ispitivanje interakcija sartana i membrane je važno za bolje razumevanje mehanizma delovanja, transporta sartana kroz membranu i razlika u farmakokinetičkim profilima sartana. Poznavanje interakcija doprinelo bi sintezi sartana sa selektivnijim i poboljšanim farmakokinetičkim osobinama<sup>45</sup>.

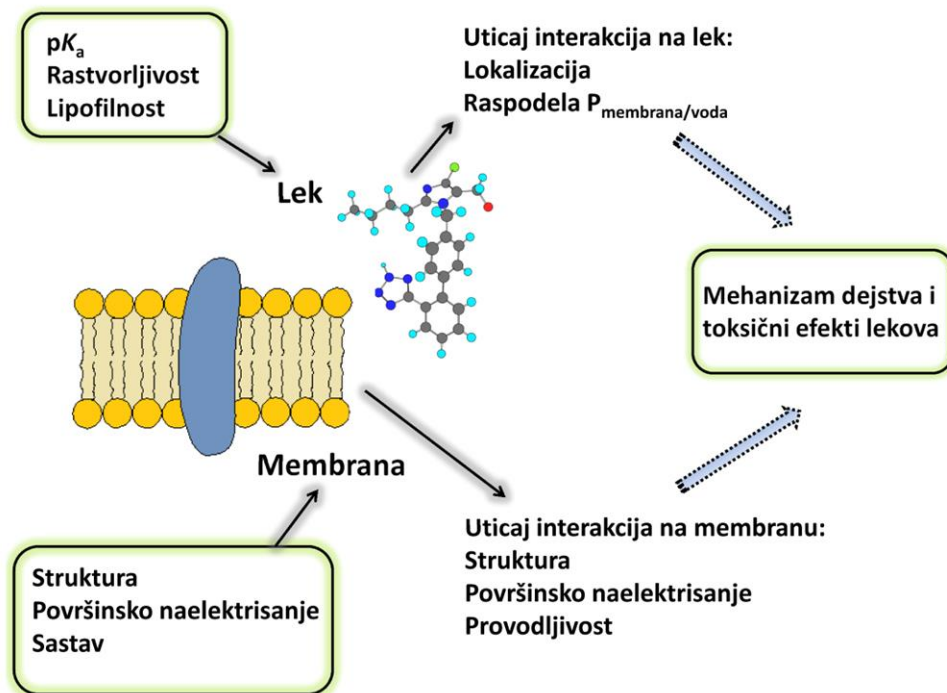
## 1.2. Značaj poznavanja interakcija leka i ćelijskih membrana

Ćelijska membrana ima važnu ulogu u procesu ćelijske signalizacije, kontrole razmene materija, održanja homeostaze ćelije, ćelijskom prepoznavanju<sup>47,48</sup>. Ispitivanje interakcija lekova i ćelijske membrane je važno jer interakcije utiču na farmakokinetiku, farmakodinamiku, toksičnost lekova<sup>48-51</sup>. Ovi podaci su značajni u cilju razvoja efikasnih *drug delivery* sistema, novih lekova<sup>48-51</sup>.



**Slika 6.** Prikaz strukture ćelijske membrane (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 52)

Ćelijska membrana predstavlja fosfolipidni dvosloj, za koju su vezani, delimično ili potpuni uronjeni proteini (**Slika 6**). Za pojedine proteine i lipide su vezani lanci oligosaharida. Lipidi koji izgrađuju membrane se mogu podeliti na: fosfolipide, glikolipide, holesterol<sup>53-58</sup>. Polarni delovi lipida su orijentisani ka površini membrane, dok hidrofobni regioni formiraju nepolarnu unutrašnjost veoma niske dielektrične konstante ( $\epsilon \sim 2$ )<sup>56</sup>. Interakcije leka i membrane mogu dovesti do promena i u osobinama membrane i u osobinama leka<sup>48,59</sup> (**Slika 7**).



**Slika 7.** Uticaj međusobnih interakcija na osobine leka i membrane (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 48)

Interakcije leka i membrane mogu biti particioni ili vezujući proces tj. mogu se posmatrati sa aspekta farmakodinamike (u membrani se nalaze ciljna mesta delovanja lekova) ili farmakokinetike (farmakokinetički procesi zavise od prolaska leka kroz membranu)<sup>50</sup>. Lek može ostvariti interakcije sa komponentama membrane što može izazvati akumulaciju leka i uticati na selektivnost na nivou membrane<sup>59-61</sup>. Neželjeni efekti i dužina trajanja dejstva su povezani sa akumulacijom leka na nivou membrana određenih organa<sup>59-61</sup>. Difuzija leka kroz visoko složenu strukturu membrane može biti otežana ili onemogućena (rezistencija na lekove)<sup>59</sup>. Membrana može uticati na način na koji lek dolazi do receptora. Lek se može direktno vezivati za receptor ili preći u membranu, pa kasnije lateralnom difuzijom doći do vezivnog mesta receptora (2D difuzija)<sup>59,60</sup>. Nakon ulaska u membranu lek može promeniti konformaciju<sup>59-61</sup>. Ravnoteža između konformera u ćelijskoj membrani se može promeniti a jedan od razloga ove promene je drugačija polarnost dvosloja u poređenju sa vodenim rastvorom<sup>59</sup>. Prilikom dizajniranja lekova mora se imati u vidu da afinitet leka za određeni receptor može biti uslovljen specifičnom konformacijom koja se formira u membrani.<sup>59</sup> Lek može zauzeti specifičnu orijentaciju, lokaciju u ćelijskoj membrani<sup>48,59</sup>.

Membrana može uticati na promenu fizičko-hemijskih osobina leka (particioni koeficijent,  $pK_a$  vrednost, rastvorljivost). Treba imati u vidu da se  $pK_a$  vrednost u vodenoj sredini može razlikovati od  $pK_a$  vrednosti u unutrašnosti membrane. Promena  $pK_a$  vrednosti utiče na permeabilnost, biološku raspoloživost, sposobnost interakcije sa receptorom (npr. proteinom membrane)<sup>62</sup>.

Interakcije leka i membrane mogu izazvati promene u osobinama membrane: debljina, zakrivljenost, konformacija acil grupa lipida, fluidnost, ćelijska signalizacija, funkcija transportera i jonskih kanala membrane, razdvajanje faza<sup>48,59,63-68</sup>. Kao posledica delovanja leka na membranu može doći do oštećenja ćelijske membrane<sup>50</sup>. Veliki broj lekova, naročito amfifilni lekovi koji ispoljavaju površinsku aktivnost mogu izazvati oštećenje i poremećaj funkcije ćelijske membrane i dovesti do fosfolipidoze<sup>50</sup>.

Tokom farmakokinetičkih procesa apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije (ADME), interakcije lekova sa membranama su neizbežne<sup>49,59</sup>. Jedna od prvih barijera, koje lek nakon oralne primene treba da prevaziđe, je prolazak kroz intestinalnu membranu. Ispitivanje faktora koji utiču na prolazak leka kroz membranu, naročito na pasivnu difuziju je od važnosti prilikom razvoja lekova. Prolazak leka kroz membranu zavisi od uspostavljenih interakcija i fizičko-hemijskih osobina leka ( $pK_a$  vrednost, rastvorljivost, particioni koeficijent, veličina molekula, mogućnost formiranja vodoničnih veza)<sup>49, 69-73</sup>.

Najzastupljeniji je transmembranski prolazak lekova kroz membranu, dok je paracelularni prolazak u intestinumu ograničen na male polarne molekule<sup>74-76</sup>. Najveći broj lekova koji imaju jonizacione centre trancelularno prolazi procesom pasivne difuzije u svom nejonizovanom obliku, dakle zavisi od uspostavljenih interakcija sa membranom<sup>74,76</sup>. Obim i brzina apsorpcije zavise od  $pK_a$  vrednosti, particionog koeficijenta i pH vrednosti sredine.

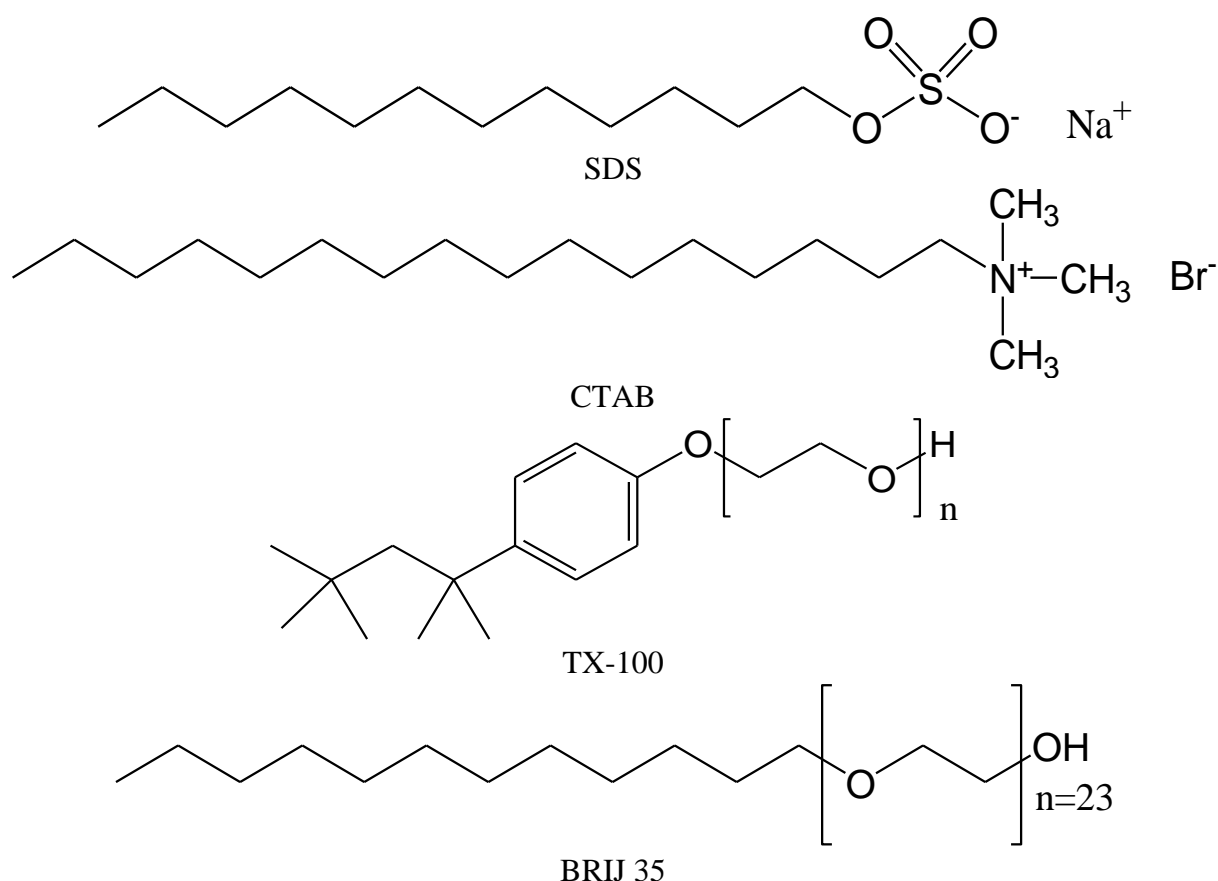
### 1.2.1. Simulirajući sistemi ćelijskih membrana

S obzirom na složenost ćelijske strukture, još uvek ne postoji idealan model bimembrane ali su razvijeni različiti pojednostavljeni simulirajući sistemi ćelijskih membrana koji se primenjuju u ispitivanjima interakcija leka i membrane<sup>47-51,74-86</sup>. Korišćenje ćelija je ograničeno usled kompleksnosti strukture, različitog sastava ćelijskih membrana, osetljivosti ćelija na uslove ispitivanja. Lipidi koji ulaze u sastav membrane pokazuju veliku raznovrsnost u pogledu molekulske mase, naelektrisanja, fluidnosti. U istraživanjima farmaceutske hemije koriste se različiti simulirajući sistemi bioloških membrana koji omogućavaju razmatranje specifičnih interakcija da bi se razjasnili procesi koji se odvijaju na površini i/ili u unutrašnjosti membrane<sup>47,84-86</sup>. Na taj način se omogućava izvođenje eksperimenata pri uslovima koje ćelije ne mogu izdržati jer je usled njihove osetljivosti teško ispitivati uticaj različitih pH vrednosti, temperature i jonske jačine na interakcije leka i membrana. Veoma je značajna mogućnost kontrole pH vrednosti rastvora što omogućava ispitivanja pri fiziološkim pH vrednostima koje odgovaraju fiziološkim uslovima (1,2 (želudac); 4,5 (proksimalni deo tankog creva); 6,8 (tanko crevo) i 7,4 (krvna plazma))<sup>64</sup>. Ovakvi sistemi se mogu primeniti za procene afiniteta leka za membranu, particionog koeficijenta i farmakokinetičkih procesa<sup>51,56,75</sup>. Između lekova i simulirajućih sistema biomembrana moguće su interakcije samo sa polarnim glavama lipida i interakcije samo sa hidrofobnim alkilnim lancima, ali mogu biti zastupljena oba tipa interakcija istovremeno<sup>51,79</sup>.

### 1.2.2. Micele kao simulirajući sistemi bioloških membrana

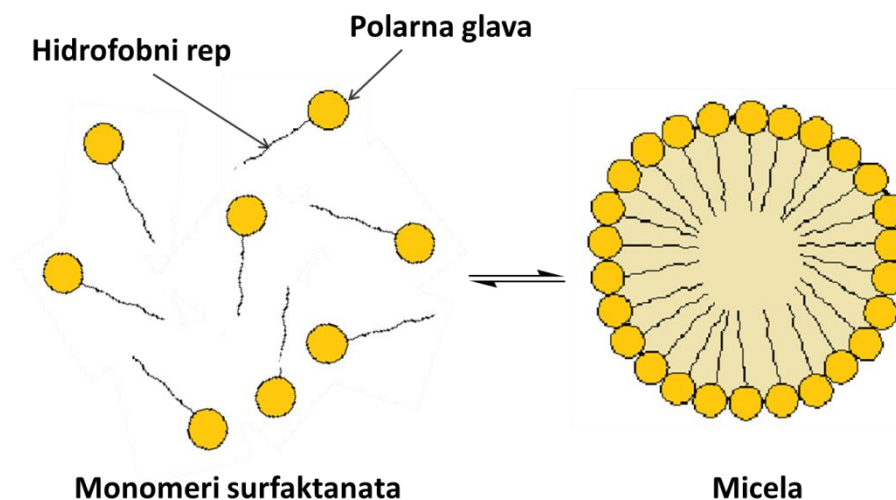
Surfaktanti su supstance amfilinog karaktera koje se spontano nagomilavaju na granici između dve faze, pri čemu dolazi do smanjenja površinskog tj. međupovršinskog napona. U literaturi se mogu naći pod sinonimima kao tenzidi ili površinski aktivne materije (PAM). Surfaktanti su značajni za formulaciju brojnih farmaceutskih i kozmetičkih preparata<sup>87-89</sup>. Surfaktanti mogu biti prirodnog ili sintetskog porekla. U njihovoj strukturi mogu se razlikovati polarni deo (polarna glava) i hidrofobni ugljovodonični deo (hidrofobni rep). U zavisnosti od strukture polarne glave mogu se razlikovati jonski, nejonski i cviterjonski surfaktanti. Kod jonskih surfaktanata, u vodi dolazi do disocijacije polarne glave surfaktanta pri čemu mogu nastati anjon ili katjon surfaktanta. U zavisnosti da li polarna glava jonskog surfaktanta nosi pozitivno ili negativno naelektrisanje možemo razlikovati katjonske (npr. cetiltrimetilamonijum bromid – CTAB) i anjonske (npr. natrijum dodecilsulfat – SDS) surfaktante. Nejonski surfaktanti (npr. 4-oktilfenol polietoksilat – TX-100; polioksietilen (23) lauril etar – Brij 35) u vodi ne jonizuju i nisu naelektrisani. Cviterjonski surfaktanti (npr. kokoamidopropilbetain) se u zavisnosti od pH vrednosti rastvora mogu ponašati kao jonski ili nejonski surfaktanti. Na **Slici 8** prikazane su hemijske strukture surfaktanata koji su korišćeni u ovoj studiji.





**Slika 8.** Hemijske strukture anjonskog (SDS), katjonskog (CTAB) i nejonskih surfaktanata (TX-100, Brij 35) korišćenih u ovoj studiji

U vodenim rastvorima ponašanje surfaktanata zavisi od njihove koncentracije. U manjim koncentracijama molekuli surfaktanata se nagomilavaju na graničnoj površini voda/vazduh. Sa povećanjem koncentracije molekuli surfaktanata se i dalje lokalizuju na graničnoj površini sve dok ne dođe do zasićenja. U cilju postizanja stanja minimalne energije amfifilni molekuli surfaktanta formiraju agregate. U zavisnosti od tipa geometrije surfaktanta i uslova u rastvoru (koncentracija surfaktanta, temperatura, pH vrednost, jonska jačina) mogu nastati sferne, eliptične, cilindrične, lameralne i druge složene strukture<sup>90</sup>. Formiranje micela uslovljeno je ravnotežom između interakcija koje doprinose stabilizaciji micela (hidrofobne interakcije), sternih i elektrostatičnih interakcija koje uslovljavaju nestabilnost micela. Kritična micelarna koncentracija (cmc) predstavlja koncentraciju surfaktanata pri kojoj dolazi do formiranja micela. Na cmc utiče dužina ugljovodoničnog lanca PAM (smanjuje se sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca), prirode polarne grupe (kod jonskih surfaktanata je uglavnom veća u poređenju sa nejonskim surfaktantima), temperature, prisustva elektrolita (dodatak elektrolita smanjuje cmc)<sup>90</sup>.



**Slika 9.** Reverzibilni proces formiranja micela (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 86)

Micela predstavljaju dinamične strukture koje se u vodenim rastvorima stalno formiraju i razgrađuju (**Slika 9**). Molekuli surfaktanta u okviru micela mogu pokazivati lateralno i rotaciono kretanje<sup>68</sup>. Micela su okarakterisane agregacionim brojem koji se definiše kao broj molekula surfaktanta koji izgrađuju micelu. Micela su najčešće sfernog oblika, ali sa povećanjem agregacionog broja surfaktanta mogu poprimiti elipsoidni ili cilindrični oblik. Prisustvo micela u rastvoru dovodi do promene električne provodljivosti, površinskog napona, osmotskog pritiska, rasipanja svetlosti, a može uticati na brzinu hemijske reakcije kao i nastale proizvode reakcije<sup>80,86,91</sup>. Interakcija micela i lekova može usloviti promenu rastvorljivosti, spektroskopskih osobina (intenzitet i pomeranje apsorpcionih maksimuma)<sup>92</sup>,  $pK_a$  vrednosti<sup>93,94</sup>, izomerizaciju<sup>95</sup> i uticati na permeabilnost membrane<sup>96</sup>. Promene osobina i protolitičkih ravnoteža lekova uslovljene su ostvarivanjem elektrostatičkih, hidrofilnih (vodonične veze, dipole interakcije) i hidrofobnih interakcija između micela i lekova. Primena micela je od velikog značaja u analitici lekova i pri razvoju farmaceutskih oblika. Primenom micela u farmaceutskim oblicima se može postići veća stabilnost lekova, smanjenje neželjenih efekata, kontrolisano oslobađanje, povećanje rastvorljivosti, uticaj na permeabilnost<sup>97,98</sup>.

U micelama postoji anizotropna distribucija vode tj. sadržaj vode smanjuje se od površine ka jezgru. Anizotropna distribucija vode povezana je sa organizacijom strukture micela. Distribucija lekova u okviru micela zavisi i od polarnosti molekula leka. Hidrofilni molekuli se zadržavaju na površini micela ili između polarnih glava surfaktanta, lipofilni molekuli su smešteni u jezgru, dok se molekuli intermedijerne polarnosti mogu naći u okviru palisadnog sloja nejonskih micela ili između jezgra i Sternovog sloja kod jonskih micela (**Slika 10**)<sup>86,90</sup>.



**Slika 10.** Lokalizacije lekova u miceli: 1. na površini micela, 2. između polarnih glava nejonskih micela, 3. između polarnih glava i prvih nekoliko ugljenikovih atoma palisadnog sloja, 4. u unutrašnjosti micela (Preuzeto i prilagođeno iz Lit. 86)

Micela se mogu posmatrati kao simulirajući sistemi bioloških membrana sa lipidnim monoslojem i hidrofilnom površinom koja okružuje hidrofobnu unutrašnjost<sup>80-85</sup>. Usled toga, u farmaceutskoj hemiji mogu se koristiti u različitim istraživanjima:

- Predviđanje lokalizacije leka u membrani, jer se veliki broj procesa dešava ili na površini

jonizovanih membrana ili u hidrofobnom regionu.

- Ispitivanja tipova interakcija (elektrostatičke, hidrofobne) između funkcionalnih grupa lekova i micela, da bi se procenio uticaj površinskog naelektrisanja na vezivanje leka za receptor.

- Ispitivanja hidrofobnih interakcije između lekova i micela, korišćenjem surfaktanata istog naelektrisanja, ali različitih dužina alkilnih lanaca.

- Određivanje parametara kojima se mogu kvantifikovati interakcije između leka i micela (particioni koeficijent, konstanta vezivanja).

### 1.3. Konstanta jonizacije – $pK_a$ vrednost

#### 1.3.1. Značaj poznavanja $pK_a$ vrednosti lekova

Merilo jačine kiselina i baza u rastvoru predstavlja konstanta jonizacije  $K_a$  koja se izražava kao  $pK_a$  vrednost ( $pK_a = -\log K_a$ ) i zavisi od rastvarača i temperature. Najveći broj farmakološki aktivnih jedinjenja sadrži slabo kisele i/ili slabo bazne funkcionalne grupe<sup>99</sup>. Kod jedinjenja koja imaju više jonizacionih centara postoji i više konstanti jonizacije.

Konstanta jonizacije je važan fizičko-hemijski parametar lekova, na čiju vrednost utiču različiti faktori: induktivni efekti, rezonantni efekti, elektrostatički efekti, sterno-zaštitni efekti rastvarača, intramolekulske vodonične veze. Od  $pK_a$  vrednosti zavise apsorpcija i distribucija leka u različite organe, biološka transformacija, kao i eliminacija iz organizma (ADME osobine). Oblici u kojima će lek biti zastupljen u rastvoru (jonizovani/nejonizovani) mogu se pretpostaviti na osnovu poznavanja  $pK_a$  vrednosti jonizacionih grupa i pH vrednosti sredine. Otkako je utvrđen značaj poznavanja stepena jonizacije, FDA zahteva da se za sva nova farmakološki aktivna jedinjenja odredi  $pK_a$  vrednost.

Većina lekova u vodenom rastvoru podleže delimičnoj jonizaciji pri čemu se uspostavlja ravnoteža između nejonizovanog i jonizovanog oblika koji se mogu razlikovati po fizičko-hemijskim, ali farmakokinetičkim osobinama. Stepem jonizacije utiče na sposobnost učestvovanja u fizičkim, hemijskim i biološkim procesima. Fizičko-hemijske karakteristike kao što su rastvorljivost, particioni koeficijent oktanol/voda, sposobnost prolaska kroz biološke membrane, stepen reaktivnosti jonizovanog oblika leka, zavise od  $pK_a$  vrednosti. Poznavanje  $pK_a$  vrednosti leka koji se primenjuje oralno koristi se za predviđanje brzine oslobađanja iz farmaceutskog oblika. Predviđanje rastvorljivosti na osnovu  $pK_a$  vrednosti je posebno značajno za dizajniranje formulacija umereno ili slabo rastvorljivih lekova. Takođe, za objašnjavanje i predviđanje kinetike enzimskih reakcija važno je poznavanje  $pK_a$  vrednosti leka. Specifične interakcije leka i receptora zavise od  $pK_a$  vrednosti leka, jonske jačine i pH receptorskog okruženja, kao i konstante jonizacije receptorskih rezidua. Poznavanje  $pK_a$  vrednosti je značajno i kod predoziranja lekovima. Primena supstanci kao što su  $NH_4Cl$  ili  $NaHCO_3$  dovode do promene pH urina što utiče da se slabe kiseline ekskretuju urinom alkalne pH vrednosti, dok se slabe baze ekskretuju urinom sa nižim pH.

Poznavanje  $pK_a$  vrednosti značajno je i za procenu ADME osobina, za razvoj novih formulacija farmaceutskih oblika, kao i za unapređenje postojećih<sup>99-109</sup>. Podaci o  $pK_a$  vrednostima potrebni su za definisanje i optimizaciju eksperimentalnih uslova analitičkih ispitivanja i hromatografska razdvajanja smeše analita jer promena pH vrednosti mobilne faze može značajno uticati na promene u retenciji ili usloviti drugačiji redosled eluiranja analita.

### 1.3.1.1. Uticaj $pK_a$ vrednosti na ADMET osobine lekova

Proučavanje protolitičkih ravnoteža lekova u fiziološkom pH opsegu je veoma značajno, jer farmakokinetički procesi lekova zavise od oblika (molekulski ili jonizovani) u kome je jedinjenje zastupljeno pri datoj pH vrednosti rastvora. Na proces apsorpcije utiču rastvorljivost, permeabilnost, površina apsorpcije, vreme intestinalnog prolaza. Apsorpcija dominantno zavisi od rastvorljivosti i permeabilnosti. Na značaj  $pK_a$  vrednosti među prvima ukazali su Brodie i Hogben otkrićem da lekovi sa kiselom grupom  $pK_a$  vrednosti manje od 3 i lekovi sa baznom grupom  $pK_a$  vrednosti veće od 8 ispoljavaju nisku apsorpciju<sup>102</sup>. Palm je pokazao da nejonizovani oblici molekula u poređenju sa jonizovanim oblicima brže prolaze ćelijsku membranu procesom pasivne difuzije<sup>102</sup>. Veća rastvorljivost i niži klirens uslovljavaju veću biološku raspoloživost kiselih lekova uprkos nižoj permeabilnosti<sup>102</sup>. Apsorpcija baznih lekova procesom pasivne difuzije ograničena je protonovanjem baznih centara na nivou GIT-a što dovodi do manje lipofilnosti i veće polarnosti<sup>102</sup>. Lekovi u cviterjonskom obliku uglavnom pokazuju nisku biološku raspoloživost<sup>106</sup>.

Jonizacija utiče na distribuciju leka u organizmu. Prisustvo kiselih grupa uslovljava vezivanje za proteine plazme u visokom stepenu, što uslovljava niže volumene distribucije<sup>102,106</sup>, dok prisustvo baznih grupa uslovljava vezivanje za proteine plazme u manjem stepenu i posledično više volumene distribucije<sup>102,106</sup>. Brocatelli je ukazao da lekovi sa kiselim grupama  $pK_a$  vrednosti manje od 5,5 pokazuju nižu permeabilnost na nivou krvno-moždane barijere, dok je Fisher ukazao da je  $pK_a$  lekova koji prolaze krvno-moždanu barijeru između 4-10<sup>102</sup>.

Zastupljenost jonizacionih grupa lekova određuje koji enzimi učestvuju u metabolizmu lekova. Vezivanje leka za proteine plazme utiče na hepatski klirens. Lekovi sa kiselim grupama pokazuju manji hepatski klirens u poređenju sa ostalim grupama lekova (neutralni, cviterjoni, baze) usled vezivanja za proteine plazme u visokom stepenu<sup>106</sup>. Kod kiselih i baznih lekova prisutan je veći renalni klirens u poređenju sa neutralnim i cviterjonskim molekulima<sup>106</sup>. Podešavanjem pH vrednosti urina se može povećati eliminacija lekova, uticajem na stepen jonizacije molekula. Eliminacija baznih lekova se povećava u kiseloj sredini, dok se eliminacija kiselih lekova može povećati povećanjem pH vrednosti urina.

Prisustvo jonizacionog centra u molekulu leka može uticati na nastanak toksičnih efekata. Toksičnost se može javiti usled neselektivnosti, akumulacije leka u organelama i ćelijskim membranama, kao i usled uticaja na metabolizam<sup>102,106</sup>.

Poseban problem prilikom razvoja lekova predstavlja mogućnost vezivanja molekula leka za receptore i transportere koji nisu ciljno mesto delovanja leka. Vezivanje za druge receptore može dovesti do neželjenih efekata ili nastanka novih terapijskih indikacija. Lekovi sa baznim jonizacionim centrom u protonovanoj formi su pozitivno naelektrisani i češće se vezuju za receptore u poređenju sa neutralnim, kiselim ili cviterjonskim formama<sup>102,106</sup>. Vezivanje lekova sa baznim grupama za hERG kalijumski kanal može dovesti do QT prolongacije, aritmije i smrti. Inhibicija ovog kanala je manje izražena kod cviterjona, neutralnih i kiselih lekova<sup>102</sup>.

### 1.3.1.2. Uticaj $pK_a$ vrednosti na razvoj formulacija farmaceutskih oblika

Profil pH zavisne rastvorljivosti je naročito važan za formulaciju farmaceutskih oblika za oralnu i intravensku primenu. Prilikom primene parenteralnih preparata, pH vrednost rastvora bi trebalo biti u opsegu 4 do 9 u cilju izbegavanja oštećenja tkiva ili bola prilikom primene<sup>102</sup>. U cilju povećanja rastvorljivosti, naročito u slučaju slabo rastvorljivih lekova može se formirati odgovarajuća so. Odabir odgovarajuće pH vrednosti je naročito značajan kod slabih baza usled uticaja povećanja temperature na  $pK_a$  vrednost tokom procesa autoklaviranja<sup>108</sup>. Povećanje temperature

može usloviti smanjenje  $pK_a$  vrednosti i oslobađanje molekuskog oblika leka što može predstavljati problem u slučaju slabe rastvorljivosti i male brzine rastvaranja molekuskog oblika<sup>108</sup>. Stepenu jonizacije može uticati na stabilnost lekova. Jonizovani oblici lekova u tečnim farmaceutskim oblicima lakše podležu reakcijama oksidacije, pa se podešavanjem pH vrednosti formulacije može postići veća zastupljenost molekuskog oblika i posledično veća stabilnost<sup>102</sup>.

### 1.3.2. Određivanje $pK_a$ vrednosti

#### 1.3.2.1. Potenciometrijsko određivanje $pK_a$ vrednosti

Određivanje konstanti jonizacije je važan deo fizičko-hemijskih ispitivanja još od ranih faza razvoja leka<sup>101-103</sup>. U toku fizičko-hemijske karakterizacije prikupljaju se podaci o stepenu jonizacije, lipofilnosti, rastvorljivosti, permeabilnosti. Lipofilnost, permeabilnost i rastvorljivost lekova zavise od  $pK_a$  vrednosti, tj. od stepena jonizacije molekula.

Određivanje  $pK_a$  vrednosti može predstavljati poseban izazov ako su u pitanju lekovi koji su slabo rastvorljivi u vodi. Za određivanje  $pK_a$  vrednosti mogu se primeniti različite tehnike: potenciometrija, UV-spektrofotometrija, kapilarna elektroforeza, hromatografija, NMR-spektrometrija<sup>109-113</sup>. Potenciometrija zbog tačnosti, praktičnosti i ekonomičnosti predstavlja najpouzdaniju tehniku za određivanje  $pK_a$  vrednosti, ako rastvorljivost jedinjenja nije manja od  $5 \times 10^{-4}$  M. Pristupačna oprema, pH-metar sa staklenom elektrodom, čine potenciometriju optimalnom tehnikom za određivanje  $pK_a$  vrednosti. Usavršavanjem i kompjuterizovanjem, potenciometrija je postala metoda izbora za jedinjenja koja imaju više jonizacionih centara bliskih  $pK_a$  vrednosti, kod kojih su procesi jonizacije preklapljeni, kao i za određivanje  $pK_a$  vrednosti više jedinjenja u smeši<sup>105</sup>.

Potenciometrijska titracija je najčešće korišćena metoda za određivanje  $pK_a$  vrednosti, koja se zasniva na postepenom dodavanju poznatih zapremina standardnog rastvora jake kiseline ili baze u rastvor supstance čija se  $pK_a$  vrednost određuje<sup>109-111</sup>. U cilju održavanja konstantne jonske jačine rastvora, dodaje se inertna so (NaCl ili KCl). U toku titracije prati se promena potencijala elektrode, čiji potencijal zavisi od koncentracije vodonikovih jona u rastvoru, tj. od pH vrednosti rastvora. Na osnovu promene pH vrednosti u zavisnosti od dodate zapremine titranta dobija se titraciona kriva.

Najpreciznije određivanje  $pK_a$  vrednosti potenciometrijskom titracijom, postiže se ako je rastvorljivost supstance veća od  $5 \times 10^{-4}$  M u okviru celog pH opsega titracije. Ovu metodu, koja se najčešće primenjuje u kasnoj fazi razvoja leka i ranoj fazi razvoja formulacija<sup>56</sup>, karakterišu visoka tačnost, jednostavnost izvođenja, mogućnost određivanja u obojenim rastvorima<sup>113</sup>. U cilju postizanja što veće tačnosti moraju se pripremiti rastvori koji ne sadrže ugljen dioksid, a supstance moraju biti visoke čistoće i stabilnosti.

Samo na osnovu izgleda titracione krive ne mogu se predvideti sve  $pK_a$  vrednosti u slučaju jedinjenja sa više od jednog jonizacionog centra, bliskih  $pK_a$  vrednosti. Za analizu potenciometrijskih podataka koriste se različiti kompjuterski softveri. Najčešće korišćen program za obradu eksperimentalnih podataka je HYPERQUAD<sup>114</sup> koji omogućava evaluaciju preklapljenih procesa jonizacije jedinjenja sa većim brojem jonizacionih centara, bliskih  $pK_a$  vrednosti. Takođe, primenom ovog programa moguće je precizno odrediti  $pK_a$  vrednosti čak i u slučaju složenih sistema kada je u rastvoru prisutno više jedinjenja koja mogu da jonizuju, kao što su lekovi u obliku soli sa slabim organskim kiselinama ili bazama.

### 1.3.2.2. Ostale metode za određivanje $pK_a$ vrednosti

Elektroforeza zahteva malu količinu uzorka (koncentracija  $10^{-6}$  M) koji ne mora biti visokog stepena čistoće, pri čemu se može analizirati veći broj jedinjenja istovremeno<sup>56,110,113</sup>. Od ključne važnosti za tačnost metode je izbor pufera<sup>111</sup>.

UV-spektrofotometrija je metoda kojom se postiže visoka preciznost određivanja, ali zahteva prisustvo hromofore u strukturi jedinjenja, visok stepen čistoće uzorka i adekvatnu rastvorljivost ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  M) u pH opsegu određivanja<sup>111</sup>.

NMR-spektrometrija omogućava praćenje jonizacije određene funkcionalne grupe u molekulu sa više jonizacionih centara bliskih  $pK_a$  vrednosti<sup>109</sup>. Ova metoda je pogodna za određivanje niskih  $pK_a$  vrednosti, između 0 i 2<sup>56</sup>. Potrebna je velika količina supstance što može biti ograničavajući faktor primene kod slabo rastvorljivih supstanci. Korišćenje deuterisanih rastvarača uslovljava visoku cenu analiza, a jonizacioni profil može biti drugačiji u odnosu na “čisto” vodeni rastvor.

HPLC metoda je pogodna u slučaju slabo rastvorljivih supstanci ili ako je dostupna mala količina uzorka koji nije visokog stepena čistoće<sup>113</sup>. Tačnost je manja u poređenju sa ostalim metodama usled primene organskih rastvarača u mobilnoj fazi (moguć je uticaj na pomeranje protolitičkih ravnoteža u odnosu na “čisto” vodeni rastvor) i mogućih interakcija analita sa stacionarnom fazom<sup>113</sup>. Određivanje  $pK_a$  vrednosti u vodeno-organskim smešama sa malim udelom organskog rastvarača može biti otežano usled velikih retencionih vremena<sup>110</sup>. Povećanje količine organskog rastvarača u mobilnoj fazi često utiče na smanjenje  $pK_a$  vrednost baznih i povećanje  $pK_a$  vrednost kiselih analita u odnosu na  $pK_a$  vrednosti koje su potencijometrijski određene u “čistoj” vodi.

Za predviđanje  $pK_a$  vrednosti mogu se primeniti kompjuterski programi kao što su: ADMET, PredictorTM, SPARC, ACD/Lab<sup>102</sup>. Podaci dobijeni na ovaj način imaju značaj kao smernice u planiranju eksperimentalnih određivanja jer se vrednosti mogu razlikovati i do 2  $pK_a$  jedinice u poređenju sa eksperimentalno određenim vrednostima. Formiranje baze podataka sa eksperimentano određenim  $pK_a$  vrednostima doprinelo bi preciznijem predviđanju  $pK_a$  vrednosti strukturno sličnih molekula, primenom računskih programa.

### 1.3.2.3. Određivanje $pK_a$ vrednosti u nevodenoj sredini

Određivanje  $pK_a$  vrednosti u vodenom rastvoru, može predstavljati veliki problem u toku razvoja lekova imajući u vidu da sve veći broj *lead* jedinjenja, lekova kandidata ima izraženiji lipofilniji karakter i slabo su rastvorljivi u vodi. U cilju potencijometrijskog određivanja  $pK_a$  vrednosti jedinjenja slabo rastvorljivih u vodi, kod kojih je rastvorljivost manja od  $5 \times 10^{-4}$  M, koriste se smeše vode i organskog rastvarača<sup>56,105</sup>. Na taj način dobijaju se praktične  $pK_a$  vrednosti ( $pK_a^*$ ) koje su određene u smešama sa različitim udelom organskog rastvarača. Koriste se organski rastvarači koji se dobro mešaju sa vodom kao što su: metanol, etanol, propanol, DMSO, aceton, tetrahidrofuran<sup>56</sup>. Metanol pokazuje solvatacioni efekat koji je najbliži vodi i predstavlja najčešći izbor za ovu svrhu<sup>56</sup>. Pregledom literature se uočava da je najveći broj podataka vezan za metanolno/vodene rastvore<sup>56</sup>.

U literaturi se mogu naći podaci o određivanju  $pK_a$  vrednosti u smeši vode i nekoliko organskih rastvarača (metanol – dioksan – acetonitril)<sup>56</sup>, koja se koristi u slučaju kada se jedinjenje ne može rastvoriti u smeši vode i jednog organskog rastvarača. U ovoj smeši povećava se rastvorljivost jedinjenja pa se mogu koristiti i niži udeli organskih rastvarača. Linearnost se može očekivati do udela smeše od 55%<sup>56</sup>.

Nakon određivanja  $pK_a^*$  vrednosti u smešama sa organskim rastvaračem u različitim odnosima,  $pK_a$  vrednost u "čistoj" vodi određuje se ekstrapolacijom na 0 % organskog rastvarača, na osnovu linearnosti koja postoji između određenih  $pK_a^*$  vrednosti i udela organskog rastvarača (m/m).

## 1.4. Rastvorljivost

Ispitivanje rastvorljivosti jedinjenja koja predstavljaju potencijalne lekove veoma je važno u gotovo svim fazama procesa otkrića i razvoja leka. Poznavanje rastvorljivosti je naročito značajno jer većina farmakološki aktivnih jedinjenja ulazi u sastav čvrstih farmaceutskih oblika za oralnu primenu. Slaba rastvorljivost jedinjenja predstavlja značajan problem farmaceutske industrije u procesu razvoja novih lekova jer utiče na visoku cenu procesa i predstavlja čest razlog isključivanja potencijalnih lekova iz daljeg razvoja<sup>115,116</sup>. Procenjuje se da više od 40% lekova za oralnu primenu koji se nalaze na tržištu i 70% lekova-kandidata su gotovo nerastvorljivi u vodi<sup>116,117</sup>. Trend povećanja zastupljenosti novih hemijskih jedinjenja (NCE) slabe rastvorljivosti u toku procesa razvoja može biti posledica primene visoko propusnog skrininga za identifikaciju *hit* jedinjenja<sup>117,118</sup>. Proces optimizacije strukture potencijalnog leka često zahteva uvođenje lipofilnih grupa da bi se povećao afinitet za receptore čiji su endogeni ligandi visoko lipofilni ili su u pitanju receptori koji se nalaze intracelularno ili u nukleusu<sup>117</sup>.

Rastvorljivost se određuje kontinuirano od početnih faza razvoja leka. Od parametara koji se određuju tokom fizičko-hemijske karakterizacije jedinjenja (rastvorljivost,  $pK_a$  vrednost, lipofilnost, permeabilnost) rastvorljivost ima važnu ulogu u odlučivanju da li će doći do daljeg razvoja datog jedinjenja<sup>119-121</sup>. Poznavanje rastvorljivosti je od značaja sa aspekta izvođenja farmakoloških, toksikoloških, farmakokinetičkih studija, optimizacije strukture potencijalnog leka<sup>121,122</sup>. Optimizacija rastvorljivosti se može postići uvođenjem hidrofилnih grupa, smanjenjem lipofilnosti, promenom planarnosti i simetrije kristalne rešetke<sup>123,124</sup>. Tip rastvorljivosti koji se određuje zavisi od faze razvoja. Kinetička rastvorljivost se određuje u toku rane faze razvoja leka dok se u kasnijim fazama pretežno ispituje ravnotežna rastvorljivost.

Slaba rastvorljivost može usloviti sledeće probleme tokom *in vitro* ispitivanja<sup>117,121</sup>:

- Visoko propusnim skriningom se može identifikovati mali procenat *hit* jedinjenja usled slabe rastvorljivosti ispitivanih jedinjenja.
- Pogrešan odnos stukture i aktivnosti, jer je koncentracija leka koja dolazi do receptora niža od očekivane.
- Neadekvatna procena rezultata ADME ispitivanja.
- Neadekvatna procena toksičnosti leka (slaba rastvorljivost uslovljava manju inhibiciju CYP enzima i blokadu hERG kalijumskog kanala).

Rastvorljivost je pored permeabilnosti i brzine rastvaranja, ključan faktor koji utiče na biološku raspoloživost. Apsorpcija supstance zavisi od njene rastvorljivosti u gastrointestinalnoj tečnosti. Na rastvorljivost i apsorpciju utiče prisustvo žučnih soli, lecitina, motilitet, zapremina prisutne tečnosti, velika apsorptivna površina, prisustvo hrane, pH vrednost<sup>120,125</sup>. U različitim delovima GIT-a zastupljene su različite pH vrednosti sredine koja može uticati na promenu rastvorljivosti jonizovanih lekova, formiranje soli, hidrata, taloženje i ponovno rastvaranje leka<sup>126,127</sup>. Nakon rastvaranja soli, lokalno dolazi do formiranja pufera, što izaziva promenu pH vrednosti mikrokruženja i rastvorljivosti u difuzionom sloju<sup>119</sup>. Razlika u pH vrednosti mikrosredine i pH vrednosti rastvora može biti i nekoliko pH jedinica<sup>119,128</sup>. Nakon odlaska iz difuzionog sloja jedinjenje se može taložiti u amorfnom ili kristalnom obliku. Ukoliko su u pitanju čestice sa velikom površinom, to može izazvati brzo rastvaranje u novoj dostupnoj količini gastrointestinalne tečnosti i povećanje biološke raspoloživosti jedinjenja<sup>128</sup>. Ukoliko je rastvorljivost nejонizovanog oblika (intrinzička rastvorljivost) jedinjenja mala, precipitacija se može desiti veoma blizu površine čestice, pri čemu se formira film koji sprečava dalje rastvaranje i smanjuje biološku raspoloživost<sup>128</sup>.

Slaba rastvorljivost u vodi ne uslovljava nužno slabu rastvorljivost na nivou GIT-a, jer fiziološke tečnosti u određenom stepenu doprinose solubilizaciji<sup>120</sup>. Rastvorljivost i brzina rastvaranja soli se mogu smanjiti usled efekata zajedničkog jona (prisustvo natrijumovog ili hloridnog jona)<sup>119,121</sup>. Na nivou GIT-a mogu se formirati prezasićeni rastvori, jer je intraluminalna koncentracija značajno veća u poređenju sa ravnotežnom rastvorljivošću<sup>117</sup>. Formiranje prezasićenih rastvora može doprineti većoj biološkoj raspoloživosti<sup>117,121</sup>.

Apsorpcija zavisi i od brzine rastvaranja leka. Rastvorljivost, pored površine čestica čvrste supstance značajno utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance. Veća rastvorljivost doprinosi većoj brzini rastvaranja i posledično većoj koncentraciji leka na nivou gastrointestinalne tečnosti, što povećava apsorpciju jer pasivna difuzija zavisi od koncentracionog gradijenta između luminalne i apikalne membrane. Glavni problem vezan za slabu rastvorljivost je smanjena apsorpcija i varijabilna biološka raspoloživost nakon oralne primene leka<sup>117,120</sup>.

Rastvorljivost leka pored apsorpcije utiče i na distribuciju i eliminaciju. Prilikom primene parenteralnih preparata mora se voditi računa o rastvorljivosti supstance na pH vrednosti krvi ukoliko se lek primenjuje intravenski. Dodatni problem može se javiti kod natrijumovih i hloridnih soli, jer do taloženja može doći i usled prisustva natrijumovog i hloridnog jona u krvi (efekat zajedničkog jona). Prilikom eliminacije slaba rastvorljivost može izazvati pojavu neželjenih efekata. Naime, na nivou tubula bubrega, dolazi do smanjenja pH vrednosti što može dovesti do taloženja prisutnih molekula leka.

Rastvorljivost je važna osobina o kojoj se mora voditi računa i u procesu razvoja formulacije farmaceutskih oblika. Na osnovu podataka o intrinzičkoj rastvorljivosti, profila pH zavisne rastvorljivosti, rastvorljivosti u nevodnim rastvaračima i biološki relevantnim medijumima, bira se farmaceutski oblik, postupak izrade i ekscipijensi. Od rastvorljivosti zavisi da li će se koristiti kristalni ili amorfni oblik jedinjenja, izbor odgovarajućeg polimorfnog oblika, soli ili estera. U cilju povećanja rastvorljivosti mogu se koristiti različite tehnike<sup>129,130,131</sup>. Farmaceutsko-tehnološke operacije sušenje, granulacija, kompresija mogu izazvati promenu polimorfnog oblika, nastatak malih količina amorfni oblika, kao i promenu hidratnog oblika<sup>126</sup>. Ove promene mogu uticati na stabilnost, rastvorljivost, izgled, brzinu rastvaranja i biološku raspoloživost jedinjenja. Da bi se odobrilo stavljanje leka u promet, FDA zahteva sprovođenje detaljnih studija u cilju identifikacije i karakterizacije polimorfnih oblika lekova, kao i amorfni oblika, hidrata i solvata, a naglašena je i važnost kontrole kristalnog oblika u toku različitih faza pripreme farmaceutskog oblika<sup>116</sup>.

Rastvorljivost zavisi od osobina jedinjenja (molekulske mase, funkcionalnih grupa,  $pK_a$  vrednosti, stereochemije molekula). Povećanjem molekulske mase rastvorljivost se smanjuje. Na rastvorljivost utiče broj mogućih vodoničnih veza i broj jonizujućih grupa. Funkcionalne grupe koje mogu formirati vodonične veze utiču na povećanje hidrofilitnosti jedinjenja<sup>4</sup>. Mogućnost formiranja vodoničnih veza je od važnosti za ostvarivanje interakcije sa receptorom. Prisustvo jonizujućih funkcionalnih grupa može povećati rastvorljivost jedinjenja usled ostvarivanja jon-dipol interakcija sa molekulima vode. U slučaju amfolita, pri određenim pH vrednostima, prisustvo jonizovanih grupa može smanjiti rastvorljivost intramolekulskim interakcijama usled formiranja cviterjona<sup>4</sup>. Iako jon-jon intramolekulske interakcije se mogu ostvariti u slučaju jonizujućih grupa koje se nalaze jedna blizu druge<sup>4</sup>. U slučaju amfolita veća udaljenost jonizujućih grupa cviterjona usloviće veću rastvorljivost. Prisustvo aromatičnih i alkil grupa smanjuje rastvorljivost jedinjenja. Za predviđanje rastvorljivosti u vodi može se koristiti Lemkeov empirijski pristup<sup>4</sup>. Rastvorljivost jedinjenja zavisi od odnosa solubilizujućeg efekta funkcionalnih grupa i broja ugljenikovih atoma u vodi. Može se pretpostaviti da će jedinjenje biti rastvorljivo u vodi ukoliko potencijal rastvaranja funkcionalnih grupa prevazilazi ukupan broj ugljenikovih atoma<sup>4</sup>.



Stereohemija molekula može uticati na rastvorljivost. Enantiomeri mogu formirati različite kristalne oblike. Kristali racemata su stabilniji i gušće se pakuju u prostoru u poređenju sa pojedinačnim kristalima enantiomera, što uslovljava različitu rastvorljivost. Rastvorljivost supstanci u čvrstom stanju zavisi od toga da li je reč o kristalnom ili amorfnom obliku, hidratu ili soli<sup>132</sup>.

Primena soli je značaja za farmaceutsku industriju jer rastvorljivost jedinjenja nakon formiranja soli može biti povećana do hiljadu puta<sup>132,133</sup>. Soli pokazuju različitu rastvorljivost jer poseduju različitu energiju kristalne rešetke.

Amorfni oblici supstanci u poređenju sa kristalnim oblicima supstanci imaju veću rastvorljivost i brže se rastvaraju. Amorfni oblici supstanci su manje stabilni i teže da pređu u kristalno stanje usled niže slobodne energije kristalnog stanja. Primena amorfnih oblika u razvoju farmaceutskih formulacija je ograničena, uprkos većoj rastvorljivosti i posledično većoj bioraspoloživosti. Uvek postoji mogućnost prelaska amornog oblika u stabilnije kristalno stanje čime se smanjuje rastvorljivost, a time i biološka raspoloživost<sup>132</sup>.

Procenjuje se da su polimorfni oblici zastupljeni kod 30% jedinjenja i usled različite energije kristalne rešetke pokazuju različite vrednosti rastvorljivosti. Tokom vremena polimorfni oblici prelaze u najstabilniji oblik za date vrednosti temperature i pritiska. Promene kristalnih oblika se moraju ispitati, jer od kristalnog oblika zavise rastvorljivost i brzina rastvaranja, kao i biološka raspoloživost. Promene kristalnog oblika mogu biti uzrok fizičke nestabilnosti farmaceutskih preparata<sup>133</sup>.

Najveći broj anhidrovanih oblika pokazuje dvostruko veću rastvorljivost u poređenju sa hidratizanim oblicima<sup>116,132</sup>. Hidratizani i anhidrovani oblici se razlikuju i u brzini rastvaranja<sup>116,132</sup>. Brzina rastvaranja hidratizanih je najčešće manja u poređenju sa anhidrovanim oblicima.

Polarnost rastvarača značajno utiče na rastvorljivost jedinjenja. Prisustvo korastvarača može usloviti povećanje rastvorljivosti. Primena korastvarača (etanol, propilen glikol) je naročito značajna pri formulaciji preparata za oralnu i parenteralnu primenu<sup>119</sup>. Prisustvo korastvarača smanjuje polarnost vode i ometa formiranje vodoničnih veza između molekula vode, što uslovljava povećanje rastvorljivosti jedinjenja. Dodatak korastvarača može uticati na pomeranje protolitičke ravnoteže i smanjenje jonizacije jonizujućih grupa jedinjenja.

Rastvorljivost jedinjenja zavisi i od temperature i prilikom određivanja rastvorljivosti mora se naznačiti temperatura pri kojoj je ispitivanje izvedeno<sup>134,135</sup>. U skladu sa Le Šateljeovim principom ravnoteže, rastvorljivost se smanjuje u slučaju kada je proces rastvaranja egzoterman, dok se rastvorljivost povećava ukoliko je proces rastvaranja endoterman<sup>136</sup>.

Na rastvorljivost lekova koji sadrže jonizujuće centre utiče pH vrednost rastvora. Promena pH vrednosti u okviru 2 pH jedinice iznad i ispod  $pK_a$  vrednosti jonizujuće grupe uslovljava promenu zastupljenosti nejonizovanog oblika u opsegu 1 - 99%.

Zavisnost rastvorljivosti od promene pH vrednosti se može definisati preko sledećih Handerson-Hasselbach jednačina<sup>134</sup>:

$$\text{Rastvorljivost slabe kiseline } \log S = \log S_0 + \log(1+10^{pH-pK_a}) \quad (1)$$

$$\text{Rastvorljivost slabe baze } \log S = \log S_0 + \log(1+10^{pK_a-pH}) \quad (2)$$

$$\text{Rastvorljivost amfolita } \log S = \log S_0 + \log(1+10^{pK_{a1}-pH}) + \log(1+10^{pH-pK_{a2}}) \quad (3)$$

U Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BSK) rastvorljivost jedinjenja se definiše preko doznog broja. Ispituje se rastvorljivost supstance u 250 ml vode (najveća primenjena doza) pri opsegu pH vrednosti 1 – 7,5 (zahtev FDA). *European Medicines Agency* (EMA) daje smernice da se

ispitivanje rastvorljivosti izvodi pri opsegu pH vrednosti 1 – 6,8. Supstanca se definiše kao rastvorljiva ukoliko je dozni broj jednak ili manji od 1, tj. jedinjenje se u najvećoj dozi može rastvoriti u 250 ml vode ili manje.

Pored rastvorljivosti u vodi, ispituje se i rastvorljivost u biološki relevantom medijumu<sup>137</sup>. Niska rastvorljivost potencijalnog leka u vodi, nije automatski kriterijum za isključivanje potencijalnog jedinjenja iz daljeg razvoja, jer jedinjenje može posedovati relativno visoku rastvorljivost u tečnosti gastrointestinalnog trakta. Stepem povećanja rastvorljivosti usled prisustva žučnih soli je nemoguće predvideti bez eksperimentalnog ispitivanja.

Kod neelektrolita rastvorljivost je definisana jednom vrednošću, dok se kod elektrolita može razlikovati<sup>138,139</sup>:

1. rastvorljivost u vodi (nepuferovanom rastvoru),
2. intrinzička rastvorljivost - rastvorljivost na pH vrednosti rastvora pri kojoj je prisutan samo nejonizovani oblik jedinjenja,
3. rastvorljivost pri određenoj pH vrednosti.

Ravnotežna rastvorljivost predstavlja koncentraciju supstance u zasićenom rastvoru iznad taloga, pri čemu je uspostavljena dinamička ravnoteža između supstance u talogu i supstance u rastvoru<sup>139</sup>. Za svaku vrednost temperature i pritiska postoji određena vrednost ravnotežne rastvorljivosti za određenu supstancu.

Termodinamička rastvorljivost se često naziva i pravom rastvorljivošću. Određivanje termodinamičke rastvorljivosti je značajno u kasnim fazama razvoja leka. Ovaj tip rastvorljivosti uključuje i energiju koja je potrebna za razaranje kristalne rešetke, pa se može koristiti za određivanje rastvorljivosti različitih polimorfni oblika. Polimorfni oblici pokazuju različitu rastvorljivost i razlike u biološkoj raspoloživosti usled različite energije kristalne rešetke. Tokom procesa razvoja početne serije amorfne ili delimično kristalnog oblika zamenjuju se sa velikim serijama kristalnih oblika visoke čistoće, što uslovljava nižu rastvorljivost, pa je određivanje termodinamičke rastvorljivosti veoma značajno<sup>115</sup>. Termodinamička rastvorljivost se određuje u različitim fiziološki značajnim medijumima (puferi pH vrednosti 1 - 9, simulirani gastrični fluid, simulirani intestinalni fluid), solubilizatorima značajnim za formulaciju (Tween 80, PEG 200, PEG 400) i organskim rastvaračima (etanol, oktanol, cikloheksan)<sup>121</sup>. Određivanje termodinamičke rastvorljivosti je od značaja za formulaciju leka, podnošenje zahteva za registraciju, analizu rezultata *in vivo* ispitivanja<sup>121</sup>.

Prividna rastvorljivost predstavlja rastvorljivost supstance u rastvoru iznad taloga nakon dugog vremena inkubacije<sup>139</sup>. Period inkubacije može trajati od nekoliko sati do jednog dana<sup>139</sup>. Ovaj tip rastvorljivosti se određuje u toku ranog procesa razvoja kada nije uvek izvodljivo određivanje termodinamičke rastvorljivosti.

Kinetička rastvorljivost predstavlja maksimalnu rastvorljivost oblika jedinjenja koji se najbrže taloži. Prilikom određivanja ovog tipa rastvorljivosti ne dostiže se ravnoteža između supstance u talogu i rastvoru, već kinetička rastvorljivost predstavlja trenutnu koncentraciju (u najvećem broju slučajeva u vremenskom periodu od nekoliko minuta do 2h)<sup>139</sup>. Kinetička rastvorljivost se može posmatrati kao tendencija supstance ka precipitaciji u kratkom vremenskom periodu<sup>139</sup>. Kinetička rastvorljivost je veća u poređenju sa termodinamičkom rastvorljivošću. Termodinamička i kinetička rastvorljivost se uglavnom određuju u fosfatnom puferu pH opsega 6,5 - 7 (pH vrednost intestinalne tečnosti). Podaci o kinetičkoj rastvorljivosti naročito su značajni u toku rane faze razvoja leka kada su dostupne izuzetno male količine supstanci nepoznate kristalne strukture.

### 1.4.1. Metode za određivanje rastvorljivosti

Veliki broj faktora može uticati na eksperimentalno određivanje rastvorljivosti. Pregledom literature može se uočiti da se podaci o vrednostima rastvorljivosti za isto jedinjenje razlikuju za prosečno 0,6 logS, mada se mogu naći i veća odstupanja<sup>140,141</sup>. Vrednosti rastvorljivosti zavise od eksperimentalnih uslova (vreme taloženja, vreme mešanja, način odvajanja taloga, sastav pufera, temperature, pH vrednost), metode određivanja, čistoće supstance, kristalnog oblika. Prilikom određivanja rastvorljivosti moguće je formiranje agregata (dimeri, trimeri), micela i kompleksa sa komponentama pufera<sup>134,138</sup>.

U literaturi je dostupan veliki broj računarskih modela koji su razvijeni za predviđanje rastvorljivosti<sup>141-143</sup>. Uprkos intezivnom razvoju, uspešnost predviđanja rastvorljivosti nije u potpunosti adekvatna. Precizniji podaci se mogu očekivati za određivanje termodinamičke u poređenju sa kinetičkom rastvorljivošću, jer se za razvoj modela koristi intrinzička rastvorljivost<sup>121</sup>. Tačnost eksperimentalnih podataka koji se koriste za razvoj modela, su od ključne važnosti za uspešnost predviđanja rastvorljivosti računskim putem. Podaci o rastvorljivosti se preuzimaju iz javno dostupnih baza podataka, ali postavlja se pitanje uporedljivosti ovih podataka usled nepostojanja standardizovanog postupka određivanja termodinamičke rastvorljivosti.

Za određivanje ravnotežne rastvorljivosti postoji više metoda:

*Shake-flask* metodu su prvi opisali Huguchi and Connors 1953. godine. Predstavlja standardnu metodu za određivanje rastvorljivosti koja je pogodna za određivanje rastvorljivosti slabo rastvorljivih supstanci. Prilikom određivanja ovog tipa rastvorljivosti uzorak u čvrstom stanju se unosi u rastvarač, a rastvorljivost se meri nakon što je uspostavljena dinamička ravnoteža između taloga i supstance urastvoru. Na početku određivanja formira se talog koji je u istom kristalnom obliku u kome je bila sama supstanca pre unošenja u rastvor. Nakon određenog vremena supstanca može preći u stabilniji polimorfni oblik, zatim se može ponovo rastvoriti i kristalisati. Ovaj postupak se može nekoliko puta ponavljati. Temperatura pri kojoj se vrši ispitivanje je najčešće 25° ili 37°C. Vreme mešanja može biti od 48 sati do dve nedelje, dok se za postizanje ravnoteže primenjuju različiti vremenski intervali od 24 do 72 sata<sup>56,140</sup>. Podešavanje pH vrednosti se izvodi primenom *Sørensenovog* pufera (pH 3-7), *Britton-Robinson* pufera (pH 2,5 – 11,5), hlorovodonične kiseline (pH < 2,5)<sup>56,120</sup>. Termodinamička rastvorljivost zavisi od oblika koji je prisutan kada je postignuta ravnoteža. Manje stabilni kristali imaju veću rastvorljivost u poređenju sa stabilnijim kristalnim oblicima. Kristalni oblici imaju manju rastvorljivost u poređenju sa amorfnim oblicima. Nakon uspostavljanja ravnoteže, talog se odvaja od rastvora (sedimentacijom, centrifugiranjem, filtracijom). Koncentracija rastvorene supstance najčešće se određuje UV spektrofotometrijski ili primenom HPLC metode.

### 1.5. DFT (*Density Functional Theory*) metoda

DFT je kvantno-mehanička metoda koja se zasniva na korišćenju elektronske gustine u cilju određivanja različitih fizičko-hemijskih parametara<sup>144-148</sup>. DFT metoda je zastupljena u velikom broju publikacija usled optimalnog odnosa tačnosti, preciznosti, kompjuterskih resursa i vremena izračunavanja. Za razliku od talasne funkcije koja zavisi od 4N promenljivih, elektronska gustina zavisi samo od tri prostorne koordinate x,y,z. Elektronska gustina se može eksperimentalno odrediti (difrakcijom X zraka). DFT metode se mogu koristiti u različitim softverskim paketima *Gaussian*, *GAMESS*, *HyperChem*, *Spartan*.

Kvantno-mehaničke metode zasnivaju se na rešavanju Šredingerove jednačine. Šredingerova jednačina se može rešiti samo za atom vodonika, dok u slučaju ostalih atoma i molekula rešavanje je nemoguće, usled velikog broja stepeni slobode. U cilju prevazilaženja ovog problema koristi se Born-Oppenheimer-ova aproksimacija. Aproksimacija se zasniva na činjenici da je masa jezgra značajno

veća u poređenju sa masom elektrona, što uslovljava da je brzina elektrona mnogo veća u poređenju sa brzinom jezgra. Jezgra atoma u molekulu se mogu posmatrati kao statična, tj. elektroni se kreću u polju fiksiranih jezgara. Uzimajući u obzir ovu aproksimaciju Šredingerova jednačina se može razdvojiti na elektronsku i nuklearnu talasnu funkciju. Kinetička energija fiksiranih jezgara je jednaka nuli, dok je potencijalna energija odbijanja jezgara predstavlja konstantnu vrednost. Rešavanjem elektronske Šredingerove jednačine dobijena je elektronska energija. Ukupna energija molekula predstavlja zbir elektronske energije i energije međujezgrarnog odbijanja.

Osnovu DFT teorije predstavljaju dve teoreme Hoenberga i Kona<sup>144</sup>. Prva teorema uvodi pojam elektronske gustine, i definiše da se bilo koja veličina (kinetička, potencijalna, ukupna energija) može izraziti kao funkcional elektronske gustine osnovnog stanja. Druga teorema uvodi variacioni princip u DFT metodu i definiše da od beskonačno mogućih elektronskih gustina, prava gustina osnovnog stanja minimizira funkcional ukupne energije.,,Bilo koja probna funkcija elektronske gustine će dati energiju sistema koja je viša ili jednaka energiji pravog osnovnog stanja<sup>144</sup>.

### 1.5.1. Geometrijska optimizacija

Da bi molekul zauzeo najstabilniju konformaciju, potrebno je optimizovati njegovu strukturu do oblika sa najnižom energijom. Geometrijska optimizacija je iteracijski proces izračunavanja strukturnih parametara molekulske strukture u određenom koordinatnom sistemu koji opisuje položaj jezgara (npr. Dekartov koordinatni sistem). Male strukturne promene dovode do promena energije molekula, a odnos te dve promene prikazan je u ravni potencijalne energije na kojoj se može naći više minimuma i maksimuma. Tačke minimuma (potencijalne jame) odgovaraju različitim konformacijama ili strukturnim izomerima najniže energije. Minimumi mogu biti lokalni (tačka najniže energije za ograničeni deo ravni potencijalne površine) i globalni (tačka najniže energije u celoj ravni). Maksimumi na ravni potencijalne površine mogu biti vrhovi i brazde. Pri svakoj iteraciji računaju se energija i gradijent, pri čemu pozitivna vrednost gradijenta označava porast energije, dok negativna vrednost označava smanjenje energije sistema<sup>149</sup>.

Geometrijska optimizacija započinje početnim razmeštanjem atoma u molekulu i molekula u koordinatnom sistemu. U datoj tački se izračunavaju energija i gradijent, a zatim se, s obzirom na promenu sile i energije u različitim smerovima, određuje promena geometrije za sledeći korak optimizacije. Nakon svake iteracije, sistem prikazuje stanje optimizacijskog računa. U cilju sprečavanja greške prilikom određivanja stacionarne tačke, zadaju se kriterijumi konvergencije koje sistem mora zadovoljiti da bi bilo sigurno da ne postoji tačka još niže energije<sup>150</sup>.

### 1.5.2. Solvacioni efekat

Geometrijska optimizacija se najčešće izvodi u gasnoj fazi, međutim, eksperimentalne vrednosti se dobijaju rastvaranjem molekula u određenom rastvaraču, tako da je neophodno uzeti u obzir i efekte solvatacije. Rastvarač utiče na energiju i strukturu, pa je potrebno pažljivo odabrati solvacioni model i način izračunavanja solvatacije. Interakcije rastvarača i rastvorenog molekula mogu se izračunati na tri načina: eksplicitnim molekulima rastvarača koji okružuju rastvoreni molekul stvarajući solvacionu ljusku, implicitnim uticajem rastvarača koji svojim dielektričnim svojstvom utiče na energiju i geometriju molekula, kao i kombinovanim pristupom u kome se za opis solvatacije istovremeno koriste eksplicitni molekuli rastvarača i implicitni uticaj rastvarača (supramolekulski pristup). Implicitna solvatacija podrazumeva stvaranje solvacione šupljine i uticaj okolnog polarizovanog medijuma na posmatranu hemijsku strukturu u šupljini. Najčešće se koriste *Polarizable Continuum Model* (PCM), *Conductor-like Polarizable Continuum Model* (CPCM), *Solvation Model "Density"* (SMD), *Conductor-like Screening Model* (COSMO) modeli pri

geometrijskoj optimizaciji ili pri izračunavanju Gibbsove slobodne energije solvatacije (solvatacioni efekat na geometriju molekula optimizovanu u gasnoj fazi). Geometrijska optimizacija u implicitnom rastvoru sprovodi se najčešće da bi se uporedile strukture dobijene geometrijskom optimizacijom u vakuumu i rastvoru. Ukoliko nema značajnih razlika u strukturi, Gibbsova slobodna energija solvatacije može se izračunati na strukturi dobijenoj geometrijskom optimizacijom bez implicitnog rastvora<sup>151,152</sup>.

## 1.6. Literaturni podaci o fizičko-hemijskoj karakterizaciji sartana

Pregledom literature utvrđeno je da postoji malo podataka o  $pK_a$  vrednostima sartana, kao i da su često podaci nepotpuni jer je eksperimentalno određena samo jedna  $pK_a$  vrednost za molekule sa dva jonizujuća centra (**Tabela 3**). Na osnovu takvih podataka ne može se steći pravi uvid u postojanje svih ravnotežnih oblika, već dobijena vrednost ukazuje samo na prosečnu jonizaciju molekula. U literaturi nema podataka o ispitivanju protolitičkih ravnoteža u prisustvu micela različitog naelektrisanja.

**Tabela 3.** Podaci iz literature o određivanju  $pK_a$  vrednosti sartana

Sartan	$pK_a$	Literaturni podaci
Valsartan	$pK_{a1}$	3,60 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}$	4,70 <sup>153</sup> ; 5,06 <sup>154</sup> ; 4,90 <sup>155</sup>
Losartan	$pK_{a1}$	2,95 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}$	4,25 <sup>153</sup> ; 3,15 <sup>155</sup> ; 4,70 <sup>156</sup>
Irbesartan	$pK_{a1}$	3,69 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}$	4,42 <sup>153</sup> ; 4,70 <sup>155</sup>

Pored toga, pretraživanjem literature<sup>153</sup> se može uočiti da je rastvorljivost sartana uglavnom definisana opisnim terminima, dok u literaturi nema podataka o uticaju nejonskih surfaktanata na rastvorljivost sartana.

## **2. CILJ RADA**

Na osnovu pregleda literature, prikazanog u Uvodu<sup>153-156</sup>, može se uočiti da podaci o  $pK_a$  vrednostima sartana nisu potpuni, jer je u najvećem broju slučajeva za dva jonizaciona centra određena samo jedna  $pK_a$  vrednost. Takođe podaci o uticaju surfaktanata na protolitičke ravnoteže nisu potpuni. U literaturi se mogu pronaći dve studije o ispitivanju uticaja katjanskog surfaktanata CTAB na  $pK_a$  vrednost tetrazola losartana i valsartana, dok nema podataka o ispitivanju uticaja anjonskog i nejonskog surfaktanta na  $pK_a$  vrednosti sartana.

Imajući u vidu da se fizičko-hemijske osobine lekova (rastvorljivost, jonizacija), određene u “čisto” vodenoj sredini, mogu razlikovati u fiziološkim uslovima, kao i mogućnost primene micela kao simulirajućih sistema biomembrana, postavljeni su ciljevi ove disertacije:

- Određivanje  $pK_a$  vrednosti sartana (losartana, irbesartana, valsartana) u “čisto” vodenim rastvorima
- Određivanje  $pK_a$  vrednosti sartana u micelarnim rastvorima surfaktanata, anjonskom (SDS), katjonskom (CTAB) i nejonskim (TX-100, Brij 35)
- Procena uticaja surfaktanata na protolitičke ravnoteže sartana i predviđanje interakcija sa micelama

Pregledom literature<sup>153</sup> se može uočiti da je rastvorljivost sartana uglavnom definisana opisnim terminima, dok u literaturi nema podataka o uticaju nejonskih surfaktanata na rastvorljivost sartana. U ovoj disertaciji odrediće se:

- Rastvorljivost sartana pri fiziološki značajnim pH vrednostima
- Predviđanje interakcija micela i sartana koje doprinose povećanju rastvorljivosti

Da bi se procenilo ponašanje leka u biosredini, primeniće se metode računarske hemije:

- U cilju određivanja redosleda jonizacije u molekulima losartana, irbesartana, valsartana
- Za predviđanje interakcija irbesartana, losartana i valsartana sa micelama na osnovu vrednosti energija i molekulskih deskriptora izračunatih primenom B3LYP/6-31G baznog seta u programu *Gaussian 09*.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**



### 3.1. Oprema

- Sistem za titraciju 798 MPT Titrino Metrohn (Herisau, Švajcarska) sa kombinovanim elektrodom (LL unitrode Pt1000, Metrohm)
- 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)
- pH metar Radiometar model PHM 240 PH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)

### 3.2. Hemikalije

- Standardi ispitivanih supstanci: irbesartan, (2-butyl-3-[[2' (1H tetrazol-5-il)[1,1' bifenil-4-il]metil]1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-on; losartan, [2-butylchloro-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il) fenil]fenil]metil]imidazol-4-il]metanol;  
valsartan, (2S)-3metil-2-[pentanoil-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il) fenil]fenil]metil]amino]butanska kiselina.
- Natrijum-dodecilsulfat (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Cetiltrimetilamonijum-bromid (Acros Organic Geel, Belgija)
- Triton X-100 (4-oktilfenilpolietoksilat) Acros (Organic Geel, Belgija)
- Brij 35 (30% w/w) (polioksietilen (23) lauriletar) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Natrijum- hidroksid Titrisol ® (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Hlorovodonična kiselina Titrisol ® (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Standardni rastvor pufera pH 4,00 (Radiometer, Villeurbanne Cedex, Francuska)
- Standardni rastvor pufera pH 7,00 (Radiometer, Villeurbanne Cedex, Francuska)
- Kalijum-hidrogenftalat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hlorid (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- 85% ortofosforna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Glacijalna sirćetna kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-acetat trihidrat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum hidrogen fosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)

### 3.3. Računarski programi

- HyperQuad software 2008
- OriginPro 8 SRO, MA, SAD, 2007
- Microsoft Excel, Microsoft Corporation, SAD, 2003
- ChemBio Draw Ultra, Version 13.0, Cambridge Soft Corporation, MA, SAD. 2012
- Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc, Wallingford, CT, SAD, 2009
- ChemBio3D Ultra, Version 13.0 Cambridge Soft Corporation 2012
- ACD/pKa Version 12.0, Advanced Chemistry development, Inc, Toronto, ON, Canada, 2011

- ChemAxon, MarvinSketch, 16.5.2.0, Budampest, Hungary, 2013.

### **3.4. Potencijometrijsko određivanje pK<sub>a</sub> vrednosti irbesartana, losartana i valsartana**

#### **3.4.1. Standardizacija rastvora natrijum-hidroksida i hlorovodonične kiseline**

Standardni rastvori hlorovodonične kiseline i beskarbonatnog natrijum-hidroksida pripremani su prenošenjem sadržaja ampule Titrisol® u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem do crte redestilovanom vodom. Rastvori su standardizovani potencijometrijski. Za standardizaciju rastvora natrijum-hidroksida korišćen je kalijum-hidrogenftalat kao primarna standardna supstanca. Za standardizaciju rastvora hlorovodonične kiseline korišćen je standardizovan rastvor natrijum-hidroksida. U oba slučaja koncentracija standardnog rastvora dobijena je izvođenjem najmanje tri nezavisne titracije.

#### **3.4.2. Priprema micelarnih rastvora surfaktanata**

Rastvor anjonskog surfaktanta (SDS) koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl) pripremljen je prenošenjem 2,8838 g SDS i 5,8440 g natrijum-hlorida u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem do crte redestilovanom vodom.

Rastvor katjonskog surfaktanta (CTAB) koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl) pripremljen je prenošenjem 3,6445 g CTAB i 5,8840 g natrijum-hlorida u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem redestilovanom vodom do crte.

Rastvor nejonskog surfaktanta (TX-100) koncentracije 0,01 M (0,1 M NaCl) pripremljen je prenošenjem 6,06 ml TX-100 i 5,8840 g natrijum-hlorida u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem redestilovanom vodom do crte.

Rastvor nejonskog surfaktanta (Brij 35) koncentracije 0,01M (0,1 M NaCl) pripremljen je prenošenjem 11,99 g Brij 35 i 5,8840 g natrijum-hlorida u odmerni sud od 1000 ml i dopunjavanjem do crte redestilovanom vodom.

#### **3.4.3. Određivanje korekcionog faktora A**

Za preračunavanje izmerenih pH vrednosti u pcH vrednosti ( $pcH = -\log[H^+]$ ) primenjena je relacija  $pcH = pH - A$ , gde je A korekциони faktor. Vrednosti faktora A za „čisto“ vodeni rastvor, smeše metanol-voda (30%, 40%, 45%, 50% i 55% m/m) i rastvore surfaktanata, određene su eksperimentalno titracijom rastvora hlorovodonične kiseline ( $2,6025 \times 10^{-3}$  M HCl; 0,1 M NaCl) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida<sup>157,158</sup>.

#### **3.4.4. Ispitivanje stabilnosti sartana pri različitim pH vrednostima**

Stabilnost sartana (irbesartana, losartana i valsartana) ispitana je spektrofotometrijski u toku 24 sata u rastvorima različite pH vrednosti: 0,1 M rastvoru hlorovodonične kiseline; 0,01 M rastvoru fosfatnog pufera pH 6,90 i 0,01 M rastvoru natrijum-hidroksida. Pripremljeni su osnovni rastvori sartana koncentracije  $5 \times 10^{-4}$  M u metanolu. Radni rastvori koncentracije  $10^{-5}$  M pripremljeni su prenošenjem 0,5 ml osnovnog rastvora u odmerni sud od 25 ml i

dopunjavanjem do crte 0,1 M rastvorom hlorovodonične kiseline; 0,01 M rastvorom fosfatnog pufera pH 6,9 ili 0,01 M rastvorom natrijum-hidroksida. Apsorpcioni spektri rastvora snimani su u intervalu 200-500 nm uz odgovarajuće slepe probe, jedan minut nakon pripreme i nakon 24 sata.

### **3.4.5. Potencimetrijske titracije sartana u rastvorima bez i u prisustvu surfaktanata**

Jonizacione konstante irbesartana, losartana i valsartana određene su bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100, Brij 35). Izabrana koncentracija surfaktanata je značajno iznad njihovih cmc, zbog čega se uticaj drugih molekula prisutnih u rastvoru na cmc mogao zanemariti. Elektroda za merenje pH vrednosti kalibrisana je standardnim puferima pH vrednosti 4,01 i 7,00. Utvrđeno je da surfaktanti u primenjenoj koncentraciji  $10^{-2}$  M nisu imali značajan efekat na pH vrednost pufera (manje od  $\pm 0,02$  pH jedinice). Potencimetrijske titracije su izvedene na temperaturi  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz kontinuirano mešanje rastvora magnetnom mešalicom. Konstantna jonska jačina rastvora 0,1 M podešena je dodatkom NaCl.

Ispitani sartani su slabo rastvorljivi u vodi zbog čega su  $pK_a$  vrednosti u „čisto“ vodenom rastvoru, bez dodatka surfaktanata, određene indirektno, na osnovu praktičnih  $pK_a$  vrednosti ( $pK_a^*$ ) određenih u smešama metanol - voda različitih odnosa (30%, 40%, 45%, 50%, 55% m/m). Rastvori sartana ( $5 \times 10^{-4}$  M -  $10^{-3}$  M) u 40 ml smeše metanol-voda, kojima je dodat 1 ml hlorovodonične kiseline (0,1041 M), titrovani su standardnim rastvorom natrijum-hidroksida (0,0996 M) alikvotima od 0,02 ml. Dodatak hlorovodonične kiseline bio je neophodan u cilju prevođenja jonizujućih centara sartana u protonovane oblike. Estrapolacijom dobijenih  $pK_a^*$  vrednosti na 0% metanola, određene su  $pK_a$  vrednosti sartana koje odgovaraju „čisto“ vodenoj sredini.

Za određivanje  $pK_a$  vrednosti sartana u micelarnim rastvorima surfaktanata primenjena je ista procedura, ali je umesto smeša metanol-voda korišćen  $10^{-2}$  M rastvor surfaktanata.

Za obradu eksperimentalnih podataka dobijenih potencimetrijskim titracijama korišćen je kompjuterski program Hyperquad, koji omogućava određivanje  $pK_a$  vrednosti u složenim sistemima sa preklopljenim kiselinsko-baznim ravnotežama<sup>14</sup>.

### **3.5. Određivanje rastvorljivosti irbesartana i losartana na pH 4,5 bez i u prisustvu nejonskih surfaktanata (TX-100, Brij 35)**

Rastvor sirćetne kiseline 0,4 M pripremljen je prenošenjem 11,6 ml glacijalne sirćetne kiseline u odmerni sud od 500 ml. Odmerni sud dopunjen je redestilovanom vodom do crte.

Rastvor natrijum-acetata 0,022 M pripremljen je prenošenjem 2,99 g natrijum-acetat trihidrata u odmerni sud od 1000 ml. Odmerni sud dopunjen je redestilovanom vodom do crte. U odmerni sud od 500 ml preneto je 100 ml 0,022 M rastvora natrijum-acetata i dopunjeno redestilovanom vodom do crte.

Zasićeni rastvori irbesartana i losartana pripremljeni su u 0,01 M rastvoru acetatnog pufera pH 4,5. Za ovu svrhu 2 mg ispitivanih sartana je rastvoreno u 40 ml 0,0044 M rastvora natrijum-acetata, i zatim je molekulski oblik sartana taložen dodatkom 0,56 ml 0,4 M sirćetne kiseline. Rastvor 0,4 M sirćetne kiseline korišćen je za podešavanje pH vrednosti na 4,5. Suspenzije su termostatisane uz mešanje u toku 24 h, nakon čega su filtrirane kroz membranski filter (0,22  $\mu\text{m}$ ). Alikvoti filtrata su razblaživani uz dodatak rastvora NaOH za podešavanje pH oko 11. Koncentracija anjonskih oblika sartana je određena spektrofotometrijski na 250 nm.

Zasićeni rastvori ispitivanih sartana u prisustvu micelarnih rastvora Brij 35 i TX-100 koncentracije  $10^{-3}$  M pripremljeni su primenom procedura za određivanje rastvorljivosti bez surfaktanata. Veća masa sartana je bila neophodna zbog očekivane veće rastvorljivosti u micelarnom rastvoru. Dalji postupci termostiranja, filtracije i razblaživanja filtrata bili su isti kao i kod određivanja rastvorljivosti u sredini bez surfaktanata. Apsorbancije rastvora merene su na 250 nm u slučaju ispitivanja uticaja Brij 35 i na 244 nm za ispitivanje uticaja TX-100, korišćenjem odgovarajućih slepih proba. Na izabranim talasnim dužinama primenjeni surfaktanti pokazuju najmanju apsorbciju u odnosu na ispitivane sartane.

### 3.6. Optimizacija strukture ravnotežnih oblika sartana i izračunavanje molekulskih deskriptora

Redosled jonizacije sartana, kao i potencijalne interakcije njihovih ravnotežnih oblika sa micelama različitog naelektrisanja i polarnosti, ispitani su u teorijskoj studiji.

Hemijske strukture svih ravnotežnih oblika ispitanih sartana konstruisane su u programu ChemBioDraw Ultra 13.0<sup>159</sup>, a zatim su od ovih struktura u programu ChemBio 3D Ultra formirani njihovi 3D modeli<sup>160</sup>. Irbesartan i losartan su amfoliti čijom jonizacijom u rastvoru mogu nastati 4 ravnotežna oblika (katjonski, anjonski, cviterjonski i molekulski), dok je valsartan dikiselina čijom jonizacijom nastaju tri ravnotežne forme (molekulska, monoanjonska, dianjonska). Od 11 ispitanih ravnotežnih oblika, pet ima ukupno naelektrisanje nula (molekulski oblici losartana, irbesartana, valsartana i cviterjonski oblici losartana i irbesartana), tri sa ukupnim naelektrisanjem -1 (anjonski oblici losartana, irbesartana i monoanjonski oblik valsartana), dva sa ukupnim naelektrisanjem +1 (katjonski oblici losartana i irbesartana) i jedan sa naelektrisanjem -2 (dianjonski oblik valsartana). Geometrijska optimizacija svakog od 11 ispitanih ravnotežnih oblika izvedena je DFT metodom<sup>151,152</sup> u gasnoj fazi, primenom B3LYP/6-31G (d,p) baznog seta u programu Gaussian 09<sup>161</sup>. Optimizovani molekulski modeli korišćeni su za sva dalja izračunavanja. Za sve ravnotežne oblike sprovedena je spektralna analiza i vrednosti elektronskih energija korigovane su u odnosu na vrednosti odgovarajućih termalnih korekcija (14,9375 – 15,7317 eV za irbesartan; 12,7618 – 13,5773 eV za losartan i 14,8182 – 15,5892 eV za valsartan).

U programu *Gaussian 09*<sup>161</sup> primenom B3LYP/6-31G (d,p)<sup>water</sup> baznog seta<sup>151,152</sup> koji opisuje uslove vodenog rastvora (*Polarisable Continuum Model, PCM*)<sup>162</sup> izračunati su elektronski deskriptori. Na osnovu vrednosti energija najviše popunjene molekulske orbitale  $E_{HOMO}$  (*Highest Occupied Molecular Orbital Energy*)<sup>163</sup> i energija najniže nepopunjene molekulske orbitale  $E_{LUMO}$  (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital Energy*)<sup>163</sup>, izračunati su kvantno-hemijski molekulski deskriptori: hemijski potencijal ( $\mu$ ), elektronegativnost ( $\chi$ ), otpornost na transfer elektrona (*hardness*,  $\eta$ ), hemijska reaktivnost (*global softness*,  $S$ ), indeks elektrofilnosti ( $\omega$ ), dipolni momenat, naelektrisanje<sup>163-166</sup>. Različiti termodinamski i sterni deskriptori izračunati su u programu ChemBio3D Ultra 13.0<sup>160</sup>.

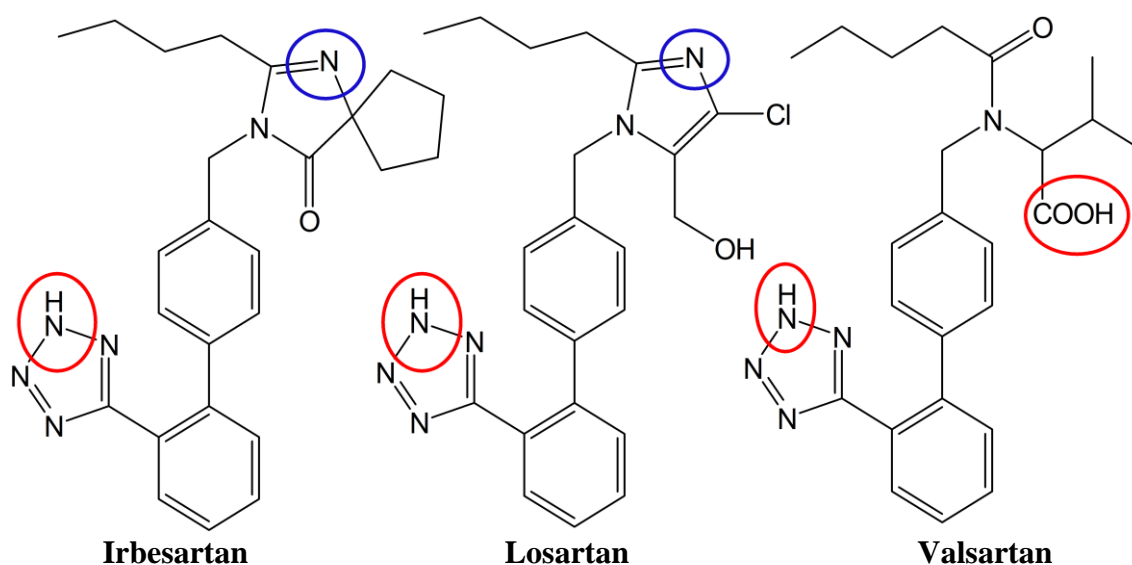
## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1. Ispitivanje uticaja micelarnih rastvora surfaktanata na jonizaciju sartana

### 4.1.1. Određivanje $pK_a$ vrednosti irbesartana, losartana i valsartana bez prisustva surfaktanata

Sa hemijskog aspekta, zajedničke funkcionalne grupe u farmakofori ispitanih sartana su bifenilna grupa, tetrazolski i imidazolski prsten, pri čemu neke od njih predstavljaju jonizujuće centre (tetrazolski i imidazolski prsten). Irbesartan i losartan su amfoliti koji sadrže jednu kiselu grupu (tetrazolski prsten) i jednu baznu grupu (imidazolski prsten). Valsartan je diprotična kiselina koja sadrži karboksilnu grupu i tetrazolski prsten **Slika 11**. Jonizujući centri sartana su direktno uključeni u interakciju sa  $AT_1$  receptorom i zato se smatraju delom strukture koji predstavlja uslov za farmakološku aktivnost<sup>4,5</sup>. Pregled literature pokazao je da postoji malo podataka o  $pK_a$  vrednostima sartana,<sup>153-156</sup> kao i da su često podaci nepotpuni jer je eksperimentalno određena samo jedna  $pK_a$  vrednost za molekule sa dva jonizujuća centra<sup>154,155,156</sup>. Na osnovu takvih podataka ne može se steći pravi uvid u postojanje svih ravnotežnih oblika, već dobijena vrednost ukazuje samo na prosečnu jonizaciju molekula. U literaturi nema podataka o ispitivanju protolitičkih ravnoteža u prisustvu micela različitog naelektrisanja koji bi poslužili za procenu interakcija sartana sa biološkim membranama.

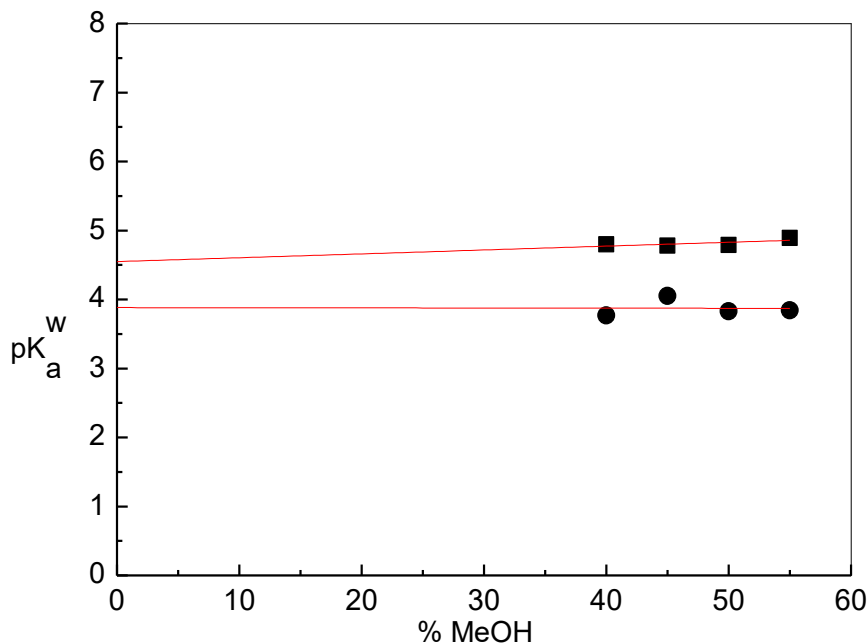
Cilj ove studije bio je da se ispita uticaj micela različitog naelektrisanja, kao simulirajućih sistema biomembrana, na protolitičke ravnoteže irbesartana, losartana i valsartana. Da bi se dobili poredljivi kiselinско-bazni profili, za svako jedinjenje određene su  $pK_a$  vrednosti pod istim uslovima, bez i u prisustvu surfaktanata. Konstante su određene potencijometrijski, pri konstantnoj jonskoj jačini (0,1M NaCl) i temperaturi 25°C.



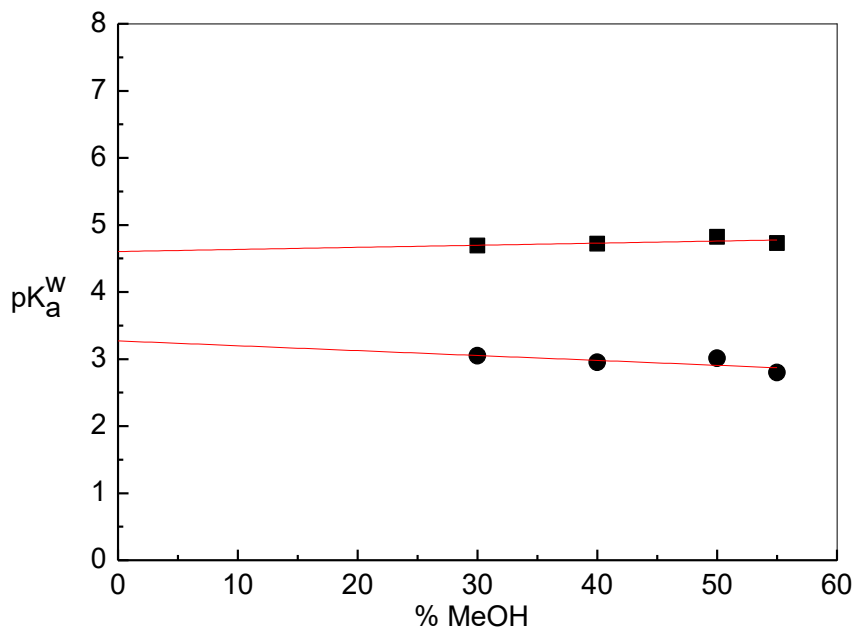
**Slika 11.** Hemijske strukture i jonizacioni centri ispitanih sartana

Sartani su jedinjenja slabo rastvorljiva u vodi, što znači da potencijometrijsko određivanje  $pK_a$  vrednosti u "čisto" vodenoj sredini ( $pK_a^w$ ) titracijom vodenog rastvora nije bilo izvodljivo<sup>62</sup>. Problem slabe rastvorljivosti sartana tokom potencijometrijske titracije, u ovom radu rešen je određivanjem praktičnih  $pK_a$  vrednosti ( $pK_a^*$ ) u smešama vode i organskog rastvarača, u različitim odnosima (30 - 55% m/m)<sup>62,167</sup>. Metanol je primenjen kao korastvarač jer ispoljava najpribližniji solvatacioni efekat kao voda.<sup>62</sup> Ekstrapolacijom  $pK_a^*$  vrednosti na 0% metanola određene su sve  $pK_a^w$  vrednosti sartana koje definišu jonizaciju u vodi (**Slike 12 - 14**). Kao korastvarač metanol je doprineo boljoj rastvorljivosti sartana, a veoma malo je uticao na  $pK_a$  vrednosti, posebno u slučaju losartana i

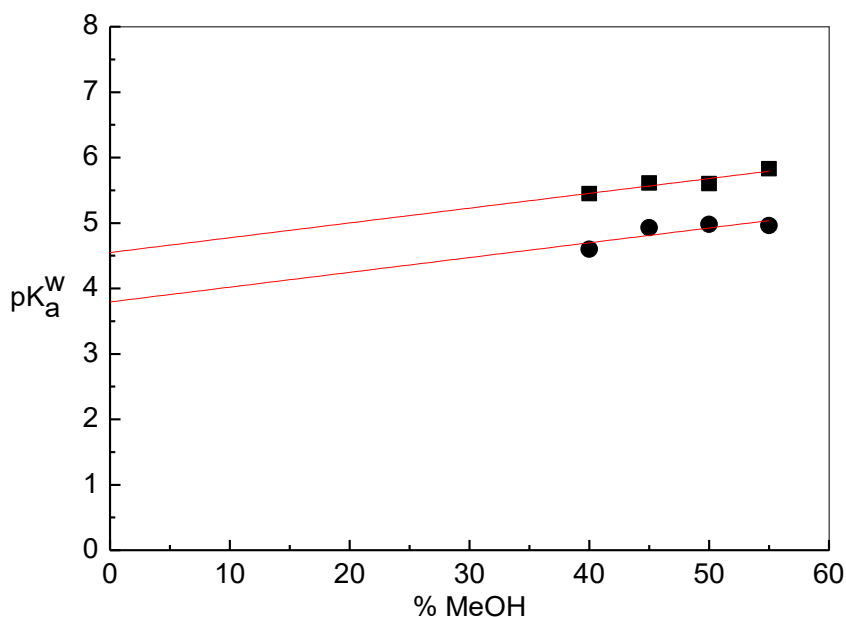
irbesartana. Ovo je potvrđeno na osnovu krive zavisnosti  $pK_a^*$  vrednosti od % metanola, pri čemu su apsolutne vrednosti nagiba krive bile manje od 0,01 za losartan i irbesartan, kao i 0,02 za obe konstante valsartana. Pored toga, pozitivan ili negativan predznak nagiba krivih (**Slike 12 – 14**) ukazuje na jonizaciju kisele grupe (pozitivan predznak) ili bazne grupe (negativan predznak)<sup>62</sup>.



**Slika 12.** Potenciometrijski određene  $pK_a^*$  vrednosti irbesartana u odnosu na procenat metanola (m/m) u smešama metanol-voda (% MeOH); ●,  $pK_{a1}^w$ ; ■,  $pK_{a2}^w$



**Slika 13.** Potenciometrijski određene  $pK_a^*$  vrednosti losartana u odnosu na procenat metanola (m/m) u smešama metanol-voda (% MeOH); ●,  $pK_{a1}^w$ ; ■,  $pK_{a2}^w$



**Slika 14.** Potenciometrijski određene  $pK_a^*$  vrednosti valsartana u odnosu na procenat metanola (m/m) u smešama metanol-voda (% MeOH); ●,  $pK_{a1}^w$ ; ■,  $pK_{a2}^w$

Kompjuterski program HYPERQUAD<sup>114</sup> korišćen je za analizu potenciometrijskih podataka i određivanje  $pK_a$  vrednosti. Primena ovog programa omogućava određivanje  $pK_a$  vrednosti i u slučaju jedinjenja složene hemijske strukture koja sadrže veći broj jonizacionih centara, čak i kada su vrednosti bliske, a procesi jonizacije preklapljeni. Vrednosti jonizacionih konstanti dobijenih u ovom radu, kao i literaturni podaci prikazani su u **Tabeli 4**.

**Tabela 4.** Potenciometrijski određene  $pK_a^w$  vrednosti irbesartana, losartana i valsartana i vrednosti iz literature

Sartan	Vrednosti određene potenciometrijski u ovom radu	Literaturni podaci	
Valsartan	$pK_{a1}^w$ (karboksilna grupa)	3,79	3,60 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}^w$ (tetrazol)	4,55	4,70 <sup>153</sup> ; 4,90 <sup>155</sup> ; 5,06 <sup>154</sup>
Losartan	$pK_{a1}^w$ (imidazol)	3,27	2,95 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}^w$ (tetrazol)	4,60	4,25 <sup>153</sup> ; 3,15 <sup>155</sup> ; 4,70 <sup>156</sup>
Irbesartan	$pK_{a1}^w$ (imidazol)	3,88	3,69 <sup>153</sup>
	$pK_{a2}^w$ (tetrazol)	4,55	4,42 <sup>153</sup> ; 4,70 <sup>155</sup>

Svaki od ispitanih sartana sadrži dva jonizujuća centra (**Slika 11**). Irbesartan i losartan predstavljaju amfolite jer sadrže jedan kiseli centar (tetrazolski prsten) i jedan bazni centar (azot imidazolskog prstena). Valsartan je diprotična kiselina koja osim kiselog tetrazolskog prstena, sadrži i karboksilnu grupu. S obzirom na bliske vrednosti jonizacionih konstanti, kiselinsko-bazni profili ovih molekula su složeni, jer su procesi jonizacije preklapljeni i eksperimentalno se ne mogu individualno posmatrati. U literaturi je dostupno malo podataka o definisanju protolitičkih ravnoteža

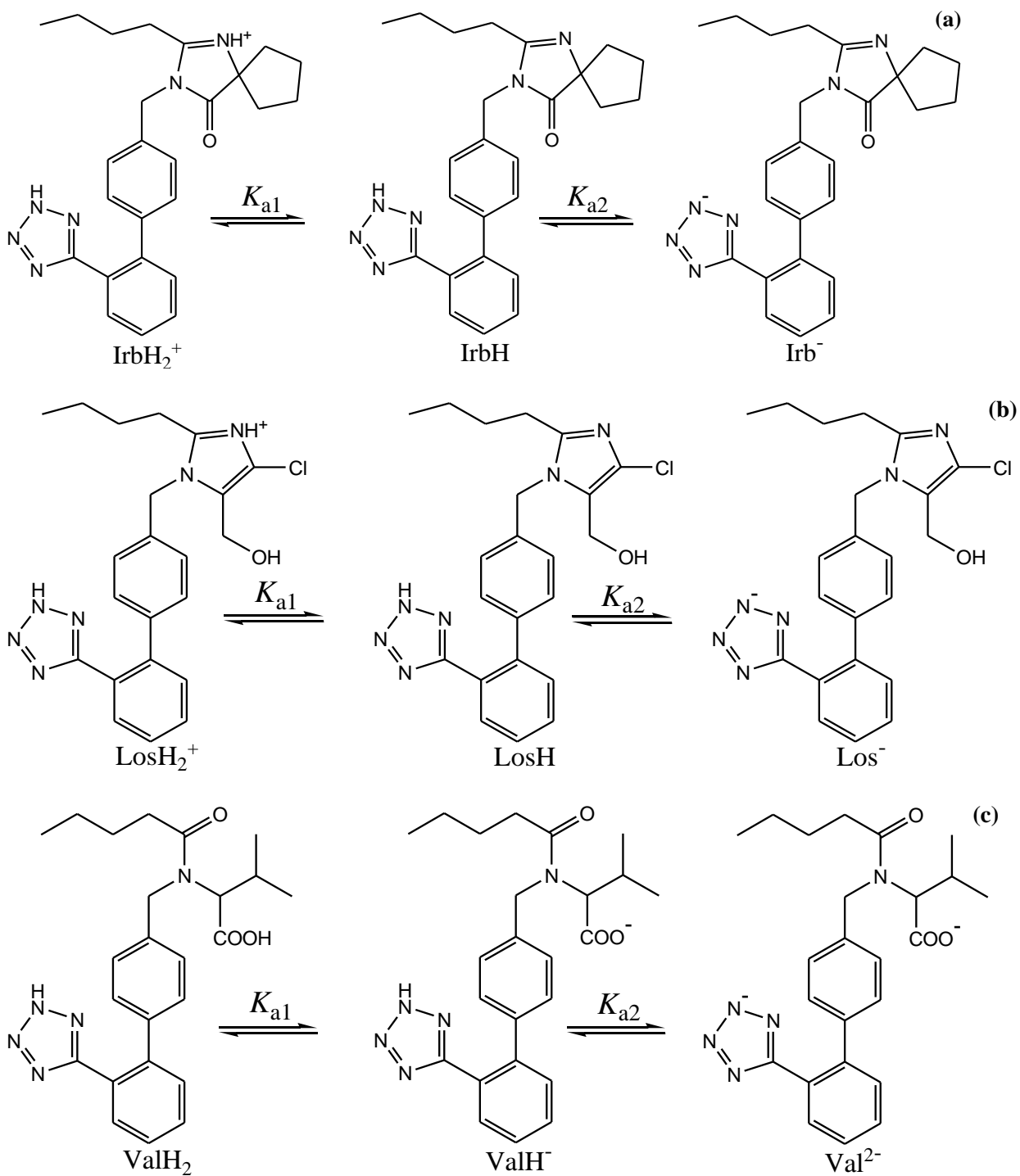


sartana za vodeni rastvor. Samo u jednoj studiji su određene jonizacione konstante za oba jonizaciona centra<sup>153</sup>, a u većini slučajeva eksperimentalno je određena samo jedna konstanta za losartan i irbesartan, koja je pripisana jonizaciji azota tetrazolskog prstena<sup>154-156</sup>. Međutim, u obzir se mora uzeti i jonizacija imidazolskog dela strukture, da bi se stekao uvid u stvarni profil jonizacije i da bi se procenilo koji su ravnotežni oblici i u kom stepenu zastupljeni u rastvoru na datoj pH vrednosti.

Redosled jonizacije, pre izvođenja teorijske studije, pretpostavljen je na osnovu analize hemijske strukture ispitanih sartana. Zajednički deo strukture sva tri molekula je tetrazol, na položaju 5 supstituisan bifenil grupom tako da su u svakom od ispitanih jedinjenja jonizujući centri dovoljno razdvojeni da elektronskim efektima međusobno ne utiču na jonizaciju. Na osnovu toga se može očekivati da se deprotovanje azota tetrazolskog prstena odvija na približno isti način u sva tri molekula. Karboksilna grupa ispoljava izraženiji kiseli karakter od tetrazolskog prstena na osnovu čega bi se moglo očekivati da u molekulu valsartana sa dva kisela centra, niža  $pK_{a1}^w$  vrednost 3,79 potiče od jonizacije karboksilne grupe, dok  $pK_{a2}^w$  4,55 ukazuje na jonizaciju tetrazola. Takve vrednosti se slažu sa već publikovanim literaturnim podacima za  $pK_a^w$  vrednosti derivata karboksilnih kiselina i derivata tetrazola supstituisanih u položaju 5<sup>168</sup>. U molekulima irbesartana i losartana vrednosti  $pK_{a2}^w$  (4,55 i 4,60) mogu se pripisati jonizaciji tetrazola.

Vrednosti  $pK_{a1}^w$  odgovarale bi slabo baznom centru, azotu u strukturi imidazola losartana (3,27) odnosno 4,5-dihidro-5-okso-1H-imidazolskom supstituentu irbesartana (3,88). Atom hlora na položaju 4 imidazola losartana elektronprivlačnim efektom smanjuje elektronsku gustinu na azotu što otežava vezivanje protona i izaziva smanjenje baznosti u odnosu na isti centar u irbesartanu.

Procesi jonizacije ispitanih sartana i ravnotežne vrste koje pritom nastaju prikazani su na **Slici 15**. Na ovaj način pripisane  $pK_a^w$  vrednosti, slažu se sa podacima iz literature<sup>153</sup>. Male razlike između  $pK_a^w$  vrednosti eksperimentalno određenih u ovom radu i literaturnih podataka<sup>153</sup>, mogu biti posledica različitih eksperimentalnih uslova određivanja (jonska jačina, vrsta elektrolita).



**Slika 15.** Jonizacioni profili (a) irbesartana ( $\text{IrbH}$ , molekularni oblik;  $\text{IrbH}_2^+$ , katjonski oblik;  $\text{Irb}^-$ , anjonski oblik), (b) losartana ( $\text{LosH}$ , molekularni oblik;  $\text{LosH}_2^+$ , katjonski oblik;  $\text{Los}^-$ , anjonski oblik) i (c) valsartana ( $\text{ValH}_2$ , molekularni oblik;  $\text{ValH}^-$ , monoanjonski oblik;  $\text{Val}^{2-}$ , dianjonski oblik)

#### 4.1.2. Određivanje $pK_a$ vrednosti irbesartana, losartana i valsartana u micelarnim rastvorima surfaktanata različitog naelektrisanja

Protolitičke ravnoteže losartana i irbesartana ispitane su u micelarnim rastvorima 4 surfaktanta, SDS, CTAB, TX-100 i Brij 35, bez korišćenja korastvarača jer su surfaktanti svojim solubilizirajućim efektom doprineli povećanju rastvorljivosti (**Tabela 5**). Uzevši u obzir da su sartani slabo rastvorljivi u vodi, povećanje rastvorljivosti u micelarnim rastvorima potvrđuje postojanje interakcija između sartana i micela, ukazujući da su ravnotežni oblici prisutni u micelarnoj pseudofazi. Vrednosti konstanti određene u micelarnim rastvorima ( $pK_a^{app}$ ) mogu se posmatrati kao ukupna jonizacija leka koja potiče i od jonizacije u „čisto“ vodenoj sredini i od jonizacije u micelarnoj pseudofazi<sup>169</sup>. Usled slabe rastvorljivosti u  $10^{-2}$  M micelarnim rastvorima nejonskih surfaktanata (TX-100 i Brij),  $pK_a^{app}$  irbesartana su određene samo u prisustvu jonskih surfaktanata SDS i CTAB, u definisanim uslovima u kojim su izvedena sva ostala određivanja. U ovom slučaju, na osnovu slabe rastvorljivosti bi se moglo zaključiti da ravnotežni oblici irbesartana ne ostvaruju interakcije sa nejonskim micelama.

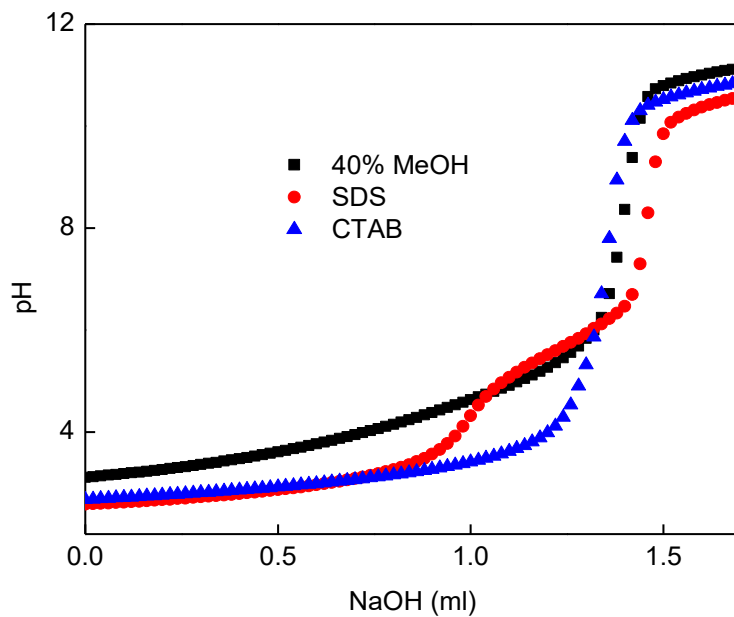
Krive titracije dobijene titracijom rastvora sartana u prisustvu surfaktanata prikazane su na **Slikama 16 - 18**. U cilju poređenja, na **Slikama 16 - 18** zajedno su prikazane i titracione krive dobijene titracijom rastvora smeše metanol – voda, bez prisustva surfaktanata, sa najnižim udelom metanola.

Razlika između  $pK_a^{app}$  vrednosti određenih u micelarnim rastvorima surfaktanata i  $pK_a^w$  vrednosti koje definišu jonizaciju u rastvorima bez surfaktanata ( $\Delta pK_a^{app} = pK_a^{app} - pK_a^w$ )<sup>170</sup> predstavlja pomeranje protolitičkih ravnoteža sartana pod uticajem micela (**Tabela 5**).

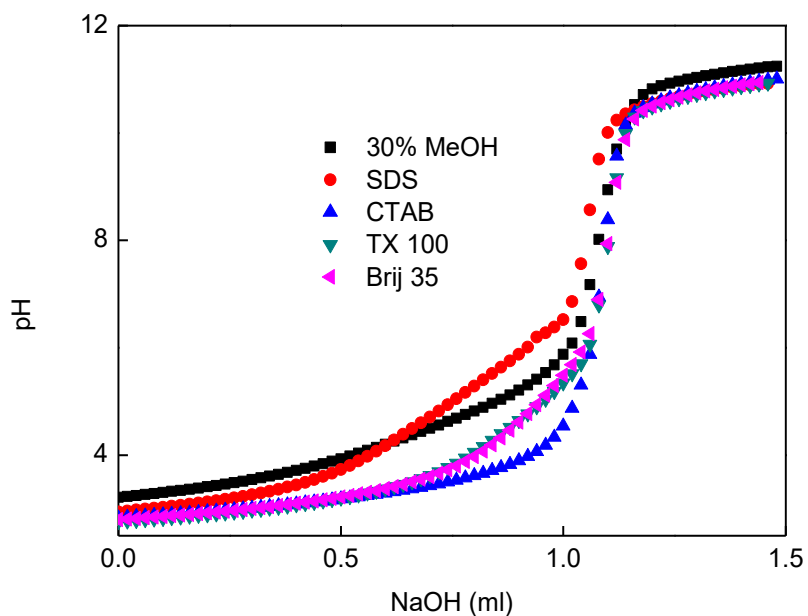
**Tabela 5.**  $pK_a^{app}$  vrednosti valsartana, losartana i irbesartana potencijometrijski određene u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata<sup>a</sup>

Sartan		SDS		CTAB		TX-100		Brij 35	
		$pK_a^{app}$	$\Delta pK_a^{app}$	$pK_a^{app}$	$\Delta pK_a^{app}$	$pK_a^{app}$	$\Delta pK_a^{app}$	$pK_a^{app}$	$\Delta pK_a^{app}$
Valsartan	$pK_{a1}$	<b>5,00±0,06</b>	<b>+1,21</b>	<b>3,29±0,04</b>	<b>-0,50</b>	<b>5,09±0,12</b>	<b>+1,30</b>	<b>4,35±0,03</b>	<b>+0,56</b>
	$pK_{a2}$	<b>5,14±0,15</b>	<b>+0,59</b>	<b>3,83±0,06</b>	<b>-0,72</b>	<b>5,55±0,17</b>	<b>+1,00</b>	<b>4,94±0,04</b>	<b>+0,39</b>
Losartan	$pK_{a1}$	<b>4,75±0,05</b>	<b>+1,48</b>	<b>1,96±0,20</b>	<b>-1,31</b>	<b>3,66±0,08</b>	<b>+0,39</b>	<b>2,41±0,04</b>	<b>-0,86</b>
	$pK_{a2}$	<b>6,01±0,06</b>	<b>+1,41</b>	<b>3,16±0,13</b>	<b>-1,44</b>	<b>5,29±0,09</b>	<b>+0,69</b>	<b>4,72±0,04</b>	<b>+0,12</b>
Irbesartan	$pK_{a1}$	<b>5,60±0,20</b>	<b>+1,72</b>	<b>3,08±0,04</b>	<b>-0,80</b>				
	$pK_{a2}$	<b>6,04±0,12</b>	<b>+1,49</b>	<b>3,14±0,02</b>	<b>-1,41</b>				

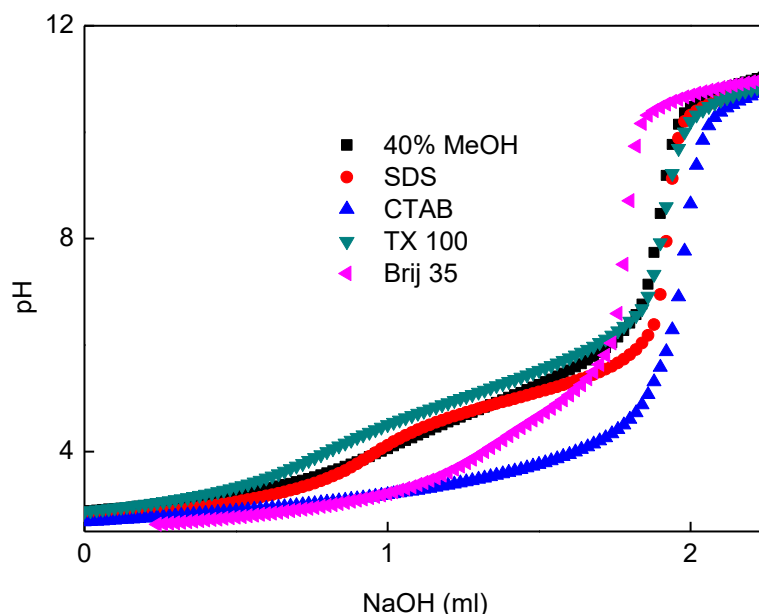
<sup>a</sup>I = 0,1 M NaCl; t = 25 °C;  $\Delta pK_a^{app} = pK_a^{app} - pK_a^w$



**Slika 16.** Potenciometrijske krive titracije  $10^{-3}$  M rastvora irbesartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata (SDS, CTAB) titrovanih standardnim rastvorom NaOH.  $I = 0,1$  M (NaCl),  $t = 25^{\circ}\text{C}$



**Slika 17.** Potenciometrijske krive titracije  $10^{-3}$  M rastvora losartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100 i Brij 35) titrovanih standardnim rastvorom NaOH.  $I = 0,1$  M (NaCl),  $t = 25^{\circ}\text{C}$

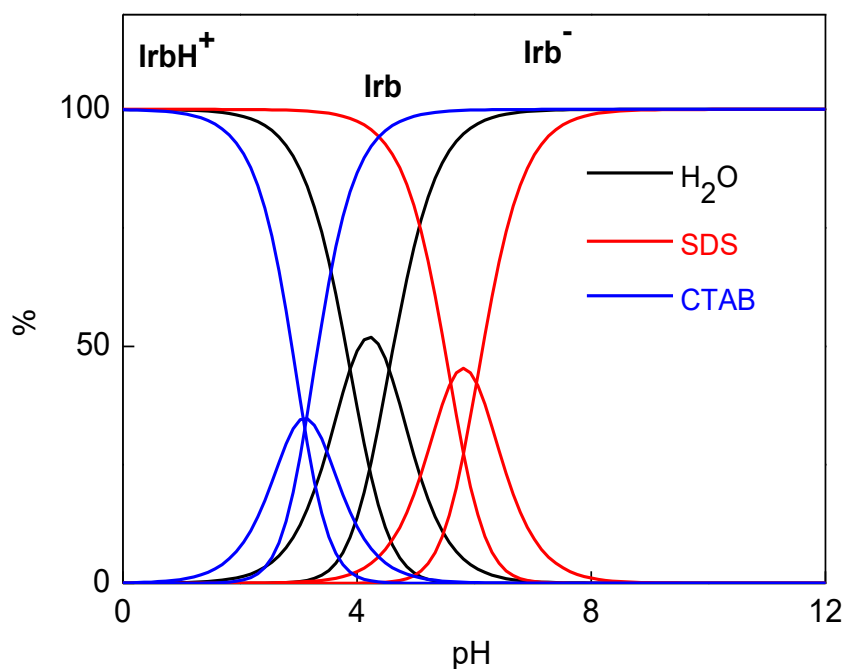


**Slika 18.** Potenciometrijske krive titracije rastvora valsartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100 i Brij 35) titrovanih standardnim rastvorom NaOH.  $I = 0,1$  M (NaCl),  $t = 25$  °C

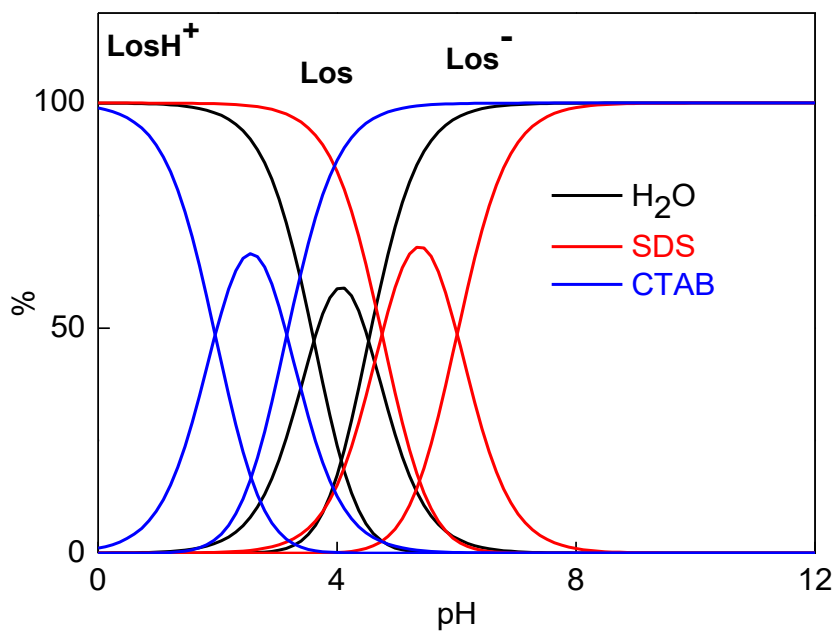
Pomeranje raspodele ravnotežnih oblika ispitanih sartana na pH skali u prisustvu micela jasno se može videti na osnovu dijagrama raspodele koji su prikazani na **Slikama 19 - 23**. Promene  $pK_a^{app}$  vrednosti su posledica interakcija koje mogu biti zasnovane na hidrofobnim efektima, između hidrofobne površine ispitanih jedinjenja i lipofilne unutrašnjosti micela, kao i elektrostatičkim efektima, koji zavise od naelektrisanja jonizovanih grupa sartana i naelektrisane površine micela<sup>171</sup>. U slučaju micela nejonskih surfaktanata moguće je građenje vodoničnih veza i dipol interakcije. Smer pomeranja protolitičkih ravnoteža može ukazati na tip efekta koji preovlađuje.

Iz **Tabele 5** može se videti da  $\Delta pK_a^{app}$  ima vrednosti u opsegu od -1,44 do +1,72. Najveći uticaj na jonizaciju kiselog tetrazola ostvaruju SDS micelle koje izazivaju povećanje  $pK_a^{app}$  vrednosti kiselih grupa valsartana, kao i kiselih i baznih grupa irbesartana i losartana koji predstavljaju amfolite. Ovakav efekat doprinosi smanjenju jonizacije karboksilne grupe ( $\Delta pK_a^{app} = +1,21$ ) i tetrazolskog prstena ( $\Delta pK_a^{app} = +1,49$ ), kao i povećanju jonizacije imidazolskog azota u ispitanim jedinjenjenjima ( $\Delta pK_a^{app} = +1,72$ ). Takođe, može se zaključiti da je smanjenje kiselosti tetrazola najizraženije pod uticajem SDS micela u slučaju irbesartana ( $\Delta pK_a^{app} = +1,49$ ).

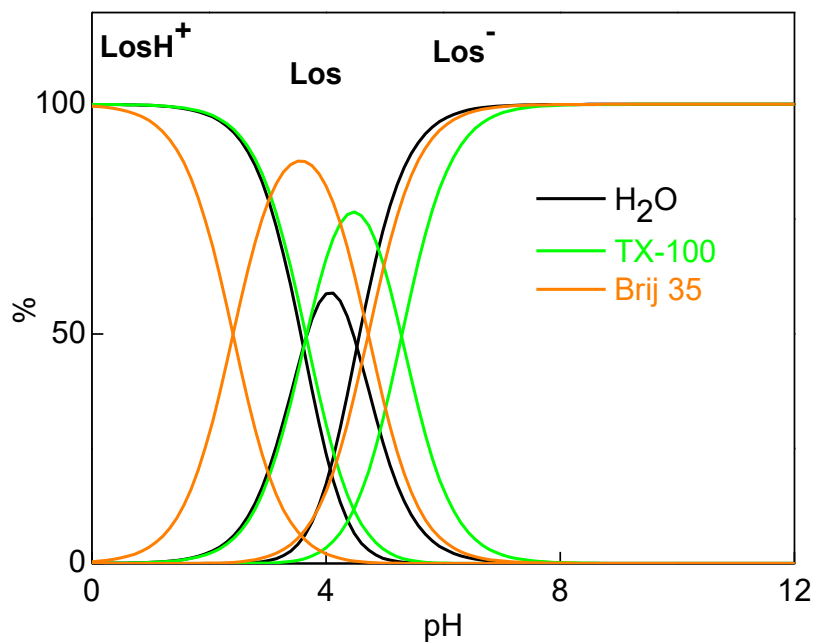
Usled negativno naelektrisane površine, anjonske SDS micelle ostvaruju elektrostatičke interakcije sa jonizovanim ravnotežnim oblicima ispitanih sartana. U interakcijama sa negativno naelektrisanim grupama (karboksilatni anjon i deprotonovani azot tetrazola) preovlađuju elektrostatičke sile odbijanja. Ovakve interakcije stabilizuju nejonizovane forme pomenutih funkcionalnih grupa, koje predstavljaju protonovane oblike, i na taj način utiču na suzbijanje jonizacije dovodeći do porasta  $pK_a^{app}$  vrednosti. Analogno tome, elektrostatičkim silama privlačenja anjonske micelle stabilizuju katjonske ravnotežne oblike imidazolskog prstena u losartanu i irbesartanu, stimulišu njihovo protonovanje i povećavaju jonizaciju, što utiče na povećanje  $pK_a^{app}$  vrednosti i povećanje baznosti. Surfaktanti značajno utiču na razlike u zastupljenosti molekulske i jonizovanih formi u opsegu pH od 2 do 7. Ovom intervalu pripadaju i biofarmaceutski značajne pH vrednosti što može ukazati i na značajnu promenu raspodele u fiziološkim uslovima usled interakcija sa biomolekulima različitog naelektrisanja i polarnosti.



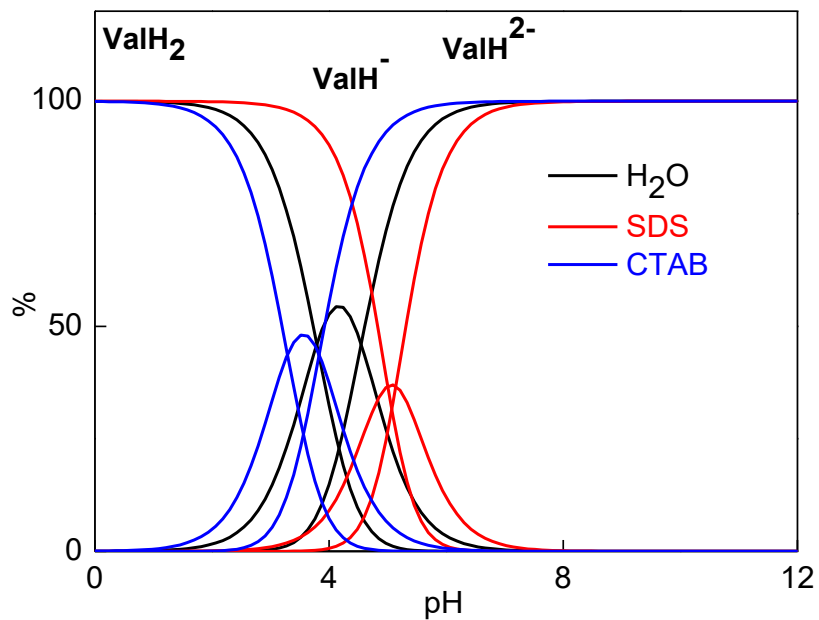
**Slika 19.** Raspodela ravnotežnih oblika irbesartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M jonskih surfaktanata, u zavisnosti od pH rastvora



**Slika 20.** Raspodela ravnotežnih oblika losartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M jonskih surfaktanata, u zavisnosti od pH rastvora

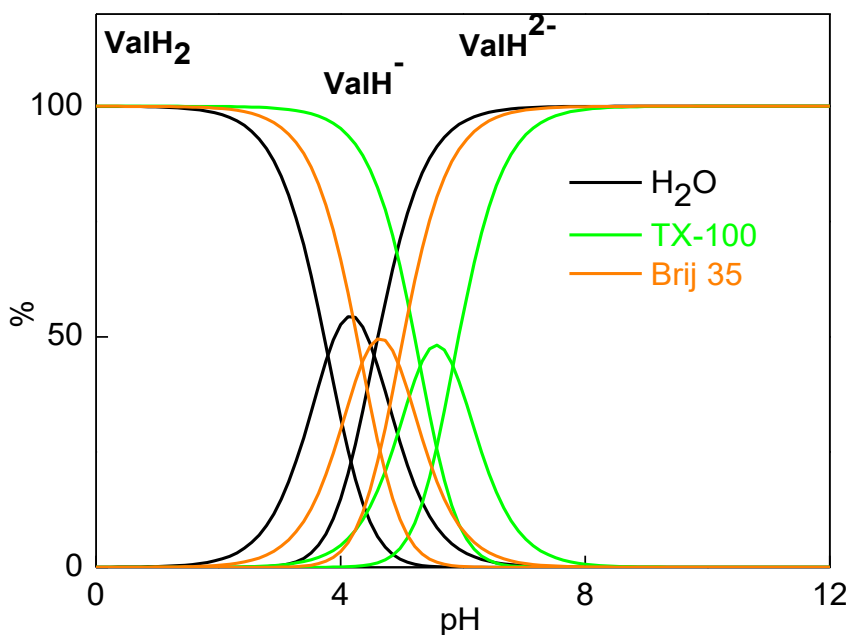


**Slika 21.** Raspodela ravnotežnih oblika losartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M nejonskih surfaktanata, u zavisnosti od pH rastvora



**Slika 22.** Raspodela ravnotežnih oblika valsartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M jonskih surfaktanata, u zavisnosti od pH rastvora





**Slika 23.** Raspodela ravnotežnih oblika valsartana bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M nejonskih surfaktanata, u zavisnosti od pH rastvora

Za razliku od negativno naelektrisanih SDS micela, CTAB micela pozitivno naelektrisane površine ostvaruju suprotan efekat na pomeranje protolitičkih ravnoteža ispitanih jedinjenja. Vrednosti  $pK_a^{app}$  određene u prisustvu micela katjonskog surfaktanta, ukazuju na smanjenje u odnosu na vodeni rastvor. Pozitivno naelektrisana površina CTAB micela izaziva povećanje jonizacije karboksilne grupe ( $\Delta pK_a^{app} = -0,50$ ) i azota tetrazola (do  $\Delta pK_a^{app} = -1,44$ ), kao i smanjenje jonizacije azota imidazola (do  $\Delta pK_a^{app} = -1,31$ ). Uočena pomeranja takođe ukazuju da elektrostatičke sile preovlađuju u interakciji sa jonizovanim grupama. Pretpostavka je da pozitivno naelektrisana površina stabilizuje negativno naelektrisan karboksilatni anjon i deprotonovan tetrazol. Sa druge strane, sile odbijanja otežavaju protonovanje imidazolskog azota što izaziva smanjenje  $\Delta pK_a^{app}$  vrednosti i njegove baznosti.

Micela nejonskih surfaktanata nemaju naelektrisanje i *counter* jone u površinskom sloju, koji formiraju navoji hidratisanih polietilenoksidnih lanaca<sup>86</sup>. Iako nisu naelektrisane na površini, ovakve micela stabilizovane su vodoničnim vezama i dipol interakcijama koje preovlađuju u hidratisanom palisadnom sloju na njihovoj hidrofilnoj površini<sup>172</sup>. Može se očekivati da se polarni delovi molekula lekova, kao i proton donorske ili akceptorske grupe, dominantno zadržavaju u hidrofilnom palisadnom sloju<sup>173</sup>. Oba nejonska surfaktanta formiraju neutralne micela sfernog oblika. Međutim, zbog razlike u strukturi i broju hidrofilnih oksietilenskih jedinica mogu se javiti razlike u micelarnim osobinama i interakcijama sa istim lekom<sup>174</sup>. Pomeranje  $pK_a^{app}$  vrednosti od  $-0,86$  (imidazol losartana) u prisustvu Brij 35, do  $+1,30$  (karboksilna grupa valsartana) u prisustvu TX-100, može se objasniti vodoničnim vezama i jonskim interakcijama u palisadnom sloju nejonskih micela. Kislost karboksilne grupe i tetrazolskog prstena valsartana, kao i tetrazolskog prstena losartana, smanjena je u prisustvu micela oba nejonska surfaktanta. Verovatno je u procesu solubilizacije dominantno zastupljeno formiranje vodoničnih veza sa polarizovanim atomima kiseonika u hidratisanom sloju što otežava deprotonovanje kiselih grupa i pomera ravnotežu u smeru molekulskog oblika. Baznost imidazolskog azota losartana povećana je u prisustvu TX-100 ( $\Delta pK_a^{app} = +0,39$ ), a smanjena u prisustvu Brij 35 micela ( $\Delta pK_a^{app} = -0,86$ ). Moguće je da različit efekat na jonizaciju baznog centra

predstavlja posledicu razlike u polarnosti palisadnog sloja koja je izraženija kod Brij 35 micela i gde se proces solvatacije odvija brže u odnosu na TX-100 micela, što može da utiče i na orijentaciju molekula u ovom sloju.

Sva dobijena pomeranja  $pK_a^{app}$  vrednosti ukazuju da se interakcije odvijaju dominantno na površini micela, gde se jonizujuće grupe ispitanih sartana uključuju u elektrostatičke efekte i vodonične veze, čime se omogućava solubilizacija jedinjenja slabo rastvorljivih u vodi.

#### **4.1.3. Procena uticaja micela na raspodelu ravnotežnih oblika irbesartana, losartana i valsartana na biofarmaceutski značajnim pH vrednostima**

Na osnovu pomeranja protolitičkih ravnoteža može se zaključiti da surfaktanti značajno utiču na raspodelu ravnotežnih oblika ispitanih sartana u oblasti pH od 2 do 7. Ovom intervalu pripadaju i biofarmaceutski značajne pH vrednosti što može ukazati i na značajnu promenu raspodele u fiziološkim uslovima usled interakcija sa biomolekulima različitog naelektrisanja i polarnosti. U **Tabeli 6** prikazan je uticaj surfaktanata na raspodelu ravnotežnih oblika sartana pri pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja (1,2 - želudac; 4,5 – proksimalni deo tankog creva; 6,8 – intestinalni fluid; 7,4 – krvna plazma).

Uticaj micela je najizraženiji na pH 4,5, vrednosti u proksimalnom delu tankog creva gde su prisutni mnogi naelektrisani i polarni biomolekuli i gde se apsorbuje najveći broj lekova koji se primenjuju oralno. Poznato je da nejonizovani oblici lekova, veće lipofilnosti od jonizovanih, lakše prolaze kroz biološke membrane usled lipidne strukture membrane. Ponašanje sartana uočeno u prisustvu različito naelektrisanih micela na pH 4,5 može se komentarisati u kontekstu uticaja na intestinalnu apsorpciju i oralnu bioraspoloživost. Prisustvo anjonskih SDS micela pomera ravnotežu u smeru stvaranja katjonske forme irbesartana, čiji se sadržaj povećava za 81%, a sadržaj molekulske i anjonske forme smanjuje za 40% u odnosu na "čisto" vodeni rastvor. Micele katjonskog surfaktanta CTAB pomeraju protolitičku ravnotežu irbesartana u suprotnom smeru u odnosu na SDS jer se sadržaj anjonske forme povećava za 54%. Ovakav rezultat ukazuje na moguće povećanje udela jonizovanih formi irbesartana u prisustvu pozitivno ili negativno naelektrisanih biomolekula prisutnih u tankom crevu. Kako jonizovane forme lekova teže prolaze kroz biomembrane, može se pretpostaviti da će interakcije irbesartana sa jonizovanim biomolekulima u tankom crevu potencijalno dovesti do smanjene apsorpcije i oralne bioraspoloživosti. Sličan uticaj jonskih micela može se uočiti i kod losartana gde SDS takođe favorizuje protonovanje imidazolskog azota (+57%), a CTAB doprinosi skoro potpunom deprotonovanju tetrazola (+51%). Izraženije pomeranje u smeru stvaranja katjonske forme irbesartana u odnosu na losartan pod uticajem anjonskih micela na pH 4,5 verovatno je posledica manje elektronske gustine na azotu imidazola koju smanjuje atom hlora elektron privlačećim efektom. Može se uočiti da SDS smanjuje jonizaciju valsartana pomerajući ravnotežu u smeru molekuskog oblika (+63%), dok CTAB povećava jonizaciju tetrazola, povećanjem dianjonske forme za 39%. Na taj način, prisustvo pozitivno naelektrisanih biomolekula može smanjiti sadržaj nejonizovanih formi valsartana, koje se mogu lakše apsorbovati, dok bi negativno naelektrisani biomolekuli doprinosili povećanju njihovog sadržaja.

Nejonski surfaktanti povećavaju sadržaj molekulske forme losartana, molekulske forme valsartana i smanjuju procenat anjonske forme losartana i dianjonske forme valsartana, ravnotežnih formi koje nastaju deprotonovanjem tetrazola. Na pH 4,5 sadržaj molekuskih formi valsartana i losartana se povećava pod uticajem micela nejonskih surfaktanata. Ovo ukazuje da bi interakcije valsartana i losartana sa nanaelektrisanim ali polarnim biomolekulima mogle doprineti porastu apsorpcije i bioraspoloživosti ovih lekova.

**Tabela 6.** Procenat ravnotežnih oblika irbesartana, losartana i valsartana na pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja, bez i u prisustvu  $10^{-2}$  M surfaktanata (SDS, CTAB, TX-100 i Brij 35). (K, katjonska forma; A, anjonska forma; M, molekulska forma; MA, monoanjonska forma; DA, dianjonska forma)

		pH 1,2			pH 4,5			pH 6,8			pH 7,4		
		K	M	A	K	M	A	K	M	A	K	M	A
<b>Irbesartan</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	0	0	11	47	42	0	1	99	0	0	100
	<b>SDS</b>	100	0	0	92	7	0	1	15	84	0	4	96
	<b>CTAB</b>	99	1	0	0	4	96	0	0	100	0	0	100
<b>Losartan</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	0	0	6	48	45	0	1	99	0	0	100
	<b>SDS</b>	100	0	0	63	36	1	0	14	86	0	4	96
	<b>CTAB</b>	85	15	0	0	4	96	0	0	100	0	0	100
	<b>TX-100</b>	100	0	0	11	77	12	0	3	97	0	1	99
	<b>Brij 35</b>	94	6	0	1	62	37	0	1	99	0	0	100
		M	MA	DA	M	MA	DA	M	MA	DA	M	MA	DA
<b>Valsartan</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	100	0	0	9	48	43	0	1	99	0	0	100
	<b>SDS</b>	100	0	0	72	23	5	0	2	98	0	1	99
	<b>CTAB</b>	99	1	0	1	17	82	0	0	100	0	0	100
	<b>TX-100</b>	100	0	0	86	14	1	0	10	90	0	3	97
	<b>Brij 35</b>	100	0	0	34	48	18	0	1	99	0	0	100

## 4.2. Teorijska studija jonizacije irbesartana, losartana i valsartana i interakcije ravnotežnih oblika sa micelama

Iako ispitivani sartani imaju veoma sličnu hemijsku strukturu, ovi lekovi mogu ispoljiti razlike u farmakološkom profilu<sup>175</sup>. Jedan od mogućih razloga koji bi trebalo uzeti u obzir je da su osobine jonizovanih ravnotežnih oblika sartana u vodenom rastvoru različite od osobina pri fiziološkim uslovima. Pored toga, kada su u pitanju amfoliti, očekuje se da je intrinzička rastvorljivost nejonizovanog, molekulskog oblika veća u poređenju sa odgovarajućim cviterjonskim oblikom, iako se ne može definisati generalno pravilo. U zavisnosti od konformacije molekula, usled intramolekulskih efekata, elektrostatičkih veza i delokalizacije naelektrisanja, lipofilnost cviterjonskih oblika može se povećati<sup>176</sup>. Treba istaći i da u dosadašnjim studijama o interakcijama sartana sa AT<sub>1</sub> receptorima nisu uzete u obzir bilo kakve razlike između amfolita i dikiselina<sup>42,44,46</sup>.

Glavni cilj teorijske studije je sticanje boljeg uvida u redosled jonizacije i tipove interakcija između ravnotežnih oblika sartana i molekula različite polarnosti i naelektrisanja prisutnih u rastvoru. U eksperimentalnoj studiji ove doktorske disertacije ispitana je jonizacija oba jonizujuća centra sartana čime je omogućen pravi uvid u preklopljene protolitičke ravnoteže i sve potencijalne ravnotežne oblike koji mogu biti prisutni u rastvoru. Potenciometrijski određene vrednosti u ovoj studiji (**Tabela 4**) su u skladu sa literaturnim podacima za tetrazol ( $pK_a$  4,89<sup>177</sup> i  $pK_a$  4,80<sup>178</sup>) i karboksilne kiseline ( $pK_a$  4~5<sup>178</sup>). U slučaju konjugovane kiseline izolovanog imidazola, u literaturi se navodi da je  $pK_a = 7$ <sup>177</sup>. Na osnovu toga se može zaključiti da protolitičke ravnoteže heterocikličnih funkcionalnih grupa mogu biti pomerene u jedinjenjima kompleksne hemijske strukture u odnosu na izolovane heterociklične molekule. U svakom slučaju, potenciometrijske vrednosti određene u ovom radu za imidazolsku grupu irbesartana (3,88) i losartana (3,27) su u saglasnosti sa literaturnim podacima eksperimentalno određenih  $pK_a$  vrednosti supstituisanih imidazola ( $pK_a$  3,10 - 5,78)<sup>168</sup>.

Potenciometrijski određene  $pK_a^w$  vrednosti za "čisto" vodene rastvore u ovom radu upoređene su sa vrednostima predviđenim primenom programa ACD/Labs<sup>179</sup> i MarvinView 16.5.2.0<sup>180</sup> (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Eksperimentalno određene i kompjuterski predviđene  $pK_a$  vrednosti sartana

Sartan	$pK_a^w$	Potenciometrijski podaci	Literaturni podaci <sup>153</sup>	ACD/Labs	MarvinView
<b>Irbesartan</b>	$pK_a$ (imidazol)	3,88	3,69	2,52	4,12
	$pK_a$ (tetrazol)	4,55	4,42	4,24	8,30
<b>Losartan</b>	$pK_a$ (imidazol)	3,27	2,95	4,35	4,12
	$pK_a$ (tetrazol)	4,60	4,25	4,23	8,30
<b>Valsartan</b>	$pK_a$ (karboksilna grupa)	3,79	3,60	3,56	4,37
	$pK_a$ (tetrazol)	4,55	4,70	4,24	8,30

U slučaju podataka dobijenih u programu ACD/LABS može se primetiti dobro slaganje vrednosti koje se odnose na jonizaciju tetrazola svih ispitanih jedinjenja. Isti redosled jonizacije kod jedinjenja valsartan i irbesartan može se utvrditi na osnovu eksperimentalno određenih i vrednosti predviđenih u oba programa. Jedino neslaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti primećeno je za  $pK_a$  vrednost imidazolskog prstena losartana, što može biti posledica specifične orijentacije molekula losartana ili intramolekulskih interakcija u rastvoru, a što se ne može predvideti

optimizacijom u gasnoj fazi. U odnosu na  $pK_a$  vrednosti predviđene programom MarvinView, redosled jonizacije se slaže u slučaju svih ispitanih jedinjenja, ali se može primetiti veća razlika u vrednostima u poređenju sa eksperimentalno određenim konstantama. Sa druge strane, vrednosti potenciometrijski određene u ovom radu se dobro slažu sa literaturnim podacima koji su eksperimentalno određeni pri sličnim eksperimentalnim uslovima<sup>153</sup>.

Energije optimizovanih molekulskih modela (**Tabela 8**) su izračunate primenom *Self-Consistent Field* (SCF) metode, prenošenjem molekula iz gasovite ( $SCF_{Gas}$ ) u vodenu fazu ( $SCF_{PCM}$ ) i izračunate su razlike u energijama ( $\Delta SCF$ )<sup>181</sup>. U **Tabeli 8** se može videti da su  $\Delta SCF$  vrednosti anjonskih oblika losartana i irbesartana veće u poređenju sa odgovarajućim katjonskim oblicima. Isto se može uočiti za vrednost dianjonskog oblika valsartana u poređenju sa odgovarajućim monoanjonskim oblikom. Veće  $\Delta SCF$  vrednosti primećene su kod anjonskih formi deprotonovanog tetrazolskog prstena, što može ukazati da je više energije potrebno za jonizaciju tetrazolske u poređenju sa imidazolskom i karboksilnom grupom. Dobijeni rezultati (**Tabela 8**) mogu ukazati na redosled jonizacije tako što se  $pK_{a2}$  vrednosti mogu povezati sa jonizacijom tetrazolskog prstena u svim ispitanim jedinjenjima.

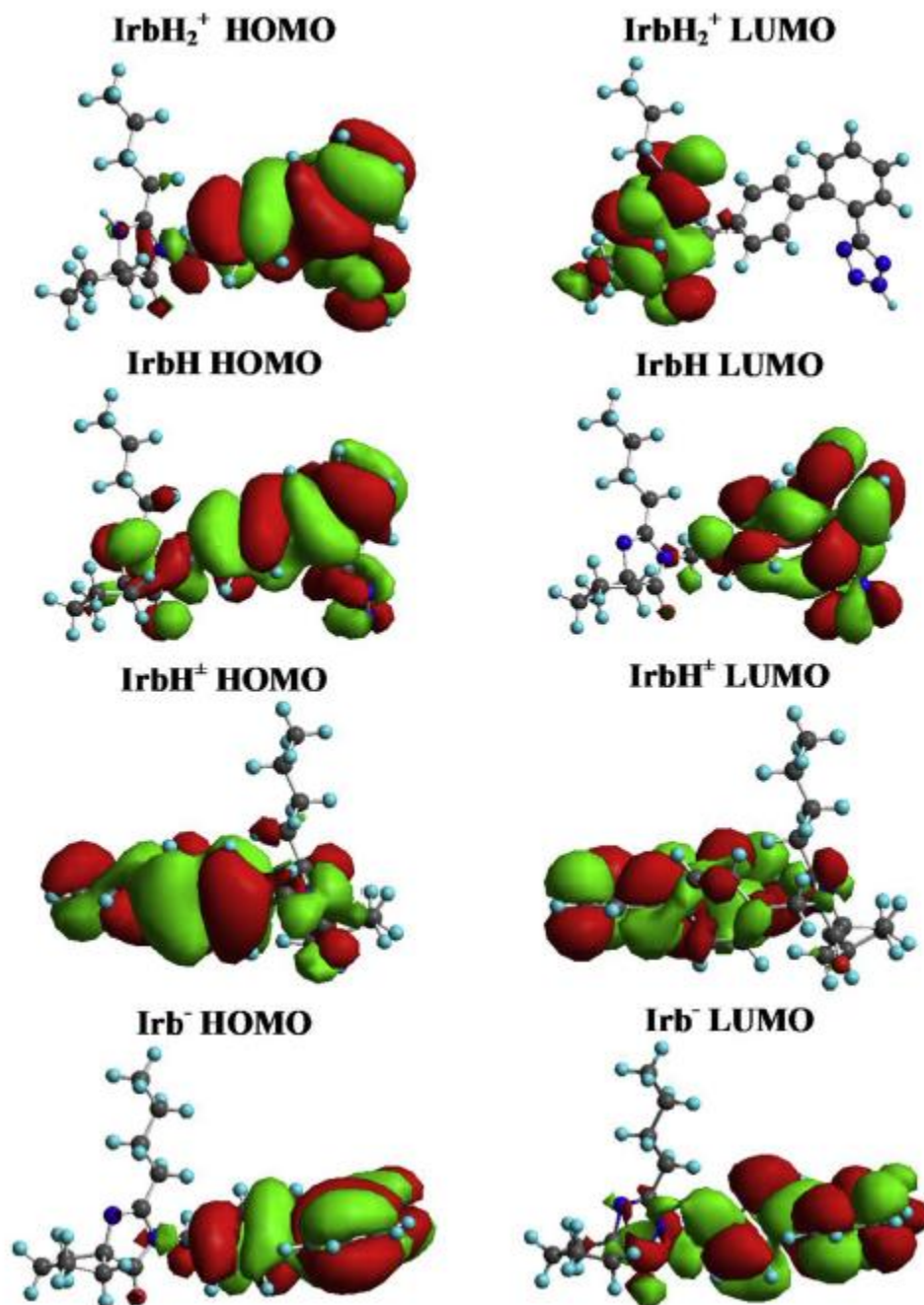
**Tabela 8.** SCF energije sartana (Hartree) izračunatih primenom DFT metode na B3LYP/6-31G (d,p) nivou

Sartan	Ravnotežni oblik	$SCF_{Gas}$	$SCF_{PCM}$	$\Delta SCF$
<b>Irbesartan</b>	IrbH	-1372,729	-1372,749	-0,020
	IrbH <sup>+</sup>	-1372,730	-1372,727	+0,003
	Irb <sup>-</sup>	-1372,199	-1372,289	-0,090
	IrbH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-1373,114	-1373,195	-0,081
<b>Losartan</b>	LosH	-1715,637	-1715,656	-0,019
	LosH <sup>+</sup>	-1715,636	-1715,642	-0,006
	Los <sup>-</sup>	-1715,112	-1715,192	-0,080
	LosH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-1716,021	-1716,092	-0,071
<b>Valsartan</b>	ValH <sub>2</sub>	-1430,913	-1430,936	-0,023
	VaH <sup>-</sup>	-1430,377	-1430,468	-0,091
	Val <sup>2-</sup>	-1429,783	-1430,007	-0,224

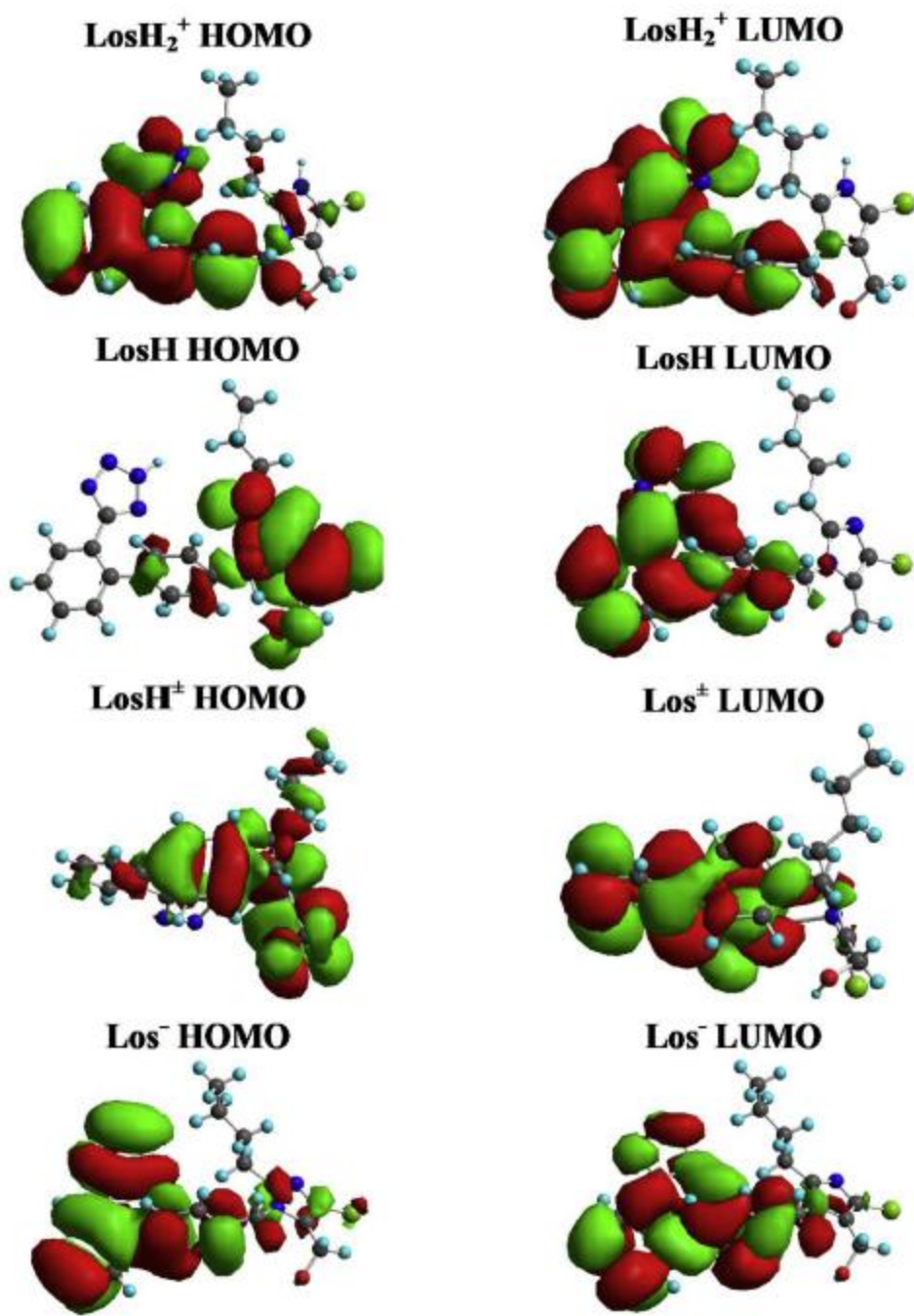
Na osnovu razlika u vrednostima molekulskih parametara dobijenih za svaki ispitani sartan i svaki njihov ravnotežni oblik, izabrana je grupa značajnih elektronskih i geometrijskih parametara ( $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ , *Connolly Accesible Area* (CAA), *Connolly Solvent Excluded Volume* (SEV)) kojima se opisuje intermolekulskih interakcija ravnotežnih oblika u rastvoru<sup>163,182,183</sup>.

Vrednostima i raspodelom energija molekulskih orbitala ( $E_{HOMO}$  i  $E_{LUMO}$ ) može se opisati profil reaktivnosti i stabilnosti ispitanih ravnotežnih oblika. Energije  $E_{HOMO}$  i  $E_{LUMO}$  svih optimizovanih struktura izračunate su primenom PCM metode i odgovarajuće molekulske orbitale su prikazane na **Slikama 24 - 26**. Niže vrednosti  $E_{LUMO}$  ukazuju na veći afinitet jedinjenja za prihvatanje elektrona, dok više vrednosti  $E_{HOMO}$  ukazuju na viši afinitet jedinjenja da otpusti elektrone, i obrnuto<sup>163</sup>. U slučaju anjonskih oblika irbesartana i losartana (**Slike 24 - 25**) HOMO energija je uglavnom lokalizovana na delu molekula koji obuhvata bifenilnu i tetrazolsku grupu, za razliku od HOMO energije negativno naelektrisanih oblika valsartana koja je lokalizovana oko karboksilne grupe. Različite lokalizacija HOMO energije potvrđuje da je karboksilna grupa kiselija od tetrazolske

što može ukazati na redosled jonizacije valsartana, gde se  $pK_{a1}$  može dodeliti karboksilnoj, a  $pK_{a2}$  vrednost tetrazolskoj grupi.

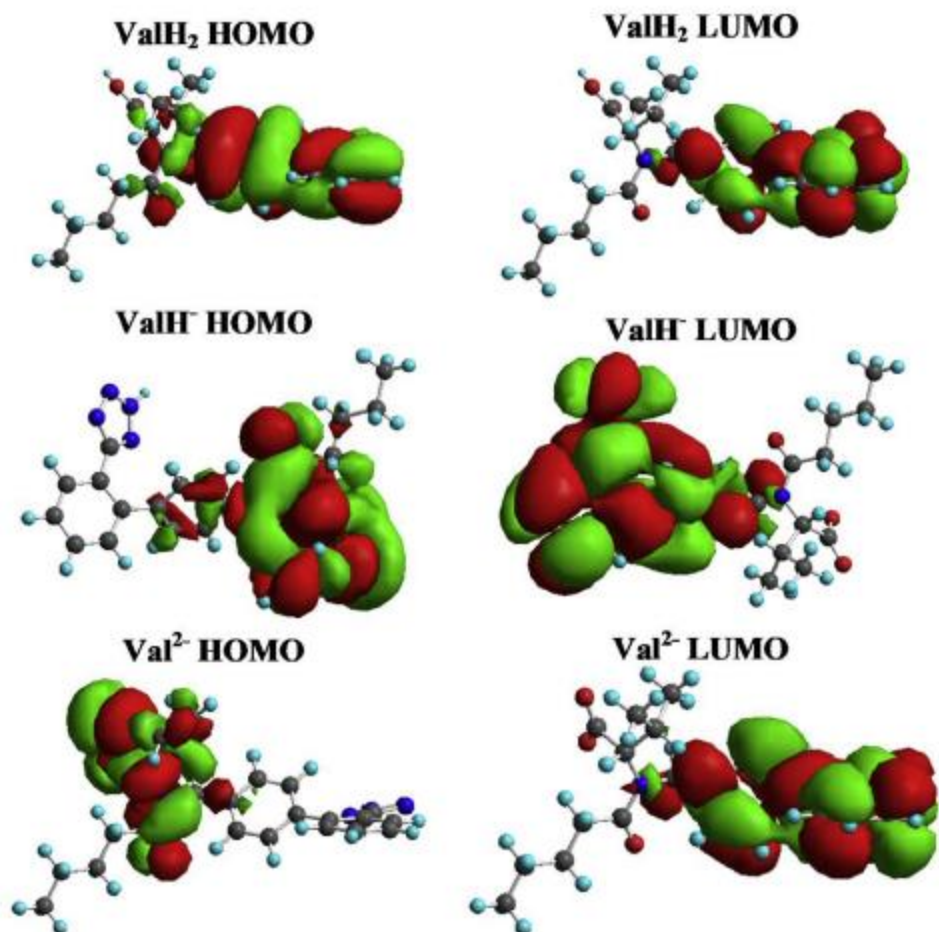


**Slika 24.** Prikaz HOMO i LUMO molekulskih orbitala ravnotežnih oblika irbesartana



**Slika 25.** Prikaz HOMO i LUMO molekularskih orbitala ravnotežnih oblika losartana





**Slika 26.** Prikaz HOMO i LUMO molekularskih orbitala ravnotežnih oblika valsartana



**Tabela 9.** Vrednosti energija (Hartree) i deskriptora (CAA, SEV) koji su određeni primenom DFT metode na B3LYP/6-31G (d,p) nivou

Sartan	Ravnotežni oblik	$E_{\text{HOMO}}$	$E_{\text{LUMO}}$	$\mu$	$\chi$	$\eta$	s	$\omega$	CAA	SEV
Irbesartan	IrbH	-0,2353	-0,0479	-0,1416	0,1416	0,0937	0,0468	0,0009	652,177	362,023
	IrbH <sup>+</sup>	-0,2399	-0,0499	-0,1449	0,1449	0,0950	0,0475	0,0010	584,210	379,623
	Irb <sup>-</sup>	-0,2144	-0,0375	-0,1259	0,1259	0,0885	0,0442	0,0007	646,680	360,661
	IrbH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-0,2424	-0,0765	-0,1595	0,1595	0,0829	0,0415	0,0011	653,639	362,436
Losartan	LosH	-0,2231	-0,0490	-0,1361	0,1361	0,0871	0,0435	0,0008	584,497	335,572
	LosH <sup>+</sup>	-0,2285	-0,0449	-0,1367	0,1367	0,0918	0,0459	0,0009	561,425	343,867
	Los <sup>-</sup>	-0,2129	-0,0306	-0,1218	0,1218	0,0911	0,0456	0,0007	567,710	339,379
	LosH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-0,2428	-0,0508	-0,1468	0,1468	0,0960	0,0480	0,0010	572,119	340,653
Valsartan	ValH <sub>2</sub>	-0,3622	-0,0934	-0,2278	0,2278	0,1344	0,0672	0,0035	638,631	367,896
	VaH <sup>-</sup>	-0,3437	-0,0765	-0,2101	0,2101	0,1336	0,0668	0,0029	636,440	366,654
	Val <sup>2-</sup>	-0,3410	-0,0775	-0,2092	0,2092	0,1317	0,0659	0,0029	631,608	364,996

Niže  $E_{\text{HOMO}}$  i niže  $E_{\text{LUMO}}$  vrednosti primećene su za valsartan u poređenju sa losartanom i irbesartanom, kao i veće razlike u vrednostima energija između pojedinačnih ravnotežnih oblika irbesartana i losartana (**Tabela 9**). Ovo poređenje može ukazati na veću jonizacionu stabilnost valsartana što je u saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima (**Tabela 5**), jer je kod valsartana najmanje izraženo pomeranje  $pK_a$  vrednosti u prisustvu surfaktanata (-0,50 do +1,30). Na osnovu ovih rezultata može se očekivati da će promene jonizacionog profila u prisustvu naelektrisanih ili polarnih biomolekula biti manje izražene kod valsartana u poređenju sa ostalim ispitanim sartanima.

Redosled jonizacije se može objasniti i na osnovu vrednosti molekulskog deskriptora elektronegativnost ( $\chi$ ), koja se definiše kao sposobnost atoma u molekulu da privuče elektrone i izračunava se na osnovu  $E_{\text{HOMO}}$  i  $E_{\text{LUMO}}$  vrednosti<sup>166,184</sup>. Veće vrednosti ovog parametra odgovaraju molekulima koji se mogu opisati kao jake Lewis-ove kiseline, jer imaju veći afinitet prema deprotonovanju (**Tabela 9**). Među izračunatim  $\chi$  vrednostima ispitanih sartana, najveća elektronegativnosti su uočene kod katjonskih oblika irbesartana i losartana, kao i kod molekulskog oblika valsartana. Treba istaći da svi ovi ravnotežni oblici predstavljaju potpuno protonovane oblike ispitanih sartana (**Slika 15**). Sa druge strane, najniže vrednosti ovog parametra odgovaraju anjonskim oblicima irbesartana i losartana, kao i dianjonskom obliku valsartana, kao potpuno deprotonovanim ravnotežnim oblicima. Iz **Tabele 9** se može uočiti i da cviterjonski oblici amfolita imaju nešto veće vrednosti  $\chi$  u poređenju sa odgovarajućim molekulskim oblicima.

Molekulski deskriptor *Connolly Accesible Area* (CAA), definiše se kao površina koju formira rastvarač, a koja utiče na hidrofobne interakcije molekula<sup>183</sup>. Pripada grupi sternih deskriptora i opisuje fizičke osobine molekula koje nastaju kao posledica interakcije molekula sa svojim okruženjem. Vrednostima ovog deskriptora može se opisati način ostvarivanja interakcija između ravnotežnih formi lekova koji sadrži jonizacione centre i micela. Zapravo, ovaj deskriptor se može primeniti za predviđanje da li će se ravnotežni oblik lakše inkorporirati u lipofilnu unutrašnjost micela ili će lakše ostvariti interakcije sa polarnom ili naelektrisanom površinom micela. U eksperimentalnoj studiji ove disertacije utvrđeno je da micela različitog naelektrisanja utiču na pomeranje protolitičkih ravnoteža ispitanih sartana. Uticaj micela na jonizaciju potvrđuje postojanje interakcija između ispitanih jedinjenja i micela, a priroda pomenutih interakcija se može objasniti na osnovu vrednosti molekulskih parametara izračunatih u teorijskoj studiji. Veće CAA vrednosti katjonskih u odnosu na anjonske forme irbesartana i losartana, kao i monoanjonske u odnosu na dianjonsku formu valsartana (**Tabela 9**), ukazuju da tetrazolski prsten u jonizovanom obliku ispoljava manji afinitet prema lipofilnom okruženju i da je manje verovatno da će ovaj deo molekula sartana penetrirati u hidrofobnu unutrašnjost micela. Na osnovu najnižih CAA, vrednosti koje su uočene kod cviterjonskih formi amfolita, može se pretpostaviti da ova jedinjenja ostvaruju interakcije dominantno sa površinskim slojem micela i da su jonizacioni centri direktno uključeni u njih. U slučaju ispitanih sartana koji predstavljaju amfolite, može se zaključiti da su molekulski oblici lipofilniji u poređenju sa odgovarajućim cviterjonskim oblicima.

Molekulski deskriptor koji pripada sternoj grupi deskriptora, *Connolly Solvent Excluded Volume* (SEV), definiše se kao zapremina prostora iz koje se rastvarač isključuje usled prisustva rastvorenog molekula, odnosno predstavlja rastvaraču nedostupnu zapreminu<sup>182</sup>. 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<sup>183</sup>. Veće vrednosti SEV deskriptora cviterjonskih formi (**Tabela 9**) potvrđuju veći afinitet jonizovanih oblika prema vodi u odnosu na afinitet prema lipofilnoj unutrašnjosti micela, naročito u slučaju irbesartana (kod koga je uočeno najveće pomeranje  $pK_a$  vrednosti u prisustvu micela (**Tabela 5**)). Pored toga, ovi rezultati ne ukazuju na intramolekulske efekte usled kojih bi cviterjonski oblici ispitanih amfolita bili lipofilniji u poređenju sa odgovarajućim molekulskim oblicima. Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da su u vodenim rastvorima molekulski oblici irbesartana i losartana dominantno zastupljeni u odnosu na odgovarajuće cviterjonske oblike.

### 4.3. Ispitivanje uticaja micela nejonskih surfaktanata (TX-100 i Brij 35) na rastvorljivost irbesartana i valsartana na pH 4,5

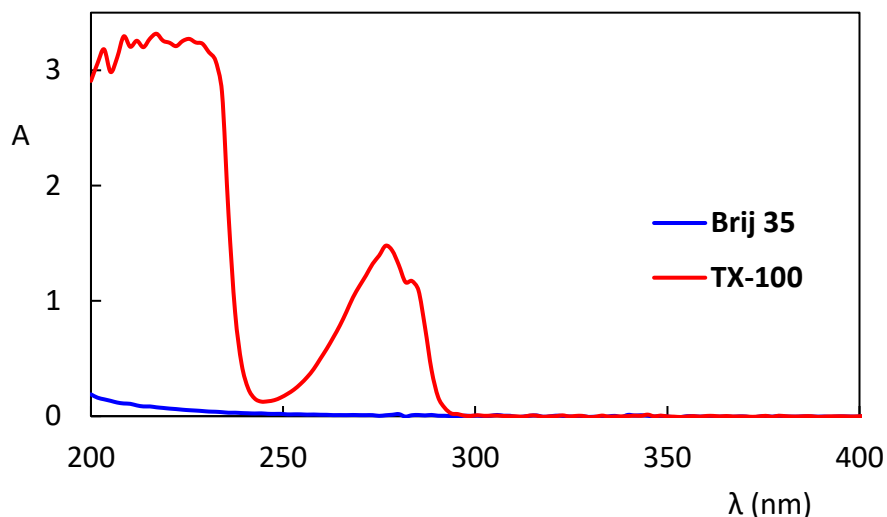
Osim što pripadaju istoj farmakološkoj klasi lekova, irbesartan i losartan su jedinjenja veoma slične hemijske strukture (**Slika 11**). Oba molekula sadrže tetrazolski prsten vezan za bifenilnu grupu, kao i imidazolski prsten sa n-butil grupom u položaju 2. U pogledu jonizacije, oba jedinjenja su amfoliti sa jednim kiselim centrom (tetrazolski prsten) i jednim baznim centrom (imidazolski azot). Jedina razlika može se uočiti na imidazolskom delu strukture, gde losartan sadrži hlor i sekundarnu alkoholnu grupu, dok irbesartan sadrži spirociklopentil i karbonilnu grupu. U prethodnoj studiji uticaja micelarnih rastvora surfaktanata na jonizaciju sartana potencijometrijski je ispitano pomeranje protolitičkih ravnoteža losartana u prisustvu micela nejonskih surfaktanata TX-100 i Brij 35.

Utvrđeno je da micelle nejonskih surfaktanata značajno utiču na protolitičke ravnoteže losartana ( $\Delta pK_a^{app}$  od -0,86 do +0,69; **Tabela 5**), pri čemu je uticaj na raspodelu ravnotežnih oblika najizraženiji na pH 4,5 (**Tabela 6**). Nije bilo moguće proceniti uticaj na jonizaciju irbesartana jer je rastvorljivost u micelarnim rastvorima nejonskih surfaktanata bila manja od koncentracije potrebne za potencijometrijsko određivanje ( $5 \times 10^{-4}$  M). Da bi se objasnile razlike između ova dva strukturno slična jedinjenja u interakcijama sa nejonskim micelama, rastvorljivost irbesartana i losartana je određena bez i u prisustvu  $10^{-3}$  M surfaktanata TX-100 i Brij 35 na pH 4,5 (**Tabela 10**).

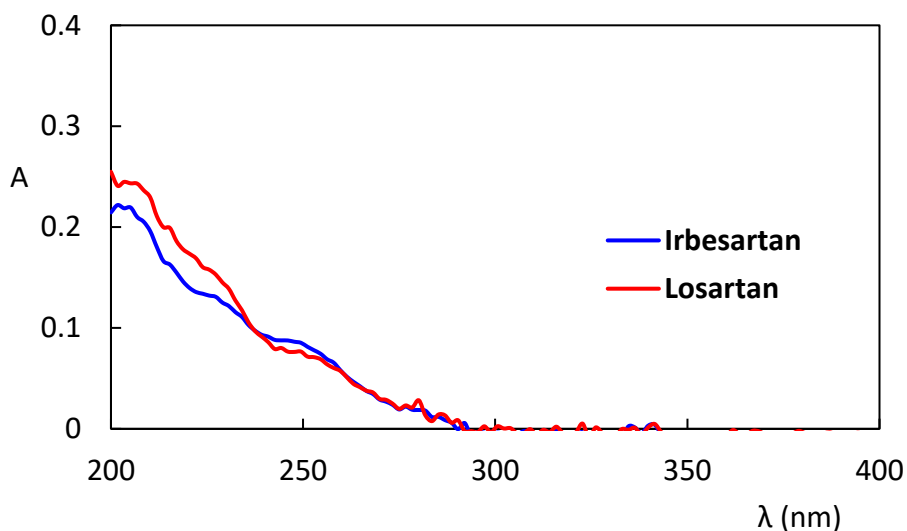
**Tabela 10.** Rastvorljivost irbesartana i losartana (M) na pH 4,5 određena bez i u prisustvu  $10^{-3}$  M nejonskih surfaktanta (Brij 35 i TX-100) na 25 °C

Sartan	Bez surfaktanata	Brij 35	TX-100
Irbesartan	$5,2 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Losartan	$6,4 \times 10^{-6}$	$>5 \times 10^{-4}$	$>5 \times 10^{-4}$

Rastvorljivost je određena spektrofotometrijski postupkom opisanom u Eksperimentalnom delu. ApSORPCIONI spektri  $10^{-3}$  M rastvora Brij 35 i TX-100, kao i  $5 \times 10^{-6}$  M rastvora irbesartana i losartana, pripremljeni u acetatnom puferu na pH 4,5 prikazani su na **Slikama 27 - 28**. Iz **Tabele 10** se vidi da je u rastvoru bez surfaktanata rastvorljivost oba jedinjenja istog reda veličine. Međutim, značajne razlike u rastvorljivosti mogu se primetiti u vrednostima određenim u micelarnim rastvorima surfaktanata. Solubilizirajućim efektom, nejonske micelle su doprinele značajnom porastu rastvorljivosti losartana koja je povećana više od 100 puta. Sa druge strane, rastvorljivost irbesartana u nejonskim micelama povećana je samo oko 2 puta. Kao što je već napomenuto, nejonske micelle nisu naelektrisane, ali u hidrofилnom palisadnom sloju sadrže polarne atome kiseonika, gde polarne grupe sartana mogu učestvovati u vodoničnim vezama ili dipol interakcijama.



**Slika 27.** Apsorpcioni spektri  $10^{-3}$  M Brij 35 i TX-100 pripremljeni u acetatnom puferu pH 4,5



**Slika 28.** Apsorpcioni spektri  $5 \times 10^{-6}$  M rastvora irbesartana i losartana pripremljeni u acetatnom puferu pH 4,5

Na osnovu povećanja rastvorljivosti u prisustvu surfaktanta može se zaključiti da jedinjenje ostvaruje interakcije sa micelama, a o tipu interakcija može se razmatrati na osnovu uticaja micela na protolitičke ravnoteže. Pomeranje  $pK_a$  vrednosti navodi na zaključak da se jonizacioni centri direktno uključuju u interakciju sa micelama, što doprinosi solubilizaciji jedinjenja u rastvorima surfaktanata. Različita rastvorljivost irbesartana i losartana u rastvorima nejonskih micela može ukazati da su za interakcije sartana sa nenaelektrisanim ali polarnim molekulima odgovorni različiti supstituenti na imidazolskom delu strukture. Moguće je da spirociklopentil grupa u strukturi irbesartana doprinosi većoj hidrofobnosti i takvoj orijentaciji molekula u rastvoru koja otežava interakciju jonizacionih centara sa nejonskim micelama.

Rezultati teorijske studije ove disertacije, takođe ukazuju na veću hidrofobnost irbesartana u odnosu na losartan. Kao što je već rečeno, na osnovu vrednosti ovog deskriptora može se predvideti hidrofobna površina molekula koja je dostupna za interakcije sa lipofilnom unutrašnjošću micela. Na

osnovu većih CAA vrednosti ravnotežnih oblika irbesartana u odnosu na losartan u **Tabeli 9** moglo bi se pretpostaviti da bi irbesartan imao veći afinitet da se inkorporira u unutrašnjost nejonskih micela, dok bi se losartan predominantno zadržao u površinskom, palisadnom sloju. Kako je eksperimentalnim određivanjem utvrđen mali uticaj nejonskih micela na rastvorljivost irbesartana, može se zaključiti da irbesartan ne ostvaruje interakcije sa TX-100 i Brij 35 micelama.

## **5. ZAKLJUČAK**

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je uticaj micela različito naelektrisanih surfaktanata na jonizaciju sartana i pokazalo se da micela pomeraju  $pK_a$  vrednosti irbesartana, losartana i valsartana. Na osnovu toga se može pretpostaviti da male promene u okruženju mogu značajno uticati na pomeranje protolitičkih ravnoteža ispitanih sartana i u fiziološkim uslovima. Smanjenje jonizacije kiselih grupa i povećanje jonizacije baznih grupa u prisustvu anjonskih SDS micela, kao i suprotan efekat na jonizaciju u prisustvu katjonskih CTAB micela, ukazuju da u interakcijama između jonizujućih grupa ispitanih sartana i naelektrisane površine micela preovlađuju elektrostatički efekti. Na osnovu pomeranja protolitičkih ravnoteža u prisustvu nejonskih micela, može se pretpostaviti da se jonizujuće grupe ispitanih sartana uključuju u dipol interakcije i formiranje vodoničnih veza, u palisadnom sloju nejonskih micela. Agregati surfaktanata ispoljavaju osnovne strukturne i funkcionalne osobine biomembrana, tako da promene u jonizaciji sartana uočene u ovoj studiji mogu ukazati na specifične interakcije sa biološkim membranama i lokalizaciju u njima. Sartani su lekovi za oralnu primenu koji moraju proći kroz mnoge membrane dok ne stignu do ciljnog mesta dejstva. U skladu sa tim, rezultati ove disertacije mogu pomoći u određivanju forme leka koja ostvaruje interakciju sa transmembranskim domenom  $AT_1$  receptora. Pored toga, praktične  $pK_a$  vrednosti ( $pK_a^*$ ), određene u smešama metanol – voda, imaju analitički značaj i mogu se primeniti u hromatografskim analizama u kojima se ispitani sartani ispituju primenom mobilne faze koja sadrži metanol kao organski modifikator.

Potenciometrijski određene  $pK_a$  vrednosti irbesartana, losartana i valsartana pripisane su odgovarajućim jonizacionim grupama na osnovu rezultata teorijske DFT studije. Vrednosti molekulskih deskriptora potvrdile su pretpostavku da se interakcije sartana sa micelama uglavnom odvijaju na površini micela, kao i da jonizovane forme sartana ispoljavaju manji afinitet za inkorporiranje u unutrašnjost micela. Rezultati dobijeni u teorijskoj studiji ukazuju da losartan i irbesartan (koji pripadaju amfolitima), ostvaruju snažnije interakcije sa micelama u poređenju sa valsartanom (diprotična kiselina). Vrednosti molekulskih deskriptora pokazuju da su molekulske forme ispitanih amfolita lipofilnije u poređenju sa odgovarajućim cviterjonskim formama. Rezultati ove disertacije su naročito značajni jer još uvek nije precizno definisano da li sartani ostvaruju interakciju sa površinom fosfolipidnih membrana ili se vezuju za  $AT_1$  receptore nakon insertovanja i difuzije kroz membranski dvosloj. Definisanje jonizacije sartana i poređenje razlika između njihovih ravnotežnih oblika može pomoći u utvrđivanju forme leka koja doprinosi većoj bioraspodivnosti, kao i obezbediti preciznije objašnjenje mehanizma interakcije sartana sa ciljnim mestom dejstva.

Ispitivanjem rastvorljivosti utvrđeno je da nema značajnih razlika u rastvorljivosti losartana i irbesartana u "čisto" vodenoj sredini, bez prisustva surfaktanata. Značajan porast rastvorljivosti losartana (više od 100 puta) uočen je u  $10^{-3}$  M rastvoru nejonskih surfaktanata Brij 35 i TX-100. Sa druge strane, nejonski surfaktanti nisu ispoljili značajan solubilizirajući efekat na irbesartan (rastvorljivost povećana 2 puta). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da hidrofobni imidazolski supstituent irbesartana doprinosi izostanku interakcija sa nejonskim micelama.

## **6. LITERATURA**



1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. 1 izdanje. Beograd: *Data status*; **2005**. 290-292
2. Kažić T. Farmakologija Klinička farmakologija. 5 izdanje. Beograd: *Integra*; **2008**. 225-228
3. Ugrešić N, Petrović RS. Farmakoterapija za farmaceute. 2 izdanje. Beograd: *Farmaceutski fakultet*; **2014**, 19-22
4. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW. Foye's principles of medicinal chemistry. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia PA: *Lippincott Williams & Wilkins*; **2013**
5. Beale JM, Block JH, Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: *Lippincott Williams & Wilkins*; **2004**.
6. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na renin-angiotenzin-aldosteronski sustav. *Medicus*; **2010**.19(2):139-146
7. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje arterijske hipertenzije. Beograd: *Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije*; **2012**. 25
8. Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system grows with endless possibilities: AT<sub>1</sub> receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cell Signal*; **2014**. 26(10):2147-2160
9. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Venderheyden PML, Thomas W. International union of basic and clinical pharmacology XCIX. Angiotensin receptors: Interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli. *Pharmacol Rev*; **2015**. 67(4):754-819
10. Zhuo JL, Ferrao F M, Zheng Y, Li XC. New frontier in intrarenal renin-angiotensin system a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol*; **2013**. 4: 166
11. Ferrão FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World J Nephrol*. **2014**; 3(3):64-76
12. Aulakh K, Sodhi RK, Singh M. An update on non-peptide angiotensin receptor antagonist and related RAAS modulators. *Life Sci*; **2007**. 81(8):615-639
13. Guang C, Philips RD, Jiang B, Milani F. Three key protease-angiotensin I converting enzim (ACE), ACE2 and renin-within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis*; **2012**. 105(6-7): 373-385
14. Wong MKS. Renin-angiotensin system. Wong MKS. Angiotensin converting enzymes. In: Takei Y, Ando H, Tsutsi K, editors. Handbook of hormones.1<sup>st</sup> ed. San Diego, United States: *Academic Press, Elsevier Science Publishing*; **2016**. 253-254, 263-265
15. Xiao CL, Zhang J, Zhuo JL. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney disease. *Pharmacol Res*; **2017**. 125(PtA): 21-38
16. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO. Localisation and function of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors. *Am J Hypertens*; **2000**. 13 (1Pt 2) 31S-38S
17. Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT<sub>1</sub> versus AT<sub>2</sub> receptors. *Kidney Int*; **1998**. 54: S95-S99
18. Aguilera G. Stress, angiotensin and cognate receptors. In: Fink G, editor. Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology.1<sup>st</sup> ed. UK, London: *Academic Press*; **2017**. 243-255
19. Singh KD, Karnik SS. Angiotensin Receptors: Structure, function, signaling and clinical applications. *J Cell Signal*; **2016**.1(2)111
20. Takezako T, Unal H, Karnik SS, Node K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased antagonism. *Pharmacol Res*; **2017**.123:40-50
21. Karni SS, Cherezov V. Structure of the angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell*; **2015**.161(4): 833-844
22. Matavell H, Siragy M. AT<sub>2</sub> receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol*; **2015**. 65(3):226-232
23. Kawai T, Forrester SJ, Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT<sub>1</sub> receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharm Res*; **2017**.125(Pt A): 4-13

24. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT<sub>4</sub> receptor. *Cell Mol Life Sci*; **2004**. 61(21):2728-37.
25. Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario C. M. Role of the vasodilator peptide angiotensin (1–7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag*; **2007**. 3(1):125–137
26. Bhardway G. How the antihypertensive losartan was discovered? *Expert Opin. Drug Discov*; **2006**. 1(6):609-618
27. Duncia VJ, Carini DJ, Andrew T, Johnson AL, Price WA, Wong PC, Wexler RR, Timmermans PBMW. The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med Res Rev*; **1992**.12(2):149-191
28. Wexler RR, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wells GJ, Chiu AT, Pancras C, Wong PC, Timmermans PBMWM. Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists. *Am J Hypertens*; **1992**. 5(12 Pt2): 209S-220S
29. Drapak I, Tsapko T, Perekhoda L, Berezhnyakova N, Kiz O. Historical overview, development and new approaches in design of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptors antagonists' part II. *Int J Res Pharm Sci*; **2017**. 8:4034-45
30. Carini DJ, Christ DD, Duncia JV, Pierce ME. The discovery and development of angiotensin II antagonist. In: Borchardt R, Freidinger RM, Sawyer TK, Smith PL, editors. Integration of pharmaceutical discovery and development: case studies.1<sup>st</sup> ed. New York: *Plenum Press*; **1998**. 11:29-56
31. Timmermans PBMWM. Angiotensin II receptor antagonist: an emerging new class of cardiovascular therapeutics. *Hypertens Res*; **1999**.22(2):147-153
32. Dorwald FZ. Lead optimization for medicinal chemist: pharmacokinetic properties of functional groups and organic compounds. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlag GmbH*; **2012**.543-547
33. Mire DE, Silfani TN, Pugsley MK. A review of the structural and functional features of olmesartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker. *J Cardiovasc Pharmacol*; **2005**. 46(5):585-93
34. Wiene W, Entzeroth M, Van Meel JCA, Stangier J, Busch U, Ebner T, Schmid J, Lehmann H, Matzek K, Kempthorne-Rawson J, Gladigau V, Huel NH. A review on Telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*; **2000**.18(2): 127–154
35. Burnier M. Telmisartan: a different angiotensin II receptor blocker protecting a different population. *J Int Med Res*; **2009**.37(6):1662-79
36. Kurtz TW, Kajiya T. Differential pharmacology, and benefit/risk of azilsartan compared to other sartans. *Vasc Health Risk Manag*; **2012**. 8:133-143
37. Singh KD, Unal H, Desnoyer R, Karnik SS. Divergent spatiotemporal interaction of angiotensin receptor blocking drugs with angiotensin type 1 receptor. *J Chem Inf Model*; **2018**.58(1):182-193.
38. Abraham HMA, White M, White WB. The comparative efficacy, and safety of the angiotensin receptor blockers in the management of hypertension and other cardiovascular diseases. *Drug Saf*; **2015**. 38(1):33-54.
39. Miura S, Karnik SS, Saku K. Angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. *J Renin Angio Aldo S*; **2012**.12(1):1-7
40. Dézsi CA. The different therapeutic choices with ARBs, which one to give? When? Why? *Am J Cardiovasc Drug*; **2016**.16(4):255–266.
41. Kellici T, Tzakos A, Mavromoustakos T. Rational drug design and synthesis of molecules targeting the angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Molecules*; **2015**. 20(3):3868-3867
42. Zoupoulakis P, Daliani I, Zervou M. Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor. *Chem Phys Lipids*; **2003**.125(1):13-25
43. Fotakis C, Megariotis G, Christodouleas D. Comparative study of the AT1 receptor prodrug antagonist candesartan cilexetil with the others on the interactions with membrane bilayers. *BBA – Bioenergetics*; **2012**. 1818(12):3107-3120

44. Fotakis C, Christodouleas D, Zoupoulakis P. Comparative biophysical studies of sartan class drug molecules losartan and candesartan (CV-11974) with membrane bilayers. *J Phys Chem*; **2011**. 115(19): 6180-6192
45. Tzoupis H, Avramopoulos A, Reis H, Leonis G, Durdagi S, Mavromaustakos T, Papadoulos MG. Theoretical studies of interaction in nanomaterials and biological systems. In: Leszczynski J, Puzyn T, editors. Towards efficient designing of safe nanomaterials: Innovative merge of computational approaches and experimental techniques. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge, United Kingdom: *The Royal Society of Chemistry*; **2012**. 148-185
46. Zervou M, Cournia Z, Potamitis C. Insights into the molecular basis of action of the AT<sub>1</sub> antagonist losartan using a combined NMR spectroscopy and computational approach. *BBA-biomembranes*; **2014**. 1838(3):1031-1046
47. Eeman M, Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Environ*; **2010**. 14(4):719-736
48. Lucio M, Lima JLFC, Reis S. Drug-membrane interactions: Significance for medicinal chemistry. *Curr Med Chem*; **2010**. 17:1795-1809
49. Lucio M, Lima JLFC, Reis S. Drug–Membrane Interactions: Molecular Mechanisms Underlying Therapeutic and Toxic Effects of Drugs. In: Pignataro B, editor. Ideas in chemistry and molecular sciences: where chemistry meets life. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlag GmbH*; **2010**. 191-207
50. Pignatelo R, Musumeci T, Basile L, Carbone C, Puglisi G. Biomembrane models and drug-biomembrane interactions studies: involment in drug design and development. *J Pharm Bioallied Sci*; **2011**. 3(1):4-14
51. Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: application in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*; **2009**. 6(5):1264-1276
52. Encyclopædia Britannica [homepage on the internet]. London: Encyclopædia Britannica. ©2020 Encyclopædia Britannica, Inc. [Pristupano marta 2019] Dostupno sa: <https://www.britannica.com/science/membrane-biology#/media/1/374264/45550>
53. Balaz S. Modeling kinetics of subcelular disposition of chemicals. *Chem Rev*; **2009**. 109(5), 1793-1899
54. Escriba PV, Gonsales-Ros JM, Goni FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Magraner LS, Fernandez A. M., Busquets X, Horvath I, Coblijn GB. Membranes: a meeting point for lipid, proteins and therapies. *J Cell Mol Med*; **2008**. 12(3):829-875
55. Thomas G. Medicinal Chemistry: An introduction. 2<sup>nd</sup> ed. New York, United States: *John Wiley & Sons*; **2011**. 208-214
56. Krisztina Takacs-Novak. Physicochemical profiling in drug research and development. In: Mandić Z, editor. Physico-chemical methods in drug discovery and development. 1<sup>st</sup> ed. Zagreb: *IAPC Publishing*; **2012**. 1-59
57. Deleu M, Crowet JM, Nasir MN, Lins L. Complementary biophysical tools to investigate to lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: a review. *Biochim Biophys Acta*; **2014**. 1838(12):3171-3190
58. Esribá PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol Med*; **2006**. 12(1):34-43
59. Seydel JK, Wiese M. Drug membrane interactions analysis, drug distribution, modeling. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlg GmbH*; **2002**. 27-29,141-212,217-285
60. Vauquelin G. On the 'micro'-pharmacodynamic and pharmacokinetic mechanisms that contribute to long-lasting drug action. *Expert Opin Drug Discov*; **2015**. 10(10):1085-98
61. Vauquelin G. Cell membranes... and how long drugs may exert beneficial pharmacological activity in vivo. *Br J Clin Pharmacol*; **2016**. 82(3):673-82
62. Avdeef A. Apsorption and drug development: solubility, permeability and charge state. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersay, United States: *Jonh Wiley & Sons INC*; **2012**
63. Kopeć W, Telenius J, Kandelia H. Molecular dynamics simulations of the interactions of medical plant extracts and drug with lipid bilayer membranes. *FEBS J*; **2013**. 280(12):2785-2805

64. Knobloch J, Suhendo DK, Zieleniecki JL, Shapter JG, Köper I. Membrane-drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi J Biol Sci*; **2015**. 22: 714-718
65. Tsuchiya H, Mizogami M. Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects. *Anesthesiol Res Pract*; **2013**, article ID 297141
66. Sheetz MP, Singer SJ. Biological membranes as bilayers couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**1974**. 71 (11):4457-4461
67. Alves AC, Magarkar A, Horta M, Lima JLFC, Bunker A, Nunes C, Reis S. Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from *in vitro* and *in silico* studies. *Sci Rep*; **2017**. 7(1) article number 6343
68. Schreier S, Malheiros SVP, Paula ED. Surface active drugs: self-association and interactions with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta*; **2000**. 1508:210-234
69. Peck T, Hill S, Williams M. Pharmacology for anaesthesia and intensive care. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge, UK: *Cambridge University Press*; **2008**. 1-8
70. Waterbeemd HVD. Physicochemical approaches to drug absorption. In: Waterbeemd HVD, Testa B, editors. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH, Verlag GmbH*; **2009**. 71-100
71. HVD Waterbeemd. Physicochemical properties in drug profiling. Muresan S, Sadowski J. Properties guiding drug and lead-likeness. In: Mannhold R, editor. Molecular drug properties: Measurements and predictions. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlag GmbH*; **2008**. 25-43,441-445
72. Đurić Z. Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom I deo. 1 izdanje. Zemun: *Nijansa*. **2004**. 21-27
73. El-Kattan, A Varma M. Oral absorption, intestinal metabolism and human Oral Bioavailability. In: Paxton J, editor. Topics on drug metabolism. [e-book]. London, UK: *IntechOpen*. **2012**. [Pristupljeno april 2019].  
Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/oral-absorption-intestinal-metabolism-and-human-oral-bioavailability>
74. Bougoux C, Couvreur P. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: What can we learn from model membranes?. *J Control Release*; **2014**. 190:127-138
75. Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, *Pharm Res*; **2011**. 28(5):962-977
76. Li H, Zhao T, Sun Z. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Rev Anal Chem*; **2017**. 37(1)
77. Le MT, Litzenberger KJ, Prenner EJ. Biomimetic model membrane systems serve as increasingly valuable *in vitro* tools. In: George A, editor. Advances in biomimetics. [e-book]. London, UK: *IntechOpen*. **2011**. [Pristupljeno april 2019]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-biomimetics/biomimetic-model-membrane-systems-serve-as-increasingly-valuable-in-vitro-tools>.
78. Zhao H, Lappalainen P. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol Biol Cell*; **2012**. 23(15):2823-2830
79. Alves AC, Ribeiro D, Nunes C, Reis S. Biophysics in cancer: the relevance of drug membrane interaction studies. *Biochim Biophys Acta*; **2016**. 1858(9):2231-2244
80. Fendler JH. Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry. *Chem Rev*; **1987**. 87(5):877-899
81. 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(21):12516-12521
82. Ghosh D, Chattopadhyay N. Equilibrium and dynamic effects on ligand binding to biomacromolecules and biomimetic model systems. *Int Rev Phys Chem*; **2013**. 32(3):435-466

83. Pereira-Leite C, Carneiro C, Soares JX. Biophysical characterization of the drug membrane interactions: the case of propranolol and acebutolol. *Eur J Pharm Biopharm*; **2013**. 84(1):183-191
84. Enache M, Toader A, Enache MI. Mitoxantrone-surfactant interactions: a physico chemical overview. *Molecules*; **2016**. 21(10): 1356
85. Mahajan S, Mahajan RK. Interactions of phenothiazine drugs with surfactants: detailed physicochemical overview. *Adv in Colloid Interface Sci*; **2013**.199-200:1-14
86. Rangel-Yagui CO, Pessoa JrA, Tavares LC. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharm Sci*; **2005**. 8(2):147-163
87. Tadros TF. Applied Surfactants: Principles and applications. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA; **2005**. 399-432, 433-501
88. Sakamoto K, Lochhead RY, Howard I, Maibach, Yamashita Y. Cosmetic science and technology, Theoretical Principles and Applications. 1<sup>st</sup>ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc. **2017**
89. Kulkarni SV, Shaw C. Essential chemistry for formulators of semisolid and liquid dosages.1<sup>st</sup> ed. San Diego, United States: Academic Press; **2016**. 5-19, 21-28, 29-41
90. Attwood D, Florence AT. Physical Pharmacy, 2<sup>nd</sup> ed. London, UK: Pharmaceutical Press; **2012**. 43-62
91. Mirgorodskaya AB, Yackevich EI, Kudryashova YR. Design of supramolecular biomimetic catalysts of high substrate specificity by noncovalent selfassembly of calix [4] arenes with amphiphilic and polymeric amines. *Colloids Surf B Biointerfaces*; **2014**. 1:497-504
92. Varghese B, Al-Busafi SN, Suliman FO, Al-Kindy SM. Synthesis, spectroscopic characterization and photophysics of a novel environmentally sensitive dye 3-naphthyl -1-phenyl-5-(4-carboxyphenyl)-2-pyrazoline. *J Lumin* ;**2015**. 159:9-16
93. Jaiswal PV, Ijeri VS, Srivastava AK. Effect of surfactants on the dissociation constants of ascorbic and maleic acids. *Colloids Surf B Biointerfaces* ;**2005**. 46:45-51
94. Popović M, Popović G, Agbaba D. The effects of anionic, cationic, and nonionic surfactants on acid-base equilibria of ACE inhibitors. *J Chem Eng Data*; **2013**. 58:2567-2573
95. Popović M, Popović G, Filipić S, Nikolić K, Agbaba 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 Chem Mon*; **2015**. 146:913-921
96. Miller JM, Beig A, Krieg BJ. The solubility epermeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol Pharm*; **2011**. 8:1848-1856
97. Rana S, Bhattacharjee J, Barick KC, Verma G, Hassan PA, Yakhmi JV. Interfacial engineering of nanoparticles for cancer therapeutics. In: Ficai A, Gruemezscail AM, editors. Nanostructures for Cancer Therapy.1<sup>st</sup> ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; **2017**. 177-209
98. Joseph M, Trinh HM, Mitra AK. Peptide and Protein-Based Therapeutic Agents. In: Mitra A, Cholkar K, Mandal A, editors. Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices.1<sup>st</sup> ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; **2017**. 145-167
99. Cairns D, editor. Essentials of Pharmaceutical Chemistry. 4<sup>th</sup> ed. London, UK: Pharmaceutical, Press; **2012**
100. Manallack DT, Prankerd RJ, Nassta GC, Ursu O, Oprea TI, Chalmers DK. A chemogenomic analysis of ionization constants implications for drug discovery. *Chem Med Chem*; **2013**. 8(2):242-255.
101. Manallack DT. The pK<sub>a</sub> distribution of drugs: application to drug discovery. *Perspect Med Chem*; **2007**. 1,25-38
102. Manallack DT, Prankerd RJ, Yuriev E, Oprea I, Chalmers DK. The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chem Soc Rev*; **2013**. 42(2):485-496
103. Manallack DT, Yuriev E, Chalmers D K. The influence and manipulation of acid/base properties in drug discovery. *Drug Discov Today Techol* ;**2018**. 27:41-47
104. Borchardt DT, Kerns E, Lipinski C, Thakker D, Wang B. Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection. *AAPS PharmSci*; **2004**. 401-402

105. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state), *Bentham Science Publishers*; **2001**. 277-351
106. Charifson S, Walters WP. Acid and basic drugs in medicinal chemistry: a perspective, *J Med Chem*; **2014**. 57(23):9701-9717
107. Wang J, Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discov World*; **2004**. 73-86
108. Liu R, editor. Water-insoluble drug formulation. 3<sup>th</sup> ed. Boca Raton, United States: *CRC Press, Taylor & Francis Group*; **2018**. 78-80
109. Reijenga J, Hoof AV, Van Loon A, Teuniseen B. Development of methods for determination of pK<sub>a</sub> values, *Anal Chem Insights*; **2013**. 8,53-71
110. Babic S, Horvat AJM, Mutavžić Pavlović D. Kaštelan-Macan M. Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal Chem*; **2007**. 26 (11): 1043-1061
111. Subirats X, Fuguet E, Roses M, Bosch E, Rafols C. Methods for pK<sub>a</sub> determination: potentiometry, spectrophotometry and capillary electrophoresis. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; **2015**. 1-10
112. Shaleva M, Kenseth J, Lombardo F, Bastin A. Measurements of dissociation constants (pK<sub>a</sub> values) of organic compounds by multiplexed capillary eletrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. *J Pharm Sci* ;**2008**. 97: 2581-2606
113. Dardonville C. Automated techiques in pK<sub>a</sub> determination: low, medium and high- throughput screening methods. *Drug Discov Today Techol*; **2018**. 27:49-57
114. 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
115. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2007**. 59:7,546-567
116. Censi R, Martino PD. Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. *Molecules*; **2015**. 20(10):18759-18776
117. Di L, Fish PV, Mano T. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov Today*; **2011**. 17(9-10):486-495
118. Stegemann S, Leveiler F, Franchi D, Jong HD, Linden H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. *Eur J Pharm Sci*; **2007**. 31(5):249-261
119. Williams HD, Trevaskis NT, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJH. Strategies to adress low drug solubility in discovery and development; **2013**. *Pharmacol Rev*. 65(1):315-499
120. Webster GK. Poorly soluble drugs: dissolutions and drug release. 1<sup>st</sup> ed. Singapore: *Pan Stanford Publishing Pte. Ltd*; **2017**. 1:19-84
121. Kerns EH, Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to Toxicity Optimization. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, United States: *Academic Press, Elsevier*; **2016**. 61-91, 313-324
122. Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Liu L, Porter W, editors. Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice. 1<sup>st</sup> ed. Berlington, United States: *Academic Press, Elsevier*; **2009**. 3
123. Ishikawa M, Hashimoto Y. Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and simmetry. *J Med Chem*; **2011**. 54(6):1539-1554
124. Walker MA. Improvement in aqueous solubility achieved via small molecular changes. *Bioorg Med Chem Lett*; **2017**. 27(23): 5100-5108
125. Hurst S, Loi CM, Brodfuehrer J, El-Kattan A. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*; **2007**. 3(4):469-89.
126. Delinag Z. Understanding physicochemical properties for pharmaceutical product development and manufacturing-dissociation, distribution/partition and solubility. *J Valid Technol*; **2009**. 15:13

127. Sugano K. Biopharmaceutics modeling and simulations theory, practise, methods, applications. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey: *John Wiley & Sons*; **2012**.1-7
128. Alsenz J. The impact of solubility and dissolution on formulation strategy and implication for oral drug disposition. In: Lyubimov AV, editor. Encyclopedia of drug metabolism and interactions, 6-volume set, 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey: *John Wiley & Sons, Inc*, **2012**. Volume III, part VI, ch 16
129. Douroumis D, Fahr A, editors. Drug delivery strategies for poorly soluble drugs.1<sup>st</sup> ed. Chichester, UK: *John Wiley & Sons*; **2013**.
130. Williams RO, Watts BA, Miller AD, editors. Formulating poorly water-soluble drugs.2<sup>nd</sup> ed. New York: *Springer Nature*; **2016**.
131. Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol*; **2008**. 36: 43-48.
132. Byrn SR, Zografu G, Chen S. Solid-state properties of pharmaceutical materials. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey: *John Wiley & Sons* ;**2017**. 26-27, 53-56, 249-256
133. Bhattachar SN, Deschenes LA, Weesley JA. Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug Discov Today*; **2006**.11(21-22):1012-1018
134. Avdeef A. Suggested improvement for measurement of equilibrium solubility - pH of ionizable drugs. *ADMET*; **2015**. 3(2):84-109
135. Tong WT. Practical aspects of solubility determination in pharmaceutical preformulation. In: Augustijns P, Brewster ME, editors. Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceutics. 1<sup>st</sup> ed. New York: *Springer*; **2007**. 137-149
136. Smith TB. Remington education: physical pharmacy.1<sup>st</sup> ed. London, UK: *Pharmaceutical Press*; **2015**. 36
137. Young RJ. Physical properties in drug design. In: Meanwell N, editor. Tactics in contemporary drug design. 1<sup>st</sup> ed. Berlin, Heidelberg: *Springer-Verlag*; **2014**. 1-68
138. Loftsson T. Aqueous solubility and true solutions. *Pharmazie*; **2010**. 65(6):404-407
139. Sugano K, Okazaki A, Sugimoto S. Solubility and dissolution profile assesment in drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet*; **2012**. 22(4):225-254
140. Baka E, Comer JE, Novák KT. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Anal*; **2008**. 46(2):335-341
141. Erić S, Kalinić M, Popović A. Računarski modeli za predviđanje rastvorljivosti lekova, *Arh Farm*; **2010**. 60:373-3900
142. Elder D, Holm R. Aqueous solubility: simple predictive methods (in silico, in vitro and bio-relevant approaches). *Int J Pharmaceut*; **2013**. 453(3):3-11
143. Jouyban A, Fakhree MAA. Experimental and computational methods pertaining to drug solubility, toxicity and drug testing. Acree B, editor. Toxicity and drug testing. [e-book]. London, UK: IntechOpen. **2012**. [Pristupljeno u martu 2019]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/toxicity-and-drug-testing/experimental-and-computational-methods-pertaining-to-drug-solubility>.187-218
144. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous electron gas, *Phys Rev* ;**1964**. 136, B864
145. Koch W, Holthansen MC. A Chemist's guide to density functional theory. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH Verlag GmbH* ;**2001**
146. Parr RG, W. Yang, Density-functional theory of atoms and molecules. 1<sup>st</sup> ed. New York, New York: *Oxford University Press*;**1989**
147. Sholl DS, Steckel JA. Density functional theory: a practical introduction. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey: *John Wiley & Sons*; **2009**
148. Marković S, Marković Z. Molekulsko modeliranje. 1 izdanje. Kragujevac: *Centar za naučno istraživački rad SANU i univerziteta*; **2012**
149. Filipović K. Usporedba DFT metoda za računanje elektrokemijskih parametara ferocenskih derivata [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; **2018**, pristupljeno 05.01.2020.

150. Šakić D. Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka. Zagreb. Sveučilište u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet; **2015**. 30-40
151. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*; **1993**. 98:5648-5652
152. Lee C, Yang W, Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density, *Phys Rev*; **1988**. B 37, 785-789
153. Tosco P, Rolando B, Fruttero R. Physicochemical profiling of sartans: a detailed study of ionization constants and distribution coefficients. *Helv Chim Acta*; **2008**. 91:468-482
154. Čudina O, Brborić J, Janković I, Karljiković-Rajić K, Vladimirov S. Study of valsartan interaction with micelles as a model system for biomembranes. *Colloids Surf B Biointerfaces*; **2008**. 65:80-84
155. Cagigal E, Gonzalez L, Alonso RM, Jimenez RM. pK<sub>a</sub> determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J Pharm Biomed Anal*; **2001**. 26:477-486
156. Abdel-Fattah L, Abdel-Aziz L, Gaied M. Enhanced spectrophotometric determination of Losartan potassium based on its physicochemical interaction with cationic surfactant. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*; **2015**. 136:178-184
157. Irving HM, Miles MG, Pettit LD. A study of some problems in determining the sto- icheiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal Chim Acta*; **1967**. 38:475-488
158. Albert A, Serjeant EP. The determination of ionization constants, 3<sup>rd</sup> ed. London: *Chapman and Hall*; **1984**
159. ChemBioDraw Ultra, Version 13.0. *CambridgeSoft Corporation*; **2012**
160. ChemBio3D Ultra, Version 13.0. *CambridgeSoft Corporation*; **2012**
161. Gaussian 09 (Revision D.01.). Gaussian, Inc, Wallingford; **2013**
162. 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
163. Fleming I. Molecular orbitals and organic chemical reactions. 2<sup>th</sup>ed. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH*; **2009**
164. Iczkowski RP, Margrave JL, Electronegativity. *J Am Chem Soc*; **1961**. 83:3547-3551
165. Parr RG, Szentpaly LV, Liu S. Electrophilicity index, *J Am Chem Soc*; **1999**. 121:1922-1924
166. Filipic S, Nikolic K, Vovk I, Krizman M, Agbaba D. Quantitative structure - mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs mediated CE. *Electrophoresis*; **2013**. 34:471- 482
167. Wrobel R, Chmurzynski L. Potentiometric pK<sub>a</sub> determination of standard substance in binary solvent systems. *Anal Chim Acta*; **2000**. 405(1-2):303-308
168. Charton M. Electrical effects of ortho substituents in imidazoles and benzimidazoles. *J Org Chem*; **1965**. 30:3346-3350
169. Mchedlov-Petrosyan NO, Kamneva NN, Kharchenko AY, Shekhovtsov SV, Marinin AI, Kryshthal AP. The influence of the micellar pseudophase of the double-chained cationic surfactant di-n-tetradecyldimethylammonium bromide on the absorption spectra and protolytic equilibrium of indicator dyes. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*; **2015**. 476:57-67
170. Mchedlov-Petrosyan NO, Vodolazkaya NA, Kamneva NN. Acid-base equilibrium in aqueous micellar solutions of surfactants. Micelles: Structural biochemistry, formation and functions and usage. *New York: Nova Science Pub Inc*; **2013**. 352
171. Khossravi D. Drug-surfactant interactions: effect on transport properties. *Int J Pharm*; **1997**. 155(2):179-190.
172. Narang AS, Delmarre D, Gao D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm*; **2007**. 345(1-2):9-25
173. Dar AA, Chat OA. Cosolubilization of Coumarin30 and Warfarin in cationic, anionic, and nonionic micelles: a micellee water interfacial charge dependent FRET. *J Phys Chem B*; **2015**, 119(35):11632-11642



174. Kumbhakar M, Goel T, Mukherjee T, Pal H. Role of micellar size and hydration on solvation dynamics: a temperature dependent study in Triton-X-100 and Brij-35 micelles. *J Phys Chem B*; **2004**.108(50):19246-19254
175. Morsing P, Vauquelin G. How can the differences among AT<sub>1</sub>-receptor antagonists be explained? *Cell Biochem Biophys*; **2001**. 35(1):89-102
176. Pagliara A, Carrupt PA, Caron G, Gaillard P, Testa B. Lipophilicity profiles of ampholytes. *Chem Rev*; **1997**. 97(8):3385-3400
177. Eicher T, Hauptmann S, Speicher A. The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications. Weinheim, Germany: *John Wiley & Sons*; **2013**
178. Shore NE, Vollhardt KPC. Organic Chemistry. 7th ed. New York: *W. H. Freeman and Company*; **2014**
179. ACD/pKa DB, Version 12.00. Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto. ON. Canada ; 2011. www.acdlabs.com. Pristupljeno u martu 2018.
180. ChemAxon, MarvinSketch 16.5.2.0 Budapest. Hungary; 2013. <http://www.chemaxon.com>. Pristupljeno u aprilu 2018.
181. Floris FM, Filippi C, Amovilli C. A density functional and quantum Monte Carlo study of glutamic acid in vacuo and in a dielectric continuum medium. *J Chem Phys*; **2012**. 137:075102
182. Connolly ML. Computation of molecular volume. *J Am Chem Soc*; **1985**, 107(5):1118-1124
183. Richmond TJ. 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(1):63-89
184. Parr RG, Pearson RG. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J Am Chem Soc*; **1983**. 105(26): 7512-7516

## **7. PRILOG**

## PRILOG A: Eksperimentalni podaci

**Tabela 11.** Potencijometrijska titracija rastvora losartana ( $c = 10^{-3}$  M,  $V = 40$  ml) u smeši metanol-voda (m/m), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl ( $c = 0,1041$  M), standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,0996$  M). Temperatura 25°C; jonska sila 0,1 M NaCl.

NaOH ml	pH							
	30% metanol		40% metanol		50% metanol		55% metanol	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	3,018	3,024	3,004	3,001	3,018	3,029	2,976	2,970
0,02	3,036	3,042	3,021	3,018	3,034	3,045	2,993	2,985
0,04	3,054	3,059	3,037	3,035	3,051	3,061	3,009	3,001
0,06	3,072	3,078	3,055	3,052	3,068	3,079	3,026	3,017
0,08	3,091	3,096	3,072	3,070	3,087	3,096	3,044	3,033
0,10	3,111	3,115	3,090	3,088	3,105	3,115	3,061	3,051
0,12	3,130	3,135	3,110	3,107	3,124	3,133	3,079	3,068
0,14	3,151	3,155	3,129	3,127	3,144	3,153	3,098	3,088
0,16	3,171	3,176	3,149	3,147	3,164	3,174	3,118	3,108
0,18	3,194	3,198	3,170	3,169	3,186	3,196	3,139	3,129
0,20	3,218	3,222	3,193	3,191	3,207	3,218	3,160	3,150
0,22	3,242	3,246	3,217	3,215	3,232	3,242	3,183	3,172
0,24	3,268	3,271	3,242	3,240	3,256	3,267	3,207	3,195
0,26	3,294	3,298	3,268	3,267	3,281	3,293	3,232	3,220
0,28	3,322	3,326	3,295	3,294	3,309	3,321	3,258	3,245
0,30	3,352	3,357	3,323	3,323	3,338	3,352	3,286	3,273
0,32	3,382	3,386	3,355	3,354	3,369	3,383	3,317	3,303
0,34	3,416	3,419	3,386	3,386	3,401	3,416	3,347	3,333
0,36	3,449	3,454	3,420	3,420	3,435	3,450	3,381	3,366
0,38	3,485	3,490	3,455	3,456	3,471	3,488	3,416	3,399
0,40	3,522	3,526	3,493	3,493	3,509	3,527	3,453	3,436
0,42	3,562	3,566	3,534	3,533	3,551	3,569	3,493	3,475
0,44	3,603	3,607	3,576	3,574	3,594	3,614	3,536	3,517
0,46	3,646	3,650	3,621	3,618	3,640	3,661	3,580	3,560
0,48	3,692	3,696	3,668	3,667	3,691	3,712	3,631	3,608
0,50	3,739	3,743	3,718	3,717	3,741	3,765	3,681	3,659
0,52	3,788	3,792	3,770	3,767	3,797	3,821	3,737	3,713
0,54	3,841	3,845	3,826	3,822	3,858	3,881	3,796	3,771
0,56	3,895	3,899	3,884	3,879	3,920	3,944	3,857	3,832
0,58	3,950	3,954	3,943	3,940	3,984	4,008	3,923	3,895
0,60	4,009	4,012	4,006	4,000	4,051	4,075	3,992	3,963
0,62	4,068	4,071	4,068	4,062	4,120	4,144	4,060	4,031
0,64	4,127	4,129	4,132	4,126	4,187	4,210	4,131	4,102
0,66	4,188	4,190	4,200	4,199	4,257	4,277	4,201	4,173
0,68	4,250	4,251	4,262	4,263	4,323	4,343	4,268	4,241
0,70	4,310	4,312	4,327	4,325	4,391	4,410	4,337	4,308
0,72	4,373	4,372	4,393	4,389	4,459	4,475	4,405	4,376
0,74	4,437	4,438	4,463	4,456	4,527	4,544	4,474	4,447
0,76	4,499	4,499	4,523	4,522	4,595	4,611	4,542	4,514
0,78	4,568	4,566	4,591	4,590	4,665	4,682	4,611	4,583
0,80	4,635	4,634	4,659	4,659	4,736	4,751	4,680	4,655
0,82	4,704	4,701	4,730	4,729	4,807	4,822	4,749	4,722
0,84	4,778	4,774	4,802	4,803	4,883	4,898	4,822	4,794
0,86	4,855	4,850	4,878	4,880	4,963	4,975	4,898	4,871
0,88	4,934	4,930	4,959	4,961	5,043	5,056	4,979	4,947
0,90	5,024	5,020	5,046	5,050	5,132	5,145	5,059	5,029

Nastavak Tabele 11.

NaOH ml	pH							
	30% metanol		40% metanol		50% metanol		55% metanol	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,92	5,123	5,119	5,145	5,150	5,234	5,244	5,151	5,119
0,94	5,233	5,222	5,253	5,256	5,340	5,354	5,250	5,215
0,96	5,353	5,349	5,368	5,38	5,465	5,484	5,359	5,324
0,98	5,504	5,49	5,507	5,526	5,613	5,628	5,489	5,446
1,00	5,678	5,686	5,666	5,692	5,781	5,791	5,640	5,586
1,02	5,890	5,897	5,872	5,915	5,974	6,005	5,806	5,756
1,04	6,343	6,299	6,278	6,340	6,324	6,376	6,030	5,953
1,06	7,096	6,986	6,882	7,024	6,908	6,975	6,389	6,274
1,08	8,014	7,829	7,659	7,892	7,717	7,710	6,940	6,830
1,10	8,944	8,751	8,513	8,793	8,601	8,482	7,705	7,590
1,12	9,655	9,508	9,264	9,546	9,409	9,207	8,559	8,459
1,14	10,125	10,012	9,835	10,065	10,049	9,781	9,382	9,345
1,16	10,410	10,336	10,223	10,373	10,428	10,175	10,041	10,028
1,18	10,571	10,523	10,472	10,566	10,612	10,444	10,417	10,433
1,20	10,662	10,628	10,628	10,668	10,699	10,618	10,588	10,596
1,22	10,714	10,691	10,717	10,727	10,752	10,718	10,662	10,665
1,24	10,757	10,737	10,771	10,770	10,795	10,781	10,715	10,715
1,26	10,795	10,776	10,812	10,809	10,836	10,825	10,761	10,757
1,28	10,830	10,813	10,849	10,843	10,87	10,862	10,800	10,797
1,30	10,864	10,845	10,881	10,876	10,905	10,896	10,840	10,832
1,32	10,893	10,876	10,911	10,906	10,937	10,928	10,854	10,865
1,34	10,922	10,905	10,939	10,933	10,966	10,955	10,884	10,895
1,36	10,94	10,931	10,965	10,959	10,991	10,982	10,914	10,922
1,38		10,956	10,988	10,983	11,017	11,007	10,942	10,947
1,40		10,979		10,997	11,039	11,030	10,97	10,972
1,42		11,001			11,062	11,035	10,992	10,995
1,44		11,022			11,061		11,016	11,017
1,46		11,042					11,037	11,038
1,48		11,051					11,053	11,057
1,50							11,078	11,075
1,52							11,098	11,093
1,54							11,103	11,110
1,56								11,128
1,58								11,143
1,60								11,143

**Tabela 12.** Potencijometrijska titracija rastvora valsartana ( $c = 10^{-3}$  M,  $V = 40$  ml) u smeši metanol-voda (m/m), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl ( $c = 0,1041$  M), standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,0996$  M). Temperatura 25°C; jonska jačina 0,1M 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	2,641	2,639	2,728	2,778	2,713	2,743	2,713	2,692
0,02	2,651	2,650	2,738	2,788	2,726	2,754	2,725	2,702
0,04	2,661	2,660	2,748	2,798	2,738	2,765	2,736	2,713
0,06	2,671	2,670	2,759	2,809	2,749	2,776	2,747	2,723
0,08	2,681	2,679	2,771	2,821	2,76	2,788	2,758	2,735
0,10	2,690	2,689	2,782	2,832	2,773	2,798	2,770	2,745
0,12	2,701	2,700	2,793	2,843	2,784	2,810	2,782	2,755
0,14	2,712	2,710	2,805	2,855	2,796	2,823	2,794	2,768
0,16	2,723	2,721	2,817	2,867	2,809	2,835	2,805	2,779
0,18	2,734	2,733	2,830	2,880	2,822	2,848	2,818	2,791
0,20	2,746	2,745	2,843	2,893	2,835	2,862	2,832	2,804
0,22	2,756	2,756	2,856	2,906	2,849	2,875	2,845	2,816
0,24	2,769	2,768	2,869	2,919	2,862	2,889	2,859	2,829
0,26	2,782	2,781	2,883	2,933	2,876	2,904	2,873	2,842
0,28	2,794	2,793	2,898	2,948	2,891	2,918	2,887	2,856
0,30	2,809	2,807	2,914	2,964	2,905	2,934	2,903	2,871
0,32	2,821	2,820	2,928	2,978	2,921	2,950	2,920	2,885
0,34	2,835	2,834	2,945	2,995	2,937	2,966	2,935	2,900
0,36	2,850	2,849	2,961	3,011	2,954	2,982	2,952	2,916
0,38	2,865	2,863	2,978	3,028	2,970	3,000	2,970	2,932
0,40	2,880	2,879	2,995	3,045	2,989	3,018	2,988	2,949
0,42	2,897	2,895	3,015	3,065	3,008	3,039	3,008	2,967
0,44	2,912	2,911	3,033	3,083	3,028	3,058	3,027	2,984
0,46	2,929	2,927	3,054	3,104	3,047	3,078	3,047	3,004
0,48	2,947	2,946	3,074	3,124	3,067	3,099	3,069	3,023
0,50	2,964	2,963	3,095	3,145	3,089	3,122	3,092	3,043
0,52	2,984	2,982	3,117	3,167	3,112	3,145	3,114	3,064
0,54	3,003	3,001	3,141	3,191	3,135	3,171	3,139	3,087
0,56	3,024	3,021	3,166	3,216	3,161	3,197	3,165	3,110
0,58	3,045	3,043	3,192	3,242	3,186	3,223	3,193	3,134
0,60	3,068	3,065	3,219	3,269	3,214	3,252	3,222	3,160
0,62	3,091	3,088	3,248	3,298	3,243	3,283	3,251	3,187
0,64	3,115	3,112	3,277	3,327	3,272	3,315	3,285	3,216
0,66	3,140	3,138	3,311	3,361	3,305	3,350	3,320	3,246
0,68	3,168	3,164	3,344	3,394	3,340	3,387	3,357	3,278
0,70	3,195	3,192	3,378	3,428	3,377	3,425	3,395	3,313
0,72	3,225	3,221	3,418	3,468	3,416	3,466	3,436	3,350
0,74	3,257	3,253	3,458	3,508	3,458	3,509	3,481	3,388
0,76	3,289	3,285	3,500	3,550	3,500	3,554	3,528	3,429
0,78	3,326	3,322	3,544	3,594	3,547	3,602	3,578	3,474
0,80	3,364	3,357	3,591	3,641	3,595	3,652	3,630	3,520
0,82	3,402	3,395	3,638	3,688	3,645	3,703	3,684	3,569
0,84	3,443	3,436	3,687	3,737	3,697	3,757	3,739	3,621
0,86	3,484	3,480	3,737	3,787	3,748	3,811	3,797	3,675
0,88	3,529	3,523	3,788	3,838	3,803	3,865	3,855	3,730
0,90	3,574	3,569	3,839	3,889	3,858	3,920	3,913	3,788
0,92	3,623	3,617	3,892	3,942	3,913	3,975	3,971	3,847

Nastavak Tabele 12.

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
0,94	3,673	3,666	3,945	3,995	3,969	4,030	4,03	3,905
0,96	3,724	3,715	3,997	4,047	4,022	4,084	4,089	3,966
0,98	3,775	3,766	4,048	4,098	4,078	4,137	4,145	4,024
1,00	3,826	3,815	4,099	4,149	4,130	4,190	4,199	4,081
1,02	3,877	3,868	4,148	4,198	4,184	4,242	4,253	4,139
1,04	3,929	3,920	4,199	4,249	4,236	4,292	4,305	4,195
1,06	3,978	3,968	4,247	4,297	4,284	4,341	4,355	4,248
1,08	4,030	4,018	4,294	4,344	4,334	4,388	4,406	4,301
1,10	4,079	4,068	4,341	4,391	4,383	4,437	4,455	4,353
1,12	4,130	4,118	4,388	4,438	4,430	4,484	4,505	4,403
1,14	4,179	4,168	4,434	4,484	4,477	4,530	4,552	4,454
1,16	4,229	4,217	4,480	4,530	4,524	4,577	4,600	4,503
1,18	4,275	4,264	4,525	4,575	4,570	4,622	4,647	4,552
1,20	4,325	4,313	4,570	4,620	4,616	4,667	4,693	4,600
1,22	4,370	4,359	4,614	4,664	4,662	4,712	4,741	4,647
1,24	4,417	4,406	4,658	4,708	4,706	4,757	4,784	4,693
1,26	4,463	4,451	4,702	4,752	4,750	4,800	4,831	4,740
1,28	4,510	4,498	4,746	4,796	4,795	4,846	4,878	4,786
1,30	4,554	4,545	4,790	4,840	4,840	4,89	4,924	4,832
1,32	4,602	4,590	4,835	4,885	4,885	4,936	4,970	4,879
1,34	4,649	4,638	4,880	4,930	4,929	4,982	5,016	4,927
1,36	4,696	4,684	4,924	4,974	4,977	5,027	5,062	4,974
1,38	4,742	4,731	4,971	5,021	5,022	5,072	5,108	5,020
1,40	4,789	4,778	5,017	5,067	5,067	5,118	5,155	5,067
1,42	4,835	4,825	5,062	5,112	5,113	5,163	5,202	5,114
1,44	4,881	4,870	5,108	5,158	5,159	5,211	5,251	5,162
1,46	4,930	4,921	5,155	5,205	5,206	5,258	5,299	5,210
1,48	4,979	4,970	5,203	5,253	5,252	5,307	5,348	5,258
1,50	5,029	5,020	5,253	5,303	5,302	5,355	5,400	5,308
1,52	5,080	5,070	5,304	5,354	5,351	5,408	5,453	5,358
1,54	5,132	5,123	5,356	5,406	5,403	5,461	5,506	5,410
1,56	5,185	5,177	5,411	5,461	5,456	5,516	5,563	5,464
1,58	5,238	5,231	5,467	5,517	5,510	5,574	5,621	5,519
1,60	5,296	5,289	5,526	5,576	5,566	5,634	5,685	5,577
1,62	5,353	5,348	5,588	5,638	5,627	5,698	5,752	5,637
1,64	5,414	5,410	5,655	5,705	5,690	5,768	5,821	5,701
1,66	5,480	5,477	5,725	5,775	5,760	5,840	5,898	5,769
1,68	5,550	5,549	5,806	5,856	5,834	5,923	5,983	5,842
1,70	5,626	5,624	5,892	5,942	5,913	6,015	6,074	5,922
1,72	5,708	5,711	5,988	6,038	6,003	6,116	6,183	6,009
1,74	5,800	5,806	6,099	6,149	6,103	6,232	6,310	6,107
1,76	5,903	5,913	6,224	6,274	6,215	6,371	6,447	6,219
1,78	6,025	6,033	6,371	6,421	6,347	6,532	6,614	6,346
1,80	6,165	6,174	6,538	6,588	6,496	6,715	6,824	6,493
1,82	6,322	6,332	6,781	6,831	6,662	7,042	7,194	6,663
1,84	6,507	6,530	7,208	7,258	6,915	7,543	7,761	6,924
1,86	6,857	6,905	7,809	7,859	7,320	8,140	8,444	7,352
1,88	7,409	7,501	8,473	9,660	7,849	8,768	9,100	7,925
1,90	8,059	8,234	9,113	9,993	8,475	9,331	9,650	8,559

**Nastavak Tabele 12.**

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
1,92	8,735	8,947	9,610	9,660	9,069	9,754	10,02	9,126
1,94	9,319	9,528	9,943	9,993	9,554	10,06	10,23	9,596
1,96	9,734	9,907	10,16	10,210	9,914	10,24	10,36	9,954
1,98	10,023	10,12	10,29	10,340	10,15	10,36	10,44	10,19
2,00	10,198	10,243	10,377	10,427	10,298	10,437	10,501	10,337
2,02	10,314	10,324	10,443	10,493	10,394	10,500	10,556	10,435
2,04	10,397	10,391	10,501	10,551	10,465	10,552	10,605	10,505
2,06	10,462	10,450	10,550	10,600	10,521	10,600	10,648	10,559
2,08	10,518	10,504	10,595	10,645	10,571	10,641	10,688	10,607
2,10	10,567	10,551	10,637	10,687	10,615	10,679	10,725	10,650
2,12	10,611	10,595	10,674	10,724	10,656	10,714	10,761	10,688
2,14	10,652	10,634	10,710	10,760	10,693	10,748	10,792	10,725
2,16	10,689	10,670	10,742	10,792	10,727	10,778	10,822	10,757
2,18	10,722	10,704	10,772	10,822	10,758	10,807	10,850	10,788
2,20	10,754	10,735	10,800	10,850	10,788	10,834	10,873	10,816
2,22	10,785	10,765	10,827	10,877	10,817	10,859		10,821
2,24	10,812	10,794	10,850	10,900	10,844	10,860		
2,26	10,839	10,819			10,843			
2,28	10,865	10,844						
2,30	10,888	10,868						
2,32	10,910	10,890						
2,34	10,931	10,911						
2,36	10,952	10,932						
2,38	10,972	10,951						
2,40	10,991	10,969						
2,42	10,991	10,986						
2,44		11,004						
2,46		11,021						
2,48		11,034						

**Tabela 13.** Potencijometrijska titracija rastvora irbesartana ( $c = 10^{-3}$  M,  $V = 40$  ml) u smeši metanol-voda (m/m), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl ( $c = 0,1041$  M), standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,0996$  M). Temperatura 25°C; jonska jačina 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	2,608	2,614	2,684	2,734	2,656	3,414	2,636	2,616
0,02	2,618	2,623	2,693	2,743	2,667	3,444	2,645	2,625
0,04	2,625	2,631	2,701	2,751	2,674	3,475	2,654	2,634
0,06	2,633	2,639	2,710	2,760	2,682	3,506	2,662	2,642
0,08	2,642	2,648	2,718	2,768	2,691	3,538	2,669	2,649
0,10	2,65	2,656	2,726	2,776	2,701	3,573	2,679	2,659
0,12	2,657	2,665	2,735	2,785	2,709	3,606	2,687	2,667
0,14	2,666	2,674	2,744	2,794	2,718	3,640	2,696	2,676
0,16	2,676	2,683	2,753	2,803	2,727	3,676	2,705	2,685
0,18	2,685	2,692	2,762	2,812	2,737	3,715	2,713	2,693
0,20	2,694	2,702	2,772	2,822	2,747	3,755	2,724	2,704
0,22	2,704	2,712	2,782	2,832	2,755	3,797	2,733	2,713
0,24	2,714	2,722	2,792	2,842	2,766	3,839	2,743	2,723
0,26	2,724	2,732	2,802	2,852	2,776	3,882	2,753	2,733
0,28	2,734	2,743	2,812	2,862	2,786	3,927	2,763	2,743
0,30	2,745	2,753	2,823	2,873	2,797	3,974	2,773	2,753
0,32	2,755	2,764	2,834	2,884	2,807	4,022	2,784	2,764
0,34	2,766	2,775	2,844	2,894	2,818	4,070	2,794	2,774
0,36	2,777	2,786	2,856	2,906	2,830	4,121	2,807	2,787
0,38	2,788	2,798	2,867	2,917	2,841	4,174	2,818	2,798
0,40	2,800	2,810	2,879	2,919	2,851	4,226	2,828	2,808
0,42	2,812	2,822	2,891	2,931	2,864	4,280	2,842	2,822
0,44	2,824	2,834	2,903	2,943	2,876	4,334	2,854	2,834
0,46	2,836	2,846	2,917	2,957	2,887	4,389	2,866	2,846
0,48	2,850	2,860	2,929	2,969	2,900	4,445	2,879	2,859
0,50	2,862	2,873	2,942	2,982	2,912	4,500	2,892	2,872
0,52	2,875	2,886	2,955	2,995	2,926	4,557	2,904	2,884
0,54	2,888	2,900	2,969	3,009	2,940	4,616	2,919	2,899
0,56	2,903	2,915	2,983	3,023	2,953	4,677	2,933	2,913
0,58	2,918	2,929	2,997	3,037	2,968	4,739	2,946	2,926
0,60	2,932	2,945	3,012	3,052	2,981	4,803	2,960	2,950
0,62	2,948	2,960	3,028	3,068	2,997	4,869	2,975	2,965
0,64	2,964	2,976	3,043	3,083	3,012	4,939	2,992	2,982
0,66	2,979	2,993	3,059	3,099	3,027	5,014	3,006	2,996
0,68	2,996	3,010	3,076	3,116	3,044	5,093	3,023	3,013
0,70	3,013	3,026	3,093	3,133	3,059	5,179	3,039	3,029
0,72	3,031	3,045	3,109	3,149	3,077	5,272	3,057	3,047
0,74	3,049	3,064	3,128	3,168	3,094	5,378	3,077	3,067
0,76	3,067	3,083	3,147	3,187	3,112	5,496	3,092	3,082
0,78	3,087	3,103	3,167	3,207	3,132	5,632	3,112	3,102
0,80	3,108	3,124	3,187	3,227	3,151	5,796	3,132	3,122
0,82	3,128	3,145	3,208	3,248	3,170	5,999	3,153	3,143
0,84	3,150	3,167	3,228	3,268	3,192	6,374	3,172	3,162
0,86	3,172	3,190	3,250	3,290	3,212	6,979	3,194	3,184
0,88	3,194	3,213	3,272	3,312	3,235	7,746	3,216	3,206
0,90	3,218	3,236	3,296	3,326	3,256	8,615	3,239	3,229
0,92	3,242	3,262	3,320	3,350	3,281	9,424	3,262	3,252



Nastavak Tabele 13.

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
0,94	3,266	3,288	3,344	3,374	3,304	9,984	3,288	3,278
0,96	3,294	3,315	3,371	3,401	3,329	10,331	3,315	3,305
0,98	3,321	3,343	3,399	3,429	3,355	10,543	3,342	3,332
1,00	3,349	3,371	3,427	3,457	3,384	10,658	3,369	3,359
1,02	3,379	3,402	3,456	3,486	3,413	10,724	3,396	3,386
1,04	3,408	3,432	3,486	3,516	3,441	10,771	3,427	3,417
1,06	3,439	3,463	3,516	3,546	3,471	10,808	3,454	3,444
1,08	3,470	3,496	3,548	3,578	3,501	10,844	3,488	3,478
1,10	3,503	3,529	3,581	3,611	3,532	10,876	3,520	3,510
1,12	3,536	3,564	3,615	3,645	3,565	10,905	3,551	3,541
1,14	3,571	3,599	3,650	3,680	3,599	10,934	3,589	3,579
1,16	3,606	3,635	3,686	3,716	3,635	10,960	3,626	3,616
1,18	3,641	3,672	3,724	3,754	3,670	10,977	3,662	3,652
1,20	3,679	3,710	3,762	3,792	3,707		3,700	3,690
1,22	3,717	3,749	3,803	3,833	3,745		3,741	3,751
1,24	3,756	3,787	3,843	3,873	3,784		3,781	3,791
1,26	3,795	3,829	3,885	3,915	3,824		3,821	3,831
1,28	3,836	3,870	3,929	3,959	3,866		3,868	3,878
1,30	3,878	3,913	3,974	4,004	3,909		3,913	3,923
1,32	3,920	3,957	4,022	4,052	3,954		3,963	3,973
1,34	3,965	4,002	4,070	4,100	4,001		4,004	4,014
1,36	4,009	4,049	4,119	4,159	4,049		4,057	4,067
1,38	4,054	4,095	4,169	4,209	4,096		4,110	4,120
1,40	4,101	4,141	4,223	4,263	4,146		4,165	4,175
1,42	4,148	4,192	4,275	4,315	4,196		4,214	4,224
1,44	4,199	4,241	4,328	4,368	4,248		4,275	4,285
1,46	4,247	4,292	4,383	4,423	4,300		4,322	4,332
1,48	4,297	4,342	4,438	4,478	4,353		4,379	4,389
1,50	4,349	4,396	4,494	4,534	4,407		4,441	4,451
1,52	4,401	4,449	4,551	4,591	4,462		4,494	4,504
1,54	4,453	4,503	4,611	4,651	4,518		4,552	4,562
1,56	4,509	4,560	4,671	4,711	4,577		4,622	4,632
1,58	4,565	4,618	4,733	4,773	4,633		4,673	4,683
1,60	4,622	4,678	4,796	4,836	4,701		4,741	4,751
1,62	4,682	4,742	4,863	4,903	4,746		4,804	4,814
1,64	4,744	4,808	4,931	4,971	4,807		4,878	4,888
1,66	4,810	4,876	5,008	5,048	4,872		4,947	4,957
1,68	4,880	4,953	5,084	5,124	4,944		5,023	5,033
1,70	4,953	5,032	5,170	5,210	5,019		5,107	5,117
1,72	5,034	5,119	5,264	5,304	5,097		5,196	5,206
1,74	5,124	5,217	5,366	5,406	5,182		5,286	5,296
1,76	5,219	5,324	5,482	5,522	5,275		5,404	5,414
1,78	5,328	5,448	5,616	5,656	5,380		5,530	5,540
1,80	5,454	5,595	5,771	5,791	5,496		5,666	5,676
1,82	5,598	5,760	5,958	5,978	5,626		5,827	5,837
1,84	5,769	6,009	6,303	6,323	5,777		6,086	6,096
1,86	6,035	6,475	6,851	6,871	5,997		6,466	6,476
1,88	6,533	7,189	7,578	7,598	6,346		7,067	7,077
1,90	7,293	8,127	8,402	8,422	6,849		7,852	7,862

**Nastavak Tabele 13.**

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
1,92	8,227	9,140	9,1930	9,213	7,501		8,733	8,743
1,94	9,162	9,914	9,7840	9,804	8,245		9,590	9,600
1,96	9,851	10,338	10,179	10,199	9,013		10,203	10,213
1,98	10,254	10,488	10,444	10,464	9,659		10,477	10,487
2,00	10,446	10,552	10,600	10,620	10,115		10,578	10,588
2,02	10,547	10,603	10,684		10,412		10,633	
2,04	10,610	10,650	10,736		10,592		10,680	
2,06	10,655	10,690	10,777		10,691		10,725	
2,08	10,696	10,728	10,814		10,755		10,761	
2,10	10,734	10,762	10,847		10,800		10,794	
2,12	10,768	10,793	10,878		10,836		10,825	
2,14	10,799	10,822	10,906		10,867		10,848	
2,16	10,828	10,849	10,932		10,897			
2,18	10,855	10,874	10,956		10,925			
2,20	10,880		10,979		10,950			
2,22	10,904		11,002		10,974			
2,24	10,926		11,014		10,997			
2,26	10,946				11,018			
2,28					11,039			
2,30					11,058			
2,32					11,077			
2,34					11,077			
2,36								
2,38								

**Tabela 14.** Potencijometrijska titracija rastvora losartana ( $c = 5 \times 10^{-4} - 10^{-3}$  M,  $V = 40$  ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl ( $c = 0,1041$  M), standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,0996$  M). Temperatura 25°C; jonska jačina 0,1 M (NaCl).

NaOH ml	pH							
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M		TX100 10 <sup>-2</sup> M		BRIJ35 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	3,570	3,537	2,963	2,783	2,712	2,765	2,723	2,748
0,02	3,619	3,586	2,977	2,796	2,724	2,778	2,736	2,761
0,04	3,668	3,635	2,991	2,805	2,735	2,790	2,748	2,772
0,06	3,719	3,687	3,004	2,817	2,747	2,802	2,76	2,784
0,08	3,773	3,739	3,019	2,827	2,760	2,816	2,773	2,795
0,10	3,828	3,794	3,034	2,838	2,772	2,828	2,786	2,808
0,12	3,883	3,850	3,048	2,849	2,785	2,842	2,799	2,821
0,14	3,941	3,907	3,063	2,861	2,799	2,854	2,813	2,833
0,16	4,000	3,967	3,078	2,873	2,812	2,869	2,827	2,847
0,18	4,060	4,028	3,094	2,884	2,827	2,883	2,841	2,861
0,20	4,123	4,090	3,112	2,897	2,842	2,899	2,856	2,875
0,22	4,183	4,151	3,128	2,910	2,857	2,914	2,870	2,890
0,24	4,245	4,214	3,146	2,923	2,873	2,930	2,887	2,906
0,26	4,306	4,275	3,165	2,937	2,889	2,948	2,903	2,921
0,28	4,366	4,335	3,184	2,951	2,906	2,965	2,920	2,938
0,30	4,427	4,398	3,204	2,965	2,924	2,983	2,937	2,955
0,32	4,486	4,458	3,224	2,980	2,943	3,001	2,954	2,973
0,34	4,544	4,517	3,244	2,995	2,961	3,021	2,973	2,991
0,36	4,604	4,578	3,267	3,012	2,981	3,042	2,993	3,010
0,38	4,663	4,637	3,289	3,028	3,001	3,062	3,013	3,031
0,40	4,722	4,697	3,312	3,044	3,024	3,086	3,035	3,051
0,42	4,783	4,756	3,338	3,062	3,046	3,109	3,057	3,073
0,44	4,841	4,816	3,364	3,079	3,070	3,134	3,080	3,095
0,46	4,900	4,876	3,391	3,098	3,095	3,159	3,103	3,119
0,48	4,960	4,937	3,419	3,117	3,121	3,187	3,130	3,144
0,50	5,020	4,999	3,448	3,137	3,148	3,216	3,155	3,170
0,52	5,081	5,059	3,480	3,157	3,178	3,246	3,183	3,197
0,54	5,144	5,122	3,513	3,178	3,209	3,280	3,213	3,227
0,56	5,206	5,187	3,549	3,201	3,244	3,314	3,244	3,258
0,58	5,271	5,250	3,589	3,223	3,278	3,353	3,277	3,290
0,60	5,334	5,315	3,630	3,247	3,318	3,395	3,314	3,326
0,62	5,398	5,379	3,676	3,273	3,360	3,440	3,352	3,365
0,64	5,463	5,445	3,723	3,298	3,406	3,490	3,393	3,406
0,66	5,529	5,511	3,778	3,325	3,456	3,545	3,438	3,452
0,68	5,594	5,576	3,838	3,354	3,512	3,605	3,489	3,500
0,70	5,660	5,642	3,905	3,384	3,573	3,671	3,542	3,552
0,72	5,727	5,711	3,984	3,416	3,641	3,745	3,601	3,612
0,74	5,797	5,780	4,078	3,451	3,718	3,830	3,667	3,678
0,76	5,866	5,851	4,191	3,487	3,802	3,923	3,740	3,749
0,78	5,938	5,924	4,340	3,527	3,899	4,026	3,822	3,832
0,80	6,012	6,000	4,547	3,571	4,002	4,137	3,914	3,925
0,82	6,088	6,077	4,840	3,615	4,111	4,250	4,015	4,026
0,84	6,169	6,156	5,209	3,665	4,228	4,372	4,129	4,142
0,86	6,249	6,241	5,560	3,719	4,348	4,493	4,255	4,272
0,88	6,331	6,328	5,939	3,779	4,470	4,616	4,386	4,413
0,90	6,420	6,419	6,452	3,847	4,593	4,743	4,529	4,564
0,92	6,517	6,517	7,141	3,927	4,720	4,875	4,678	4,725

Nastavak Tabele 14.

NaOH ml	pH							
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M		TX100 10 <sup>-2</sup> M		BRIJ35 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,94	6,616	6,623	7,924	4,020	4,852	5,011	4,832	4,887
0,96	6,733	6,749	8,688	4,136	4,991	5,158	4,990	5,065
0,98	6,865	6,884	9,252	4,287	5,135	5,318	5,158	5,249
1,00	7,068	7,118	9,590	4,495	5,294	5,491	5,328	5,438
1,02	7,560	7,687	9,764	4,824	5,465	5,685	5,512	5,638
1,04	8,362	8,558	9,882	5,256	5,652	6,070	5,708	5,869
1,06	9,235	9,388	9,980	5,830	6,013	6,839	6,054	6,211
1,08	9,846	9,924	10,07	6,898	6,744	7,948	6,741	6,846
1,10	10,185	10,191	10,153	8,338	7,837	9,174	7,799	7,888
1,12	10,345	10,315	10,231	9,523	9,115	9,906	8,984	9,030
1,14	10,439	10,401	10,304	10,098	9,937	10,239	9,777	9,824
1,16	10,509	10,472	10,371	10,320	10,249	10,374	10,186	10,212
1,18	10,571	10,533	10,433	10,423	10,364	10,449	10,368	10,371
1,20	10,624	10,588	10,492	10,494	10,434	10,507	10,452	10,451
1,22	10,673	10,636	10,544	10,553	10,493	10,559	10,513	10,514
1,24	10,716	10,680	10,594	10,603	10,543	10,604	10,564	10,567
1,26	10,755	10,720	10,639	10,648	10,590	10,644	10,613	10,616
1,28	10,790	10,756	10,680	10,689	10,631	10,680	10,654	10,656
1,30	10,823	10,790	10,714	10,726	10,667	10,713	10,691	10,696
1,32	10,854	10,821	10,750	10,760	10,701	10,743	10,725	10,731
1,34	10,882	10,851	10,785	10,791	10,732	10,771	10,756	10,762
1,36	10,908	10,877	10,819	10,819	10,761	10,798	10,784	10,791
1,38	10,933	10,903	10,851	10,847	10,788	10,822	10,811	10,818
1,40	10,957	10,926	10,879	10,872	10,813	10,845	10,835	10,844
1,42	10,979	10,949	10,906	10,895	10,837	10,867	10,858	10,867
1,44	10,999	10,970	10,931	10,917	10,860	10,888	10,879	10,889
1,46	11,020	10,991	10,956	10,937	10,878	10,908	10,900	
1,48	11,038	11,010	10,979	10,957		10,928	10,919	
1,50	11,056	11,029	11,001	10,957		10,945	10,938	
1,52	11,075	11,046	11,021				10,956	
1,54	11,091	11,053	11,041				10,972	
1,56	11,106		11,061					
1,58			11,080					
1,60			11,096					
1,62			11,112					
1,64			11,116					

**Tabela 15.** Potencijometrijska titracija rastvora valsartana ( $c = 5 \times 10^{-4} - 10^{-3}$  M,  $V = 40$  ml) kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl ( $c = 0,1041$  M), standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,0996$  M). Temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ ; jonska jačina 0,1 M.

NaOH ml	pH							
	SDS $10^{-2}\text{M}$		CTAB $10^{-2}\text{M}$		TX100 $10^{-2}\text{M}$		BRIJ35 $10^{-2}\text{M}$	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,683	2,743	2,629	2,659	2,830	2,820	2,584	2,594
0,02	2,692	2,752	2,636	2,666	2,842	2,832	2,594	2,604
0,04	2,700	2,760	2,643	2,673	2,854	2,844	2,603	2,613
0,06	2,711	2,771	2,650	2,68	2,866	2,856	2,612	2,622
0,08	2,720	2,780	2,658	2,688	2,879	2,869	2,621	2,631
0,10	2,729	2,789	2,666	2,696	2,892	2,882	2,631	2,641
0,12	2,740	2,800	2,672	2,702	2,905	2,895	2,640	2,65
0,14	2,749	2,809	2,680	2,710	2,917	2,907	2,651	2,661
0,16	2,759	2,819	2,687	2,717	2,932	2,922	2,661	2,671
0,18	2,771	2,831	2,695	2,725	2,946	2,936	2,672	2,682
0,20	2,782	2,842	2,703	2,733	2,961	2,951	2,682	2,692
0,22	2,793	2,853	2,711	2,741	2,977	2,967	2,694	2,704
0,24	2,805	2,865	2,718	2,748	2,993	2,983	2,705	2,705
0,26	2,817	2,877	2,727	2,757	3,011	3,001	2,717	2,717
0,28	2,830	2,890	2,735	2,765	3,028	3,018	2,730	2,730
0,30	2,844	2,874	2,744	2,774	3,046	3,036	2,743	2,743
0,32	2,857	2,887	2,752	2,782	3,065	3,055	2,755	2,755
0,34	2,871	2,901	2,760	2,790	3,084	3,074	2,768	2,768
0,36	2,887	2,917	2,769	2,799	3,105	3,095	2,781	2,781
0,38	2,902	2,932	2,779	2,809	3,126	3,116	2,794	2,794
0,40	2,918	2,948	2,789	2,819	3,149	3,139	2,808	2,808
0,42	2,935	2,965	2,797	2,827	3,173	3,163	2,823	2,823
0,44	2,951	2,981	2,807	2,817	3,198	3,188	2,837	2,837
0,46	2,968	2,998	2,816	2,826	3,224	3,214	2,853	2,853
0,48	2,986	3,016	2,824	2,834	3,251	3,241	2,868	2,868
0,50	3,005	3,035	2,834	2,844	3,280	3,270	2,884	2,884
0,52	3,025	3,055	2,844	2,854	3,309	3,299	2,900	2,900
0,54	3,046	3,076	2,853	2,863	3,342	3,332	2,918	2,918
0,56	3,068	3,098	2,864	2,874	3,376	3,366	2,936	2,936
0,58	3,090	3,120	2,873	2,883	3,411	3,401	2,954	2,954
0,60	3,115	3,145	2,884	2,894	3,451	3,441	2,973	2,973
0,62	3,141	3,171	2,895	2,905	3,491	3,481	2,994	2,994
0,64	3,166	3,196	2,905	2,915	3,533	3,523	3,014	3,024
0,66	3,193	3,223	2,916	2,926	3,580	3,570	3,036	3,046
0,68	3,222	3,252	2,927	2,937	3,627	3,617	3,058	3,068
0,70	3,252	3,282	2,938	2,948	3,677	3,667	3,083	3,093
0,72	3,286	3,316	2,950	2,970	3,727	3,717	3,108	3,118
0,74	3,321	3,351	2,962	2,982	3,782	3,772	3,134	3,144
0,76	3,357	3,387	2,974	2,994	3,836	3,826	3,162	3,172
0,78	3,399	3,429	2,987	3,007	3,893	3,883	3,191	3,201
0,80	3,443	3,473	2,999	3,019	3,949	3,939	3,223	3,233
0,82	3,489	3,519	3,012	3,032	4,003	3,993	3,255	3,265
0,84	3,539	3,569	3,025	3,065	4,058	4,048	3,290	3,300
0,86	3,594	3,624	3,038	3,078	4,111	4,101	3,328	3,338

Nastavak Tabele 15.

NaOH ml	pH							
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M		TX100 10 <sup>-2</sup> M		BRIJ35 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,88	3,654	3,684	3,052	3,092	4,163	4,153	3,366	3,376
0,90	3,719	3,749	3,065	3,105	4,215	4,205	3,410	3,420
0,92	3,787	3,817	3,080	3,120	4,265	4,255	3,456	3,466
0,94	3,857	3,887	3,095	3,135	4,313	4,313	3,507	3,517
0,96	3,929	3,959	3,110	3,150	4,362	4,362	3,560	3,570
0,98	4,001	4,031	3,126	3,166	4,411	4,411	3,617	3,627
1,00	4,068	4,098	3,142	3,182	4,455	4,455	3,677	3,687
1,02	4,135	4,165	3,158	3,198	4,500	4,500	3,741	3,751
1,04	4,197	4,227	3,175	3,215	4,543	4,543	3,808	3,818
1,06	4,253	4,283	3,191	3,231	4,585	4,585	3,877	3,887
1,08	4,308	4,338	3,209	3,249	4,627	4,627	3,948	3,958
1,10	4,359	4,389	3,226	3,266	4,669	4,669	4,022	4,032
1,12	4,408	4,438	3,245	3,285	4,709	4,709	4,096	4,106
1,14	4,454	4,484	3,263	3,303	4,750	4,750	4,171	4,181
1,16	4,498	4,528	3,282	3,322	4,790	4,790	4,246	4,256
1,18	4,539	4,569	3,302	3,342	4,830	4,830	4,322	4,332
1,20	4,578	4,608	3,322	3,362	4,869	4,869	4,396	4,406
1,22	4,616	4,646	3,342	3,382	4,909	4,909	4,468	4,478
1,24	4,651	4,681	3,363	3,403	4,948	4,958	4,541	4,551
1,26	4,686	4,716	3,385	3,425	4,987	4,997	4,613	4,623
1,28	4,720	4,750	3,407	3,437	5,025	5,035	4,688	4,698
1,30	4,753	4,783	3,430	3,460	5,065	5,075	4,763	4,773
1,32	4,786	4,816	3,454	3,484	5,105	5,115	4,841	4,851
1,34	4,818	4,848	3,479	3,509	5,146	5,156	4,921	4,931
1,36	4,850	4,880	3,505	3,535	5,186	5,196	5,010	5,020
1,38	4,882	4,912	3,531	3,561	5,225	5,235	5,107	5,117
1,40	4,913	4,943	3,558	3,588	5,267	5,277	5,206	5,216
1,42	4,944	4,974	3,587	3,617	5,307	5,317	5,317	5,327
1,44	4,975	5,005	3,616	3,646	5,349	5,359	5,445	5,455
1,46	5,006	5,036	3,647	3,677	5,390	5,400	5,588	5,598
1,48	5,037	5,067	3,677	3,707	5,433	5,443	5,759	5,769
1,50	5,069	5,099	3,710	3,740	5,477	5,487	5,991	6,001
1,52	5,101	5,131	3,744	3,774	5,522	5,532	6,541	6,551
1,54	5,134	5,164	3,781	3,811	5,567	5,577	7,466	7,476
1,56	5,169	5,199	3,818	3,848	5,613	5,623	8,660	8,680
1,58	5,203	5,233	3,858	3,888	5,662	5,672	9,686	9,706
1,60	5,239	5,269	3,899	3,929	5,711	5,721	10,112	10,132
1,62	5,276	5,306	3,943	3,973	5,763	5,773	10,271	10,291
1,64	5,314	5,344	3,990	4,020	5,816	5,826	10,355	10,375
1,66	5,355	5,385	4,038	4,068	5,872	5,882	10,419	10,439
1,68	5,398	5,428	4,093	4,123	5,932	5,942	10,475	10,495
1,70	5,445	5,475	4,151	4,181	5,998	6,008	10,524	10,544
1,72	5,497	5,527	4,213	4,233	6,065	6,075	10,570	10,590
1,74	5,553	5,583	4,285	4,305	6,139	6,149	10,610	10,630
1,76	5,615	5,645	4,364	4,384	6,219	6,229	10,645	10,665
1,78	5,684	5,714	4,452	4,472	6,305	6,315	10,678	10,698
1,80	5,767	5,797	4,556	4,576	6,399	6,409	10,708	10,728
1,82	5,865	5,895	4,680	4,700	6,506	6,526	10,735	10,755
1,84	5,986	6,016	4,831	4,851	6,633	6,653	10,762	10,782

**Nastavak Tabele 15.**

NaOH ml	pH							
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M		TX100 10 <sup>-2</sup> M		BRIJ35 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
1,86	6,133	6,153	5,022	5,042	6,869	6,889	10,787	10,807
1,88	6,336	6,356	5,265	5,285	7,281	7,301	10,811	10,831
1,90	6,901	6,921	5,533	5,553	7,871	7,891	10,833	10,853
1,92	7,898	7,918	5,829	5,849	8,548	8,568	10,855	10,875
1,96	9,839	9,859	6,858	6,878	9,643	9,663	10,893	10,913
1,98	10,152	10,172	7,716	7,736	9,952	9,972	10,913	10,933
2,00	10,270	10,290	8,605	8,625	10,15	10,17	10,919	10,939
2,02	10,349		9,332		10,273			
2,04	10,416		9,798		10,364			
2,06	10,473		10,074		10,433			
2,08	10,523		10,226		10,496			
2,10	10,569		10,329		10,551			
2,12	10,609		10,406		10,600			
2,14	10,647		10,474		10,643			
2,16	10,682		10,534		10,685			
2,18	10,713		10,586		10,721			
2,20	10,740		10,632		10,754			
2,22	10,768		10,678		10,786			
2,24	10,794		10,717		10,815			
2,26	10,817		10,752		10,842			
2,28	10,840		10,786		10,868			
2,30	10,862		10,816		10,892			
2,32	10,881		10,845		10,914			
2,34	10,901		10,873		10,936			
2,36	10,919		10,891		10,957			
2,38	10,937				10,958			
2,40	10,953							
2,42	10,970							
2,44	10,986							
2,46	11,001							
2,48	11,015							
2,50	11,029							
2,52	11,044							
2,54	11,056							
2,56	11,069							

**Tabela 16.** Potencijometrijska titracija rastvora irbesartana ( $c = 5 \times 10^{-4}$  M,  $V = 40$  ml), kome je dodat 1 ml standardnog rastvora HCl (0,1041M ), standardnim rastvorom NaOH (0,0996 M) . Temperatura 25°C; jonska jačina 0,1 M.

NaOH ml	pH			
	SDS $10^{-2}$ M		CTAB $10^{-2}$ M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,00	2,587	2,535	2,292	2,628
0,02	2,594	2,544	2,297	2,635
0,04	2,603	2,550	2,300	2,643
0,06	2,612	2,558	2,305	2,651
0,08	2,620	2,566	2,309	2,657
0,10	2,630	2,574	2,315	2,665
0,12	2,639	2,583	2,319	2,673
0,14	2,649	2,593	2,324	2,680
0,16	2,658	2,602	2,328	2,688
0,18	2,668	2,612	2,333	2,696
0,20	2,679	2,622	2,337	2,704
0,22	2,689	2,632	2,342	2,712
0,24	2,701	2,644	2,347	2,721
0,26	2,712	2,655	2,351	2,729
0,28	2,723	2,667	2,356	2,737
0,30	2,738	2,678	2,361	2,746
0,32	2,750	2,690	2,366	2,755
0,34	2,762	2,703	2,371	2,765
0,36	2,776	2,716	2,375	2,774
0,38	2,791	2,728	2,380	2,783
0,40	2,804	2,743	2,386	2,773
0,42	2,820	2,758	2,390	2,783
0,44	2,835	2,773	2,394	2,793
0,46	2,850	2,788	2,399	2,803
0,48	2,868	2,803	2,405	2,813
0,50	2,885	2,818	2,411	2,823
0,52	2,903	2,836	2,415	2,834
0,54	2,922	2,854	2,421	2,844
0,56	2,942	2,873	2,426	2,857
0,58	2,963	2,893	2,432	2,867
0,60	2,986	2,914	2,437	2,878
0,62	3,009	2,938	2,442	2,890
0,64	3,034	2,961	2,448	2,902
0,66	3,060	2,985	2,454	2,915
0,68	3,089	3,011	2,460	2,927
0,70	3,118	3,038	2,465	2,940
0,72	3,151	3,069	2,470	2,954
0,74	3,186	3,100	2,477	2,968
0,76	3,223	3,134	2,483	2,981
0,78	3,265	3,173	2,490	2,996
0,80	3,310	3,213	2,495	3,011
0,82	3,360	3,260	2,502	3,027
0,84	3,415	3,311	2,508	3,042
0,86	3,481	3,369	2,515	3,059
0,88	3,557	3,435	2,521	3,076
0,90	3,648	3,515	2,527	3,094



**Nastavak Tabele 16.**

NaOH ml	pH			
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
0,92	3,762	3,609	2,534	3,112
0,94	3,904	3,724	2,540	3,130
0,96	4,084	3,874	2,548	3,151
0,98	4,296	4,061	2,554	3,171
1,00	4,500	4,270	2,562	3,192
1,02	4,677	4,476	2,568	3,235
1,04	4,827	4,648	2,575	3,258
1,06	4,953	4,791	2,583	3,282
1,08	5,065	4,917	2,591	3,308
1,10	5,168	5,025	2,597	3,336
1,12	5,263	5,126	2,605	3,363
1,14	5,353	5,219	2,613	3,394
1,16	5,437	5,304	2,620	3,426
1,18	5,519	5,387	2,628	3,460
1,20	5,601	5,469	2,636	3,497
1,22	5,680	5,548	2,644	3,538
1,24	5,762	5,628	2,652	3,584
1,26	5,845	5,707	2,661	3,632
1,28	5,934	5,789	2,669	3,687
1,30	6,028	5,877	2,677	3,748
1,32	6,128	5,981	2,686	3,790
1,34	6,236	6,070	2,695	3,870
1,36	6,357	6,174	2,705	3,969
1,38	6,494	6,284	2,714	4,096
1,40	6,835	6,415	2,723	4,270
1,42	7,612	6,649	2,733	4,515
1,44	8,689	7,250	2,743	5,301
1,46	9,595	8,245	2,753	5,845
1,48	9,968	9,250	2,763	6,692
1,50	10,105	9,796	2,773	7,780
1,52	10,190	10,025	2,783	8,925
1,54	10,259	10,125	2,794	9,685
1,56	10,318	10,200	2,804	10,09
1,58	10,371	10,264	2,817	10,284
1,60	10,417	10,319	2,827	10,388
1,62	10,458	10,369	2,838	10,452
1,64	10,496	10,413	2,850	10,505
1,66	10,531	10,453	2,862	10,552
1,68	10,564	10,491	2,875	10,595
1,70	10,594	10,527	2,887	10,634
1,72	10,622	10,560	2,900	10,678
1,74	10,649	10,590	2,914	10,710
1,76	10,672	10,617	2,928	10,740
1,78	10,696	10,644	2,941	10,769
1,80		10,669	2,956	10,795
1,82		10,694	2,971	10,819
1,84		10,714	2,987	10,831
1,86		10,736	3,002	10,842
1,88		10,756	3,019	10,855

**Nastavak Tabele 16.**

NaOH ml	pH			
	SDS 10 <sup>-2</sup> M		CTAB 10 <sup>-2</sup> M	
	proba 1	proba 2	proba 1	proba 2
1,90		10,775	3,036	10,856
1,92		10,793	3,054	10,868
1,94		10,810	3,072	10,880
1,96		10,828	3,090	10,921
1,98		10,844	3,111	10,934
2,00		10,859	3,131	10,941
2,02		10,874	3,152	
2,04		10,889	3,175	
2,06		10,902	3,198	
2,08		10,916	3,222	
2,10		10,930	3,248	
2,12		10,942	3,276	
2,14		10,955	3,303	
2,16		10,966	3,334	
2,18			3,366	
2,20			3,400	
2,22			3,437	
2,24			3,478	
2,26			3,524	
2,28			3,572	
2,30			3,627	
2,32			3,688	
2,34			3,760	
2,36			3,840	
2,38			3,939	
2,40			4,066	
2,42			4,240	
2,44			4,485	
2,46			4,857	
2,48			5,271	
2,50			5,815	
2,52			6,662	
2,54			7,750	
2,56			8,895	
2,58			9,655	
2,60			10,06	
2,62			10,254	
2,64			10,358	
2,66			10,422	
2,68			10,475	
2,70			10,522	
2,72			10,565	
2,74			10,604	
2,76			10,638	
2,78			10,670	
2,80			10,700	
2,82			10,729	
2,84			10,755	
2,86			10,779	
2,88			10,778	

## **Prilog B: Spisak publikovanih radova i saopštenja**

### **Publikovani radovi**

1. Grujić M, Popović M, Popović G, Nikolić K, Agbaba D. Protolytic equilibria of sartans in micellar solutions of differently charged surfactants. *Journal of Pharmaceutical Science*;2016. 105, 2444-2452.

M22 (IF 2.713)

2. Popović Nikolić MR, Popović G, Grujić M, Nikolić K, Agbaba D. A theoretical study on ionization of sartans in aqueous media and on interactions with surfactant micelles. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* ;2018. 82, 67-73.

M22 (IF 1.863)

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)**

1. Popović M, Grujić M, Popović G, Agbaba D. The effects of anionic and cationic surfactants on acid-base equilibria of irbesartan. 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry. September 22-26, 2014. Belgrade, Serbia. *PHYSICAL CHEMISTRY 2014 (Proceedings), Volume III*, 1133-1136.

2. Popović M, Popović G, Nikolić K, Grujić M, Agbaba D. Theoretical study of ionization of sartans in aqueous media. 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry. September 26-30, 2016. Belgrade, Serbia. *PHYSICAL CHEMISTRY 2016 (Proceedings), Volume II*, 801-804.

## **8. Biografija**

Maja Grujić je rođena 31.10.1985. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Jovan Jovanović Zmaj“ i srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, završila je u Kruševcu kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2004/2005. godine. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Školske 2012/13. godine upisala je doktorske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Farmaceutska hemija. Autor je dva rada objavljena u istaknutim međunarodnim časopisima, kao i dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

---

---

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одбраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство -некомерцијално (CC BY -NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY- NC-ND )
4. Ауторство– некомерцијално – делити под истим условима (CC BY- NC- SA)
5. Ауторство– без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство делити под истим условима (CC BY-SA)

Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**1. Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

**2. Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

**3. Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употреба дела у свом делу, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

**4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце ако се прерада дистрибуира по истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

**5. Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употреба дела у свом делу, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце.

**6. Ауторство делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на одређен начин од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада истрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.