

**Centrum Badań
Molekularnych
i Makromolekularnych**



**Polskiej
Akademii
Nauk**

Dr Marta Dudek
Samodzielna Pracownia Badań Strukturalnych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Autoreferat do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Warszawa, 08.03.2019

1. Dane personalne

Imię i Nazwisko: Marta Katarzyna Dudek
Nazwisko panieńskie: Jamróz

2. Informacje o posiadanych dyplomach

- a) **magister farmacji** (ocena bardzo dobra, praca wyróżniona) – *Pilotażowe badania trwałości preparatów recepturowych ojców Bonifratrów*. Promotor pracy: Prof. dr hab. Józef Kowalski, praca obroniona w lipcu 2005 roku na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie.
- b) **doktor nauk farmaceutycznych** (praca wyróżniona *summa cum laude*) – *Struktura ksylozydów triterpenowych wyizolowanych z Cimicifuga racemosa: badania NMR i modelowanie molekularne*. Promotor pracy: Prof. dr hab. Iwona Wawer, praca obroniona 16 listopada 2011 roku na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- c) **dyplom ukończenia studiów podyplomowych na Wydziale Fizyki z Astronomią** Uniwersytetu Warszawskiego, praca dyplomowa – *Doświadczenia ilustrujące właściwości magnetyczne materii* – przyjęta w lipcu 2011 roku.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- (a) 01.10.2017 – obecnie: stanowisko specjalisty w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi
- (b) 01.02.2018 – 31.01.2019: staż podoktorski w School of Chemistry na Uniwersytecie w Southampton, UK
- (c) 01.10.2015 – 30.09.2017: staż podoktorski w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi
- (d) 01.10.2012 – 30.09.2015: adiunkt w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- (e) 02.11.2009 – 30.09.2015: asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- (f) 01.10.2007 – 30.09.2011: doktorant w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego 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

(a) tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl prac tematycznych pt. *Implementacja nowoczesnych metod spektroskopowych i obliczeniowych w analizie strukturalnej produktów pochodzenia naturalnego i aktywnych składników leków*.

(b) prace wchodzące w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego

H1. Marta K. Dudek (Jamróz), Sławomir Kaźmierski, Kamil Stefaniak, Witold B. Gliński, Jan. A. Gliński. Conformational equilibria in selected A-type trimeric procyanidins. *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12, 9837–9844, IF=3,562 (2014).

Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu wszystkich eksperymentów NMR, w tym widm temperaturowych, analizie uzyskanych widm, przypisaniu sygnałów ^1H i ^{13}C różnym rotamerom w różnych rozpuszczalnikach lub kontroli poprawności tego przypisania przeprowadzonego przez

magistranta, zaplanowaniu, przeprowadzeniu oraz analizie obliczeń kwantowo-mechanicznych, interpretacji uzyskanych wyników i ich analizie w świetle wybranych skal rozpuszczalników oraz napisaniu pracy i przygotowaniu wszystkich elementów graficznych. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 70%.

H2. Marta K. Dudek, Agata Jeziorna, Marek J. Potrzebowski. Computational and experimental study of reversible hydration/dehydration processes in molecular crystals of natural products – a case of catechin. *CrystEngComm* 2016, 18, 5267–5277, IF=3,474 (2016).

Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu, rejestracji i analizie wszystkich widm ^{13}C CPMAS, ^2H MAS, PASS-2D oraz ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR NMR w cieple stałym, przeprowadzeniu symulacji widm ^2H i interpretacji uzyskanych wyników, zaplanowaniu i przeprowadzeniu analizy zawartości wody w uzyskanych hydratách katechiny, zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich obliczeń kwantowo-mechanicznych oraz napisaniu pracy i przygotowaniu wszystkich elementów graficznych, łącznie z tytułową grafiką na okładkę czasopisma. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 85%.

H3. Marta K. Dudek, Tomasz Pawlak, Piotr Paluch, Agata Jeziorna, Marek J. Potrzebowski. A multi-technique experimental and computational approach to study the dehydration processes in the crystals of endomorphin opioid peptide derivative. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16, 5312–5322, IF=4,055 (2016).

Mój udział w tej pracy polegał na analizie wyników uzyskanych z eksperymentów NMR, zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu wszystkich obliczeń kwantowo-chemicznych w fazie gazowej i w kryształach, Stworzeniu koncepcji obliczeniowej i modeli strukturalnych poddanych obliczeniom, selekcji najlepszych uzyskanych modeli, analizie uzyskanych wyników obliczeniowych i ich korelacji z danymi eksperymentalnymi oraz napisaniu większości pracy i przygotowaniu elementów graficznych.

Swój wkład szacuję na 60%.

H4. Marta K. Dudek, Witold B. Gliński, Matthew H. Davey, Daniel Sliva, Sławomir Kaźmierski, Jan A. Gliński. Trimeric and tetrameric A-type procyanidins from peanut skins. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 415–426, IF=3,885 (2017).

Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu i zleceniu wszystkich pomiarów NMR, a później także pomiarów ECD, zaplanowaniu i przeprowadzeniu obliczeń kwantowo-chemicznych, analizie uzyskanych wyników, skonstruowaniu toku analizy strukturalnej procyanidyn, określeniu struktury wszystkich badanych związków, w tym 4 nowych pochodnych oraz napisaniu znacznej części pracy i przygotowaniu jej elementów graficznych. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 70%.

H5. Marta K. Dudek, Grzegorz Bujacz, Marek J. Potrzebowski. Experimental tests for quality validation of computationally predicted crystal structures – a case of a conformationally flexible procyanidin A2 dihydrate. *CrystEngComm* 2017, 19, 2903–2913, IF=3,304 (2017).

Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu, przeprowadzeniu i analizie wszystkich obliczeń kwantowo-chemicznych, w tym przeszukiwaniu przestrzeni konformacyjnej procyanidyny A2, analizie wyników i selekcji konformerów do dalszych etapów, wygenerowaniu i wstępnej optymalizacji struktur krystalicznych dla wyselekcjonowanych konformerów, selekcji i optymalizacji na wyższym poziomie teorii najniżej energetycznych struktur krystalicznych oraz obliczeniu teoretycznych

parametrów NMR. Ponadto, zaplanowałam i poddałam analizie eksperymenty NMR w ciele stałym, wraz z przypisaniem sygnałów oraz dokonałam analizy uzyskanych wyników i ich porównania z danymi teoretycznymi, a także napisałam manuskrypt i przygotowałam jego elementy graficzne. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 90%.

H6. Marta K Dudek, Ewelina Wielgus, Piotr Paluch, Marek Potrzebowski. Spontaneous keto-enol tautomerization in the crystal lattice visualized with the help of water encapsulated in hydrophilic reservoirs. *ChemPhysChem* 2017, 18, 2850–2854, IF=2,947 (2017).

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na zaobserwowaniu zjawiska tautomerii keto-enolowej, zaplanowaniu eksperymentów krystalizacyjnych, a także pomiarów NMR i MS, które pozwoliły dowiedzieć, że takie zjawisko zachodzi w badanych kryształach, przeprowadzeniu eksperymentów NMR w roztworze, analizie widm NMR w roztworze i ciele stałym, częściowej analizie i dyskusji danych uzyskanych z pomiarów MS, analizie wniosków płynących z wszystkich uzyskanych danych i stworzeniu pełnego obrazu pozwalającego wyjaśnić obserwowane zjawisko, napisaniu większości manuskryptu oraz przygotowaniu jego elementów graficznych. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 70%.

H7. Marta K. Dudek, Maciej Kostrzewa, Piotr Paluch, Marek J. Potrzebowski. π -Phylic molecular recognition in the solid state as a driving force for mechanochemical formation of apremilast solvates and cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18, 3959–3970, IF=3,972 (2018).

Mój udział w tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu sposobu otrzymania nowych kokryształów apremilastu, analizie widm NMR w ciele stałym uzyskanego solwatu apremilastu z toluenem oraz kokryształu apremilastu z toluenem, w tym przypisaniu sygnałów ^1H , ^{13}C i ^{15}N , analizie danych uzyskanych z pomiarów PXRD, stworzeniu modeli strukturalnych odpowiadających uzyskanym danym eksperymentalnym, przeprowadzeniu obliczeń kwantowo-chemicznych, porównaniu teoretycznych i eksperymentalnych parametrów NMR i PXRD oraz napisaniu większości manuskryptu. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 60%.

H8. Marta K. Dudek, Graeme M. Day. Explaining crystallization preferences of two polyphenolic diastereoisomers by crystal structure prediction. *CrystEngComm* 2019, 10.1039/C8CE01783B, IF=3,304 (2017).

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na zaobserwowaniu różnic w preferencjach krystalizacyjnych katechiny i epikatechiny, zaplanowaniu i przeprowadzeniu obliczeń, które pozwoliły wyjaśnić obserwowane różnice, w tym przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej, wygenerowanie i wstępna optymalizacja struktur krystalicznych dla wszystkich uzyskanych konformerów, zarówno czystych form krystalicznych, jak i solwatów 1:1 i 1:2 z metanolem. Ponadto przeprowadziłam analizę uzyskanych wyników i napisałam zdecydowaną większość manuskryptu oraz przygotowałam wszystkie elementy graficzne, łącznie z tytułową grafiką na okładkę czasopisma. Jestem autorem korespondencyjnym tej pracy.

Swój wkład szacuję na 90%.

- (c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Spektroskopia NMR w roztworze i ciele stałym, a także często towarzyszące im obliczenia teoretyczne stanowią komplementarne i unikatowe w swej uniwersalności narzędzia, użyteczne do rozwiązywania problemów strukturalnych chemii organicznej, farmacji, lub analizy produktów pochodzenia naturalnego. Niezwykle szybki i często spontaniczny rozwój metodologii w obu tych dziedzinach powoduje jednak, że najnowsze i najbardziej zaawansowane techniki nie są powszechnie stosowane. Tak dzieje się szczególnie w przypadku spektroskopii NMR w ciele stałym, w której postęp technologiczny umożliwia rejestrację widm o bardzo dużej rozdzielczości, zbliżonych jakością do tych uzyskiwanych w cieczy, na tyle jednak specyficznych, że mogą stać się źródłem subtelnych informacji, niedostępnych w klasycznych pomiarach cieczowych. Coraz trudniejsze problemy strukturalne mogą znaleźć swoje rozwiązanie właśnie dzięki wykorzystaniu tego narzędzia, pod warunkiem, że próbujący je rozwiązać badacze będą świadomi zarówno możliwości, jakie oferuje spektroskopia NMR w ciele stałym, jak i ograniczeń tej metody. Podobnie jest w przypadku obliczeń kwantowo-chemicznych, zwłaszcza w dziedzinie komputerowego przewidywania struktur krystalicznych, które oferuje zrozumienie preferencji krystalizacyjnych związków organicznych, możliwość przewidzenia istnienia form polimorficznych leków, a także opisanie struktury krystalicznej związku, wymykającego się poznaniu za pomocą metod eksperymentalnych. Tego typu badania, wyznaczające trend współczesnej chemii strukturalnej ciał stałych, są rozwijane w kilku grupach naukowych na świecie, działających w najbardziej prestiżowych ośrodkach, jednak w Polsce stosowane są zgodnie z moją wiedzą niezwykle rzadko (jeśli w ogóle).

W swojej dotychczasowej pracy badawczej zajmowałam się implementacją nowoczesnych metod spektroskopii NMR w roztworze i ciele stałym oraz obliczeń kwantowo – chemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem przewidywania struktur krystalicznych, do rozwiązywania trudnych problemów strukturalnych na poziomie molekularnym. Niniejszy autoreferat podzielony jest na 4 części, z których każda opisuje nieco inne aspekty zastosowania wspomnianych wyżej technik. W pierwszej części przedstawiam zastosowanie nieco bardziej rutynowych metod spektroskopii NMR w roztworze w połączeniu z zaawansowanymi obliczeniami kwantowo – chemicznymi, do opisu struktury i równowag konformacyjnych nowych, trudnych do analizy strukturalnej związków pochodzenia naturalnego, procyjanidyn. W kolejnej, demonstruję analizę stosowalności, a później także wykorzystanie komputerowego przewidywania struktur krystalicznych do poznania preferencji krystalizacyjnych diastereoizomerycznych polifenoli (część 2). Wreszcie część 3 i 4 skupiają się na zastosowaniu spektroskopii NMR w ciele stałym do opisanie struktur krystalicznych związków mikrokryształicznych o istotnych działaniach biologicznych (część 3), a także do „zajrzenia w głąb” kryształów i śledzenia procesów dynamicznych w nich zachodzących (część 4). Znaczna część prowadzonych przeze mnie badań dotyczyła naturalnie występujących polifenoli, katechiny i epikatechiny, oraz ich pochodnych (**H1**, **H2**, **H4–H6**, **H8**), ale zajmowałam się również badaniami

strukturalnymi apremilastu, nowego leku stosowanego w łuszczycy (**H7**), kwasu barbiturowego (**H6**) oraz pochodnej biologicznie aktywnego tetrapeptydu, endomorfiny-2 (**H3**).

1. Struktura i analiza konformacyjna w roztworze (**H1, H4**)

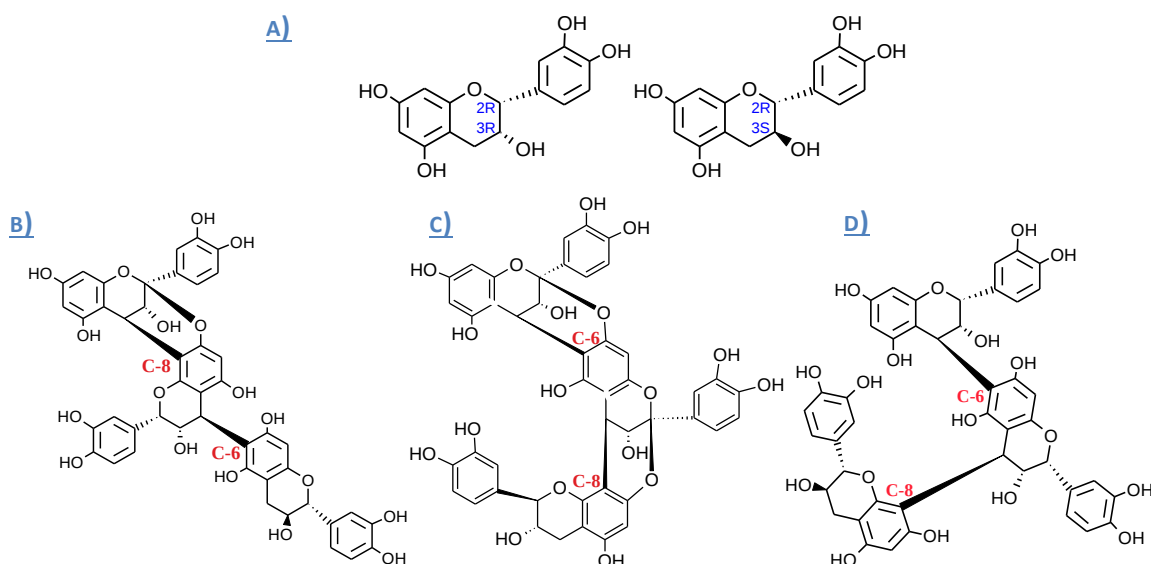
Jednym z głównych obiektów moich badań są procyanidyny, związki polifenolowe pochodzenia naturalnego o wielu ciekawych działaniach biologicznych. Wśród nich opisywano jak dotąd nie tylko typowe dla polifenoli działania neutralizujące wolne rodniki tlenowe, ale również działania przeciwnowotworowe, przeciwalergiczne, wspomagające funkcjonowanie układu sercowo – naczyniowego i przeciwzapalne. Działanie to silnie zależało od struktury chemicznej badanych związków w taki sposób, że nawet niewielka zmiana strukturalna powodowała znaczne zmiany w skutkach działania biologicznego. Przykładowo, jak wykazały badania biologiczne przeprowadzone w pracy **H4**, supresja wydzielania czynnika martwicy nowotworów TNF α przez dwa diastereoizomeryczne tetramery o tym samym stężeniu wynosiła odpowiednio 82 i 4%.

Wyjaśnienie obserwowanych różnic w działaniach biologicznych, a co za tym idzie zrozumienie mechanizmu działania procyanidyn, możliwe jest dopiero wówczas, gdy dysponuje się wiarygodnie określonymi strukturami chemicznymi. Natomiast w przypadku procyanidyn, niejednokrotnie nawet w renomowanych czasopismach, podaje się błędnie określone struktury. Dzieje się tak głównie z powodu stosunkowo skomplikowanej budowy tych związków oraz wzajemnego podobieństwa poszczególnych fragmentów tych cząsteczek.

Chemicznie procyanidyny są oligomerami pochodnych flawon-3-olu, katechiny i/lub epikatechiny, które są wzajemnymi diastereoizomerami ([RYSUNEK 1A](#)). W naturze najczęściej spotyka się (+)-katechinę (izomer 2*R*, 3*S*), oraz (–)-epikatechinę (2*R*, 3*R*), choć zdarzają się również związki zawierające (–)-katechinę (2*S*, 3*R*), zwaną dla uproszczenia *entkatechiną*. W procyanidynach te pochodne flawon-3-olu mogą być połączone ze sobą wiązaniami typu A lub B ([RYSUNEK 1B-D](#)), a lokalizacja tych połączeń występuje w co najmniej dwóch wariantach. Podjednostki (epi)katechin mogą być bowiem połączone w pozycjach (4-6) lub (4-8) w przypadku połączenia typu B oraz (2-O-7,4-6), (2-O-7,4-8) oraz (2-O-5,4-6) dla połączeń typu A. Dodatkowo istnieje możliwość występowania tzw. rozgałęzień, kiedy zarówno do atomu węgla C-6, jak i C-8 jednej podjednostki podstawione są dwie inne podjednostki. Różna może być też stereochemia tych połączeń. To wszystko powoduje, że analiza strukturalna procyanidyn i wiarygodne określenie ich struktury jest zadaniem trudnym, zwłaszcza jeśli chodzi o określenie sposobu i/lub lokalizacji połączeń występujących między poszczególnymi podjednostkami.

W literaturze rodzaj i miejsce połączenia między poszczególnymi podjednostkami procyanidyn najczęściej ustalane były na podstawie przesunięć chemicznych atomów węgla C-6 i C-8. Większość badaczy uważała bowiem, że w przypadku połączenia (4-8) przesunięcie chemiczne atomu węgla C-8 będzie wynosiło około 107 ppm, zaś dla połączeń (4-6) będzie wyższe i równe około 109 ppm. Jednak kryterium to nie pozwala jednoznacznie określić miejsca połączenia podjednostek, co wykazałam w pracy **H4**. Drugim często stosowanym kryterium w literaturze są korelacje HMBC pomiędzy protonem H-4 górnej podjednostki, a atomami węgla C-9 połączenia (4-8) lub C-5 połączenia (4-6) dolnej podjednostki. Problem jednak w tym, że przypisanie sygnałów tym atomom węgla odbywa się na

podstawie tych samych korelacji HMBC, korzystając ze wstępnych założeń przyjętych podczas analizy widm. Takie podejście powoduje, że te same korelacje mogą stanowić dowód na różną lokalizację połączeń. Ten brak niepodważalnych sposobów określania struktury procyanidyn, który ograniczał możliwości zrozumienia zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną, skłonił mnie do opracowania wiarygodnej metody analizy strukturalnej tych związków. Metodę tą opisałam w pracy **H4**, w której określiłam również strukturę czterech nowych procyanidyn wyizolowanych z łupin nasiennej orzeczy podziemnej (*Arachis hypogaea* L.).

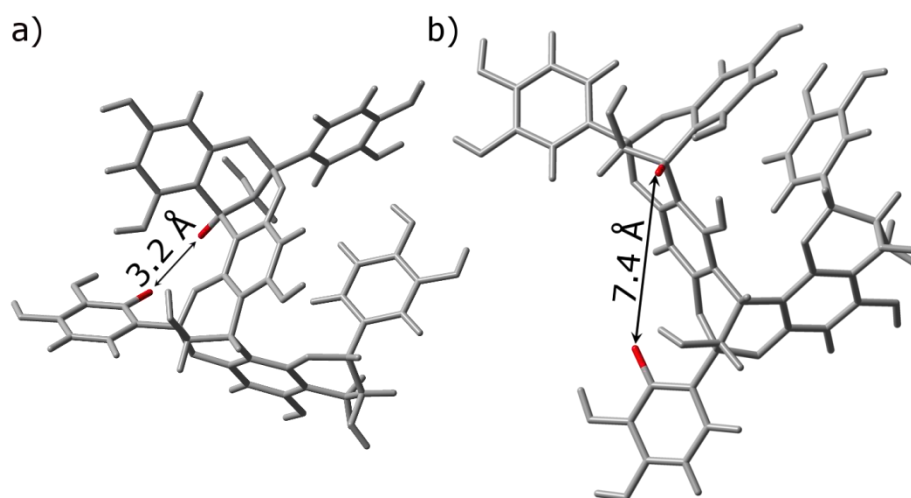


RYСУNEK 1. Wzory strukturalne (–)-epikatechiny i (+)-katechiny (a), a także procyanidyn z wiązaniami typu A i B (b), tylko typu A (c) oraz tylko typu B (d).

Łupiny nasienne orzeczy (brązowe cienkie otuliny znajdujące się między skorupą a orzeszkiem, które wyrzucamy jedząc popularne fistaszki), stanowiące surowiec odpadowy w produkcji masła orzechowego, są cennym źródłem procyanidyn, zwłaszcza tych posiadających połączenia typu A. W ramach wieloletniej współpracy z amerykańską firmą *Planta Analytica LCC* otrzymałam do analizy strukturalnej szereg związków wyizolowanych z tego surowca, a wstępne badania strukturalne sugerowały, że cztery z tych związków, dwa trimery i dwa tetramery, nie zostały opisane w literaturze. W toku ustalenia ich struktury szybko stało się jasne, że literaturowe kryteria określenia lokalizacji połączeń pomiędzy podjednostkami (epi)katechiny, jak również te związane z określeniem konfiguracji absolutnej samych podjednostek nie wystarczą, by jednoznacznie określić strukturę badanych związków. Dla przykładu przedstawię problemy, jakie napotkałam w czasie ustalenia miejsca połączeń międzyflawanowych struktury związku oznaczonego w pracy **H4** numerem **3**, będącego trimerem (epi)katechiny, który otrzymał nazwę Peanut procyanidyna B (*Peanut procyanidin B*).

W toku analizy ustaliłam na podstawie wartości sprzężeń *J* dla protonów H3 i H4 w widmach ^1H NMR, że związek ten składa się z dwóch podjednostek epikatechiny (górnej, I, i środkowej, II) oraz jednej jednostki katechiny (dolnej, III), połączonych ze sobą wiązaniami typu A. Przesunięcie chemiczne atomów węgla C-6/8 podjednostki II wynosiło 108.95 ppm, co zgodnie z przedstawionym powyżej kryterium sugerowałoby występowanie połączenia C4-C6 między podjednostkami I i II. Z

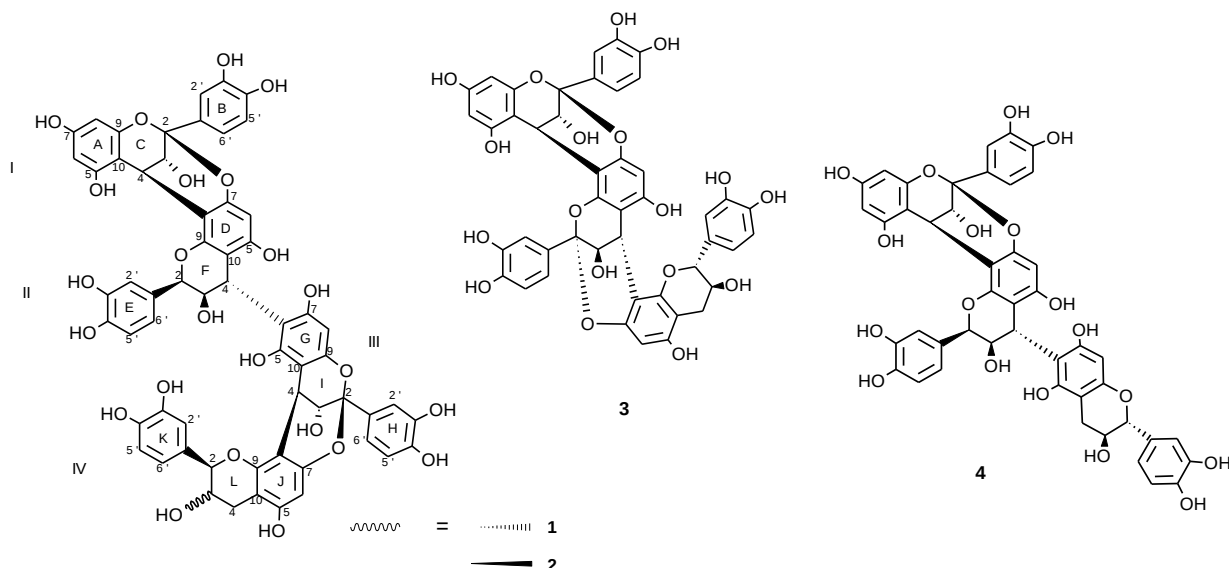
drugiej strony literaturowe przesunięcia dla pavetanin B7 i B8, w których podjednostki połączone są wiązaniami C4-C8, wynoszą 108.9 i 107.8 ppm. Sugeruje to, że zastosowanie „kryterium przesunięcia chemicznego” nie jest w tym przypadku wiarygodne. W celu jednoznacznej lokalizacji tego połączenia poddałam dodatkowej analizie widma ^1H - ^1H ROESY w metanolu- d_4 , typowym rozpuszczalniku stosowanym w analizie strukturalnej procyanidyn. Zbudowałam też i zoptymalizowałam modele strukturalne obu możliwych miejsc połączenia podjednostek (**RYSUNEK 2**). Obserwowane korelacje pomiędzy sygnałem pochodzącym od protonu H-4 z podjednostki I, a sygnałami pochodzącymi od protonów H-2' i H-6' z podjednostki II, wskazują jednoznacznie na połączenie atomów C4 i C8. Tylko wówczas bowiem odległości pomiędzy poszczególnymi parami protonów, od których pochodzą korelujące ze sobą sygnały ^1H , są mniejsze niż graniczna dla obserwowalności korelacji ROESY wartość 5 Å. W wypadku połączenia C4-C8 jest to odległość 3.2 Å, zaś przy połączeniu C4-C6 wynosi ona 7.4 Å.



RYSUNEK 2. Struktura proponowanych modeli strukturalnych Peanut procyanidyny B: EC-(4B-8,2B-O-7)-EC-(4B-8,2B-O-7)-C (**3**) (z lewej) i EC-(4B-6,2B-O-7)-EC-(4B-8,2B-O-7)-C (z prawej), z zaznaczoną odległością pomiędzy atomami H4 z podjednostki I i H2' z podjednostki II.

Ustalenie lokalizacji połączenia pomiędzy podjednostką II i III nastręczyło jeszcze więcej problemów. Widma korelacyjne ROESY w metanolu- d_4 były na tyle niejednoznaczne, że jedynie w niewielkim stopniu wskazywały na lokalizację wiązania pomiędzy atomami C4 i C8. Zawodne i niejednoznaczne okazało się również kryterium korelacji HMBC, zaś aby definitywnie ustalić miejsce połączenia konieczne było zarejestrowanie i analiza widm ROESY w rozpuszczalniku pozwalającym na obserwację sygnałów pochodzących od mobilnych protonów hydroksylowych, takim jak bezwodny DMSO- d_6 . Dopiero na podstawie takich korelacji możliwe było potwierdzenie, że podjednostki II i III łączą się poprzez atomy C4 i C8. Ostatnim krokiem w analizie strukturalnej było potwierdzenie stereochemii wiązania międzyflawonowego oraz poszczególnych podjednostek za pomocą elektronowego dichroizmu kołowego. Dopiero tak skonstruowany tok analizy strukturalnej, obejmujący zarówno korelacyjne widma NMR w metanolu, umożliwiające porównanie z danymi literaturowymi, widma NMR w rozpuszczalniku aprotycznym (bezwodny DMSO), obliczenia teoretyczne oraz elektronowy dichroizm kołowy, pozwala ustalić strukturę oligomerycznych procyanidyn w sposób pewny.

Dzięki sformułowaniu nowego wiarygodnego kryterium ustalania połączeń pomiędzy podjednostkami flawinowymi, opisałam również strukturę dwóch nowych tetramerów – Peanut procyanidyny E (*Peanut procyanidin E*) i Peanut procyanidyny F (*Peanut procyanidin F*) – oraz kolejnego nowego trimeru, Peanut procyanidyny C (*Peanut procyanidin C*) (**RYSUNEK 3**). Jednocześnie zauważyłam, że wpływ na obserwowane przesunięcia chemiczne ma nie tyle sama lokalizacja występującego połączenia międzyflawonowego, ile trójwymiarowa konformacja związku wynikająca z takiego połączenia. Błędne jest zatem podejście często spotykane w literaturze, opierające się wyłącznie na porównaniu przesunięć chemicznych pomiędzy poszczególnymi procyanidynami i określanie struktury jedynie na podstawie podobieństwa tych przesunięć. W pracy **H4** wykazałam, że Peanut procyanidyna C, posiadająca połączenie C4-C6 pomiędzy podjednostką II i III ma niezwykle podobne przesunięcia chemiczne do jednego z rotamerów cinnamtaniny D-1, w której te podjednostki połączone są wiązaniem C4-C8. Dzieje się tak właśnie ze względu na podobieństwo konformacji, jaką w metanolu przybierają obie te struktury.



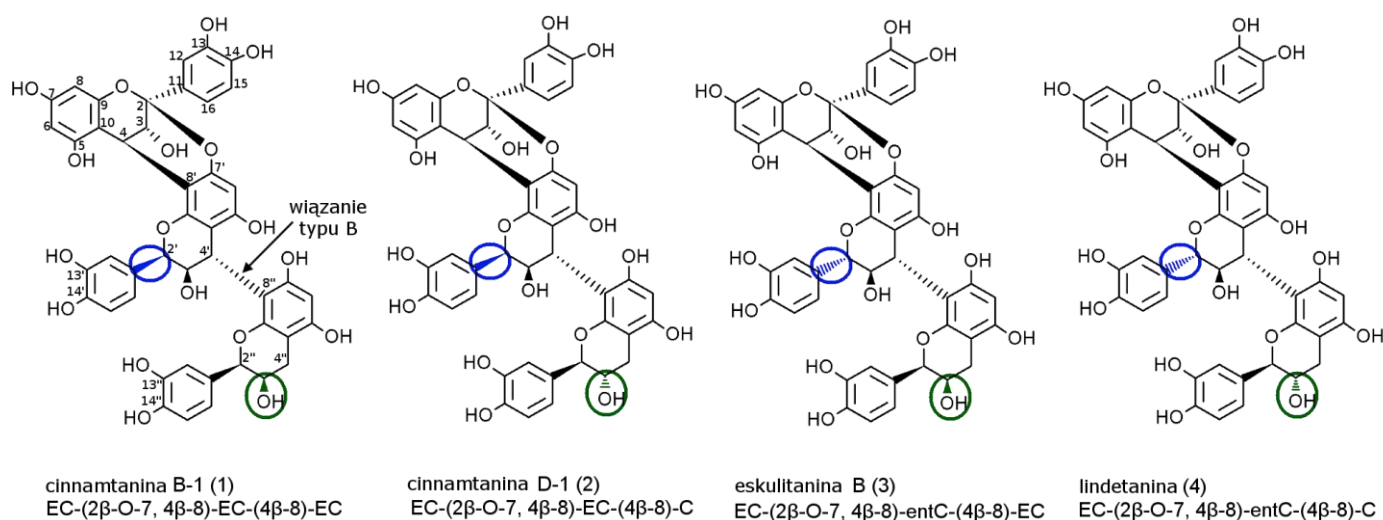
RYSUNEK 3. Struktura nowych związków wyizolowanych z łupin nasiennych orzechy podziemnej opisanych w pracy **H4**: Peanut procyanidyny B (3), C (4), E (1) i F (2).

Ostatni aspekt cytowanej pracy związany jest z częstym zjawiskiem w chemii procyanidyn, jakim jest występowanie w roztworze izomerów rotacyjnych (rotamerów). W skali czasowej spektroskopii NMR obserwuje się je jako występowanie dwóch zestawów sygnałów rezonansowych, ulegających koalescencji (uwspólnieniu) w odpowiednio wysokiej temperaturze. Ich obecność związana jest z możliwością obrotu wokół wiązania typu B w oligomerycznych procyanidynach, co prowadzi do współistnienia przynajmniej dwóch konformerów o odmiennych wartościach kąta torsyjnego zawierającego międzyflawonowe wiązanie typu B. Uważa się, że możliwość przyjęcia odmiennych konformacji może być jedną z przyczyn wspomnianego wcześniej zróżnicowania siły działania biologicznego procyanidyn, nawet przy niewielkich różnicach strukturalnych. W pracy **H4** określiłam wzajemny stosunek zawartości rotamerów każdego z badanych związków, zauważając przy tym, że zależy on silnie od struktury związku, z najbardziej skrajną różnicą występującą dla

dwóch znanych trimerów, Peanut procyanidyny A i Peanut procyanidyny D, różniących się od siebie lokalizacją połączenia międzyflawanowego między I i II podjednostką (odpowiednio C4-C6 i C4-C8). W Peanut procyanidynie A rotamery występowały w stosunku 1:0.9, zaś w Peanut procyanidynie D nie występowały w ogóle nawet w temperaturze 250 K.

Zjawisko rotamerii czterech innych trimerycznych procyanidyn wyizolowanych z kory cynamonu opisałam w pracy **H1**. Badane związki, do których należały cinnamtanina D1 (*cinnamtannin* D1), cinnamtanina B1 (*cinnamtannin* B1), lindetanina (*lindetannin*) i eskulitanina B (*aesculitannin* B), zawierające w swej budowie jedno wiązanie typu A i jedno wiązanie typu B, izolowane były jak dotąd z wielu surowców roślinnych. Pozwala to wnioskować, że są dość mocno rozpowszechnione w świecie roślin. Z tego powodu istnieje również znaczna liczba badań biologicznych sugerujących m.in., że to właśnie te trimeryczne procyanidyny są odpowiedzialne za insulinopodobną aktywność cynamonu opisywaną w literaturze.

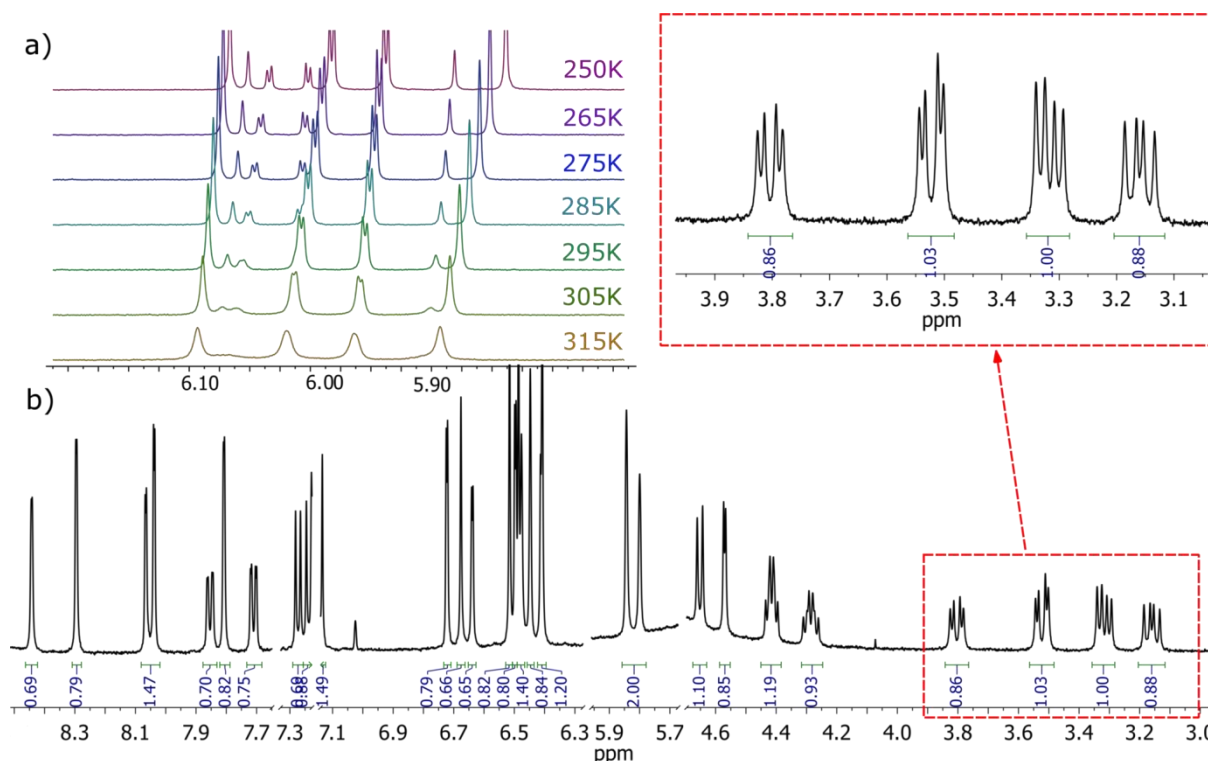
Badane trimery są zbudowane w bardzo podobny sposób, różniąc się od siebie jedynie konfiguracją absolutną na jednym lub dwóch centrach chiralnych (**RYSUNEK 4**), zlokalizowanych w podjednostce II lub III. Podjednostki te połączone są wiązaniem typu B, zaś kąt torsyjny φ , zawierający to wiązanie i zlokalizowany między atomami C3'_C4'_C8''_C9'', to element strukturalny różnicujący występujące obok siebie izomery rotacyjne. Koalescencję sygnałów pochodzących od dwóch zestawów sygnałów rezonansowych różnych rotamerów przedstawia **RYSUNEK 5**.



RYSUNEK 4. Struktura procyanidyn z kory cynamonu badanych w pracy **H1**. Kolorowe zaznaczenia podkreślają różnice strukturalne pomiędzy analizowanymi związkami, zaś strzałka wskazuje wiązanie typu B, wokół którego obrót jest odpowiedzialny za występowanie izomerów rotacyjnych. Kąt torsyjny zawierający to wiązanie oznaczony jest w tekście jako φ .

W prezentowanej pracy przeprowadziłam szczegółową analizę konformacyjną rotamerów występujących w badanych związkach, począwszy od przypisania wszystkich sygnałów rezonansowych poszczególnym rotamerom. Wykazałam ponadto, że pomimo dużego podobieństwa strukturalnego, procyanidyny te mają znacząco różny stosunek rotamerów zależny od ich budowy i zastosowanego rozpuszczalnika (**TABELA 1**). Temperaturowe widma NMR w metanolu pozwoliły mi na

wyznaczenie entalpii swobodnej Gibbsa aktywacji rotacji wokół kąta φ w rozpuszczalniku, korzystając z równania Eyringa: $\Delta G_{T_c} = 4.58T_c * (10.32 + \log \frac{T_c}{k_c})$, w którym T_c oznacza temperaturę koalescencji, zaś wielkość k_c wyznacza się wykorzystując wartość maksymalnej obserwowanej separacji sygnałów $\Delta\nu$, zgodnie z równaniem: $k_c = \frac{\pi * \Delta\nu}{\sqrt{2}}$. Otrzymane wielkości są w granicach błędu takie same dla wszystkich badanych związków i wskazują na istnienie jedynie niewielkiej bariery energetycznej między rotamerami, wyjaśniając fakt jednoczesnego występowania dwóch konformacji.



RYSUNEK 5. Widma ^1H NMR dla cinnamtaniny D1: (a) charakterystyczna koalescencja sygnałów ^1H w metanolu oraz (b) wyraźnie widoczne dwa zestawy sygnałów ^1H w pirydynie.

W celu potwierdzenia wniosków wyciągniętych z widm NMR przeprowadziłam obliczenia teoretyczne, które wykazały istnienie dwóch minimów energetycznych rozdzielonych barierą rotacji o wielkości zbliżonej do tej otrzymanej z danych eksperymentalnych. Obliczenia te pozwoliły mi także ustalić preferowane wartości kąta φ w obu rotamerach, które dla każdego związku oscylowały wokół -90° i $+90^\circ$ (stąd nazwane są rotamerami $(-\varphi)$ i $(+\varphi)$). Szczegółowa analiza otrzymanych konformacji wykazała, że uzyskane wartości kąta φ wynikają z kompromisu pomiędzy maksymalizacją liczby wiązań wodorowych, a minimalizacją odpychania wolnych par elektronowych licznych atomów tlenu.

Zastanawiające różnice wzajemnych stosunków rotamerów poszczególnych związków w różnych rozpuszczalnikach skłoniły mnie do przeprowadzenia obliczeń statycznych ekranowania preferowanych konformacji badanych związków oraz porównania ich z eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych jąder ^1H . W efekcie udowodniłam, że w różnych rozpuszczalnikach stabilizowane są inne konformacje procyjanidyn (**TABELA 1**): w przypadku rozpuszczalników silnie elektrono-donorowych (DMSO, pirydyna) we wszystkich przypadkach

przeważał rotamer ($-\varphi$), zaś w przypadku acetonu i metanolu dominował rotamer ($+\varphi$), który zgodnie z uzyskanymi wynikami obliczeń charakteryzował się również niższą swobodną entalpią Gibbsa w fazie gazowej (obliczoną metodą M06-2X/6-31G(d,p)).

TABELA 1. Wzajemny stosunek ilościowy rotamerów badanych związków w różnych rozpuszczalnikach (wyrażony jako zawartość rotametru ($-\varphi$) w stosunku do rotametru ($+\varphi$)) oraz wyznaczone z temperaturowych widm ^1H NMR entalpie swobodne Gibbsa aktywacji rotacji wokół wiązania typu B.

	1 (EC-EC-EC)	2 (EC-EC-C)	3 (EC-entC-EC)	4 (EC-entC-C)
Metanol	0.27	0.24	0.11	0.11
Aceton	0.40	0.50	0.28	0.28
DMSO	1.50	2.40	1.30	1.70
Pirydyna	1.10	1.20	2.00	1.10
ΔG_{T_c} (298K) [kcal/mol]	15.2	12.2	13.8	13.6

Fakt preferowania różnych konformacji w rozpuszczalnikach o różnym charakterze wynika z budowy konformerów. Rotamer ($+\varphi$) ma bowiem dużo bardziej zwartą budowę od rotametru ($-\varphi$), mając jednocześnie większą liczbę wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. W takiej sytuacji rozpuszczalniki o niezbyt silnych właściwościach elektrono-donorowych nie są w stanie konkurować z istniejącymi oddziaływaniami wewnątrzcząsteczkowymi. Jednak w przypadku silniejszych właściwości elektrono-donorowych rozpuszczalnika, wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe ulegają zerwaniu na korzyść oddziaływania z rozpuszczalnikiem, stąd preferowana jest konformacja bardziej rozciągnięta, dająca lepszy dostęp cząsteczkom rozpuszczalnika do potencjalnych miejsc elektrono-akceptorowych. Implikacje płynące z tych obserwacji mogą być niezwykle znamienne. Łatwo bowiem wyobrazić sobie sytuację, w której podczas oddziaływania z białkami tylko ta cząsteczka procyanidyny zwiąże się z receptorem, która znalazłszy się w miejscu wiążącym o silnie elektrono-donorowym charakterze ma zdolność przyjęcia innej konformacji od tej, która preferowana jest w środowisku wodnym.

2. Zastosowanie przewidywania struktur krystalicznych (CSP) w badaniach strukturalnych (H5, H8)

Wyniki uzyskane w pracy **H1** pozwoliły mi także lepiej zrozumieć i wyjaśnić preferencje krystalizacyjne katechiny i epikatechiny, jednostek budulcowych procyanidyn. Badania tego zagadnienia podjęłam w związku z przeprowadzonymi przeze mnie próbami otrzymania odpowiednich do badań rentgenograficznych monokryształów tych diastereoizomerów. W toku prac zaobserwowałam znaczące różnice w zachowaniu się epikatechiny i katechiny. Epikatechina, której jedyna struktura krystaliczna znana jest od ponad 40 lat, nie wykazywała bowiem żadnych tendencji do tworzenia jakichkolwiek innych form krystalicznych. Wydaje się zatem być monomorficzna. Zaś katechina nie tworzy czystych form krystalicznych, ale niezwykle chętnie krystalizuje w postaci solwatów i hydratów, chłonec z powietrza nie tylko parę wodną, ale także pary polarnych

rozpuszczalników organicznych, jeśli tylko znajdzie się w zawierającej je atmosferze (**H2**, **H8**). Wyjaśnienie na poziomie molekularnym tak zdecydowanych różnic w preferencjach krystalizacyjnych podobnych do siebie związków możliwe jest w zasadzie wyłącznie za pomocą przewidywania struktur krystalicznych (CSP, od angielskiego *Crystal Structure Prediction*). Procedura ta ma na celu przewidzenie za pomocą metod obliczeniowych wszystkich stabilnych form krystalicznych badanej substancji, opierając się jedynie na wiedzy o opisującym ją wzorze chemicznym i potencjalnych warunkach krystalizacji (**H8**).

CSP jest obecnie jednym z największych wyzwań chemii obliczeniowej ze względu na liczbę możliwych stopni swobody, które w takim procesie trzeba uwzględnić. Obejmuje to nie tylko różnorodność krystalograficznych grup przestrzennych oraz poszczególnych parametrów opisujących krystaliczną komórkę elementarną, ale także swobodę konformacyjną cząsteczki i różne warianty jej ułożenia w kryształ. Z drugiej strony, możliwość komputerowego przewidzenia jak dane związki chemiczne będą krystalizować, jakie formy polimorficzne będą tworzyć, czy będą podatne na tworzenie hydratów i solwatów oraz jakie ich formy krystaliczne będą najtrwalsze i dlaczego, jest nie do przecenienia dla przemysłu farmaceutycznego i rozwoju inżynierii kryształów. Warto podkreślić, że chociaż istnieje już wiele prac, w których z sukcesem zastosowano obliczenia CSP do głębszego zrozumienia obserwowanych tendencji krystalizacyjnych, to jednak dziedzina ta jest na wczesnym etapie rozwoju. W Polsce nie ma grupy badawczej, która zajmowałaby się rozwijaniem lub stosowaniem tej metodologii.

W pracy **H8** zastosowałam procedurę CSP do wyjaśnienia preferencji krystalizacyjnych katechiny i epikatechiny. Zastosowana przeze mnie metodologia składała się z kilku kluczowych etapów: (1) przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej badanych związków, (2) generowania struktur krystalicznych za pomocą kwazi-losowego próbkowania opartego o sekwencję Sobola, (3) wstępnej ewaluacji energii oddziaływań międzycząsteczkowych wygenerowanych kryształów z wykorzystaniem multipoli atomowych oraz (4) końcowej ewaluacji energii z wykorzystaniem metody DFT układów periodycznych (*periodic DFT*) tych struktur krystalicznych, które w poprzednim etapie uzyskały energię nie wyższą niż 15 kJ/mol od struktury o najniższej energii. Do tej pory zdecydowana większość zastosowań CSP dotyczyła układów sztywnych, dlatego praca **H8** poszerza zakres stosowalności tego rodzaju obliczeń do układów o znaczącej swobodzie konformacyjnej (w przypadku katechiny i epikatechiny jest to 6 rotujących wiązań). W przeprowadzonych obliczeniach CSP brałam pod uwagę 56 konformerów epikatechiny i 68 konformerów katechiny, generując struktury krystaliczne zarówno czystych związków, jak i ich metanолоwych solwatów w stosunku 1:1 i 1:2. Dla każdego konformeru każdego badanego związku rozważałam 4 najczęściej występujące chiralne grupy przestrzenne (co jest powszechnie przyjętą metodą zawężania przeszukiwanej przestrzeni, stosowaną w znacznej większości prac dotyczących CSP). Oznacza to, że wygenerowałam i podałam ocenie łącznie około 1.5 miliona struktur krystalicznych.

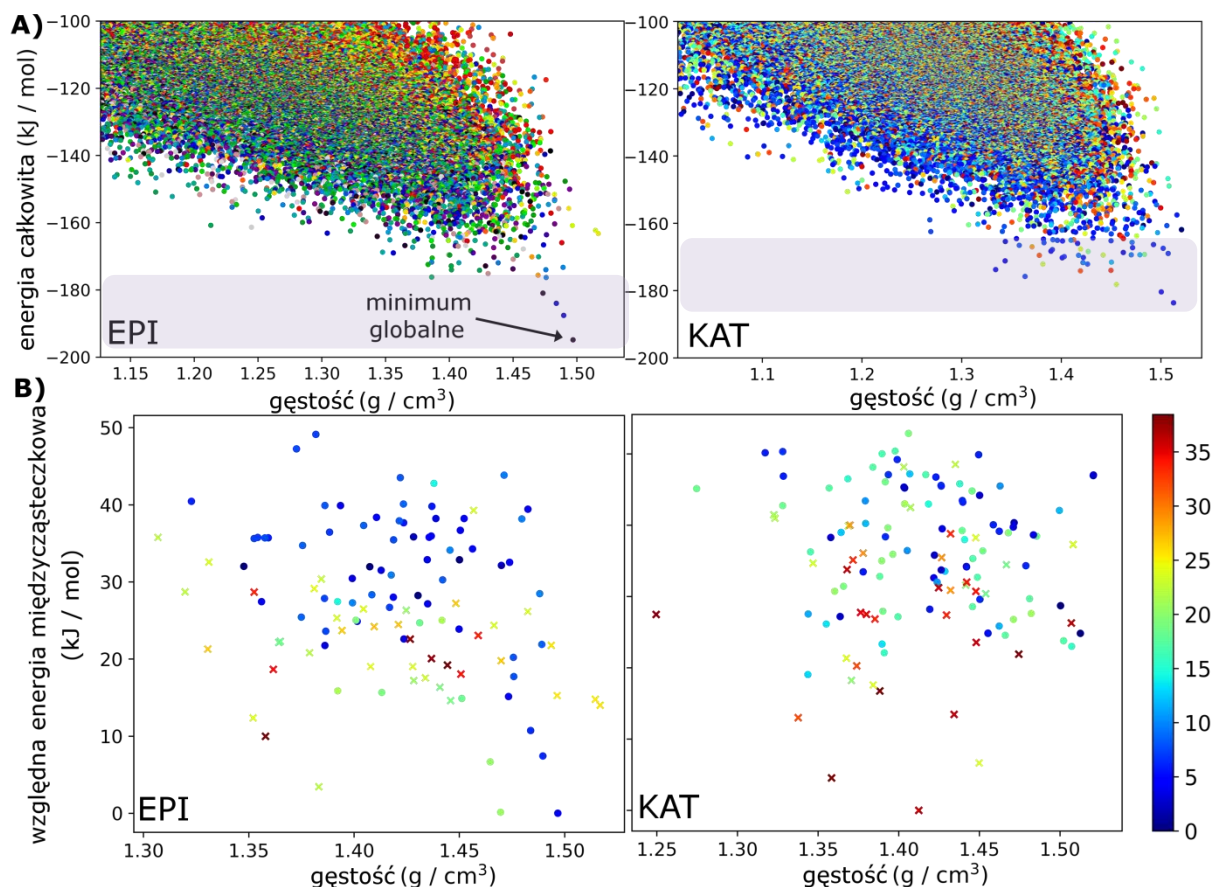
Rezultatem obliczeń CSP jest tzw. krajobraz energii krystalicznej (*crystal energy landscape*), czyli wykres zależności energii otrzymanych kryształów od ich gęstości. W takim krajobrazie każdy punkt (minimum lokalne) oznacza unikatową strukturę krystaliczną, zaś jego minimum globalne uważane jest za strukturę, którą powinno się obserwować eksperymentalnie. W rezultacie pierwszym

testem dla procedury CSP jest zawsze fakt znalezienia eksperymentalnej struktury krystalicznej rozważanego związku. W przypadku czystej epikatechiny struktura stanowiąca minimum globalne krajobrazu energii krystalicznej ([RYSUNEK 6A](#)) wykazuje dużą zgodność ze strukturą eksperymentalną. Znajduje to odzwierciedlenie w wartości RMSD uzyskanej po nałożeniu tych struktur na siebie, a wyrażającej różnicę w położeniach poszczególnych atomów. Wartość ta dla klastra 20 cząsteczek wynosiła 0.383 Å po wstępnej optymalizacji opartej o multipole atomowe, zaś po optymalizacji metodą DFT układów periodycznych 0.023 Å. Podobnie znaleziona została eksperymentalna struktura metanolowego disolwatu katechiny, z RMSD o wartości 0.538 Å.

Warto zwrócić uwagę na różnice w krajobrazie energetycznym czystych katechiny i epikatechiny. W najważniejszym obszarze energii oddalonym najwyżej o 15 kJ/mol od uzyskanego minimum globalnego w przypadku epikatechiny znajduje się tylko kilka struktur ([RYSUNEK 6A](#), jasnofioletowe pole), z różnicą energetyczną między minimum globalnym a następną strukturą wynoszącą 9 kJ/mol. W przypadku katechiny w takim obszarze znajduje się około 40 struktur krystalicznych, z niewielkimi różnicami energetycznymi między nimi. Szczegółowa analiza uzyskanych struktur i ich energii w rozbiciu na energię międzycząsteczkową E_{INTER} (rozumianą jako wkład do energii sieci krystalicznej, wynikający jedynie z oddziaływań między poszczególnymi cząsteczkami, a nie biorący pod uwagę konformacji cząsteczki) i wewnątrzcząsteczkową E_{INTRA} (obrazującą energię cząsteczki w fazie gazowej, wynikającą bezpośrednio z konformacji cząsteczki) pozwala zrozumieć różnice w preferencjach krystalizacyjnych katechiny i epikatechiny ([RYSUNEK 6B](#)). W przypadku tej ostatniej konformery o niskiej energii E_{INTRA} tworzą stabilne struktury o korzystnej wartości E_{INTER} , zaś w przypadku katechiny takie korzystne struktury są tworzone wyłącznie przez konformery o wysokiej energii w fazie gazowej, a te o niskiej E_{INTRA} nie upakowują się w kryształy w korzystnie energetyczny sposób. Ciekawe, że wszystkie korzystne energetyczne struktury katechiny nie mają wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego. Ma to znaczący wpływ na obecne w kryształach motywy strukturalne, wyraźnie różne od tych znalezionych w kryształach epikatechiny ([RYSUNEK 7](#)). Na [RYSUNKU 6B](#) struktury bez wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego zaznaczone są krzyżykami. Taka niezdolność konformerów katechiny o niskiej energii do efektywnego upakowania się w korzystny sposób w sieci krystalicznej jest jedną z przyczyn obserwowanych różnic w preferencjach krystalizacyjnych pomiędzy nią a jej diastereoizomerem.

W przypadku wyników uzyskanych dla metanolowych solwatów badanych związków przede wszystkim zwraca uwagę fakt, że konformer katechiny tworzący strukturę eksperymentalną ma energię większą od najkorzystniejszej energetycznie konformacji aż o 33 kJ/mol. Zwykle uważa się, że stabilne struktury krystaliczne mogą być tworzone przez konformery o energii do 22.5 kJ/mol większej niż globalne konformacyjne minimum energetyczne. Jednak istniejące badania tego zagadnienia nie uwzględniały form solwatowanych. Uzyskany przeze mnie wynik oznacza, że w przypadku solwatów można spodziewać się, że oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalnika mogą stabilizować nawet bardzo niekorzystne energetycznie konformacje. Uzyskane wyniki są również interesujące w kontekście analizy konformacyjnej procyanidyn przeprowadzonej w pracy **H1**, w której metanol nie był w stanie zerwać wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych tworzonych przez badane oligomery. Wydaje się, że w przypadku katechiny dochodzi do takiego zerwania

wewnątrzcząsteczkowego wiązania w pierścieniu dihydroksyfenylowym podczas krystalizacji z metanolu, przy zatężaniu roztworu w miarę odparowywania rozpuszczalnika. Hipotezę tą potwierdzają motywy strukturalne obecne w eksperymentalnym kryształ metanolowego solwatu katechiny ([RYSUNEK 7](#)), w którym to właśnie cząsteczki metanolu wiążą się za pomocą wiązań wodorowych z sąsiadującymi ze sobą grupami hydroksylowymi pierścienia dihydroksyfenylowego, zastępując w ten sposób zazwyczaj tworzone wiązania wewnątrzcząsteczkowe.

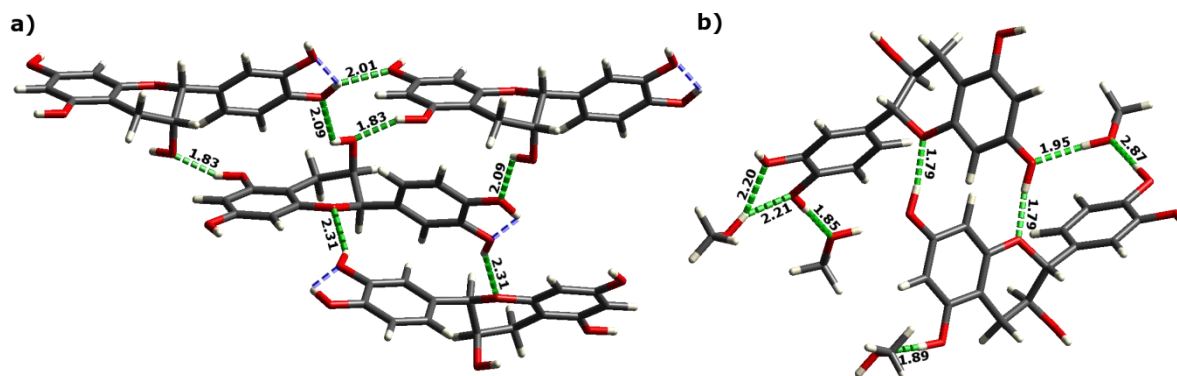


RYSUNEK 6. Krajobraz energii krystalicznej dla czystych epikatechiny i katechiny z zaznaczonym obszarem najniższej energii (20 kJ/mol od minimum globalnego) (A) oraz międzycząsteczkowy wkład do energii sieci krystalicznej obu cząsteczek, z zaznaczoną za pomocą mapy kolorów energią wewnątrzcząsteczkową (B). Krzyżykami oznaczone są struktury zawierające konformery bez wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego.

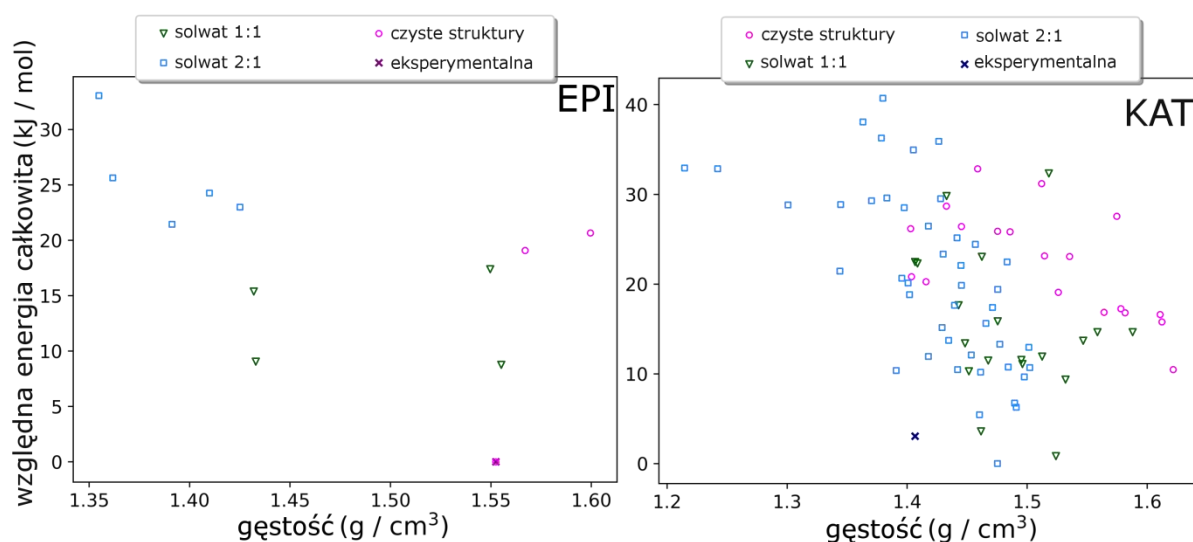
Obserwowana wysoka energia konformerów katechiny tworzących korzystne energetycznie struktury krystaliczne jest przyczyną, dla której ten polifenol tak chętnie tworzy solwaty i hydraty. Małe cząsteczki rozpuszczalników bowiem łatwo penetrują sieć krystaliczną katechiny i tworzą z nią wiązania wodorowe kompensując w ten sposób niekorzystną energię wewnątrzcząsteczkową. Dowodzi tego ostatecznie porównanie energii struktur krystalicznych czystej katechiny i jej metanolowych solwatów uzyskanych w wyniku procedury CSP ([RYSUNEK 8](#)). W przeciwieństwie do niej czysta forma krystaliczna epikatechiny jest znacznie bardziej stabilna.

Przeprowadzone obliczenia wyjaśniają przyczynę tendencji tworzenia form solwatowanych przez kryształy związków organicznych i pozwalają głębiej zrozumieć to zjawisko. Przeprowadzone

wcześniej prace wskazywały na obecność stabilnych struktur krystalicznych o niskiej gęstości jako przyczynę powstawania solwatów. W takich strukturach istniały bowiem puste przestrzenie mogące „zmieścić” cząsteczkę(i) rozpuszczalnika. W przeprowadzonych przeze mnie obliczeniach wszystkie struktury krystaliczne miały podobną gęstość, zaś czynnikiem prowadzącym do tworzenia solwatów jest możliwość kompensacji przez rozpuszczalnik wysokoenergetycznej konformacji cząsteczki.



RYSUNEK 7. Motywy strukturalne występujące w kryształach epikatechiny (a) i metanolowego solwatu katechiny (b). Kolorem niebieskim zaznaczone są wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe.

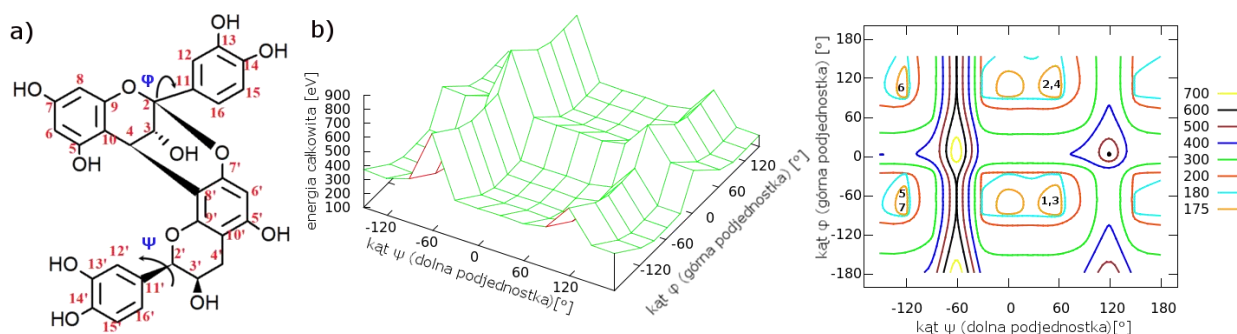


RYSUNEK 8. Porównanie krajobrazu energii sieci krystalicznej metanolowych solwatów i czystych form katechiny i epikatechiny policzonych na poziomie teorii PBE-D2.

Procedura CSP, choć często niezwykle pomocna, ma też kilka słabych punktów, które utrudniają jej szerokie zastosowanie. Jednym z nich jest dokładność metod teoretycznych stosowanych do oszacowania energii uzyskanych struktur. Wstępna ocena energii odbywa się najczęściej za pomocą pól siłowych (warto zaznaczyć, że w niektórych pracach pozostaje się na tym etapie ewaluacji), a następnie dla najlepszych struktur liczona jest energia na poziomie DFT układów periodycznych. Żadna z tych metod nie gwarantuje jednak dokładności poniżej 5 kJ/mol, zwłaszcza w przypadku hydratów i układów wieloskładnikowych. Potencjalnych struktur krystalicznych uzyskanych w najniższym obszarze energii może być kilkadziesiąt lub nawet kilkaset. Jeśli wśród tych struktur chcielibyśmy znaleźć tę obserwowaną doświadczalnie, potrzebujemy pomocy metod eksperymentalnych. Jeśli natomiast zależy nam na opisanie nieznannej struktury krystalicznej związku,

którego nie udaje się wykrystalizować w postaci odpowiednich do badań rentgenograficznych monokryształów, metodą z wyboru jest tzw. *krystalografia NMR*, a więc połączenie spektroskopii NMR w ciele stałym, proszkowej dyfrakcji promieni X i obliczeń kwantowo-chemicznych. Pierwsza z metod dostarcza wówczas więzów strukturalnych, druga danych dotyczących komórki elementarnej w kryształ i grupy przestrzennej, zaś trzecia służy optymalizacji geometrii oraz obliczeniom teoretycznym parametrów NMR struktur zbudowanych na podstawie informacji uzyskanych z dwóch pierwszych metod. Tak jak w krystalografii rentgenowskiej, dużą zgodność wyników teoretycznych z danymi eksperymentalnymi jednej ze struktur traktuje się jako potwierdzenie struktury doświadczalnej. Często zdarza się jednak, że z przeprowadzonych pomiarów nie można wyciągnąć informacji pozwalających na stworzenie odpowiednich modeli strukturalnych. Wtedy warto zastosować procedurę CSP do uzyskania prawdopodobnych struktur, dla których następnie oblicza się parametry NMR i porównuje z danymi eksperymentalnymi. W ten sposób połączenie CSP i krystalografii NMR może stać się potężnym narzędziem analizy strukturalnej. Narzędzie to jest na razie we wstępnej fazie rozwoju.

W pracy **H5** przeprowadziłam analizę stosowalności wspomnianego wyżej połączenia CSP z krystalografią NMR do określania *de novo* struktury krystalicznej labilnego konformacyjnie i złożonego układu, jakim jest dihydrat procyjanidyny A2 (PA2, [RYSUNEK 9A](#)). Badany układ przekracza swoją złożonością jakąkolwiek inną formę krystaliczną analizowaną jak do tej pory za pomocą CSP. Fakt, że mamy do czynienia z układem trójskładnikowym, w którym badana cząsteczka ma 10 wiązań podlegających swobodnej rotacji sprawia, że przeprowadzenie obliczeń obejmujących całą dostępną przestrzeń stopni swobody byłoby niemożliwe przy racjonalnym nakładzie środków i czasu. Z tego powodu koniecznością staje się zastosowanie metod eksperymentalnych pozwalających zawęzić przeszukiwany obszar.

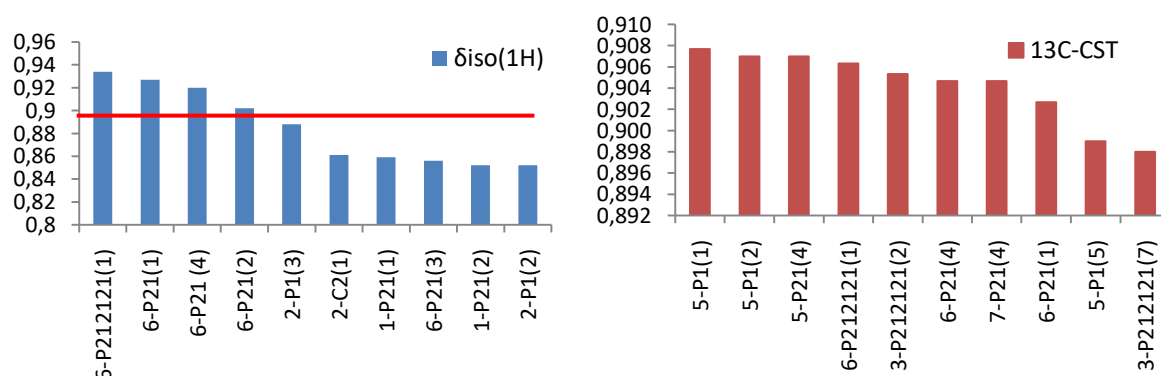


RYSUNEK 9. Struktura procyjanidyny A2 wraz z numeracją i zaznaczonymi kątami torsyjnymi φ i ψ (a) oraz uzyskane w wyniku przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej wykresy zależności energii konformerów PA2 w zależności od wartości kątów φ i ψ (b).

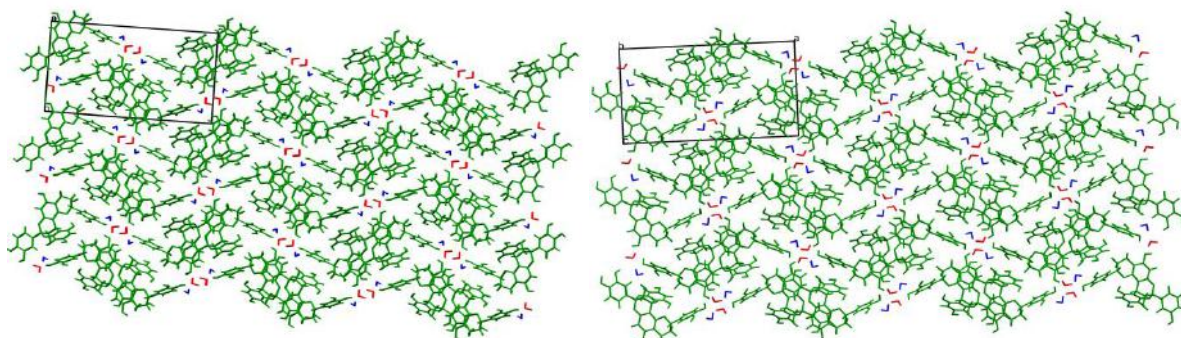
W omawianej pracy wyselekcjonowałam 7 znacząco różnych konformerów o najniższej energii ([RYSUNEK 9B-C](#)), dla których przeprowadziłam obliczenia CSP, a następnie spośród setek tysięcy otrzymanych struktur krystalicznych wybrałam 67 najkorzystniejszych energetycznie do dalszej ewaluacji z wykorzystaniem metody DFT układów periodycznych. Następnie wykonałam eksperymenty NMR w ciele stałym z bardzo szybkim wirowaniem pod kątem magicznym (z prędkością rotacji próbki 60 kHz). Pozwoliło mi to uzyskać wiarygodne przesunięcia chemiczne nie tylko dla jąder ^{13}C , ale również ^1H . Aby uzyskać dodatkowe parametry mogące posłużyć

wyselekcjonowaniu właściwej struktury, poddałam analizie także główne składowe tensora przesunięcia chemicznego jądra ^{13}C (z wykorzystaniem eksperymentu 2D-PASS). Uzyskane wyniki wskazywały wyraźnie, który konformer obecny jest w sieci krystalicznej. Pokazywały to zwłaszcza dane ^1H NMR ([RYSUNEK 10](#)). Niestety, nie wskazywały jednoznacznie grupy przestrzennej ani sposobu upakowania cząsteczek w badanym kryształ. Tą pierwszą informację udało się uzyskać z analizy porównawczej symulowanych i eksperymentalnych dyfraktogramów proszkowych, które bez cienia wątpliwości wskazywały na grupę przestrzenną $P2_12_12_1$.

Niestety struktura krystaliczna wybranego konformeru we wskazanej grupie przestrzennej uzyskana w wyniku CSP miała aż o 50 kJ/mol wyższą energię od minimum globalnego, zaś w rankingu energetycznym opartym o DFT układów periodycznych zajmowała dopiero odległe 22-gie miejsce. Było więc jasne, że mimo znacznej zgodności z danymi NMR nie można było uznać tej struktury za zgodną z obserwowaną eksperymentalnie. Wynika to z faktu, że parametry NMR są bardzo wrażliwe na lokalne zmiany otoczenia chemicznego analizowanej struktury (i z tego powodu jednoznacznie wskazują konformację obecną w kryształ), ale nie są wrażliwe na zmiany dalszego zasięgu. Ponadto trudno arbitralnie ustalić jaka zgodność z danymi eksperymentalnymi może być uznana za wystarczającą. Stąd wynika konieczność uwzględnienia dodatkowych kryteriów, jakimi są właśnie zgodność z danymi PXRD i energia sieci krystalicznej. To ostatnie kryterium może dostarczyć informacji o brakującym elemencie, czyli o sposobie upakowania cząsteczek w sieci krystalicznej w danej grupie przestrzennej. Rzeczywiście, wśród struktur uzyskanych w grupie przestrzennej $P2_12_12_1$ znajdowała się taka, która w rankingu energetycznym zajmowała wysokie 3-cie miejsce, z energią sieci krystalicznej wyższą od minimum globalnego jedynie o 5 kJ/mol (co dla hydratów nie jest dużą różnicą), ale zawierająca w sieci krystalicznej niewłaściwy konformer. Odpowiednia modyfikacja konformacji cząsteczki w tej strukturze na tą wskazywaną przez eksperyment NMR, a następnie ponowna jej optymalizacja zaowocowała uzyskaniem struktury, która nie tylko zajęła pierwsze miejsce w rankingu energetycznym, ale uzyskała jeszcze lepszą zgodność z danymi eksperymentalnymi NMR i PXRD niż jakkolwiek inna z analizowanych dotychczas struktur. Ostatecznym potwierdzeniem poprawności otrzymanej *de novo* struktury jest jej wysoka zgodność z eksperymentalną strukturą krystaliczną ([RYSUNEK 11](#)).



RYSUNEK 10. Współczynniki korelacji uzyskane z regresji liniowej dla eksperymentalnych i teoretycznych parametrów NMR: izotropowych wartości δ dla jądra ^1H oraz średniej arytmetycznej z głównych składowych tensora przesunięcia chemicznego ^{13}C . Czerwona linia na pierwszym wykresie odpowiada wartości ^1H RMSD 0.46 ppm.



RYSUNEK 11. Porównanie eksperymentalnej (z lewej) i uzyskanej *de novo* w wyniku przeprowadzonych obliczeń (z prawej) struktur krystalicznych procyanidyny A2.

Przeprowadzone badania wskazują na możliwość zastosowania metody opartej o CSP i krystalografię NMR w analizie złożonych, labilnych konformacyjnie układów, pod warunkiem, że każdy z komponentów tej metodologii będzie stosowany ostrożnie i z właściwym dystansem. Interesującą wydaje się również obserwacja dotycząca braku jednoznacznej granicy wskazującej jak duża zgodność teoretycznych i eksperymentalnych danych NMR może być uznana za wystarczającą. Jest to o tyle istotne, że stanowi podstawę całej krystalografii NMR, zaś obserwowane w pracy **H5** różnice w zgodności z eksperymentem poszczególnych struktur krystalicznych nie były bardzo znaczące. Zagadnienie to będzie stanowić jeden z obszarów moich dalszych badań.

3. Zastosowanie krystalografii NMR do opisu struktur krystalicznych (H2, H3, H7)

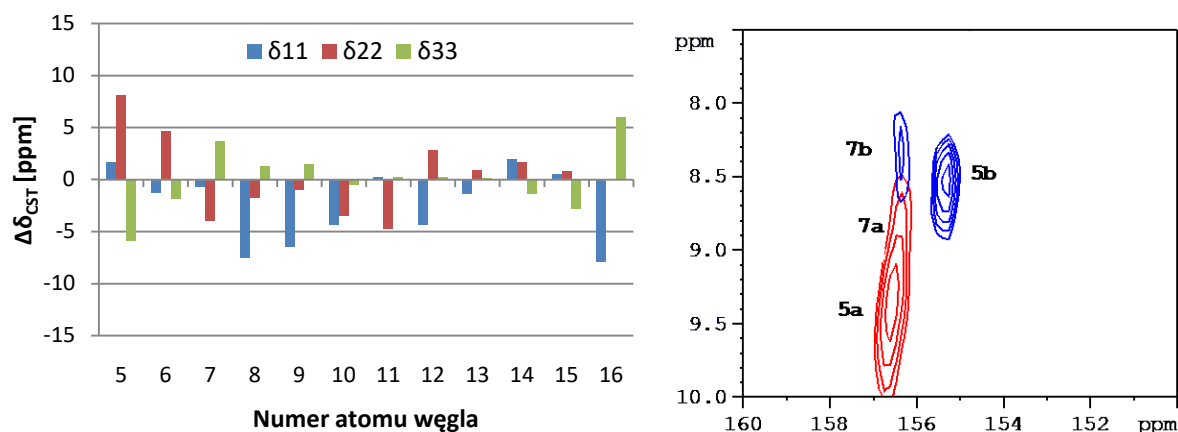
Przedstawione powyżej badania opublikowane w artykule **H5** miały na celu głównie sprawdzenie stosowalności krystalografii NMR do analizy wielokomponentowych układów o znacznej swobodzie konformacyjnej. W takim sensie nie stanowią rozwiązania rzeczywistego problemu strukturalnego, ale raczej pokazują perspektywę zastosowań tej metodologii. W tej części przedstawię prace **H2**, **H3** i **H7**, w których rzeczywiste problemy strukturalne rozwiązywałam wykorzystując krystalografię NMR w połączeniu z obliczeniami kwantowo-chemicznymi.

Pierwsze dwie prace (**H2** i **H3**) dotyczyły analizy strukturalnej hydratów o mniejszej zawartości wody, powstałych w wyniku dehydratacji hydratów o większej zawartości wody i znanych strukturach, 4.5-hydratu katechiny i 7-hydratu endomorfiny-2-OH (EM-2OH). W takich sytuacjach otrzymane związki są zwykle w postaci mikrokrystalicznego proszku, zaś próby otrzymania kryształu hydratów o mniejszej zawartości wody w wyniku krystalizacji odpowiedniego dla rentgenografii strukturalnej najczęściej kończą się fiaskiem. Z tego powodu krystalografia NMR wydaje się być jedyną metodą, która pozwala zajrzeć w głąb takiego mikrokrystalicznego proszku i opisać jego strukturę na poziomie molekularnym. W przytoczonych pracach stosowałam NMR w ciele stałym nie tylko do opisu struktury badanych związków, ale także do śledzenia procesów dehydratacji i (w przypadku pracy **H2**) rehydratacji. Ten aspekt przytaczanych prac omówię jednak w kolejnej części autoreferatu.

W toku badań nad dehydratacją 4.5-hydratu katechiny (forma I) uzyskałam nieznaną dotąd formę krystaliczną tego polifenolu, którą określiłam jako formę II, będącą niestechiometrycznym

hydratem zawierającym od 0.5 do 2.5 cząsteczek wody. W celu opisanie jej struktury zarejestrowałam i poddałam szczegółowej analizie widma NMR w cieple stałym obejmujące korelacyjne widma ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR przy prędkości wirowania 20 kHz oraz widma 2D-PASS ([RYSUNEK 12](#)). Dzięki temu ustaliłam, które fragmenty cząsteczki ulegają w wyniku dehydratacji największym zmianom w ich lokalnym środowisku w kryształach. Szczególnie istotne informacje uzyskałam z analizy zmian głównych składowych tensora przesunięcia chemicznego jąder ^{13}C , dla których przeprowadziłam również teoretyczną analizę wpływu poszczególnych parametrów strukturalnych. Doprowadziło mnie to do wniosku, że w obrębie samej cząsteczki katechiny dochodzi do niewielkich zmian strukturalnych, obejmujących jedynie zmieniającą się orientację protonów grup hydroksylowych, ale najważniejszy parametr strukturalny, tj. wartość kąta torsyjnego pomiędzy pierścieniem dihydroksyfenylowym a resztą chromanu, ulega jedynie niewielkiej zmianie lub nie ulega jej wcale.

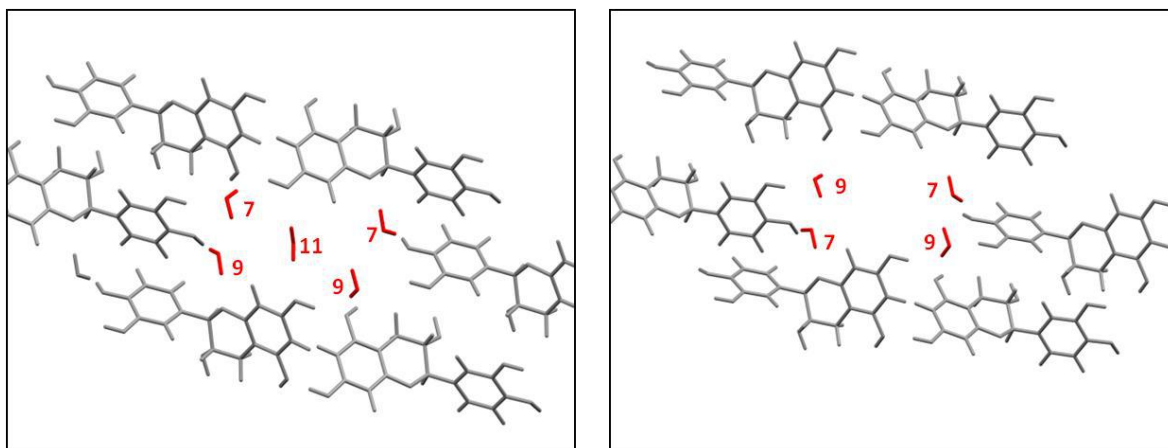
Upewniona, że sama konformacja katechiny nie zmienia się w sposób znaczący pod wpływem częściowej dehydratacji, skonstruowałam łącznie 26 modeli strukturalnych zawierających od 0.5 do 3 cząsteczek wody na cząsteczkę katechiny w sieci krystalicznej, dla których następnie przeprowadziłam optymalizację geometrii oraz obliczenia parametrów NMR z wykorzystaniem metody DFT układów periodycznych. Część uzyskanych wyników przedstawia [TABELA 2](#), która wskazuje dwie struktury o najwyższej zgodności z danymi eksperymentalnymi, a zarazem o najniższej energii. Pozwala to wnioskować, że jedna z nich jest tą obserwowaną eksperymentalnie. Rozróżnienie ich na podstawie uzyskanych wyników wydaje się niemożliwe, jednakże nie jest ono konieczne, bowiem różnią się jedynie „połową” cząsteczki H_2O przypadającej na cząsteczkę katechiny ([RYSUNEK 13](#)). Można zatem uznać, że obie w równym stopniu opisują strukturę hydratu katechiny o mniejszej zawartości wody, który przecież może zawierać od 0.5 do 2.5 cząsteczek H_2O na cząsteczkę katechiny.



RYSUNEK 12. Zmiany w wartościach głównych składowych tensora przesunięcia chemicznego (z lewej) oraz fragment nałożonych na siebie widm ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR ilustrujący zmiany w przesunięciach chemicznych protonów hydroksylowych (z prawej) po przejściu katechiny z formy I do II.

TABELA 2. Energie sieci krystalicznej oraz współczynniki korelacji uzyskane z regresji liniowej dla porównania eksperymentalnych i teoretycznych parametrów NMR formy II katechiny.

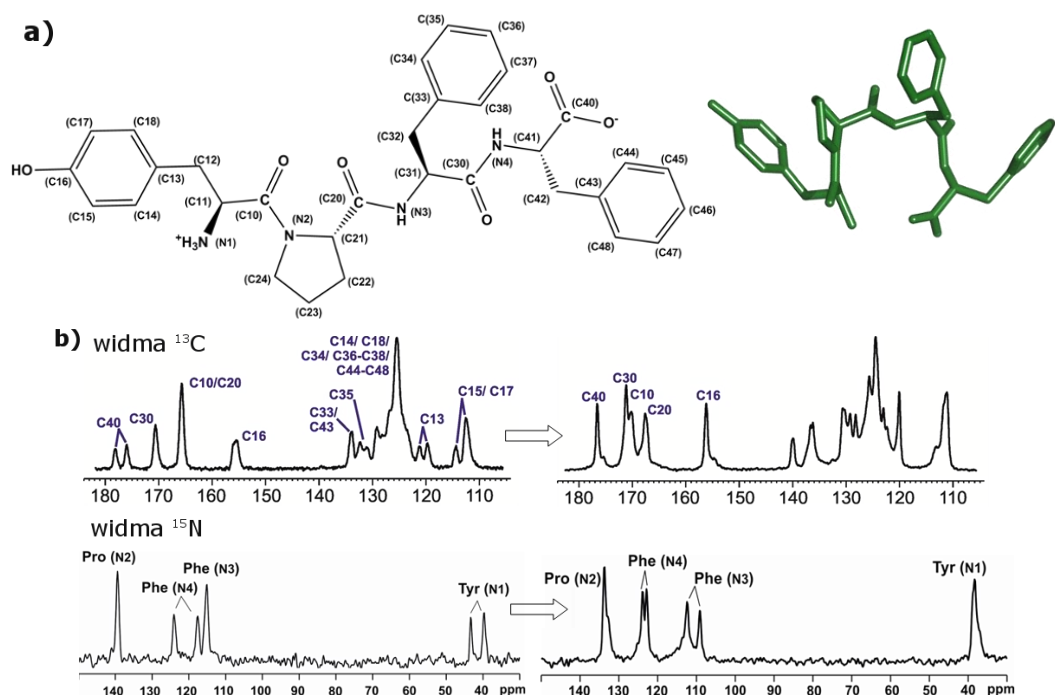
Struktura	Energia	Współczynnik korelacji liniowej (R^2)			
		$^1\text{H}(\delta_{\text{iso}})$	$^{13}\text{C}(\delta_{11})$	$^{13}\text{C}(\delta_{22})$	$^{13}\text{C}(\delta_{33})$
0.5-hydrat	-252016	0.630	0.985	0.949	0.970
1-hydrat	-262928	0.586	0.986	0.927	0.967
	-262929	0.852	0.993	0.911	0.967
	-262920	0.647	0.984	0.883	0.978
	-262929	0.819	0.984	0.957	0.963
1.5-hydrat	-273820	0.635	0.986	0.930	0.966
	-273826	0.771	0.990	0.913	0.976
	-273829	0.581	0.992	0.923	0.966
	-273823	0.605	0.984	0.856	0.947
2-hydrat	-284723	0.830	0.984	0.936	0.976
	-284738	0.919	0.986	0.897	0.976
	-284728	0.674	0.985	0.882	0.976
	-284729	0.771	0.988	0.969	0.959
	-284720	0.630	0.977	0.891	0.981
2.5-hydrat	-295621	0.713	0.974	0.905	0.978
	-295631	0.909	0.986	0.909	0.975
	-295630	0.789	0.979	0.944	0.984
	-295631	0.871	0.990	0.912	0.976
3-hydrat	-306514	0.833	0.995	0.945	0.975



RYSUNEK 13. Uzyskane w wyniku krystalografii NMR struktury krystaliczne formy II katechiny: 2.5- i 2-hydrat.

Podobny problem strukturalny pojawił się podczas określania struktury nowej formy krystalicznej pochodnej endomorfiny-2 (EM2-OH), uzyskanej w wyniku procesu nieodwracalnej hydratacji (**H3**). Tetrapeptyd EM2-OH krystalizuje w postaci heptahydratu z dwiema cząsteczkami EM2-OH w niezależnej części komórki elementarnej. Cząsteczki te różnią się w niewielkim stopniu: obie tworzą pseudocykliczne konformacje poprzez zbliżenie się do siebie N- i C-końca, ale w jednej z nich reszty aminowa i karboksylowa tworzą wiązanie wodorowe, w drugiej zaś są położone nieco dalej od siebie. Niezależnie od tych oddziaływań w każdej z „kieszeni” utworzonych przez przyjmowaną konformację znajduje się po jednej cząsteczce wody. Pozostałe cząsteczki wody znajdują się pomiędzy cząsteczkami EM2-OH. Umieszczenie heptahydratu w środowisku o niskiej

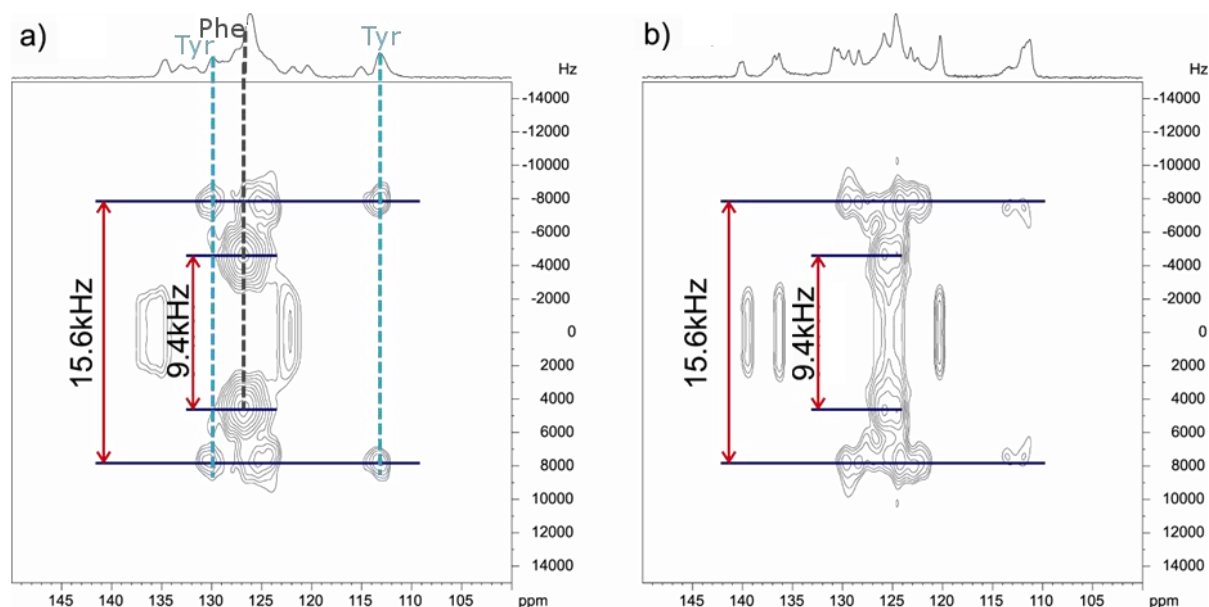
wilgotności prowadzi do otrzymania hydratu o mniejszej zawartości wody, zawierającego 3 cząsteczki wody przypadające na 2 cząsteczki endomorfiny. **RYSUNEK 14** przedstawia strukturę badanego tetrapeptydu oraz fragment widm ^{13}C i ^{15}N CPMAS obu jego hydratów. W strukturze heptahydratu wyraźnie widoczne jest podwojenie sygnałów pochodzących od karbonylowego atomu węgla C40, czwartorzędowego atomu węgla C16 w pierścieniu aromatycznym tyrozyny, oraz atomów azotu N1 i N4, świadczące o nieco różnym otoczeniu chemicznym dwóch różnych cząsteczek EM2-OH w sieci krystalicznej. Pod wpływem dehydratacji podwojenie to albo całkowicie zanika, albo znacząco się zmniejsza, zwłaszcza w rejonie atomów N1, N4 i C40 znajdujących się w pobliżu N- i C-końca. Przy tym omawiane sygnały przesuwają się w kierunku cząsteczki, której końce oddziałują ze sobą poprzez wiązanie wodorowe. Pozwala to wnioskować, że w obrębie pseudocyklicznych „kieszeni” struktury trihydratu dwie cząsteczki EM2-OH mają znacznie bardziej podobne otoczenie chemiczne. Ponadto brak istotnych zmian w przesunięciach chemicznych atomów znajdujących się w tym fragmencie obu cząsteczek wskazuje na to, że po dehydratacji dwie z trzech pozostałych w strukturze cząsteczek wody są w dalszym ciągu zlokalizowane w obrębie powstałych „kieszeni”.



RYSUNEK 14. Struktura i pseudocykliczna konformacja endomorfiny-2-OH (a) oraz widma ^{13}C i ^{15}N CPMAS NMR przed i po dehydratacji

Ustalenie lokalizacji trzeciej cząsteczki wody umożliwiła analiza widm $\text{inv-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -HETCOR oraz widm ^{13}C CP-VC zarejestrowanych z prędkością wirowania 60 kHz. Pierwszy z eksperymentów wskazuje, że po dehydratacji przesunięcia chemiczne sygnałów protonowych i węglowych pochodzących od tyrozyny nie ulegają przesunięciu. Jest zatem bardzo prawdopodobne, że cząsteczka wody, która przed dehydratacją związana była wiązaniem wodorowym z grupą hydroksylową pierścienia aromatycznego tyrozyny, po dehydratacji pozostaje na swoim miejscu. Potwierdzają to widma ^{13}C CP-VC, pozwalające wyznaczyć stałe sprzężeń dipolowych jąder ^{13}C - ^{13}C .

Zależą one od mobilności poszczególnych fragmentów cząsteczek w taki sposób, że ruch danej grupy funkcyjnej znacząco zmniejsza oddziaływania dipolowe znajdujących się w niej atomów, zmniejszając stałe sprzężenia. Zarówno przed, jak i po dehydratacji pierścienie fenyloalaniny podlegają rotacji wokół wiązań osi C1-C4, o czym świadczy zredukowana wartość stałej sprzężenia dipolowego wynosząca 9.4 kHz, zaś dla atomów pierścienia tyrozyny wartość ta wynosi 15.6 kHz, co wskazuje, że są one nieruchome ([RYSUNEK 15](#)). Można zatem wnioskować, że dehydratacja nie wpływa w sposób obserwowalny na otoczenie chemiczne tyrozyny, co lokuje trzecią pozostałą cząsteczkę wody w pozycji związanej z tym pierścieniem wiązaniem wodorowym.



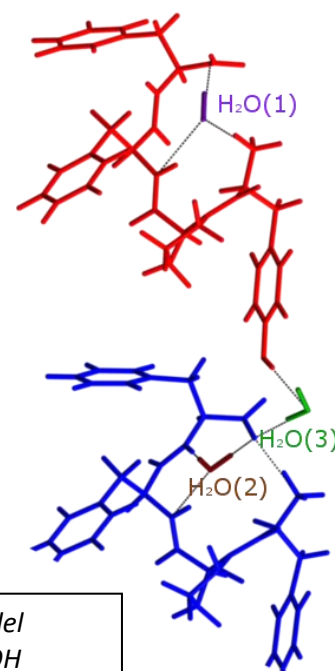
RYSUNEK 15. Widma ^{13}C CP-VC NMR endomorfiny-2-OH przed (a) i po (b) dehydratacji.

Przedstawione rozumowanie, pomimo że poparte dowodami spektroskopowymi, stanowi hipotezę domagającą się potwierdzenia obliczeniowego. W przypadku układu zawierającego aż pięć cząsteczek w niezależnej części komórki elementarnej i 13 wiązań obrotowych, procedura CSP jest niemożliwa do zastosowania na jej obecnym poziomie rozwoju. Z drugiej strony obliczenia z zastosowaniem metody DFT układów periodycznych dla wszystkich hipotetycznych struktur byłyby niezwykle kosztowne. Z tego powodu zbudowałam 35 modeli strukturalnych, złożonych z cząsteczek endomorfiny i każdej możliwej kombinacji pozostałych po dehydratacji trzech cząsteczek wody, zachowując przy tym wiązania wodorowe występujące w kryształach przed dehydratacją, a następnie obliczyłam dla tych modeli teoretyczne stałe ekranowania w fazie gazowej. Takie wstępne obliczenia pozwoliły mi na wybranie pięciu najbardziej prawdopodobnych struktur mających stałe ekranowania ^{15}N i ^{13}C najbliższe wartościom eksperymentalnym. Obliczenia na poziomie teorii DFT układów periodycznych dla wyselekcjonowanych modeli strukturalnych wskazały, że największą zgodność z danymi eksperymentalnymi ma struktura, w której cząsteczki wody ułożone są w pozycjach sugerowanych przez dane NMR ([RYSUNEK 16](#)). Ponadto odległości pomiędzy atomami CO(40)-N(1) w dwóch cząsteczkach endomorfiny-2-OH tej struktury były bardzo podobne ([TABELA 3](#)), potwierdzając

wnioski wyciągnięte z pomiarów NMR, mówiące o większym podobieństwie dwóch cząsteczek EM2-OH po dehydratacji.

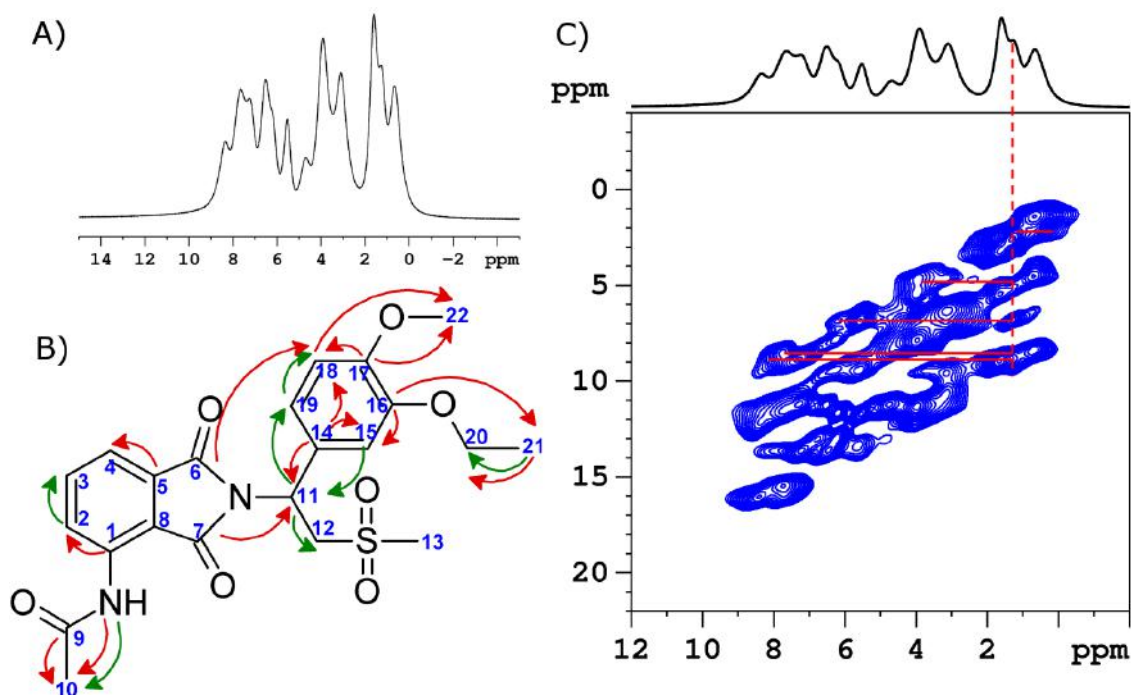
TABELA 3. Odległości międzyatomowe CO(40)-N(1) (Å) w cząsteczkach A i B pięciu najbardziej prawdopodobnych modeli strukturalnych trihydratu i w heptahydracie EM2-OH

model strukturalny	CO(40)-N(1)	
	cząsteczka A	cząsteczka B
1	3.56	3.23
3	3.73	3.71
4	3.60	4.16
6	3.46	4.36
10	3.54	4.70
heptahydrat	3.60	4.30



RYSUNEK 16. Model trihydratu EM2-OH

Metoda omawiana w pracach **H2** i **H3**, dotyczących zastosowań krystalografii NMR w badaniach strukturalnych, jest w zasadzie jedną z niewielu, pozwalających opisać na poziomie molekularnym strukturę tych kryształów, które otrzymuje się nie w wyniku krystalizacji, ale w wyniku przemian zachodzących pod wpływem czynników zewnętrznych (takich jak częściowa dehydratacja w środowisku o niskiej wilgotności). W takich bowiem sytuacjach prawie zawsze mamy do czynienia z mikrokryształicznym proszkiem. Podobnie jest w sytuacji otrzymywania nowych form polimorficznych lub krystalicznych w wyniku mechanicznego ucierania substratów w młynie kulowym. Ta zyskująca coraz bardziej na popularności metoda syntezy chemicznej w ciele stałym wpisuje się w nurt „zielonej chemii”, pozwalając na znaczne ograniczenie ilości stosowanych rozpuszczalników, a często również skrócenie czasu reakcji. Coraz częściej w ten sposób otrzymuje się również kokryształy – dwu- lub więcej składnikowe formy krystaliczne tworzone przez substancje będące w temperaturze pokojowej ciałami stałymi, w których cząsteczki składników związane są we wspólną sieć krystaliczną. Ich szczególne znaczenie dla chemii materiałów i nauk farmaceutycznych wynika z faktu, że często mają one inne (lepsze?) właściwości fizykochemiczne niż budujące je związki w czystych postaciach. W ramach prac prowadzonych w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych opracowany został nowy sposób mechanochemicznego otrzymywania takich kokryształów farmaceutycznych apremilastu (APR, **RYSUNEK 17B**) – leku będącego inhibitorem fosfodiesterazy 4 stosowanego w leczeniu łuszczycy. Stanowi on przedmiot zgłoszenia patentowego **P.424599**, którego jestem współautorem. W wyniku opracowanej procedury mechanochemicznie otrzymany został m.in. nowy kokryształ APR z katecholem (**H7**). Z uwagi na sposób jego powstawania i na to, że próby krystalizacji takiego układu z roztworu zawiodły, konieczne było zastosowanie alternatywnej metody opisu jego struktury.

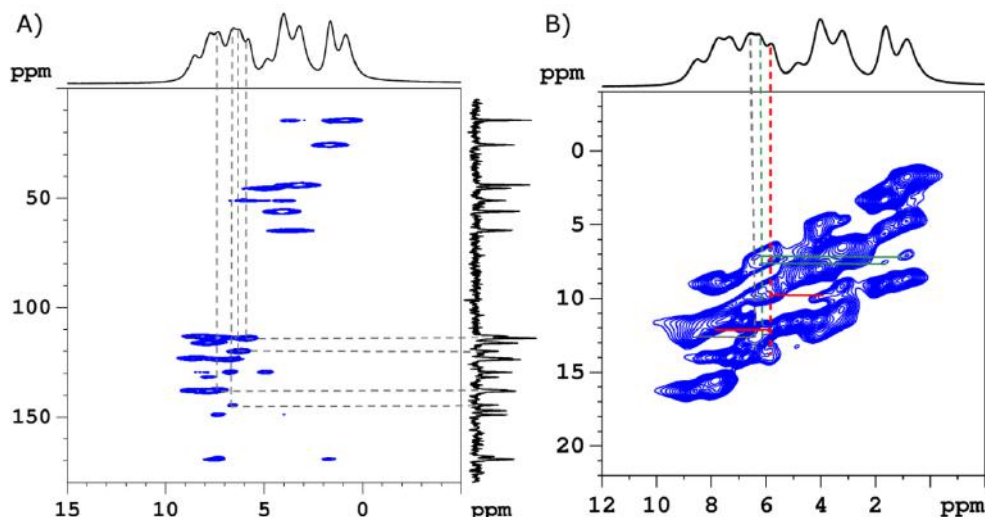


RYSUNEK 17. Widmo ^1H NMR dla solwatu APR – toluen (a), struktura apremilastu z zaznaczonymi na zielono korelacjami z widm $\text{inv-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -HETCOR, zaś na czerwono z widm $^1\text{H-}^1\text{H}$ BaBa (b) oraz widmo $^1\text{H-}^1\text{H}$ BaBa z zaznaczonymi korelacjami międzycząsteczkowymi pomiędzy APR a toluenem.

W pracy **H7** przedstawiłam metodologię, opierającą się na krystalografii NMR, której wykorzystanie pozwoliło mi opisać strukturę tego kokryształu. Zarejestrowane widma ^{13}C CPMAS NMR wykazały, że ułożenie cząsteczek APR jest w nim takie samo, jak w znanych strukturach krystalicznych solwatów z toluenem, chlorkiem metylenu i octanem etylu. Do ustalenia zatem pozostała lokalizacja cząsteczek „gościa” – katecholu. Aby ją ustalić wykorzystałam najpierw widma ^1H i ^{13}C zarejestrowane z szybkością rotacji 60 kHz dla solwatu APR z toluenem do przypisania sygnałów apremilastu oraz do porównania z danymi krystalograficznymi obserwowanych w widmach 2D korelacji pomiędzy toluenem a APR. Było to o tyle istotne, że mimo znacznego postępu w tej dziedzinie w ostatnich latach, nadal w protonowych widmach NMR w cieple stałym sygnały pochodzące od jąder ^1H mogą być stosunkowo szerokie i przez to mogą nakładać się na inne sygnały, prowadząc do niejednoznaczności przypisań i obserwowanych kontaktów międzycząsteczkowych. **RYSUNKI 17A** i **17C** przedstawiają widma NMR odpowiednio ^1H oraz $^1\text{H-}^1\text{H}$ Back-to-Back (BaBa) solwatu, z zaznaczonymi w widmie 2D korelacjami pomiędzy cząsteczkami APR i toluenu. Wszystkie znalezione w widmie kontakty międzycząsteczkowe są zgodne z odległościami międzyatomowymi obserwowanymi w strukturze krystalicznej.

Upewniona w powyższy sposób co do wiarygodności obserwowanych korelacji, poddałam analizie widma $\text{inv-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HETCOR i $^1\text{H-}^1\text{H}$ BaBa zarejestrowane dla kokryształu APR z katecholem (**RYSUNEK 18**). Na podstawie obserwowanych korelacji międzycząsteczkowych zbudowałam trzy modele strukturalne z trzema różnymi pozycjami cząsteczki katecholu, z których każdy odpowiadał wiązom strukturalnym znalezionym w widmach NMR. Tak przygotowane struktury zoptymalizowałam z wykorzystaniem metody DFT układów periodycznych, a następnie porównałam

uzyskane teoretyczne wartości stałych ekranowania ^1H i ^{13}C z przesunięciami chemicznymi obserwowanymi eksperymentalnie. Uzyskane wyniki (TABELA 4) jednoznacznie wyróżniały jeden z modeli, jako na wykazujący najwyższą zgodność z eksperymentami NMR i PXRD. Struktura ta miała jednocześnie najniższą energię sieci krystalicznej.



RYSUNEK 18. Widma $\text{inv-}^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HETCOR i $^1\text{H-}^1\text{H}$ BaBa zarejestrowane dla kokryształu APR z katecholem. Kolorowe linie wskazują na sygnały pochodzące od katecholu (widma HETCOR) i korelacje katecholu z apremilastem (widma BaBa)

TABELA 4. Współczynniki korelacji uzyskane z regresji linowej dla porównania eksperymentalnych i teoretycznych danych NMR i uzyskana względna energia sieci krystalicznej trzech modeli strukturalnych APR z katecholem

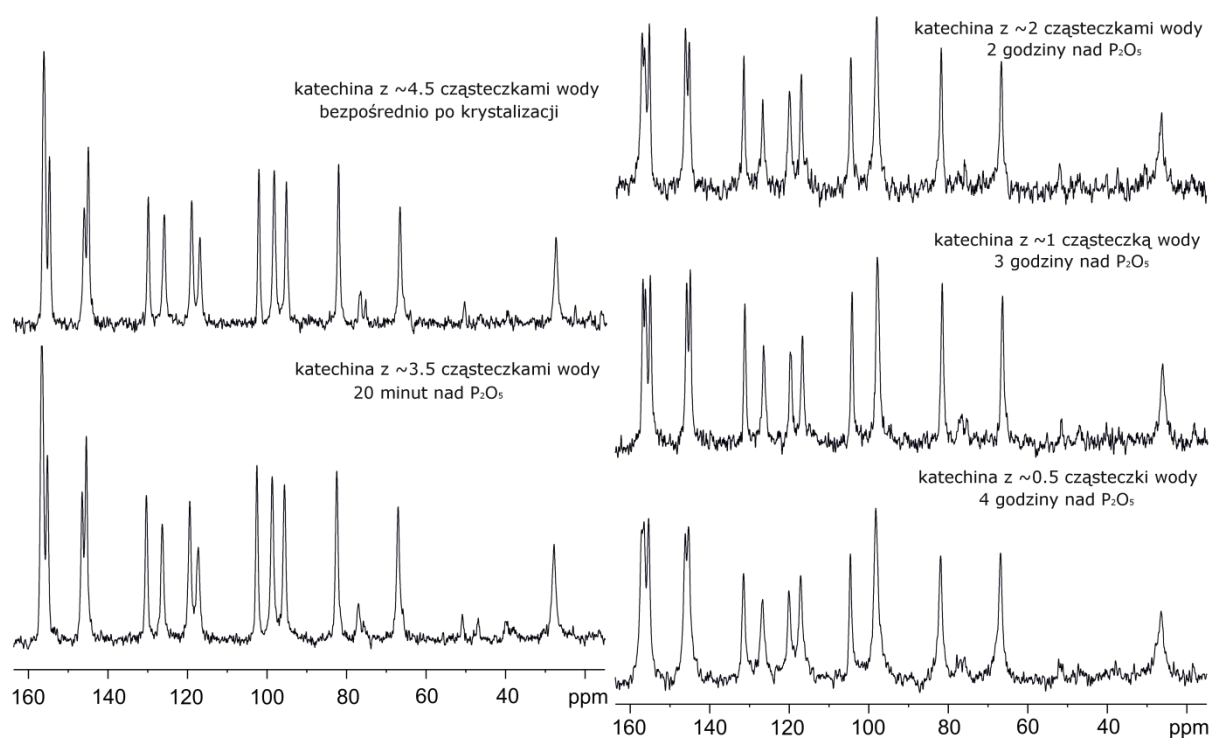
	struktura 1	struktura 2	struktura 3
ułożenie katecholu			
$R^2(\delta_{\text{C}})$	0.998	0.998	0.998
$R^2(\delta_{\text{H}})$	0.736	0.839	0.916
ΔE	+28 kJ/mol	+8 kJ/mol	-

4. Zastosowanie spektroskopii NMR w ciele stałym do opisu procesów zachodzących w sieci krystalicznej (H2, H6)

Możliwości jakie oferuje spektroskopia NMR w ciele stałym pozwalają nie tylko na opis statycznej struktury krystalicznej cząsteczki, ale dostarczają także unikatowych informacji o procesach dynamicznych zachodzących w ciele stałym. Przykładem są wspomniane procesy

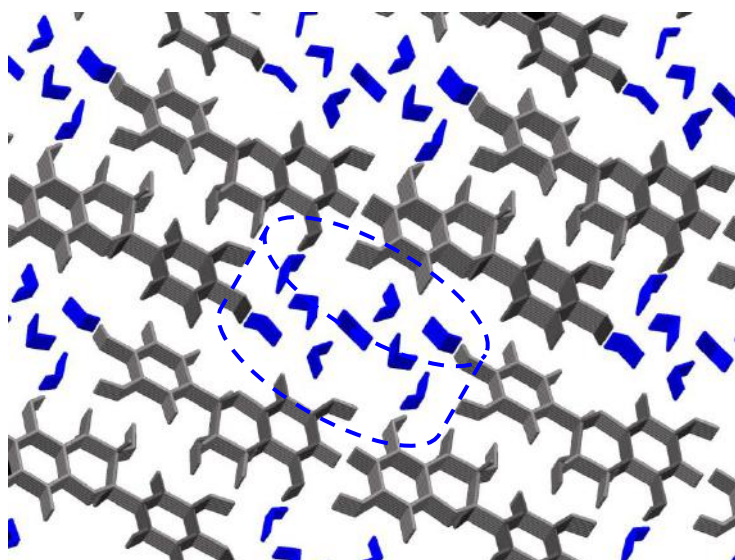
dynamiczne w hydratách endomorfiny-2-OH (**H3**), procesy odwracalnej dehydratacji wraz z rehydratacją (**H2**), a także opis trudnej do wykrycia tautomerii keto-enolowej, w której czas życia jednej z form jest zbyt krótki, by zaobserwować ją bezpośrednio i opisać na poziomie molekularnym dostępnymi technikami eksperymentalnymi (**H6**). W niniejszej części opiszę przykłady zastosowania spektroskopii NMR w cieple stałym do śledzenia tego typu procesów.

Katechina krystalizuje z wody w postaci 4.5 hydratu, który stosunkowo łatwo traci wodę, prowadząc do powstania hydratu o mniejszej zawartości wody, a następnie do formy amorficznej. Proces ten łatwo odwrócić umieszczając amorficzną katechinę w środowisku o dużej wilgotności, by po 15 minutach uzyskać z powrotem formę I. W toku prowadzonych badań odkryłam, że żadna z otrzymanych form nie ma w rzeczywistości ściśle określonej liczby cząsteczek wody, przypadających na cząsteczkę katechiny. Ilustrują to widma ^{13}C CPMAS NMR zarejestrowane dla próbek katechiny poddanej dehydratacji nad P_2O_5 od 20 minut do 4 godzin, wraz z liczbą cząsteczek wody określonej w tych samych próbkach za pomocą analizy elementarnej oraz pomiarów NMR w bezwodnym acetonie (**RYSUNEK 19**). W ten sposób ustaliłam, że forma I dotychczas uważana za 4.5 hydrat, może w istocie zawierać od 3 do 4.5 cząsteczek wody. Dopiero w wyniku utraty więcej niż 1.5 cząsteczki wody na cząsteczkę katechiny jej sieć krystaliczna ulega reorganizacji prowadząc do utworzenia formy II zawierającej od 0.5 do 2.5 cząsteczek wody. Uzyskany wynik poza znaczeniem poznawczym jest o tyle istotny, że katechina jest często stosowana jako wzorzec w oznaczeniach analitycznych (np. w oznaczeniu zawartości polifenoli, testach antyoksydacyjnych). Stopień jej uwodnienia, który bardzo silnie zależy od wilgotności otoczenia, może zatem w sposób znaczny wpływać na zawyżenie lub zaniżenie otrzymanych w tych oznaczeniach wyników.



RYSUNEK 19. Widma ^{13}C CPMAS próbek katechiny o różnej zawartości wody.

Dehydratacja katechiny trwająca ponad 4 h prowadzi do formy amorficznej, która nie jest jednak zupełnie pozbawiona wody. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem wody deuterowanej do dyfuzyjnego nawadniania katechiny by otrzymać formę I, pozwoliły mi zilustrować naturę oddziaływań cząsteczek wody w poszczególnych formach katechiny. Stosując eksperymenty ^2H NMR w ciele stałym wykazałam, że jądra ^2H cząsteczek wody w hydracie o najmniejszej zawartości wody (formie amorficznej) mają wartości stałych sprzężenia kwadrupolowego C_Q tego samego rzędu, co te obserwowane dla grup hydroksylowych. Wskazuje to na silne związanie pozostałości wody z cząsteczkami katechiny. Przeciwnie, wartości C_Q jąder ^2H cząsteczek wody w formie I i II były znacznie niższe i odpowiadały cząsteczkom lekko związanym i bardzo mobilnym. Obserwacje te są zgodne ze strukturą krystaliczną katechiny, w której obecne są kanały wodne ([RYSUNEK 20](#)). Mają one zarówno łatwo usuwalne, mobilne cząsteczki wody związane tylko z innymi cząsteczkami wody, jak i takie, które są znacznie silniej związane z cząsteczką katechiny. Z tego powodu usunięcie do 1.5 cząsteczki wody z formy I katechiny nie prowadzi do obserwowalnych zmian w widmach ^{13}C CPMAS NMR, a co za tym idzie prawdopodobnie również w jej sieci krystalicznej, bowiem jądra ^{13}C tego związku „nie czują”, aby cokolwiek w ich otoczeniu się zmieniło.

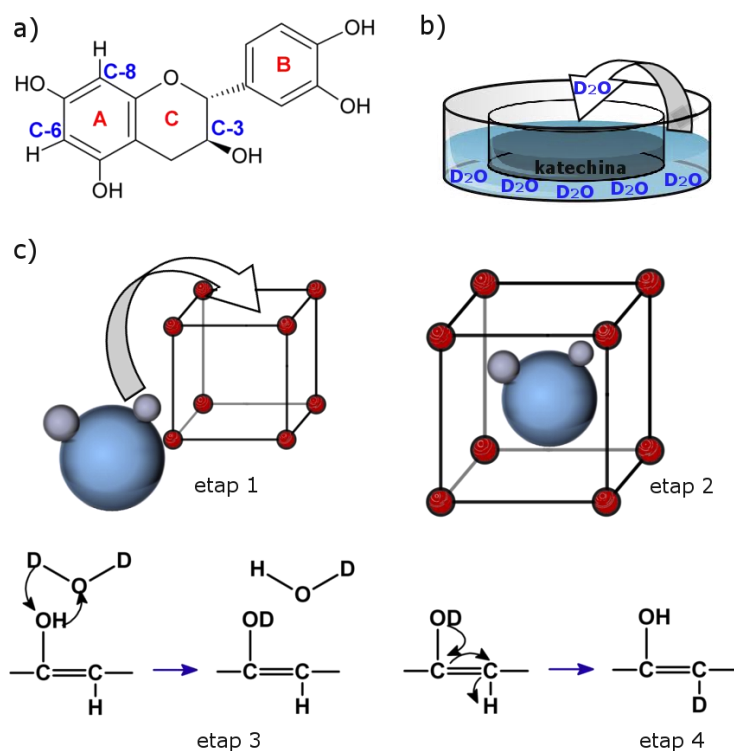


RYSUNEK 20. Kanały wodne obecne w strukturze krystalicznej hydratu katechiny.

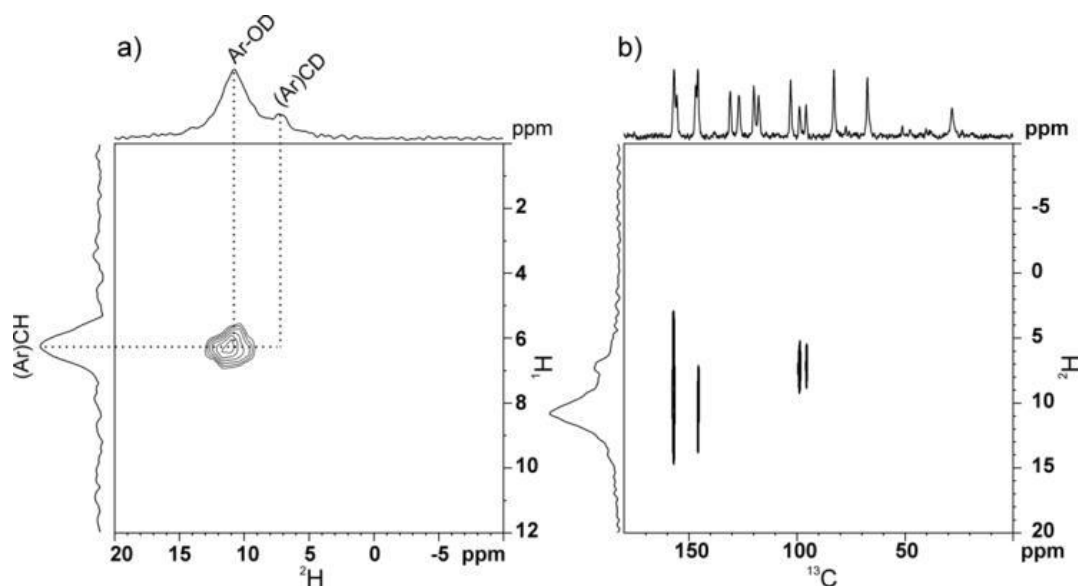
W toku badań nad procesami dehydratacji i rehydratacji katechiny z wykorzystaniem D_2O zauważyłam, że po umieszczeniu polifenolu w środowisku zawierającym jedynie pary D_2O ([RYSUNEK 21B](#)) następuje zauważalny spadek intensywności sygnałów ^{13}C NMR pochodzących od atomów C6 i C8. Spadek ten nie może pochodzić od prostej wymiany protonów Ar-H z pozycji C6 i C8 na deuter, gdyż protony te nie są mobilne, a ich oderwanie od pierścienia aromatycznego katechiny wymagałoby zbyt wiele energii. Przeprowadzone w ramach pracy **H6** eksperymenty MS i NMR zasugerowały natomiast, że następuje to w wyniku tautomerii keto-enolowej, zachodzącej w fazie stałej hydratu katechiny, nie zaś, jak można by początkowo przypuszczać, w wyniku mniejszego transferu polaryzacji od łatwo wymienialnych na deuter protonów hydroksylowych sąsiadujących z atomami C6 i C8. W zaproponowanym przeze mnie mechanizmie, cząsteczki D_2O wnikają najpierw do

sieci krystalicznej katechiny ([RYSUNEK 21c](#), etapy 1 i 2), przekształcając ją w hydrat i stając się w ten sposób sondą deuterową, której losy w kryształach możemy śledzić za pomocą spektroskopii NMR i spektrometrii mas. Następnie dochodzi do wymiany mobilnych protonów z grup hydroksylowych katechiny na deuter (etap 3), który w kolejnym kroku poprzez tautomerię keto-enolową zostaje wymieniony z niemobilnymi protonami H6 i H8 (etap 4).

Widma spektrometrii mas próbek deuterowanego hydratu katechiny wykazały, że rzeczywiście dochodzi do częściowej wymiany 6 lub 7 atomów ^1H na atomy ^2H . Można zatem przypuszczać, że wymiana ta dotyczy 5 hydroksylowych atomów ^1H i przynajmniej jednego z pozycji C6 lub C8. Przeprowadzona w kolejnym kroku analiza fragmentacyjnych widm MS pozwoliła mi udowodnić, że w pierścieniu A wymianie ulegają aż 4 atomy ^1H (a zatem muszą to być atomy z pozycji C6 i C8). Bezpośrednim dowodem obserwowanej wymiany niemobilnych protonów katechiny na deuter są widma ^2H - ^{13}C CPMAS i ^2H - ^{13}C HETCOR zarejestrowane z odsprężaniem jąder ^1H . Aby je zarejestrować musiałam wprowadzić nową sekwencję pulsową, pozwalającą na obserwowanie odpowiednich korelacji. Widma przedstawione na [RYSUNKU 22](#) wyraźnie pokazują korelacje pomiędzy sygnałami pochodzącymi od atomów węgla C5/C7 i C13/C14 z sygnałami pochodzącymi od atomów ^2H z deuterowanych grup hydroksylowych oraz pomiędzy sygnałami pochodzącymi od atomów C6 i C8 z sygnałami ^2H pochodzącymi od jąder z pierścienia aromatycznego Ar- ^2H . W prezentowanych widmach nie widać korelacji świadczącej o istnieniu podstawienia w pozycji C3-OH (alifatyczna grupa hydroksylowa), co w połączeniu z wnioskami płynącymi z widm MS jednoznacznie wskazuje na wymianę obu niemobilnych protonów Ar-H (z pozycji C6 i C8) na deuter.

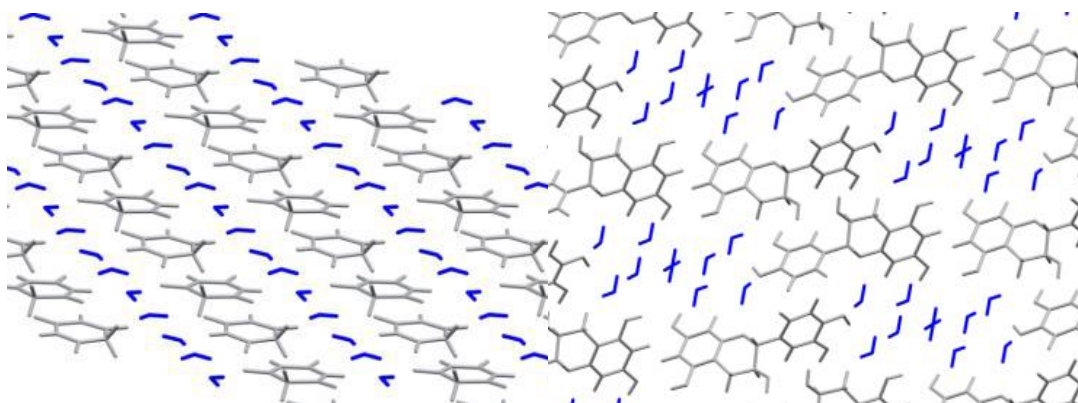


RYSUNEK 21. Struktura katechiny z zaznaczonymi pozycjami C6 i C8 (a), schemat ilustrujący dyfuzyjne wnikanie par D_2O do sieci krystalicznej katechiny (b) oraz zaproponowany mechanizm tautomerii keto-enolowej (c)



RYSUNEK 22. Widma ^2H - ^1H HETCOR i ^2H - ^{13}C HETCOR deuterowanego dyfuzyjnie hydratu katechiny.

Analogiczne zjawisko wymiany niemobilnych protonów na deuter zaobserwowałam również w kryształach kwasu barbiturowego, który, podobnie jak katechina, przy podwyższonej wilgotności łatwo przechodzi w hydrat. Czysty kwas barbiturowy występuje w dwóch formach polimorficznych: ketonowej i enolowej, jednak do tej pory znana była jedynie forma ketonowa jego dihydratu. Dzięki zastosowaniu omówionej wyżej metodologii udowodniłam, że w kryształach hydratu kwasu barbiturowego również dochodzi do wymiany niemobilnych protonów z grupy CH_2 na deuter, która jest możliwa tylko przy założeniu, że występuje tam zjawisko tautomerii keto-enolowej. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły mi również określić stopień wymiany atomów ^1H na ^2H w pozycjach niemobilnych, który w kwasie barbiturowym i w katechinie wynosił odpowiednio 100% i 15%. Różnicę tę przypisałam różnej budowie kryształów obu hydratów: w przypadku katechiny woda tworzy eliptyczne kanały wodne, w których tylko niewielka część cząsteczek wody ma bezpośredni kontakt z cząsteczkami katechiny, zaś w strukturze kwasu barbiturowego obserwujemy raczej ścieżki wodne (**RYSUNEK 23**), w których każda cząsteczka wody oddziałuje bezpośrednio z cząsteczkami kwasu barbiturowego.



RYSUNEK 23. Różne rezerwuary wodne w strukturach krystalicznych kwasu barbiturowego (z lewej) i katechiny (z prawej).

Obserwacje poczynione w pracy **H6** doprowadziły do opracowania nowej metody śledzenia procesów zachodzących w ciele stałym inaczej trudnych do uchwycenia. W obu analizowanych przypadkach występuje w ciele stałym tautomeria keto-enolowa, jednak czas życia formy enolowej lub ketonowej jest na tyle krótki, że nie jesteśmy w stanie jej zaobserwować bezpośrednio i opisać na poziomie molekularnym za pomocą dostępnych technik spektroskopowych. Można jednak to uczynić wprowadzając „sondę” deuterową, a następnie śledząc jej lokalizację za pomocą opracowanych widm korelacyjnych ^1H - ^2H i ^2H - ^{13}C .

Podsumowanie

Poniższe punkty przedstawiają najważniejsze osiągnięcia opisane w pracach **H1-H8**:

1. Opracowałam protokół analityczny wiarygodnego i jednoznacznego określania struktur nowych, oligomerycznych procyjanidyn.
2. Stosując powyższą metodologię opisałam strukturę czterech nowych związków, dwóch trimerów i dwóch tetramerów, wyizolowanych z łupin nasiennych orzachy podziemnej.
3. Opisałam równowagi konformacyjne procyjanidyn w roztworze, ustalając trójwymiarowe struktury rotamerów trimerycznych procyjanidyn wyizolowanych z kory cynamonu.
4. Określiłam wpływ właściwości elektronodonorowych rozpuszczalnika na wyżej wspomniane równowagi konformacyjne.
5. Opisałam na poziomie molekularnym proces odwracalnej dehydratacji kryształów hydratów katechiny z wykorzystaniem spektroskopii NMR w ciele stałym i obliczeń kwantowo-chemicznych
6. Ustaliłam strukturę nowego, nieznanego wcześniej hydratu katechiny o niższej zawartości wody i udowodniłam, że hydrat o większej zawartości wody, który jak do tej pory określany był jako 4.5-hydrat, może zawierać od 3. do 4.5 cząsteczek wody, zachowując cały czas tę samą strukturę krystaliczną, zaś hydrat o mniejszej zawartości wody zawiera od 0.5 do 2.5 cząsteczek wody.
7. Ustaliłam strukturę trihydratu endomorfiny-2-OH, precyzyjnie lokalizując cząsteczki wody pozostałe w strukturze krystalicznej po dehydratacji.
8. Wykazałam, że nawet w przypadku skomplikowanych systemów wielokomponentowych, połączenie spektroskopii NMR w ciele stałym z obliczeniami kwantowo-chemicznymi i dyfrakcją proszkową pozwala na wiarygodne komputerowe przewidzenie struktury krystalicznej związku chemicznego.
9. Przewidziałam za pomocą metod obliczeniowych strukturę krystaliczną dihydratu procyjanidyny A2, a metody eksperymentalne pozwoliły na weryfikację wygenerowanych teoretycznie struktur. Przewidziana przeze mnie struktura jest największym jak do tej pory układem, dla którego struktura krystaliczna wygenerowana została *de novo* (z wykorzystaniem metod obliczeniowych).
10. Dzięki zastosowaniu komputerowego przewidywania struktur krystalicznych wyjaśniłam zaobserwowane przeze mnie różnice w preferencjach krystalizacyjnych dwóch diastereoizomerów, katechiny i epikatechiny, i przypisałam je brakowi zdolności

niskoenergetycznych konformerów katechiny do tworzenia korzystnych energetycznie struktur krystalicznych

11. Wykazałam, że struktury krystaliczne solwatów mogą być budowane przez konformery charakteryzujące się wyższą energią niż struktury czystych form krystalicznych, z powodu obecności w sieci krystalicznej małych cząsteczek rozpuszczalnika. Wówczas bowiem oddziaływania pomiędzy tymi cząsteczkami, a cząsteczkami związku tworzącego solwaty, w większym stopniu kompensują straty energetyczne wynikające z niekorzystnej konformacji.
12. Stosując połączenie spektroskopii NMR w ciele stałym z obliczeniami na poziomie DFT struktur periodycznych określiłam strukturę nowego kokryształu apremilastu z katecholem.
13. Odkryłam i opisałam proces tautomerii keto – enolowej w ciele stałym w hydratách katechiny i kwasu barbiturowego.
14. Opracowałam metodę pozwalającą na śledzenie takiej tautomerii nawet wówczas, gdy czas życia jednej z form tautomerycznych jest na tyle krótki, że nie możemy zaobserwować tej formy bezpośrednio metodą NMR.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

W pierwszych latach po obronie pracy doktorskiej na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w listopadzie 2011 roku zajmowałam się analizą strukturalną związków pochodzenia naturalnego z zastosowaniem spektroskopii NMR w roztworze oraz obliczeń kwantowo-chemicznych. Od wielu lat współpracuję z amerykańską firmą *Planta Analytica*, której właściciel niejednokrotnie zwracał się do mnie z prośbą o ustalenie struktury związków wyizolowanych m.in. z *Trichilia catigua*, *Angelica archangelica*, *Valeriana officinalis*, *Ganoderma lucidum*, *Alchornea castaneifolia*, *Arachis hypogaea*, *Muira puama*, *Cinnamomum burmannii* i innych. Wiele spośród analizowanych przeze mnie związków były nowymi, nieposianymi wcześniej w literaturze pochodnymi. Szacuję, że łącznie w mojej dotychczasowej pracy badawczej opisałam struktury około 30 nowych związków. Metody spektroskopii NMR stosowałam także w projekcie związanym z określeniem profilu fitochemicznego ziołomiodów (praca Z3.II.A2.3; załącznik nr 3, część II, punkt A2, praca nr 3), zaś od 2013 roku zajmowałam się analizą strukturalną procyjanidyn, spośród których ustaliłam jak do tej pory strukturę około 60 związków. W tym zakresie współpracowałam nie tylko ze wspomnianą wcześniej firmą *Planta Analytica*, ale także z prof. dr hab. Anną Kiss i dr hab. Sebastianem Granicą z Zakładu Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Wydziału Farmaceutycznego WUM oraz z dr Michałem Gleńskim z Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Owocem tej współpracy są publikacje Z3.II.A2.4, Z3.II.A2.6-8, Z3.II.A2.10-11. Zdobyte doświadczenie pozwoliło mi również przeprowadzić analizę konformacyjną w roztworze ligandu SO3-Ph-BTP w ramach współpracy z prof. dr hab. Janem Cz. Dobrowolskim z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej (praca Z3.II.A2.5) oraz kompleksów radiofarmaceutyku, będącego analogiem DOTA-minigastryny, z lutetem i europem w ramach współpracy z dr Piotrem Lipińskim z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego PAN (praca Z3.II.A2.12).

Równolegle stosowałam również metody spektroskopii NMR w cieple stałym do analizy strukturalnej niektórych z wyizolowanych pochodnych, a także stałych postaci leków (prace Z3.II.A2.1-2). Od roku 2015 zajmowałam się w szerszym stopniu zastosowaniami spektroskopii NMR w cieple stałym, w tym widm korelacyjnych, do rozwiązywania bardziej zaawansowanych problemów strukturalnych. Większość z nich związana była z analizą strukturalną nowych form polimorficznych i solwatomorficznych związków o istotnym działaniu biologicznym. Ważnym elementem tych badań było połączenie metod eksperymentalnych z obliczeniami kwantowo-chemicznymi prowadzonymi z uwzględnieniem periodyczności sieci krystalicznej. Metody te pozwoliły mi na ustalenie struktury chlorowodorku EDC w cieple stałym oraz aktywnego produktu pośredniego, powstałego w wyniku ucierania tego związku z kwasem benzoesowym w młynie kulowym (praca Z3.II.A2.9). Wiedza zdobyta podczas realizacji wspomnianych wyżej projektów oraz tych, które stanowią przedmiot przedstawionego w poprzednim punkcie cyklu publikacji, posłużyła mi do napisania 3 rozdziałów obszernej pracy przeglądowej dotyczącej problemów strukturalnych w analizie kryształów molekularnych z zastosowaniem spektroskopii NMR w cieple stałym (praca Z3.II.A2.13).

M. Dudek