UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE "IULIU HAŢIEGANU"CLUJ-NAPOCA

ŞCOALA DOCTORALĂ

CLUJ-NAPOCA 2013

EDITURA MEDICALĂ
UNIVERSITARĂ
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Calixarene utilizate ca selectori chirali în analiza unor anticoagulante orale

Doctorand **Ioana – Daria Tiuca**

Conducător ştiinţific **Prof. dr. Radu Oprean**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
IULIU HAŢIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE 13

STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

1. Principiile chiralităţii 17

1.1. Importanţa chiralităţii în domeniul farmaceutic 18

2. Utilizarea calixarenelor ca selectori chirali 21

2.1. Introducere către calixarene 21

2.2. Calixarene în domeniul farmaceutic 23

2.3. Calixarene în tehnici de separare 25

2.3.1. Calixarene adăugate la faza mobilă

2.3.2. Faze staţionare pe bază de calixarene

2.4. Calixarene în enantioseparare 26

2.5. Calixarene în alte tehnici chirale 28

3. Analiza chirală a anticoagulantelor orale 31

3.1. Anticoagulante cumarinice 31

3.1.1. Activitatatea enantiomerilor anticoagulantelor

3.2. Separarea prin cromatografie de lichide 34

3.3. Separarea prin tehnici elecroforetice 36

CONTRIBUŢII PERSONALE

1. Obiective 41

2. Studiul 1 – Studiu ATR-IR şi Raman asupra interacţiunii dintre calixarene şi anticoagulante orale 43

2.1. Introducere 43

2.2. Materiale şi metode 44

2.2.1. Materiale

2.2.2. Simulări computaţionale

2.2.3. Spectroscopie IR şi Raman (metode)

2.3. Resultate şi discuţii 46

2.3.1. Aspecte teoretice

2.3.2. Rezultate practice şi discuţii

2.4. Concluzii 52

3. Studiul 2 – Enantiorecunoaşterea warfarinei prin analiză multivariată, utilizând *p*-tert-butil-calix[6]arena ca selector chiral 53

3.1. Introducere 53

3.2. Materiale şi metode 54

3.2.1. Materiale

3.2.2. HPLC chiral

3.2.3. Analiza multivariată

3.3. Resultate şi discuţii 55

3.4. Concluzii 58

4. Studiul 3 – Optimizarea enantioseparării HPLC a anticoagulantelor orale 59

4.1. Introducere 59

4.2. Materiale şi metode 59

4.2.1. Materiale

4.2.2. Metode HPLC

4.3. Resultate şi discuţii 60

4.4. Concluzii 64

5. Studiul 4 - Prepararea şi caracterizarea unor faze staţionare pentru metode lichid şi electro-cromatografice 65

5.1. Introducere 65

5.2. Materiale şi metode 65

5.2.1. Materiale

5.2.2. Metode

5.3. Resultate şi discuţii 65

5.4. Concluzii 72

6. Concluzii generale 73

7. Originalitatea şi contribuţiile inovative 75

REFERINŢE 77

INTRODUCERE

Teza de doctorat intitulată ***"Calixarene utilizate ca selectori chirali în analiza unor anticoagulante orale"*** reprezintă un amplu studiu despre importanţa chiralităţii în analiza medicamentelor şi, mai concret, despre utilizarea selectorilor chirali care formează o cavitate în enantioanaliza unor compuşi model.

Scopul acestei lucrări a fost de a dezvolta metode simple şi eficiente pentru detecţia selectivă şi/sau pentru separarea enantiomerilor a două anticoagulante model (warfarina şi acenocumarolul), utilizând derivaţi de calixarene ca şi selectori chirali.

Calixarenele[1-5] sunt molecule cunoscute de peste 60 de ani, dar acestea au câştigat atenţia cercetătorilor doar în ultimele două decade. Acestea reprezintă oligomeri ciclici ce provin de la un fenol şi formaldehidă, care prezintă capacitatea de a forma complecşi de incluziune cu diferiţi ioni şi molecule mici. Datorită similarităţii cu alţi selectori chirali (forma moleculei, capacitatea de complexare), cum sunt ciclodextrinele sau eterii coroană, calixarenele au fost utilizate în enantioseparare şi în alte tehnici de separare, dovedind chiar unele avantaje faţă de selectorii chirali menţionaţi mai sus.

Prezenta teză este structurată în două secţiuni principale, prima fiind un vast studiu de literatură, care reprezintă baza teoretică a prezentei lucrări. A doua secţiune prezintă cititorului toate experimentele si contribuţiile personale aduse comunităţii ştiinţifice, metodele dezvoltate şi este structurată în patru studii principale. In ***primul studiu*** se observă interacţiunea dintre diferiţi derivaţi de calixarene, având diferite mărimi ale cavităţii, substituite sau nu, si anticoagulantele alese. Această etapă a fost importantă pentru următoarele studii. Astfel, ca şi rezultat, ***al doilea studiu*** al tezei constă în elaborarea unei metode eficiente şi rapide pentru enantiorecunoaşterea warfarinei de către *p*-terţ-butil-calix[6]arena asimetrică. ***Al treilea studiu*** a constat într-un scurt screening HPLC chiral pentru enantioseparareа celor două anticoagulante, având ca scop separarea acestora în modul preparativ, deoarece enantiomerii au fost necesari în timpul studiilor, chiar în studiul al doilea. Acest studiu s-a prezentat cu rezultate foarte bune din punct de vedere al timpilor de analiză scurţi

şi rezoluţiilor de separare mari. In final, ***al patrulea studiu*** prezintă prepararea şi caracterizarea unor faze staţionare co-polimerice pe bază de calix[6]arenă utilizate în principal în micro-LC, care au prezentat retenţie pentru warfarină. De asemenea, retenţia s-a dovedit a se datora prezenţei unităţii calixarenice în interiorul fazei staţionare.

Această teză este incheiată cu aspecte generale despre contribuţiile inovative personale aduse comunităţii ştiinţifice şi, de asemenea, cu nişte concluzii generale despre prezenta cercetare doctorală.

CUVINTE CHEIE: Calixarene, Anticoagulante orale, Enantiodiscriminare, Selectori chirali

1. Studiu ATR-IR şi Raman asupra interacţiunii dintre calixarene şi anticoagulante orale

In acest capitol se descrie observarea şi caracterizarea interacţiunii dintre diferiţi derivaţi de calixarene şi cele două anticoagulante luate în studiu, warfarina şi acenocumarolul.

Derivaţii de calixarene luaţi în lucru au fost *p*-terţ-butil-calix[4]arena (C4), *p*-terţ-butil-calix[6]arena (C6) şi *p*-terţ-butil-calix[8]arena (C8) şi etil-esterii lor (C4Es4, C6Es6, C8Es8).

Soluţii conţinând amestecuri între fiecare derivat calixarenic şi fiecare anticoagulant au fost preparate în cloroform în rapoarte stoechiometrice de 1:1, apoi solventul a fost evaporat. Reziduurile obţinute au fost supuse analizei şi caracterizate prin spectroscopie în infraroşu (IR) şi Raman.

Rezultatele arată cea mai bună interacţiune din punct de vedere al celei mai mari deplasări a benzilor IR pentru cuplul C4-acenocumarol şi pentru cuplul C4-warfarină. In ceea ce priveşte rezultatele spectroscopice Raman, cea mai bună interacţiune interpretată prin prisma celei mai mari deplasări de benzi Raman a fost în cazul derivaţilor C8 şi C6, cu mici diferenţe.

In acord cu datele prezentate în literatură, complecşii C4-anticoagulante au fost interpretaţi ca fiind complecşi externi, din cauza cavităţii mai mici a acestui derivat, comparativ cu celelalte calixarene luate în studiu, dar şi din cauza rigidităţii mai ridicate a calix[4]arenelor. De asemenea, studii ^{1}H-RMN au arătat o flexibilitate conformaţională mai ridicată a calix[6]arenelor comparativ cu celelalte, ceea ce a dus la concluzia că probabil cel mai stabil complex de tip „gazdă-oaspete" este format între C6 şi cele două anticoagulante. Luând în considerare deplasările de benzi caracteristice, interacţiunile necovalente formate între liganzi şi analiţi au fost probabil de tip π-π sau de tip hidrofob.

2. Studiu asupra enantiorecunoaşterii warfarinei prin analiză multivariată, utilizând *p*-terţ-butil-calix[6]arena ca selector chiral

Acest capitol descrie capacitatea de recunoaştere a *p*-terţ-butil-calix[6]arenei (C6) faţă de enantiomerii warfarinei. Derivatul de calixarenă a fost ales în urma rezultatelor obţinute şi descrise anterior.

Pentru aceasta s-a ales o metodă chemometrică ce utilizează analiza multivariată a datelor. Soluţii cloroformice conţinând concentraţii constante de C6 şi o concentraţie totală a warfarinei fixată la aceeaşi valoare, cu rapoarte enantiomerice diferite, variind de la 10% la 90% în (R)-(+)-warfarină, au fost preparate şi apoi aplicate pe plăci HPTLC. Spectrele lor de reflectanţă au fost apoi înregistrate în domeniul UV (200-400 nm).

Diferenţele mici obţinute între spectrele UV sunt datorate interacţiunilor diferite între sectorul chiral şi enantiomerii warfarinei şi au putut fi cuantificate prin analiză multivariată. Valorile numerelor de undă între 200 şi 400 nm şi concentraţia totală a warfarinei au fost utilizate ca factori pentru a prezice fracţia enantiomerică a (R)-(+)-warfarinei din probe necunoscute.

Metoda a fost utilizată pentru a prezice raportul enantiomeric al warfarinei în soluţii extractive obţinute din probe reale (tablete). Metoda a fost, de asemenea, comparată cu o metodă de separare chirală utilizată în mod curent în analiza medicamentelor (HPLC).

Această metodă chemometrică bazată pe analiza multivariată a datelor spectrale prezintă timpi de analiză mai scurţi, este eficientă, iar prin utilizarea unor volume mai mici de solvenţi, costurile de analiză sunt mult reduse.

3. Optimizarea enantioseparării HPLC a anticoagulantelor orale

In acest capitol se descrie optimizarea enantioseparării warfarinei şi acenocumarolului prin HPLC, utilizând faze staţionare polizaharidice pe bază de celuloză si/sau amiloză, clorurate sau nu. Fazele staţionare folosite în acest studiu au fost coloanele chirale HPLC: Sepapak-3® (in prezent comercializată sub denumirea Lux-Amylose-2®), Chiralcel OD-H® şi Chiralpak IC®.

Principalul obiectiv al acestui studiu a fost de a utiliza metoda optimizată în modul HPLC preparativ, pentru a obţine enantiomerii puri ai fiecărui anticoagulant.

Enantiosepararea celor două anticoagulante a fost obţinută cu o rezoluţie a separării de peste 3, în faze mobile cu doi aditivi (acid şi bazic) în cazul coloanelor Sepapak-3 şi Chiralcel OD-H. In cazul Chiralpak IC, o rezoluţie enantiomerică de peste 4 a fost obţinută în fază normală, utilizând hexan:isopropanol (70:30) ca fază mobilă, fără a-i ajusta compoziţia cu aditivi acizi sau bazici. Acesta a fost un factor determinant în alegerea fazei staţionare la trecerea în modul HPLC preparativ.

In final, separarea preparativă s-a realizat pentru ambele anticoagulante într-o fază mobilă cu hexan:tetrahidrofuran, fără a pierde rezoluţie, datorită solubilităţii mai bune a analiţilor în tetrahidrofuran decât în isopropanol.

4. Prepararea şi caracterizarea unor faze staţionare pentru metode lichid şi electro-cromatografice

In acest capitol se descrie prepararea unor faze staţionare co-polimerice pe bază de tris-crotil-*p*-terţ-butil-calix[6]arenă, utilizând ca şi co-monomeri acidul metacrilic sau 4-vinil-piridina.

Fazele staţionare au fost obţinute prin prepararea unui amestec de polimerizare format dintr-un iniţiator, un cross-linker, cei doi monomeri şi solventul, care apoi a fost introdus la temperatură (60°C) pentru a polimeriza.

Polimerii obţinuţi au fost caracterizaţi prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) şi spectroscopie în infraroşu (IR), din interiorul şi/sau exteriorul capilarelor de silice.

Rezultatele SEM au arătat diferenţe de formă şi dimensiune între particulele polimerilor simpli, obţinuţi doar cu acid metacrilic sau 4-vinil-piridină, şi cele ale co-polimerilor în care derivatul de calix[6]arena a fost inclus. Mai mult, analiza SEM a secţiunilor transversale de capilare a arătat o dependenţă de tipul solventului utilizat şi de concentraţia calixarenei în amestecul de polimerizare.

Rezultatele IR au demonstrat, de asemenea, o dependenţă de tipul de cross-linker utilizat în procesul de polimerizare. De asemenea, implicarea derivatului de crotil-calixarenă în polimerizare a fost demonstrată prin analiză IR.

Fazele staţionare au fost studiate prin prisma retenţiei warfarinei pe acestea în micro-LC. Acestea au demonstrat o retenţie mai bună în mediu acid şi, de asemenea, prin utilizarea unei faze mobile cu un conţinut mai ridicat de tampon apos.

5. Concluzii generale

Scopul prezentului studiu a fost de a discrimina enantiomerii a două anticoagulante larg utilizate la nivel mondial: warfarina şi acenocumarolul, utilizând derivaţi de calixarene ca şi selectori chirali. Rezultatele preliminare obţinute prin studii spectrale IR şi Raman au arătat o interacţiune bună între cele două molecule şi diferite calix[4]-, -[6]- şi –[8]arene, în special cu *p*-terţ-butil-calix[6]arena.

Prin analiză multivariată s-a dovedit capacitatea de enatiorecunoaştere a *p*-terţ-butil-calix[6]arenei asimetrice faţă de enantiomerii warfarinei. De asemenea, enantiomerii warfarinei şi acenocumarolului au fost colectaţi prin HPLC preparativ utilizând o fază staţionară chirală polizaharidică, Chiralpak IC®.

De asemenea, am preparat faze staţionare polimerice pe bază de calix[6]arene pentru micro-LC. Diferite tipuri de faze staţionare au fost obţinute, în funcţie de solventul utilizat, concentraţia monomerilor, iniţiator sau tipul de cross-linker. Fazele staţionare obţinute au dovedit o retenţie bună pentru warfarină, în special în mediu acid.

REFERINȚE

1. Gutsche CD. Calixarenes: an Introduction. London: Royal Society of Chemistry, 2008:24-237.
2. Asfari Z, Bohmer V, Harrowfield J, Vicens J. Calixarenes 2001. Boston: Kluver Academic, 2001:1-12.
3. Vicens J, Bohmer V. Calixarenes A Versatile Class of Macrocyclic Compounds. Boston: Kluver Academic, 1991:3-11;65-86;149-260.
4. Gutsche CD. Calixarenes Revisited. London: Royal Society of Chemistry, 1998:7-16;41-45;135-208.
5. Mandolini L, Ungaro R. Calixarenes in Action. London: Imperial College Press, 2000:37-61;241-264.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE “IULIU HAŢIEGANU”CLUJ-NAPOCA

ŞCOALA DOCTORALĂ

CLUJ-NAPOCA 2013

EDITURA MEDICALĂ
UNIVERSITARĂ
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ NAPOCA

SUMMARY OF PH.D. THESIS

Calixarenes used as chiral selectors in the analysis of oral anticoagulants

PhD. Student **Ioana – Daria Tiuca**

Thesis supervisor **Prof. dr. Radu Oprean**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION 13

LITERATURE REVIEW

1. Principles of chirality 17

1.1. Importance of chirality in pharmaceutical field 18

2. Use of calixarenes as chiral selectors 21

2.1. Introduction to calixarenes 21

2.2. Calixarenes in pharmaceutical field 23

2.3. Calixarenes in separation techniques 25

2.3.1. Calixarenes as mobile phase additives

2.3.2. Calixarenes based stationary phases

2.4. Calixarenes in enantioseparation 26

2.5. Calixarenes in other chiral techniques 28

3. Chiral analysis of oral anticoagulants 31

3.1. Coumarinic anticoagulants 31

3.1.1. Enantiomers anticoagulant activity

3.2. Separation by liquid chromatography 34

3.3. Separation by electrodriven techniques 36

PERSONAL RESEARCH

1. Objectives 41

2. Study 1 - ATR-IR and Raman study about the interaction between calixarenes and oral anticoagulants 43

2.1. Introduction 43

2.2. Materials and methods 44

2.2.1. Materials

2.2.2. Computational simulations

2.2.3. IR and Raman spectroscopy (methods)

2.3. Results and discussions 46

2.3.1. Theoretical aspects

2.3.2. Practical results and discussions

2.4. Conclusions 52

3. Study 2 - Study of warfarin enantiorecognition by multivariate analysis, using *p*-tert-butyl-calix[6]arene as chiral selector 53
3.1. Introduction 53
3.2. Materials and methods 54
3.2.1. Materials
3.2.2. Chiral HPLC
3.2.3. Multivariate analysis
3.3. Results and discussions 55
3.4. Conclusions 58
4. Study 3 - Optimisation of HPLC enantioseparation of oral anticoagulants 59
4.1. Introduction 59
4.2. Materials and methods 59
4.2.1. Materials
4.2.2. HPLC methods
4.3. Results and discussions 60
4.4. Conclusions 64
5. Study 4 - Preparation and characterization of stationary phases for liquid and electro-driven techniques 65
5.1. Introduction 65
5.2. Materials and methods 65
5.2.1. Materials
5.2.2. Methods
5.3. Results and discussions 65
5.4. Conclusions 72
6. General conclusions 73
7. Originality and innovative contributions 75

REFERENCES 77

INTRODUCTION

The Ph.D. thesis entitled ***"Calixarenes used as chiral selectors in the analysis of oral anticoagulants"*** represents an extensive study about the importance of chirality in drug analysis and, more specifically, the use of cavity forming chiral selectors in the enantioanalysis of some model compunds.

The aim of the present work was to develop simple and efficient methods of selective detection and/or separation of the enantiomers of two selected model anticoagulants (warfarin and acenocoumarol), using calixarene derivatives as chiral selectors.

Calixarenes[1-5] are molecules known for over 60 years, but they gained the attention of scientific researchers only since two decades. They are oligomers coming from a phenol and formaldehyde, which present the capacity to form inclusion complexes with different ions and small molecules. Due to the similarity to other chiral selectors (shape of molecule, complexation capacity), like cyclodextrins and crown ethers, calixarenes have been used in enantioseparation and other separation techniques, proving even some advantages over the abovementioned selectors.

The present thesis is structured in two main sections, the first section being a wide literature review which represents the theoretical basis of the present work. The second section represents and shows to the reader all the experiments and personal contributions to the scientific community, the methods developed and it is structured in four main studies. The ***first study*** observes the interaction between different calixarene derivatives, of different cavity sizes, substituted or not, and the selected anticoagulants. This phase was important for the next studies. Thus, as a result, the ***second study*** of the thesis consisted in the developement of an efficient and fast method of enantiorecognition of warfarin enantiomers by asymmetrical *p*-tert-butyl-calix[6]arene. The ***third study*** consisted in a short chiral HPLC screening for the enantioseparation of the two anticoagulants, where the aim was to obtain results in preparative mode, beacause enantiomers were needed cross the research, even in stage two. This study came with very good results in terms of fast analysis times and

high separation resolutions. Finally, the ***fourth study*** presents the preparation and characterization of co-polymeric calix[6]arene based stationary phases utilized mainly in micro-LC, which presented retention for warfarin. We also proved that the retention was due to the presence of the calixarene moiety in the stationary phase.

The thesis is concluded with some general aspects about the personal innovative contributions to the scientific community and, of course, some general conclusions about the present doctoral research.

KEY WORDS: Calixarenes, Oral anticoagulants, Enantiodiscrimination, Chiral selectors

1. ATR-IR and Raman study about the interaction between calixarenes and oral anticoagulants

In this chapter we describe the observation and characterization of interaction between different calixarene derivatives and the two oral anticoagulants, warfarin and acenocoumarol.

Calixarene derivatives taken in study were *p*-tert-butyl-calix[4]arene (C4), *p*-tert-butyl-calix[6]arene (C6) and *p*-tert-butyl-calix[8]arene (C8) and their ethyl-ester-derivatives (C4Es4, C6Es6, C8Es8).

Solutions of mixtures between each calixarene derivative and each anticoagulant in a stoichiometric ratio of 1:1 were prepared in chlorform and then the solvent was evaporated. The obtained residues were analysed and characterised by infrared (IR) and Raman spectroscopy.

The results showed the best interaction in terms of higher band shift in IR spectra for the C4-acenocoumarol couple and for C4-warfarin couple. As for the Raman spectroscopic results, the best interaction in terms of highest Raman band shift was interpreted for the C8 and C6 derivatives, with slight differences.

According to literature data, the C4-anticoagulant complex was interpreted as an external complex, because of the smaller cavity of the calixarene derivative, compared to the others taken in study and, also because of the higher rigidity of the calix[4]arene molecule. Also literature reports ^{1}H-NMR studies which show the higher conformational flexibility of calix[6]arene compared to the others, which suggested the conclusion that the most stable “host-guest” type complex formed was between C6 and the two anticoagulants. View the characteristic band shifts, the non-covalent interactions formed between the ligands and the analytes were probably of π-π type and/or hydrophobic type.

2. Study of warfarin enantiorecognition by multivariate analysis, using *p*-tert-butyl-calix[6]arene as chiral selector

This chapter describes the study of recognition capacity of *p*-tert-butyl-calix[6]arene (C6) towards warfarin enantiomers. The calixarene derivative was chosen prior the results obtained and described previously.

A chemometric method based on multivariate analysis was chosen. Chloroformic solutions containing a constant concentration of C6 and a total concentration of warfarin kept at the same level, with enantiomeric ratios varying from 10% to 90% (R)-(+)-warfarin, were prepared and applied on HPTLC plates. Their UV (200-400 nm) reflectance spectra were recorded.

The slight differences which resulted between the obtained UV spectra are given by the different interaction between the chiral selector and the warfarin enantiomers and they were quantified by multivariate analysis. The values of wavenumbers between 200 and 400 nm and the total concentration of warfarin were used as factors to predict the enantiomeric ratio of (R)-(+)-warfarin in unknown samples.

The method was used to predict the enantiomeric ratio of warfarin in extractive solutions from real samples (tablets). The method was also compared with a currently chiral separation method (HPLC) used in drug analysis.

This chemometric method based on the multivariate analysis of spectral data presents faster analysis times, is more efficient and by using much smaller amounts of reagents, the costs are much smaller.

3. Optimisation of HPLC enantioseparation of oral anticoagulants

In this chapter we describe the optimisation of enantioseparation of warfarin and acenocoumarol in HPLC, by using polysaccharidic stationary phases, based on cellulose and amylose, chlorinated or not. The stationary phases used in this study were commercial HPLC analytical columns: Sepapak-3® (presently commercialized under the name of Lux-Amylose-2®), Chiralcel OD-H® and Chiralpak IC®.

The main purpose of this study was to use the resulted optimized method in preparative HPLC mode, in order to obtain pure single enantiomers of each anticoagulant.

The enantioseparation of the two anticoagulants was obtained at a resolution of separation over 3, in mobile phases with two additives (acidic and basic) in case of Sepapak-3 and Chiralcel OD-H columns. In case of Chiralpak IC, an enantiomeric resolution over 4 was obtained in normal phase mode, by using hexane:isopropanol (70:30), without adjusting the composition of the mobile phase with acidic and/or basic additives. This was an important factor in deciding the stationary phase, when crossing to preparative HPLC mode.

Finally the preparative separation was realized for both anticoagulants by using a hexane:tetrahydrofurane mobile phase, without loss of resolution, due to the better solubility of the analytes in tetrahydrofurane than in isopropanol.

4. Preparation and characterization of stationary phases for liquid and electro-driven techniques

In this chapter we describe the preparation of different co-polymeric stationary phases based on tris-crotyl-*p*-tert-butyl-calix[6]arene, using as co-monomere methacrylic acid or 4-vynil-pyridine.

The stationary phases were obtained by forming a polymerization mixture from a radical initiator, a cross-linker, the monomers and the solvent, which was then placed to polymerize at temperature (60°C).

The obtained polymers were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and infrared (IR) spectroscopy, inside and/or outside silica capillaries.

The SEM results showed differences in shapes and sizes between simple polymer particules obtained only with methacrylic acid or 4-vynil-pyridin and co-polymers in which calix[6]arene derivative unit was included. Moreover, the SEM analysis of transversal sections of capillaries revealed a dependence on the type of solvent used and on the concentration of the calixarene moiety.

The IR results showed also a dependence on the type of cross-linker used in the polymerization process. Also, the implication of the calixarene derivative in the polymerization process was established by IR analysis.

The obtained stationary phases were studied prior their retention towards warfarin in micro-LC. They showed better retention in acidic media and also, by using a mobile phase with a higher content of aqueous buffer.

5. General conclusions

The aim of the present study was to separate the enantiomers of two widely used oral anticoagulants: warfarin and acenocoumarol, using calixarene derivatives as chiral selectors. Preliminary results obtained in IR and Raman spectral studies showed a good interaction between the two molecules and different calix[4]-, [6]- and [8]arene derivatives, especially with *p*-tert-butyl-calix[6]arene.

By multivariate analysis we proved the enantiorecognition capacity of asymmetrical *p*-tert-butyl-calix[6]arene towards warfarin enantiomers. Enantiomers of warfarin and acenocoumarol were also collected by preparative HPLC using a commercial chlorinated polysaccharidic chiral stationary phase, Chiralpak IC.

We have also prepared stationary phases for micro-LC based on calix[6]arene polymers. Different types of stationary phases were obtained, depending on the solvent used, on the monomer concentration, initiator or type of cross-linker. The obtained stationary phases have proved good retention towards warfarin, especially in acidic media.

REFERENCES

1. Gutsche CD. Calixarenes: an Introduction. London: Royal Society of Chemistry, 2008:24-237.
2. Asfari Z, Bohmer V, Harrowfield J, Vicens J. Calixarenes 2001. Boston: Kluver Academic, 2001:1-12.
3. Vicens J, Bohmer V. Calixarenes A Versatile Class of Macrocyclic Compounds. Boston: Kluver Academic, 1991:3-11;65-86;149-260.
4. Gutsche CD. Calixarenes Revisited. London: Royal Society of Chemistry, 1998:7-16;41-45;135-208.
5. Mandolini L, Ungaro R. Calixarenes in Action. London: Imperial College Press, 2000:37-61;241-264.