



**UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE**

**RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA (DSC) W BADANIACH
ANALITYCZNYCH LEKÓW Z ZASTOSOWANIEM NIEKTÓRYCH
UWODNIONYCH POLISACHARYDÓW (HPC, HPMC)**

AUTOREFERAT

dr n. farm. Przemysław Talik

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kraków 2021

Spis treści

1) Imię i nazwisko	3
2) Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy	3
3) Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
4) Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	3
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
4.3 Omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	6
4.3.1 Wprowadzenie	6
4.3.2 Cel naukowy badań	19
4.3.3 Omówienie wyników badań	19
4.3.4 Podsumowanie	57
Bibliografia	60
5) Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	64
6) Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	68
6.1 Działalność dydaktyczna	68
6.2 Szkolenia i wykłady dla farmaceutów	69
6.3 Szkolenia i wykłady dla medyków	70
6.4 Publikacje popularyzujące naukę	70
6.5 Rozdziały w skryptach	71
6.6 Wystąpienia ustne na seminariach naukowych	71
6.7 Działalność organizacyjna	71
6.8 Kursy, szkolenia, warsztaty o charakterze naukowym	71
6.9 Uczestnictwo w szkoleniach wspomagających jakość kształcenia	72
7) Nagrody i wyróżnienia	72

1. Imię i Nazwisko: *Przemysław Talik*

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

8 września 1988 Magister Chemii – specjalność Agrobiochemia.

Pracę magisterską wykonałem w Katedrze Fizyki Chemicznej Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu, pod kierunkiem prof. dr hab. Witolda Waclawka.

18 lipca 2008 Doktor nauk farmaceutycznych w zakresie chemii leków.

Rozprawę doktorską pt.: „Badania w grupie 1,3,7,8-pochodnych ksantyny o potencjalnym działaniu na receptory adenozynowe” wykonałem w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Pawłowskiego.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od X.2009 – adiunkt w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

XI.1994 – IX.2007 asystent w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

XII.1987 – IX.1992 stanowisko inżynierjno-techniczne w Katedrze Fizyki Chemicznej Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

„Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) w badaniach analitycznych leków z zastosowaniem niektórych uwodnionych polisacharydów (HPC, HPMC)”

4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Lp.	Publikacja	IF	MNiSW
H1	Talik P, Hubicka U. <i>The DSC approach to study non-freezing water contents of hydrated hydroxypropylcellulose (HPC): A study over effects of viscosity and drug addition.</i> J. Therm. Anal. Calorim. 2018;132(1):445-451.	2,471	25
	W tej pracy jestem zarówno autorem pierwszym jak i korespondencyjnym. Mój wkład w jej powstanie polegał na: opracowaniu koncepcji i zaplanowaniu wszystkich badań, sporządzeniu wszystkich próbek wraz z wszystkimi pomiarami DSC, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, omówieniu wniosków, napisaniu publikacji, przygotowaniu tabel i rycin, edycji manuskryptu oraz dyskusji z recenzentami.		
H2	Talik P, Hubicka U. <i>A study of the drying behaviour of various types of hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC) and their mixtures with drugs of different solubility using DSC.</i> J. Therm. Anal. Calorim. 2021;143:247-254.	4,626	70
	W tej pracy jestem zarówno autorem pierwszym jak i korespondencyjnym. Mój wkład w jej powstanie polegał na: opracowaniu koncepcji i zaplanowaniu wszystkich badań, sporządzeniu wszystkich próbek wraz z wszystkimi pomiarami DSC, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, omówieniu wniosków, napisaniu publikacji, przygotowaniu tabel i rycin, edycji manuskryptu oraz dyskusji z recenzentami.		
H3	Talik P, Piotrowska J, Hubicka U. <i>The Influence of Viscosity and Non-freezing Water Contents Bounded to Different Hydroxypropyl Celluloses (HPC) and Hydroxypropyl Methylcelluloses (HPMC) on Stability of Acetylsalicylic Acid.</i> AAPS PharmSciTech. 2019;20:187.	2,401	100
	W tej pracy jestem zarówno autorem pierwszym jak i korespondencyjnym. Mój wkład w jej powstanie polegał na: opracowaniu koncepcji i zaplanowaniu wszystkich badań, sporządzeniu wszystkich próbek wraz z wszystkimi pomiarami DSC, analizie i interpretacji otrzymanych wyników DSC i UV/Vis, omówieniu wniosków DSC i UV/Vis, napisaniu publikacji, przygotowaniu tabel i rycin, edycji manuskryptu oraz dyskusji z recenzentami.		

-
- | | | | |
|-----------|---|-------|----|
| H4 | Talik P , Piwowarczyk J, Muszyńska B, Hubicka U. <i>DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured in vitro mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried <i>Boletus badius</i>, <i>Agaricus bisporus</i> and <i>Cantharellus cibarius</i>. <i>J. Therm. Anal. Calorim.</i> 2021;143:3525–3532.</i> | 4,626 | 70 |
|-----------|---|-------|----|

W tej pracy jestem zarówno autorem pierwszym jak i korespondencyjnym. Mój wkład w jej powstanie polegał na: opracowaniu koncepcji i zaplanowaniu wszystkich badań, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, omówieniu wniosków, napisaniu publikacji, przygotowaniu tabel i rycin, edycji manuskryptu oraz dyskusji z recenzentami.

-
- | | | | |
|-----------|---|-------|----|
| H5 | Talik P , Moskal P, Proniewicz LM, Wesełucha-Birczyńska A. <i>The Raman spectroscopy approach to the study of Water–Polymer interactions in hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC). <i>J. Mol. Struct.</i> 2020;1210:128062.</i> | 3,196 | 70 |
|-----------|---|-------|----|

W tej pracy jestem pierwszym autorem. Mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, częściowym sporządzeniu próbek oraz napisaniu ogólnego zarysu tekstu w obszarze wstępu, omówienia wyników i wniosków końcowych. Uczestniczyłem w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

-
- | | | | |
|-----------|---|-------|----|
| H6 | Talik P , Mendyk A. <i>Machine Learning for the Identification of Hydration Mechanisms of Pharmaceutical-Grade Cellulose Polymers and Their Mixtures with Model Drugs. <i>Appl. Sci.</i> 2021;11:7751.</i> | 2,679 | 70 |
|-----------|---|-------|----|

W tej pracy jestem zarówno autorem pierwszym jak i korespondencyjnym. Mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodologii, analizie formalnej, napisaniu i przygotowaniu oryginalnego projektu, redakcji tekstu, wizualizacji, napisaniu wniosków końcowych oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

SUMA 19,999 405

4.3 Omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

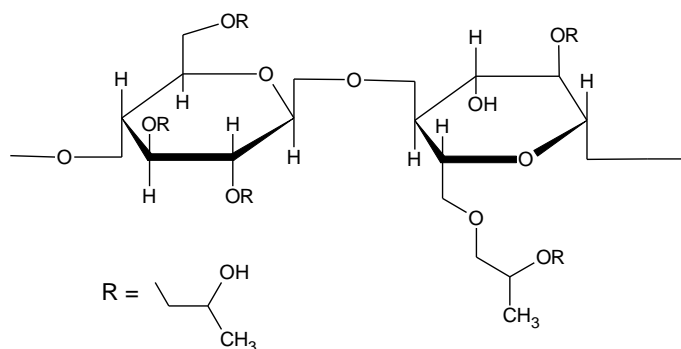
4.3.1 Wprowadzenie

Celuloza jest liniowym, homopolimerowym polisacharydem zbudowanym z podjednostek β -D-glukopiranozowych, połączonych wiązaniem β -1,4-O-glikozydowym. Ważną cechą tego biopolimeru, stosunkowo nietypową w świecie polisacharydów, jest jego samoorganizująca się struktura krystaliczna, powstająca w związku z możliwością tworzenia się wewnątrzcząsteczkowych oraz międzycząsteczkowych wiązań wodorowych [1]. W odróżnieniu od swoich pochodnych o budowie eterowej i estrowej, celuloza jest nierozpuszczalna w wodzie.

Etery celulozy otrzymywane są w wyniku syntezy, w reakcji bezpośredniego podstawienia w jej grupach hydroksylowych, podstawników o charakterze pochodnych alifatycznych. Rodzaj podstawnika oraz stopień podstawienia (uśredniona liczba podstawionych grup w celulozie) determinuje właściwości fizyko-chemiczne otrzymanej pochodnej.

Półsyntetyczne pochodne naturalnej celulozy o budowie eterowej okazały się bardzo użytecznymi polimerami, znajdując zastosowanie w takich dziedzinach, jak żywność, produkty kosmetyczne, budownictwo, przemysł papierniczy i tekstylny. Ich ugruntowana pozycja i szczególna wartość w zastosowaniach farmaceutycznych związana jest z takimi właściwościami, jak wysokie temperatury zeszklenia, wysoka stabilność chemiczna i fotochemiczna, rozpuszczalność, ograniczona krystaliczność, zdolność tworzenia wiązań wodorowych i niska toksyczność. Jeśli chodzi o toksyczność, etery celulozy zasadniczo nie mają zdolności przenikania przez enterocyty przewodu pokarmowego, co czyni je bezpiecznymi dla wszelkich farmaceutycznych postaci leku.

Jedną z powszechnie stosowanych pochodnych eterowych celulozy, jest hydroksypropylo celuloza (HPC), syntetyzowana w środowisku alkalicznym, w reakcji celulozy z tlenkiem propylenu, w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia. Modelowy fragment łańcucha o podstawieniu molowym równym 3,0 został przedstawiony na Rysunku 1.



Rysunek 1. Struktura hydroksypropylo celulozy o podstawieniu molowym równym 3,0.

Drugorzędowe grupy hydroksylowe w łańcuchach bocznych, są dostępne do dalszej eteryfikacji, co umożliwia powstawanie łańcuchów bocznych zawierających więcej niż jeden podstawnik propylenowy. Ponieważ uśredniona wartość podstawienia molowego jest stała, kontrolowanie stopnia polimeryzacji szkieletu celulozy pozwala na otrzymywanie szeregu pochodnych o zróżnicowanych masach cząsteczkowych i lepkościach [2]. Jest regułą, że ze wzrostem stopnia polimeryzacji wzrasta lepkość polimeru.

Tabela 1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne hydroksypropylo celulozy Klucel[®] Pharm wybranych typów LF, MF, HF, przeznaczonych dla przemysłu farmaceutycznego.

typ HPC	masa cząsteczkowa [Da]	stopień podstawienia molowego	zawartość grup 2-hydroksypropyloowych [%]	lepkość [cP]	w roztworze o stężeniu
LF	95000	3,6	72,8	126	5 %
MF	850000	3,8	74,8	6300	2 %
HF	1150000	3,8	74,5	2850	1 %

Hydroksypropylo celuloza jest eterem niejonowym o właściwościach amfifilowych. Hydrofobowe podstawniki hydroksypropyloowe nadają jej termoplastyczność i pewien stopień aktywności powierzchniowej. Jednocześnie, podobnie jak inne rozpuszczalne w wodzie etery celulozy, HPC modyfikuje właściwości reologiczne koloidalnych roztworów wodnych, zagęszczając je i polepszając ich stabilność koloidalną [1].

Hydroksypropylo celuloza jest szeroko wykorzystywana w preparatach farmaceutycznych. Polimery o niskiej lepkości są stosowane jako środki wiążące w tabletkach o szybkim uwalnianiu. Odmiany o średniej i wysokiej lepkości można znaleźć w preparatach matrycowych o przedłużonym uwalnianiu. Mieszanki HPC i innych polimerów celulozowych

stosuje się w celu poprawy charakterystyki granulacji na mokro i charakterystyki tabletkowania. W preparatach do stosowania miejscowego HPC stosuje się w plastrach przezskórnych i preparatach okulistycznych [1].

Ponadto; HPC to popularny zagęszczacz, stabilizator, emulgator i zamiennik tłuszczu w przemyśle spożywczym [3,4] oraz surowiec w innych nowoczesnych gałęziach przemysłu [5-7].

Podobnie jak inne polisacharydy (np. hydroksypropylometylo celuloza HPMC, chitozan, schizofylan, kwas hialuronowy), także hydroksypropylo celuloza, ze względu na swoją biokompatybilność z ludzką tkanką i składnikami krwi, niską toksyczność a także stosunkowo łatwą dostępność i powtarzalność otrzymywania zróżnicowanych struktur, jest bardzo chętnie badanym polimerem o charakterze modelowym. To szczególne zainteresowanie jest między innymi związane z dużą zdolnością polisacharydów do zmiany właściwości mechanicznych i chemicznych, w obecności nawet śladowych ilości wody. W ten sposób cząsteczki wody, poprzez wiązania wodorowe z innymi cząsteczkami wody, jak również z grupami funkcyjnymi, takimi jak np.: karbonylowa, hydroksylowa czy aminowa, mogą modyfikować architekturę wewnętrzną matrycy, co prowadzi do powstania nowej, stabilnej struktury przestrzennej [1,2].

Współczesne rozumienie tego zjawiska zakłada istnienie trzech odrębnych frakcji wody: silnie związanej wody niezamarzającej (*non-freezing water* – NFW), wody związanej zamarzającej (*freezing bound water* – FBW) i wolnej (*free water* – FW) [8].

Niezamarzająca woda (NFW) to zasób wody, której cząsteczki znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie łańcuchów polisacharydu, związane wiązaniem wodorowymi, zamknięte lub w specyficzny sposób ograniczone w nanoprzestrzennych pułapkach. Wzajemne oddziaływania, o których mowa, są tak silne, że kalorymetrycznie nie obserwuje się procesów krystalizacji i topnienia podczas odpowiednio – chłodzenia i ogrzewania. W literaturze znajdują się doniesienia, że w warunkach eksperymentu, ten rodzaj wody nie krystalizuje nawet po schłodzeniu do $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [9]. NFW to frakcja wody, która nie uczestniczy w tworzeniu się lub topieniu lodu. Dla niskich stężeń, cała pula wody znajdująca się w układzie jest uważana za niezamarzającą [9]. Zawartość NFW wyraźnie wzrasta, gdy w strukturze polimeru obecne są struktury zjonizowane [H1]. Berthold i wsp. [10] wykazali, że najbardziej sprzyjającym powstawaniu wody niezamarzającej jonem jest Li^+ , a następnie, w kolejności malejącej wydajności, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i H^+ .

Pochodzenie wody niezamarzającej NFW jest przedmiotem wielu badań [8,11-14], w których generalnie obserwuje się dwa główne nurty dyskusyjne. W części dostępnych publikacji postuluje się, że zjawisko niezamarzania wody może być efektem czysto kinetycznym, ponieważ poniżej temperatury zeszklenia T_g , ruchliwość łańcuchów polimerowych utrudnia dyfuzję cząsteczek wody, a tym samym zapobiega tworzeniu zarodków krystalizacji (nukleacja) i wzrostowi kryształów. W tym obszarze zaproponowano również, że zjawisko niezamarzania wody jest związane z temperaturą aktywności pary przechłodzonej wody, ponieważ obniżenie temperatury zamarzania jest funkcją aktywności wody jako właściwości koligatywnej [13].

W drugim nurcie, pojęcie wody NFW rozumiane jest jako zespół cząsteczek wody, które oddziałują z grupami polarnymi łańcuchów polimerowych i/lub pozostają w bezpośrednim pobliżu tych makrocząsteczek, nie będąc w ten sposób zdolnymi do asocjacji i tworzenia lodu czy kryształitów [9,11,12]. W tej samej grupie badań wskazano, że woda zamknięta w przestrzeniach, których wymiary nie przekraczają kilku angstromów, również nie posiada zdolności do krystalizacji [11,12,16]. W szeregu eksperymentów wykazano, że promień krytyczny jąder lodu w temperaturze zamarzania wynosi około 1 nm. Dlatego oczekuje się, że zarodkowanie lodu będzie silnie hamowane, jeśli cząsteczki wody znajdują się w zamkniętych przestrzeniach o wymiarach zbliżonych lub mniejszych niż 2 nm [13]. Tak więc obecność swoistych „nanoprzestrzeni” lub „nanoporów” (*nanocavities, nanopores*) w hydrożelach może mieć istotny wpływ na powstawanie wody niezamarzającej. Uwagę zwraca też fakt, że woda zamknięta w małych hydrofobowych domenach może podlegać tak zwanej zimnej krystalizacji, tj. procesowi, w którym podczas ogrzewania następuje przemiana ze stanu amorficznego do krystalicznego [16].

Rosnąca zawartość wody powoduje zajmowanie nowych obszarów, bardziej oddalonych od łańcuchów polimerowych. W obszarach tych cząsteczki wody są słabiej wiązane, a zatem mogą krystalizować. Ponieważ cała pula wody znajdująca się w układzie jest uważana za niezamarzającą, uznaje się, że struktury nanoprzestrzenne są już obsadzone. Frakcja ta, tradycyjnie nazywana wodą związaną zamarzającą FBW, charakteryzuje się między innymi istotnie niższą entalpią topnienia, obniżoną temperaturą krzepnięcia oraz silną zależnością od tzw. historii termicznej, charakterystycznej dla cieczy przechłodzonej (*supercooling*) [8]. W rezultacie, wodę FBW można odróżnić od wolnej FW, chociaż obie frakcje uważane są za zamarzające. Woda wolna FW nie różni się znacząco temperaturą topnienia i krystalizacji oraz entalpią przemian fazowych od wody normalnej [8].

Współistnienie trzech frakcji wody w matrycy polimerowej tworzy specyficzny układ, składający się z łańcuchów polimerowych, zamrożonej wody (lodu), niezamrożonej wody i pustych przestrzeni. Zarówno lód, jak i niezamrożona woda mogą być osadzone w porach i/lub wnękach matrycy polimerowej. Jak już wspomniano, gdy wymiary takiej wnęki nie przekraczają kilku angstromów, krystalizacja wody jest trudna lub niemożliwa. Liu i wsp. [16] nazwali takie puste przestrzenie „nanownękami” (*nanocavities*) i wykazali, że wiązania wodorowe nie są jedynym czynnikiem mającym wpływ na krystalizację wody. Ponadto zasugerowali, że woda związana wiązaniami wodorowymi, to tylko jeden z możliwych stanów fizycznych w polimerze [16].

Spośród metod instrumentalnych, które mają zastosowanie w badaniach wody związanej, należy wspomnieć o m.in. magnetycznym rezonansie jądrowym (NMR) [17,18], rezonansie magnetycznym (MRI) (*magnetic resonance imaging*) [19], reflektometrii TDR [17], metodach spektroskopowych IR i Ramana [9,20,21] oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) [22-27]. Badanie procesów topnienia/zamrażania z użyciem DSC wydaje się być najbardziej odpowiednią techniką do ilościowego wyznaczania wody NFW.

Kalorymetria jest podstawową techniką pomiaru właściwości termicznych stosowaną w celu ustalenia związku pomiędzy temperaturą a określonymi właściwościami fizycznymi badanego materiału. Ponadto, jest to jedyna metoda bezpośredniego badania zmian entalpii ΔH badanych procesów fizycznych. Analiza przejść fazowych, we współczesnych badaniach nad lekiem, w znacznym stopniu przyciąga uwagę wielu grup badawczych zajmujących się *Drug Discovery and Development*. Badanie parametrów termodynamicznych, takich jak topnienie (T_m), krystalizacja (T_c) czy temperatura zeszklenia (T_g), entalpia (ΔH) i pojemność cieplna (C_p), jest źródłem cennych informacji, które można wykorzystać przy opracowywaniu zarówno nowych leków, jak i ulepszeniu tych już stosowanych w terapii. Ze względu na względną łatwość, zarówno analizy jakościowej jak i ilościowej, technika DSC ma swoją ugruntowaną pozycję i pierwszeństwo przed innymi.

Każdy lek lub jego aktywne lub nieaktywne farmakologicznie odmiany polimorficzne, charakteryzuje się pewną pojemnością cieplną, którą można zmierzyć na podstawie różnicy entalpii ΔH w trakcie określonego programu temperaturowego. Towarzyszące inne leki, związki chemiczne, substancje pomocnicze lub cząsteczki rozpuszczalników, mogą modyfikować bezpośrednio otoczenie badanego leku za pomocą oddziaływań chemicznych lub fizycznych. Zmiany te manifestują się na krzywej DSC w postaci różnych efektów

endotermicznych, najczęściej związanych z topnieniem, przejściem szklistym postaci amorficznej lub też odparowaniem rozpuszczalnika. Efekty egzotermiczne mogą mieć związek z procesami krystalizacji. Zarówno przejścia polimorficzne, jak i dekompozycja termiczna mogą być związane z obydwooma typami efektów cieplnych [28-31].

Wymienione procesy fizyczne i przemiany, były przedmiotem szeregu prac badawczych związanych z zastosowaniem metody DSC w mojej pracy zawodowej. Potencjalne niezgodności pomiędzy lekiem a wybranymi substancjami pomocniczymi, analizowałem na przykładzie flukonazolu i celulozy mikrokrystalicznej Vivapur 212, laktozy i ksylitolu w publikacji pt. „Differential Scanning Calorimetry (DSC) in the Study of Potential Incompatibilities Between Fluconazole and Selected Pharmaceutical Excipients” [32]. Ponieważ z technologicznego punktu widzenia, interakcje leków z substancjami pomocniczymi czy też matrycami nośnymi, indukowane w procesach technologicznych, są często trudne do przewidzenia, w publikacji pt. “The influence of sample preparation and the presence of other API and excipients on the use of DSC method in quantification of paracetamol in commercially available tablets” [33], pokazałem; w jaki sposób metoda sporządzania takich mieszanin wpływa na oznaczenia ilościowe z użyciem DSC. Przedmiotem badań był paracetamol wchodzący w skład komercyjnie dostępnych preparatów w formie tabletek. W pracy uwzględniono także wpływ obecności innych leków, takich jak ibuprofen, butylobromek hioscyny, kofeina i fosforan kodeiny [33].

Analiza różnicy entalpii procesu topnienia w funkcji stężenia, umożliwia także zastosowanie metody DSC w analizie ilościowej, w pełnym zakresie stężeń analitu. I choć rzadko stosowana, ponieważ ugruntowaną pozycję w tym obszarze analizy ma wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC, to przewaga techniki kalorymetrycznej polega na możliwości pomiaru np. sproszkowanej tabletki w postaci niezmięnionej (stała postać leku). W przypadku HPLC jest to niemożliwe. Przykładem, w których zastosowałem DSC w analizie ilościowej są publikacje pt. “Quantification of active pharmaceutical ingredients in commercially available poly pharmaceutical tablets by means of DSC” [34] oraz “The use of the DSC method in quantification of active pharmaceutical ingredients in commercially available one component tablets” [35]. W doniesieniach tych [34,35] analizowałem komercyjnie dostępne jedno- i dwuskładnikowe tabletki paracetamolu i ibuprofenu.

Przejścia fazowe takie jak amorfizacja, miałem możliwość badać i opisać w pracy pt. “Application of supercritical carbon dioxide to enhance dissolution rate of bicalutamide” [36],

w której podjęto udaną próbę zwiększenia rozpuszczalności trudno rozpuszczalnego, niesteroidowego leku o działaniu przeciw-androgenowym. W pracy pt. „The Influence of Ionizing Radiation on Itraconazole in the Solid State” [37], opisane zostały moje badania dotyczące stabilności itraconazolu eksponowanego na promieniowanie jonizujące.

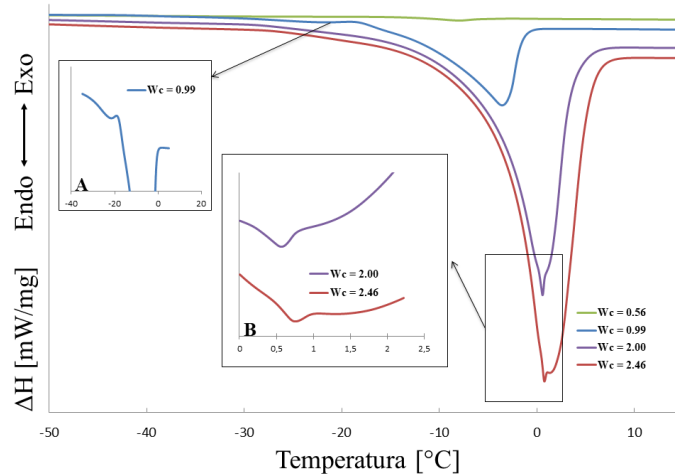
Publikacja pt. „Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS/MS and DSC” [31], której jestem współautorem, jest przykładem zastosowania techniki DSC w badaniu dekompozycji leków. Celem badań tych leków z grupy fluorowanych chinolonów, była ich fotodegradacja, analizowana przy zastosowaniu różnych technik instrumentalnych [31].

Przykładem zastosowania DSC, jako techniki wspierającej obserwację morfologicznych zmian zachodzących w uwodnionych tabletkach, jest praca pt. „Magnetic resonance microscopy for assessment of morphological changes in hydrating hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets in situ – is it possible to detect phenomena related to drug dissolution within the hydrated matrices?” [19].

Podstawą przeprowadzonych serii badań, w części dotyczącej różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), prezentowanego cyklu habilitacyjnego, była metoda, której teoretyczne uzasadnienie przedstawił Liu i wsp. [24]. W pracy tej, autorzy zamieścili wyniki badań nad uwodnionym kwasem hialuronowym, w związku z jego unikalną zdolnością do przechowywania i uwalniania wody, a także pewnymi niespójnościami w wyjaśnieniu niektórych danych eksperymentalnych, opublikowanych wcześniej przez innych autorów. Liu zaproponował alternatywną hipotezę i ilościowe podejście do analizy tych danych. W przeprowadzonych rozważaniach matematycznych, skoncentrowanych na procesie topnienia uwodnionego kwasu hialuronowego, znajdujemy następujące konkluzje:

1) jeśli istnieje krytyczne stężenie wody w mieszaninie, poniżej której nie obserwowane są (kalorymetrycznie) piki procesów krystalizacji i topnienia, to taki typ wody należy uznać za bardzo silnie związaną wodę niezamarzającą (NFW);

Zjawisko to pokazano na Rysunku 2 – dla stężenia wody $W_C = 0,56$ g/g nie obserwuje się endotermicznego piku procesu topnienia.



Rysunek 2. Krzywe DSC procesu topnienia, otrzymane z próbek hydroksypropylo celulozy typ HPC-HF uwodnionych w zakresie W_c pomiędzy 0.56 a 2.46 g/g.

2) dające się zarejestrować piki, zarówno krystalizacji jak i topnienia, ilościowo należą do pozostałych typów wody wolnej FW i związanej zamarzającej FBW, a ich masę można obliczyć pomniejszając masę całkowitą wody (m_{wody}) o masę wody NFW (m_{NFW});

$$m_{FW} + m_{FBW} = m_{wody} - m_{NFW}$$

3) tylko zmiana zawartości stężenia wody w obrębie tej puli, odpowiada za zmianę rejestrowanej entalpii badanych procesów;

$$\Delta H_{zmierzone} = \Delta H_{FW+FBW}$$

Mając na uwadze powyższe; dla dowolnej suchej masy próbki m_{sp} uwodnionej masą wody m_{wody} , dla której zmierzono kalorymetrycznie (DSC) zmianę entalpii o wartości $\Delta H_{zmierzone}$, dostajemy:

$$\frac{\Delta H_{zmierzone}}{m_{sp}} = \frac{\Delta H_{FW+FBW}}{m_{sp}}$$

gdzie iloraz $\Delta H_{zmierzone}/m_{sp}$ określa wartość zmierzonej entalpii ΔH normalizowanej do masy suchej substancji (nieuwodnionej próbki).

Otrzymana wartość zmierzonej entalpii ΔH dotyczy tylko mas wody FW i FBW, zatem równanie tożsamościowe można dalej przekształcić do postaci:

$$\frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{sp}} = \frac{\Delta H_{FW+FBW}}{m_{sp} \times (m_{FW} + m_{FWB})} (m_{FW} + m_{FWB})$$

i dalej:

$$\frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{sp}} = \frac{\Delta H_{FW+FBW}}{m_{sp} \times (m_{FW} + m_{FWB})} (m_{\text{wody}} - m_{NFW})$$

jeśli stężenie wody w mieszaninie wyrazimy w postaci stosunku masy wody do masy suchej substancji W_C :

$$W_C = \frac{m_{\text{wody}}}{m_{sp}}$$

to równanie przyjmie postać:

$$\frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{sp}} = \frac{\Delta H_{FW+FBW}}{m_{FW} + m_{FWB}} \left(\frac{m_{\text{wody}}}{m_{sp}} \right) - \frac{\Delta H_{FW+FBW}}{m_{FW} + m_{FWB}} \left(\frac{m_{NFW}}{m_{sp}} \right)$$

czyli:

$$\frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{sp}} = \frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{FW} + m_{FWB}} \times W_C - \frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{FW} + m_{FWB}} \left(\frac{m_{NFW}}{m_{sp}} \right)$$

W wyniku opisanych przekształceń otrzymujemy liniową funkcję opisaną równaniem $\Delta H = a \cdot W_C + b$ (wartość entalpii ΔH normalizowana do masy suchej substancji). Jeśli wartość $\Delta H_{\text{zmierzone}}/m_{sp} = 0$ (ekstrapolacja prostej), to:

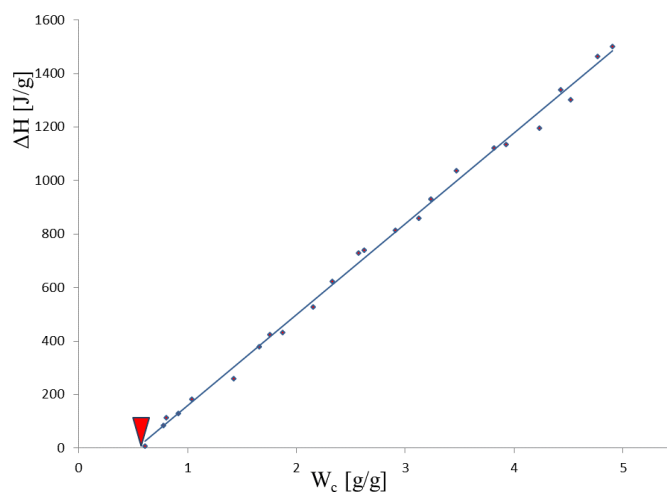
$$\frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{sp} + m_{FWP}} \left(\frac{m_{NFW}}{m_{sp}} \right) = \frac{\Delta H_{\text{zmierzone}}}{m_{FW} + m_{FWB}} \times W_C$$

i po uproszczeniu:

$$\left(\frac{m_{NFW}}{m_{sp}} \right) = W_C$$

co pokazuje, że poniżej pewnego stężenia granicznego, przy którym na krzywej DSC (w warunkach eksperymentu) nie obserwuje się endotermicznego piku procesu topnienia wody ($\Delta H_{\text{zmierzona}}/m_{\text{sp}} = 0$), stężenie W_C badanej próbki opisuje bezpośrednio masę silnie związanej niezamarzającej wody NFW, przypadającą na jednostkową masę suchej próbki.

Zatem, jeśli obliczone w pomiarach DSC entalpie topnienia próbek normalizowanych do suchej masy, odłożone w funkcji zawartości wody W_C mają charakter liniowy, to wartość silnie związanej wody niezamarzającej NFW jest wartością ekstrapolowaną otrzymanej funkcji do zera – $\Delta H = 0$. Graficznym obrazem takiej zależności jest Rysunek 3 – miejsce przecięcia osi W_C dla wartości funkcji równej zero oznaczono czerwonym markerem.



Rysunek 3. Entalpie topnienia próbek normalizowanych do suchej masy, odłożone w funkcji zawartości wody W_C mają charakter liniowy. Zawartość silnie związanej wody niezamarzającej NFW jest wartością ekstrapolowaną otrzymanej funkcji do zera – $\Delta H = 0$. Miejsce przecięcia osi W_C dla wartości funkcji równej zero oznaczono czerwonym markerem.

Metoda zaproponowana przez Liu i wsp. [24] znalazła swoje uznanie wśród zespołów zajmujących się problematyką, w której obecność wody jest kluczowa dla aktywności badanej substancji, jak miało to miejsce w przypadku kwasu hialuronowego [24,26,38]. Ponadto, metoda ta znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym [39,40], dla opisu właściwości fizykochemicznych niektórych polisacharydów [22], a także w rolnictwie [41].

Przykłady zastosowania omówionej metody DSC w analizie zawartości silnie związanej wody niezamarzającej NFW w hydroksypropylo celulozie (HPC) oraz hydroksypropylometylo celulozie (HPMC) opisałem w publikacjach **H1** pt. „The DSC approach to study non-freezing

water contents of hydrated hydroxypropylcellulose (HPC): A study over effects of viscosity and drug addition” i **H3** pt. „The Influence of Viscosity and Non-freezing Water Contents Bounded to Different Hydroxypropyl Celluloses (HPC) and Hydroxypropyl Methylcelluloses (HPMC) on Stability of Acetylsalicylic Acid” wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego. Innowacją w tej metodzie było zbadanie zawartości NFW w mieszaninach tych polimerów z lekami o zróżnicowanej rozpuszczalności i oceny ich wpływu na tę zawartość. Ponadto, omówioną metodę zastosowałem w badaniu zawartości NFW w materiale grzybowym, w tym po raz pierwszy w hodowlach mycelialnych (*in vitro*) *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* oraz *Cantharellus cibarius*. Wyniki tych badań były przedmiotem publikacji **H4** pt. “DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured *in vitro* mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* and *Cantharellus cibarius*” również wchodzącej w skład cyklu habilitacyjnego.

Ponieważ omówiona metoda otwierała nowe możliwości poznawcze w zakresie badania uwodnionych polimerów hydrofilowych, Průšová i wsp. [26] zaproponowali zaimplementowanie jej w procesach parowania. Przez analogię, badaną zawartość wody nazwano wodą nieodparowującą NEW (*non evaporating water*), po czym ze względów formalnych, zamieniono na N_{ev} – woda związana z procesem parowania. Dyskusja, jaką przeprowadzili autorzy tej pracy, pozwoliła powiązać powstające w strukturze czystych polisacharydów nanoprzestrzenie z ich zdolnością do wiązania i zatrzymywania wody [26].

Rozważania te skierowały moją uwagę na procesy technologiczne stosowane w trakcie wytwarzania stałych formułacji farmaceutycznych – głównie tabletek. Etap suszenia, który ma na celu usunięcie nadmiaru wilgoci ze sproszkowanej masy lub z granulatu i/lub zapewnienie odpowiednich parametrów masy tabletkowej, prowadzi do odparowania rozpuszczalników zaabsorbowanych, natomiast może nie powodować usunięcia wody silnie związanej z łańcuchami polimeru (NFW) lub zamkniętej w jego nanoprzestrzeniach (N_{ev}). Przykład zastosowania techniki DSC, zaimplementowanej do analizy zawartości wody związanej z procesem parowania N_{ev} opisałem w pracy **H2** pt. „A study of the drying behaviour of various types of hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC) and their mixtures with drugs of different solubility using DSC” oraz **H4** pt. “DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured *in vitro* mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* and *Cantharellus cibarius*” wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego.

Podsumowując. Stosowana metoda DSC, której opublikowane wyniki stanowią część prezentowanego cyklu habilitacyjnego posiada zalety, które wykazano w następujących publikacjach:

1. umożliwia oznaczenie zawartości wody niezamarzającej NFW – **H1, H3, H4**
2. umożliwia oznaczenie zawartości wody związanej z procesem parowania N_{ev} – **H2, H4**
3. pozwala na badanie wpływu lepkości i masy cząsteczkowej uwodnionych matryc polimerowych na zawartości NFW i N_{ev} – **H1-H3**
4. pozwala na badanie wpływu leków dobrze i słabo rozpuszczalnych w wodzie, na zawartości NFW i N_{ev} – **H1-H3**
5. umożliwia ocenę wpływu NFW i N_{ev} oraz lepkości i masy cząsteczkowej uwodnionych matryc polimerowych na trwałość leków – **H3**
6. pozwala na badanie właściwości fizykochemicznych różnych układów matrycowych – **H1-H4**
7. daje możliwość badania różnych typów wody a także oznaczenie zawartości NFW i N_{ev} w materiałach biologicznych – **H4**
8. daje możliwość uzupełnienia, istotnego dla przemysłu spożywczego, diagramu fazowego wody o alternatywnie obliczoną zawartość wody NFW oraz o nowy składnik N_{ev} – **H4**
9. dzięki ocenie bilansu zawartości NFW i N_{ev} , daje możliwość oceny udziału charakteru wiązania się wody: wiązania wodorowe (*H-bonds*) vs pułapkowanie w swoistych strukturach nanoprzestrzennych (*nanocavities*) – **H2-H4**
10. uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie i korelują z wynikami otrzymanymi metodą spektroskopii Ramana – **H5**
11. krzywe DSC spełniają wymagania jako zmienne wejściowe dla metod AI/ML (Artificial intelligence/Machine learning) w modelowaniu predykcyjnym badanej właściwości fizykochemicznej – **H6**
12. pełny zakres badań wymaga stosunkowo niewielkiej ilości substancji – przy 3 powtórzeniach około 250 mg; ponadto metoda charakteryzuje się krótkim czasem analizy oraz brakiem konieczności stosowania wzorców.

Do chwili powstania niniejszego autoreferatu, w literaturze cytowanej w dostępnych Bazach Bibliotecznych, opisana metoda po raz pierwszy:

- znalazła istotne zastosowanie w dziedzinie nauk farmaceutycznych
- dotyczyła leków o zróżnicowanej rozpuszczalności
- została użyta w mieszaninach tych leków z substancjami stosowanymi jako matryce uwalniania, składniki formulacji czy postaci leku
- została potwierdzona wynikami uzyskanymi metodą spektroskopii Ramana – w wyniku czego potwierdzono jej kompatybilność z tą metodą
- została wykorzystana jako wyjściowa baza danych dla sporządzenia modelu predykcyjnego, z zastosowaniem metod AI/ML (*Artificial intelligence/Machine learning*)

Trójwymiarowa sieć uwodnionych polimerów disacharydowych, wraz z ich właściwościami fizykochemicznymi, może być modyfikowana nie tylko ilością zaabsorbowanej wody, ale także obecnością innych składników, także tych aktywnych farmakologicznie (API – *artificial pharmaceutical ingredient*). Dzięki zmniejszeniu odległości pomiędzy łańcuchami polimeru, zmniejsza się współczynnik dyfuzji efektywnej, co w konsekwencji prowadzi do wydłużenia czasu uwalniania leku z matrycy. W ten sposób można kontrolować proces uwalniania leku.

W związku z powyższym, ocena wpływu lepkości i masy cząsteczkowej polimeru oraz obecności leków o zróżnicowanej rozpuszczalności na zawartość niezamarzającej związanej wody NFW w modelowych mieszaninach jednoskładnikowych, będzie miała istotny wpływ w badaniach nad nowoczesnymi systemami uwalniania leków.

4.3.2 Cel naukowy badań

Celem badawczym przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego, było badanie wpływu leków o dobrej i słabej rozpuszczalności, lepkości matrycy polimerowej oraz obecności silnie dysocjujących kationów; na zawartość wody niezamarzającej NFW oraz związanej z procesem parowania N_{ev} , za pomocą zoptymalizowanej metody różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC. W obszarze zainteresowania, znalazło się także potwierdzenie możliwości jej zastosowania dla innych materiałów, w tym pochodzenia naturalnego.

Podobnie, niezwykle interesującą częścią zaplanowanego cyklu była ocena, czy uzyskane wyniki eksperymentalne korelują z wynikami otrzymanymi innymi, instrumentalnymi metodami badania ciała stałego.

Zaplanowano także podjęcie próby sporządzenia teoretycznego, jakościowego i ilościowego, modelu rozkładu poszczególnych frakcji wody, który zostałby otrzymany z użyciem zaawansowanych technik obliczeniowych AI/ML.

4.3.3 Omówienie wyników badań

Podstawą habilitacji jest cykl sześciu oryginalnych artykułów (**H1–H6**), które omawiam poniżej. Zgodnie z moją wiedzą, badania wykonane prezentowaną metodą DSC, nie były jak dotąd przedmiotem innych publikacji.

H1 Talik P, Hubicka U. *The DSC approach to study non-freezing water contents of hydrated hydroxypropylcellulose (HPC): A study over effects of viscosity and drug addition. J Therm Anal Calorim. 2018;132(1):445-451.*

Hydroksypropylo celuloza jest bardzo istotnym dla przemysłu farmaceutycznego, chętnie badanym polimerem o charakterze modelowym i podobnie jak inne półsyntetyczne celulozy charakteryzuje się dużą zdolnością do zmiany właściwości mechanicznych i chemicznych w obecności nawet śladowych ilości wody. Jednym z elementów charakteryzujących jakościowo i ilościowo te właściwości, jest zawartość silnie związanej niezamarzającej wody NFW.

Jak już wspomniano, właściwości fizykochemiczne uwodnionych polimerów disacharydowych, mogą być także modyfikowane obecnością cząsteczek leków. Efekt ten jest

wynikiem interakcji z łańcuchami polimeru poprzez różnej mocy wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania jon-dipol czy też słabymi międzycząsteczkowymi siłami przyciągania, jakimi są siły van der Waalsa.

Mając na uwadze dużą różnorodność takich niekowalencyjnych oddziaływań, postanowiono także zbadać wpływ obecności kationów metali, które tworzą dobrze rozpuszczalne sole organiczne.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie, w jaki sposób modelowe leki o małych masach cząsteczkowych, prostej strukturze przestrzennej i zróżnicowanej rozpuszczalności, mogą modyfikować zawartości wody niezamarzającej NFW, silnie związanej w przestrzennej sieci uwodnionej hydroksypropylo celulozy o różnej lepkości i masie molekularnej. W tym celu, obok surowych polimerów, przedmiotem badań były także ich mieszaniny ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym i bardzo dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem omówionej we wstępie metody DSC.

Ważnym celem przeprowadzonych na tym etapie badań, było dopracowanie warsztatu sporządzania uwodnionych próbek polimeru i jego mieszanin w oczekiwanych stężeniach wody, optymalizacja metody w części instrumentalnej oraz obliczeniowej. Prezentowane badania miały charakter nowatorski.

W celu zrealizowania zamierzonego celu, do badań DSC wybrano hydroksypropylo celulozy Klucel®Pharm LF, MF i HF oraz ich mieszaniny dwuskładnikowe (1:1 m/m) z kwasem salicylowym (SA) i salicylanem sodu (NaSA). Rozpuszczalność w wodzie użytych leków wynosiła odpowiednio około 2,2 i 1200 g/L. Każda z otrzymanych w ten sposób 9 serii pomiarowych została przebadana w zakresie stężeń W_C od 0,2 do 5,0 g/g – pojedynczą serię reprezentowało od 20 do 23 próbek. Pomiary DSC realizowano 3 stopniowym programem temperaturowym: 1 – chłodzenie od 20 C do -55 C z szybkością 3 C/min; 2 – część izotermiczna: 2 minuty w temperaturze -55 C; 3 – grzanie powrotne do temperatury 20 C. Tygłe DSC ważono przed i po każdym cyklu pomiarowym, aby sprawdzić czy masa próbki nie uległa zmianie. %RSD wszystkich pomiarów nie przekroczył 4,9%.

Otrzymane krzywe zależności $\Delta H = f(W_C)$ charakteryzowały się silną korelacją, wyrażającą się współczynnikiem R^2 zawartym w przedziale od 0,9922 do 0,9992 (Tabela 2).

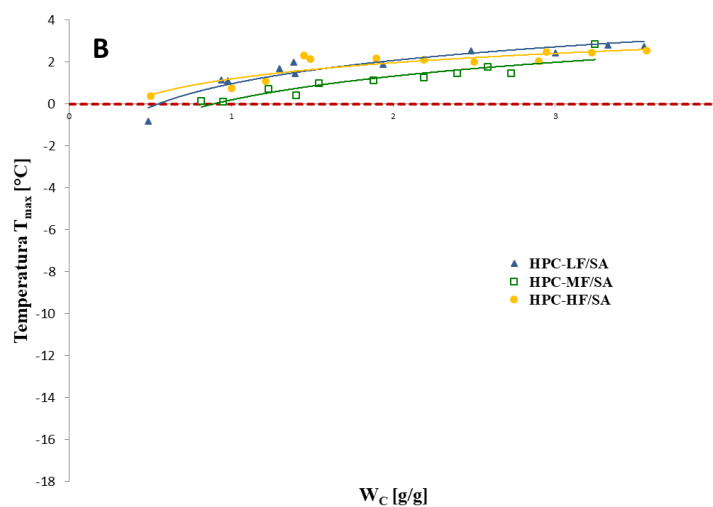
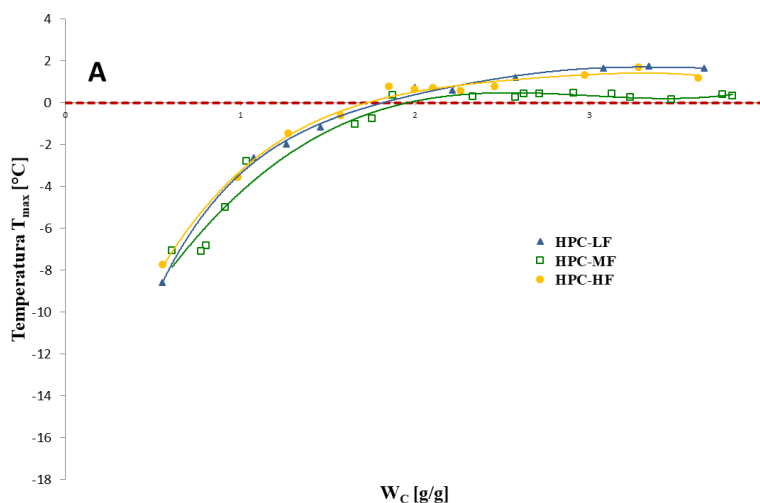
Tabela 2. Zawartość niezamarzającej wody NFW obliczona dla surowej HPC oraz jej mieszanin z lekami o zróżnicowanej rozpuszczalności: kwasem salicylowym (SA) i salicylanem sodu (NaSA); nNFW oznacza liczbę cząsteczek wody przypadającą na jednostkę disacharydową HPC; * dla porównania przytoczono wartości NFW polisacharydów zmierzone przez innych autorów [22].

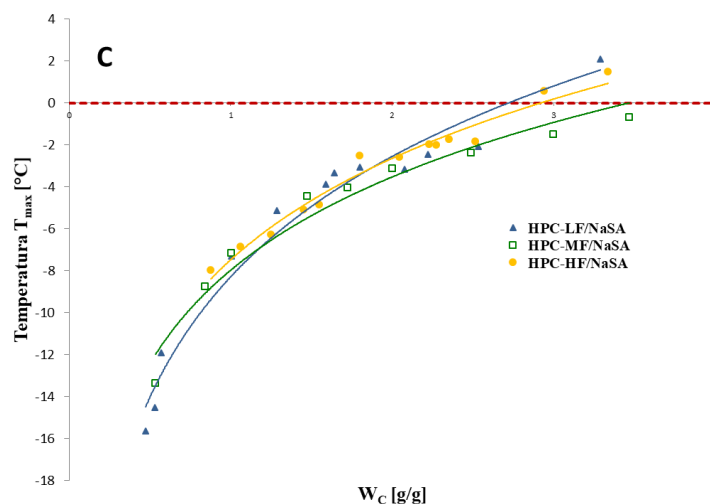
HPC	R ²	NFW [g/g]	n _{NFW}
LF	0.9928	0.54	22.2
MF	0.9922	0.54	22.9
HF	0.9936	0.51	21.7
LF/SA	0.9992	0.19	7.8
MF/SA	0.9949	0.18	7.7
HF/SA	0.9927	0.17	7.2
LF/NaSA	0.9970	0.50	20.6
MF/NaSA	0.9972	0.48	20.4
HF/NaSA	0.9966	0.44	18.7
*chitozan		0,37	7,0
*schizofylan		0,38	14,1
*hialuronian		0,77	17,2
*CMC 90 kDa		0,77	18,7
*CMC 700 kDa		0,84	21,9
*celuloza		0,14	2,4

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w warunkach eksperymentu, różnica pomiędzy lepkościami badanych surowych typów HPC HF, MF, LF rzędu 126 vs 6300 [cp] nie wpływa na zawartość NFW, ponieważ obliczone wartości wahały się od 0,51 do 0,54 g/g. Obecność słabo rozpuszczalnego kwasu salicylowego była powodem prawie 3 krotnie mniejszego stężenia NFW w badanych mieszaninach – 0,17-0,19 g/g. Ten interesujący fakt wskazuje, że na powstawanie niezamarzającej wody w surowym polimerze, mają wpływ zarówno hydrofilne grupy łańcuchów polimeru, oddziaływujące *via* wiązania wodorowe, jak i architektura przestrzenna w postaci swoistych nanostruktur („*nanocavities*”), zdolnych do pułapkowania cząsteczek wody. W mieszaninach HPC/SA, gdzie zawartość hydroksypropylo celulozy jest niższa o połowę (mieszaniny 1:1 m/m), możliwość utworzenia się wiązań wodorowych w miejscach hydrofilnych jest wyraźnie mniejsza. Podobnie, małe cząsteczki kwasu salicylowego utrudniają formowanie się struktur nanoprzestrzennych poprzez wzrost ilości centrów hydrofobowych oraz blokowanie dostępu do nich w sposób czysto mechaniczny (zawada steryczna). Zawartość NFW obliczona dla mieszanin z bardzo dobrze rozpuszczalną solą sodową kwasu salicylowego, zawierająca się w przedziale od 0,44 do 0,50 g/g, była

porównywalna z zawartością wyznaczoną dla surowej HPC. Wskazuje to na silny dysocjacyjny wpływ jonu Na^+ , pochodzącego od łatwo dysocjującej soli sodowej salicylanu.

Wynikiem przeprowadzonych badań była również obserwacja, że obecność małych cząsteczek leków o słabej i bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie, silnie różnicuje maksymalną temperaturę T_{max} procesu topnienia wody zawartej w mieszaninie. Dla takich samych stężeń wody W_C , salicylan sodu powodował silne obniżenie T_{max} topnienia (Rysunek 4c), podczas gdy dla mieszanin z kwasem salicylowym temperatury te były dodatnie w całym zakresie pomiarowym – Rysunek 4b. Maksymalne temperatury topnienia wyjściowych HPC (Rysunek 4a) miały charakter mieszany i dla stężeń $W_C < \sim 2,0$ g/g były ujemne a dla stężeń $W_C > \sim 2,0$ g/g dodanie.





Rysunek 4. Zależność pomiędzy maksymalną temperaturą T_{\max} procesu topnienia wody a jej zawartością W_C , otrzymaną dla poszczególnych typów HPC (4A) oraz ich mieszanin z lekami (4B i 4C – mieszaniny odpowiednio z kwasem salicylowym i salicylanem sodu): LF (niebieski trójkąt), MF (pusty zielony kwadrat), HF (żółty pełny okrąg); pozioma czerwona przerywana linia wskazuje 0 °C; dla celów porównawczych osie W_C i T_{\max} zostały znormalizowane do tej samej skali.

Osiągnięcia:

- zoptymalizowano metodę sporządzania surowych próbek HPC oraz ich mieszanin z modelowymi lekami o oczekiwanych stężeniach wody W_C
- zoptymalizowano program temperaturowy na potrzeby stosowanej metody DSC
- przeprowadzono pomiary DSC procesu krystalizacji i topnienia uwodnionych hydroksypropylo celuloz typu LF, MF i HF o zróżnicowanych masach cząsteczkowych i lepkości oraz obliczono dla nich zawartości wody niezamarzającej NFW
- w celu sprawdzenia wpływu leków o zróżnicowanej rozpuszczalności, przeprowadzono także odpowiednie pomiary DSC oraz obliczenia NFW mieszanin HPC ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym i bardzo dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu
- zawartość NFW dla czystych HPC waha się odpowiednio od 0,51 g/g dla typu HPC-HF do 0,54 g/g dla obydwu pozostałych typów LF i MF
- lepkość HPC w zakresie 126 – 6300 [cP] nie wpływa na zawartość NFW

- obecność słabo rozpuszczalnego w wodzie kwasu salicylowego obniża zawartość NFW do około 30% – to jest 0,17 g/g, 0,18 g/g, 0,19 g/g odpowiednio dla typów HF, MF i LF

- obecność bardzo dobrze rozpuszczalnego w wodzie salicylanu sodu powoduje, że zawartość NFW jest nieco niższa/porównywalna do zawartości NFW obliczonych dla wyjściowych typów HPC – to jest 0,44 g/g, 0,48 g/g, 0,50 g/g odpowiednio dla typów HF, MF i LF

- wzrostowi zawartości NFW, w porównaniu do mieszanin HPC/SA, sprzyjają łatwo dysocjujące kationy jednowartościowe Na^+

- obecność małych cząsteczek leków o słabej i bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie, silnie różnicuje maksymalną temperaturę T_{\max} procesu topnienia wody zawartej w mieszaninie: mieszaniny HPC/NaSA powodują obniżenie T_{\max} topnienia do wartości ujemnych; T_{\max} topnienia mieszanin HPC/SA są dodatnie w całym zakresie pomiarowym; maksymalne temperatury topnienia czystych HPC mają charakter mieszany i dla stężeń $W_C < \sim 2,0$ g/g są ujemne a dla stężeń $W_C > \sim 2,0$ g/g dodatnie.

H2 Talik P, Hubicka U. A study of the drying behaviour of various types of hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC) and their mixtures with drugs of different solubility using DSC. J Therm Anal Calorim. 2021;143:247–254.

Wytwarzanie leków jest złożonym procesem technologicznym, w którym poszczególne etapy, takie jak mielenie, mielenie na mokro, granulowanie, suszenie, mieszanie i tabletkowanie, mogą mieć krytyczny wpływ na właściwości fizyczne i mechaniczne tabletek. W następstwie tego typu obróbki, istnieje realna możliwość zaburzania rozpuszczalności leku oraz jego biodostępności, co w konsekwencji może zagrażać powodzeniu całej farmakoterapii. Kluczowym elementem tych procesów, obok substancji pomocniczych, jest woda, wygodne medium do przeprowadzania wszystkich procesów technologicznych, którą należy usunąć przed ostateczną formulacją tabletki. Podczas suszenia, woda jest zwykle usuwana przez wymuszone odparowanie za pomocą źródła ciepła, rzadziej stosuje się inne metody, jak np. sublimacja czy krystalizacja. Kontrola energii potrzebnej do usunięcia wilgoci z preparatu farmaceutycznego jest ważną kwestią dla zachowania odpowiednich właściwości farmakologicznych i fizykochemicznych leku. Odparowanie wody z prostych systemów nie

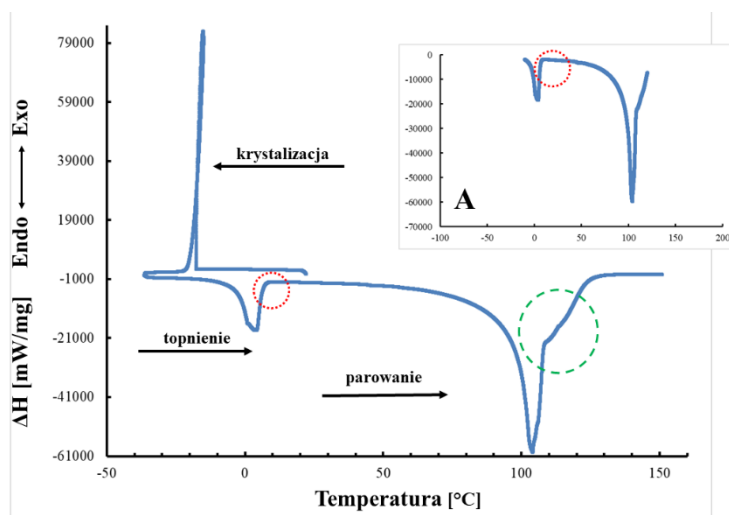
stanowi większego problemu, choć wciąż niewiele wiemy o usuwaniu jej z podłoża o silnym powinowactwie do wody.

Usuwanie wolnej wody typu FW, odbywa się w temperaturze do 100 °C. Jednak w temperaturze wyższej niż 100 °C parowanie wody może przebiegać dalej, zwłaszcza w układach zawierających, obok wody wolnej, zasób wody typu NFW. Zjawisko dwuetapowego parowania opisywał między innymi Hatakeyama i wsp. [42]. W swoich badaniach termogravimetrycznych (TG) autorzy doniesienia pokazali, że pierwszy etap tego procesu kończył się poniżej 100 °C, ale drugi przebiegał w zakresie od 147 °C do 197 °C. Zgodność wyników różnicowej analizy termicznej ze spadkiem masy uzyskanym przez TG, została potwierdzona w innych badaniach tego samego autora [43].

Tradycyjne podejście w badaniu uwodnionych struktur polimerowych polega na analizie wcześniej wspomnianych 3 frakcji wody NFW, FBW i FW. Metodą z wyboru jest różnicowa kalorymetria skaningowa DSC. Istnieją jednak alternatywne podejścia [22,26,44] związane z wyznaczaniem entalpii parowania wody (N_{ev}). W takim przypadku termin „entalpia parowania” ΔH definiuje się jako energię wymaganą do odparowania wody zaabsorbowanej przez uwodnioną strukturę polimeru. Zatem podobnie jak w przypadku zdolności wody do niezamarzania, wodę związaną z procesem parowania N_{ev} można uznać za wodę, która pozostaje w materiale w temperaturach znacznie przekraczających 100 °C, a nawet 140° C. Badanie entalpii parowania wody, było przedmiotem wcześniejszych doniesień, w których przebadano kilka powszechnie używanych w przemyśle farmaceutycznym polisacharydów, takich jak hialuronian, chitosan, schizophyllan, CMC 90 i 700 kDa oraz celuloza [22,26,44]. Z wyłączeniem hialuronianu, zależność ΔH od zawartości wody W_C wszystkich badanych próbek, była liniowa w całym zakresie stężeń. Jak sugerują Liu i wsp. [24], wartość współczynnika kierunkowego a w równaniu $\Delta H = f(W_C)$ ($y=a \times x + b$) jest bezpośrednio związana z entalpią parowania. Innymi słowy, im mniejsza wartość tego współczynnika, tym mniej energii potrzeba do odparowania wody z próbki. Dodatkowo, pula wody związanej, zwłaszcza niezamarzającej NFW, potrzebuje więcej energii do odparowania [45]. Podobnie, wartość wyrazu wolnego b z tego samego równania można uznać za ciepło uwalniane podczas procesu hydratacji.

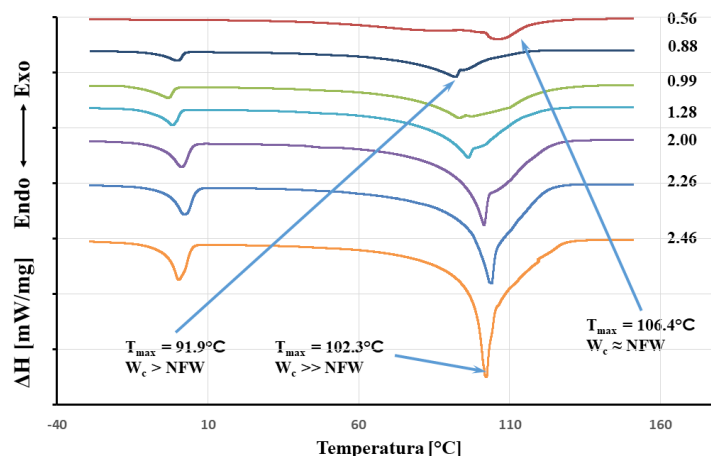
Celem niniejszej pracy było wyznaczenie zawartości oraz zweryfikowanie sposobu wiązania wody, biorącej udział w procesie odparowania (N_{ev}), uwodnionej hydroksypropylo celulozy o zróżnicowanej lepkości i masie molekularnej. W celu stwierdzenia w jaki sposób leki mogą modyfikować tę zawartość i sam proces parowania, obok surowych polimerów HPC, w badaniach użyto ich mieszaniny z modelowymi lekami o małych masach cząsteczkowych, prostej strukturze przestrzennej i zróżnicowanej rozpuszczalności, jakimi są kwas salicylowy i jego sodowa sól – salicylan sodu. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem omówionej we wstępie metody DSC. Integralną częścią pracy było wykazanie istotnego wpływu swoistych struktur nanoprzestrzennych na zdolność sporządzonych mieszanin do wiązania lub przetrzymywania wody. W związku z czym, otrzymane wyniki N_{ev} korelowano z obliczonymi w H1 zawartościami wody niezamarzającej NFW. Przedmiotem analizy był także wpływ silnie dysocjującego kationu Na^+ . Prezentowane badania miały charakter nowatorski.

Przedmiotem pomiarów DSC były, podobnie jak w publikacji **H1**, surowe hydroksypropylo celulozy a także ich mieszaniny dwuskładnikowe (1:1 m/m) z kwasem salicylowym SA i salicylanem sodu NaSA. Analogicznie, otrzymano 9 serii pomiarowych, które w tym przypadku zostały przebadane w mniejszym niż poprzednio zakresie stężeń W_C ; pomiędzy 0,2 g/g a 3,5 g/g. W każdej serii znajdowało się 12-16 próbek. Podobnie jak w poprzedniej serii badań, wszystkie pomiary DSC powtórzono trzykrotnie a dla wybranych próbek, które zmierzono co najmniej 5 razy, wyznaczono względne odchylenie standardowe %RSD. Pomiary DSC realizowano w perforowanych tyglach aluminiowych, przy użyciu następującego programu temperaturowego: 1 – chłodzenie od 20 °C do -40 °C z szybkością 5 °C/min; 2 – grzanie od -40 do 150 °C z szybkością 3 °C/min. Zamrożenie próbek przed zasadniczym pomiarem (etap 1 programu temperaturowego) miało na celu łatwiejszą identyfikację początku procesu parowania, który zaczyna się natychmiast po zakończeniu procesu topnienia. Zjawisko to, zaznaczone czerwonym okręgiem na Rysunku 5, jest charakterystyczne dla wszystkich badanych próbek i było przedmiotem analiz, opisanych także w innych publikacjach [22,45,46].



Rysunek 5. Przykładowa krzywa DSC, na której pokazano przebieg stosowanego programu temperaturowego. Czerwonym okręgiem zaznaczono obszar zakończenia procesu topnienia i natychmiastowe rozpoczęcie procesu parowania – na Rysunku 5A dodatkowo wyekspozowano i powiększono ten obszar. Zielony okrąg wskazuje sposób nakładania się 2 obszarów związanych z procesem parowania. Obserwowane właściwości krzywej DSC są charakterystyczne dla wszystkich badanych próbek.

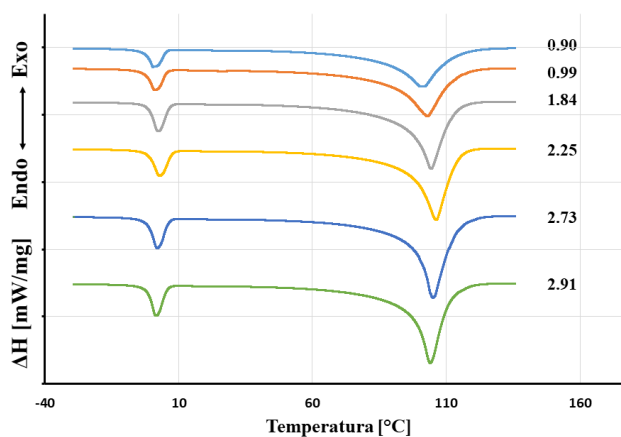
W trakcie dalszego ogrzewania niemieszanej hydroksypropylo celulozy, obserwowano dwa częściowo nakładające się piki parowania. Efekt ten zaznaczono zielonym okręgiem na Rysunku 5A. Takie nakładanie się 2 obszarów można także łatwo prześledzić na Rysunku 6, gdzie pokazano krzywe DSC próbek HPC typu HF, zarejestrowanych dla różnych zawartości wody W_c .



Rysunek 6. Szereg wybranych krzywych DSC procesu parowania wody zabsorbowanej na surowej HPC typu HF; wartości liczbowe przy każdej krzywej są związane ze stężeniem wody W_c ; NFW mieszaniny HPC/HF wynosi 0,51 g/g [H1].

Dla stężeń poniżej i około NFW (w tym przypadku 0,54 g/g [H1]), cała pula wody w matrycy uważana jest za niezamarzającą. Świadczy o tym widoczny tylko jeden pik parowania przy temperaturze maksymalnej $T_{\max}=106,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pochodzący właśnie od tej frakcji wody. Gdy zawartość wody w próbce znacząco przekroczyła zawartość NFW – $W_C = 0,88\text{ g/g}$ – pojawia się drugi pik przy $91,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, pochodzący od sumy wody wolnej FW i związanej zamarzającej FBW. Przy dalszym wzroście stężenia wody w próbce, pik należący do wody niezamarzającej NFW (wartość stała) zaczyna nakładać się na pik parowania sumy wody FBW i FW, po czym finalnie zostaje całkowicie zasłonięty przez tę składową – $W_C = 2,46\text{ g/g}$, $T_{\max}=102,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

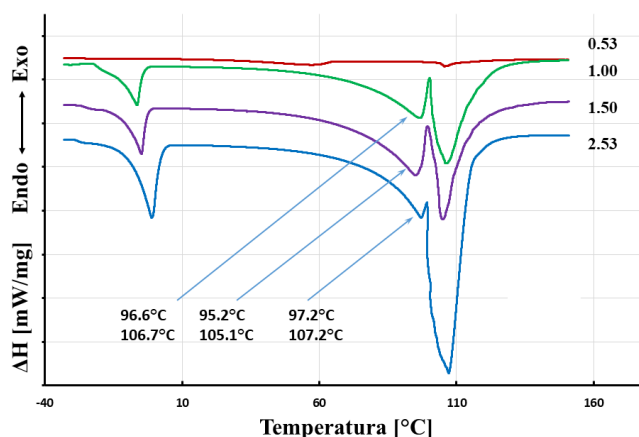
W grupie mieszanin HPC i kwasu salicylowego nakładanie się pików nie jest widoczne, co pokazano na Rysunku 7. Jak widać, w całym zakresie stężeń wody występuje tylko jeden (poza procesem topnienia) pik endotermiczny, związany z procesem parowania. Podobnie, jak dla wyjściowych typów HPC, parowanie rozpoczyna się przy $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ i kończy przy około $130\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Rysunek 7. Szereg wybranych krzywych DSC procesu parowania wody zabiorowanej w mieszaninie HPC z kwasem salicylowym; wartości liczbowe przy każdej krzywej są związane ze stężeniem wody W_C ; NFW mieszaniny HPC-HF/SA wynosi 0,17 g/g [H1].

Krzywe DSC uwodnionych mieszanin HPC z dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu charakteryzują się innym przebiegiem w porównaniu do surowych typów HPC lub ich mieszanin z kwasem salicylowym. Przedstawione na Rysunku 8 piki procesu parowania są

wyraźnie rozdzielone – wyraźniej niż to miało miejsce w przypadku ich niezmięszanych odpowiedników. Dla stężenia wody 0,53 g/g widoczny jest pojedynczy pik przy T_{max} około 105 °C – tak jak w poprzednich przypadkach, odpowiada on zajmowanej w pierwszej kolejności puli wody NFW. W miarę wzrostu stężenia wody ($W_C > 0,8$ °C) pojawiają się nowe piki przy około 95 °C, częściowo nałożone z głównym pikiem przy około 105 °C.



Rysunek 8. Szereg wybranych krzywych DSC procesu parowania wody zabsorbowanej w mieszaninie HPC z salicylanem sodu; wartości liczbowe przy każdej krzywej są związane ze stężeniem wody W_C ; NFW mieszaniny HPC-LF/SA wynosi 0,50 g/g [H1].

Otrzymane krzywe zależności $\Delta H = f(W_C)$ charakteryzowały się silną korelacją a współczynnik R^2 był zawarty w przedziale od 0,9869 do 0,9977 (Tabela 3).

Porównanie ilości wody związanej z procesem parowania N_{ev} niemieszanych typów HPC HF, MF, LF z zawartościami wody niezamarzającej NFW odpowiednio 0,51, 0,54, 0,54 g/g [H1] wskazuje, że zawartości NFW są znacznie większe oraz że nie są bezpośrednio związane zarówno z lepkością, jak i masą cząsteczkową polimeru.

Odmienne właściwości można zaobserwować w przypadku badanych mieszanin ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym. Zawartości wody N_{ev} i NFW odpowiednio 0,17, 0,18, 0,19 g/g dla HF/SA, MF/SA, LF/SA [H1] są w zasadzie porównywalne i tylko nieznacznie większe niż obliczone dla surowych polimerów.

Tabela 3. Zawartość wody otrzymanej w trakcie procesu odparowania wody z surowych HPC a także ich mieszanin ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym (SA) i bardzo dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu (NaSA); nN_{ev} oznacza liczbę cząsteczek wody przypadającą na jednostkę disacharydową HPC; * dla porównania przytoczono wartości N_{ev} polisacharydów zmierzone przez innych autorów [22].

typ HPC	N_{ev} [g/g]	nN_{ev}	NFW [g/g]	współczynniki regresji liniowej		R^2
				a	b	
HPC-HF	0.11	4.7	0.54	2723	-311	0.9977
HPC-HF/SA	0.15	6.4	0.54	2299	-335	0.9954
HPC-HF/NaSA	0.27	11.5	0.51	2296	-614	0.9961
HPC-MF	0.11	4.7	0.19	2392	-261	0.9927
HPC-MF/SA	0.12	5.1	0.18	2317	-273	0.9956
HPC-MF/NaSA	0.19	8.1	0.17	2231	-415	0.9943
HPC-LF	0.11	4.5	0.50	2553	-285	0.9869
HPC-LF/SA	0.11	4.5	0.48	2245	-241	0.9966
HPC-LF/NaSA	0.16	6.6	0.44	2450	-388	0.9933
*chitozan	1,06	20,1	0,37	-	-	-
*schizofylan	0,38	14,8	0,38	-	-	-
*hialuronian	0,3	6,7	0,77	-	-	-
*celuloza	0,2	3,4	0,77	-	-	-

W związku z tym, korzystając z toku rozumowania Miłcocha i wsp. [22] można stwierdzić, że badane mieszaniny tworzą struktury nanoprzestrzenne o znacznie większej średnicy niż te powstałe w surowym HPC. W takich warunkach woda niezamarzająca NFW składa się głównie z cząsteczek wody oddziałujących wiązaniami wodorowymi z grupami hydrofilowymi polimeru i w mniejszej części pochodzi od wody zamkniętej w tych przestrzennych pułapkach. W rzeczywistości, do zerwania wiązań wodorowych i uwolnienia cząsteczek wody z nanoprzestrzeni o małej średnicy (surowych HPC) potrzeba więcej energii niż do uwolnienia tych samych cząsteczek wody z nanoprzestrzeni o większej średnicy. Ponadto okazuje się, że liczba dostępnych nanoprzestrzeni jest ograniczona, ponieważ obecność kwasu salicylowego zwiększa ilość centrów hydrofobowych w mieszaninie.

Jak pokazano w Tabeli 3, mieszaniny HPC/NaSA wykazywały wyższą zawartość N_{ev} w porównaniu z surowymi próbkami HPC lub ich mieszkankami z SA. Jednocześnie, odpowiednie zawartości NFW są prawie równe zawartości obliczonej dla próbek niemieszanych, odpowiednio 0,44, 0,48, 0,50 g/g – HF/NaSA, MF/NaSA, LF/NaSA [H1]. Fakt ten należy wytłumaczyć silniejszym oddziaływaniem pomiędzy zdysocjowaną parą jonową kationów Na^+ a cząsteczkami wody uwięzionymi w nanoprzestrzeniach lub znajdującymi się w ich pobliżu.

Opisane powyżej zależności potwierdza również analiza współczynnika kierunkowego a z równania $\Delta H = f(W_C)$. Tak jak już wcześniej wspomniano, odpowiada on energii potrzebnej do odparowania wody z próbki. Jak pokazano w Tabeli 3, mieszaniny HPC z SA i NaSA charakteryzują się mniejszymi wartościami tego współczynnika, podobnie jak wartość wyrazu wolnego b z tego równania. Można zauważyć, że dla surowych próbek HPC i ich mieszanin z cząsteczkami kwasu salicylowego, ciepło hydratacji jest takie samo lub porównywalne. Jednak ciepło hydratacji obserwowane dla mieszanin HPC z salicylanem sodu jest prawie podwojone. Wyraźnie pokazuje to ilość energii uwalnianej podczas tworzenia nowych wiązań pomiędzy cząsteczkami Na^+ i wodą.

Porównując otrzymane wyniki z wartościami obliczonymi dla innych polisacharydów można zauważyć, że ilość wody związanej z procesem parowania N_{ev} dla wszystkich typów HPC i ich mieszanin z modelowymi lekami mieści się w zakresie od 0,11 do 0,19 g/g co może odpowiadać wartości 0,2 g/g obliczonej dla celulozy. Wyjątek stanowi mieszanina HPC z salicylanem sodu $N_{ev}=0,27$ g/g, która w ten sposób bardziej zbliża się do hialuronianu $N_{ev}=0,3$ g/g.

Osiągnięcia:

- przeprowadzono pomiary DSC parowania uwodnionych hydroksypropylo celuloz typu LF, MF i HF o zróżnicowanych masach cząsteczkowych i lepkości oraz obliczono zawartości wody związanej z procesem parowania N_{ev}

- w celu sprawdzenia wpływu leków o zróżnicowanej rozpuszczalności, przeprowadzono także odpowiednie pomiary DSC oraz obliczenia N_{ev} mieszanin HPC ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym i bardzo dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu

- w przypadku wszystkich badanych typów hydroksypropylo celulozy, wcześniej obliczone zawartości wody NFW [H1] są wynikiem zarówno interakcji z łańcuchami polimeru jak i zamknięcia części cząsteczek wody w strukturach nanoprzestrzennych

- znajduje to również potwierdzenie w analizie współczynnika kierunkowego a równania $\Delta H = f(W_C)$, który odpowiada energii potrzebnej do odparowania wody z próbki, i który jest znacząco większy w porównaniu do odpowiadających mu mieszanin HPC z SA i NaSA

- w przypadku badanych mieszanin HPC z modelowymi lekami, woda niezamarzająca NFW składa się głównie z cząsteczek wody oddziałujących wiązaniami wodorowymi z grupami hydrofilowymi polimeru i w mniejszej części pochodzącymi od wody zamkniętej w tych przestrzennych nanopułapkach

- nieco wyższą zawartość N_{ev} obliczoną dla mieszaniny HPC/NaSA można wytłumaczyć faktem silniejszego oddziaływania pomiędzy zdysocjowaną parą jonową Na^+ i cząsteczkami wody

- znajduje to również potwierdzenie w analizie wyrazu wolnego b z równania $\Delta H = f(W_C)$, odpowiadającego za ciepło hydratacji. Wartość tej wielkości w przypadku mieszaniny HPC/NaSA jest prawie dwukrotnie większa w porównaniu do analogicznych mieszanin HPC/SA i niemieszanej HPC.

H3 Talik P, Piotrowska J, Hubicka U. The Influence of Viscosity and Non-freezing Water Contents Bounded to Different Hydroxypropyl Celluloses (HPC) and Hydroxypropyl Methylcelluloses (HPMC) on Stability of Acetylsalicylic Acid. AAPS PharmSciTech. 2019;20:187.

Stabilność chemiczna jest ważnym czynnikiem jakości leku, ponieważ bezpośrednio wiąże się ze skutecznością i bezpieczeństwem farmakoterapii. W przypadku większości leków, stabilność całego produktu leczniczego zależy nie tylko od właściwości fizykochemicznych samego aktywnego składnika farmaceutycznego (API), ale także od składu i/lub formulacji w jakim się znajduje. Nieaktywne składniki uzupełniające, mają za zadanie stabilizować substancję czynną, podczas gdy w rzeczywistości mogą z nią oddziaływać bezpośrednio albo pośrednio, modyfikując rozpuszczalność lub inne właściwości fizykochemiczne. W konsekwencji może to prowadzić do ograniczenia biodostępności i skuteczności farmakoterapii. Najczęściej spotykanym mechanizmem degradacji leku jest hydroliza,

utlenianie i redukcja, rzadziej fotoliza [47]. Jednak w wieloskładnikowych układach heterogenicznych, degradacja API może mieć przebieg bardziej złożony a często mieszany. W trakcie wieloetapowego procesu może na przykład dochodzić do hydrolizy z dalszym lub jednoczesnym utlenianiem. Obserwowane są także procesy przebiegające w odwrotnej kolejności, to jest hydroliza produktów wcześniejszego utlenienia [47]. Ze względu na budowę estrową, jako modelowy lek w tego typu badaniach, często stosuje się łatwo hydrolizujący kwas acetylosalicylowy (ASA) [48,49].

Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami wody a związkami o budowie polisacharydowej silnie modyfikują zarówno właściwości samej wody, jak i struktury przestrzenne polimeru. Różnorodność zachowania wody może być związana z efektem kondensacji kapilarnej [50] oraz z obecnością nanoprzestrzeni [16], które są w stanie zatrzymywać w swoistych pułapkach cząsteczki wody, silnie oddziałujące z grupami polarnymi polimeru. Takie interakcje mogą być wynikiem bezpośredniego wiązania z łańcuchem polimeru *via* wiązanie wodorowe lub za pośrednictwem innej cząsteczki wody. W związku z powyższym, badanie związku między zawartością wody niezamarzającej NFW a lepkością, jego wpływu na stabilność API, może być kluczowe dla lepszego zrozumienia mechanizmów rozpuszczania i uwalniania leku z preparatów stosowanych w postaci tabletkowych.

Celem pracy było zbadanie wpływu lepkości oraz zawartości wody niezamarzającej NFW na stabilność kwasu acetylosalicylowego w mieszaninach z półsyntetycznymi celulozami o zróżnicowanej budowie strukturalnej HPC i HPMC. Tego typu zależności nie były dotychczas przedmiotem publikacji i mają charakter innowacyjny.

Ze względu na duże zróżnicowanie półsyntetycznych celuloz, zarówno pod względem masy cząsteczkowej, jak i lepkości; do dalszych badań wykorzystano hydroksypropylo celulozę (HPC) i hydroksypropylometylo celulozę (HPMC) o lepkościach odpowiednio 126 cP, 6300 cP, 3 cP i 100000 cP. Stężenia wody NFW badano wcześniej omówioną metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC [H1, H2]. Przyspieszony test stabilności, przeprowadzono w komorze klimatycznej w temperaturze 40 °C i wilgotności względnej 75 %, przez 5 tygodni. Spadek zawartości ASA, któremu towarzyszył stechiometryczny wzrost zawartości kwasu salicylowego (SA), badano w odstępach tygodniowych, za pomocą spektrofotometrii UV-Vis [51].

Obliczone zawartości silnie związanej niezamarzającej wody NFW, zarówno w surowych polisacharydach, jak i w ich w mieszaninach 1:1 (m/m) z kwasem acetylosalicylowym, przedstawiono w Tabeli 4. Uzyskane wyniki wskazują, że dla bardzo znaczących różnic lepkości HPMC, rzędu 3 cP vs 100000 cP, zawartość NFW maleje z odpowiednio 0,49 g/g do 0,42 g/g. Podobnego efektu nie obserwuje się dla mniej znaczących różnic lepkości HPC rzędu 126 cP i 6300 cP, o których była mowa w **H1**.

Tabela 4. Zawartość niezamarzającej wody NFW obliczona dla czystych celuloz HPMC i HPC oraz ich mieszanin z kwasem acetylosalicylowym (1:1 m/m). *W celach porównawczych dołączono wartości NFW obliczone dla hydroksypropylo celuloz LF i MF oraz ich mieszanin z kwasem salicylowym SA (1:1 m/m) [**H1**].

rodzaj/typ polimeru (lepkość [cP])	współczynniki równania prostej ($\Delta H = a \times W_c + b$); a ; b	R ²	NFW [g/g]
HPMC(3)	316,9; -154,9	0,9959	0,49
HPMC(100000)	295,7; -125,6	0,9980	0,42
HPC-LF(126)*	–	–	0,54*
HPC-MF(6300)*	–	–	0,54*
HPC-LF(126)/SA*	–	–	0,19*
HPC-MF(6300)/SA*	–	–	0,18*
HPMC(3)/ASA	331,7; -85,6	0,9945	0,21
HPMC(100000)/ASA	332,5; -108,8	0,9960	0,33
HPC-LF(126)/ASA	297,9; -37,5	0,9890	0,23
HPC-MF(6300)/ASA	341,3; -95,4	0,9953	0,28

Analiza wyników, dla mieszanin zarówno HPC, jak i HPMC, pozwala stwierdzić, że zawartości NFW rosną wraz ze wzrostem lepkości, niezależnie od budowy chemicznej polisacharydu. W porównaniu do mieszanin HPC z kwasem salicylowym (zarówno kwas salicylowy jak i acetylosalicylowy są lekami trudno rozpuszczalnymi w wodzie), mieszaniny HPC z kwasem acetylosalicylowym charakteryzują się znacznym wzrostem zawartości NFW dla obydwu typów HPC: z 0,18 g/g na 0,23 g/g i z 0,19 g/g na 0,28 g/g, odpowiednio dla typu LF i MF. Postuluje się, że może mieć to związek z obecnością grup acetylowych, zdolnych do generowania kolejnych struktur nanoprzestrzennych, w których lokują się cząsteczki wody NFW.

Kolejna część badań polegała na pomiarze stopnia degradacji hydrolitycznej ASA. W tym przypadku, wpływ struktury chemicznej badanych polimerów mógł być wyraźnie dostrzeżony (Tabela 5).

Tabela 5. Porównanie zawartości NFW ze stężeniem kwasu acetylosalicylowego ASA w mieszaninie polisacharyd/ASA, po 5 tygodniach trwania eksperymentu w komorze klimatycznej – 40 °C i 75 % RH.

rodzaj/typ polimeru	NFW	zawartość ASA [%]
	g _{H2O} /g _{suchej_masy}	po 5 tygodniach
HPMC 100k/ASA [cP]	0,33	93,70
HPMC 3/ASA [cP]	0,21	89,00
HPC MF 6300/ASA [cP]	0,28	85,95
HPC LF 126/ASA [cP]	0,23	85,05
ASA	–	100,00

W grupie mieszanin HPC, gdzie lepkość polimerów różniła się o jeden rząd wielkości (126 vs 6300 cP), stężenie ASA po 35 dniach trwania eksperymentu było porównywalne i równe około 85% początkowej zawartości – NFW różniły się 0,05 g/g. W grupie HPMC lepkości różniły się o pięć rzędów wielkości (3 vs 100k cP). W przypadku tych układów, hydroliza ASA była znacznie niższa. Najwyższą zawartość ASA (93,7%) stwierdzono dla matrycy o wysokiej lepkości i wysokiej zawartości NFW. Oznacza to, że obserwowany wzrost ilości wody związanej NFW w stosunku do ilości pozostałych frakcji wody, zdecydowanie ogranicza mobilność wody. W efekcie, hydroliza kwasu acetylosalicylowego była wyraźnie wolniejsza.

Osiągnięcia:

- w bieżących badaniach nad hydroksypropylometrylo celulozami zaobserwowano, że polimery o niskiej lepkości (3 cP) posiadają większą zdolność lokowania silnie związanej wody NFW (NFW = 0,49 g/g) niż ich odpowiedniki o lepkości większej o blisko 5 rzędów wielkości (NFW = 0,42 g/g)

- w poszczególnych grupach strukturalnych uwodnionych mieszanin kwasu acetylosalicylowego, zarówno z HPC jak i z HPMC, dominuje efekt odwrotny - wraz ze wzrostem lepkości wzrasta zawartość NFW

- w porównaniu do mieszanin HPC/SA, mieszaniny HPC/ASA charakteryzują się znacznym wzrostem zawartości NFW dla obydwu typów LF i MF – sugeruje się, że może mieć to związek

z obecnością grup acetylowych, zdolnych do generowania kolejnych struktur nanoprzestrzennych, w których lokują się cząsteczki wody NFW

- mieszaniny HPMC/ASA o lepkości 100000 cP, które mają dużą zdolność wiązania wody z grupami hydroksylowymi łańcuchów polimerowych (NFW = 0,33 g/g), znacznie ograniczają udział wody w reakcjach hydrolizy – zaledwie 6,3% powstającego kwasu salicylowego

- układy HPMC/ASA o lepkości 3 cP, wyraźnie zwiększają efekt hydrolizy – do 11% powstającego kwasu salicylowego

- dla mieszanin HPC/ASA nie obserwowano podobnej zależności, ponieważ bardzo wysokie zaawansowanie procesów hydrolitycznych, rzędu 15%, oznaczono dla obydwu badanych typów MF i LF

H4 Talik P, Piwowarczyk J, Muszyńska B, Hubicka U. DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured in vitro mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried Boletus badius, Agaricus bisporus and Cantharellus cibarius. J Therm Anal Calorim. 2021;143:3525–3532.

Diagram fazowy żywności jest rodzajem wykresu identyfikującego i wizualizującego różne zachowania żywności, w zależności od zawartości wody i temperatury. Celem sporządzania diagramów jest dobór optymalnych warunków przetwarzania i dalszego przechowywania liofilizowanych produktów spożywczych, przy zachowaniu ich jak najwyższej jakości. Idea diagramu fazowego łączy koncepcje aktywności wody i przejścia szklanego T_g . Metoda została prawdopodobnie użyta po raz pierwszy przez Levine'a i wsp. [52] a następnie zmodyfikowana przez Rahmana [53]. Jednym z ważniejszych elementów diagramu jest zawartość silnie związanej wody niezamarzającej NFW [54-58]. Zaobserwowano, że zawartość frakcji NFW wyraźnie wzrasta, gdy w strukturze mieszaniny polimerowej, a za taką można uznać materiał owocnika grzybowego, obecne są kationy metali [H1]. W związku z tym, niezwykle interesującym mogła być korelacja średniej zawartości kationów jedno- i dwuwartościowych z zawartością NFW w badanym materiale. Jak już wspomniano w części wstępnej, jonem sprzyjającym adsorpcji wody jest Li^+ , a następnie, w kolejności malejącej wydajności Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i H^+ .

Generalnie, przechowywanie żywności wiąże się z jej wstępną obróbką. Bardzo często towarzyszy temu odparowanie wody podczas suszenia termicznego, rzadziej stosuje się inne metody, takie jak sublimacja. Usuwanie wolnej wody odbywa się w temperaturze do 100 °C. Niemniej, wcale nie oznacza to jej całkowitego usunięcia. W temperaturze wyższej niż 100 °C można zaobserwować kolejny etap parowania, tym razem wody silnie związanej z łańcuchami polimerowymi przez grupy hydrofilowe, lub zamkniętymi w nanoprzestrzeniach, tak jak ma to miejsce w przypadku próbek zawierających zarówno wodę niezamarzającą NFW, jak i pozostałe jej frakcje. W ten sposób, parowanie wody może być dodatkowym źródłem charakteryzowania właściwości uwodnionych materiałów grzybowych a także ich zdolności do zatrzymywania wody, czego istotność wykazano w publikacji **H2**. Ponadto postuluje się, że zawartość N_{ev} mogłaby stanowić użyteczne uzupełnienie diagramu fazowego w części opisującej parowanie wody z fazy ciekłej i stałej. Rahman zilustrował ten odcinek odpowiednimi liniami MD i DP - [53 - Rys. 1].

Wybrane gatunki grzybów jadalnych *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*, zarówno z kultur *in vitro*, jak i pochodzenia naturalnego, znane są jako cenne źródło witamin (zwłaszcza ryboflawina, ergokalcyferol), biopierwiastków (m.in. selen, magnez, miedź, żelazo, wapń, cynk i potas) [59-61] oraz substancji antyoksydacyjnych (fenole, flawonoidy, terpeny, steroidy, karotenoidy) [62,63]. Z tego powodu, dla utrzymania ich stabilności chemicznej i mikrobiologicznej w procesie przetwarzania, niezbędne są optymalne dane dotyczące warunków zarówno suszenia, jak i zamrażania.

*Celem pracy było wyznaczenie zawartości wody niezamarzającej NFW oraz wody związanej z procesem parowania N_{ev} w wybranych gatunkach liofilizowanych grzybnii z hodowli *in vitro* oraz komercyjnie dostępnych; *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*. W badaniach zastosowano wcześniej opublikowaną metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej [H1, H2]. Zaplanowano przeprowadzenie analizy wpływu kationów jedno- i dwuwartościowych na stężenia obliczonych NFW i N_{ev} a także wpływu obecności struktur nanoprzestrzennych na te właściwości. Badania owocników pochodzących z kultur *in vitro*, z zastosowaniem opisanej metody DSC, miało charakter nowatorski i nie było jak dotychczas przedmiotem publikacji.*

Zawartość wody niezamarzającej NFW obliczona dla wszystkich badanych próbek grzybów wahała się od 0,19 do 0,31 g/g – Tabela 6.

Tabela 6. Zawartości wody NFW w wybranych gatunkach liofilizowanych grzybnii z hodowli *in vitro* oraz komercyjnie dostępnych *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*.

gatunek grzyba	pochodzenie naturalne lub hodowlane			<i>in vitro</i> mycelium		
	współczynnik <i>a; b</i>	R ²	NFW	współczynnik <i>a; b</i>	R ²	NFW
<i>Boletus badius</i>	356.3; -82.8	0.9977	0.23	364.0; -69.7	0.9978	0.19
<i>Cantharellus cibarius</i>	361.5; -78.3	0.9962	0.22	400.6; -103.5	0.9970	0.26
<i>Agaricus bisporus</i>	384.5; -117.6	0.9982	0.31	369.5; -71.8	0.9982	0.19

Najwyższą wartość NFW uzyskano dla owocników *A. bisporus* (0,31 g/g) pochodzenia naturalnego a obliczone stężenie bardzo dobrze odpowiada wartości 0,30 g/g otrzymanej przez Guizani i wsp. [56]. Stężenia NFW obliczone dla *B. badius* i *C. Cibarius*, w tej samej grupie grzybów handlowych, były mniejsze i wynosiły odpowiednio 0,23 i 0,22 g/g. Zjawisko to znajduje wytłumaczenie w jakości i ilości rozpuszczonych kationów metali wchodzących w skład podłoża (leśnego lub szklarniowego) na którym zachodziła wegetacja, a które odgrywają kluczową rolę w badanych procesach formowania się wody NFW. Fakt, że grzyby potrafią akumulować pierwiastki jest przedmiotem doniesień literaturowych [61,64]. Najważniejsze pierwiastki to K, P, Mg, Ca, Na, Zn, Cu, Mn, Ni i Co. Pierwsze trzy metale występują na poziomie mg/g suchej masy (SM), natomiast Na, Zn, Ca, Fe, Cu, Mn występują w µg/g SM [61,64]. W badanych procesach powstawania wody NFW największe znaczenie będą miały kationy występujące w stężeniach rzędu mg/g SM.

Fakt, że najwyższe łączne stężenie zarówno potasu, magnezu, jak i sodu występuje u *A. bisporus* – 61,75 mg/g SM vs 57,63 i 44,85 mg/g SM odpowiednio dla *C. Cibarius* i *B. badius* – pozwala zrozumieć, dlaczego gatunek ten wyróżnia się najwyższą zawartością frakcji NFW. Co ciekawe stwierdzono, że stężenie NFW w grzybnii pochodzącej z kultur *in vitro* wynosiła tylko 0,19 g/g, podczas gdy najwyższą wartość obliczono dla *C. cibarius* 0,26 g/g. Obserwację tę należy łączyć z wyższą, w porównaniu z innymi gatunkami, całkowitą zawartością dwuwartościowych kationów Mg, Zn, Cu oraz Fe, który dodatkowo może występować także jako jon trójwartościowy – 1,14 mg/g SM vs. 0,76 mg/g i 0,89 mg/g SM, odpowiednio dla *A. bisporus* i *B. badius*.

Zawartości NFW obliczone dla innych surowców spożywczych, takich jak owoce, warzywa, mięso, ryby i pieczywo, charakteryzują się dużym zróżnicowaniem. Dla porównania, NFW marchwi wynosi tylko 0,08 g/g [65], makreli kawali aż 0,37 g/g [66] – znacznie więcej niż mięsa renifera 0,15 g/g [65]. Zdolność do zatrzymywania wody w stanie niezamarzającym przez warzywa (z wyjątkiem marchwi) w stanie niezamarzającym waha się od 0,20 g/g dla czosnku w proszku [67], do 0,32 g/g dla brokułów [68] i jest znacznie wyższa niż w przypadku powszechnie uprawianych owoców, których NFW najczęściej pozostaje w zakresie od 0,16 g/g dla malin [69] i mango [70] do 0,27 g/g dla ananasa [70].

W porównaniu do wody niezamarzającej NFW, wpływ jonów na zawartość wody związanej z procesem parowania N_{ev} wiąże się z innym mechanizmem. Průšová i wsp. [26] wskazała, że obecność jonów o stałym promieniu atomowym i ładunku, działa „usztyniająco” na strukturę uwodnionej matrycy polimerowej. Potwierdzają to wcześniejsze badania [16], w których pokazano wpływ wielkości struktur nanoprzestrzennych na charakter i ilość wody w niezamarzających warstwach. Dzięki obecności jonów, zwłaszcza dwu- i trójwartościowych, każda nanoprzestrzeń ma stabilną średnicę. Im więcej kationów, tym więcej nanoprzestrzeni o stałej średnicy. Innymi słowy, jeśli przekrój tych struktur jest wystarczająco mały, to tak wygenerowana pułapka może mocniej zatrzymywać cząsteczki wody. Wskazuje na to większa entalpia parowania. W sytuacji odwrotnej, entalpia parowania jest odpowiednio mniejsza, gdyż cząsteczki wody mogą łatwiej desorbować.

W grupie grzybów z kultur *in vitro* lub pochodzenia naturalnego, otrzymane wartości N_{ev} były porównywalne i wynosiły 0,08, 0,09 i 0,07 g/g odpowiednio dla *Boletus badius*, *Cantharellus cibarius* i *Agaricus bisporus* (Tabela 7).

Tabela 7. Zawartości wody N_{ev} w wybranych gatunkach liofilizowanych grzybnii z hodowli *in vitro* oraz komercyjnie dostępnych *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*.

gatunek grzyba	pochodzenie naturalne lub hodowlane			<i>in vitro</i> mycelium		
	współczynnik $a; b$	R^2	N_{ev}	współczynnik $a; b$	R^2	N_{ev}
<i>Boletus badius</i>	2525.7; 209.7	0.9952	0.08	2538.7; 116.4	0.9975	0.05
<i>Cantharellus cibarius</i>	2292.8; 208.8	0.9971	0.09	2491.9; 222.9	0.9958	0.09
<i>Agaricus bisporus</i>	2532.9; 180.7	0.9970	0.07	2282.0; 298.7	0.9973	0.13

Analiza tych zawartości prowadzi do wniosku, że struktura wewnętrzna łańcuchów polisacharydowych grzybnii, w połączeniu ze stężeniem kationów i stosunkowo niskimi

wartościami NFW, sprzyja łatwej desorpcji cząsteczek wody z matrycy. Wyłączając *A. bisporus*, w grupie grzybni pochodzących z kultur *in vitro* otrzymano zbliżone wartości N_{ev} 0,05 g/g i 0,09 g/g odpowiednio dla *B. badius* i *C. cibarius*. Dlatego szczególna pozycja *A. bisporus*, dla którego N_{ev} obliczono na 0,13 g/g, jest przykładem potwierdzającym poprawność zaobserwowanych już wcześniej zależności. *A. bisporus* charakteryzował się najwyższą sumaryczną zawartością kationów, a także największym stężeniem NFW.

Osiągnięcia:

- wyznaczono zawartości wody niezamarzającej NFW oraz wody związanej z procesem parowania N_{ev} w wybranych gatunkach liofilizowanych grzybni z hodowli *in vitro* oraz komercyjnie dostępnych *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*

- liofilizowane grzybnie z hodowli *in vitro* *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius* oraz komercyjnie dostępne *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius* były przedmiotem takich badań po raz pierwszy

- do badań zaimplementowano, również po raz pierwszy, metodę DSC, która wcześniej bardzo dobrze sprawdzała się w badaniu polimerów o budowie polisacharydowej oraz ich mieszanin z lekami o zróżnicowanej rozpuszczalności (**H1-H2**)

- uzyskane wyniki NFW były zróżnicowane i silnie zależne od gatunku grzyba, pochodzenia (grzybnia *in vitro* lub hodowlana) oraz zawartości kumulowanych jonów metali – stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości kationów wzrastało stężenie NFW

- zmierzone zawartości N_{ev} były niskie dla wszystkich badanych próbek, co sugeruje, że niezamarzająca woda składa się głównie z cząsteczek wody oddziałujących z miejscami sorpcji, które nie są uwięzione w strukturach nanoprzestrzennych – wyjątek stanowi *Agaricus bisporus*

- pokazano użyteczność wyznaczania N_{ev} dla oceny wpływu obecności nanoprzestrzeni w powstawaniu NFW

- mając na uwadze duże znaczenie dla przemysłu spożywczego, obliczone zawartości NFW i N_{ev} mogą znaleźć konkretne zastosowanie przy wykreślaniu diagramów fazowych, dla określenia optymalnych warunków przetwarzania i dalszego przechowywania liofilizowanych postaci grzybów *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* oraz *Cantharellus cibarius*

- w grupie badań owocników pochodzących z kultur *in vitro*, zastosowanie opisanej metody DSC miało charakter nowatorski i nie było jak dotąd przedmiotem publikacji.

H5 Talik P, Moskal P, Proniewicz LM, Weselucha-Birczyńska A. U. The Raman spectroscopy approach to the study of Watere-Polymer interactions in hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC). J Mol Struct. 2020;1210:128062.

Na tym etapie zaplanowanego cyklu badań, było bardzo interesującym sprawdzić, czy istnieje kompatybilność pomiędzy stosowaną metodą DSC a innymi analitycznymi metodami instrumentalnymi. Spośród tych, które obok metod termooanalitycznych mają zastosowanie w badaniu wody związanej, w części wstępnej wymieniłem m.in. magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) [17,18], rezonans magnetyczny (MRI) (magnetic resonance imaging) [19], reflektometria TDR [17] oraz metody spektroskopowe IR i Ramana [9,20,21]. Moją uwagę zwróciła jednak praca Mority i wsp. [21], w której autorzy wykazali istnienie 3 badanych przeze mnie typów wody: NFW, FBW i FW. Eksperyment wykonano techniką ATR-IR (*Attenuated Total Reflectance* - spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni). W grupie metod spektroskopowych istotną rolę pełni także spektroskopia Ramana. Metoda ta, będąca uzupełnieniem spektroskopii w podczerwieni (IR), pozwala także badać uporządkowania bliskiego zasięgu. Jednak w przeciwieństwie do IR, spektroskopia Ramana lepiej sprawdza się w badaniu próbek w środowisku wodnym [20].

Spektroskopia Ramana jest obecnie jedną z najsilniej rozwijających się metod, służącą identyfikacji wielu substancji czynnych oraz weryfikacji tożsamości surowców chemicznych o szczególnym znaczeniu dla farmacji, takich jak leki, substancje uzupełniające pochodne celulozy, a także substancje nieorganiczne o złożonej strukturze krystalicznej, w tym polimorficznej. Technika ta może być używana do badania leków we wszystkich postaciach jak np. maści, hydrożele, kremy, a także oceny dystrybucji aktywnego składnika farmaceutycznego API. W przemyśle farmaceutycznym doskonałym przykładem zastosowania tej odmiany spektroskopii jest monitorowanie procesów wytwarzania stałych postaci leku, takich jak mieszanie, granulacja, tabletkowanie, powlekanie oraz analiza ich jednorodności.

Wymienione, niekwestionowane zalety spektroskopii Ramana, pośród dostępnych metod instrumentalnych, zdecydowały o wykorzystaniu jej właśnie w dalszym etapie zaplanowanego cyklu badań. Jako substancję modelową, postanowiono wykorzystać uwodnione hydroksypropylo celulozy typu MF.

Fundamentem, na jakim oparto plan badawczy, były wspomniane doniesienia Mority i wsp. [21] oraz Guido i wsp. [71]. W pierwszym z nich, autorzy przyporządkowali charakterystyczne częstotliwości przy około 3600, 3400 i 3200 cm^{-1} (akrylan 2-metoksyetylowy) do poszczególnych frakcji wody NFW, FBW i FW. Z podsumowania drugiej pracy wynika, że stężone wodne roztwory HPC wykazują właściwości optyczne typowe dla cholesterycznych ciekłych kryształów [71]. W temperaturze pokojowej, stężenie krytyczne dla tworzenia mezofazy mieści się w zakresie 36–42% wag., co odpowiada W_C w zakresie 1,78–1,38 g/g. Z tego powodu, przy stężeniu wody poniżej tego zakresu należy się spodziewać jej właściwości anizotropowych. W obrębie tych stężeń, strukturę można uznać za bifazową, a przy stężeniu wyższym izotropową [71].

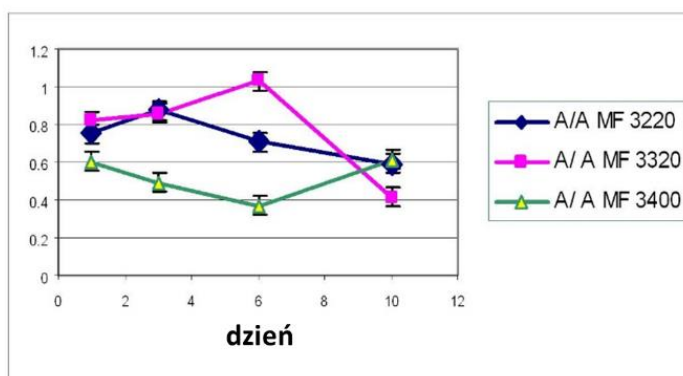
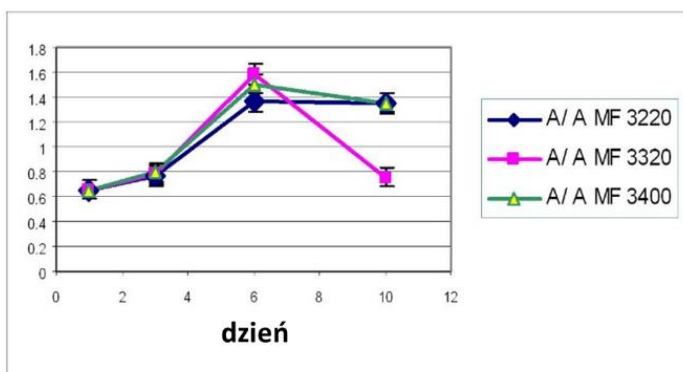
Celem niniejszej pracy było potwierdzenie, czy istnieje korelacja pomiędzy stosowaną w prezentowanym cyklu badań metodą DSC a metodą spektroskopii Ramana. Dla zrealizowania tego zamiaru, analizie zachodzących interakcji poddano uwodnione hydroksypropylo celulozy typu MF, w stężeniach wody odpowiadających właściwościom anizotropowym, bifazowym i izotropowym. Ponadto podjęto próbę przyporządkowania charakterystycznych częstotliwości widma Ramana poszczególnym frakcjom wody NFW, FBW i FW.

Zgodnie z sugestiami Mority i wsp. [21], w analizie skupiono się na obszarze pasm odpowiadającym drganiom rozciągającym O–H od 3600 do 3000 cm^{-1} . Dodatkowo przeanalizowano zmiany w zakresie wiązania glikozydowego 1235–1000 cm^{-1} oraz w zakresie 3000–2850 cm^{-1} , co odpowiada zmienności drgań rozciągających CH grup CH_2 i CH_3 . Jako szczególnie czuły wskaźnik zmian zachodzących w badanym układzie skoncentrowano się również na analizie stosunku natężenia asymetrycznych drgań rozciągających CH metylenu i symetrycznych drgań rozciągających CH_3 [72]. Przedmiotem badań były próbki o stężeniach wody $W_C = 0,69$ g/g, 1,41 g/g (2,6 razy więcej niż zawartość NFW) oraz 2,17 g/g (4 razy więcej niż zawartość NFW), co odpowiada odpowiednio strukturze anizotropowej, bifazowej i izotropowej [71]. Każdą z próbek, o podanej wartości współczynnika W_C sezonowano, po czym aby zbadać kinetykę interakcji, pomiary powtarzano w czterech kilkudniowych segmentach czasowych.

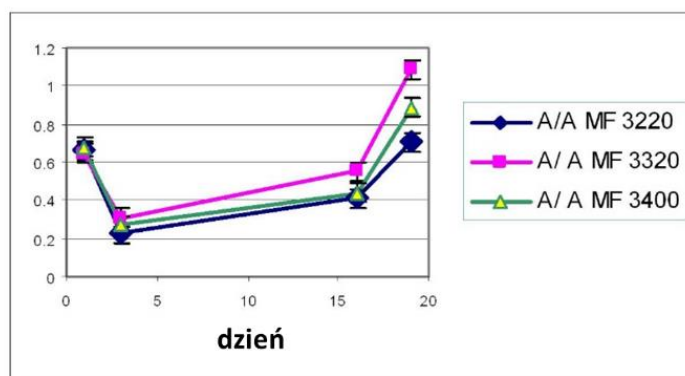
Analiza widma w zakresie 3600–3100 cm^{-1} , doprowadziła do identyfikacji 3 pasm przy 3400 cm^{-1} , 3320 cm^{-1} i 3220 cm^{-1} , które następnie przypisano poszczególnym frakcjom wody,

odpowiednio NFW, FBW i FW. Całkowita intensywność każdego z tych pasm była ewaluowana jako integralna intensywność odpowiedniego pasma w stosunku do integralnej intensywności pasma suchego HPC.

Dla niskiego stężenia wody równego $W_C = 0,69$ g/g (Rysunek 9A), co w przybliżeniu może odpowiadać zawartości NFW = 0,54 g/g, obserwowano spadek ilości wody wolnej FW po 3 dniu pomiarów, czemu towarzyszył gwałtowny wzrost zawartości zamarzającej wody FBW do dnia 6. Po tym czasie (6 dni), obserwowano spadek obydwu badanych frakcji wody przy jednoczesnym wzroście stężenia NFW. Wskazuje to, że zasadnicza stabilizacja układu, polegająca na tworzeniu charakterystycznych dla NFW silnych wiązań wodorowych, jest procesem przesuniętym w czasie. Potwierdzają to również obserwacje Ping i wsp. [9], z których wynika że dla niskiej zawartości wody (zbliżonej do NFW), cała woda znajdująca się w matrycy jest uważana za niezamarzającą NFW.

A**B**

C

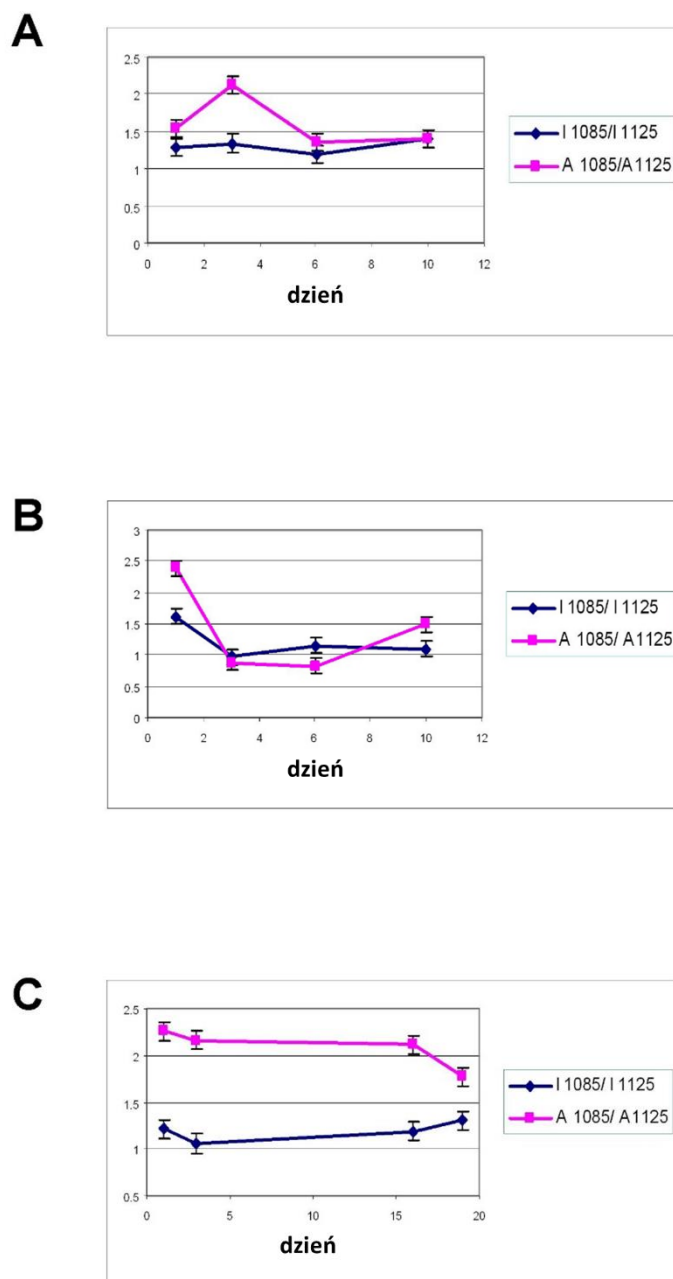


Rysunek 9. Stosunek intensywności: woda wolna (FW; 3220 cm^{-1}), woda związana zamarzająca (FBW; 3320 cm^{-1}) i woda niezamarzająca (NFW; 3400 cm^{-1}) pasma O–H w HPC/H₂O A) $W_C = 0,69\text{ g/g}$, B) $1,41\text{ g/g}$ i C) $2,17\text{ g/g}$, w stosunku do odpowiednich pasm w suchym polimerze HPC-MF.

Dla stężeń wody przekraczających 2,6-krotnie zawartość NFW ($W_C = 1,42\text{ g/g}$) stężenie wszystkich rodzajów wody wzrasta równomiernie – Rysunek 9B. Jednak po 6 dniach, gdy stężenia wody NFW i FW osiągają *plateau*, zawartość wody FBW spada. Sugeruje to, że wzajemne ułożenie łańcuchów polimerowych stwarza stabilne warunki dla obecności NFW także w nanoprzestrzeniach, a zamarzająca woda FBW jest mniej zaangażowana w stabilizację przestrzennej struktury polimeru.

Dla próbki o $W_C = 2,17\text{ g/g}$ obserwowany jest w początkowej fazie, spadek stężenia wszystkich typów wody – Rysunek 9C. Okres stabilizacji wynoszący około 10 dni, po którym następuje dalszy wzrost stężenia, może być związany z przejściem próbki ze struktury anizotropowej do izotropowej. W tym przypadku przejściu towarzyszy mikroseparacja grup hydrofobowych, co jest pierwszym etapem dwuetapowego procesu żelowania. Drugi etap odpowiada rozdzieleniu faz regionów bogatych w polimer (zdehydratowanym) i regionów bogatych w wodę (spęczniałym).

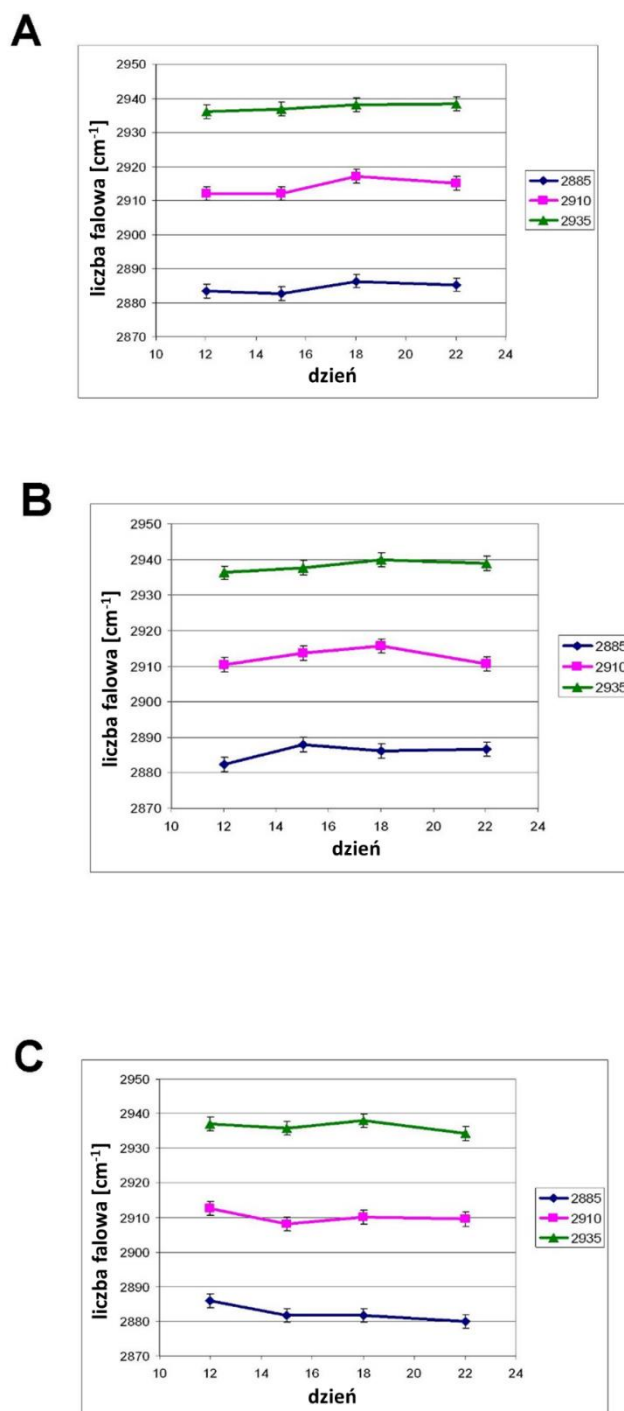
Zmiany strukturalne i modyfikacje pierścienia glukopiranozy podczas wchłaniania wody odzwierciedlają zmiany w stosunkach intensywności pasma od 1085 cm^{-1} do 1125 cm^{-1} (Rysunek 10). Szczególnie wrażliwe na symetrię otoczenia jest pasmo 1085 cm^{-1} ze względu na asymetryczne drgania rozciągające C–O–C [73,74]. Dla $W_C = 0,69\text{ g/g}$ stabilizacja w obrębie drgań pierścienia ustala się po kilku dniach, podczas gdy dla pozostałych dwóch stężeń $1,42\text{ g/g}$ i $2,17\text{ g/g}$ odkształcenia te wydają się zachodzić przez cały czas trwania eksperymentu.



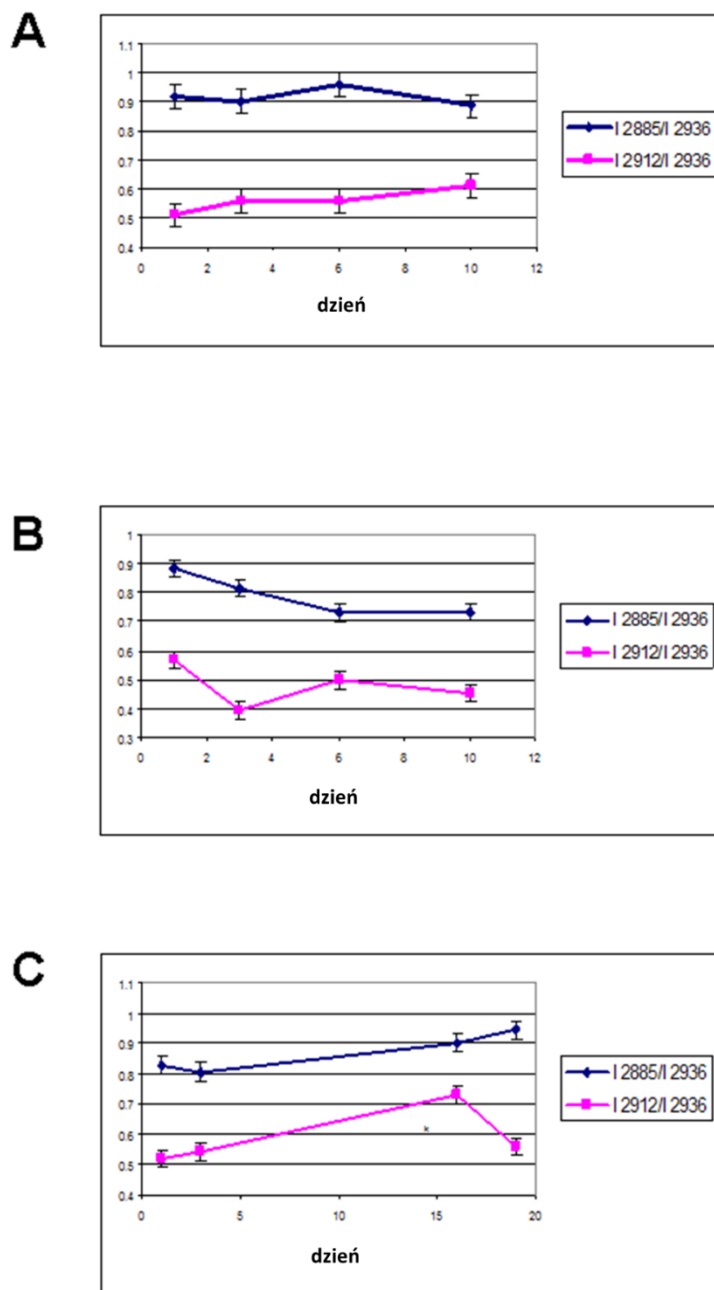
Rysunek 10. Stosunki intensywności i intensywności całkowitej pasma 1085 cm^{-1} (asym C–O–C str) do pasma 1125 cm^{-1} (sym C–O–C str) charakteryzujące drgania wiązania glikozydowego, dla próbek polimeru o stężeniu wody W_C równe: A) $0,69\text{ g/g}$, B) $1,41\text{ g/g}$ i C) $2,17\text{ g/g}$.

Złożoność drgań rozciągających C–H łańcuchów w zakresie $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, wynika z obecności różnych typów grup zawierających CH, takich jak $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ i C–H [72]. Dla $W_C = 0,69\text{ g/g}$ wykazano, że pasma przy *ca.* 2890 cm^{-1} (drgania rozciągające asymetryczne C–H grupy CH_2) i przy *ca.* 2920 cm^{-1} (drgania rozciągające CH_2 sąsiadujące z CH_3) przesuwają się w kierunku wyższych liczb falowych, co wskazuje na wzrost energii obu tych drgań. W ten

sposób pokazano, że długości wiązań, które reprezentują te drgania, ulegają skróceniu i stabilizacji dopiero po 6 dniach (Rysunek 11A). Również, dopiero po tym czasie wzrasta ich względny współczynnik intensywności A2885/A2936 co wskazuje, że lokalne zaburzenie, które odzwierciedla asymetryczne drgania C–H grup CH₂ jest znaczne – Rysunek 12A.



Rysunek 11. Przesunięcie pozycji pasm przy liczbie falowej 2885 cm⁻¹, 2910 cm⁻¹, 2935⁻¹ dla uwodnionej HPC A) W_C = 0,69 g/g, B) 1,41 g/g i C) 2,17 g/g.



Rysunek 12. Stosunek intensywności pasm $2885/2935\text{ cm}^{-1}$ i $2912/2935\text{ cm}^{-1}$ dla uwodnionej HPC: A) $W_C = 0,69\text{ g/g}$, B) $1,41\text{ g/g}$ i C) $2,17\text{ g/g}$.

Dla próbki $W_C = 1,41\text{ g/g}$ – początkowa pozycja pasma $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ odpowiadająca drganiom rozciągającym grupy CH_2 sąsiadującej z CH_3 – intensywność jest prawie taka sama jak po czwartym, końcowym segmencie pomiarowym. Wskazuje to, że nie ma specjalnej zmiany w strukturze łańcuchów HPC w funkcji czasu. Pasma przy *ca.* 2890 cm^{-1} (Rysunek 11B), które odpowiada asymetrycznym drganiom łańcuchów celulozy CH_2 , po trzech dniach

stabilizuje się i zaczyna narastać, co wskazuje na tworzenie się silniejszego charakteru wiązania. Po sześciu dniach współczynnik intensywności A2885/A2936 maleje, co wyraźnie wskazuje na proces stabilizowania się struktury – Rysunek 12B.

Dla $W_C = 2,16$ g/g – pozycja przy ~ 2890 cm^{-1} – intensywność pasma maleje (Rysunek 11C), co wskazuje na wydłużenie wiązań. Intensywność pasma przy *ca.* 2910 cm^{-1} ulega nieznacznym zmianom. Początkowo zmniejsza się (pierwszy segment pomiarowy), a następnie stabilizuje. Po trzech dniach stosunek całkowitej intensywności A2885/A2936 wzrasta a taka dynamika struktury molekularnej utrzymuje się również po piętnastu dniach. W tym czasie, stosunek intensywności A2912/A2938 również wzrasta (Rysunek 12C), co wskazuje na modyfikacje w obrębie pierścieni glukopiranu. Duży nadmiar wody daje możliwość różnych konfiguracji, dlatego obserwuje się taką ciągłą dynamikę układu [73].

Osiągnięcia:

W toku badań potwierdziłem zasadność wyboru metody spektroskopii Ramana, która okazała się bardzo dobrze opisywać, i w wielu elementach przystawać do wcześniej przeprowadzonych obserwacji, także potwierdzać wnioski opracowane na podstawie analiz metodą DSC. Stwierdzono kompatybilność metod, która dotyczyła głównie:

1) **Identyfikacji poszczególnych frakcji wody** – kluczowym elementem, który zapewnia jakościową i ilościową analizę uwodnionych układów, było ustalenie i przyporządkowanie 3 pasm przy około 3400 cm^{-1} , 3320 cm^{-1} i 3220 cm^{-1} odpowiednim frakcjom wody NFW, FBW i FW.

2) **Dla stężeń wody W_C nie przekraczających wartość NFW, cała woda znajdująca się w matrycy jest uważana za niezamarzającą NFW** – dla niskich wartości W_C , w warunkach eksperymentu rzędu 0,69 g/g > NFW – pula wody znajdująca się w przestrzeni matrycy polimerowej miała charakter frakcji NFW z niewielką komponentą frakcji FBW. Korelację pomiędzy metodami manifestuje porównanie Rysunku 4A związanego z publikacją **H1** z Rysunkiem 9A bieżącej pracy **H5**. Dla niskich stężeń ($W_C = \text{NFW} = 0,54$ g/g), wartości T_{max} krzywych DSC znajdowały się w zakresie od -9 °C do -8 °C dla wszystkich typów hydroksypropylo celulozy, co wskazuje na silny udział frakcji wody niezamarzającej NFW. Podobne wnioski w swoich badaniach donosił Ping i wsp. [9]. Badania kinetyczne, wykonane spektroskopią ramanowską, pokazały również, że proces wysycania zasobu NFW jest procesem

długotrwałym, czym należy tłumaczyć początkowy spadek zawartości frakcji NFW, połączony ze wzrostem zawartości konkurujących frakcji FBW i FW. Dopiero w 6 dniu (w warunkach eksperymentu) proces ten ulega odwróceniu a układ osiąga, opisany metodą DSC, finalny stan równowagowy.

3) **Powstawanie frakcji NFW w surowych hydroksypropylo celulozach, jest związane nie tylko z udziałem wiązań wodorowych, ale także z obecnością struktur nanoprzestrzennych** – w przypadku wszystkich badanych typów hydroksypropylo celulozy, tworzenie się frakcji NFW [H1] jest wynikiem zarówno interakcji z łańcuchami polimeru jak i zamknięcia części cząsteczek wody w strukturach nanoprzestrzennych. Znajduje to potwierdzenie w analizie współczynnika kierunkowego a równania $\Delta H = f(W_C)$, który odpowiada energii N_{ev} potrzebnej do odparowania wody z próbki [H2], i który jest znacząco większy w porównaniu do odpowiadających mu mieszanin HPC z SA i NaSA – Tabela 3 H2. Efekt ten można znaleźć na Rysunku 9B publikacji H5, gdzie dla stężeń wody $W_C = 1,42$ g/g zawartości wszystkich rodzajów wody wzrastają równomiernie do dnia 6, po czym zawartość wody FBW spada.

4) Zmniejszająca się zawartość FBW, którą wskazuje Rysunek 9B (H5), pozwala również zauważyć, że **zamarzająca woda FBW jest mniej zaangażowana w stabilizację przestrzennej struktury HPC**. Związek ten objaśnia komentarz do Rysunku 6 przy omówieniu pracy H2.

Ponadto, zastosowanie metody spektroskopii Ramana przyniosło następujące osiągnięcia:

- jeśli stężenie wody w HPC, znajduje się w obszarze bifazy (W_C w zakresie 1,78–1,38 g/g), to wszystkie frakcje wody osiągają swoje maksimum, w warunkach eksperymentu, po około 6 dniach

- przy zawartości wody dużo przewyższającej zawartość frakcji wody NFW (4-krotny nadmiar), w warunkach eksperymentu, obserwowany wzrost stężeń wszystkich rodzajów wody rozpoczyna się po 16 dniach, co może mieć związek z przejściem od struktury anizotropowej do izotropowej, spowodowanym koncentracją grup hydrofobowych

- w pracy śledzono kinetykę interakcji pomiędzy cząsteczkami hydroksypropylo celulozy i wody, co jest podejściem nowatorskim.

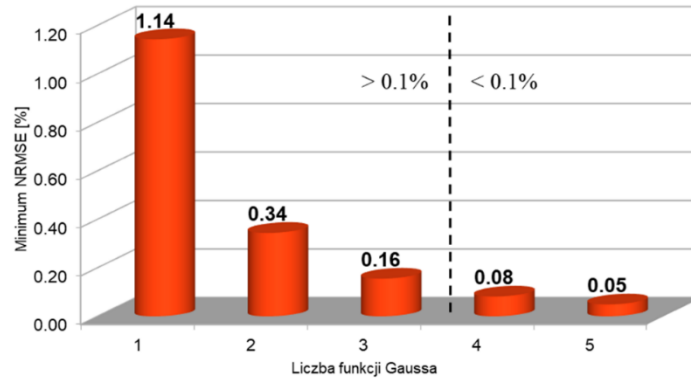
H6 Talik P, Mendyk A. Machine Learning for the Identification of Hydration Mechanisms of Pharmaceutical-Grade Cellulose Polymers and Their Mixtures with Model Drugs. Appl. Sci. 2021, 11, 7751.

Systemy uczące się (Machine learning – ML) przejęły świat sztucznej inteligencji (Artificial intelligence – AI), wprowadzając komputerowe możliwości samoadaptacji i autonomicznego uczenia się, do różnych dziedzin nauki i technologii. Aplikacje te nie ograniczają się li tylko do modelowania predykcyjnego, ale są również wykorzystywane w przetwarzaniu i odkrywaniu wiedzy. Dla tych ostatnich dziedzin, eksploracja danych jest kluczowym przykładem zastosowania ML, opartego na surowych danych i wykorzystywanego do wyjaśnienia możliwych mechanizmów rządzących obserwowanymi zjawiskami. W przemyśle farmaceutycznym, gdzie podejścia PAT/QbD (*process analytical technologies/quality by design*) [75] są obecnie obowiązkowe, to polepszenie rozumienia i wyjaśniania danych staje się coraz ważniejsze dla racjonalnych procesów opracowywania leków. PAT jest źródłem coraz większej ilości danych w oparciu o stale rosnącą liczbę dostępnych technik analitycznych standaryzowanych dla zastosowań farmaceutycznych. Jedną z takich technik jest różnicowa kalorymetria skaningowa, gdzie narzędzia AI/ML znalazły również zastosowanie w analizie rejestrowanych krzywych DSC, zwykle w podejściu predykcyjnym. Przykładem takiego zastosowania jest praca Wytenbacha i wsp. [76], gdzie sygnały DSC wykorzystano bezpośrednio, jako deskryptory molekularne do przewidywania rozpuszczalności różnych związków. Takie podejście do modelowania, należy do kategorii ilościowej relacji struktura-właściwość (QSPR) i wykorzystuje wyniki DSC jako zmienne wejściowe dla modelu do przewidywania interesującej właściwości fizykochemicznej.

Celem pracy był rozkład otrzymanych w pracy H1 krzywych DSC na składowe, reprezentujące różne frakcje wody związanej z hydroksypropylo celulozą oraz jej mieszaninami z lekami o zróżnicowanej rozpuszczalności. Do analizy danych empirycznych, bez żadnych założeń fizycznych, wykorzystano narzędzia AI/ML, a na podstawie zachowania frakcji wodnych postawiono hipotezy wyjaśniające możliwe mechanizmy oddziaływania wody z tą pochodną celulozy.

W badaniach posłużono się krzywymi DSC z publikacji [H1], w części w której rejestrowano proces topnienia. Poszukiwanie optymalnej liczby funkcji gaussowskich przeprowadzono wśród wszystkich dostępnych próbek danych i oparto na analizie

minimalnego błędu dopasowania (NRMSE – *normalised root mean square error*) w funkcji liczby funkcji gaussowskich. Ostatecznie do dalszej analizy wybrano trzy funkcje (Rysunek 13) odpowiadające za trzy frakcje wody.

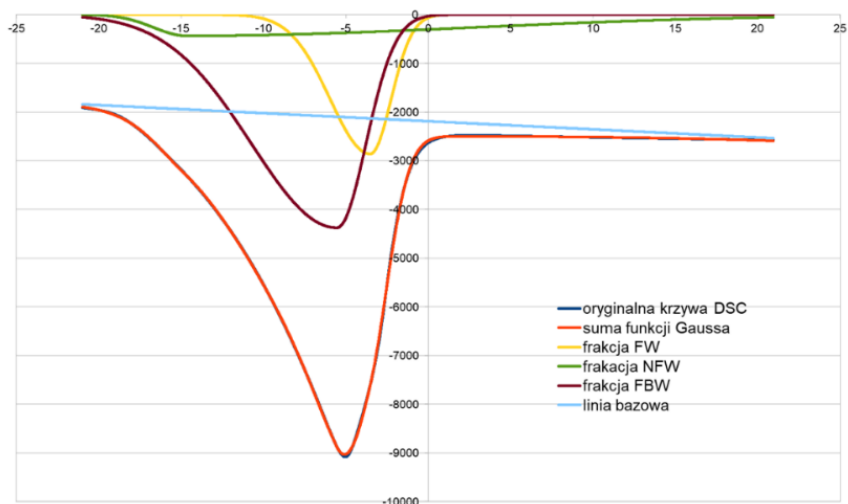


Rysunek 13. Optymalna liczba funkcji Gaussa, wybrana z kryterium 0,1% NRSME.

Powierzchnie nad krzywymi DSC zostały obliczone z uwzględnieniem wyznaczonych linii bazowych i wykorzystane jako wskaźniki ilości odpowiednich frakcji wody – Rysunek 14.

W procedurze dopasowania zachowano następujące kryteria:

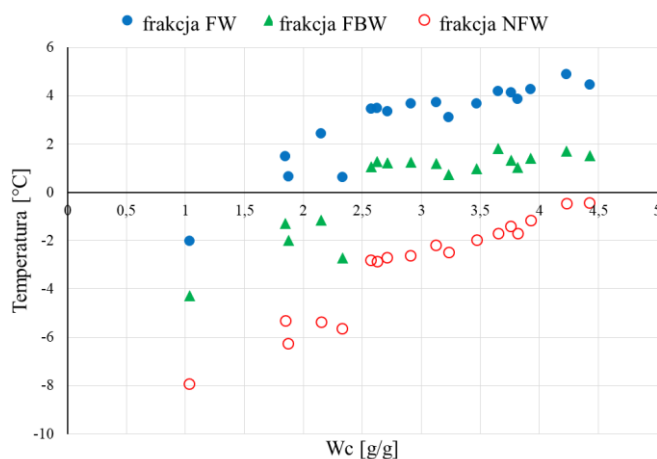
- zgodnie z zasadą brzytwy Ockhama liczba elementów składowych powinna być minimalna
- ponieważ krzywe procesu topnienia zamrożonej wody były asymetryczne, ich rozkład przeprowadzono za pomocą funkcji bi-gaussowskich
- krzywa teoretyczna podana przez sumę poszczególnych składowych była najlepiej dopasowana do eksperymentalnej krzywej DSC
- kryterium dobroci dopasowania stanowił znormalizowany błąd średniokwadratowy (NRMSE)); jako kryterium zatrzymania algorytmu przyjęto empiryczną regułę $NRMSE < 0,1\%$.



Rysunek 14. Reprezentatywny, trójskładowy rozkład krzywej DSC, otrzymany z uwodnionego HPC — stężenie wody $W_C = 0,92$ g/g; linia ciemnoniebieska — oryginalna krzywa DSC, na którą nakłada się czerwona linia, oznaczająca sumę funkcji Gaussów; linia żółta — frakcja wody FW; linia zielona – frakcja wody NFW; linia brązowa – frakcja wody FBW; jasnoniebieska linia — linia bazowa.

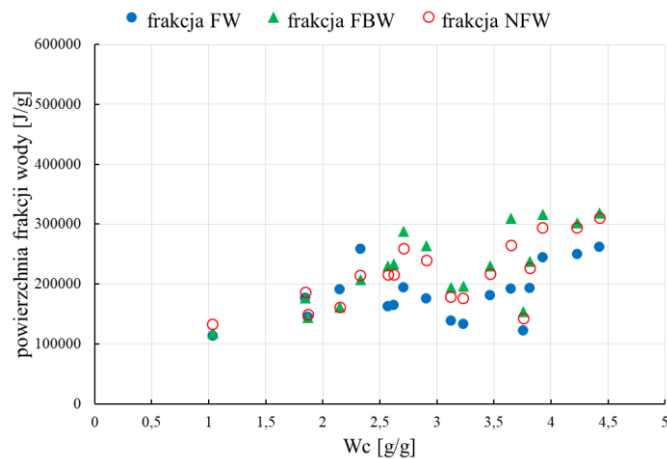
Jak wyjaśniono we wstępie, jednym z kluczowych elementów służących do identyfikacji odpowiedniej frakcji wody jest jej temperatura topnienia. W tym celu, każdej obliczonej w procesie dekonwolucji składowej, przypisano obliczoną odpowiednio maksymalną temperaturę T_{\max} tego procesu. Rysunek 15 jest reprezentatywnym przykładem, w którym poszczególne frakcje zostały pogrupowane w ten właśnie sposób – od temperatury najwyższej do najniższej. Pierwsza seria – najwyższa temperatura – frakcja wody wolnej FW, druga seria – frakcja wody związanej zamarzającej FBW, ostatnia w kolejności seria trzecia, najniższa temperatura – frakcja wody niezamarzającej NFW. Jak widać, temperatury T_{\max} frakcji FW (niebieskie punkty) są w większości dodatnie, natomiast pula wody niezamarzającej (czerwone puste punkty) charakteryzują się temperaturami ujemnymi. Wynika to z faktu, że typ wody NFW jest definiowany tylko przez cząsteczki wody silnie związane wiązaniami wodorowymi i/lub osadzone w strukturach nanoprzestrzennych łańcuchów polimerowych. Wraz ze wzrostem puli NFW, interakcje między kolejnymi warstwami wody są nadal wystarczająco silne, ale słabną wraz ze wzrostem stężenia wody. Zatem temperatura T_{\max} frakcji wodnej jest początkowo ujemna, a następnie, gdy zwiększają się odległości od miejsca wiązania, staje się dodatnia. W ten sposób w matrycy pojawia się kolejny typ wody FBW. Temperatury tej frakcji są ujemne przy niskich stężeniach wody do około 1,5 g/g, ale dodatnie przy wyższych stężeniach >1,5 g/g.

Wykorzystując ten związek, w kolejnej części artykułu pokazano zależności pól powierzchni obliczonych poszczególnych frakcji wody od stężenia wody W_C , zgrupowanych według maksymalnych temperatur T_{max} .



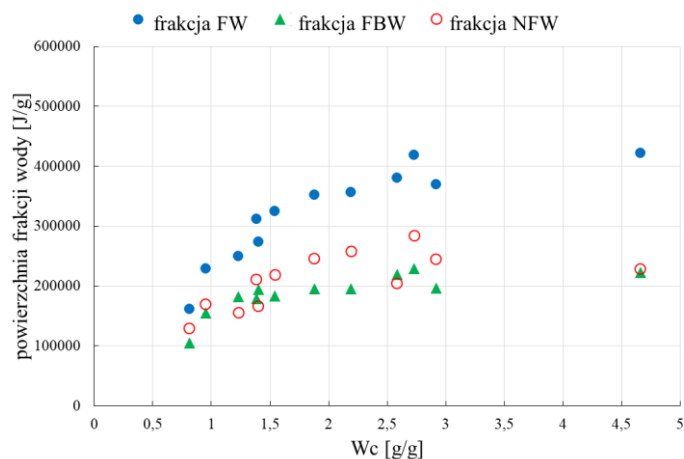
Rysunek 15. Hydroksypropylo celuloza HPC — przykładowy wykres przedstawiający zależność maksymalnej temperatury T_{max} frakcji FW, FBW i NFW od stężenia wody W_C .

Analiza dekonwolucyjna hydroksypropylo celulozy dostarcza bardzo interesujących obserwacji. Stężenie frakcji wody wolnej FW (niebieskie punkty) dla $W_C \geq 2,2$ g/g jest niższe w porównaniu do innych typów, a dla niskich stężeń — $W_C \leq 1,1$ g/g — stężenia wszystkich frakcji wody są prawie takie same. Zjawisko to znalazło wyjaśnienie w pracy **H5**, gdzie przedmiotem badania z użyciem spektroskopii Ramana, była ta sama hydroksypropylo celuloza HPC. We wnioskach pracy wykazano, że przy niskiej zawartości wody $W_C = 0,69$ g/g, cała woda znajdująca się w matrycy jest niezamarzająca. Dlatego należy spodziewać się obecności tylko jednej frakcji, czego w modelu 3 składnikowym nie da się inaczej przedstawić. W próbkach o stężeniu wody $W_C = 1,41$ g/g stwierdzono spadek zawartości frakcji wody FBW, podczas gdy stężenia innych typów pozostały na tym samym poziomie. Dla zawartości wody $W_C \geq 2,2$ g/g, tak jak w omawianym modelu teoretycznym, obserwowano wzrost stężeń wszystkich rodzajów wody, przy czym stężenie frakcji FBW pozostawało ciągle najniższe. Zjawisko to można łatwo zaobserwować na Rysunku 16.



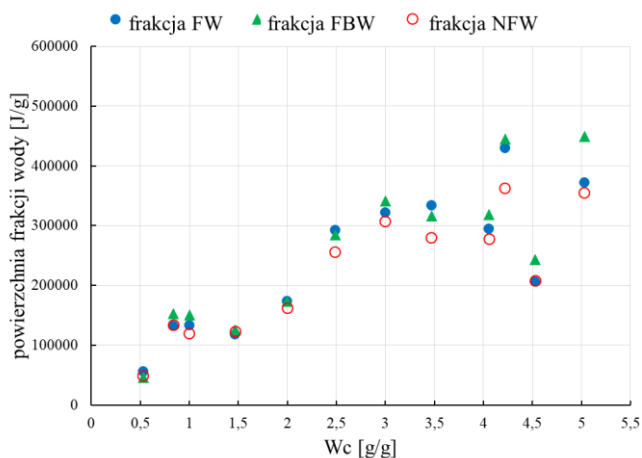
Rysunek 16. Powierzchnia 3 frakcji wody, uzyskana po dekonwolucji HPC w funkcji W_C – frakcja FW niebieskie punkty, frakcja FBW zielone trójkąty, frakcja NFW czerwone puste punkty.

Rysunek 17 obrazuje tę samą zależność pól powierzchni poszczególnych frakcji wody w funkcji W_C , obliczoną dla mieszanin HPC ze słabo rozpuszczalnym kwasem salicylowym SA. W przeciwieństwie do niezmięsanego polimeru wyraźnie widać, że stężenie frakcji wody wolnej FW (niebieskie punkty) wzrasta od samego początku, podczas gdy frakcje wody FBW (zielone trójkąty) i NFW (czerwone puste punkty) ulegają szybkiemu nasyceniu i od W_C około 1,5 g/g pozostają na stałym poziomie. Bez wątpliwości wynika to ze zmniejszonej zawartości łańcuchów polimerowych, ponieważ binarna mieszanina jest matrycą polimeru i leku w stosunku wagowym 1:1 m/m. Obniża to liczbę możliwych aktywnych miejsc wiązania *via* wiązania wodorowe a także zmniejsza liczbę zdolnych do pułapkowania wody nanoprzestrzeni. Co więcej, małe cząsteczki kwasu salicylowego utrudniają formowanie się struktur nanoprzestrzennych poprzez wzrost ilości centrów hydrofobowych. Z tego powodu obszary FBW i NFW bardzo szybko nasycają się, a obszar frakcji FW gwałtownie zwiększa swoje stężenie [H2].



Rysunek 17. Powierzchnia 3 frakcji wody, uzyskana po dekonwolucji mieszaniny HPC z trudno rozpuszczalnym kwasem salicylowym (HPC/SA) w funkcji W_c – frakcja FW niebieskie punkty, frakcja FBW zielone trójkąty, frakcja NFW czerwone puste punkty.

Podobnie jak w przypadku mieszanin HPC/SA, liczba miejsc wiązania wody w mieszaninach HPC/NaSA jest związana z zawartością łańcuchów polimerowych i ograniczona do 1/2 – HPC:NaSA – 1:1 m/m. Jednak, jak wcześniej wykazano [H1], stężenie frakcji wody NFW obliczone dla HPC/NaSA było równe 0,48 g/g, co czyni tę wartość porównywalną ze stężeniem 0,54 g/g obliczonym dla niemieszanej HPC. Zjawisko to jest związane z obecnością silnie dysocjującego jonu Na^+ , co bardzo zwiększa ruchliwość cząsteczek wody w układzie. W efekcie prędkość ich wymiany jest tak duża, że odróżnienie jednej frakcji wody od drugiej, w praktyce staje się niemożliwe – Rysunek 18.



Rysunek 18. Powierzchnia 3 frakcji wody, uzyskana po dekonwolucji mieszaniny HPC z bardzo dobrze rozpuszczalnym salicylanem sodu (HPC/NaSA) w funkcji W_c – frakcja FW niebieskie punkty, frakcja FBW zielone trójkąty, frakcja NFW czerwone puste punkty.

Otrzymane wyniki obliczeń zostały szczegółowo omówione i porównane z wcześniej uzyskanymi eksperymentalnymi danymi DSC, także innych autorów. Narzędzia AI/ML pomogły w opracowaniu teorii i pośredniej walidacji hipotetycznego mechanizmu oddziaływania wody z polimerem HPC oraz jego mieszaninami z lekami o zróżnicowanej rozpuszczalności.

Osiągnięcia:

- opracowano i opublikowano narzędzia AI/ML do dekompozycji krzywych DSC jako oprogramowanie *open source*, dostępne bezpłatnie zarówno do użytku osobistego, jak i komercyjnego [76]

- zweryfikowano koncepcję wykorzystania wyżej wymienionego narzędzia do wyników DSC dla uwodnionych mieszanin HPC z modelowymi lekami

- przyporządkowano, wyznaczonym w procesie dekonwolucji składowym, maksymalne temperatury T_{\max} procesu topnienia, co pozwoliło na potwierdzenie tożsamości każdej frakcji wody – podobne wnioski, ale uzyskane dla eksperymentalnie otrzymanych krzywych DSC, były przedmiotem publikacji [H1]

- wykazano, że zarówno jakościowe jak i ilościowe właściwości poszczególnych frakcji wody obliczonych podczas analizy AI/ML, znajdują potwierdzenie w badaniach metodą spektrometrii ramanowskiej [H5, 21]

- zastosowane narzędzie AI/ML bardzo dobrze opisuje wpływ leków o zróżnicowanej rozpuszczalności – lokalizacja poszczególnych frakcji wraz z aspektami ilościowymi zostały zachowane i potwierdzone we wcześniejszych eksperymentach DSC [H1,H2]

- pokazano znaczący udział nanoprzestrzeni w tworzeniu silnie związanej wody NFW – uzyskane wyniki zostały potwierdzone w publikacjach [9,16,45,H1,H2]

- wskazano wpływ silnie dysocjujących jonów Na^+ na niektóre ilościowe zależności związane z wodą niezamarzającą NFW [10,26,H1]

4.3.4 Podsumowanie

Wnioski z prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego są następujące:

H1 W badanym zakresie pomiarowym, lepkość hydroksypropylo celulozy HPC nie wpływa na zawartość wody niezamarzającej NFW. W porównaniu do typów HPC HF, MF i LF: obecność słabo rozpuszczalnego w wodzie kwasu salicylowego obniża zawartość NFW do około 30% a bardzo dobrze rozpuszczalnego w wodzie salicylanu sodu zmienia ją o około 10 do 20%. Wzrostowi zawartości NFW, w porównaniu do mieszanin HPC/SA, sprzyjają łatwo dysocjujące kationy jednowartościowe Na^+ . Obecność małych cząsteczek leków o słabej i bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie, silnie różnicuje maksymalną temperaturę T_{\max} procesu topnienia wody zawartej w mieszaninie.

H2 W przypadku wszystkich badanych typów hydroksypropylo celulozy, wcześniej obliczone zawartości wody NFW [**H1**] są wynikiem zarówno interakcji z łańcuchami polimeru jak i obecności nanoprzestrzennych pułapek. Znajduje to potwierdzenie w analizie współczynnika kierunkowego a równania $\Delta H = f(W_C)$, który odpowiada energii potrzebnej do odparowania wody z próbki, i który jest znacząco większy w porównaniu do odpowiadających mu mieszanin HPC z SA i NaSA. W przypadku badanych mieszanin HPC z modelowymi lekami, woda niezamarzająca NFW składa się głównie z cząsteczek wody oddziałujących wiązaniami wodorowymi z grupami hydrofilowymi polimeru i w mniejszej części pochodzącymi od wody zamkniętej w przestrzennych nanopułapkach. Wyższą zawartość N_{ev} obliczoną dla mieszaniny HPC/NaSA można wytłumaczyć faktem silniejszego oddziaływania pomiędzy zdysocjowaną parą jonową Na^+ i cząsteczkami wody, co znajduje potwierdzenie w analizie wyrazu wolnego b z równania $\Delta H = f(W_C)$, odpowiadającego za ciepło hydratacji. Wartość tej wielkości w przypadku mieszaniny HPC/NaSA jest prawie dwukrotnie większa w porównaniu do analogicznych mieszanin HPC/SA i niemieszanej HPC.

H3 Hydroksypropylometrylo celulozy HPMC o niskiej lepkości (3 cP) posiadają większą zdolność tworzenia silnie związanej wody niezamarzającej, niż ich odpowiedniki o lepkości większej o blisko 5 rzędów wielkości. W poszczególnych grupach strukturalnych uwodnionych mieszaninach kwasu acetylosalicylowego z zarówno HPC jak i HPMC dominuje efekt odwrotny - wraz ze wzrostem lepkości wzrasta zawartość NFW. W porównaniu do mieszanin HPC/SA, mieszaniny HPC/ASA charakteryzują się znacznym wzrostem zawartości NFW dla obydwu typów LF i MF, co sugeruje związek z obecnością grup acetylowych, zdolnych do

generowania kolejnych struktur nanoprzestrzennych, w których powstają cząsteczki wody NFW. Mieszanki HPMC/ASA o lepkości 100000 cP, które mają dużą zdolność wiązania wody z grupami hydroksylowymi łańcuchów polimerowych, znacznie ograniczają hydrolizę kwasu acetylosalicylowego w przeciwieństwie do układów HPMC/ASA o lepkości 3 cP, w których efekt hydrolizy jest wyraźnie większy. Dla mieszanin HPC/ASA nie obserwowano podobnej zależności, ponieważ bardzo wysoką hydrolizę rzędu 15% oznaczono dla obydwu badanych typów MF i LF

H4 Wyznaczono zawartości wody niezamarzającej NFW oraz wody związanej z procesem parowania N_{ev} w wybranych gatunkach liofilizowanych grzybnia z hodowli *in vitro* oraz komercyjnie dostępnych *Agaricus bisporus*, *Boletus badius* i *Cantharellus cibarius*. Uzyskane wyniki NFW były zróżnicowane i silnie zależne od gatunku grzyba, pochodzenia (grzybnia *in vitro* lub hodowlana) oraz zawartości kumulowanych jonów metali. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości kationów wzrasta stężenie NFW. Obliczone stężenia N_{ev} były niskie dla wszystkich badanych próbek, co sugeruje, że niezamarzająca woda składa się głównie z cząsteczek wody oddziałujących z miejscami sorpcji, które nie są uwięzione w nanoprzestrzeniach – wyjątek stanowi *Agaricus bisporus*. Pokazano użyteczność wyznaczania N_{ev} dla oceny wpływu obecności struktur nanoprzestrzennych w powstawaniu NFW. Mając na uwadze duże znaczenie dla przemysłu spożywczego, obliczone zawartości NFW i N_{ev} mogą znaleźć konkretne zastosowanie przy wykreślanu diagramów fazowych dla określenia optymalnych warunków przetwarzania i dalszego przechowywania liofilizowanych postaci grzybów *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* oraz *Cantharellus cibarius*. W grupie badań owocników pochodzących z kultur *in vitro*, zastosowanie opisanej metody DSC miało charakter nowatorski i nie było jak dotąd przedmiotem publikacji.

H5 W toku badań potwierdziłem zasadność wyboru metody spektroskopii Ramana, która okazała się bardzo dobrze przystawać do wcześniej przeprowadzonych obserwacji i wniosków uzyskanych metodą DSC. Badania przeprowadzono na niemieszanej hydroksypropylo celulozie typu MF a zaobserwowana kompatybilność metod dotyczyła: identyfikacji i przypisaniu 3 pasm przy około 3400 cm^{-1} , 3320 cm^{-1} i 3220 cm^{-1} odpowiednim frakcjom wody NFW, FBW i FW – potwierdzenia, że dla stężeń wody W_C nie przekraczających wartości $NFW = 0,54\text{ g/g}$, cała woda znajdująca się w matrycy jest uważana za niezamarzającą – powstawanie frakcji NFW w surowych hydroksypropylo celulozach, jest związane nie tylko z udziałem wiązań wodorowych, ale także z obecnością struktur nanoprzestrzennych – zamarzająca woda FBW jest mniej zaangażowana w stabilizację przestrzennej struktury HPC.

Ponadto stwierdzono, że jeśli stężenie wody w HPC, znajduje się w obszarze tworzenia bifazy (W_C w zakresie 1,78–1,38 g/g), to wszystkie frakcje wody osiągają swoje maksimum, w warunkach eksperymentu, po około 6 dniach. Przy zawartości wody dużo przewyższającej zawartość frakcji wody NFW (4-krotny nadmiar), wzrost stężeń wszystkich rodzajów wody rozpoczyna się po 16 dniach, co może mieć związek z przejściem od struktury anizotropowej do izotropowej, spowodowanym koncentracją grup hydrofobowych.

W pracy śledzono kinetykę interakcji pomiędzy cząsteczkami hydroksypropylo celulozy i wody, co jest podejściem nowatorskim.

H6 Opracowano i opublikowano narzędzia AI/ML do dekompozycji krzywych DSC jako oprogramowanie *open source*, dostępne bezpłatnie zarówno do użytku osobistego, jak i komercyjnego. Zweryfikowano koncepcję wykorzystania wyżej wymienionego narzędzia do wyników DSC dla uwodnionych mieszanin HPC z modelowymi lekami. Przyporządkowano, wyznaczonym w procesie dekonwolucji składowym, maksymalnych temperatur T_{max} procesu topnienia, co pozwoliło na potwierdzenie tożsamości każdej frakcji wody. Potwierdzono w literaturze znaczną część empirycznie opracowanych hipotez AI/ML, dotyczących właściwości termicznych uwodnionych mieszanin HPC. Zastosowane narzędzie AI/ML bardzo dobrze opisuje wpływ leków o zróżnicowanej rozpuszczalności, znaczący udział nanoprzestrzeni w tworzeniu silnie związanej wody NFW a także wpływ silnie dysocjujących jonów Na^+ na niektóre ilościowe zależności związane z wodą niezamarzającą NFW.

Bibliografia

1. Arca HC, Mosquera-Giraldo LI, Bi V, Xu D, Taylor LS, Edgar KJ. *Biomacromolecules* 2018;19(7):2351–2376.
2. Guo JH, Skinner G, Harcum W, Barnum P. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1998;1(6):254–261.
3. Ye R, Cheng Q, Cai J, Feng T, Wang G. *J. Food Qual.* 2016;39(4):292–300.
4. Liu X, Zhou Y, Nie W, Song L, Chen P. *J. Mater. Sci.* 2015;50(18):6113–23.
5. Ledwon P, Andrade JR, Lapkowski M, Pawlicka A. *Electrochim. Acta* 2015;159:227–33.
6. Barzic AI, Dimitriu DG, Dorohoi DO. *Polym. Eng. Sci.* 2015;55(5):1077–81.
7. Vueba ML, Batista de Carvalho LA, Veiga F, Sousa JJ, Pina ME. *Pharm. Dev. Technol.* 2006;11(2):213–28.
8. Wolfe J, Bryant G, Koster KL. *Cryo-Letters* 2002;23:157–66.
9. Ping ZH, Nguyen QT, Chen SM, Zhou JQ, Ding YD. *Polymer* 2001;42:8461–7.
10. Berthold J, Desbrie`res J, Rinaudo M, Salme´n L. *Polymer* 1994;35(26):5729–36.
11. Hatakeyama T, Tanaka M, Kishi A, Hatakeyama H. *Thermochim. Acta* 2012;532:159–163.
12. Pissis P, Kyritsis A. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 2013;51:159–175.
13. Bullock G, Molinero V. *Faraday Discuss.* 2013;167:371–388.
14. Guńko VM, Savina IN, Mikhalovsky SV. *Gels* 2017;3(4):37.
15. Wiener CG, Tyagi M, Liu Y, Weiss RA, Vogt BD. *J. Phys. Chem. B* 2016;120:5543–5552.
16. Liu GL, Yao KD. *Polymer* 2001;42:3943–7.
17. Watanabe K, Wake T. *Cold Reg. Sci. Technol.* 2009;59:34–41.
18. Průšová A, Conte P, Kučerík J, Alonzo G. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397:3023–8.
19. Kulinowski P, Młynarczyk A, Jasiński K, Talik P, Gruwel ML, Tomanek B, Węglarz WP, Dorożyński P. *Pharm. Res.* 2014;31(9):2383–92.
20. Mlčoch T, Kučerík J. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2013;113(3):1177–85.
21. Paudel A, Rajjada D, Rantanen J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;89:3e20.
22. Morita S, Tanaka M, Ozaki Y. *Langmuir* 2007;23:3750e3761.
23. Hatakeyama T, Inui Y, Iijima M, Hatakeyama H. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2013;113(3):1019–25.
24. Liu J, Cowman MK. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2000;59:547–57.

25. Dehabadi L, Udoetok IA, Wilson LD. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2016;126(3):1851–66.
26. Průšová A, Šmejkalová D, Chytil M, Velebný V, Kučerík J. *Carbohydr. Polym.* 2010;82:498–503.
27. Hatakeyama T, Tanaka M, Hatakeyama H. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2010;21:1865–75.
28. Caldeira TG, Saude-Guimaraes DA, De Lacerda DLR, Mussel WD, Yoshida MI, De Souza J. *J. Pharm. Pharmacol.* 2019;71(6):910–919.
29. Lust A, Lakio S, Vintsevits J, Kozlova J, Veski P, Heinämäki J, Kogermann K. *Int. J. Pharm.* 2013;456:41-48.
30. Atici EB, Karlığa B. *J. Pharm. Biomed.* 2015;114:330-340.
31. Hubicka U, Żmudzki P, Talik P, Żuromska-Witek B, Krzek J. *Chem. Cent. J.* 2013;7(1):133–44.
32. Talik P, Hubicka U. *Med. Int. Rev.* 2018;28(111):82–90.
33. Talik P, Talik P, Hubicka U. *Med. Int. Rev.* 2016;27:100–6.
34. Talik P, Czerniecka E, Hubicka U, Krzek J. *Acta Pol. Pharm.* 2017;74(4):1057–62.
35. Talik P, Żuromska-Witek B, Hubicka U, Krzek J. *Acta Pol. Pharm.* 2017;74(4):1049–55.
36. Antosik A, Witkowski S, Woyna–Orlewicz K, Talik P, Szafraniec J, Wawrzuta B, Jachowicz R. *Acta Pol. Pharm.* 2017;74(4):1231–38.
37. Dettlaff K, Talik P, Spólnik G, Danikiewicz W, Ogrodowczyk M. *AAPS PharmSciTech.* 2014;16(1):21-9.
38. Alber C, Engblom J, Falkman P, Kocherbitov V. *J. Phys. Chem. B* 2015;119(11):4211–4219.
39. Zaitoon AM, Elansari AM, Ahmed YS, Taha NA. *Emir. J. Food Agric.* 2016;28(9):625–632.
40. Seetapan N, Limpanyoon N, Fuongfuchat A, Gamonpilas C, Methacanon P. *Int. J. Food Prop.* 2016;19(7):1616–1630.
41. Kučerík J, Bursáková P, Průšová A et al. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2012;110:451–459.
42. Hatakeyama H, Hatakeyama T. *Thermochim. Acta* 1998;308:3–22.
43. Hatakeyama T, Nakamura K, Hatakeyama H. *Thermochim. Acta* 1985;123:153–61.
44. Kučerík J, Průšová A, Šmejkalová D, Velebný V. *Carbohydr. Polym.* 2013;98(2):1561–4.
45. Park S, Venditti RA, Jameel H, Pawlak JJ. *Cellulose* 2007;14:195–204.
46. Hatakeyama T, Nakamura K, Hatakeyama H. *Thermochim Acta.* 2000;352–353:233–9.

47. Qiu Y, He X, Zhu L, Product CG. Process development of solid Oral dosage forms. In: Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Yu L, Mantri RV, editors. Developing solid Oral dosage forms (second edition) pharmaceutical theory and practice: Academic Press; 2017. p. 551–91.
48. Mwesigwa E, Basit AW, Buckton G. *J. Pharm. Sci.* 2008;97:4433–45.
49. Mwesigwa E, Buckton G, Basit AW. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2005;31:959–68.
50. Kocherbitov V. *Carbohydr. Polym.* 2016;150:353–8.
51. Kokot Z, Burda K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998;18:871–5.
52. Levine H, Slade L. *Carbohydr. Polym.* 1986;6(3):213–44.
53. Rahman MS. *Trends Food Sci. Technol.* 2006;17:129–41.
54. Rahman MS. *J. Food Eng.* 2010;99(4):402–16.
55. Guizani N, Al-Saidi GS, Rahman MS, Bornaz S, Al-Alawi AA. *J. Food Eng.* 2010;99(1):92–7.
56. Guizani N, Rahman MS, Klibi M, Al-Rawahi A, Bornaz S. *Int. Food Res. J.* 2013;20(4):1945–52.
57. Herawat H, Kusnandar F, Adawiyah DR, Budijanto S, Rahman MS. *Thermochim. Acta* 2014;593:50–7.
58. Rahman MS. *Food Chem.* 2012;132:1679–85.
59. Mleczek M, Magdziak Z, Gąsecka M, Niedzielski P, Kalač P, Siwulski M, Rzymyski P, Zalicka S, Sobieralski K. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2016;23(20):20609–18.
60. Kojta AK, Falandysz J. *Food Chem.* 2016;200(1):206–14.
61. Reczyński W, Muszyńska B, Opoka W, Sułkowska-Ziaja K, Malec M. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013;153(1–3):355–62.
62. Gąsecka M, Siwulski M, Mleczek M. *J. Food Process. Preserv.* 2018;42(1):e13386.
63. Zhang L, Hu Y, Duan X, Tang T, Shen Y, Hu B, Liu A, Chen H, Li C, Liu Y. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;113(1):1–7.
64. Falandysz J, Borovička J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97(2):477–501.
65. Roos YH. *J. Food Sci.* 1986;51(3):684–6.
66. Sablani SS, Rahman MS, Al-Busaidi S, Guizani N, Al-Habsi N, Al-Belushi R, Soussi B. *Thermochim. Acta* 2007;462:56–63.
67. Rahman MS, Sablani SS, Al-Habsi N, Al-Maskri S, Al-Belushi R. *J. Food Sci.* 2005;70(2):E135–41.
68. Suresh S, Al-Habsi N, Guizani N, Rahman MS. *Thermochim. Acta* 2017;655:129–36.

69. Syamaladevi RM, Sablani SS, Tang J, Powers J, Swanson BG. *J. Food Eng.* 2009;91(3):460–7.
70. Telis VRN, Sobral PJA. *LWT–Food Sci. Technol.* 2001;34:199–205.
71. Guido S, *Macromolecules* 1995;28:4530e4539.
72. Tu AT, *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1982. Ch.7.
73. Fechner PM, Wartewig S, Kiesow A, Heilmann A, Kleinebudde P, Neubert RHH, J. *Pharm. Pharmacol.* 2005;57:689e698.
74. Schenzel K, Fischer S, Applications of FT- Raman spectroscopy for the characterization of cellulose, Lenzinger Berichte. www.lenzing.com/index.php?type=88245&tx_filedownloads_file%5bfileName%5d=fileadmin/content/PDF/03_Forschung_u_Entwicklung/Lenzinger_Berichte_83_2004.pdf, 2004, 83-64-70.
75. ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q8(R2) Pharmaceutical Development. 2009. Available online: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf (accessed on 21 June 2021).
76. Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1999;2:311–320.
77. R Peak Decomposer. Available online: <https://sourceforge.net/projects/r-peak-decomposer> (accessed on 21 June 2021).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

1. W październiku 1996 roku, na zaproszenie strony francuskiej, odbyłem krótkoterminowy (7 dni) staż naukowo-dydaktyczny w pracowni profesora dr hab. Jean Martineza, na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu w Montpellier (Francja). Tematem pobytu były nowe i innowacyjne metody syntezy organicznej i peptydowej, projektowanie i synteza różnych silnych i selektywnych analogów neuropeptydów oraz innych aktywnych biomolekuł.

2. W czerwcu 1998 roku odbyłem miesięczny staż naukowy w ramach europejskiego programu *Tempus Phare* na Wydziale Chemii i Farmacji Uniwersytetu w Würzburgu (RFN), w katedrze prowadzonej przez profesor dr hab. Ch. Müller. Wyjazd stanowił kontynuację współpracy badawczej, której wyniki były przedmiotem:

- doniesienia zjazdowego:

Sauer R, Schobert U, Geis U, Frobenius W, Müller ChE, **Talik P**, Pawłowski M. Neue A1 und A2 - selektive adenosinreceptor-antagonisten. Synthesen und strukturwirkungsbeziehungen – Konferencja Niemieckiego Towarzystwa Farmaceutycznego Salzau 14-16.03 1996

- oraz publikacji:

Müller ChE, Sauer R, Geis U, Frobenius W, **Talik P**, Pawłowski M. Aza-analogs of 8-styrylxanthines as A2A-adenosine receptor antagonists. Arch Pharm. 1997;330(6):181-9

W trakcie pobytu zajmowałem się syntezą nowych diaza-analogów 8-styryloksantyny o potencjalnym działaniu na receptory A₁ i A₂-adenozynowe.

Wynikiem pobytu były doniesienia zjazdowe:

Talik P, Müller ChE, Pawłowski M. Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych diaza-analogów 8-styryloksantyny o potencjalnym działaniu na receptory A₁ i A₂-adenozynowe. Synthesis and physicochemical properties of new diaza-analogs of 8-styryloxantines as potential agents on A1 and A2 adenosine receptors. XVII Naukowy Zjazd PTFarm. "Farmacja w perspektywie XXI w.", Kraków, 10-13 września 1998.

Talik P, Müller ChE, Pawłowski M. Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych diaza-analogów 8-styryloksantyny o potencjalnym działaniu na receptory A1 i A2-adenozynowe. Synthesis and physicochemical properties of new diaza-analogs of 8-styryloxantines as potential agents on A1 and A2 adenosine receptors. XLI Zjazd Naukowy PTChem. i SITPChem., Wrocław 14-18 września 1998.

Wyniki tego pobytu, zostały częściowo wykorzystane w mojej rozprawie doktorskiej „Badania w grupie 1,3,7,8-pochodnych ksantyny o potencjalnym działaniu na receptory adenozynowe”.

3. W październiku 2000 roku, odbyłem krótkoterminowy (7 dni) staż naukowo-dydaktyczny, w ramach europejskiego grantu *Tempus Phare* – Wydział Matematyki i Nauk Przyrodniczych Reńskiego Uniwersytetu Fryderyka Wilhelma w Bonn (RFN).

Kolejną moją aktywnością naukową, o której chciałem wspomnieć w niniejszym rozdziale autoreferatu, jest intensywna współpraca z:

1) Zespołem Spektroskopii Oscylacyjnej Wydziału Chemii UJ, kierowanym przez prof. dr hab. Aleksandrę Wesełucha-Birczyńską, której efektem są:

- doniesienie zjazdowe: **Talik P**, Moskal P, Wesełucha-Birczyńska A. Water-Polymer Interactions of Hydrated Hydroxypropyl Cellulose (HPC) and its Mixtures with Drugs of Different Solubility – Raman Spectroscopy Studies for Drug Delivery Applications. XVth International Conference on Molecular spectroscopy, 15.09 - 19.09.2019 Wrocław

- doniesienie zjazdowe: Kraińska M, **Talik P**, Moskal P, Proniewicz LM, Wesełucha-Birczyńska A, Raman spectroscopy investigations of hydrated hydroxypropyl cellulose mixtures with low soluble salicylic acid: molecular interactions and the water binding structure. 2.2. Biomedical Applications, 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 23rd-26th August 2021.

- publikacja: **H5** – **Talik P**, Moskal P, Proniewicz LM, Wesełucha-Birczyńska A. U. The Raman spectroscopy approach to the study of Water-Polymer interactions in hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC). *J Mol Struct.* 2020;1210:128062

2) Katedrą i Zakładem Technologii Postaci Leku i Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, której efektem są publikacje:

- publikacja: Kulinowski P, Młynarczyk A, Jasiński K, **Talik P**, Gruwel ML, Tomanek B, Węglarz WP, Dorożyński P. Magnetic resonance microscopy for assessment of morphological changes in hydrating hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets in situ— is it possible to detect phenomena related to drug dissolution within the hydrated matrices? Pharm Res. 2014;31(9):2383–92.

- publikacja: **H6** – **Talik P**, Mendyk A. Machine Learning for the Identification of Hydration Mechanisms of Pharmaceutical-Grade Cellulose Polymers and Their Mixtures with Model Drugs. Appl. Sci. 2021, 11, 7751.

3) Zakładem Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii UJ – której efektem jest praca licencjacka Pani Alicji Romańskiej – „Badanie właściwości fizykochemicznych uwodnionych mieszanin hydroksypropyloceluloz z lekami o różnej rozpuszczalności.” Praca wykonana pod opieką dr hab. Krzysztofa Kruczały, prof. UJ

4) Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, której rezultatem jest:

- publikacja: **H4** – **Talik P**, Piwowarczyk J, Muszyńska B, Hubicka U. DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured in vitro mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* and *Cantharellus cibarius*. J Therm Anal Calorim. 2021;143:3525–3532.

5) Wydziałem Chemii Uniwersytetu Opolskiego – zespół badawczy kierowany przez prof. dr hab. Jacka Lipoka. Zostałem zaproszony do udziału w projekcie pt. „Profilowanie fosforowe jako metoda oceny rozwoju organizmów w warunkach stresu fizjologicznego - diagnostyka fosforomiczna” (“Phosphorus profiling as the method of evaluation of development of organisms in conditions of physiological stress - phosphoromics diagnostics”) – numer umowy projektowej: UMO-2017/27/B/NZ4/00698, kierowanego przez prof. dr hab. Jacka Lipoka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Jednym z istotnych aspektów tego projektu jest ustalenie losu pochodnych fosfonowych w środowisku i wskazanie możliwości przekształceń tych substancji. Choć zdecydowana większość szczegółowych informacji związanych z biokatalizowanymi przemianami fosfonianów dotyczy aktywności bakterii, stopniowo rośnie liczba danych wskazujących na znaczący udział grzybów mikroskopowych w tych procesach. Mój udział w projekcie jest związany z wchodzącą w skład cyklu habilitacyjnego publikacją **H4** „DSC study of hydration and water-holding behaviour of cultured in vitro mycelium and naturally grown fruiting bodies of freeze-dried *Boletus badius*, *Agaricus bisporus* and

Cantharellus cibarius”. Przedmiotem badań jest zastosowanie metody DSC w ocenie zawartości wody niezamarzającej NFW oraz wody związanej z procesem parowania Nev w materiale biologicznym, szczególnie w warunkach steru osmotycznego, a także analiza wpływu kationów jedno- i dwuwartościowych oraz obecność struktur nanoprzestrzennych, na stężenia obliczonych frakcji wody. Otrzymane wyniki zostaną wykorzystane w badaniach korelacyjnych z wykorzystaniem zaawansowanych metod statystycznych.

6) Uniwersytetem w Szeged, której rezultatem jest

- prezentacja ustna w języku angielskim: “The DSC approach to study non-freezing water contents of hydrophilic polysaccharides – effect of drug addition.” 1st Hungarian-Polish Interdisciplinary Scientific Symposium 26-27th September 2019, Szeged, Hungary.

- publikacja: „Opoka W, Szłósarczyk M, Chojnacki A, Kryczyk-Poprawa A, **Talik P** et al. Semiautomatic and fully functional electrochemical microanalyzer BO-05 suitable for scientific, didactic, and analytical applications: The use in the potentiometric analysis of drugs. Anal. Tech. Szeged. 2021; 15(1):64-72.”

7) Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection "ICTEP", Brno University of Technology – współpraca z Profesorem Jiří Kučerik (Assoc. prof., PhD) polega na wzajemnych konsultacjach i wymianie doświadczeń w zakresie zastosowań metod termoanalitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem Różnicowej Kalorymetrii Skaningowej DSC.

8) Efektem bliskiej współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, było także:

- doniesienie zjazdowe: Dettlaff K, **Talik P**, Danikiewicz W, Spólnik G. Ocena trwałości radiochemicznej itraconazolu w fazie stałej. S.05.P-126. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja – Nauka – Społeczeństwo Białystok, 18-21.09.2013

- publikacja: Dettlaff K, **Talik P**, Spólnik G, Danikiewicz W, Ogrodowczyk M. The Influence of Ionizing Radiation on Itraconazole in the Solid State. AAPS PharmSciTech. 2014;16(1):21-9.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Działalność dydaktyczna

Od chwili zatrudnienia w Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Farmaceutycznego, Oddziału Analityki Medycznej oraz kierunku Drug Development and Discovery (DDD) – zajęcia prowadzone w języku angielskim. W okresie pracy w Katedrze Chemii Farmaceutycznej, były to zajęcia laboratoryjne oraz seminaria rozszerzające tematykę wykładową studentów III roku Farmacji, na które przygotowałem szereg instrukcji oraz konspektów. Ponadto, byłem czynnie zaangażowany w opracowanie pytań na kolokwia tematyczne oraz egzamin praktyczny podsumowujący osiągnięcia studentów tego roku.

Zajęcia dydaktyczne w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej obejmują ćwiczenia laboratoryjne ze studentami pierwszego i drugiego roku z zakresu chemii ogólnej, nieorganicznej i analitycznej. Dotyczą analizy jakościowej kationów i anionów, badaniu tożsamości jonów oraz czystości związków zgodnie z wytycznymi farmakopealnymi oraz analizy ilościowej substancji. Podobnie jak w latach ubiegłych, w ramach zajęć opracowałem szereg instrukcji do ćwiczeń, pytań kontrolnych, pytań na kolokwia oraz egzaminy zarówno praktyczne, jak i kończące rok. Prowadzę również zajęcia obliczeniowe obejmujące zakres chemii ogólnej. Dla kierunków Farmaceutycznego, Analitycznego i Drug Discovery and Development opracowałem i prowadzę seminaria oraz ćwiczenia praktyczne z zakresu analizy instrumentalnej, związanej z zastosowaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC w naukach farmaceutycznych. Na potrzebę tych zajęć napisałem rozdział w skrypcie Talik P, Hubicka U. Termoanaliza, w: Rzeszutko W, Krzek J, Opoka W, Hubicka U, Somogyi E. Wybrane ćwiczenia z analizy instrumentalnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydanie III, Kraków 2017.

W całej działalności dydaktycznej jestem opiekunem 15 i promotorem 11 prac magisterskich na kierunkach Chemia, Farmacja i Drug Development and Discovery. W ramach prowadzonych prac realizowałam tematykę bezpośrednio związaną z prowadzoną tematyką badawczą. We wszystkich pracach dbałem o wysoki poziom naukowy i możliwość włączenia otrzymanych wyników do artykułów naukowych.

Jestem wykładowcą na studiach podyplomowych „Osoba Wykwalifikowana w kontroli jakości produktu leczniczego i wyrobu medycznego”, realizowanego przez Studium Podyplomowe Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Ponadto, w okresie od 08.07.2019 do 15.07.2019 oraz 19.07.2021 do 23.07.2021 sprawowałem opiekę nad praktyką wakacyjną studentów Petera Harleya z Egiptu oraz Liliany Silva z Hiszpanii, w ramach wymiany Student Exchange Program (SEP).

6.2 Szkolenia i wykłady dla farmaceutów

Jestem autorem wykładów w całorocznym cyklu posiedzeń naukowo-szkoleniowych:

1) Akademia Farmaceuty organizowana przez Ośrodek Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Sanofi-Aventis:

- wykłady w ramach V edycji Akademii Farmaceuty 2017 – Kurs 1.12. pod wiodącym tytułem: Komunikacja i informacja o leku w pracy aptekarza.

- wykłady w ramach VI edycji Akademii Farmaceuty 2018 – Kurs 1.13. pod wiodącym tytułem: Wpływ czynników fizjologicznych i patologicznych na działanie leków (indywidualizacja farmakoterapii).

- wykłady w ramach VII edycji Akademii Farmaceuty 2019 – Kurs 1.5. pod wiodącym tytułem: Postępy farmakoterapii chorób układu pokarmowego.

- wykłady w ramach VIII edycji Akademii Farmaceuty 2020 – Kurs 1.12. pod wiodącym tytułem: Komunikacja i informacja o leku w pracy aptekarza – wybrane aspekty teoretyczne i praktyczne.

- wykłady w ramach IX edycji Akademii Farmaceuty 2021 – Kurs 1.31. pod wiodącym tytułem: Metody zwiększania skuteczności i bezpieczeństwa leczenia farmakologicznego.

2) Webinaria z Ekspertem:

- „O rozmowie jelit z mózgiem i mózgu z jelitami” – 15 czerwca 2021.

- „Zaburzenia czynnościowe układu pokarmowego” – 14 września 2021.

3) Webinaria na zaproszenie Śląskiej Izby Aptekarskiej:

- "Makrogole 4000: osmotyczny środek przeczyszczający - budowa i mechanizm działania"
– 25 listopada 2020.

- „Mikrobiota jelitowa” – 2 grudnia 2020.

6.3 Szkolenia i wykłady dla medyków

Jestem autorem wykładów w cyklu posiedzeń naukowo-szkoleniowych pod wiodącym tytułem:

- „Współczesne spojrzenie na leczenie bólu w zapaleniach gardła” – Oblicza współczesnej interny i medycyny rodzinnej 2019 – 15 czerwca 2019 Rzeszów.

- „Racjonalna farmakoterapia w otolaryngologii czyli jak leczyć skutecznie i bezpiecznie”
– Zapalenie zatok przynosowych – 29 listopada 2019 Kraków.

6.4 Publikacje popularyzujące naukę

Talik P. Substancje biomimetyczne: fascynujące siedmiowęglowe cukry awokado. *Panacea* 2019;1:30-31.

Talik P, Talik A. Owoce acai - fascynujący potencjał antyoksydacyjny z dorzecza Amazonii. *Panacea* 2020;3-4:34-38.

Talik P, Talik A. Goji - fascynujące owoce znane od wieków. *Panacea* 2021;1-2:34-37.

6.5 Rozdziały w skryptach

Talik P, Hubicka U. Termoanaliza, w: Rzeszutko W, Krzek J, Opoka W, Hubicka U, Somogyi E. Wybrane ćwiczenia z analizy instrumentalnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydanie III, Kraków 2019.

6.6 Wystąpienia ustne na seminariach naukowych

Wykład, na zaproszenie organizatorów IV Seminarium Analizy Termicznej „Nowe Trendy, Innowacje i Najnowsze Rozwiązania w Analizie Termicznej (Poznań, 19 września 2019), miał tytuł „Badanie uwodnionych hydroksypropylo celuloz metodą DSC”.

6.7 Działalność organizacyjna

- Członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej CM UJ w latach 1995-1998
- Członek Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w latach 2012-2016
- XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja w Polsce – Perspektywy Nauki i Zawodu” Kraków, 19-22.10.2017.
- Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego – PTChem
- Członek Polskiego Towarzystwa Kalorymetrii i Analizy Termicznej – PTKAT

6.8 Kursy, szkolenia, warsztaty o charakterze naukowym

- Summer school of calorimetry – „2nd Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry (CEEC-TAC2)” 27-30.08 2013 Vilnius, Lithuania.
- Summer school of calorimetry – “The 11th European Symposium on Thermal Analysis and Calorimetry (ESTAC 11) 17-21.08 2014 Dipoli Congress Center, Espoo, Finland.
- Fitoterapia górnych dróg oddechowych – Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych – Lublin 23.11 2017.
- Farmakoterapia w schorzeniach sercowo-naczyniowych – Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych – Lublin 23.11 2017.
- 2nd Workshop on Magnesium Neuroscience and Nutrition in current COVID-19 Pandemia – Online Virtual Meeting – May 28th-29th, 2021.

6.9 Uczestnictwo w szkoleniach wspomagających jakość kształcenia

- „Ucz i trenuj. Narzędzia aktywizujące w pracy nauczyciela akademickiego” – Tydzień Jakości Kształcenia 2017 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 28.11 2017.

- „Wystąpienia publiczne’ – Tydzień Jakości Kształcenia 2017 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 30.11 2017.

- „Szkolenie. Jakość kształcenia na Wydziale Farmaceutycznym” – Tydzień Jakości Kształcenia 2019 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 10.04 2019.

- „III Debata Jakości Kształcenia na Wydziale Farmaceutycznym” – Tydzień Jakości Kształcenia 2019 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 12.04 2019.

- „Seminarium: Jak uczyć, by nauczyć? – sprawdzone strategie kształcenia” – Tydzień Jakości Kształcenia 2021 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 12.04 2021.

- „Metody aktywizujące w kształceniu zdalnym” – Tydzień Jakości Kształcenia 2021 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 13.04 2021.

- „Prawo autorskie w zdalnym nauczaniu” – Tydzień Jakości Kształcenia 2021 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 14.04 2021.

- „Czego nie wiesz o MS Teams, a na pewno chciałbyś wiedzieć” – Tydzień Jakości Kształcenia 2021 na Uniwersytecie Jagiellońskim – Kraków 14.04 2021.

7. Nagrody i odznaczenia

Nagroda z okazji jubileuszu 30–lecia pracy zawodowej.