

AUTOREFERAT

Zastosowanie spektroskopii ^{13}C CP MAS NMR w badaniach stałych form leków

Dariusz Maciej Pisklak

Zakład Chemii Fizycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2017

1. Dane personalne

Imię i nazwisko:	Dariusz Maciej Pisklak
Miejsce zatrudnienia:	Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny.
Stanowisko:	Adiunkt

2. Posiadane stopnie naukowe i dyplomy

Dyplom magistra farmacji - uzyskany w dniu 8 stycznia 1999 r., na podstawie pracy magisterskiej pt. *„Synteza pochodnej 6,7-dimetoksy-1,4-dihydro-3(2H)-izochinolonu o spodziewanym działaniu na o.u.n”*. Praca została wykonana w Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie. Promotorem pracy była Pani Prof. dr hab. Bożenna Gutkowska.

Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych - uzyskany w dniu 3 grudnia 2003 r., nadany z wyróżnieniem na podstawie rozprawy doktorskiej pt. *„NMR i modelowanie molekularne w badaniach nowych pochodnych o spodziewanej aktywności przeciwłkowej”*. Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie. Promotorem pracy była Pani Prof. dr hab. Iwona Wawer.

Stopień specjalisty w dziedzinie farmacji aptecznej - uzyskany w dniu 21 stycznia 2010 r., na podstawie złożenia państwowego egzaminu specjalizacyjnego. Opiekunem specjalizacji była Pani mgr farm. Danuta Jarzębińska.

3. Dotychczasowy przebieg zatrudnienia w jednostkach naukowych

Po ukończeniu studiów, w okresie od 1.02.1999 r. do 31.09.1999 r. byłem zatrudniony na etacie naukowo-technicznym w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego AM w Warszawie. W dniu 1.10.1999 r. rozpocząłem studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie. Pracę doktorską, którą wykonywałem

w Zakładzie Chemii Fizycznej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Iwony Wawer, obroniłem z wyróżnieniem w dniu 03.12.2003 r. Od 2004 r. do chwili obecnej jestem zatrudniony na etacie adiunkta w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie spektroskopii ^{13}C CP MAS NMR w badaniach stałych form leków

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą postępowania habilitacyjnego, jest spójny tematycznie cykl siedmiu publikacji (sześć anglojęzycznych prac badawczych i jedna polskojęzyczna praca przeglądowa) opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Dla każdej pracy podano współczynnik oddziaływania czasopisma (*Impact Factor*) oraz punktację MNiSW. Wartości powyższych współczynników zostały przygotowane przez Bibliotekę Główną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

H1. D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, „Application of ^{13}C NMR cross-polarization inversion recovery experiments in analysis of solid dosage forms”, International Journal of Pharmaceutics, 513, 538 - 542, 2016. **IF = 3,994, MNiSW = 40**

Wkład własny: koncepcja badań, implementacja techniki, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem oraz korekcie pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 80 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H2. D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, „¹³C solid-state NMR analysis of the most common pharmaceutical excipients used in solid drug formulations, Part I: Chemical shifts assignment”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 122, 81 - 89, 2016. **IF = 3,169, MNiSW = 35**

Wkład własny: koncepcja badań, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem oraz korekcie pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H3. D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, „¹³C solid-state NMR analysis of the most common pharmaceutical excipients used in solid drug formulations, Part II: CP kinetics and relaxation analysis”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 122, 29 - 34, 2016. **IF = 3,169, MNiSW = 35**

Wkład własny: koncepcja badań, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem oraz korekcie pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H4. D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, „¹³C cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance analysis of the solid drug forms with low concentration of an active ingredient-propranolol case”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 93, 68 - 72, 2014. **IF= 2,979, MNiSW = 35**

Wkład własny: koncepcja badań, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem oraz korekcie pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H5. M.A. Zielińska – Pisklak*, **D.M. Pisklak**, I. Wawer, „Application of ^{13}C CP MAS NMR for qualitative and quantitative characterization of carvedilol and its commercial formulations”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 5, 1763 - 1772, 2012. **IF= 3,130, MNiSW = 35**

Wkład własny: współudział w koncepcji badań, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych i przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 45%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H6. I. Wawer*, **M. Pisklak**, Z. Chilmonczyk, „ ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, 865-870, 2005. **IF= 1,889, MNiSW = 20**

Wkład własny: współudział w koncepcji badań, wykonanie pomiarów, współudział w analizie danych i przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H7. **D.M. Pisklak***, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, „Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w fazie stałej w farmacji”, Farmacja Polska, 73, 129-135, 2017. **MNiSW = 8**

Wkład własny: koncepcja pracy, przygotowanie manuskryptu, korekta pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (**Impact Factor**) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **18,330**, a punktacja **MNiSW - 200**.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wstęp

Stałe postacie leków, takie jak tabletki, kapsułki czy drażetki, są najbardziej popularnymi z dostępnych na rynku produktów leczniczych. Wynika to głównie z dokładnego, a jednocześnie łatwego sposobu dawkowania oraz wygodnego transportu i przechowywania; również trwałość substancji aktywnych jest większa w produktach leczniczych o stałej postaci. W przypadku omawianych form leku, możliwe jest również modyfikowanie procesu uwalniania i projektowanie formulacji o określonym profilu farmakokinetycznym; zwykle jest to osiągane poprzez zastosowanie odpowiednich substancji pomocniczych lub/i formy polimorficznej substancji aktywnej. Jednym z kierunków rozwoju nauk farmaceutycznych jest opracowywanie metod analitycznych pozwalających na analizę jakościową i ilościową składników bezpośrednio w preparatach farmaceutycznych, bez konieczności ich izolacji. Ma to kluczowe znaczenie nie tylko w przypadku kontroli procesu produkcyjnego, ale jest istotne także w badaniach stabilności substancji aktywnej, czy identyfikacji sfałszowanych produktów leczniczych w formie stałej. Również z punktu widzenia prawa patentowego, ważne jest określenie formy polimorficznej substancji czynnej występującej bezpośrednio w produkcie leczniczym. W przypadku metod analitycznych, w których niezbędne jest rozpuszczenie próbki, dane określające formę polimorficzną substancji leczniczej zostają utracone, również informacje dotyczące składu matrycy leku mogą być niepełne (często w procesie formulacji wykorzystuje się trudno rozpuszczalne polimery). Metody pozwalające na bezpośrednią analizę produktów leczniczych umożliwiają także badanie oddziaływania substancji aktywnych z substancjami pomocniczymi, co może bezpośrednio wpływać na profil uwalniania oraz stabilność danego preparatu farmaceutycznego. Wspomniane techniki analityczne mogą być wykorzystane między innymi w projektowaniu nowoczesnych postaci leków. Z powyższych względów, w analizie farmaceutycznej coraz częściej wykorzystuje się metody umożliwiające badanie próbek bezpośrednio w fazie stałej, do których należą m.in. spektroskopia oscylacyjna, tj. spektroskopia w podczerwieni (IR) i spektroskopia Ramana, oraz dyfraktometria proszkowa (PXRD). Jedną z technik o olbrzymim potencjale badawczym, która do tej pory rzadko była wykorzystywana w badaniach farmaceutycznych stałych postaci leku, jest spektroskopia

magnetycznego rezonansu jądrowego w fazie stałej (SSNMR, ang. *Solid-State Nuclear Magnetic Resonance*).

Spektroskopia NMR w badaniach próbek roztworowych znalazła powszechne zastosowanie w analizie farmaceutycznej. Często stanowi ona podstawową technikę służącą do identyfikacji i analizy strukturalnej związków chemicznych, zarówno tych uzyskanych na drodze syntezy, jak i izolowanych związków pochodzenia naturalnego. Coraz powszechniej wykorzystywana jest w badaniach strukturalnych układów makromolekularnych, takich jak białka [1] czy DNA, a także w projektowaniu nowych substancji leczniczych [2]. Technikę dyfuzyjnego NMR (DOSY, ang. *Diffusion Ordered Spectroscopy*), polegającą na rozseparowaniu widm ^1H NMR poszczególnych składników mieszanin pod względem wartości współczynników dyfuzji, można wykorzystać zarówno w badaniach gotowych produktów leczniczych, jak i produktów nielegalnych [3,4]. O ile techniki spektroskopii NMR w roztworze znalazły szerokie zastosowanie w farmacji, wydaje się, że spektroskopia NMR w fazie stałej jest nadal niedocenianą techniką o ogromnych możliwościach aplikacyjnych, szczególnie w przypadku badania obiektów w stanie stałym.

Spektroskopia NMR w fazie stałej

Spektroskopia NMR bazuje na zjawisku oddziaływania spinu jądrowego z zewnętrznym polem magnetycznym (oddziaływanie Zeemana). Najczęściej w badaniach SSNMR wykorzystuje się izotopy pierwiastków, stanowiących podstawowy budulec materii organicznej, dla których jądrowa liczba spinowa wynosi $I = \frac{1}{2}$, tj. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Szeroki zakres możliwości zastosowania tej techniki wynika z tego, że na kształt rejestrowanego widma wpływają również efekty, wynikające z oddziaływań spinów jądrowych pomiędzy sobą (sprzężenia typu spin-spin) oraz oddziaływania zewnętrznego pola magnetycznego z gęstością elektronową w otoczeniu danego jądra. To ostatnie zjawisko, zwane ekranowaniem, skutkuje różnicowaniem położenia sygnałów w widmie NMR.

W widmach NMR próbek roztworowych, szybkie ruchy molekularne prowadzą do uśrednienia poszczególnych wkładów do hamiltonianu, w wyniku czego obserwujemy tylko

¹ Kay L.E.: NMR studies of protein structure and dynamics. *J. Magn. Res.* 2005, 173, 193.

² Campos-Olivas R.: NMR screening and hit validation in fragment based drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 43.

³ Balayssac S., Gilard V., Delsuc M.A., Malet-Martino M.: DOSY NMR, a new tool for fake drug analyses. *Spectrosc. Eur.* 2009, 21, 10.

⁴ Holzgrabe U., Malet-Martino M.: Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification-The NMR approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55, 679.

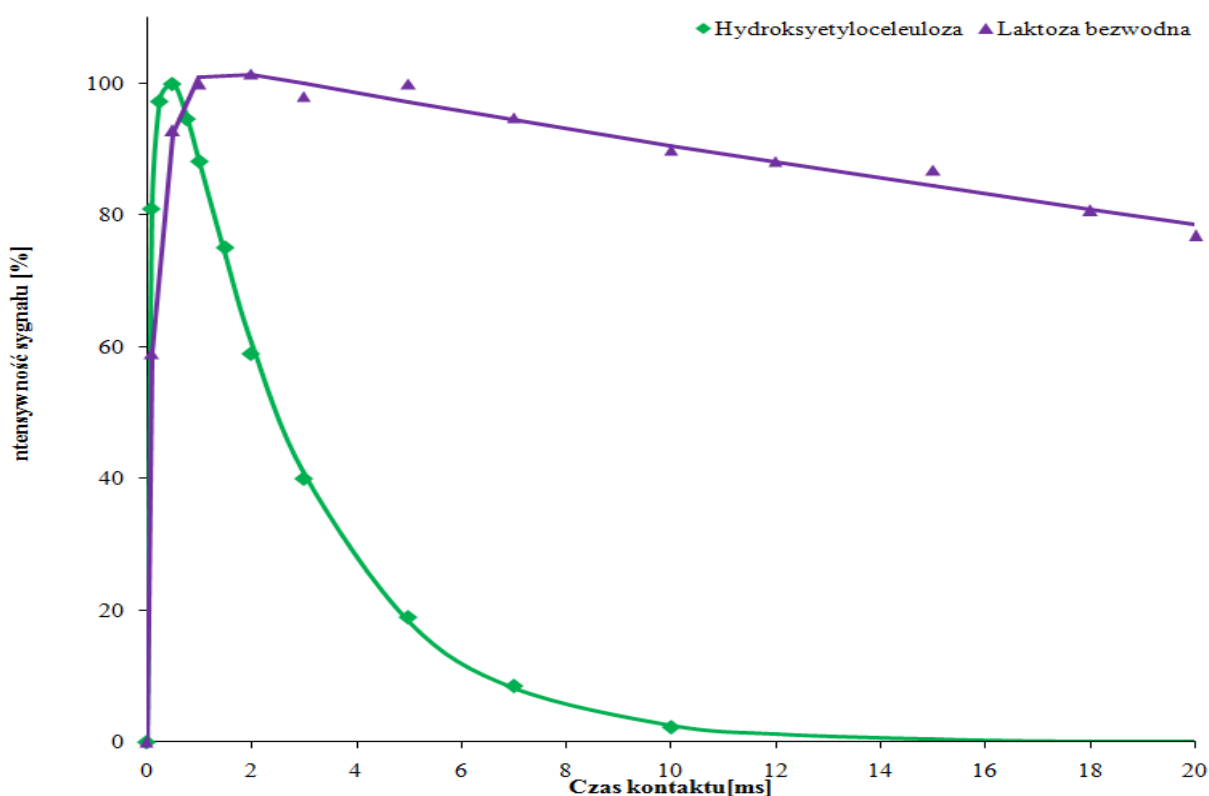
izotropową wartość przesunięcia chemicznego oraz sprzężenie J (nazywane kiedyś sprzężeniem skalarnym). W przypadku próbek w fazie stałej zahamowanie ruchów molekularnych prowadzi do odbudowania pełnego hamiltonianu oddziaływań, w efekcie czego obserwujemy znaczne poszerzenie sygnału w widmie, często przekraczające jego zakres spektralny. W celu zawężenia linii w widmie NMR ciała stałego wykorzystuje się specjalną technikę zwaną wirowaniem pod kątem magicznym (MAS – ang. *Magic Angle Spinning*) [5]. Polega ona na szybkim wirowaniu próbki pod odpowiednim kątem względem zewnętrznego pola magnetycznego. W przypadku, gdy kąt ten wynosi 54° , następuje znaczne zawężenie linii, wynikające z fizycznego uśrednienia tensora anizotropii przesunięcia chemicznego do wartości izotropowej oraz redukcji oddziaływań dipolowych. Sondy standardowo stosowane do pomiarów w ciele stałym umożliwiają rotację z częstotliwością do 15 kHz; jest to jednak często niewystarczające do całkowitego wyeliminowania sprzężeń dipolowych, szczególnie w przypadku oddziaływań z jądrami atomów wodoru. Dlatego też w trakcie zbierania sygnału wykorzystuje się dodatkowo odsprężanie wspomnianych oddziaływań z wykorzystaniem impulsów o wysokiej mocy.

Techniką najczęściej wykorzystywaną w pomiarach widm NMR w fazie stałej dla jąder o małej abundancji (zawartości izotopowej) i niskim współczynniku giromagnetycznym takich jak np. ^{13}C czy ^{15}N jest tzw. polaryzacja skrośna (CP, ang. *cross-polarization*). Wspomniana metoda bazuje na tym, że do generowania odpowiednich koherencji wykorzystuje się transfer polaryzacji, zamiast bezpośredniego ich wzbudzenia. Jądrami, które ulegają bezpośredniemu wzbudzeniu w eksperymencie CP, są najczęściej - charakteryzujące się wysoką abundancją i wysokim współczynnikiem giromagnetycznym - jądra wodoru ^1H . Następnie, przez zastosowanie odpowiednich impulsów, następuje transfer polaryzacji do jąder dla których rejestruje się widmo NMR. Czas, w którym następuje przeniesienie polaryzacji - nazywany czasem kontaktu (t_{CP}) - jest jednym z kluczowych parametrów, który ustala się przygotowując rejestrację widma. Zależność intensywności sygnału w widmie CP MAS NMR od czasu kontaktu opisuje kinetyka polaryzacji skrośnej [6]. Wysokość obserwowanego sygnału w widmie rośnie wraz z wydłużaniem czasu kontaktu, osiągając w pewnym momencie maksymalną wartość. W przypadku widm ^{13}C NMR omawiane maksimum obserwujemy dla czasu kontaktu wynoszącego około 2 ms, natomiast w

⁵ Polenova T., Gupta R., Goldbourt A.: Magic angle spinning NMR spectroscopy: a versatile technique for structural and dynamic analysis of solid-phase systems. *Anal. Chem.* 2015, 87, 5458.

⁶ Kolodziejski W., Klinowski J.: Kinetics of cross-polarization in solid-state NMR: a guide for chemists. *Chem. Rev.* 2002, 102, 613.

przypadku widm ^{15}N NMR dla około 5 ms. Wspomniana wartość silnie zależy od wielkości sprzężenia dipolowego pomiędzy najbliższymi atomami wodoru, a obserwowanym jądrem. Dalsze wydłużanie czasu kontaktu prowadzi do zmniejszania intensywności sygnału w widmie NMR, a zanik ten jest eksponencjalny ze stałą czasową $T_{1\rho}$. Wartość parametru $T_{1\rho}$ jest najczęściej charakterystyczna dla danej substancji i w dużej mierze zależy od jej krystaliczności. Dla związków amorficznych omawiana stała czasowa ma zwykle znacznie większą wartość (szybszy zanik sygnału) niż dla substancji krystalicznych (wolniejszy zanik sygnału). Przykładowy przebieg tej zależności dla sygnału w widmie laktozy i hydroksyetylocelulozy (HEC) przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Zależność intensywności sygnału od czasu kontaktu w widmie ^{13}C CP MAS NMR krystalicznej laktozy bezwodnej oraz amorficznej hydroksyetylocelulozy.

Rejestrując widma CP MAS NMR najczęściej optymalizuje się czas kontaktu tak, aby uzyskać maksymalną intensywność sygnałów w widmie; w przypadku widm ^{13}C NMR jest to zwykle wartość w granicach 1 - 2 ms.

Z fizycznego punktu widzenia, transfer polaryzacji wykorzystywany w sekwencji CP, opisywany jest jako proces relaksacji zachodzący z wyrównaniem temperatur spinowych pomiędzy spinami jądrowymi atomów wodoru – które ulegają bezpośredniemu wzbudzeniu –

a spinami jąder dla których rejestrujemy widmo NMR. Matematycznie zależność intensywności sygnału w widmie CP od czasu kontaktu opisywana jest funkcją:

$$I(t) = I_0 e^{\frac{-t}{T_{1\rho}^I}} \left[1 - \lambda e^{\frac{-t}{T_{df}}} - (1 - \lambda) e^{\frac{-3t}{2T_{df}} + \frac{-t^2}{2T_2^2}} \right]$$

I_0 – wielkość odpowiadająca ilości jąder składających się na dany sygnał w widmie;

T_2 – stała czasowa opisująca efektywność heteronuklearnego transferu polaryzacji;

T_{df} – stała czasowa opisująca efektywność dyfuzji spinowej pomiędzy jądrami ^1H ;

$T_{1\rho}^I$ – czas relaksacji spinowo-sieciowej dla jąder ^1H w warunkach ujarzmionych spinów;

λ – stała charakteryzująca otoczenie chemiczne, dla ^{13}C $\lambda = \frac{1}{5-n}$, gdzie n jest rzędowością danego atomu węgla;

Stałe czasowe T_2 i T_{df} mają kluczowy wpływ na etap narastania sygnału w widmie przy krótkich czasach kontaktu. Przy dłuższych czasach kontaktu, gdy obserwujemy zanik intensywności sygnału, zależność ta jest determinowana przez stałą czasową T_{1q} , która zależy zarówno od uporządkowania molekularnego, jak i dynamiki układu. Wyznaczenie poszczególnych parametrów kinetyki polaryzacji skrośnej polega na statystycznym dopasowaniu powyższej funkcji do serii punktów eksperymentalnych odpowiadających intensywności sygnału w widmach zarejestrowanych przy różnych czasach kontaktu.

Zastosowanie NMR w fazie stałej w badaniach farmaceutycznych

Spektroskopia NMR w fazie stałej znalazła szerokie zastosowanie w badaniach chemicznych i materiałowych. Coraz częściej wykorzystywana jest również w farmacji [7,8]. Wiodącym kierunkiem jest w tym przypadku identyfikacja i analiza struktur krystalicznych związków o aktywności farmakologicznej [9,10]. Pozwala ona nie tylko identyfikować formy

⁷ Holzgrabe U., Wawer I., Diehl B.: NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis. Wyd. 1. Amsterdam, Elsevier, 2008.

⁸ Paradowska K., Wawer I.: Solid-state NMR in the analysis of drugs and naturally occurring materials. J. Pharm. Biomed. Anal. 2014, 93, 27.

⁹ Pindelska E., Szeleszczuk Ł., Pisklak D.M., Majka Z., Kolodziejski W.: Crystal structures of tiotropium bromide and its monohydrate in view of combined solid-state nuclear magnetic resonance and gauge-including projector-augmented wave studies. J. Pharm. Sci. 2015, 104, 2285.

¹⁰ Pindelska E., Szeleszczuk L., Pisklak D.M., Mazurek A., Kolodziejski W.: Solid-state NMR as an effective method of polymorphic analysis: solid dosage forms of clopidogrel hydrogensulfate. J. Pharm. Sci. 2015, 104, 106.

polimorficzne [11] czy określać stopień krystaliczności próbki, ale również badać oddziaływania inter- i intramolekularne w fazie stałej. Ogromnym wsparciem w analizie widm NMR w ciele stałym są techniki obliczeniowe chemii kwantowej, które pozwalają określić położenie sygnału w widmie oraz oszacować wpływ otoczenia chemicznego i zmian konformacyjnych na wartości przesunięcia chemicznego w widmach NMR [12]. Połączenie obu tych technik coraz częściej wykorzystuje się do określenia struktury krystalicznej układów molekularnych, dla których niedostępne są dane rentgenostrukturalne. Omawiane podejście nazywane jest krystalografią NMR i może stanowić alternatywę dla klasycznych technik rentgenograficznych. Wspomniana technika jest również coraz szerzej wykorzystywana w badaniach oddziaływań związków aktywnych z innymi układami molekularnymi, takimi jak cyklodekstryny [13] czy układy mezoporowate [14]. Kierunek omawianych badań związany jest najczęściej z poszukiwaniem nowych nośników substancji aktywnych lub projektowaniem leków o kontrolowanym uwalnianiu. Ogromne możliwości badawcze wspomnianej metody tkwią w tym, że w przypadku spektroskopii NMR każdemu atomowi w analizowanej cząsteczce można przypisać pojedynczy sygnał w widmie NMR, którego położenie silnie zależy nie tylko od charakteru chemicznego, ale również od oddziaływań w jakie jest zaangażowany.

Wydaje się, że bardzo duży potencjał analityczny spektroskopii NMR w fazie stałej polega na możliwości wykorzystania omawianej metody w badaniach gotowych produktów leczniczych. Do tej pory jednak opublikowanych zostało niewiele prac związanych z tą tematyką. W pracy przeglądowej z 2014 roku, dotyczącej zastosowania spektroskopii NMR w ciele stałym w badaniach farmaceutycznych [15], temat badania gotowych postaci leków został ograniczony do jednej strony tekstu (na 49 stron omawianej publikacji) oraz zacytowanych sześciu pozycji literaturowych (ze 126 pozycji cytowanych), z których dwie są

¹¹ Harris R.K.: Applications of solid-state NMR to pharmaceutical polymorphism and related matters. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007, 59, 225.

¹² Dudenko D.V., R. Yates J.R., Harris K.D. Brown S.P.: An NMR crystallography DFT-D approach to analyse the role of intermolecular hydrogen bonding and π - π interactions in driving cocrystallisation of indomethacin and nicotinamide. *Cryst. Eng. Comm.* 2014, 15, 8797.

¹³ Garnero C., Chattah A.K., Longhi M.: Improving furosemide polymorphs properties through supramolecular complexes of β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 95, 139.

¹⁴ Skorupska E., Jeziorna A., Paluch P., Potrzebowski M.J.: Ibuprofen in mesopores of mobil crystalline material 41 (MCM-41): a deeper understanding. *Mol. Pharm.* 2014, 11, 1512.

¹⁵ Monti G.A., Chattah A.K., Linck Y.Y.: Solid-state nuclear magnetic resonance in pharmaceutical compounds. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 2014, 83, 221.

częścią niniejszego cyklu habilitacyjnego. Świadczy to o tym, że tematyka związana z zastosowaniem spektroskopii NMR w ciecie stałym w badaniach gotowych form leków była do tej pory niedoceniana w aspekcie praktycznego wykorzystania w badaniach naukowych i przemysłowych.

Cel badawczy

Celem badawczym przedstawionego cyklu habilitacyjnego była analiza możliwości wykorzystania spektroskopii ^{13}C NMR w fazie stałej w badaniach gotowych form leków oraz opracowanie technik pozwalających na wykorzystanie wspomnianej techniki w przypadku analizy produktów leczniczych o niskiej zawartości procentowej substancji czynnej.

Większość substancji leczniczych i pomocniczych stosowanych w procesie formulacji leku stanowią związki organiczne. Z tego względu, w analizie gotowych produktów leczniczych, można z powodzeniem stosować rezonans węgla – ^{13}C . Omawiana technika ma wiele zalet w stosunku do rezonansu innych jąder magnetycznych. Szeroki zakres przesunięć chemicznych pozwala na lepsze (niż w widmach ^1H NMR) rozdzielenie sygnałów, natomiast niewielki współczynnik giromagnetyczny jąder ^{13}C ogranicza efektywność oddziaływań dipolowych (wiąże się to ze zwężeniem linii w widmie). Dodatkowo, niewielka abundancja (około 1%) eliminuje konieczność stosowania homonuklearnego odsprężania w trakcie akwizycji widm. Zastosowanie rezonansu ^1H NMR, mimo znacznie wyższej czułości, w przypadku rejestracji widm w ciecie stałym jest ograniczone ze względu na wysoką abundancję oraz wysoki współczynnik giromagnetyczny i wynikającą z tego znaczną szerokość linii w widmie NMR, często znacznie przekraczającą zakres spektralny widma. Zastosowanie techniki rezonansu azotu - ^{15}N ograniczone jest do związków zawierających w strukturze atomy azotu. Dodatkowo, dużo niższe wartości współczynnika giromagnetycznego oraz abundancji - w porównaniu do izotopu ^{13}C - drastycznie obniżają czułość takiego pomiaru, co wiąże się z dużo dłuższym czasem pomiarowym koniecznym do rejestracji widma. Z tego powodu, spektroskopia ^{13}C CP MAS NMR została wybrana przeze mnie jako optymalna technika do badania gotowych produktów leczniczych.

Do cyklu habilitacyjnego włączono serię sześciu oryginalnych pełnotekstowych artykułów (H-1 – H-6), omówionych poniżej.

H6. ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms;

I. Wawer*, M. Pisklak, Z. Chilmonczyk, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, 865-870, 2005.

Celem pracy była pełna analiza spektroskopowa ^1H , ^{13}C oraz ^{15}N NMR sildenafilu w postaci zasady oraz soli (cytrynian sildenafilu). Wspomniana substancja lecznicza w postaci cytrynianu występuje w produkcie leczniczym, dostępnym pod nazwą handlową Viagra (Pfizer). Na podstawie widm ^1H i ^{13}C NMR oraz korelacyjnych 2D NMR zarejestrowanych w DMSO- d_6 , przypisano sygnały czystej substancji w widmach roztworowych. Następnie, zarejestrowano widma ^{13}C oraz ^{15}N CP MAS NMR w ciele stałym dla obu form (wolna zasada i sól). Różnice przesunięć chemicznych ^{13}C NMR w fazie stałej pomiędzy obiema formami są niewielkie; w przypadku widm sildenafilu w formie soli widoczne były dodatkowe sygnały pochodzące od cząsteczki cytrynianu. Brak różnic w przesunięciach chemicznych obu form wynikających z efektu protonowania, może świadczyć o tym, że związek ten występuje w formie kokryształu. Dla obu próbek wykonano pomiary kinetyki CP i wyznaczono parametry kinetyczne. Wykazano, że obie formy znacznie różnią się pod względem czasów relaksacji $T_{1\rho}$. Zarejestrowano również widma ^{13}C CP MAS NMR dla tabletek Viagra 100 mg, Viagra 50 mg oraz Viagra 25 mg. W zarejestrowanych widmach można było zidentyfikować sygnały pochodzące od substancji czynnej i potwierdzić, że w badanej formulacji występuje ona w formie cytrynianu sildenafilu. Mimo, że dominujące sygnały w widmie pochodziły od celulozy mikrokryształicznej, jej zakres spektralny nakładał się tylko na dwa sygnały pochodzące od sildenafilu co pozwalało na przypisanie pozostałych sygnałów substancji czynnej. Pomocne w tym było zarejestrowanie widma ^{13}C CP MAS NMR z filtrem dipolowym (ang. *dipolar-dephase*), który pozwolił na wytlumienie w widmie sygnałów atomów węgla drugo- i trzeciorzędowych. Dla tabletek zarejestrowano również dodatkowe widma, stosując dłuższe czasy kontaktu. Okazało się, że jego wydłużenie prowadzi do efektywnego zwiększenia stosunku intensywności sygnałów substancji czynnej w porównaniu do sygnałów celulozy. Jest to wynikiem różnic w parametrach kinetyki CP pomiędzy oboma składnikami formulacji (sildenafilem oraz celulozą) i świadczy o tym, że tabletki - mimo różnych procesów stosowanych podczas wytwarzania - stanowią układ heterogeniczny pod względem fazowym. Porównanie widm zarejestrowanych dla poszczególnych dawek sildenafilu w tabletkach nie wykazało żadnych różnic w zakresie intensywności sygnałów, co dowodzi, że poszczególne produkty różnią się głównie masą tabletki. Niestety, ze względu na ówczesny brak na rynku farmaceutycznym (w czasie

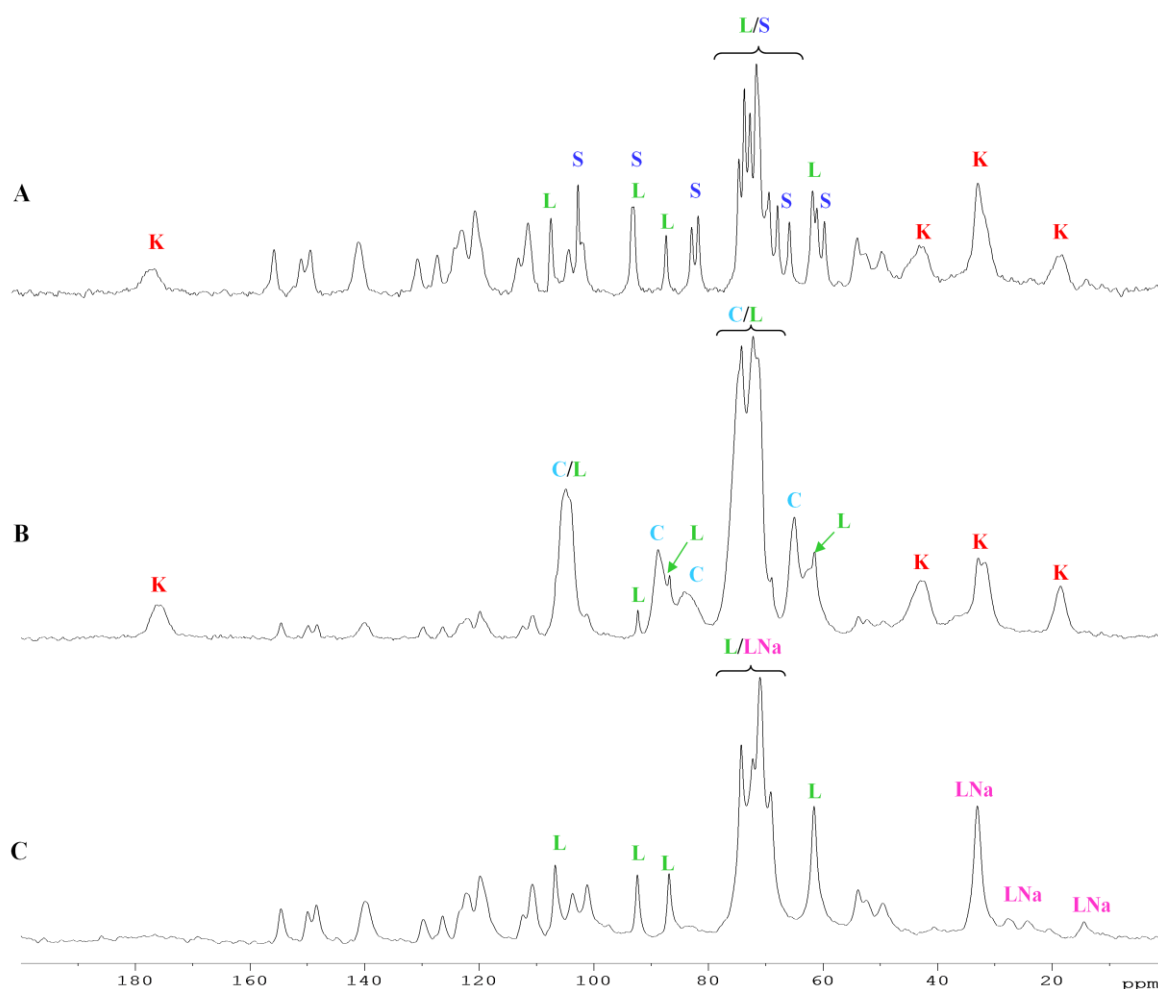
prowadzonych badań) generycznych odpowiedników Viagry o różnych zawartościach substancji czynnej, nie można było wykorzystać tej metody do analizy ilościowej substancji czynnej w tablecie. Wykazano natomiast, że spektroskopię NMR w fazie stałej można zastosować w badaniach jakościowych produktów leczniczych oraz, że pozwala ona zarówno zidentyfikować substancję czynną, jak i określać skład matrycy leku.

H5. Application of ^{13}C CP MAS NMR for qualitative and quantitative characterization of carvedilol and its commercial formulations;

M.A. Zielińska-Pisklak*, **D.M. Pisklak**, I. Wawer, Journal of Pharmaceutical Sciences, 5, 1763 - 1772, 2012.

Celem pracy była analiza gotowych produktów leczniczych zawierających w składzie substancję czynną, karwedilol. Zarejestrowano widma ^{13}C CP MAS NMR dla czystej substancji czynnej oraz sześciu produktów zarejestrowanych na polskim rynku i zawierających wspomnianą substancję czynną, pochodzących od różnych producentów: Carvedilol-Teva (Teva), Dilatrend (Roche), Coryol (Krka), Carvedilol-Rathiopharm (Rathiopharm), Vivacor (Anpharm) oraz Carvedigamma (Wörwag Pharma). W celu ograniczenia problemów z czułością pomiaru, do rejestracji widm wybrano formułacje zawierające najwyższą dostępną na rynku dawkę karwedilolu (25 mg). Sygnały w widmie ^{13}C CP MAS NMR czystego karwedilolu zostały przypisane na podstawie standardowego widma ^{13}C NMR w roztworze oraz widma z zastosowaniem filtra dipolowego. Pomimo że w zarejestrowanych widmach tabletek dominujące sygnały pochodziły od substancji pomocniczych, można było jednoznacznie zidentyfikować substancję czynną. Wyjątek stanowiły jedynie tabletki Carvedigamma, dla których sygnały substancji czynnej w widmie ^{13}C CP MAS NMR były bardzo niskie. Poszczególne produkty różniły się nie tylko intensywnością, ale również położeniem sygnałów substancji pomocniczych w widmie. Świadczy to o różnym, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, składzie chemicznym postaci leku. Na podstawie położenia sygnałów oraz poszczególnych charakterystyk produktów leczniczych (CHPL) zidentyfikowano substancje pomocnicze wchodzące w skład matrycy każdego z leków. Były to głównie laktoza, sacharoza i kolidon. Następnie dla każdej z tych substancji zarejestrowano widma ^{13}C CP MAS NMR i porównano z widmami tabletek. Analiza wykazała, że w każdej z tabletek występowała laktoza, w większości formułacji występował również kolidon, ale intensywność jego sygnałów różniła się znacznie pomiędzy poszczególnymi produktami. Najwięcej kolidonu znajdowało w

produkcie Diltrend, zaś w widmach Vivacor nie znaleziono sygnałów kolidonu, za to zidentyfikowano intensywne sygnały pochodzące od laurylosiarczanu sodu. W tabletkach Diltrend, Coryol oraz Carvedilol-Rathipharm dodatkowo występowały wąskie sygnały pochodzące od sacharozy. Uzyskane wyniki były w pełni zgodne z charakterystyką każdego z produktów leczniczych. Świadczy to o tym, że na podstawie analizy widm ^{13}C CP MAS NMR można zidentyfikować, poszczególne substancje pomocnicze wchodzące w skład matrycy leku bez potrzeby ich izolacji, zaś różnice pod względem ich składu, można wykorzystać również w celu identyfikacji wytwórcy danego produktu. W tym przypadku widma ^{13}C CP MAS NMR mogą stanowić swoisty „fingerprint” odpowiadający konkretnemu produktowi leczniczemu. Widma zarejestrowane dla tabletek Carvedilol-Rathipharm, Carvedigamma oraz Vivacor przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Widma ^{13}C CP MAS NMR tabletek Carvedilol-Rathipharm (A), Carvedigamma (B) oraz Vivacor (C) z zaznaczonymi sygnałami substancji pomocniczych (K- kolidon, L-laktoza jednowodna, S- sacharoza, C- celuloza mikrokrystaliczna, LNa- laurylosiarczan sodu).

Postanowiłem również wykorzystać zarejestrowane widma NMR do oszacowania zawartości poszczególnych substancji w tabletkach na podstawie intensywności sygnałów w widmach ^{13}C CP MAS NMR. Niestety możliwe to było tylko dla substancji czynnej (karwedilolu), gdyż skład ilościowy substancji pomocniczych nie był ujęty w charakterystyce produktu leczniczego. Parametry takie jak wielkość i masa tabletek różniły się znacznie pomiędzy produktami pochodzącymi od różnych wytwórców, a co za tym idzie, również zawartość procentowa substancji czynnej w każdej tabletkie była inna. Na podstawie masy tabletek wyznaczono procentową zawartość substancji czynnej w masie tabletkowej i wartości te skorelowano z intensywnością wybranych sygnałów w widmie NMR, pochodzących od substancji czynnej. Uzyskano współczynniki korelacji na poziomie $r = 0,99$, ale niestety wspomniane korelacje nie przebiegały przez początek układu współrzędnych. W efekcie tego zerowa intensywność sygnału odpowiadała dodatniej zawartości substancji czynnej na poziomie około 5%, a im niższa była jej zawartość procentowa w masie tabletkowej, tym większa była rozbieżność. Po przeanalizowaniu omawianego efektu, powiązано go z szumem pomiarowym. Okazało się, że odczytywana intensywność sygnału pochodzącego od substancji leczniczej zawierała dodatkowy wkład, wynikający z obecności szumów w widmie, spowodowanych z kolei występowaniem intensywnych sygnałów substancji pomocniczych. Wydaje się więc, że o ile oszacowanie zawartości substancji na podstawie intensywności sygnałów w widmie ^{13}C CP MAS NMR jest możliwe, o tyle dokładna analiza ilościowa wymaga zastosowania technik pozwalających na wytłumienie intensywnych sygnałów substancji pomocniczych, szczególnie w przypadku leków o niskiej zawartości substancji czynnej.

H4. ^{13}C cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance analysis of the solid drug forms with low concentration of an active ingredient-propranolol case;

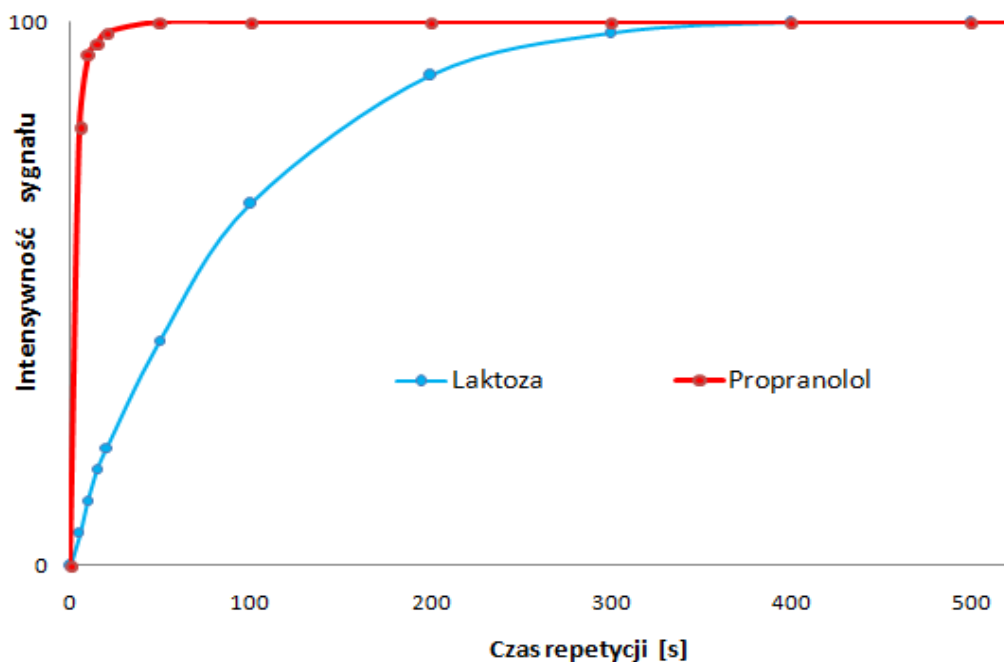
D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 93, 68 - 72, 2014.

Wykorzystanie spektroskopii ^{13}C CP MAS NMR w badaniach stałych form leków nie stanowi problemu w sytuacji, gdy w danej formulacji występuje wysoka zawartość substancji leczniczej. W przypadku omawianych wcześniej tabletek Viagry, czy produktów leczniczych zawierających w swoim składzie karwedilol, zawartość substancji czynnej przekraczała 10 % (z wyjątkiem preparatu Carvedigamma). W omówionych przypadkach klasyczne

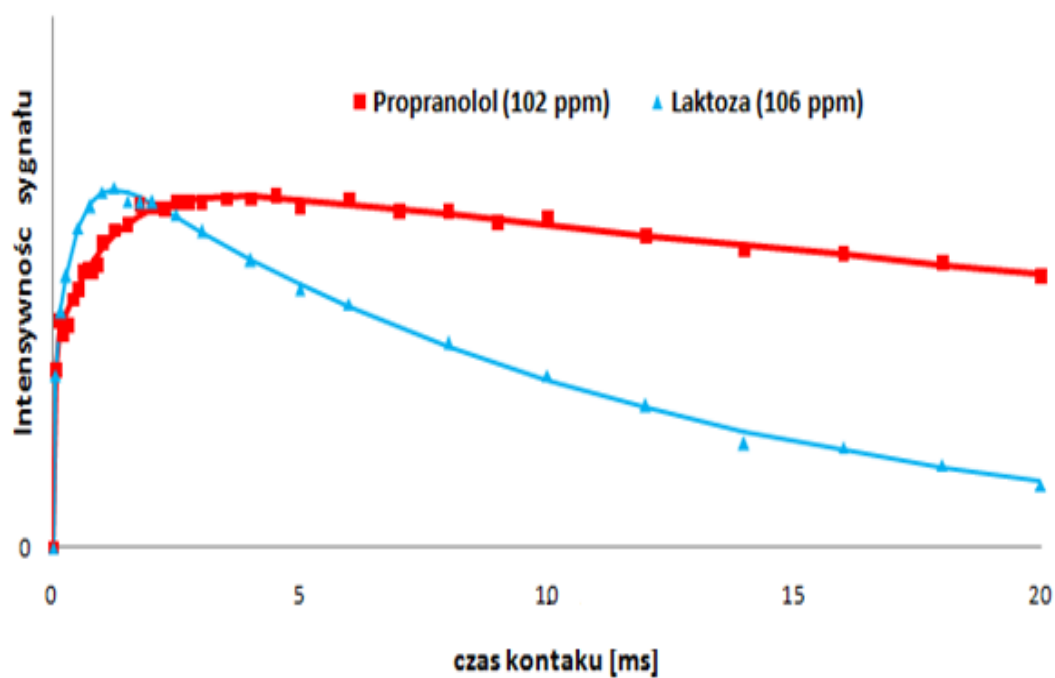
wykorzystanie spektroskopii ^{13}C NMR w ciele stałym pozwoliło na identyfikację zarówno substancji czynnych, jak i substancji pomocniczych wykorzystanych w procesie formulacji.

W przypadku tabletek o niskiej zawartości substancji czynnej, widmo ^{13}C NMR zdominowane jest przez sygnały pochodzące od substancji pomocniczych. Sygnały pochodzące od substancji czynnej są często trudne do identyfikacji, a ich intensywność jest na poziomie szumów. Przykładem takiego produktu leczniczego mogą być tabletki Propranolol 10 mg (WZF Polfa), w których zawartość substancji czynnej w masie tabletkowej była na poziomie 8%. W standardowym widmie ^{13}C CP MAS NMR zarejestrowanym dla tego leku łatwo zidentyfikować sygnały pochodzące od laktozy, która jest główną substancją pomocniczą występującą w formulacji. Sygnały pochodzące od propranololu są nieznacznie wyższe od poziomu szumów w widmie. W takim przypadku identyfikacja substancji czynnej, bazująca na przypisaniu jej sygnałów w widmie, była niemożliwa. Na podstawie obserwacji dotyczącej niejednorodności parametrów relaksacyjnych w obrębie składników formulacji farmaceutycznej, kluczowym pytaniem było, czy można je wykorzystać w celu zwiększenia względnej intensywności sygnałów pochodzących od substancji czynnej w widmie NMR tabletki?

Standardowo, w przypadku rejestracji widm ^{13}C CP MAS NMR optymalizuje się warunki rejestracji tak, aby uzyskać maksymalną intensywność sygnałów w widmie. Związane jest to z ustaleniem istotnych dla pomiaru parametrów, takich jak czas repetycji oraz czas kontaktu. Zwykle czas kontaktu dobiera się tak, aby uzyskać maksymalną intensywność interesującego sygnału (tj. najczęściej w granicach 2 ms), a czas repetycji ustawia się na tyle długi, by wyeliminować efekty związane z saturacją sygnałów. W tym celu wykonano pomiary kinetyki polaryzacji skrośnej oraz optymalizację czasów repetycji dla propranololu i laktozy jednowodnej w postaci czystych substancji. Uzyskane wyniki wykazały, że obie substancje charakteryzują się znacznymi różnicami pomiędzy parametrami relaksacyjnym $T_{1\rho}$ oraz T_{1H} . Porównanie zależności intensywności wybranych sygnałów w widmie ^{13}C CP MAS NMR dla laktozy oraz propranololu od czasu repetycji (rys. 3) oraz czasu kontaktu (rys. 4) przedstawiono na rysunkach poniżej.

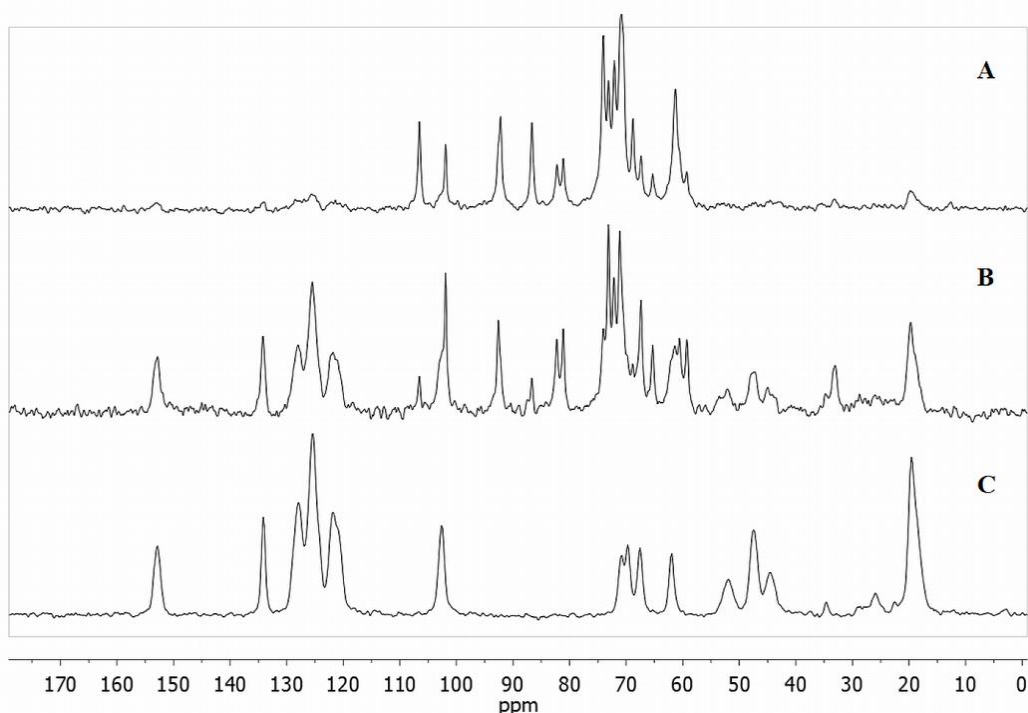


Rys. 3. Zależność intensywności wybranych sygnałów propranololu ($\delta=102$ ppm) i laktozy ($\delta=106$ ppm) w widmie NMR od zastosowanego czasu repetycji.



Rys. 4 Zależność intensywności wybranych sygnałów propranololu ($\delta=102$ ppm) i laktozy ($\delta=106$ ppm) w widmie NMR od czasu kontaktu.

Łatwo zauważyć, że w przypadku rejestracji widma laktozy, aby uniknąć saturacji sygnału wymagane jest zastosowanie znacznie dłuższego czasu repetycji (czas relaksacji T^1_H jest znacznie dłuższy) w porównaniu do propranololu. Skrócenie czasu repetycji powinno więc prowadzić do selektywnej saturacji sygnałów pochodzących od laktozy. Dodatkowo z analizy kinetyki CP widać, że w przypadku wydłużania czasu kontaktu zanik sygnałów laktozy jest znacznie szybszy, w porównaniu do sygnałów propranololu, co świadczy o znacznie dłuższym czasie relaksacji $T_{1\rho}$ dla tej substancji ($T_{1\rho}$ laktozy = 10 ms, $T_{1\rho}$ propranololu = 90 ms). W takiej sytuacji, wydłużenie czasu kontaktu również powinno wpłynąć korzystnie na stosunek intensywności sygnałów propranololu do laktozy w widmie tabletki. Aby zweryfikować te hipotezy, zarejestrowano widma przy znacznie wydłużonym czasie kontaktu (t_{cp} = 20 ms) oraz przy czasie repetycji skróconym do 10 s. Tego typu eksperymenty wymagają pewnej ostrożności ze względu na wysokie moce pulsów wykorzystywanych w rejestracji widm w ciele stałym. Z tego względu, wydłużając czas kontaktu, równocześnie skrócono czas akwizycji do 25 ms, co było wystarczające do pełnego próbkowania sygnału, a z drugiej strony zwiększało bezpieczeństwo pomiaru. Widma ^{13}C CP MAS NMR tabletek Propranolol 10 mg (WZF Polfa) zarejestrowane w sposób standardowy (czas repetycji - 400 s, czas kontaktu - 2 ms) [**A**] oraz z odpowiednio dobranymi parametrami akwizycji (czas repetycji - 10 s, czas kontaktu - 20 ms) [**B**] a także widmo zarejestrowane dla czystej substancji aktywnej - propranololu [**C**] przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Widmo ^{13}C CP MAS NMR tabletek Propranolol 10 mg (WZW Polfa) zarejestrowane przy standardowych parametrach (A) i z odpowiednio zoptymalizowanymi parametrami (B) oraz widmo czystego propranololu (C).

W widmie tabletki zarejestrowanym z odpowiednio zoptymalizowanymi parametrami akwizycji, bez problemu można zidentyfikować sygnały pochodzące od substancji czynnej, a intensywność sygnałów laktozy jest znacznie niższa. Na tej podstawie można przypisać większość sygnałów substancji czynnej z wyjątkiem tych, które nakładają się na sygnały substancji pomocniczej. W pracy pokazano, że wykorzystanie różnych parametrów relaksacyjnych substancji wchodzących w skład masy tabletkowej pozwala na taki dobór (często niestandardowy) parametrów akwizycji, aby można było efektywnie zmniejszyć intensywność sygnałów pochodzących od wybranej substancji w widmie. W efekcie można uzyskać zwiększenie stosunku sygnału do szumu dla sygnałów substancji czynnej. Omówiony eksperyment jest najbardziej efektywny w przypadku, gdy różnice pomiędzy parametrami relaksacji obu substancji są duże. Mimo to zastosowanie „filtrów relaksacyjnych” często nie pozwala na całkowite wytłumienie sygnałów substancji pomocniczych, co może uniemożliwić identyfikację wszystkich sygnałów pochodzących od substancji czynnej w widmie ^{13}C CP MAS NMR.

H4. ^{13}C solid-state NMR analysis of the most common pharmaceutical excipients used in solid drug formulations, Part I: Chemical shifts assignment;

D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 122, 81 - 89, 2016.

W celu praktycznego wykorzystania spektroskopii ^{13}C CP MAS NMR w analizie stałych postaci leków, istotna jest możliwość nie tylko identyfikacji sygnałów substancji czynnej, ale również określenia składu substancji pomocniczych w tabletkach na podstawie widm NMR. Wspomniane informacje można wykorzystać zarówno w celu określenia wytwórcy danego leku, jak i potencjalnie zastosować jako narzędzie do identyfikacji produktów zafałszowanych. Kluczowe w tym przypadku jest przypisanie w widmie sygnałów poszczególnych substancji pomocniczych wchodzących w skład danej formacji. Dostępne w literaturze dane spektroskopowe są często niepełne, a przypisania sygnałów niekompletne albo błędne. Dlatego też celem kolejnej pracy było stworzenie spójnej bazy danych widm ^{13}C CP MAS NMR substancji pomocniczych. Do badań wybrano substancje organiczne najczęściej wykorzystywane w procesie wytwarzania stałych postaci leków, takie jak: laktoza bezwodna, laktoza jednowodna, sacharoza, mannitol, sorbitol, skrobia ziemniaczana, skrobia kukurydziana, glikolan sodowy skrobi (typ A i typ B), celuloza mikrokryształiczna, etyloceluloza, metyloceluloza, hypromeloza, hydroksyetyloceluloza, algininian sodu, stearynian magnezu, laurylosiarczan sodu oraz kolidon. Dla każdej z ww. substancji zarejestrowano widmo ^{13}C CP MAS NMR oraz przypisano poszczególne sygnały. W przypadku substancji, dla których dostępne były struktury krystaliczne, w przypisaniu sygnałów pomocne były obliczenia kwantowo-mechaniczne. Obliczenia stałych ekranowania NMR wykonano przy użyciu pakietu Castep [16], który umożliwia wykonywanie obliczeń na poziomie DFT dla struktur periodycznych z wykorzystaniem elementów symetrii badanego układu. Podejście takie umożliwia pełne obliczeniowe odwzorowanie struktury krystalicznej danego układu, co wiąże się również z dokładnym wyznaczeniem parametrów ekranowania NMR. W obliczeniach wykorzystano funkcjonal PBE [17] bazujący na przybliżeniu GGA (*Generalized Gradient Approximation*) i wykonano je dla odpowiednich struktur krystalicznych pobranych z bazy Cambridge Structural Database (CSD). Uzyskane wartości

¹⁶ Pickard C. J., Mauri F.: All-electron magnetic response with pseudopotentials: NMR chemical shifts, Phys. Rev. 2001, B63, 245101.

¹⁷ Perdew J. P., Burke K.: Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation made simple Phys. Rev. Lett. 1996, 77, 3865.

stałych ekranowania przeliczono na przesunięcia chemiczne i porównano z danymi eksperymentalnymi. Pozwoliło to na jednoznaczne przypisanie sygnałów w widmach ^{13}C CP MAS NMR substancji takich jak: laktoza bezwodna, laktoza jednowodna, sacharoza, sorbitol oraz mannitol. Widma ^{13}C CP MAS wspomnianych substancji charakteryzowały się wąskimi liniami i można było w ich przypadku przypisać poszczególne sygnały odpowiednim atomom węgla w strukturze krystalicznej. Widma pozostałych substancji charakteryzowały się szerokimi liniami, wynikającymi z ich struktury amorficznej. W takim przypadku przypisano sygnały określonym ugrupowaniom chemicznym, wchodzącym w skład badanych struktur. O wysokiej specyficzności spektroskopii NMR w fazie stałej świadczy fakt, że w przypadku laktozy jednowodnej oraz bezwodnej na podstawie widm ^{13}C CP MAS NMR można było w sposób jednoznaczny rozróżnić obie formy krystaliczne. Analiza widma sugerowała również, że w niezależnej części komórki elementarnej laktozy bezwodnej występuje więcej niż jedna cząsteczka; świadczyło o tym zarówno poszerzenie linii, jak i zwiększenie liczby sygnałów w widmie. Podobna sytuacja – zwielokrotnienia i poszerzenia sygnałów w widmie ^{13}C CP MAS NMR - wystąpiła w przypadku sorbitolu. Przypuszczenia wynikające z analizy widm NMR w fazie stałej były zgodne z danymi krystalograficznymi; w obu przypadkach w niezależnej części komórki elementarnej występowała więcej niż jedna cząsteczka. Na podstawie widm ^{13}C CP MAS NMR nie można było natomiast rozróżnić źródła pochodzenia skrobi (ziemniaczana/kukurydziana); zarówno położenia sygnałów, jak i ich kształt były - w tym przypadku - identyczne.

Przedstawione w pracy dane mogą stanowić podstawę do identyfikacji składu matrycy leku na podstawie analizy widm ^{13}C CP MAS NMR badanego produktu leczniczego.

H3. ^{13}C solid-state NMR analysis of the most common pharmaceutical excipients used in solid drug formulations Part II: CP kinetics and relaxation analysis;

D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 122, 29 - 34, 2016.

W celu wykorzystania spektroskopii ^{13}C CP MAS NMR w analizie gotowego komercyjnego produktu leczniczego pomocna jest również znajomość parametrów relaksacyjnych $T_{1\rho}$ oraz T_{1H} dla poszczególnych składników występujących w danej formulacji. Dotyczy to zarówno substancji czynnej, jak i substancji pomocniczych wchodzących w skład matrycy danego leku. Jest to niezbędne do optymalizacji omawianych wcześniej parametrów rejestracji widma NMR (czas kontaktu, czas repetycji) oraz określenia

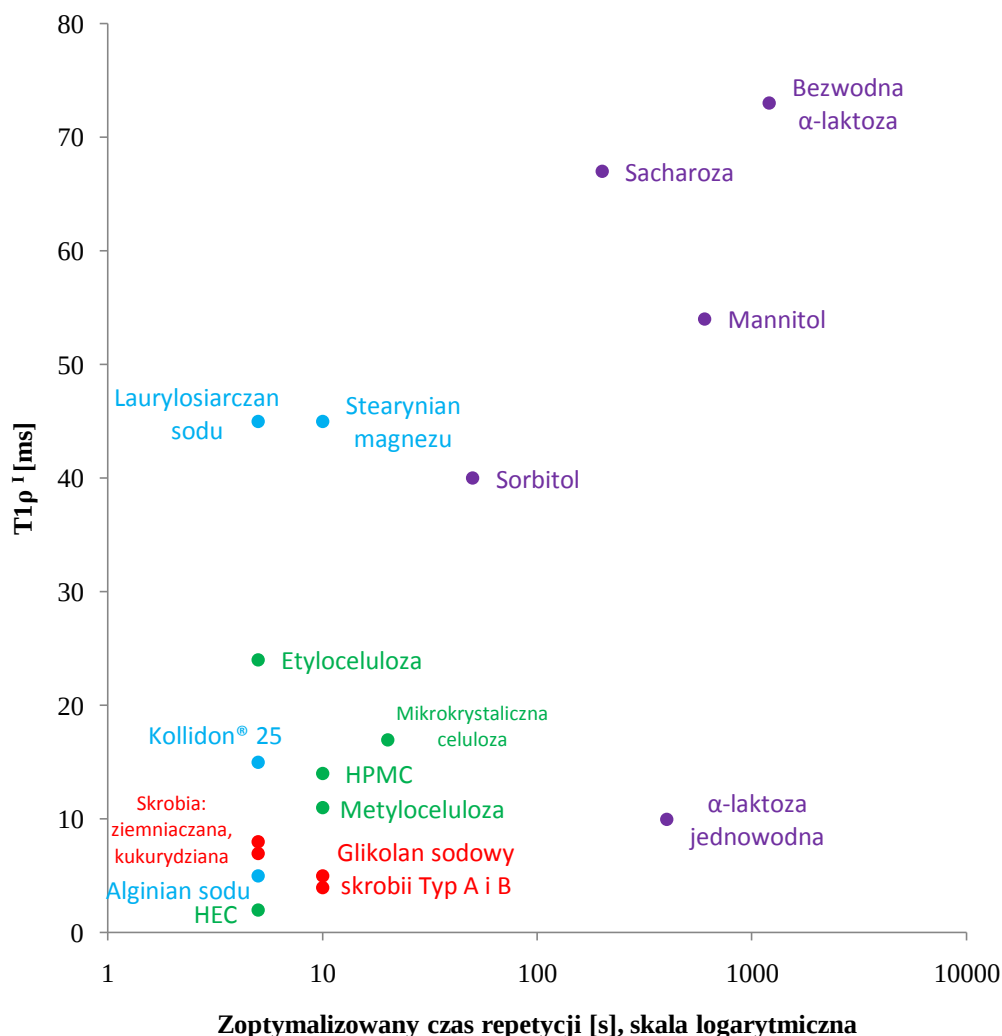
możliwości wykorzystania różnic pomiędzy wspomnianymi parametrami do tłumienia sygnałów wybranej substancji w widmie ^{13}C CP MAS NMR. Analizę taką wykonano dla 18 najczęściej wykorzystywanych substancji pomocniczych wchodzących w skład stałych postaci leku. Do badań wybrano te same substancje, dla których w poprzedniej pracy dokonano analizy widm ^{13}C CP MAS NMR [H3]; były to: laktoza bezwodna, laktoza jednowodna, sacharoza, mannitol, sorbitol, skrobia ziemniaczana, skrobia kukurydziana, glikolan sodowy skrobi (typ A i typ B), celuloza mikrokrystaliczna, etyloceluloza, metyloceluloza, hypromeloza, hydroksyetyloceluloza, algininian sodu, stearynian magnezu, laurylosiarczan sodu oraz kolidon.

Dla każdej z omawianych substancji zarejestrowano serię widm ^{13}C CP MAS NMR z różnymi czasami kontaktu. Na podstawie zależności intensywności sygnału od czasu kontaktu dopasowano model kinetyki polaryzacji skrośnej i na tej podstawie wyznaczono parametry $T_{1\rho}$. Podobną analizę wykonano dla zależności intensywności sygnału w widmie od czasu repetycji. Parametry wyznaczone dla poszczególnych substancji różniły się znacząco i zostały przedstawione w postaci wykresu na rysunku 6.

Związki wielkocząsteczkowe takie jak: kolidon, skrobia czy pochodne celulozy, charakteryzowały się zarówno krótkimi czasami relaksacji $T_{1\rho}$, jak i krótkimi czasami relaksacji T_{1H} ; wynika to z ich amorficznej postaci. Dla substancji krystalicznych, takich jak: laktoza bezwodna, sacharoza, czy mannitol, zaobserwowano znaczne wydłużenie obu analizowanych parametrów. Zaobserwowałem, iż w przypadku laktozy jednowodnej i bezwodnej, mimo zbliżonych parametrów związanych z relaksacją T_{1H} , występowały znaczne różnice w przypadku czasu relaksacji $T_{1\rho}$. Wspomniany parametr w przypadku laktozy jednowodnej, mimo że tworzy ona silnie uporządkowaną strukturę krystaliczną, zbliżony jest do wartości parametru charakteryzującego układy amorficzne i może być związany z obecnością cząsteczki wody w komórce elementarnej. Największe wartości czasu T_{1H} charakteryzowały laktozę jednowodną oraz mannitol. W związku z tym dla wspomnianych substancji, w celu rejestracji ilościowych widm ^{13}C CP MAS NMR, niezbędne są czasy repetycji rzędu 1200 sekund (!).

Otrzymane wyniki mogą być pomocne przy rejestracji widm ^{13}C CP MAS NMR tabletek o różnym składzie, pozwalają bowiem na ustawienie parametrów akwizycji w taki sposób, aby uzyskać efekt wytłumienia sygnałów określonej substancji w masie tabletkowej. W przypadku leków o niskiej zawartości substancji czynnej, efektywne tłumienie sygnałów substancji pomocniczych, takich jak kolidon, pochodne celulozy czy skrobi, możliwe jest poprzez odpowiednie wydłużenie czasu kontaktu (t_{CP}). Dla substancji krystalicznych, takich

jak laktoza, mannitol, czy sacharoza, cel ten będzie zrealizowany poprzez odpowiednie skrócenie czasu repetycji.



Rys. 6. Wykres przedstawiający wartości czasu repetycji oraz parametru $T_{1\rho}$ dla substancji pomocniczych występujących w stałych postaciach leku.

H1. Application of ^{13}C NMR cross-polarization inversion recovery experiments in analysis of solid dosage forms;

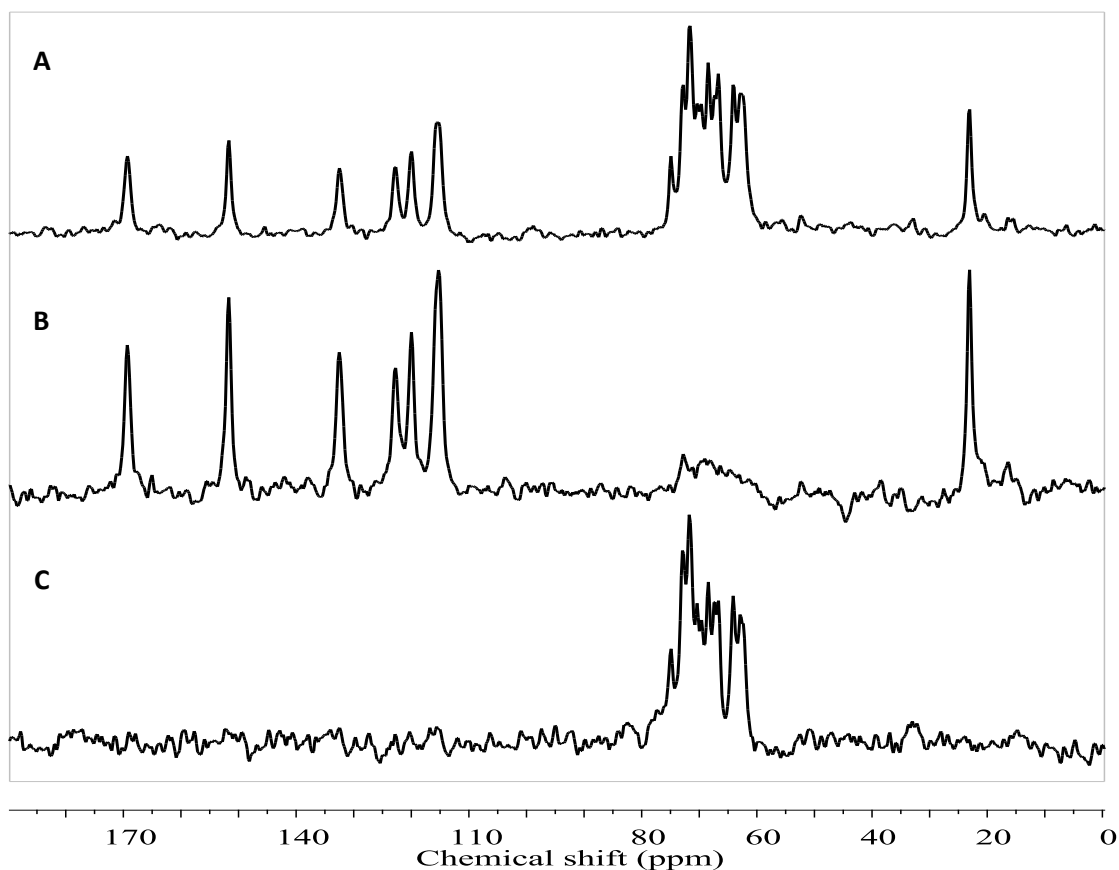
D.M. Pisklak*, M.A. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, International Journal of Pharmaceutics, 513, 538 - 542, 2016.

Często, pomimo optymalizacji parametrów rejestracji widma ^{13}C CP MAS NMR, takich jak czas repetycji i czas kontaktu, niemożliwe jest pełne wytłumienie sygnałów wybranej substancji w widmie. Szczególnie problematyczne jest to w przypadku, gdy sygnały substancji pomocniczej nakładają się, w wyniku zbliżonych wartości przesunięć

chemicznych, z sygnałami substancji czynnej. W przypadku takich obiektów jak stałe produkty lecznicze wykazano, że czasy relaksacji T_{1H} poszczególnych składników wchodzących w skład danej formulacji mogą się znacznie różnić (**H3**). Aby w sposób bardziej efektywny wykorzystać wspomniane różnice i osiągnąć całkowite wytłumienie sygnałów wybranej substancji pomocniczej w widmie ^{13}C CP MAS NMR, postanowiłem modyfikować standardową sekwencję impulsową CP poprzedzając ją sekwencją zwaną „*inversion-recovery*”. Wspomniana sekwencja wykorzystywana jest do pomiarów czasów relaksacji T_1 ; polega ona na wprowadzeniu impulsu 180° , który odwraca magnetyzację przed pulsem odpowiedzialnym za wzbudzenie sygnału, oraz wprowadzeniu czasu ewolucji (τ_{ew}), podczas którego magnetyzacja może swobodnie relaksować. Omawiany eksperyment polega w praktyce na wykonaniu serii widm ^{13}C CP MAS NMR z różnymi czasami ewolucji i analizie intensywności sygnału w widmach w zależności od wspomnianego parametru. Przy bardzo krótkich czasach ewolucji obserwujemy sygnał w przeciwfazie (odwrócony do dołu), stopniowe wydłużanie czasu ewolucji prowadzi zaś do eksponencjalnego zmniejszenia intensywności sygnału. Dla pewnej określonej wartości czasu ewolucji, intensywność sygnału spada do zera (odpowiada to czasowi ewolucji $t_0 = \ln(2) \cdot T_1$), a następnie odbudowuje się do intensywności uzyskiwanej przy bezpośrednim wzbudzeniu sygnału (intensywność sygnału osiąga plateau). Zakładając, że każda substancja wchodząca w skład tabletki charakteryzuje się konkretną wartością czasu relaksacji T_{1H} (T_{1H} w obrębie cząsteczki ujednolicony jest przez efektywną dyfuzję spinową), i odpowiednio dobierając czas ewolucji można uzyskać saturację sygnałów tej substancji w widmie NMR. W przypadku wykorzystania sekwencji CP saturacja sygnałów ^1H danego związku chemicznego prowadzi do braku efektywności transferu polaryzacji CP i wyeliminowania sygnałów wspomnianego związku w widmie ^{13}C CP MAS NMR. Wobec powyższego faktu odpowiednio zmodyfikowałem sekwencję CP i wykorzystałem ją do rejestracji widm ^{13}C CP MAS NMR.

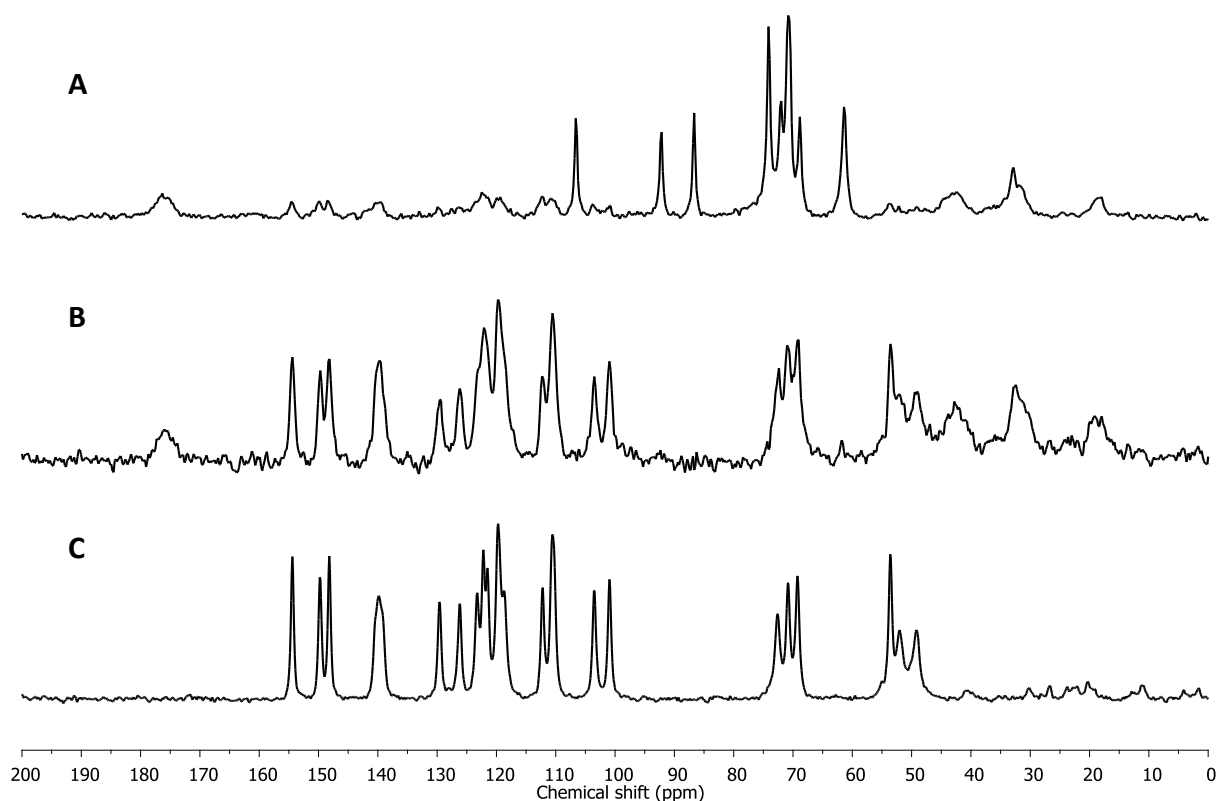
W pierwszym etapie badań omawianą sekwencję przetestowano na mieszaninie fizycznej etylocelulozy i sorbitolu oraz gotowym produkcie leczniczym Apap Junior, w skład którego wchodziły paracetamol i sorbitol. Przy odpowiednio dobranych parametrach czasu ewolucji, w obu przypadkach można było uzyskać widma NMR, w których występowały sygnały pojedynczej substancji. Na rysunku poniżej (Rys. 7) przedstawiono widma zarejestrowane dla preparatu Apap Junior. W widmie zarejestrowanym przy użyciu klasycznej sekwencji CP, widoczne były sygnały obu substancji (**A**). Zastosowanie zmodyfikowanej sekwencji pozwoliło zarejestrować widma, w których widoczne były tylko poszczególne składniki formulacji. Dla czasu ewolucji $\tau_{ew} = 6$ s można zaobserwować w

widmie jedynie sygnały pochodzące od paracetamolu (**B**), natomiast przy czasie ewolucji $\tau_{ew}=12$ s widoczne są tylko sygnały sorbitolu (**C**).



Rys. 7. Widma ^{13}C CP MAS NMR produktu leczniczego Apap Junior zarejestrowane przy pomocy klasycznej sekwencji CP (**A**) oraz z wykorzystaniem sekwencji zmodyfikowanej dla czasu ewolucji $\tau_{ew} = 6$ s (**B**) oraz $\tau_{ew} = 12$ s (**C**)

Odpowiedni dobór czasu ewolucji umożliwił całkowite wytłumienie sygnałów jednej z dwóch substancji obecnych w formulacji. Postanowiłem sprawdzić, czy takie podejście będzie skuteczne również w przypadku tłumienia sygnałów dominującej substancji pomocniczej, w przypadku analizy leków o niskiej zawartości substancji czynnej. Zastosowałem tę sekwencję również do rejestracji widm tabletek Coryol (Krka) zawierających najmniejszą z dostępnych komercyjnie dawek karwedilolu (6,25 mg). Widma ^{13}C CP MAS NMR czystego karwedilolu (**C**) oraz tabletek Coryol (6,25 mg) zarejestrowane przy użyciu standardowej sekwencji (**A**) oraz z wykorzystaniem zmodyfikowanej sekwencji CP z zoptymalizowanym czasem ewolucji ($\tau_{ew} = 42$ s.) (**B**) przedstawiono poniżej (Rys. 8).



Rys. 8. Widma tabletek Coryol (6,25 mg) zarejestrowane przy użyciu standardowej sekwencji ^{13}C CP MAS NMR (**A**) oraz z wykorzystaniem sekwencji zmodyfikowanej (czas ewolucji – $\tau_{\text{ew}} = 42$ s) (**B**) i widmo czystego karwedilolu (**C**).

W standardowym widmie ^{13}C NMR CP MAS tabletek Coryol (rys. 8, A) trudno było potwierdzić obecność substancji czynnej w masie tabletkowej; dominujące sygnały w widmie NMR pochodziły od laktozy. Odpowiednie ustawienie wartości czasu ewolucji ($\tau_{\text{ew}} = 42$ s) pozwoliło na pełne wyeliminowanie z widma ^{13}C CP MAS NMR sygnałów substancji pomocniczej. Umożliwiło to również identyfikację wszystkich sygnałów substancji czynnej w tabletkach, także tych, na które uprzednio nałożone były sygnały pochodzące od laktozy. Widoczne jest to w przypadku sygnałów jąder ^{13}C karwedilolu w zakresie przesunięć chemicznych 65-75 ppm, w przypadku których zastosowanie omawianej sekwencji impulsowej pozwoliło ustalić zarówno dokładne wartości przesunięć chemicznych, jak i kształt sygnałów w widmie.

Podsumowanie

W pracach wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego wykazałem, że :

1. Analiza widm ^{13}C CP MAS NMR pozwala na określenie składu jakościowego zarówno substancji czynnej, jak i substancji pomocniczych wchodzących w skład danej formulacji leku.
2. Odpowiedni dobór parametrów eksperymentu przy wykorzystaniu techniki CP pozwala na zwiększenie intensywności sygnałów substancji aktywnej względem substancji pomocniczych w widmie ^{13}C CP MAS NMR, co jest kluczowe w przypadku leków o niskiej zawartości substancji czynnej.
3. Zastosowanie zmodyfikowanej sekwencji „*inversion-recovery*” CP pozwoliło na całkowitą eliminację sygnałów wybranej substancji pomocniczej i umożliwiło obserwację wszystkich sygnałów substancji czynnej w widmie ^{13}C CP MAS NMR.
4. Spektroskopia ^{13}C CP MAS NMR pozwala na identyfikację sygnałów substancji czynnej w formulacjach o niskiej jej zawartości.
5. Produkty lecznicze pochodzące od różnych wytwórców, a zawierające tę samą substancję czynną, można dzięki technice ^{13}C CP MAS NMR identyfikować na podstawie sygnałów pochodzących od substancji pomocniczych wchodzących w skład danej formulacji.
6. Analiza intensywności sygnałów substancji w widmach ^{13}C CP MAS NMR, zarejestrowanych dla różnych formulacji, pozwala oszacować względną zawartość substancji czynnej w masie tabletkowej.

Dokonałem również pełnej analizy spektroskopowej ^{13}C NMR w ciele stałym 18 substancji pomocniczych, najczęściej wykorzystywanych w procesie wytwarzania stałych postaci leków. Stanowi to bazę do identyfikacji substancji pomocniczych wchodzących w skład danej formulacji, może być pomocne również w optymalizacji parametrów rejestracji widm ^{13}C CP MAS NMR stałych form leków.

Plan badawczy kontynuacji podjętej tematyki

Tematyka prac przedstawionych do oceny w rozprawie habilitacyjnej jest podstawą do dalszego rozwijania metodologii związanej z wykorzystaniem spektroskopii NMR w fazie stałej do analizy gotowych produktów leczniczych. Jednym z głównych kierunków badań będzie opracowanie metody analizy ilościowej zarówno substancji aktywnych, jak i pomocniczych wchodzących w skład danej formy leku. Wstępne wyniki przedstawione w publikacji [H2](#) sugerują, że spektroskopię ^{13}C CP MAS NMR można wykorzystać również w oznaczeniach ilościowych, jednak prosta analiza porównawcza intensywności sygnałów w widmie charakteryzuje się małą dokładnością, szczególnie w przypadku niskiej zawartości substancji czynnej w tablecie. Moim kolejnym celem badań będzie określenie wpływu parametrów rejestracji, jak również obróbki widma, na dokładność oraz powtarzalność uzyskanych wyników. Drugim kierunkiem badań będzie analiza wpływu procesu formulacji leku na parametry spektralne NMR. Planuję przeanalizować wpływ metod oraz warunków podczas procesów technologicznych, takich jak granulacja czy tabletkowanie, stosowanych w technologii stałych postaci leku, na położenie sygnałów w widmie oraz parametry relaksacyjne NMR. W ramach badań wykonane zostaną pomiary czasów relaksacji T_1 , T_2 oraz wyznaczone będą parametry kinetyki polaryzacji skrośnej dla sygnałów pochodzących od substancji czynnej oraz substancji pomocniczych. Badania będą dotyczyły substancji czystych (przed procesem formulacji) oraz gotowych produktów leczniczych. Analiza porównawcza pozwoli określić wpływ procesów technologicznych na strukturę i dynamikę substancji chemicznych wchodzących w skład danej stałej postaci leku. Uzyskane wyniki będzie można skorelować również z kinetyką uwalniania substancji czynnej z postaci leku.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Po obronie pracy magisterskiej rozpocząłem studia doktoranckie w Zakładzie Chemii Fizycznej na wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem Pani Prof. Iwony Wawer. Temat pracy doktorskiej związany był z zastosowaniem spektroskopii NMR oraz metod modelowania molekularnego w badaniu nowo zsyntetyzowanych związków o potencjalnej aktywności przeciwlękowej. Zagadnienia podjęte w pracy doktorskiej rozwinęły moje zainteresowania naukowe w kierunku metod obliczeniowych chemii kwantowej, jak również technik stosowanych w spektroskopii NMR.

Wyniki badań związanych z tematem pracy doktorskiej opublikowane zostały w czterech publikacjach (**B1–B3, A19**). Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałem wspomniany temat badań, ale dla bardziej różnorodnej grupy związków; zainteresowany byłem wykorzystaniem spektroskopii NMR w cieple stałym oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych w badaniach strukturalnych układów krystalicznych. We współpracy z Pracownią Krystalochemii Uniwersytetu Warszawskiego badałem struktury tautomeryczne wybranych układów amino-imidazolinowych. Na podstawie badań rentgenostrukturalnych, widm ^{13}C i ^{15}N NMR w cieple stałym oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych, przeanalizowałem równowagi tautomeryczne w badanych układach krystalicznych. Równocześnie w ramach macierzystego Zakładu rozpocząłem współpracę naukową z dr Tomaszem Gubicą, która dotyczyła badań strukturalnych wybranych związków o budowie glikozydowej w fazie stałej. We wspomnianych pracach jednym z głównych narzędzi badawczych była spektroskopia ^{13}C NMR w cieple stałym, a efektem tej współpracy był cykl czterech publikacji (**A7, A9, A10, A11**).

Równolegle rozpocząłem poszukiwanie alternatywnych kierunków badań naukowych związanych z zastosowaniem metod spektroskopii NMR w cieple stałym. Jednym z podjętych zagadnień były badania strukturalne naturalnego materiału bioceramicznego, jakim jest skorupa jaja kurzego, oraz analiza zmian zachodzących w jej obrębie w trakcie procesu inkubacji. Wspomniane badania były podstawą pracy magisterskiej, a później również rozprawy doktorskiej dr n. farm. Łukasza Szeleszczuka, której byłem promotorem pomocniczym. W ramach badań określone zostały zmiany składu chemicznego skorupy w trakcie inkubacji. Wykazaliśmy również, że zmiany te związane są między innymi z wymianą jonów wapnia na jony wodorowe oraz tworzeniem się wodorowęglanu wapnia. Przebadaliśmy również dostępność farmaceutyczną jonów wapnia ze wspomnianego materiału biologicznego. Wyniki omawianych prac zostały opublikowane w trzech publikacjach (**A2, A6, A12**).

Kolejnym kierunkiem podjętych przeze mnie badań było wykorzystanie spektroskopii NMR w analizie guzów mózgu. Obiektem badawczym były tkanki nowotworowe, a badania związane były wykorzystaniem techniki NMR w cieple stałym do badania liofilizatów tkankowych, oraz spektroskopii NMR w roztworze do analizy próbek otrzymanych po ekstrakcji frakcji lipidowej. Wyniki wspomnianych prac zostały opublikowane w dwóch artykułach (**A14, A15**).

Obecnie zaangażowany jestem również w projekt związany z syntezą i badaniami strukturalnymi biosyntetycznych pochodnych selenowych glukanów (grant NCN – OPUS5

realizowany pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Jadwigi Turło), w ramach którego odpowiedzialny jestem za wykonywanie obliczeń strukturalnych dla wspomnianych układów z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej i mechaniki kwantowej.

Uczestniczę również w projekcie metabolomicznym realizowanym we współpracy z Zakładem Toksykologii WUM oraz Zakładem Radiologii II Wydziału Lekarskiego WUM. Omawiane badania związane są z wykorzystaniem metod spektroskopii zlokalizowanej (MRS, ang. *Magnetic Resonance Spectroscopy*) w diagnostyce radiologicznej tkanek nowotworowych. Moim zadaniem jest rejestracja i analiza widm ^1H i ^{13}C NMR w roztworze ekstraktów tkankowych. Omawiany projekt ma na celu nie tylko rozwinięcie metod diagnostyki bazującej na technice spektroskopii zlokalizowanej MRS, lecz również próbę określenia korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami *in vitro* i *in vivo*.

6. Publikacje oryginalne niewchodzące w skład cyklu habilitacyjnego

A1. V. Enchev, N. Markova, M. Marinov, N. Stoyanov, M. Rogojerov, A. Ugrinov, I. Wawer, **D.M. Pisklak**, „2-Methylthioimidazolins: a rare case of different tautomeric forms in solid state and in solution”. *Journal of Structural Chemistry* 2016 DOI 10.1007/s11224-016-0860-4 **IF=1,854**

A2. L. Szeleszczuk, M. Kuras, **D.M. Pisklak**, I. Wawer, „Analysis of the changes in elemental composition of the chicken eggshell during the incubation period”. *Journal of Animal and Plant Science* 26, 583-587, 2016. **IF=0,442**

A3. L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, M. Zielińska-Pisklak, I. Wawer, „Effects of structural differences on the NMR chemical shifts in cinnamic acid derivatives: Comparison of GIAO and GIPAW calculations”. *Chemical Physics Letters* 653, 35-41, 2016. **IF=1,860**

A4. E. Pindelska, L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, Z. Majka, W. Kolodziejski, „Crystal structures of tiotropium bromide and its monohydrate in view of combined solid-state nuclear magnetic resonance and gauge-including projector-augmented wave studies”. *Journal of Pharmaceutical Science* 104, 2285-2292, 2015. **IF=2,641**

A5. E. Pindelska, L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, A. Mazurek, W. Kolodziejski, „Solid-state NMR as an effective method of polymorphic analysis: solid dosage forms of clopidogrel hydrogensulfate”. *Journal of Pharmaceutical Science* 104, 106-113, 2015. **IF=2,641**

A6. L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, M. Kuras, I. Wawer, „In vitro dissolution of calcium carbonate from the chicken eggshell: on the study of calcium bioavailability”. *International Journal of Food Properties* 18, 2791-2799, 2015. **IF=1,586**

A7. T. Gubica, L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, D.K. Stępień, M.K. Cyrański, M. Kańska, „Reliable evaluation of molecular structure of methyl 3-O-nitro- α -D-glucopyranoside and its intermediates by means of solid-state NMR spectroscopy and DFT optimization in the absence of appropriate crystallographic data”. *Tetrahedron* 70, 1910–1917, 2014. **IF=2,641**

A8. E. Pindelska, A. Sokal, L. Szeleszczuk, **D.M. Pisklak**, W. Kolodziejcki, „Solid-state NMR studies of theophylline co-crystals with dicarboxylic acids”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 100, 322-8, 2014. **IF=2,979**

A9. T. Gubica, D.K. Stępień, **D.M. Pisklak**, A. Ostrowski, M.K. Cyrański, „Single-crystal and powder X-ray diffraction, ^{13}C CP/MAS NMR, and DFT-GIAO calculations of methyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranoside and methyl-2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranoside”. *Journal of Molecular Structure* 1036, 407-413, 2013. **IF=1,599**

A10. T. Gubica, J. Bukowicki, D.K. Stępień, A. Ostrowski, **D.M. Pisklak**, M.K. Cyrański, „Solid-state structure of methyl 2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside and methyl 3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside”. *Journal of Molecular Structure* 1037, 49-56, 2013. **IF=1,599**

A11. T. Gubica, D.K. Stępień, A. Ostrowski, **D.M. Pisklak**, A. Temeriusz, E. Głowacka, K. Paradowska, M.K. Cyrański, „Crystal and molecular structure of nitrophenyl 2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-xylopyranosides”. *Journal of Molecular Structure*, 1007, 227-234, 2012. **IF=1,404**

A12. **D.M. Pisklak**, Ł. Szeleszczuk, I. Wawer, „ ^1H and ^{13}C magic-angle spinning nuclear magnetic resonance studies of the chicken eggshell”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **IF=2,906**

A13. M. Zielińska-Pisklak, **D. Pisklak**, I. Wawer, „ ^1H and ^{13}C NMR characteristics of β -blockers”. *Magnetic Resonance in Chemistry* 49, 284-290, 2011. **IF=1,437**

A14. R. Marszałek, **M. Pisklak**, D. Horsztyński, I. Wawer, „ ^1H , ^{13}C and ^{31}P MAS NMR studies of lyophilized brain tumors”. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 37, 21-27, 2010. **IF=1,804**

A15. R. Marszałek, **M. Pisklak**, W. Jankowski, J. Łukaszewicz, D. Horsztyński, I. Wawer, „NMR and gas chromatography studies of lyophilized human brain tumors”. Acta Poloniae Pharmaceutica 67, 129-136, 2010. **IF=0,465**

A16. **M. Pisklak**, M. Król, F. Herold, I. Wolska, I. Wawer, „Structural studies of pyrido[1,2-c] pyrimidine derivatives by ^{13}C CP MAS NMR, X-ray diffraction and GIAO/DFT calculations”. Journal of Molecular Structure 892, 325-330, 2008. **IF=1,594**

A17. K. Paradowska, M. Wolniak, **M. Pisklak**, J. Gliński, M. Davey, I. Wawer, „ ^{13}C , ^{15}N CP MAS NMR and GIAO DFT calculations of stereoisomeric oxindole alkaloids from Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*)”, Solid State Nuclear Magnetic Resonance 34, 202-209, 2008. **IF=1,804**

A18. M.A. Dobrowolski, M.K. Cyrański, **D. Pisklak**, I. Wawer, D. Matosiuk, „Structural studies of 1-aryl-2-aminoimidazolinium bromides: focus on tautomer preference of the 2-aminoimidazoline moiety in the solid state”. Polish Journal of Chemistry 81, 1037-1048, 2007. **IF=0,483**

A19. **M. Pisklak**, J. Kossakowski, M. Perliński, I. Wawer, „ ^1H , ^{13}C NMR studies and GIAO/DFT calculations of substituted N-(4-aryl-1-piperazynylbutyl) derivatives, new analogues of buspirone”. Journal of Molecular Structure 698, 93-102, 2004. **IF=1,060**

Sumaryczny IF= 32,939, MNiSW= 434

7. Publikacje przeglądowe niewchodzące w skład cyklu habilitacyjnego

B1. **D.M. Pisklak**, Ł. Szeleszczuk, „Komputerowe projektowanie leków, czyli farmacja in silico”. Współczesne problemy nauk medycznych. 2, 14-18, 2016.

B2. I. Wawer, **D.M. Pisklak**, K. Paradowska, Ł. Szeleszczuk, „Magiczny NMR w farmacji”. Współczesne problemy nauk medycznych 2, 40-48, 2016.

8. Publikacje oryginalne opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

C1. M. Pisklak, D. Maciejewska, F. Herold, I. Wawer, „Solid state structure of coumarin anticoagulants: warfarin and sintrom. ^{13}C CP MAS NMR and GIAO DFT calculations”. Journal of Molecular Structure 649, 169-176, 2003. **IF=1,021**

C2. M. Pisklak, F. Herold, R. Anulewicz-Ostrowska, I. Wawer, „Structural studies of 4-aryloctahydro-pyrido[1,2-c]pyrimidine derivatives”. Journal of Molecular Structure 605, 85-92, 2002. **IF=1,122**

C3. M. Pisklak, M. Perliński, J. Kossakowski, I. Wawer, „ ^{13}C CP MAS NMR and molecular modeling in the studies of new analogues of buspirone”. Acta Poloniae Pharmaceutica 596, 461-465, 2002.

Sumaryczny IF= 2,143

9. Udział w konferencjach

Konferencje międzynarodowe

D1. IXth Symposium Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Physics and Biological Sciences, Warszawa, 28–30.09.2016, Edyta Pindelska, Łukasz Szeleszczuk, Łukasz Dobrzycki, **Dariusz Pisklak**, Wacław Kołodziejski, Physicochemical characterization and crystal structure analysis of anhydrous and hydrated forms of zaleplon.

D2. 27th International Carbohydrate Symposium, Bangalore, Indie, 12-17.01.2014, Tomasz Gubica, Łukasz Szeleszczuk, **Dariusz Maciej Pisklak**, Dorota Stępień, Michał Cyrański, Reliable evaluation of molecular structure of carbohydrates by CP/MAS NMR spectroscopy and DFT optimization in the absence of crystallographic data.

D3. Ampere NMR School, Wierzba, 17-26.06.2010, **Dariusz Maciej Pisklak**, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer, ^1H and ^{13}C MAS NMR studies of chicken eggshell.

D4. 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdańsk, 08-12.06.2008, Monika Zielińska-Pisklak, **Maciej Pisklak**, Iwona Wawer, ^{13}C Solid state

spectroscopic investigation of crystalline nifedipine and amlodipine in both bulk and pharmaceutical dosage form samples.

Konferencje krajowe

E1. 59. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, 19-23.09.2016, Edyta Pindelska, Łukasz Szeleszczuk, Łukasz Dobrzycki, **Dariusz Pisklak**, Badania strukturalne i właściwości fizykochemiczne zaleplonu i jego hydratów.

E2. VI Minisymposium Młodych Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym, Warszawa, 24.02.2016, Jarosław Golis, Kinga Pasioneck, Izabela Wyżycka, **Dariusz Maciej Pisklak**, Łukasz Szeleszczuk, Badanie kwantowej dynamiki molekularnej i parametrów NMR azotanu (V) ołowiu.

E3. IV Konferencja Związki biologicznie czynne: aktywność, struktura, synteza, Białystok, 12-14.06.2015, Łukasz Szeleszczuk, **Dariusz Maciej Pisklak**, Iwona Wawer, Spektroskopowe badania skorupy jaja kurzego.

E4. VI Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 18-20.09.2014, **Maciej Pisklak**, Łukasz Szeleszczuk, Jakub Ogrodnik, Wykorzystanie pakietów dokujących w poszukiwaniu związków o potencjalnej aktywności przeciwalkoholowej.

E5. IV Bruker Users Meeting, Poznań, 3-4.10.2013, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer. NMR w fazie stałej – w badaniu tabletek o niskiej zawartości substancji czynnej.

E6. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Białystok, 18-21.09.2013, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer, NMR w fazie stałej – w badaniu tabletek o niskiej zawartości substancji czynnej.

E7. ChemSession'13, Warszawa, 17.05.2013. Łukasz Szeleszczuk, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Iwona Wawer. NMR w fazie stałej – w badaniu tabletek o niskiej zawartości substancji czynnej.

E8. 55. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Białystok, 16-20.09.2012, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer Analiza skorupy jaja kurzego.

E9. 55. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Białystok, 16-20.09.2012, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer, Badania stabilności substancji leczniczych w tabletkach metodą ^{13}C CP/MAS NMR.

E10. 55. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Białystok, 16-20.09.2012, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, Łukasz Szeleszczuk, Iwona Wawer. NMR w fazie stałej – w badaniu tabletek o niskiej zawartości substancji czynnej

E11. V Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 13-15.09.2012, Łukasz Szeleszczuk, **Dariusz Maciej Pisklak**, Emilia Dragan, Application of the docking programs in estimating the binding affinity to the SHBG protein.

E12. V Konwersatorium chemii medycznej, Lublin, 13-15.09.2012, Łukasz Szeleszczuk, **Dariusz Maciej Pisklak**, Piotr Bojanowski, Piotr Lipiński, A simple computational methodology used to distinguish between agonists and antagonists of the estrogen receptor.

E13. II Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe, Gdańsk, 15-16.09.2011, **Dariusz Maciej Pisklak**, Monika Zielińska-Pisklak, NMR w fazie stałej – badania składu tabletek.

E14. XLII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań, Kraków, 1-2.12.2009, Karolina Kamińska, Stanisław Adaszewski, Ewa Piątkowska-Janko, Piotr Bogorodzki, **Maciej Pisklak**, Firm quality assurances system :phantom and automatic data analysis.

E15. XLII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań, Kraków, 1-2.12.2009, Łukasz Kołaszewski, Piotr Bogorodzki, Ewa Piątkowska-Janko, Jerzy Piotrowski, Jerzy Skulski, **Maciej Pisklak** Detector for proton-electron double resonance imaging.

E16. XXXIX Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań, 30.11-01.12.2006, **M. Pisklak**, M. Tkaczyk, F. Herold, M. Król, I. Wolska, I. Wawer, ^{13}C CP MAS NMR i obliczenia GIAO/DFT w badaniach pochodnych pirydo[1, 2-c]piramidyny, nowych analogów buspironu

E17. XXXIX Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań 30.11-01.12.2006 M. Zielińska, I. Wawer, **D. M. Pisklak**, M. Tkaczyk, Nifedypina i produkty jej fotorozkładu - badania postaci leku metodą ^{13}C CP MAS NMR

E18. V Multidisciplinary Conference On Drug Reserach, 15-17.05.2006, **Dariusz Maciej Pisklak**, Iwona Wawer, Conformations of aryl-piperazines as studied by NMR and DFT calulations

E19. V Multidisciplinary Conference On Drug Reserach, 15-17.05.2006, Rafał Augustyniak, **Dariusz Maciej Pisklak**, Iwona Wawer, Grzegorz Gryniewicz, The role of C-ring of flavonoids for biological activity towards HCK and COX-2.

E20. XXXVIII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań. 1-2.12.2005 **Pisklak Dariusz Maciej**, Iwona Wawer, Michał Tkaczyk, Struktura wybranych pochodnych kwasu p-hydroksycynowego w swietle badan ^{13}C CP MAS NMR i obliczen DFT

E21. XXXVIII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań. 1-2.12.2005, M. Zielinska, D. M. Pisklak, J. Konarski, ^{13}C CP MAS obliczenia DFT dla wybranych leków z grupy B-adrenolityków.

E22. XXXVII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań, Kraków, 1-2.12.2004, **D.M. Pisklak**, B. Grodner, J. Pachecka, I. Wawer, Badanie mianseryny leku przeciwdepresyjnego metodą ^{13}C CP MAS NMR.

10. Staże naukowe

We marcu 2013 r. odbyłem miesięczny staż w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, w laboratorium NMR pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Marka Potrzebowskiego.

11. Odbyte kursy i szkolenia naukowe

We wrześniu 2016 uczestniczyłem w tygodniowej szkole NMR „Summer School on Theory of NMR” zorganizowanej w Lipsku. W ramach rozwoju naukowego uczestniczyłem również w licznych szkoleniach związanych z zastosowaniem metod obliczeniowych w projektowaniu leków organizowanych przez Interdyscyplinarne Centrum Modelowania. Dodatkowo jako wolny słuchacz uczestniczyłem w wykładach prowadzonych na Wydziale Fizyki UW.

12. Recenzje prac naukowych

Byłem recenzentem 7 prac naukowych w następujących czasopismach: Pharmaceutical Reserach (1), Chemical Physics (1) , Journal of Physical Chemistry (1), Journal of Molecular Structure (2), Ochrona Środowiska(1), Biuletyn WUM (1).

13. Udział w grantach naukowych

1. Grant NCN OPUS 5 nr. 2013/09/B/NZ7/03978 WUM - 3A93ZG, okres realizacji 19.05.2014 – 18.05.2018 r. Tytuł projektu: Selenowane polisacharydy- badania nad biosyntezą i zależnością pomiędzy strukturą a aktywnością immunologiczną. **Wykonawca grantu.**

2. Grant młodego badacza 03-FW-28/WB2/2004

Tytuł projektu: NMR i modelowanie molekularne w badaniach nowych analogów buspironu. **Kierownik grantu.**

Byłem również opiekunem trzech minigrantów studenckich zrealizowanych w ramach prac magisterskich:

1. Piotr Lipiński: grant nr FW28/NM3/12

Tytuł projektu: *Modelowanie molekularne w projektowaniu i optymalizacji nowych ligandów receptora androgennego.*

2. Katarzyna Nurzyńska: grant nr FW28/NM5/07

Tytuł projektu: *Antyoksydacyjne działanie kurkuminy a struktura molekularna.*

3. Jakub Konarski : grant nr FW28/NM3/2006

Tytuł projektu: *Poszukiwanie bioaktywnej konformacji β -adrenolityków z zastosowaniem algorytmu ewolucyjnego i spektroskopii NMR w fazie stałej.*

14. Współpraca naukowa

Współpraca z jednostkami spoza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego:

- Instytut Chemii Organicznej Bułgarskiej Akademii Nauk: prof. Venelin Enchev - w zakresie wykorzystania spektroskopii NMR w fazie stałej w badaniach stabilności tautomerycznej wybranych związków organicznych.

- Pracownia Krystalochemii, Wydział Chemii UW: prof. dr hab. Michał Cyrański – w zakresie wykorzystania spektroskopii NMR w fazie stałej w badaniach strukturalnych związków organicznych.

- Instytut Radioelektroniki, Politechnika Warszawska: dr hab. Piotr Bogorodzki - w zakresie wykorzystania spektroskopii NMR w analizie ilościowej metabolitów tkankowych.
- Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN: prof. dr hab. Paweł Grieb - w zakresie wykorzystania techniki NMR w fazie stałej w badaniach tkanek nowotworowych.
- Zakład Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW: prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk - w zakresie badań spektroskopowych materiałów biologicznych.

Współpraca z jednostkami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

- Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego WUM: dr Edyta Pindelska – w zakresie badań polimorfizmu związków o aktywności farmakologicznej (3 wspólne publikacje),
- Zakład Chemii Biomateriałów, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutycznego WUM: dr Marzena Kuras - w zakresie badań struktury i składu naturalnych materiałów bioceramicznych (2 wspólne publikacje),
- II Zakład Radiologii Klinicznej WUM: mgr Wojciech Szeszkowski - w zakresie wykorzystania spektroskopii NMR w analizie ilościowej metabolitów tkankowych.
- Zakład Toksykologii WUM: prof. dr hab. Ireneusz Grudziński - w zakresie wykorzystania spektroskopii NMR w analizie ilościowej metabolitów tkankowych.

15. Otrzymane nagrody za działalność naukową

Otrzymałem wyróżnienia w postaci trzech nagród naukowych:

- w roku 2014: Nagroda zespołowa naukowa III stopnia J.M. Rektora WUM za pracę dotyczącą farmaceutycznych ko-kryształów teofiliny;
- w roku 2012: Nagroda indywidualna naukowa III stopnia J.M. Rektora WUM za pracę związaną z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego w roztworze i ciele stałym w badaniu β -blokerów;
- w roku 2006: Nagroda zespołowa naukowa III stopnia J.M. Rektora WUM za pracę związaną z badaniami struktury Viagry metodą NMR ciała stałego;

16. Działalność dydaktyczna

a) Pełnienie funkcji promotora pomocniczego w ukończonych przewodach doktorskich:

Byłem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej p. dr Łukasza Szeleszczuka. Tytuł pracy: „Spektroskopowe badania skorupy jaja kurzego”. Obrona publiczna pracy odbyła się w dniu 28 października 2015 r.

b) Pełnienie funkcji promotora pomocniczego w rozpoczętych pracach doktorskich:

Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej p. mgr Jakuba Harwackiego. Temat pracy: „Wykorzystanie metod modelowania molekularnego w celu opracowania nowych metod przesiewu wirtualnego w grupie ligandów receptorów dopaminergicznych i serotonergicznych”. Planowany termin otwarcia przewodu doktorskiego - jesień 2017 r.

c) Opieka nad indywidualnym tokiem studiów „Projektowanie leków ”

Jestem odpowiedzialny za organizację i koordynację zajęć dla indywidualnego toku studiów „Projektowanie leków” dla studentów IV i V roku studiów kierunku farmacja. Byłem jedną z osób tworzących koncepcję oraz podstawy programowe tego bloku (zostałem uhonorowany za to nagrodą organizacyjną J.M. Rektora WUM w roku 2013). Prowadzę w ramach wspomnianego bloku seminarium oraz ćwiczenia z przedmiotów: „Modelowanie molekularne” oraz „Projektowanie leków”.

d) Opieka nad pracami magisterskimi:

Byłem opiekunem naukowym 23 prac magisterskich zrealizowanych w Zakładzie Chemii Fizycznej. Tematy prac dyplomowych związane były głównie z wykorzystaniem metod obliczeniowych lub zastosowaniem metod spektroskopii NMR w badaniach farmaceutycznych. W latach 2015-2016 byłem również recenzentem trzech prac magisterskich zrealizowanych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM.

e) Prowadzone zajęcia dydaktyczne:

W ramach zajęć dydaktycznych prowadzę ćwiczenia laboratoryjne oraz seminarium rachunkowe z przedmiotu „Chemia fizyczna” dla studentów II roku kierunku farmacja. Dla studentów V roku indywidualnego toku studiów „projektowanie leków” prowadzę ćwiczenia oraz seminarium z przedmiotu „Modelowanie molekularne” oraz „Projektowanie leków”. Prowadzone przeze mnie zajęcia były zawsze wysoko oceniane w ramach ankiet studenckich

f) Osiągnięcia związane z popularyzacją nauki:

1. Od roku 2015 jestem zaangażowany w prowadzenie zajęć dla licealistów w ramach programu „Poznaj nasz wydział” realizowanego na naszej Uczelni. W ramach tego programu prowadzę seminarium oraz ćwiczenia praktyczne z wykorzystania metod dokowania w projektowaniu leków.
2. W roku 2016 w ramach Festiwalu Nauki przygotowałem i wygłosiłem wykład na temat zastosowania metod modelowania molekularnego w projektowaniu nowych leków.
3. Wygłosiłem dwa wykłady na posiedzeniach Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego:
 - w dniu 10.06.2014, wykład pt. „Projektowanie leków - współczesne wyzwanie przemysłu farmaceutycznego”;
 - w dniu 25.10.2016, wykład pt. „Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w farmacji i medycynie”

17. Działalność organizacyjna

1. Od roku 2012 jestem przedstawicielem pracowników naukowych w Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM.
2. Jestem osobą odpowiedzialną za koordynację zajęć w ramach indywidualnego toku studiów Projektowanie Leków.
3. W roku obecnym zostałem powołany jako członek Rady Programowej ds. Bloków Fakultatywnych funkcjonującej w ramach Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM.
4. W latach 2012-2015 byłem członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na Wydziale Farmaceutycznym WUM.
5. Byłem członkiem jury w XLV i XLVI Konkursie Prac Magisterskich w roku akademickim 2007/2008 oraz 2008/2009.
6. Od 2014 r. jestem recenzentem prac w dziedzinie farmacji zgłaszanych na Warszawski Międzynarodowy Kongres Medyczny (WIMC), organizowanym przez Samorząd Studentów WUM.

18. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (PTFarm) oraz Polskiego Towarzystwa Chemicznego (PTChem).

Pisklak Dariusz Maciej

Dariusz Maciej Pisklak

Zakład Chemii Fizycznej

Wydział Farmaceutyczny

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny