AUTOREFERAT

1. Wykształcenie/stopnie naukowe:

1987 – Doktor Nauk Chemicznych, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii
1977 – Magister Chemii, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

2. Przebieg zatrudnienia:

Grudzień 1997 do dzisiaj – Narodowy Instytut Leków, Warszawa – kierownik Zakładu Wyrobów Medycznych, kierownik Pracowni Analizy Produktów Sfałszowanych

Kwiecień 1991 do dzisiaj – Narodowe Centrum Badań Jądrowych (dawniej: Instytut Energii Atomowej – Polatom), Pracownia Badań Rentgenowskich; kierownik pracowni

Lipiec – wrzesień 1994 – University of California, San Diego, Department of Medicine, La Jolla, California, USA – Visiting Research Professor.

Luty 1989 – grudzień 1990 – University of Illinois, Department of Chemistry, Urbana, Illinois, USA – Postdoctoral Research Associate

Październik 1986 – styczeń 1989 – Instytut Chemii Fizycznej PAN, Warszawa – adiunkt

Październik 1977 – wrzesień 1986 – Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii – asystent, starszy asystent

3. Ogólna charakterystyka dorobku

Dr Jan K. Maurin jest autorem i współautorem 121 publikacji naukowych z pogranicza farmacji, chemii i krystalografii dotyczących:

- Struktur związków farmakologicznie czynnych;
- kinaz białkowe i ich inhibitorów – roli inhibitorów jako leków antyrakowych;
- badania leków sfałszowanych metodami rentgenowskimi

Do oceny w ramach postępowania habilitacyjnego wyodrębniono 20 publikacji opisujących wyniki badań, których część wykonana osobiście przez Jana Maurin związana była z zastosowaniem dyfrakcji rentgenowskiej. Prace te dotyczyły struktur związków farmakologicznie czynnych z grupy alkaloidów izochinolinowych i β-karbolinowych oraz badań rentgenowskich produktów leczniczych.

4. Osiągnięcie naukowe.

4.1. Tytuł osiągnięcia:

Zastosowanie rentgenowskich metod dyfrakcyjnych do badania substancji o aktywności farmaceutycznej oraz produktów leczniczych.

4.2. Publikacje naukowe zgłoszone do oceny w postępowaniu habilitacyjnym[1] wraz z liczbą cytowań i wartością „impact factor".

		l. cyt.[2]	I.F.[3]
H1.	Zbigniew Czarnocki, Jan Maurin (1993). "Enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids from simple sugar. I. Structure of an oxaziridine derivative". *Acta Cryst.* **C49**, 1992-1994. *(Wkład indywidualny 70%)*	3	0.437
H2.	Zbigniew Czarnocki, Jan Maurin, Małgorzata Winnicka-Maurin (1994). "Enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids from simple sugar. II. Structure of 1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)-1,2,3,4-butanetetrayl tetraacetate N-oxide". *Acta Cryst.* **C50**, 1779-1781. *(Wkład indywidualny 65%)*	4	0.437
H3.	Z. Czarnocki, J.K. Maurin, A. Leniewski (1995). "Synthesis, X-ray and spectroscopic studies of 2-acetoxy-(1S)-[(1'S,2'R)-diacetoxy-2'-methoxycarbonyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline". *Polish J. Chem.*, **69**, 805-811. *(Wkład indywidualny 50%)*	0	0.380
H4.	Jan K. Maurin, Zbigniew Czarnocki, Beata Paluchowska (1996). "(S)-1-Acetoxymethyl-2-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-methylisoquinoline". *Acta Cryst.* **C52**, 953-955. *(Wkład indywidualny 65%)*	5	0.437
H5.	Z. Czarnocki, M. Ziółkowski, A. Leniewski, J.K. Maurin (1999). "Highly enantioselective synthesis of S-(+)-calycotomine from L-ascorbic acid and absolute assignement of its enantiomeric Excess". *Enantiomer*, **4**, 71-77. *(Wkład indywidualny 25%)*	2	1.417[4]
H6.	M. Ziółkowski, Z. Czarnocki, A. Leniewski, J.K. Maurin (1999). "(S)-(-)-α-Methylbenzylamine as an efficient chiral auxiliary in enantiodivergent synthesis of both enantiomers of N-acetylcalycotomine" *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3371-3380. *(Wkład indywidualny 25%)*	16	2.652
H7.	A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K.Wojtasiewicz, Z.Czarnocki (2001). "Diastereoselective Synthesis of 1-benzyltetrahydroisoquinoline derivatives from amino acids via 1,4 chirality transfer. Part 1". *Org. Lett.* **3**(7), 997-999. *(Wkład indywidualny 35%)*	22	5.558
H8.	A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K.Wojtasiewicz, A. Siwicka, Z.Czarnocki (2003). "Synthesis and crystal structure of hydrogenated pyrazino[2,1-a]isoquinoline derivatives". *Polish J. Chem.* **77**, 565-576. *(Wkład indywidualny 40%)*	1	0.380
H9.	A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K. Wojtasiewicz, A. Siwicka, D. Blachut, Z. Czarnocki (2003). "Diastereoselective Synthesis of 1-Benzyltetrahydroisoquinoline Derivatives from Amino Acids by 1,4 Chirality Transfer". *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2443-2453. *(Wkład indywidualny 30%)*	6	3.289

[1] W spisie podkreślono prace, w których dr Jan Maurin pełnił również rolę autora korespondującego.
[2] Dane na temat cytowań według przeszukania „web of knowledge" wykonanego 15-04-20123
[3] Podano średnią wartość z ostatnich 5 lat
[4] Czasopismo obecnie nie istnieje. Zastosowano wartość IF z roku 2002

		l. cyt.	I.F.
H10.	J. Szawkało, S.J. Czarnocki, A. Zawadzka,. K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, Z. Czarnocki, J. Drabowicz (2007). "Enantioselective synthesis of some tetrahydroisoquinoline and tetrahydro-β-carboline alkaloids". *Tetrahedron: Asymmetry,* **18**, 406–413. *(Wkład indywidualny 40%)*	51	2.652
H11.	A. Siwicka, K. Wojtasiewicz, A. Zawadzka, J.K. Maurin, Z. Czarnocki (2005). "The structure of some *trans*-diketopiperazine derivatives of isoquinoine and β-carboline". *Tetrahedron: Asymmetry,* **16**, 2071-2073. *(Wkład indywidualny 60%)*	1	2.652
H12.	Z. Araźny, Z. Czarnocki, K. Wojtasiewicz, J.K. Maurin (2000). "Enantioselective synthesis of (1*R*)-1-(hydroxymethyl)-2-acetyl-1,2,3,4-trtrahydro-β-carboline from L-(+)-tartaric acid". *Tetrahedron: Asymmetry,* **11**, 2793-2800. *(Wkład indywidualny 35%)*	6	2.652
H13.	A. Siwicka, K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, Z. Czarnocki, (2002). "Diastereoselective synthesis of some β-carboline derivatives from L-aminoacids". *Tetrahedron:Asymmetry*, **13**, 2295-2297. *(Wkład indywidualny 60%)*	4	2.652
H14.	P. Roszkowski, K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, T. Lis, Z. Czarnocki (2005). "Enantioselective synthesis of 1-substituted tetrahydro-β-carboline derivatives via the asymetric transfer hydrogenation". *J. Mol. Cat. A Chemical* **232**, 143-149. *(Wkład indywidualny 20%)*	20	3.336
H15.	J.K. Maurin, F. Pluciński, A.P. Mazurek, Z. Fijałek, (2007). "The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control – The Viagra example" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1514-1518. *(Wkład indywidualny 85%)*	28	2.979
H16.	Ł. Komsta, J.K. Maurin (2010). "Recognition af active ingredients in tablets by chemometric processing of X-ray diffractometric data" *Talanta* **82** 850-853. *(Wkład indywidualny 70%)*	1	3.747
H17.	K. Stypułkowska, A. Błażewicz, J. Maurin, K. Sarna, Z. Fijałek (2011). "X-ray powder diffractometry and liquid chromatography studies of sibutramine and its analogues content in herbal dietary supplements". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 969-975. *(Wkład indywidualny 30%)*	3	2.979
H18.	B.J.Venhuis, M.V. Vredenbregt, N. Kaun,, J.K. Maurin, Z. Fijałek, D. de Kaste (2011). "The identification of rimonabant polymorphs, sibutramine and analogues of both in counterfeit Acomplia bought on the internet". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**, 21-26. *(Wkład indywidualny 20%)*	4	2.979

Sumaryczna liczba cytowań – 142 (z pominięciem autocytowań 135),
Sumaryczny "impact factor" – 41.615
Indeks Hirsha (dla 20 publikacji) H = 6

4.3. Wstęp.

Rentgenowskie metody dyfrakcyjne mają ponad 100 letnią historię. Wszystko zaczęło się od odkrycia promieniowania X przez Wilhelma Konrada Roentgena w 1895 roku, za które to odkrycie otrzymał on nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki w 1901[1] roku. Była to zresztą pierwsza w historii nagroda Nobla w dziedzinie fizyki. Późniejsze odkrycie dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach i zastosowanie tego zjawiska do analizy struktur kryształów (prace Maxa von Laue, Williama Henry'ego oraz Williama Laurenca Braggów[2] - nagrody Nobla odpowiednio w 1914 i 1915 roku) dały początek burzliwie rozwijającej się dziedzinie doświadczalnej. Wyniki prac oraz rozwój metodologii niejednokrotnie zostały docenione przez komitet noblowski.

Metody rentgenowskie oparte na zjawisku dyfrakcji, a więc pomijając zarówno metodę fluorescencji rentgenowskiej, jak i niskokątowego rozpraszania, dzielą się na te, których obiektem są pojedyncze kryształy oraz te, które badają próbki proszkowe i polikrystaliczne. Oba te warianty są cenne zarówno dla poszukiwania nowych leków jak i badaniu leków już istniejących. Pierwszy wariant metody proszkowej stanowiła tzw. metoda Debye'a-Scherrera. Była ona podstawą utworzonych baz danych dyfrakcyjnych (obecne bazy pdf-2, pdf-4+), służących do analizy jakościowej substancji stałych. Między innymi za prace nad dyfrakcją Paul Debye otrzymał nagrodę Nobla z chemii w 1936 roku,[3] chociaż nie były to być może najważniejsze z jego osiągnięć naukowych.

Moje zainteresowania od dłuższego czasu związane są z rolą związków organicznych, będących potencjalnymi lekami, a jako krystalografa, z zastosowaniem rentgenowskich metod dyfrakcyjnych do określania struktury tych związków i identyfikacji produktów leczniczych. Stąd też w moim dorobku można wyróżnić grupę prac związanych ze związkami naturalnymi o potencjalnych i udowodnionych właściwościach farmakologicznych, grupą związków pomyślanych jako selektywne inhibitory lub aktywatory enzymów i mogących pełnić rolę w leczeniu nowotworów, jak również prace o charakterze bardziej analitycznym związanych problemem leków sfałszowanych. Badania strukturalne mimo że istotne mają często charakter służebny w stosunku do takich dziedzin, jak synteza związków optycznie czynnych, czy badanie oddziaływań w układach biochemicznych. Implikuje to konieczność szerokiej współpracy, głównie z chemikami zajmującymi się syntezą organiczną, biochemikami i farmakologami. Z drugiej strony wyniki prac strukturalnych i modelowania molekularnego pozwalają zarówno wyjaśnić i zaprojektować przebieg reakcji, jak i opisać właściwości elektronowe i reaktywność cząsteczek otrzymanych związków.

W niniejszym autoreferacie postanowiłem wyodrębnić ze swego dorobku naukowego dwie grupy prac istotnych z punktu widzenia farmacji: badań strukturalnych substancji biologicznie aktywnych z grupy alkaloidów izochinolinowych i β-karbolinowych, oraz badań za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej produktów farmaceutycznych.

4.3.1. Badania monokryształów.

Badanie rentgenowskie monokryształów mają na celu pomiar natężeń wiązek dyfrakcyjnych pochodzących od wszystkich możliwych rodzin płaszczyzn sieciowych. Warunki geometryczne dla zajścia zjawiska dyfrakcji na sieci krystalicznej opisuje tzw. prawo Bragga:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} \qquad (1),$$

gdzie n jest rzędem ugięcia, λ długością fali monochromatycznego promieniowania, d_{hkl} odległością międzypłaszczyznową dla płaszczyzny (hkl), a θ_{hkl} charakterystycznym kątem braggowskim. Doświadczalnie więc w pomiarach wykorzystuje się takie urządzenia, które umożliwiają ustawienie odpowiedniej płaszczyzny sieciowej w pozycji odbijającej. W praktyce wykorzystywałem w badaniach monokrystaliczne dyfraktometry czterokołowe - początkowo przyrząd wyposażony w detektor punktowy, w realizacji późniejszych prac aparat z dwuwymiarowym detektorem pozycyjnie czułym opartym na technice ccd.
Ogólnie natężenie refleksów zależy od szeregu czynników. I tak:

$$I(hkl) = |F(hkl)|^2 \cdot A \cdot PL \cdot l^2 \qquad (2)$$

natężenie danego refleksu zależy od amplitudy struktury $|F(hkl)|^2$, absorpcji oraz czynnika Lorentza. Zaś $F(hkl)$ jest związane ze strukturą kryształu zależnością:

$$F(hkl) = \int_V \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV \qquad (3),$$

gdzie całkowanie jest prowadzone po całej objętości komórki elementarnej kryształu, a $\rho(xyz)$ jest gęstością elektronową w punkcie o współrzędnych x,y,z. Odwrotna zależność, czyli tak zwana odwrotna transformata Fouriera:

$$\rho(xyz) = \int_{V^*} F(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} dV^* \qquad (4),$$

gdzie całkowanie odbywa się w przestrzeni odwrotnej po całej objętości komórki elementarnej w sieci odwrotnej, wiąże gęstość elektronową w punkcie x,y,z $[\rho(xyz)]$ z czynnikami struktury $F(hkl)$. Te zależności mówią mniej więcej tyle, że jeśli zmierzymy natężenia wszystkich niezależnych refleksów, to możliwe jest rozwiązanie struktury, czyli znalezienie na ich podstawie rozkładu gęstości ładunku w komórce elementarnej a w konsekwencji położeń wszystkich atomów. Mając współrzędne atomów w komórce elementarnej możemy wyliczyć wszystkie interesujące parametry dla kryształu i cząsteczek takie jak długości wiązań, kąty między wiązaniami, kąty torsyjne, odległości międzycząsteczkowe itp. Ponieważ w zależności (2) występuje kwadrat modułu wielkości, która jest liczbą zespoloną, kluczowym zagadnieniem w krystalografii jest rozwiązanie tzw. problemu fazowego. Nie będę tutaj wchodził w szczegóły teorii, a wspominam o tym, gdyż problem ten obecny w strukturach chiralnych jest istotny z punktu widzenia syntetycznej chemii organicznej, gdyż właściwe przypisanie struktury absolutnej staje się możliwe, jeśli w sposób właściwy przeprowadzi się eksperyment i późniejsze obliczenia. Jednocześnie należy tutaj podkreślić fakt, że eksperyment rentgenowski wykorzystujący anomalne rozpraszanie i statystyczną ocenę jego wpływu w dwóch przeciwnych enancjomerach (czynnik Flacka)[4] jest jedyną obiektywną metodą określenia konfiguracji absolutnej związku. Wartość parametru Flacka dla poprawnej konfiguracji powinna wynosić **0**, zaś dla struktury przeciwnej **+1**. Udział współczynnika anomalnego jest większy dla promieniowania charakterystycznego CuKα niż dla równie często stosowanego w badaniu monokryształów promieniowania MoKα. Jednocześnie atomowe współczynniki są większe dla atomów cięższych. Stąd obecność w strukturze atomów siarki, chloru itd. Pozwala wyznaczyć parametr Flacka z niższym odchyleniem standardowym i w konsekwencji wyznaczyć w sposób pewny strukturę absolutną. Przypisanie konfiguracji związku było kluczowym zadaniem, jakie stawiałem sobie przystępując do badania monokryształu. Sam proces

rozwiązywania struktur na podstawie zmierzonych natężeń refleksów prowadziłem stosując oprogramowanie *SHELXS-97* oraz *SHELXL-97* Georga M. Sheldricka[5].

4.3.2. Rentgenowskie badania próbek polikrystalicznych.

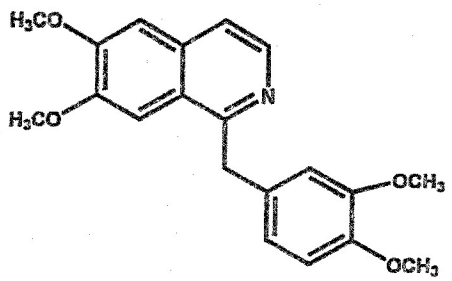
Rentgenowska dyfraktometria proszkowa jest uznaną i podstawową metodą analityczną w badaniach ciała stałego. Zasadniczą różnicą w porównaniu z badaniami na monokryształach jest forma próbki, którą można traktować, jako zbiór losowo zorientowanych krystalitów. W związku z tym niezależnie od orientacji całości próbki względem pierwotnej wiązki promieniowania zawsze istnieją krystality, dla których jeśli tylko spełnione jest równanie Bragga, można zarejestrować refleks. Jednocześnie obraz dyfrakcyjny ma formę $I = f(2\theta)$ i liczba danych jest znacząco mniejsza niż ma to miejsce dla monokryształów.

Każda substancja krystaliczna charakteryzuje się siecią przestrzenną opisywaną przez komórkę elementarną o ściśle określonych wymiarach i symetrii. Odpowiada temu określony zestaw kątów dyfrakcyjnych 2θ, przy których można oczekiwać refleksów w doświadczeniu rentgenowskim. Dodatkowo natężenia poszczególnych refleksów są ściśle związane z zawartością komórki elementarnej. Stąd też dana substancja krystaliczna ma charakterystyczne, niezmienne w czasie widmo dyfrakcyjne (dyfraktogram). Podobnie mieszaniny substancji krystalicznych dają rentgenowski obraz dyfrakcyjny będący superpozycją dyfraktogramów poszczególnych składników mieszaniny, przy czym „sumowanie" dyfraktogramów uwzględnia zawartości poszczególnych składników w mieszaninie. Dlatego metoda ta może być stosowana w analizie jakościowej i ilościowej próbek polikrystalicznych. Jest ona stosunkowo rzadko stosowana przez przemysł farmaceutyczny, chociaż w niektórych przypadkach jest jedyną metodą dającą odpowiedź wprost np. w badaniach polimorfizmu substancji krystalicznych. Jedną z przyczyn takiego stanu jest wysoka cena aparatury rentgenowskiej. Inną może być to, że jako metoda fizykochemiczna została wprowadzona do Farmakopei Europejskiej dopiero w 2007 roku[6]. Być może dlatego w laboratoriach przemysłowych, jak i laboratoriach kontroli leków stosowana jest rzadko. I tak wśród oficjalnych europejskich rządowych laboratoriów kontroli leków (OMCL network) współdziałających z Europejskim Dyrektoriatem Jakości Leków (EDQM) i Europejską Agencją Leków (EMA) dotychczas taka aparatura działa jedynie w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie. W ostatnich latach oprócz rutynowych prac kontrolnych prowadziłem prace naukowe mające na celu pokazanie skuteczności tej metody, jako jakościowej metody analitycznej w badaniach skriningowych produktów leczniczych. Pozwalają one rozróżnić produkty o podobnym składzie, a różnym pochodzeniu, co umożliwia wykryć leki sfałszowane.

4.3.3. Alkaloidy.

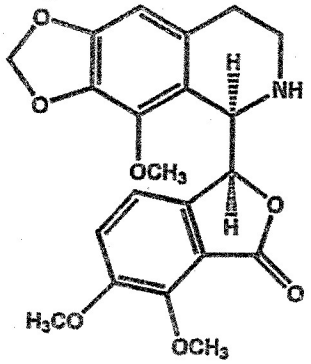
Alkaloidy są grupą azotowych związków naturalnych o właściwościach zasadowych, syntezowanych głównie przez rośliny. Najczęściej są to azotowe związki heterocykliczne, choć niektórzy autorzy dołączają do tej grupy również związki, w których azot aminowy umieszczony jest we fragmencie alifatycznym np. amfetaminę. Alkaloidy są wytwarzane na drodze biosyntezy z aminokwasów. Choć zawartość alkaloidów w roślinach jest nieznaczna i na ogół nie przekracza kilku procent suchej masy. Ta nieznaczna ilość jest odpowiedzialna za bardzo silne działanie farmakologiczne ziół (ziela, kwiatów, nasion i korzeni). Znane od wieków działanie lecznicze, narkotyczne i trujące roślin było w przeszłości impulsem do badań, które doprowadziły do wyizolowania ponad 8000 alkaloidów. Ich działanie rozciąga się od narkotycznego (np. alkaloidy opium), poprzez anty-psychotyczne, hipotensyjne, zwiotczające, rozkurczowe, do pobudzających działanie mięśnia sercowego, czy wreszcie działania cytostatycznego (np. winkrystyna i winblastyna).

W pracach będących przedmiotem autoreferatu zajmowaliśmy się pochodnymi izochinoliny i indolu (w tym pochodnymi β-carboliny). Związki zawierające szkielet izochinoliny występują często w układach roślinnych i mają właściwości narkotyczne i przeciwbólowe i rozkurczowe. Przykładowo papaweryna – Rys. 1 stosowana jest doustnie w stanach skurczowych przewodu pokarmowego, kolce wątrobowej, skurczach mięsni macicy itp.[7].



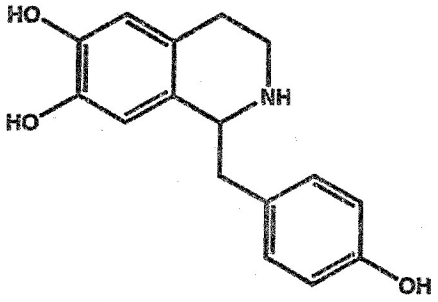
Rys. 1. Papaweryna.

Zajmowaliśmy się nie tyle samym układem izochinolinowym, ile związkami zawierającymi fragment 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny. Układ ten jest ważny i występuje w wielu naturalnie występujących alkaloidach o silnej aktywności biologicznej. Takim alkaloidem jest np. narkotyna (noskapina – Rys. 2) występująca w opium. Posiada ona właściwości znieczulające i potęgujące działanie przeciwbólowe morfiny. Główne jej zastosowanie to działanie przeciwkaszlowe i jest stosowana jako składnik wielu leków OTC[8]. Są również doniesienia o jej działaniu przeciwnowotworowym np. w raku prostaty.



Rys. 2. Noskapina (narkotyna)

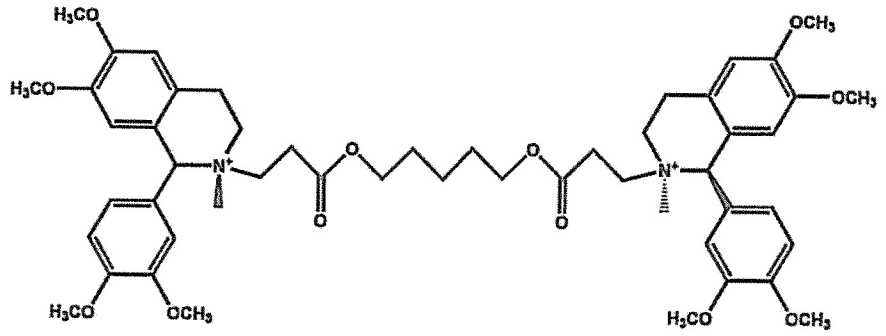
Innym przykładem jest higenamina (Rys. 3), będąca agonistą receptorów β-2 adrenergicznych[9] i posiadająca działanie stymulujące serce i rozszerzające naczynia krwionośne.[10]



Rys. 3. Higenamina

Działanie rozkurczowe układów zawierających fragment tetrahydroizochinoliny jest najbardziej widoczne na przykładzie leków o nazwach atrakurium i *cis*-atrakurium (Rys. 4). Leki te stosowane są jako leki zwiotczające podczas intubowania pacjentów oraz podczas operacji chirurgicznych np. podczas cięcia cesarskiego. Należy zwrócić uwagę, że atrakurium

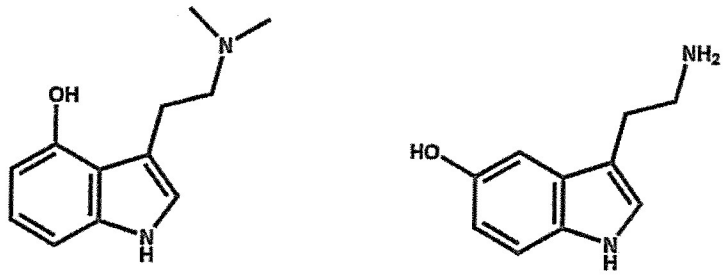
jest mieszaniną 10 izomerów. Po raz pierwszy lek został wprowadzony w lecznictwie w 1979 roku[11,12]. Ze względu jednak na efekty uboczne tej mieszaniny prowadzone były intensywne badania poszczególnych izomerów, co doprowadziło w końcu do opracowania syntezy i oczyszczania cis-atrakurium - izomeru o najlepszych własnościach,[13,14] który sprzedawany jest pod nazwą Nimbex. W atrakurium cisatrakurium stanowi jedynie około15%[15].



Rys. 4. Cis-atracurium.

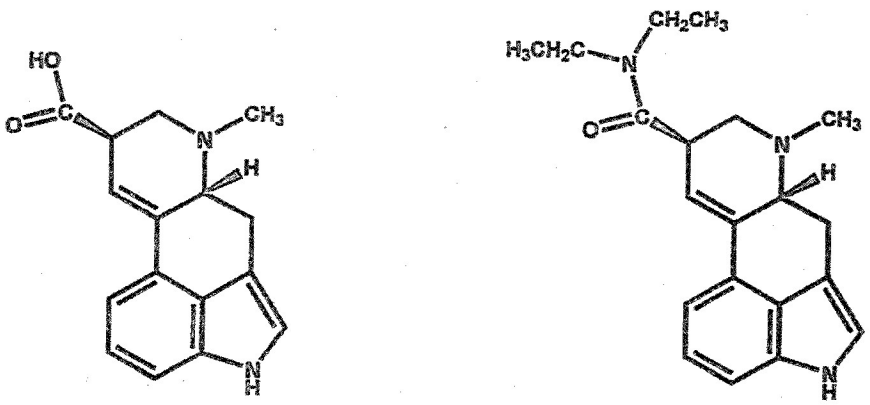
Przykład ten pokazuje, jak ważny jest problem konfiguracji związku w przypadku substancji farmaceutycznej.

Alkaloidy indolowe dzieli się na kilka podgrup w zależności od komplikacji układu: zaczynając od najprostszych pochodnych tryptaminy, poprzez pochodne β-karboliny do pochodnych kwasu lizerginowego, alkaloidów sporyszu i alkaloidów bisindolowych (np. winblastyny). Pochodne tryptaminy mają dość silne działanie ze względu na wysokie powinowactwo do receptorów serotoninowych wynikające z ich podobieństwa do serotoniny (Rys. 5).



Rys. 5. Porównanie psylocyny i serotoniny.

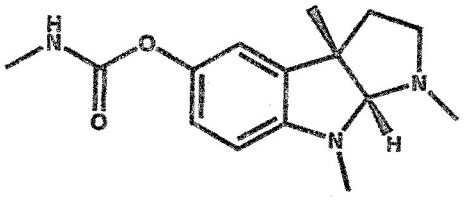
Serotonina jest jedną z cząsteczek uczestniczących w przenoszeniu sygnału w układzie nerwowym poprzez oddziaływanie z receptorami seretoninowymi 5-HT i w konsekwencji uwalnianie strumienia jonów w synapsach. Psylocyna oraz jej fosforylowana forma psylocybina – obie występują w niektórych grzybach - mają właściwości psychodeliczne podobnie, jak pochodne kwasu lizergowego np. popularny w latach 60-tych ubiegłego wieku LSD (Rys. 6).



Rys. 6. Kwas lizergowy (lewa strona) i jego amid dietylowy – LSD (prawa strona)

Chociaż aktywność biologiczna LSD jest wiązana potocznie z jego właściwościami psychodelicznymi posiada on ciekawe zastosowania farmakologiczne.[16] Znane są doniesienia o pozytywnych rezultatach zastosowania LSD w leczeniu alkoholizmu[17], leczeniu klastrowych bólów głowy[18] i wspomaganiu leczenia przeciwbólowego w terminalnych stanach nowotworów.[19].

Małą grupą alkaloidów indolowych jest grupa fizostygminy będącej alkaloidem pirolo-indolowym (Rys. 7). Fizostygmina jest odwracalnym inhibitorem acetylocholinesterazy i ma znaczenie np. w leczeniu choroby Alzheimera[20,21] i jaskry.

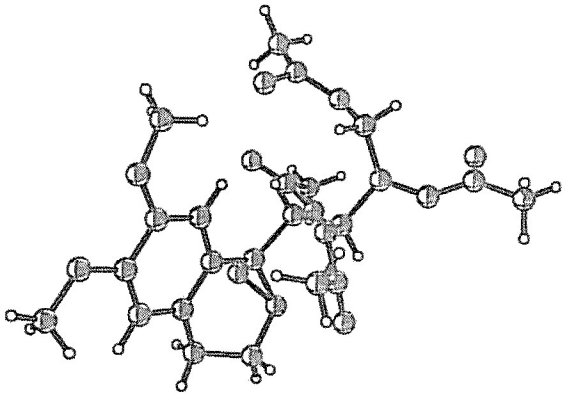


Rys. 7. Fizostygmina.

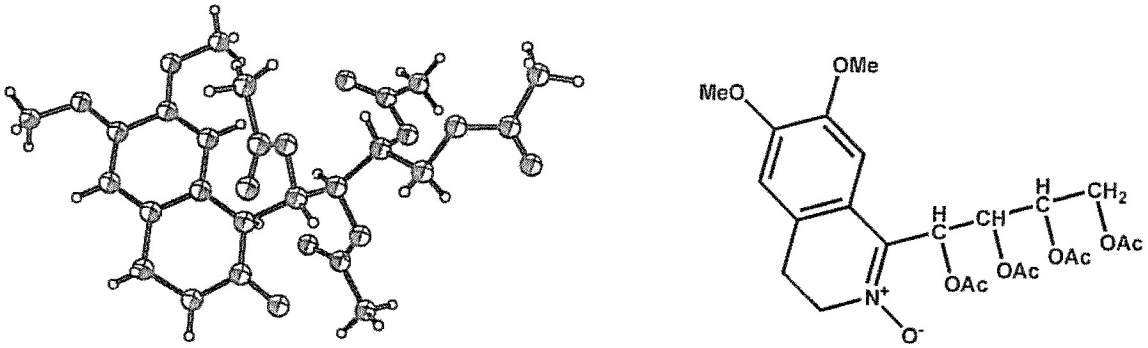
4.4. Enancjoselektywna synteza alkaloidów izochinolinowych – badania strukturalne.

Jak wspomniałem we wstępie, alkaloidy występujące naturalnie w roślinach stanowią jedynie nieznaczny procent ich suchej masy. Chociaż w niektórych przypadkach nadal pozyskuje się aktywne związki ze źródeł naturalnych, coraz większe znaczenie ma ich synteza „totalna", czyli otrzymywanie z prostych, dostępnych substratów. Jak wspomniano uprzednio, aktywność biologiczna i farmakologiczna poszczególnych związków w dużej mierze związana jest z ich chiralnością, a więc z konkretną strukturą absolutną. Stąd też nacisk, jaki kładzie się na opracowanie wydajnych metod syntezy enancjoselektywnej, jak również wydajne metody rozdziału enancjomerów. W syntezach chemicznych jako substraty stosuje się łatwo dostępne związki chiralne takie jak cukry i aminokwasy.

Przykładem tego nurtu są nasze prace, w których stosowano prostą pochodną cukrową, D-rybonolakton, w celu otrzymania takich alkaloidów jak kalykotomina i (*S*)-ksylopinina. W trakcie prac jednym z produktów przejściowych, których strukturalną charakteryzację prowadziłem metodami rentgenowskimi była pochodna oksazyrydynowa[22] (Rys. 8) oraz *N*-tlenek[23] (Rys. 9).



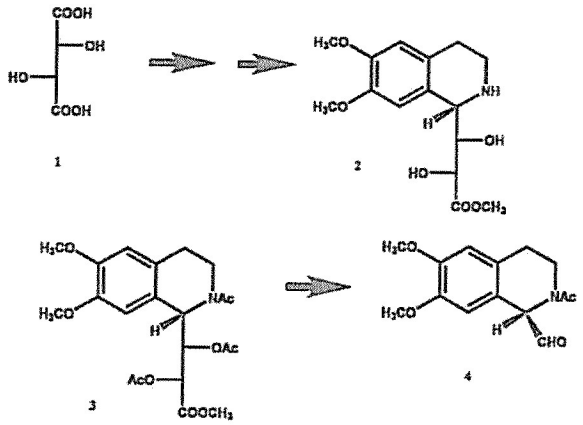
Rys. 8. Struktura cząsteczki pochodnej oksazyrydynowej.



Rys. 9. Struktura cząsteczkowa N-tlenku.

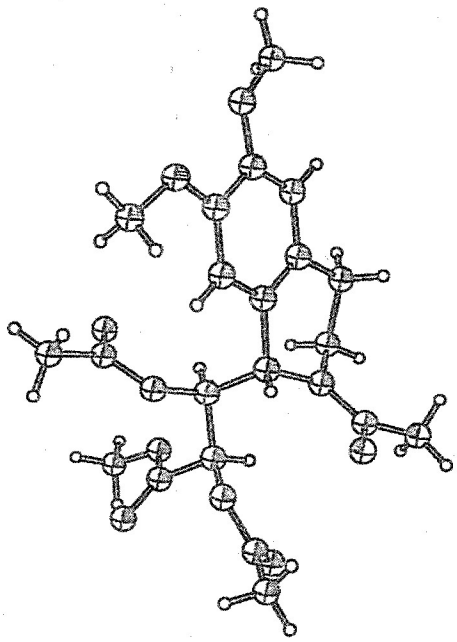
Oba przytoczone związki, jako związki chiralne, krystalizują w niecentrosymetrycznych grupach przestrzennych. W przypadku pochodnej oksazyrydynowej (krystalizuje ona w grupie $P2_12_12_1$), badania pozwoliły określić konfigurację na atomie C(1) fragmentu tetrahydroizochinolinowego oraz konformację całej cząsteczki. Choć pokazana na Rys. 9 cząsteczka *N*-thenku różni się jedynie nieznacznie od poprzedniej, związek ten krystalizuje w całkiem innej grupie przestrzennej ($P2_1$).

Następnie zajmowaliśmy się zastosowaniem kwasu (2*R*,3*R*)-winowego w syntezie pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny[24]. W wyniku kolejnych etapów syntezy (Rys. 10) otrzymano pochodną **4**. Konfigurację związków potwierdziłem w badaniach rentgenowskich przez pomiar i rozwiązanie struktury dla kryształu związku **3**.



Rys. 10. Główne produkty przejściowe i produkt końcowy

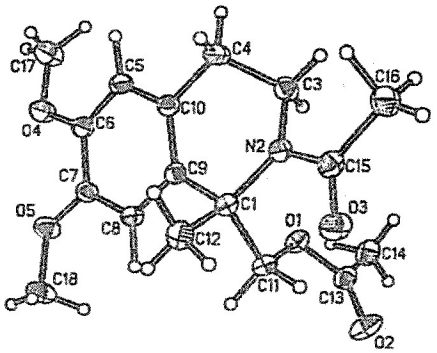
Należy tu zaznaczyć, że zastosowanie kwasu (2*S*,3*S*)-winowego prowadzi nie do związku **4**, ale do jego enancjomeru **ent-4**. Rys. 11 przedstawia strukturę cząsteczki **3**, która była przedmiotem badań strukturalnych.



Rys. 11. Struktura cząsteczki 2-acetoksy-(1S)-[(1'S,2'R)-diacetoksy-2'-metoksykarbonylo]-6,7-dimetoksy-1,2,3,4-tetrahydroisochuinoliny (3).

Konfiguracja reszty kwasu winowego w związku **3** nie jest zaburzana w trakcie prowadzonych reakcji, stąd możliwe było przypisanie względnej konfiguracji na atomie C(1) i w konsekwencji konfiguracji absolutnej związku **4**. Związek **4** ma trwałą konfigurację i może być stosowany jako produkt przejściowy w syntezach wielu pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny.

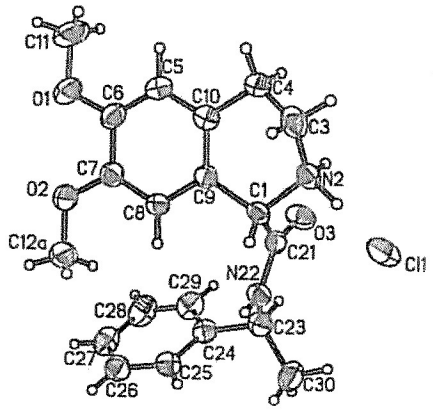
Innym interesującym produktem przejściowym w syntezach alkaloidów izochinolinowych jest (*S*)-1-actoksymetylo-2-acetylo-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimetoksy-1-metyloizochinolina[25] (Rys. 12). Związek krystalizuje w niecentrosymetrycznej grupie $P2_1$ i pomiar dyfraktometryczny oraz późniejsze rozwiązanie struktury kryształu pozwoliło mi określić strukturę cząsteczkową związku.



Rys. 12. Struktura (S)-1-actoksymetylo-2-acetylo-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimetoksy-1-metyloizochinoliny.

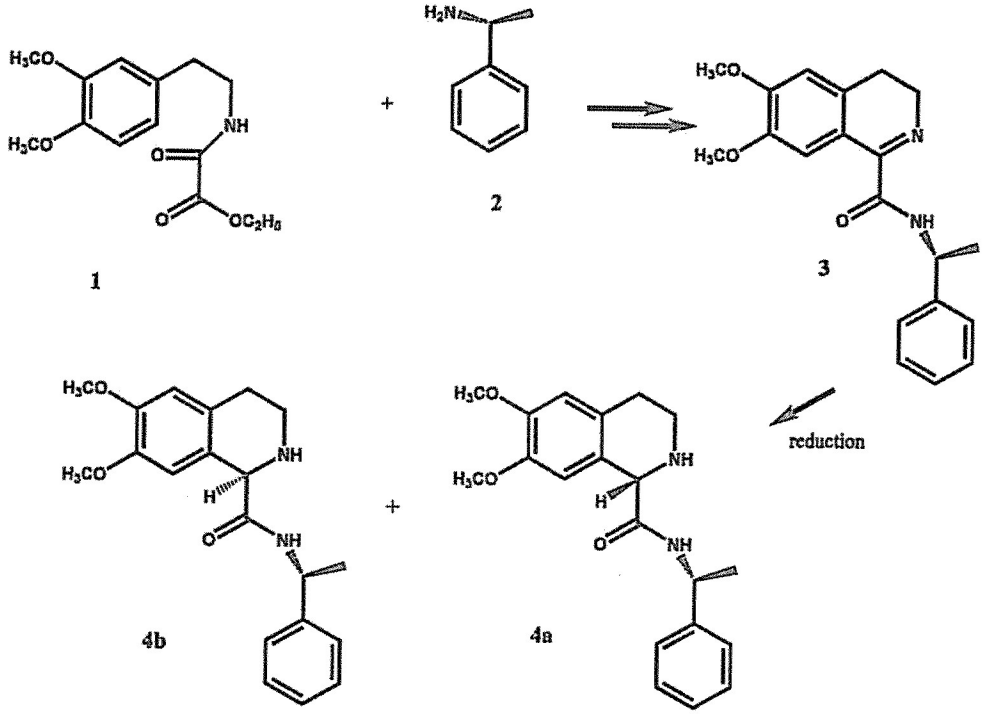
Związek ten jest relatywnie trwały w porównaniu z wyjściową 1-hydroksymetylową pochodną [*N*-acetoksy-1-metylo-1-(*S*)-kalikotominą]. Konfigurację absolutną związku określiłem poprzez wyznaczenie czynnika Flacka[4].

Innymi związkami chiralnymi wykorzystywanymi w syntezie kalikotominy były kwas L-askorbinowy[26] i (*S*)-(–)-α-metylobenzyloamina[27]. W ostatnim przypadku w ciągu reakcji otrzymano aminę **4a** (Rys. 13), oraz **4b** o przeciwnych konfiguracjach na atomie C(1).



Rys. 13. Struktura cząsteczki chlorowodorku związku **4a**.

Interesującym odkryciem było to, że zmiana warunków etapu redukcji prowadzącego do powyższych produktów prowadziła do wyraźnej przewagi albo jednego (88:12), albo drugiego enancjomeru (9:91) - (Rys. 14).

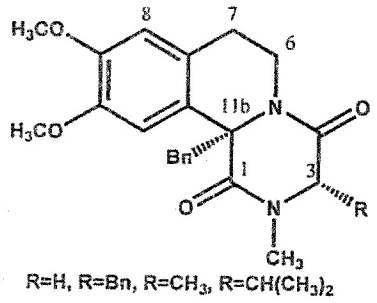


Rys. 14. Ciąg reakcyjny prowadzący do związków **4a** i **4b**.

W kolejnym etapie otrzymano *N*-acetylokalikotominę. Strukturę chlorowodorku związku **4a** krystalizującego w niecentrosymetrycznej grupie $P2_12_12_1$ rozwiązałem na podstawie danych rentgenowskich zmierzonych z użyciem monochromatycznego promieniowania CuKα. Pozwoliło mi to wyznaczyć współczynnik Flacka i w konsekwencji wyznaczyć strukturę absolutną kryształu i przypisać nie tylko względną konfigurację na węglu C(1), ale również ją niezależnie potwierdzić. Pochodne 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny takie jak kalikotomina, salsolina i ich pochodne wykazują właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze. Stąd też były i są przedmiotem badań biomedycznych, jako potencjalne leki.

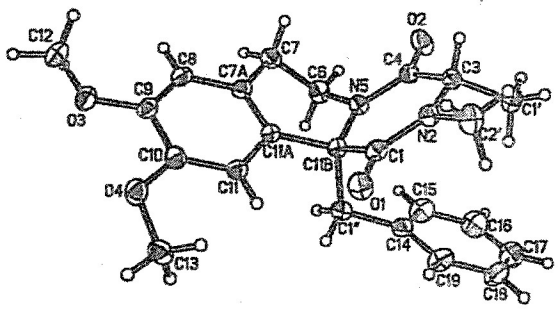
Dalszym przykładem zastosowania metod rentgenowskich w badaniu struktur chiralnych alkaloidów tetrahydroizochinolinowych były prace nad diastereoselektywnymi syntezami z wykorzystaniem prostych związków chiralnych jako induktorów przenoszonej chiralności. W tym przypadku przetestowane zostały możliwości zastosowania jako prekursorów szeregu naturalnych aminokwasów: L-(-)-fenyloalaniny, L-(+)-waliny

i L-(-)-proliny[28]. Inspiracją było ich uczestnictwo w biosyntezie alkaloidów[29]. Przeprowadzone syntezy charakteryzowały się wysoką wydajnością – powyżej 90%, dając w efekcie produkty o strukturze pokazanej na rysunku (Rys. 15).

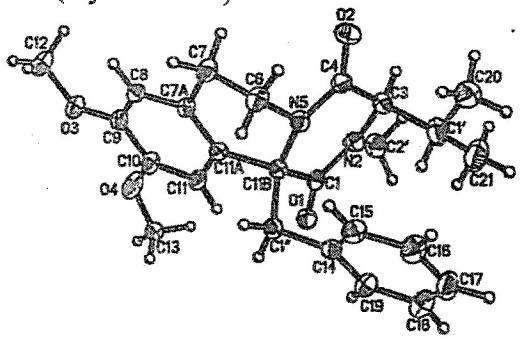


Rys. 15. Schematyczny wzór otrzymywanych pochodnych izochinolinowych.

Reakcje z *N*-metylo-L-alaniną i *N*-metylo-L-waliną, oraz struktury otrzymanych produktów zostały opisane szczegółowo w pracy (Zawadzka, Leniewski, Maurin, Wojtasiewicz, Siwicka, Czarnocki, 2003)[30]. W pracy tej raportowane było otrzymanie z dużą wydajnością racemicznych mieszanin (3*S**,11b*R**) z podstawnikami metylowym i izopropylowym w pozycji 3 pierścienia heterocyklu. Kryształy związków były, zgodnie z przewidywaniem, centrosymetryczne i krystalizowały odpowiednio w grupie *P2₁/c* i *P-1*. Struktury cząsteczkowe związków ***a*** i ***b*** pokazane są na rysunkach (Rys. 16 i 17).

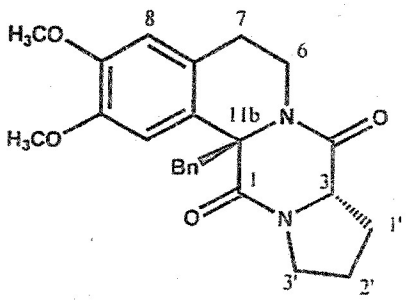


Rys. 16. Konformacja cząsteczki *a*-(3*S**,11b*R**)

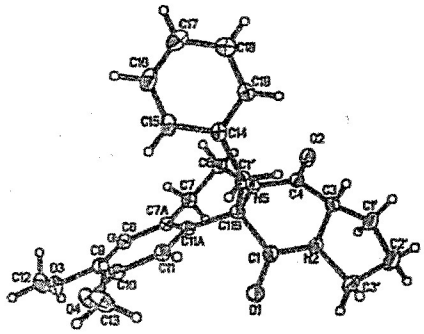


Rys. 17. Konformacja cząsteczki *b*-(3*S**,11b*R**)

W przypadku zastosowania jako prekursora proliny[29], której sztywna, pierścieniowa struktura powinna zapobiegać racemizacji związku, otrzymano diketopiperazynę (Rys. 18 i 19). Związek o konfiguracji (3*S*, 11b*S*) otrzymano w stosunku 92:8 względem drugiego diastereoizomeru (3*S*, 11b*R*).



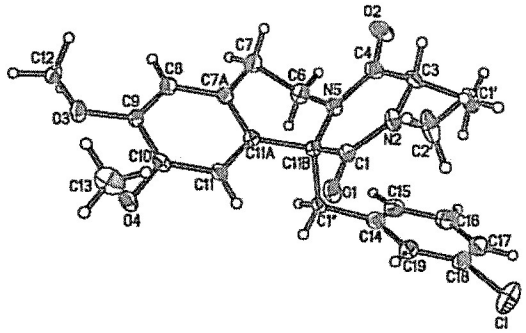
Rys. 18. Produkt otrzymany z proliny



Rys. 19. Struktura przestrzenna cząsteczki (3*S*, 11b*S*)

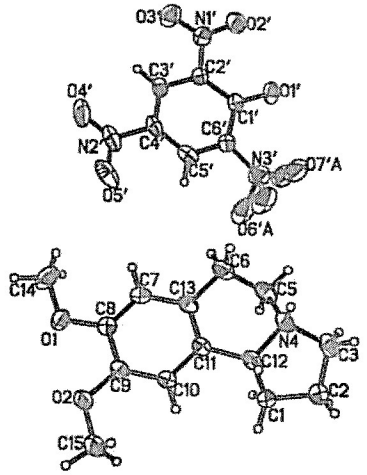
Zastosowanie aminokwasów, jako stereoselektywnych fragmentów budulcowych w otrzymywaniu 1-benzylowych pochodnych tetrahydroizochinoliny zostało opisane szczegółowo w pracy (Zawadzka, Leniwski, Maurin, Wojtasiewicz, Siwicka, Błachut,

Czarnocki, 2003)[31]. Jako induktory chiralności stosowane były: L-alanina, *N*-metylo-L-alanina, L-walina, *N*-metylo-L-walina, L-fenyloalanina i *N*-metylo-L-fenyloalanina. W trakcie przeprowadzania jednego z etapów syntetycznych - kondensacji Picteta-Spenglera powstających amidów – okazało się, że zastosowanie jako induktorów chiralności L-Ala, L-Val, czy L-Phe nie prowadzi do cyklizacji ketoamidów, podczas gdy *N*-metylo-L-alanina, dawała w efekcie finalny produkt cyklizacji z dużym nadmiarem jednego z diastereoizomerów (87:13). W tym przypadku po rozdzieleniu chromatograficznym nie udało się niestety otrzymać monokryształów o dostatecznie dobrej jakości. Dlatego też przeprowadzono reakcję, w której zamiast kwasu fenylopirogronowego zastosowano jego 3-chloro pochodną. Otrzymane kryształy związku posłużyły mi do badań krystalograficznych, a jego strukturę cząsteczkową o konfiguracji (3*S*,11b*R*) pokazałem na rysunku poniżej (Rys. 20).



Rys. 20. Struktura przestrzenna związku (3*S*,11b*R*)-**6d**.

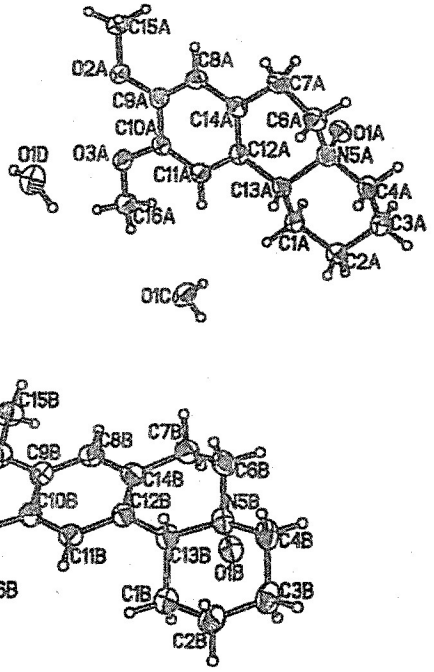
Praca (Szawkało, Czarnocki, Zawadzka, Wojtasiewicz, Leniewski, Maurin, Czarnocki, Drabowicz, 2007)[32] była pierwszą z serii prac poświęconych enancjoselektywnej syntezie alkaloidów z wykorzystaniem ATH (asymmetric transfer hydrogenation) – asymetrycznego uwodornienia z zastosowaniem katalizatora zawierającego Ru(II). W pracy tej między innymi prowadzono syntezę (+)-kryspiny A oraz pochodnych emetyny. Prace syntetyczne ukierunkowane były na optymalizację zasadniczego procesu – redukcji iminy z udziałem katalizatora rutenowego - tak, aby otrzymać najwyższy nadmiar enancjomeryczny oczekiwanego związku. W tym celu stosowano różne ligandy do syntezy katalizatora. W efekcie udało się uzyskać wartości ee przekraczające 80%. Prace strukturalne ukierunkowane były na określenie struktury absolutnej cząsteczek otrzymywanych związków. W publikacji tej opisałem strukturę pikrynianu otrzymanej (+)-kryspiny A (Rys. 21).



Rys. 21. struktura pikrynianu (+)-kryspiny A.

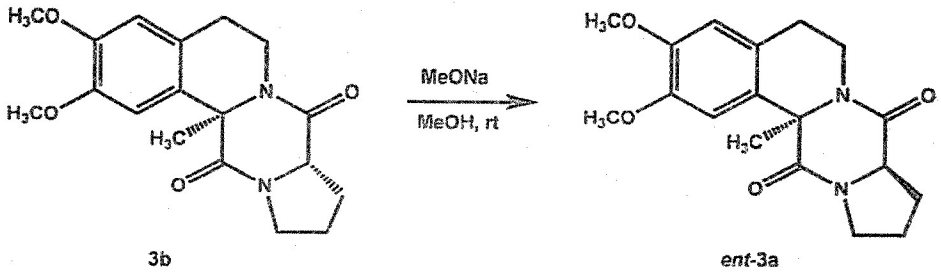
Struktura kryształu była jednoskośna z grupy przestrzennej $P2_1$. Pomiar wykonałem stosując monochromatyczną wiązkę CuKα. Umożliwiło mi to dzięki wyznaczeniu parametru Flacka

określenie konfiguracji na węglu C(12) jako *R*. W publikacji opisano otrzymywanie pochodnej wykorzystywanej następnie do syntezy emetyny. W trakcie syntez otrzymano *N*-tlenek, dla którego kryształu wykonałem badania krystalograficzne przypisując konfigurację *R* na węglu C(13). Związek krystalizował w chiralnej grupie $P2_12_12_1$. W niezależnej części komórki elementarnej występowały obok siebie cząsteczki dwóch diastereoizomerów oraz dwie cząsteczki wody. Pomiar wykonywałem stosując monochromatyczną wiązkę CuKα, co umożliwiło mi określenie konfiguracji na węglu C(13) jako *R* – Rys. 22.



Rys. 22. Struktura cząsteczkowa *N*-tlenku. W obu cząsteczkach występuje ta sama konfiguracja na chiralnym atomie węgla.

Publikacja (Siwicka, Wojtasiewicz, Zawadzka, Maurin, Czarnocki, 2005)[33] omawia wyniki obliczeń kwantowo-chemicznych, które prowadziłem dla *trans*- i *cis*-diketopiperazynowych pochodnych izochinoliny otrzymywanych z L-alaniny i L-proliny. Wynikało z nich, że trwalsze termodynamicznie dla związków pochodzących od acyklicznych aminokwasów są diketopiperazyny o konfiguracji *cis*. Natomiast w przypadku otrzymywanych z L-proliny trwalsze są związki o konfiguracji *trans*. Zbadano również reakcję epimeryzacji *cis*-diketopiperazyny w środowisku zasadowym (Rys. 23).

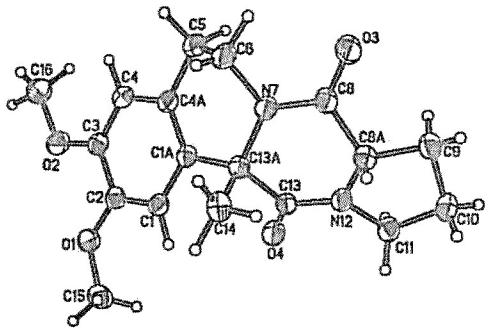


3b **ent-3a**

Rys. 23. Epimeryzacja w środowisku zasadowym

Otrzymany związek **3a** udało się wykrystalizować, a kryształy posłużyły do badań rentgenowskich. Wykonany z użyciem monochromatycznej wiązki promieniowania CuKα pomiar pozwolił mi nie tylko rozwiązać i udokładnić strukturę, ale również wyznaczyć wiarygodnie współczynnik Flacka. Na jego podstawie wyznaczyłem strukturę absolutną kryształu. Związek **3a** krystalizował w rombowej grupie przestrzennej $P2_12_12_1$ z jedną

cząsteczką w niezależnej części komórki elementarnej. Struktura cząsteczki przedstawiona jest na rysunku (Rys. 24).

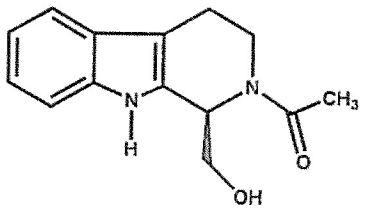


Rys. 24. Struktura cząsteczki **3a**.

4.5. Enancjoselektywna synteza alkaloidów β-karbolinowych – badania strukturalne.

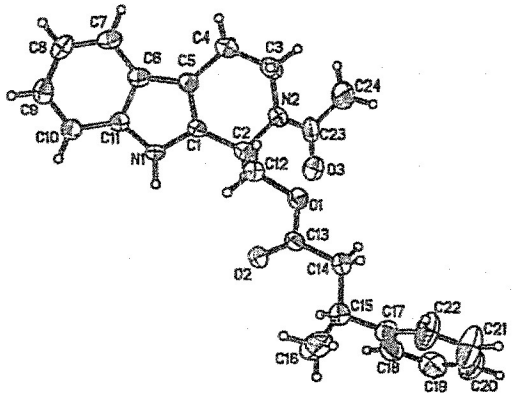
Podobnie, jak w poprzednio omówionych pracach dotyczących pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny, zasadniczym celem było opracowanie wydajnych metod enancjoselektywnych syntez pochodnych 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny. Celem prowadzonych przeze mnie prac strukturalnych było rozwiązanie struktur krystalicznych i cząsteczkowych związków – w tym również określenie konfiguracji absolutnych.

Publikacja (Araźny, Czarnocki, Wojtasiewicz, Maurin, 2000)[34] poświęcona była wykorzystaniu tryptaminy i kwasu L-(+)-winowego w syntezie (1*R*)-1-(hydroksymetylo)-2-acetylo-1,2,3,4-trtrahydro-β-karboliny (Rys. 25).



Rys. 25. Tytułowy związek **17**.

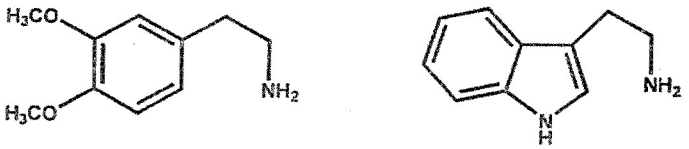
W wyniku wieloetapowej syntezy otrzymano powyższy związek z wydajnością 42%, o czystości enancjomerycznej 98%. Konfigurację na asymetrycznym atomie węgla przypisałem po rozwiązaniu struktury estru związku **17** z kwasem (*S*)-3-fenylobutanokarboksylowym (**19**). W tym przypadku, ze względu na to, że pomiar rentgenowski wykonywałem z użyciem monochromatycznej wiązki promieniowania MoKα nie mogłem przypisać absolutnej struktury chiralnego kryształu (grupa przestrzenna $P2_1$). Dzięki znanej konfiguracji kwasu winowego i wyznaczonej względnej konfiguracji związku na centrach chiralnych (patrz Rys. 26), mogłem przypisać właściwą konfigurację na fragmencie 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny.



Rys. 26. Struktura cząsteczki związku **19**.

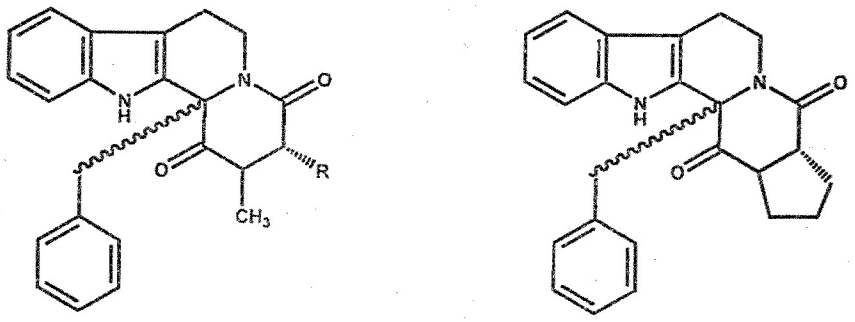
Związek **17** (Rys 32) był używany, jako substrat do syntez szeregu alkaloidów 1,2,3,4-tetrahydro-β-karbolinowych.

Podobnie, jak poprzednio dla pochodnych tetrahydroizochinoliny, przeprowadzono próby zastosowania naturalnie występujących aminokwasów, jako nośników chiralności w syntezie alkaloidów indolowych. Tym razem jednym z substratów, zamiast *N*-(etylofenylo)aminy, była tryptamina (Rys. 27). Kolejnym substratem był odpowiedni L-aminokwas.



Rys. 27. Substraty prowadzące do otrzymania pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (lewa strona) i 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny (strona prawa).

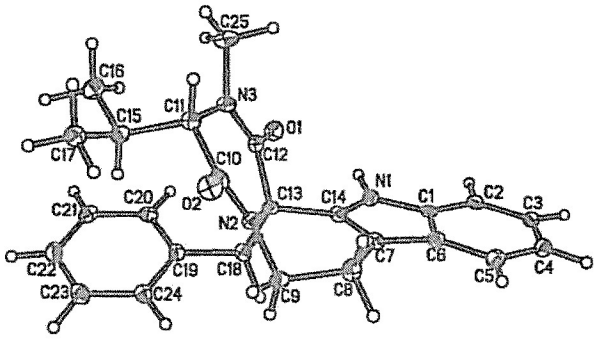
W publikacji (Siwicka, Wojtasiewicz, Leniewski, Maurin, Czarnocki, 2002)[35] opisaliśmy użycie jako induktorów chiralności L-alaniny, L-proliny i L-waliny. W wyniku wieloetapowej reakcji zakończonych kondensacją typu Pictet-Spenglera otrzymano mieszaninę diastereoizomerów (Rys. 28).



R=CH_3, R=$CH(CH_3)_2$

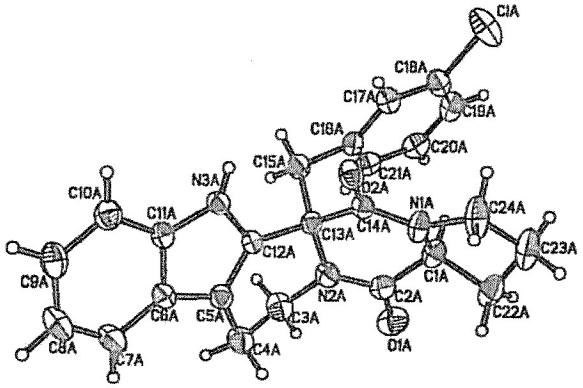
Rys. 28. Diastereoizomery otrzymywane z użyciem L-aminokwasów.

W reakcjach z użyciem L-alaniny i L-waliny uzyskano zasadniczą przewagę diastereoizomeru o konfiguracji *R* na atomie węgla C-1 (odpowiednio 91:9 i 93:7). Jednocześnie w tych samych warunkach reakcji stosując L-prolinę otrzymano w przewadze diastereoizomer o konfiguracji przeciwnej. I tak udało się wykrystalizować związek **8a** i rozwiązać jego strukturę (Rys. 29).



Rys. 29. Cząsteczka związku **8a**.

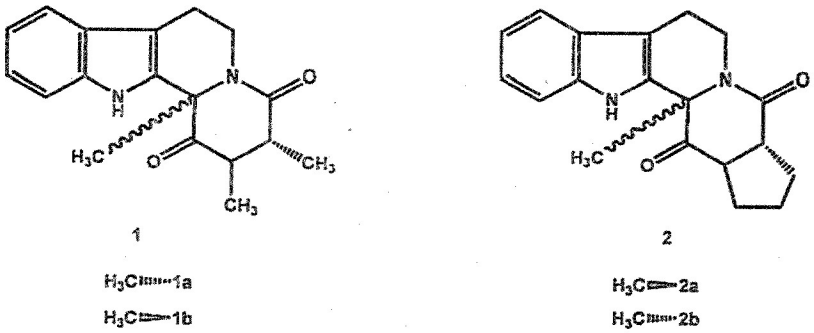
Kryształ należał do jednoskośnej grupy przestrzennej $P2_1$. W niezależnej części komórki elementarnej występowały dwie cząsteczki nieznacznie różniące się geometrią, przy czym obie cząsteczki były cząsteczkami tego samego diastereoizomeru. Pomiar dla kryształu wykonany został w niskiej temperaturze z wykorzystaniem monochromatycznej wiązki promieniowania rentgenowskiego MoKα. W związku z tym, że znana była konfiguracja fragmentu pochodzącego od L-waliny, wyznaczenie względnej konfiguracji na asymetrycznych atomach węgla dało w wyniku konfigurację całej cząsteczki. W przypadku zastosowania jako substratu L-proliny otrzymano produkt, dla którego nie udało się otrzymać monokryształów satysfakcjonującej jakości. Zastosowanie zamiast kwasu fenylopirogronowego jego *meta*-chloro-pochodnej (kwasu m-chlorofenylopirogronowego) dało produkt lepiej krystalizujący. Dla dominującego diastereoizomeru (**10a**) przeprowadziłem analizę strukturalną. Podobnie jak w przypadku związku **8a** związek krystalizował w jednoskośnej grupie przestrzennej $P2_1$ i podobnie, jak poprzednio, z dwoma cząsteczkami w niezależnej części komórki elementarnej. Na rysunku (Rys. 30) przedstawiono strukturę jednej z cząsteczek.



Rys. 30. Cząsteczka związku **10a**.

Tak, jak poprzednio, ze względu na znaną konfigurację aminokwasu zastosowanego w reakcji, wystarczyło jedynie wyznaczenie względnej konfiguracji na centrach asymetrycznych.

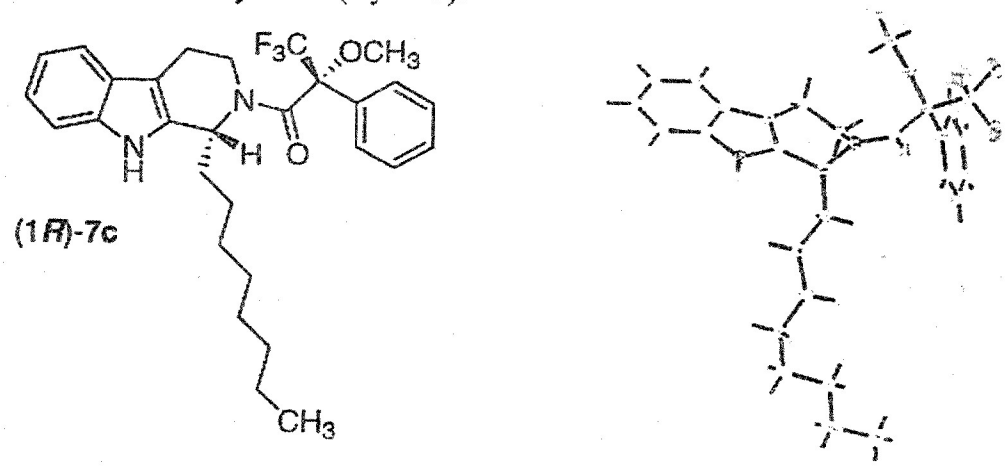
Publikacja (Siwicka, Wojtasiewicz, Zawadzka, Maurin, Czarnocki, 2005)[33] poza zagadnieniami związanymi z syntezą pochodnych *trans*-diketopiperazynowych izochinoliny omówionych wcześniej dotyczyła również zagadnień stereoselektywności reakcji aminokwasów prowadzących do diketopiperazynowych pochodnych β-karboliny. Przeprowadziłem między innymi obliczenia kwantowo-chemiczne metodami *ab initio* dla związków uwidocznionych na schemacie (Rys. 31) w celu wytłumaczenia obserwowanych zależności.



Rys. 31. Związki, dla których prowadzono obliczenia.

I tak stwierdziłem, że dla par związków **1** i **2** termodynamicznie preferowane są produkty **1a** i **2a**. Jest to zgodne z obserwowanymi nadmiarami diastereomerycznymi w przypadku stosowania w reakcjach acyklicznych i cyklicznych aminokwasów. Dodatkowo obserwowano epimeryzację odpowiednich pochodnych *cis*-diketopiperazyn **2b**.

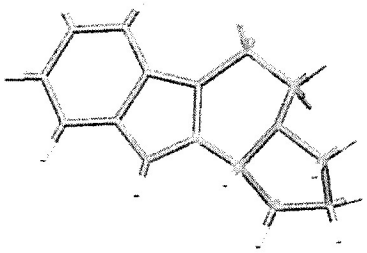
Praca (Roszkowski, Wojtasiewicz, Leniewski, Maurin, Lis, Czarnocki, 2005)[36] dotyczyła otrzymywania pochodnych tetrahydro-β-karboliny podstawionych podstawnikami alkilowymi w pozycji 1. Procedura syntetyczna obejmowała standardową procedurę łączenia tryptaminy z kwasami tłuszczowymi w obecności BOP, następnie prowadzoną cyklizację i katalityczne uwodornienie z wykorzystaniem procesu ATH. W raportowanej pracy rozwiązywałem strukturę pochodnej β-karboliny z długim, ośmiowęglowym podstawnikiem alkilowym. Synteza pochodnej z takimi podstawnikami podyktowana była potencjalnie lepszą biodostępnością związków amfifilowych i przenikaniem ich przez barierę krew-mózg. Ze względów praktycznych otrzymana została w ostatnim etapie sól związku z kwasem Moshera, co umożliwiło przypisanie konfiguracji na atomie węgla C(1). Związek krystalizował w rombowej grupie przestrzennej $P2_12_12_1$ z jedną cząsteczką w niezależnej części komórki elementarnej. Pomiar prowadzony był w niskiej temperaturze na przyrządzie wyposażonym w czuły detektor CCD. Jednak ze względu na wykorzystanie monochromatycznej wiązki rentgenowskiej MoKα nie możliwe było wyznaczenie współczynnika Flacka [-0.4(5)] z wystarczającą dokładnością i przypisani na jego podstawie konfiguracji absolutnej. Znana konfiguracja reszty kwasu Moshera umożliwiła przypisanie właściwej konfiguracji na podstawie względnej konfiguracji na centrach asymetrycznych. Struktura cząsteczki uwidoczniona została na rysunku (Rys. 32).



Rys. 32. Struktura związku (1*R*)-7c z publikacji.

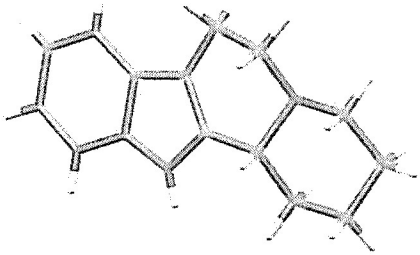
Cytowana uprzednio praca (Szawkało, Czarnocki, Zawadzka, Wojtasiewicz, Leniewski, Maurin, Czarnocki, Drabowicz, 2007)[32] dotyczyła, poza syntezą pochodnych izochinoliny, enancjoselektywnej syntezy kilku pochodnych β-karboliny: (*R*)-(+)-harmicyny

(**19**) i (*R*)-(+)-desbromoarborescydyny A (**22**). W obu przypadkach zasadniczym etapem prowadzącym do otrzymania ze znaczną przewagą jednego z enancjomerów był proces ATH (asymmetric transfer hydrogenation). Strukturę cząsteczkową i absolutną konfigurację otrzymanych związków określiłem w oparciu o rentgenowskie badania krystalograficzne. Ze względu na prowadzenie pomiarów z zastosowaniem monochromatycznego promieniowania CuKα i pomiarowi par friedlowskich dla wszystkich refleksów było możliwe wyznaczenie współczynników Flacka dla obu struktur i przypisanie właściwej struktury absolutnej. Struktura cząsteczki (*R*)-(+)-harmicyny przedstawiona jest na rysunku 33.



Rys. 33. Absolutna stereochemia (R)-(+)-harmicyny.

Związek krystalizuje w rombowej grupie przestrzennej $P2_12_12_1$ z jedną cząsteczką w niezależnej części komórki elementarnej. Określony parametr Flacka wynosił x=-0.2(5) świadczy o prawidłowym przypisaniu konfiguracji absolutnej kryształu i cząsteczki. Atomy wodoru z pierścienia indolu uczestniczą w sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych N-H···N. Struktura (*R*)-(+)-desbromoarborescydyny A przedstawiona jest na rysunku 34.



Rys. 34. Stereochemia (*R*)-(+)-desbromoarborescydyny A.

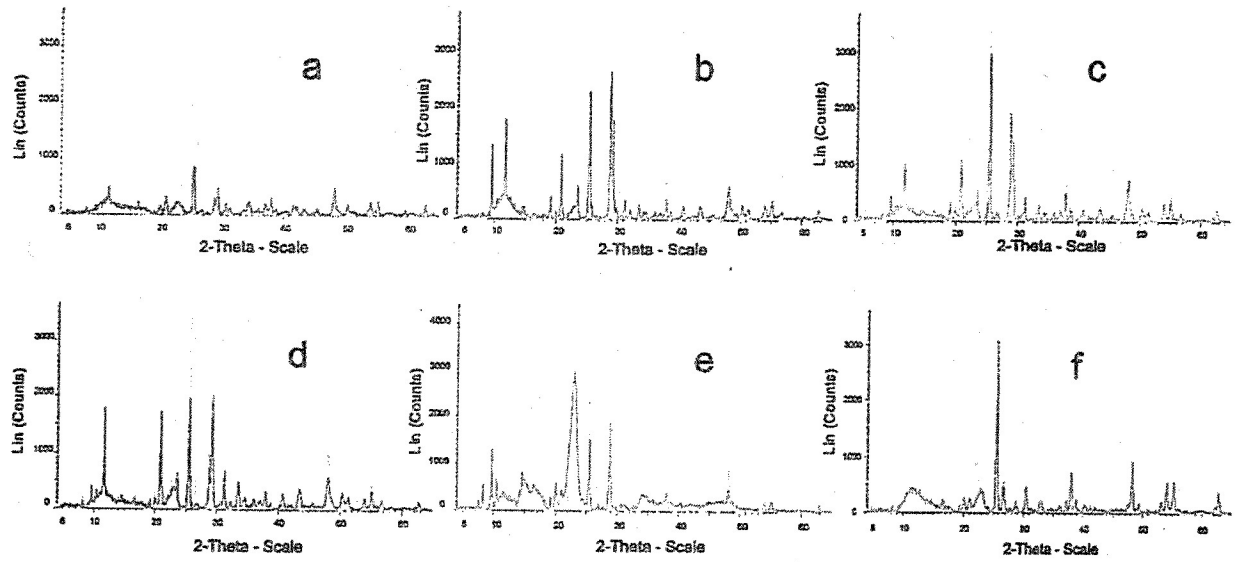
Związek krystalizował w układzie jednoskośnym w grupie przestrzennej *C2*. Struktura zawiera dodatkowo, oprócz cząsteczek związku, cząsteczki wody zajmujące pozycję szczególną w komórce elementarnej. Wodory indolowe oraz wodory rozpuszczalnika uczestniczą w sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Obserwowano zarówno wiązania N-H···N, N-H···O, O-H···O i O-H···N. Parametr Flacka x=-0.2(4) świadczy o poprawnym określeniu konfiguracji kryształu i związku.

4.6. Badania produktów leczniczych i suplementów diety rentgenowską dyfraktometrią proszkową (XRPD).

Drugim, bardzo istotnym fragmentem mojej aktywności naukowej są badania prowadzone metodą rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej. Prace naukowe, znacznie mniej liczne niż poprzednio referowane mają w mojej ocenie duże znaczenie dla badań nad jakością leków.

W pracy (Maurin, Pluciński, Mazurek, Fijałek; 2007)[37] pokazałem porównanie obrazów dyfrakcyjnych, które otrzymałem dla 6 całych tabletek produktów podejrzanych

o sfałszowanie leku Viagra z dyfraktogramem dla produktu oryginalnego otrzymanego w tych samych warunkach eksperymentalnych (Rys. 35).

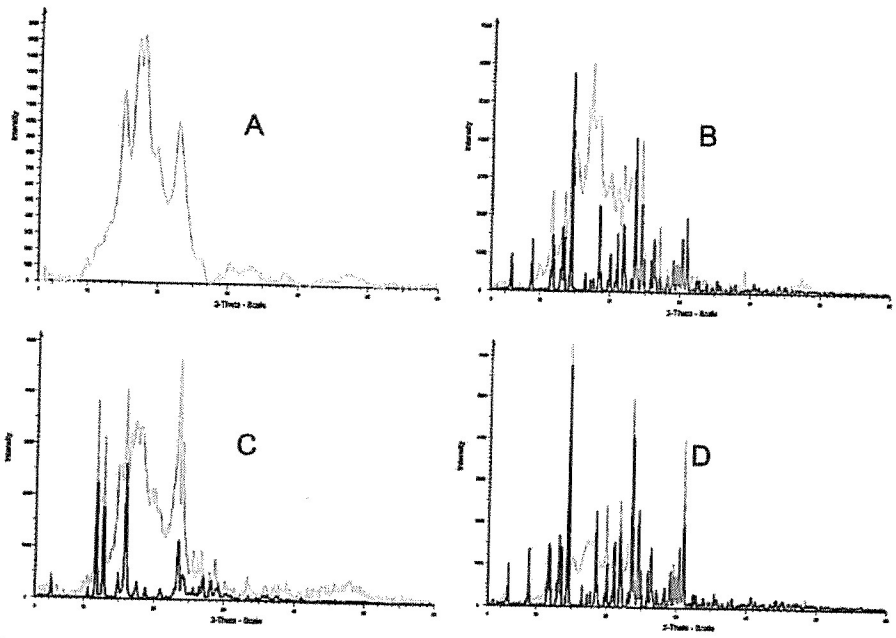


Rys. 35. Porównanie dyfraktogramów wykonanych bez uprzedniego przygotowania próbek dla 6 tabletek sfałszowanej "Viagry" i oryginalnego produktu leczniczego (zaznaczonego grubszą szarą linią).

Pokazałem ponadto, że chociaż różnice są bardziej widoczne dla produktu pozbawionego otoczki, to różnice są zauważalne już w eksperymentach prowadzonych dla całych tabletek. Warunkiem powodzenia jest zastosowanie metody wiązki równoległej o dużej intensywności, generowanej przez odpowiedni układ optyczny. Pokazałem także zależności jakości widma dyfrakcyjnego od czasu prowadzenia eksperymentu.

Obrazy dyfrakcyjne otrzymywane z użyciem dyfraktometru proszkowego można traktować analogicznie do danych spektroskopowych, chociaż obserwujemy tutaj zależność natężenia od kąta ugięcia nie zaś od długości fali. Takie dane można poddać obróbce statystycznej, podobnej do tej, jakiej używa się dla danych spektroskopowych (FTIR, NIR, czy Ramana). Publikacja (Komsta, Maurin, 2010)[38] pokazuje takie możliwości. Otrzymane przeze mnie dane dyfraktometryczne dla szeregu substancji czynnych występujących w popularnych produktach leczniczych OTC (over the counter) zostały poddane odpowiedniej obróbce statystycznej. W wyniku zastosowania analizy PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) utworzono model pozwalający wykrywać obecność substancji czynnej - *N*-(4-hydroksyfenylo)acetamidu (Paracetamol, Acetaminofen).

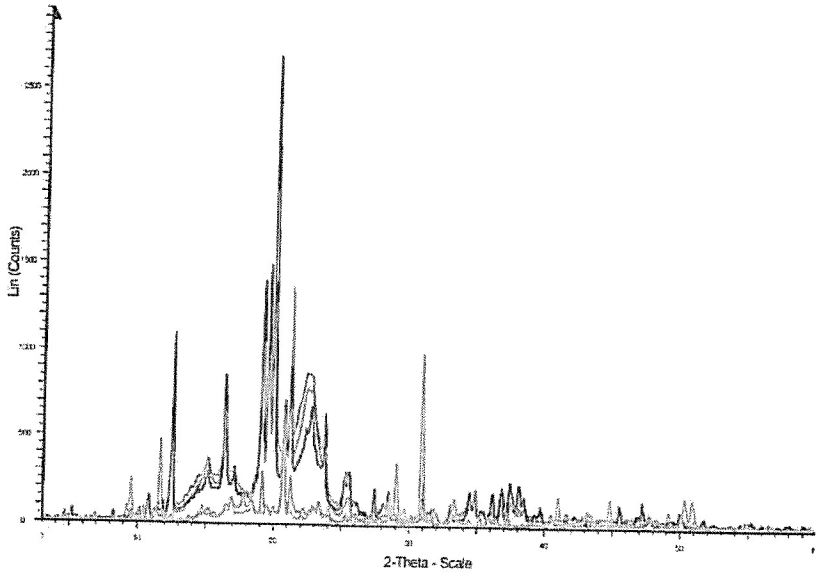
Publikacja (Stypułkowska, Błażewicz, Maurin, Sarna, Fijałek, 2011)[39] poświęcona jest problemowi, który często określany jest jako „sfałszowane suplementy diety". Suplementy diety stanowią dużą grupę produktów witaminowych, ziołowych i paraleków, które praktycznie nie podlegają kontroli. Najczęściej ma miejsce występowanie w ich składzie niedeklarowanych aktywnych substancji farmaceutycznych (API). Dwie popularne grupy preparatów są najczęściej fałszowane: preparaty na dysfunkcję erekcji u mężczyzn oraz wspomagające odchudzanie. Badaliśmy zawartość Sybutraminy (i jej analogów) w ziołowych suplementach diety. W pracy zaprezentowałem przykładowe wyniki rentgenowskich badań proszkowych pokazujące różnice pomiędzy czystymi produktami ziołowymi i ich „sfałszowanymi" odpowiednikami (Rys. 36). Na podstawie badań rentgenowskich możliwe było wykrycie krystalicznych syntetycznych dodatków - Sybutraminy i Desmetylo-sybutraminy, które nie były deklarowane przez producentów.



Rys. 36. Porównanie dyfraktogramów: (A) ziołowgo produktu LiDa; (B) LiDa z Sybutraminą (SIB) – szary i wzorca SIB – czarny; (C) LiDa z DSIB – szary i wzorca DSIB (desmetylosybutraminy) – czarny; (D) Meizitang z SIB – szary oraz wzorca SIB – czarny Co to LiDa

Niezależnie od badań krystalograficznych obecność tych, obcych dla preparatu ziołowego związków, została potwierdzona przez HPLC i HPLC-MS.

Problemowi sfałszowania leków poświęcona jest również publikacja (Venhuis, Vredenbregt, Kaun, Maurin, Fijałek, de Kaste, 2011)[40]. Praca dotyczyła badań przeprowadzonych dla zakupionych w Internecie próbek produktu wspomagającego odchudzanie – Acomplia. Badania były prowadzone komplementarnymi metodami: LC-DAD, LC-MS, spektroskopiami NIR oraz Ramana, a przeze mnie dyfraktometrią rentgenowską. Rysunek 37 przedstawia nałożone na siebie dyfraktogramy czterech zakupionych w Internecie tabletek oraz dyfraktogram oryginalnego produktu Acomplia.



Rys. 37. Dyfraktogramy czterech produktów zakupionych w Internecie (kolory zielony, czerwony, fioletowy i pomarańczowy) oraz dyfraktogram oryginalnego produktu Acomplia (kolor ciemno-niebieski)

Badania LC-DAD i LC-MS pozwoliły wykryć w zakupionych próbkach zanieczyszczenia Rimonabantu – aktywnej substancji produktu Acomplia - czy też zastąpienie go chlorowodorkiem Sybutraminy, a również jej analogiem: Desmetylosybutraminą. W wyniku

wykonanych przeze mnie badań rentgenowskich udało się natomiast stwierdzić obecność, w dwóch na pięć badanych próbek, innej niż w oryginalnym produkcie formy polimorficznej Rimonabantu. Dodatkowo wykryłem różnice w składzie substancji pomocniczych. Wszystkie te cechy świadczyły o sfałszowaniu zakupionych przez Internet analogów produktu Acomplia.

4.7. Podsumowanie.

W niniejszym autoreferacie pragnąłem zawrzeć charakterystykę prac naukowych, jakie prowadziłem w okresie od uzyskania przeze mnie stopnia doktora nauk chemicznych do chwili obecnej. Ze względu na dużą liczbę publikacji, których autorem byłem na przestrzeni ostatnich lat, musiałem ograniczyć się do pewnej selekcji tematycznej. Autoreferat dotyczy tylko publikacji na temat struktur substancji aktywnych farmakologicznie z grupy alkaloidów izochinolinowych i indolowych oraz prac z dziedziny krystalografii stosowanej użytej do charakterystyki produktów leczniczych i suplementów diety.

We wstępie autoreferatu opisałem pokrótce motywacje, które przyświecały podjęciu zadania syntezy enancjo- i diastereoselektywnej alkaloidów. Ze względu na ich udokumentowaną aktywność farmakologiczną wiele z nich znalazło zastosowanie w terapii różnych chorób. Są one cennym surowcem farmaceutycznym. Jednocześnie zawartość poszczególnych pochodnych w materiale roślinnym jest na tyle mała, że konieczne jest opracowanie dróg syntetycznych do nich prowadzących. Występujące w naturze alkaloidy, ze względu na ich biosyntetyczne pochodzenie od naturalnych aminokwasów, są chiralne. Aktywność natomiast racemicznych mieszanin, jeżeli nawet nie jest niższa, to związana jest niejednokrotnie z działaniami niepożądanymi, których nie wykazują związki czyste enancjomerycznie. Stąd właśnie potrzeba enancjoselektywnych syntez i dokumentacja ich przebiegu metodami strukturalnymi. Badania strukturalne stanowią zatem ważny/integralny element projektów, bez którego sukces badawczy nie byłby możliwy.

W niniejszym arbitarlnym wyborze pominąłem prace strukturalne dotyczące zarówno innych alkaloidów jak i prostych cząsteczek organicznych mogących mieć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej, antywirusowej i przeciwgrzybiczej. Pominąłem cykl prac dotyczących specyficznych układów z wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą karboksylową i grupą oksymową. Nie omawiałem również prac, w których stosowałem rentgenowską dyfraktometrię proszkową w badaniach nowych materiałów. Niemniej zaprezentowane publikacje stanowią reprezentatywny wybór, zarówno pod względem stosowanych przeze mnie technik doświadczalnych, którymi były dyfraktometria monokrystaliczna i dyfraktometria proszkowa, jak i metod obliczeniowych. Zastosowane zostały metody bezpośrednie rozwiązywania struktur, metody ich udokładniania, jak również obliczenia metodami *ab initio* chemii kwantowej. Podobna metodologia była stosowana w pracach, które znalazły się poza przedstawionym wyborem.

Przedstawione prace wykorzystujące badania za pomocą dyfraktometrii proszkowej są pracami ukierunkowanymi na rozpoznawanie pochodzenia i zawartości produktów leczniczych, które to zagadnienie jest niezwykle istotne ze względu na narastające zagrożenia związane z fałszowaniem produktów leczniczych.

4.8. Lista cytowań (kolorem czerwonym zaznaczono prace własne z omawianej tematyki).

[1] "The Nobel Prize in Physics 1901". Nobelprize.org. 26 Sep 2012
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1901/
[2] "The Nobel Prize in Physics 1915". Nobelprize.org. 26 Sep 2012
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1915/index.html

[3] "The Nobel Prize in Chemistry 1936". Nobelprize.org. 23 Oct 2012 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1936/

[4] Flack H.D. (1983). "On enantiomorph-polarity estimation". *Acta Cryst.* **A39**, 876-881.

[5] Sheldrick G.M. (2008). "A short history of SHELX". *Acta Cryst.* **A64**, 112-122.

[6] European Pharmacopea, 2.9.33. „Characterisation of crystalline and partly crystalline solids by X-ray powder diffraction method" 01/2007:20933 Strasbourgh, France

[7] Takeuchi K, Sakamoto S, Nagayoshi Y, Nishizawa H, Matsubara J (2004). "Reactivity of the human internal thoracic artery to vasodilators in coronary artery bypass grafting". *Eur J Cardiothorac Surg* **26**, 956–9.

[8] Kamei J (1996). "Role of opioidergic and serotonergic mechanisms in cough and antitussives". *Pulmonary pharmacology* **9** (5–6): 349–356.

[9] Tsukiyama, M; Ueki, T; Yasuda, Y; Kikuchi, H; Akaishi, T; Okumura, H; Abe, K (2009). "Beta2-adrenoceptor-mediated tracheal relaxation induced by higenamine from Nandina domestica Thunberg". *Planta medica* **75** (13): 1393–1399.

[10] Bai, G; Yang, Y; Shi, Q; Liu, Z; Zhang, Q; Zhu, YY (2008). "Identification of higenamine in Radix Aconiti Lateralis Preparata as a beta2-adrenergic receptor agonist". *Acta pharmacologica Sinica* **29** (10): 1187–1194.

[11] Coker GG, Dewar GH, Hughes R, Hunt TM, Payne JP, Stenlake JB, Waigh RD. (1981). "A preliminary assessment of atracurium, a new competitive neuromuscular blocking agent". *Acta Anaesthesiol Scand* **25** (1): 67–69.

[12] Payne J.P., Hughes R. (1981). "Evaluation of atracurium in anaesthetized man.". *Br J Anaesth.* **53** (1): 45–54.

[13] Wastila WB, Maehr RB, Turner GL, Hill DA, Savarese JJ (Jul 1996). "Comparative pharmacology of cisatracurium (51W89), atracurium, and five isomers in cats". *Anesthesiol* **85** (1): 169–177.

[14] D.F.Kisor, V.D. Schmith, (1999) "Clinical Pharmacocinetics of cisatracurium besilate". *Clin. Pharmacokinet.*, **36**, 27-40.

[15] Agata Błazewicz, Zbigniew Fijałek, Małgorzata Warowna-Grześkiewicz, Magdalena Jadach, (2010) "Determination of atracurium, cisatracurium and mivacurium with their impurities in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with charged aerosol detection". *Journal of chromatography. A* (impact **1217**(8):1266-72.

[16] Torsten Passie, John H. Halpern, Dirk O. Stichtenoth, Hinderk M. Emrich, Annelie Hintzen. (2008) "The Pharmacology of Lysergic Acid Diethylamide: A Review" *CNS Neuroscience & Therapeutics* 14 295–314.

[17] Krebs, Teri S; Johansen, Pal-Orjan (2012). "Lysergic acid diethylamide (LSD) for alcoholism: meta-analysis of randomized controlled trials". *Journal of Psychopharmacology* **26** (7): 994–1002.

[18] Sewell, R. A.; Halpern, J. H.; Pope, H. G. Jr. (2006). "Response of cluster headache to psilocybin and LSD". *Neurology* **66** (12): 1920–2.

[19] Kast, Eric (1967). "Attenuation of anticipation: a therapeutic use of lysergic acid diethylamide". *Psychiat. Quart.* **41** (4): 646–57.

[20] Beach TG, Kuo YM, Schwab C, Walker DG, Roher AE. (2001) "Reduction of cortical amyloid beta levels in guinea pig brain after systemic administration of physostigmine". *Neurosci Lett.* **310**(1):21-4.

[21] Petrie EC, Peskind ER, Dobie DJ, Veith RC, Raskind MA. (2001) "Plasma catecholamine and cardiovascular responses to physostigmine in Alzheimer's disease and aging". *Psychoneuroendocrinology.* **26**(2):147-64.

[22] Zbigniew Czarnocki, Jan Maurin (1993). "Enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids from simple sugar. I. Structure of an oxaziridine derivative". *Acta Cryst.* C49, 1992-1994.

[23] Zbigniew Czarnocki, Jan Maurin, Malgorzata Winnicka-Maurin (1994). "Enantioselective synthesis of isoquinoline alkaloids from simple sugar. II. Structureof 1-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-1-yl)-1,2,3,4-butanetetrayl tetraacetate N-oxide". *Acta Cryst.* C50, 1779-1781.

[24] Z. Czarnocki, J.K. Maurin, A. Leniewski (1995). „"Synthesis, X-ray and spectroscopic studies of 2-acetoxy-(1S)-[(1`S,2`R)-diacetoxy-2`-methoxycarbonyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline". *Polish J. Chem.*, 69, 805-811.

[25] Jan K. Maurin, Zbigniew Czarnocki, Beata Paluchowska (1996). "(S)-1-Acetoxymethyl-2-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy- 1-methylisoquinoline". *Acta Cryst.* C52, 953-955.

[26] Z. Czarnocki, M. Ziółkowski, A. Leniewski, J.K. Maurin (1999). "Highly enantioselective synthesis of S-(+)-calycotomine from L-ascorbic acid and absolute assignement of its enantiomeric Excess". *Enantiomer*, 4, 71-77.
[27] M. Ziółkowski, Z. Czarnocki, A. Leniewski, J.K. Maurin (1999). "(S)-(-)-α-Methylbenzylamine as an efficient chiral auxiliary in enantiodivergent synthesis of both enantiomers of N-acetylcalycotomine" *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3371-3380.
[28] A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K.Wojtasiewicz, Z.Czarnocki (2001). "Diastereoselective Synthesis of 1-benzyltetrahydroisoquinoline derivatives from amino acids via 1,4 chirality transfer. Part I". *Org. Lett.* 3(7), 997-999.
[29] F.J. Sardina, H. Rapoport (1996). "Enantiospecific Synthesis of Heterocycles from α-Amino Acids". *Chem. Rev.* 96, 1825-1872.
[30] A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K.Wojtasiewicz, A. Siwicka, Z.Czarnocki (2003). "Synthesis and crystal structure of hydrogenated pyrazino[2,1-α]isoquinoline derivatives". *Polish J. Chem.* 77, 565-576.
[31] A. Zawadzka, A. Leniewski, J.K. Maurin, K. Wojtasiewicz, A. Siwicka, D. Blachut, Z. Czarnocki (2003). "Diastereoselective Synthesis of 1-Benzyltetrahydroisoquinoline Derivatives from Amino Acids by 1,4 Chirality Transfer". *Eur. J. Chem.* **2003**, 2443-2453.
[32] J. Szawkalo, S.J. Czarnocki, A. Zawadzka,. K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, Z. Czarnockia, J. Drabowicz (2007). " Enantioselective synthesis of some tetrahydroisoquinoline and tetrahydro-β-carboline alkaloids". *Tetrahedron: Asymmetry*, **18**, 406–413.
[33] A. Siwicka, K. Wojtasiewicz, A. Zawadzka, J.K. Maurin, Z. Czarnocki (2005). "The structure of some *trans*-diketopiperazine derivatives of isoquinoine and β-carboline". *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 2071-2073.
[34] Z. Arażny, Z. Czarnocki, K. Wojtasiewicz, J.K. Maurin (2000). " Enantioselective synthesis of (1*R*)-1-(hydroxymethyl)-2-acetyl-1,2,3,4-trtrahydro-β-carboline from L-(+)-tartaric acid". *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 2793-2800.
[35] A. Siwicka, K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, Z. Czarnocki, (2002). "Diastereoselective synthesis of some β-carboline derivatives from L-aminoacids". *Tetrahedron:Asymmetry*, **13**, 2295-2297.
[36] P. Roszkowski, K. Wojtasiewicz, A. Leniewski, J.K. Maurin, T. Lis, Z. Czarnocki (2005). "Enantioselective synthesis of 1-substituted tetrahydro-β-carboline derivatives via the asymetric transfer hydrogenation". *J. Mol. Cat. A Chemical* **232**, 143-149.
[37] J.K. Maurin, F. Pluciński, A.P. Mazurek, Z. Fijalek, (2007). "The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control – The Viagra example" *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1514-1518.
[38] L. Komsta, J.K. Maurin (2010). "Recognition af active ingredients in tablets by chemometric processing of X-ray diffractometric data" *Talanta* **82** 850-853.
[39] K. Stypułkowska, A. Błażewicz, J. Maurin, K. Sarna, Z. Fijałek (2011). "X-ray powder diffractometry and liquid chromatography studies of sibutramine and its analogues content in herbal dietary supplements". **56**, 969-975.
[40] B.J.Venhuis, M.V. Vredenbregt, N. Kaun,, J.K. Maurin, Z. Fijalek, D. de Kaste (2011). "The identification of rimonabant polymorphs, sibutramine and analogues of both in counterfeit Acomplia bought on the internet". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**, 21-26.