

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Enantiosepararea substanțelor bioactive chirale

---

Doctorand **Anamaria Ziller (Podar)**

---

Conducător de doctorat prof.dr. **Radu Oprean**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>11</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>13</b>
<b>1. Enantiomerii și importanța lor biologică</b>	<b>15</b>
1. 1. Noțiunea de chiralitate	15
1. 2. Amestec racemic. Enantiomeri	15
<b>2. Electroforeza capilară</b>	<b>17</b>
2. 1. Noțiuni teoretice	17
2.1.1. Mobilitatea electroforetică	17
2.1.2. Migrarea electroforetică	18
2.1.3. Viteza de migrare	19
2. 2. Aparatură și materiale	19
2.2.1. Coloana de separare	19
2.2.2. Mediul de migrare. Electroliți	20
2.2.3. Sistemul de injectare a probei	20
2.2.4. Sursa de curent	21
2.2.5. Sistemul de detectare	21
2.2.6. Sistemul de achiziție, prelucrare și stocare a datelor	23
2.3. Selectorii chirali	24
2.3.1. Ciclodextrinele	25
2.3.2. Oligo-/Polizaharide nonciclice	30
2.3.3. Eteri ciclici tip "coroană"	31
2.3.4. Schimbători de ioni	31
2.3.5. Surfactanți chirali	32
2.3.6. Proteine	33
2.3.7. Antibiotice macrociclice	33
2.3.8. Sisteme duale de selectorii chirali	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>39</b>
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	<b>41</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>43</b>
<b>3. Studiul 1. Strategii de separare a AINS-uri prin electroforeză capilară</b>	<b>45</b>
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	48
3.3. Material și metodă	48
3.4. Rezultate	48
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	60

---

<b>4. Studiul 2. Separarea enantiomerilor de profeni prin CE folosind CD-native</b>	<b>63</b>
4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteza de lucru	66
4.3. Materiale și metodă	66
4.4. Rezultate	67
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	73
<b>5. Studiul 3. Discriminarea chirală a compușilor model folosind derivați de ciclodextrine</b>	<b>75</b>
5.1. Introducere	75
5.2. Ipoteza de lucru	75
5.3. Material și metodă	75
5.4. Rezultate	77
5.5. Discuții	80
5.6. Concluzii	82
<b>6. Studiul 4. Utilizarea unui sistem dual de selectori chirali pentru enantiosepararea AINS prin CE</b>	<b>83</b>
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteza de lucru	83
6.3. Materiale și metodă	83
6.4. Rezultate	84
6.5. Discuții	86
6.6. Concluzii	91
<b>7. Discuții generale</b>	<b>93</b>
<b>8. Concluzii generale</b>	<b>97</b>
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>101</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>103</b>

**Cuvinte cheie:** *electroforeză capilară, enantioseparare, AINS, selectori chirali, ciclodextrine, ibuprofen, ketoprofen.*

## INTRODUCERE

Prin prezenta teză de doctorat, intitulată "Enantiosepararea substanțelor bioactive chirale" am abordat problema medicamentelor care prezintă un centru de chiralitate și importanța găsirii unor metode simple și eficiente pentru separarea enantiomerilor.

Pornind de la ipoteza că majoritatea moleculelor utilizate în prezent în terapia medicamentoasă prezintă un centru de chiralitate și sunt în general sintetizate ca amestec racemic și ținând cont de diferențele farmacodinamice: absorbția, distribuție, legarea de proteine, afinitatea față de receptori, calea de metabolizare, respectiv proprietățile și potențialul efectului farmacologic, în multe cazuri în terapia medicamentoasă este de dorit utilizarea unui singur enantiomer în locul amestecului racemic.

Principala metodă de separare a enantiomerilor substanțelor bioactive chirale o reprezintă electroforeza capilară. Această metodă se bazează pe utilizarea unor selectori chirali capabili de recunoaștere chirală și formarea de complecși diaseroizomerici cu cei doi enantiomeri. Conform regulii de interacțiune în trei puncte a lui Dalglish, recunoașterea chirală depinde de cel puțin trei interacțiuni simultane între selector și selectand, și cel puțin una dintre aceste interacțiuni trebuie să fie stereoselectivă pentru a permite discriminarea enantiomerilor. Majoritatea CSs formează complecși de incluziune, legături covalente și legături electrostatice. Recunoașterea chirală este și rezultatul unor interacțiuni secundare: legături de hidrogen, legături dipol-dipol sau interacțiuni  $\pi$ - $\pi$ . Numărul CSs sintetizați este în continuă creștere, scopul utilizării acestora fiind reducerea timpului de analiză, creșterea selectivității sistemului și/sau creșterea sensibilității de detecție (scăderea limitei de detecție). Cei mai utilizați selectori chirali sunt de departe derivații de CD, dar găsirea a noi molecule reprezintă a provocare continuă pentru cercetare.

Teza este structurată în două părți, prima reprezentând stadiul actual al cunoașterii, iar cea de-a doua cuprinde contribuția personală. Scopul studiile experimentale a fost dezvoltarea și validarea unor noi metode de separare a enantiomerilor de ibuprofen și ketoprofen, prin CE și gasirea unui design experimental adecvat, în vederea îmbunătățirii selectivității și creșterea rezoluției.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Această primă parte a tezei are ca scop familiarizarea cititorului cu noțiunea de chiralitate, respectiv amestec racemic, enantiomeri. Această parte cuprinde și noțiuni teoretice de electroforeză capilară, descrierea aparatului și a materialelor necesare, urmate de clasificarea și descrierea selectorilor chirali utilizați în enantiosepararea compușilor chirali prin electroforeză capilară.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Principalul obiectiv al tezei a fost cercetarea comportamentului unor molecule medicamentoase chirale model în vederea obținerii unei discriminări chirale prin electroforeză capilară.

Unul din cele mai frecvent prescrise medicamente în practica medicală o reprezintă antiinflamatoarele nesteroidiene. AINS reprezintă o clasă de medicamente cu proprietăți antiinflamatoare, analgezice și antipiretice. Au ca mecanism de acțiune inhibarea ciclooxigenazei (COX-1 și COX-2), prin mecanism competitiv cu acidul arahidonic, împiedicând formarea prostaglandinelor (PG), prostaciclinelor (PC) și a tromboxanilor (TX). Din punct de vedere chimic majoritatea AINS sunt acizi organici slabi și se clasifică în acizi carboxilici, respectiv acizi enolici. În studiile efectuate am ales ca substanțe model doi profeni din grupa acidului 2-arilpropionic: *ibuprofenul* și *ketoprofenul*, care prezintă câte un centru de chiralitate în moleculă.

### Studiul 1. Strategii de enantioseparare a AINS prin CE

În decursul ultimelor decenii s-au dezvoltat și aplicat o mare varietate de metode de enantioseparare prin CE. Obiectivul primului studiu a fost realizarea unui vast studiu de literatură, prin accesarea unui număr mare de articole de cercetare și publicații de specialitate pe tema *enantioseparare, electroforeza capilară, selectori chirali și AINS*.

Baza de date a publicațiilor SCOPUS, respectiv Web of Knowledge (WOK), reprezintă o modalitate comună de accesare a informațiilor cu caracter științific privind cercetarea pe această temă. În principal căutările s-au focusat pe metodele dezvoltate și validate ce folosesc selector chiral, dar mai ales cele cu aplicabilitatea în domeniul farmaceutic.

Prima parte oferă o imagine de ansamblu asupra publicațiilor privind subiectul *electroforeza capilară și enantiosepararea*. Numărul mare de articole publicate în ultimele două decenii, arată interesul crescut față de acest subiect. Rezultatele au fost prezentate sub formă unor grafice care totodată ne arată și tendințele generale, astfel în următoarea perioadă este de așteptat o creștere a numărului de publicații.

A doua parte a studiului reprezintă o sinteză a celor mai noi strategii aplicate în enantiosepararea prin electroforeză capilară utilizând ca model de compuși chirali AINS. Am constatat că utilizarea AINS ca substanțe chirale reprezintă alegerea unui număr limitat de echipe de cercetare. Separarea enantiomerilor și a metaboliților chirali ai profenilor și creșterea rezoluției, nu este o problemă analitică ușor de rezolvat. Principiul de bază pentru a realiza separări chirale prin electroforeză este adăugarea unui aditiv optic activ, capabil să formeze interacțiuni stereoselective pentru a permite discriminarea enantiomerilor. 80% utilizează ca selector chiral ciclodextrinele. În continuare s-au discutat mecanismele de recunoaștere și rolul structurii chimice în recunoașterea moleculară, stabilitatea compușilor model în diferite soluții tampon și influența naturii electrolitului suport în modelarea moleculară.

## Studiul 2. Separarea enantiomerilor de profeni prin CE folosind ciclodextrine native

În acest studiu s-a pornit de la un plan teoretic privind enantiosepararea compușilor chirali model în mediu neapos (NACE) în prezența ciclodextrinelor native ( $\alpha$ -,  $\beta$ - și  $\gamma$ -CD), considerând că utilizarea unui sistem neapos poate reduce interacțiunea dintre analit și pereții capilarei și implicit duce la creșterea rezoluției. S-a realizat un design experimental ce presupunea utilizarea unei soluții de electrolit MeOH:ACN, iar pentru ajustarea pH-lui s-a utilizat un tampon format.

S-a utilizat un sistem de electroforeză capilară Agilent 3D (Agilent Technologies, Walbronn, Germania) echipat cu un detector spectrofotometric. S-au folosit capilare de silice de 50 $\mu$ m, L=48.5cm, l=40cm, fixate într-o incintă riguros termostată la 25°C. Pentru prelucrarea și stocarea datelor s-a folosit un program 3D-CE Chemsation Rev. A.08.03(843). Probele de amestec racemic de ibuprofen și ketoprofen au fost oferite de Terapia-Rambaxy S.A., Cluj-Napoca, România, iar ciclodextrinele a fost achiziționate de la Cyclolab Hungary.

Dat fiind masa moleculară mare și solubilitatea scăzută a ciclodextrinelor native în soluție neapoasă (MeOH/ACN), ex: solubilitatea  $\alpha$ -CD în MeOH < 0.3g/l, pentru creșterea solubilității CD, a fost necesară adăugarea de apă în soluția de electrolit, rezultând o soluție organică diluată (MeOH/H<sub>2</sub>O/ACN).

În urma analizelor efectuate s-a constatat ca separarea enantiomerilor este influențată atât de natura, cât și de concentrația selectorului chiral. Selectivitatea crescută a  $\alpha$ -CD native față de ibuprofen și ketoprofen, se datorează în primul rând dimensiunii reduse a cavității ciclodextrinei capabilă să încorporeze și să formeze legături puternice cu moleculele celor doi profeni. În cazul ibuprofenului se observa creșterea vitezei de migrare odată cu creșterea moleculei de CD, dar în aceleași condiții, în cazul ketoprofenului are loc un fenomen de decelerare, cu creșterea timpului de migrare, însă deși crește intensitatea semnalului, scade selectivitatea și rezoluția. Creșterea concentrației CD influențează mobilitatea electroforetică, prin creșterea timpului de retenție și totodată crește intensitatea semnalului electroforetic și scade suprafața picurilor.

Totodată am urmărit influența electrolitului asupra mobilității moleculelor, determinarea constantelor de afinitate și mobilitatea efectivă a complexilor analit-CD și evaluarea interacțiunilor dintre compușii chirali model și selectori. Raportul MeOH:ACN (v/v) influențează diferit enantiosepararea celor doi profeni, astfel în cazul ibuprofenului creșterea raportului are ca rezultat scăderea selectivității și a rezoluției, iar în cazul ketoprofenului, creșterea raportului duce la creșterea acestora. De remarcat că eficiența separării în mediul organic apos (MeOH/H<sub>2</sub>O/ACN) este foarte scăzută ( $R_s$ : 0.39-1.29), cel mai probabil datorită adsorbției analitului pe pereții capilarei.

pH-ul influențează atât fluxul electroosmotic prin creșterea EOF și poate modifica sarcina sau structura solutului. În general, se afirmă că un compusul este complet

protonat/deprotonat, dacă între pH și pKa este cel puțin o diferență de două unități. La valorile experimentale pH=5, putem considera că moleculele de profeni, fiind acizi slabi ( $pK_{a1}=4.6$ ,  $pK_{a2}=4.0$ ) se găsesc sub formă parțial disociată, iar în intervalul  $6.5 < \text{pH} < 6.95$  am luat în calcul forma complet deprotonată. S-a constatat că creșterea pH-ului duce la creșterea timpului de migrare, însă rezultatele obținute arată scăderea selectivității și a rezoluției.

### Studiul 3. Discriminarea chirală a compușilor model folosind derivați de ciclodextrine

S-au păstrat metodologia și aparatura descrise în studiul anterior, însă design-ul experimental a fost practic complet modificat. De această dată s-a lucrat în mediu apos, într-un tampon de acid fosforic 100mM / trietanolamină 20mM, la pH 2,5. Apa, ca și mediu de lucru în CE oferă avantaje importante, cum ar fi vâscozitatea redusă, lipsa volatilității, siguranța și prețul redus, însă utilizarea unui mediu apos poate crește semnificativ fluxul electroforetic (EOF).

Ca selectori chirali s-au utilizat doi derivați de ciclodextrine ca unic selector (*single CD system*), mai exact fie un derivat cationic: permetil-6-monoamino-6-monodeoxi- $\beta$ -ciclodextrină (PMMA- $\beta$ -CD), respectiv un derivat neutru: heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrină (TM- $\beta$ -CD) în diferite concentrații (0-40mM). Derivatizarea grupărilor hidroxil de pe inelul ciclodextrinei, modifică nu doar hidrofobicitatea, ci și sarcina ciclodextrinei, crescând capacitatea de complexare față de cei doi profeni neutri. Raportul de combinare este în egală măsură determinat și de mărimea analitului, care trebuie să fie în concordanță cu dimensiunea cavității ciclodextrinei. În cazul moleculelor mici de profeni derivații de  $\beta$ -CD sunt ideali ca dimensiune pentru formarea unui complex de incluziune aproape complet.

Utilizarea PMMA- $\beta$ -CD ca selector chiral s-a dovedit de succes. Timpul de migrare lung se datorează faptului ca PMMA- $\beta$ -CD fiind un derivat cationic de ciclodextrină și utilizând capilare de silice neacoperite, exista interacțiuni electrostatice și are loc aderența ciclodextrinei încărcate pozitiv de pereții capilarei. Acest lucru îl indică și tendința de "peak tailing", mai exact obținerea unor picuri asimetrice cu coadă.

În cazul utilizării TM- $\beta$ -CD, separarea enantiomerilor celor doi profeni a fost posibilă doar prin creșterea pH-ului soluției de electrolit și realizarea unei disocieri parțiale a analitului. Datele furnizate de aceste analize oferă informații importante privind influența diferitor factori asupra separării enantiomerilor de profeni.

Pentru a determina ordinea de migrare și identificarea enantiomerilor, simultan cu separarea amestecul racemic, s-a folosit o probă conținând doar enantiomerul S. S-a observat că ordinea de migrare a enantiomerilor este dependentă de afinitate pentru selectorul chiral, astfel în cazul utilizării PMMA- $\beta$ -CD ca selector chiral, migrează mai întâi enantiomerul R având o afinitate mai puternică, în timp ce enantiomerul S, cu afinitate mai mică, migrează mai târziu.

Structurile complecșilor formați între enantiomerii analitului și selectorul chiral a fost confirmată prin spectroscopie RMN. Concordanța dintre dimensiunea cavității CD și dimensiunea moleculei de ibuprofen permite formarea unui complex de incluziune aproape complet, gruparea isobutil, grupare hidrofobă, jucând un rol important în formarea complexului. În cazul ketoprofenului, gruparea benzoil, localizată adânc în interiorul cavității ciclodextrinei este gruparea chimică implicată în formarea complexului de incluziune, chiar dacă nu este adiacentă centrului de chiralitate. Formarea complexului de incluziune este o reacție reversibilă. Raportul molar de complexare între analit și ciclodextrină este 1:1.

#### **Studiul 4. Utilizarea unui sistem dual de selectori chirali pentru enantiosepararea AINS prin CE**

Acest studiu a avut ca obiectiv nu doar o nouă abordare, respectiv utilizarea celor doi derivați de ciclodextrină sub formă de sistem dual de selectori (*dual selector system*) pentru îmbunătățirea selectivității și a rezoluției separării enantiomerilor de profeni, dar și încercarea unui nou design experimental, pentru corectarea unor neajunsuri constatate în studiile anterioare.

Aparatura și metoda de lucru, sunt similare cu cele din studiile precedente. Pentru a evita interacțiunea electrostatică și aderarea ciclodextrinei încărcate pozitiv de pereții capilarei, s-au folosit capilare căptușite cu polivinil alcool (PVA), ceea ce elimină totodată și fluxul electroosmotic (EOF).

Utilizarea unui derivat cationic de ciclodextrină (PMMA- $\beta$ -CD), alături de un derivat neutru (TM- $\beta$ -CD) în diferite concentrații (0-40mM), ne-a permis evaluarea influenței unui astfel de sistem dual de selectori asupra enantioseparării unor amestecuri racemice de profeni neutri. Rezultatele obținute arată că valoarea selectivității și a rezoluției scade cu creșterea concentrațiilor celor două ciclodextrine, scădere ce poate fi atribuită faptului că atât derivatul cationic de ciclodextrină (PMMA- $\beta$ -CD), cât și derivatul neutru (TM- $\beta$ -CD) au același mod de legare față de enantiomeri formând complecși de incluziune, raport molar 1:1 și prezintă același tip de afinitate față de enantiomeri, fiind mai mare față de izomerul R, decât față de izomerul S.

Prin determinarea constantelor de afinitate prin metode matematice sau utilizând regresia liniară printr-o abordare în două etape, s-a arătat că afinitatea compușilor studiați este mai mare față de TM- $\beta$ -CD decât față de PMMA- $\beta$ -CD ( $K_{A.C1} < K_{A.C2}$ ), astfel, în cazul unui sistem dual de selector, TM- $\beta$ -CD produce un efect de decelerare asupra mobilității enantiomerilor de profeni, având ca rezultat creșterea timpului de migrare și chiar obținerea unei separări incomplete. Utilizarea unui sistem cu selector unic, care conține numai PMMA- $\beta$ -CD în concentrația optimă este de preferat pentru enantiosepararea celor doi profeni în condițiile experimentale date.



## CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Articolul publicat în Revista Farmacia, vol.64 din 2016, cuprinzând rezultatele primului studiu este singurul articol review din literatura ce tratează subiectul utilizării CD în electroforeza capilară și care prezintă exclusiv strategiile de enantioseparare ale antiinflamatoarelor nesteroidiene.

Interesul crescut față de moleculele din clasa AINS se datorează în primul rând importanței biofarmaceutice pe care acestea le prezintă, în prezent fiind medicamentele cel mai frecvent utilizate în tratamentul durerii acute și cronice. Utilizarea lor ca substanțe bioactive chirale a făcut posibilă dezvoltarea și validarea unor noi metode de separare a enantiomerilor, ce pot reprezenta potențiale modele pentru separarea altor compuși chirali în industria farmaceutică.

Rezultatele obținute prin modificarea unor factori ai design-ului experimental ce presupune utilizarea CD native ca selectori chirali, ne permit înțelegerea mecanismelor aflate la baza separarea enantiomerilor de ibuprofen și ketoprofen prin CE, precum și influența acestora asupra mobilității electroforetice și a selectivității.

Creșterea raportul MeOH:ACN (v/v) din soluția de electrolit influențează diferit eficiența enantioseparării celor doi profeni. Creșterea pH-ului duce la creșterea timpului de migrare și la scăderea selectivității și a rezoluției.

Natura CD-native influențează separarea enantiomerilor în primul rând prin capacitatea diferită de formare a complexilor de incluziune. Creșterea concentrației de CSs duce la creșterea timpului de retenție, datorită adsorbției CD pe pereții capilarei.

Modificarea soluției de electrolit, alegerea unui mediu apos și utilizarea PMMA- $\beta$ -CD ca unic selector chiral, s-au dovedit de succes. Prin utilizarea PMMA- $\beta$ -CD într-un interval larg de concentrație (0-40mM) s-a demonstrat că la concentrații extreme valoarea rezoluției este zero. Concentrație optimă de CDs este cea la care diferența dintre constantele de afinitate, respectiv mobilitatea efectivă a celor doi enantiomeri este maximă.

Utilizarea unui sistem dual de selectori, format din PMMA- $\beta$ -CD, alături de un derivat neutru TM- $\beta$ -CD, nu a dus la îmbunătățirea scontată a selectivității și creșterea rezoluției, însă studiile ne-au ajutat să înțelegem mecanismele de recunoaștere și rolul structurii chimice în recunoașterea moleculară, influența electrolitului asupra mobilității electroforetice și evaluarea interacțiunilor dintre compușii chirali model și selectori.

Folosind modele matematice și cu ajutorul constantelor de afinitate și valoarea mobilității complexilor analit-CD determinate, este posibilă prezicerea mobilității efective a enantiomerilor, cât și a selectivității și a rezoluției, într-un sistem dual de ciclodextrine, la orice concentrație a celor doi selectori.

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

# Enantioseparation of chiral bioactive compounds

---

PhD Student **Anamaria Ziller (Podar)**

---

PhD Coordinator **prof.dr. Radu Oprean**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>13</b>
<b>1. Enantiomers and their biological importance</b>	<b>15</b>
1. 1. Chirality	15
1. 2. Racemic mixture. Enantiomers	15
<b>2. Capillary electrophoresis</b>	<b>17</b>
2. 1. Theoretical notions	17
2.1.1. Electrophoretic mobility	17
2.1.2. Electrophoretic migration	18
2.1.3. Migration speed	19
2. 2. Equipment and materials	19
2.2.1. Separation column	19
2.2.2. Background electrolytes	20
2.2.3. Sample injection system	20
2.2.4. Power source	21
2.2.5. Detection system	21
2.2.6. Data reception, processing and storage system	23
2.3. Chiral selectors	24
2.3.1. Cyclodextrins	25
2.3.2. Linear oligo-/polysaccharides	30
2.3.3. Chiral crown ethers	31
2.3.4. Ligand-exchange complexes	31
2.3.5. Chiral surfactants	32
2.3.6. Proteins	33
2.3.7. Macrocyclic antibiotics	33
2.3.8. Dual selector system	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>39</b>
<b>1. Working hypothesis/objectives</b>	<b>41</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>43</b>
<b>3. Study 1. Separation strategies of NSAIDs by capillary electrophoresis</b>	<b>45</b>
3.1. Introduction	45
3.2. Working hypothesis	48
3.3. Materials and methods	48
3.4. Results	48
3.5. Discussions	58
3.6. Conclusions	60

---

<b>4. Study 2. Profen enantiomers separation by CE using native-CD</b>	<b>63</b>
4.1. Introduction	63
4.2. Working hypothesis	66
4.3. Materials and methods	66
4.4. Results	67
4.5. Discussions	69
4.6. Conclusions	73
<b>5. Study 3. Chiral discrimination of model compounds using cyclodextrin derivatives</b>	<b>75</b>
5.1. Introduction	75
5.2. Working hypothesis	75
5.3. Materials and methods	75
5.4. Results	77
5.5. Discussions	80
5.6. Conclusions	82
<b>6. Study 4. Enantioseparation of NSAIDs by CE using a dual selector system</b>	<b>83</b>
6.1. Introduction	83
6.2. Working hypothesis	83
6.3. Materials and methods	83
6.4. Results	84
6.5. Discussions	86
6.6. Conclusions	91
<b>7. General discussions</b>	<b>93</b>
<b>8. General conclusions</b>	<b>97</b>
<b>9. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>101</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>103</b>

**KEY WORDS:** *capillary electrophoresis, enantioseparation, NSAIDs, chiral selector, cyclodextrin, ibuprofen, ketoprofen.*

## INTRODUCTION

Through this doctoral thesis entitled "Enantioseparation of bioactive chiral compounds" I focused on the issue of the drugs with a chirality center and the importance of finding simple and effective methods for the separation of the enantiomers.

Starting from the hypothesis that most of the molecules currently used in drug therapy have a chirality center and are generally synthesized as a racemic mixture and taking into account the pharmacodynamic differences: absorption, distribution, protein binding, affinity to receptors, metabolic pathway, respectively, the pharmacological properties and potential, in drug therapy it is desirable to use a single enantiomer in place of the racemic mixture.

The main method for the separation of enantiomers of chiral bioactive substances is capillary electrophoresis. In chiral separation techniques, the key step is the use of chiral selectors capable of chiral recognition and the formation of diastereomeric complexes with the two enantiomers. According to Dalglish's three-point interaction rule, chiral recognition depends on at least three simultaneous interactions between the selector and the selected and at least one of these interactions must be stereoselective to permit discrimination of the enantiomers. Most CSs form inclusion complexes, covalent bonds and electrostatic bonding. Chiral recognition is also the result of secondary interactions such as hydrogen bonds, dipole-dipole bonds or  $\pi$ -interactions. The purpose of CSs use is to reduce analytical time, increase selectivity and / or increase detection sensitivity (decrease of detection limit). The widely used chiral selectors are by far the CD derivatives, but finding new molecules is a continuous challenge for research.

The thesis is structured in two parts, the first represents the current state of knowledge, and the second represents the personal contribution. The purpose of the experimental studies was to develop and validate new enantioseparation methods of two chiral compounds by capillary electrophoresis and to find a proper experimental design to improve selectivity and increase resolution.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This first part of the thesis aims to familiarize the reader with the term of chirality, respectively racemic mixture, enantiomers. This part also includes theoretical notions about capillary electrophoresis, description of the analytical instruments and supplies, followed by the classification and description of chiral selectors used in the enantioseparation of chiral compounds by capillary electrophoresis.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The main objective of the thesis was to investigate the behavior of some model chiral molecules in order to obtain a chiral discrimination by capillary electrophoresis.

One of the most commonly prescribed drugs in medical practice are the non-steroidal anti-inflammatory drugs. NSAIDs represent a class of drugs with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. NSAIDs work by inhibiting the action of cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) through a competitive mechanism with the arachidonic acid, preventing the synthesis of prostaglandins (PG), prostacyclin (PC) and thromboxanes (TX). According to chemical structure most NSAIDs are weak organic acids and are classified into carboxylic acids and enolic acids. In my enantioseparation studies I choose to work with two compounds from the 2-arylpropionic acid group: *ibuprofen* and *ketoprofen*, both having a chirality center in the molecules.

### Study 1. Separation strategies of NSAIDs by capillary electrophoresis

Over the last decades a wide variety of enantioseparation methods have been developed and applied through the CE. The aim of this first study was to carry out a vast literature study by accessing a large number of research papers, journal articles and scientific articles related to *enantioseparation*, *capillary electrophoresis*, *chiral selectors* and *NSAIDs* topics.

Publication databases are a common way to access research information on targeted topics. Searching in to SCOPUS database, using the key words "*capillary electrophoresis*" and "*enantioseparation*" in the "Title-Abstract-keywords" search field, returned an impressive number of articles. Merging the two terms into the "Topic" search field of Web of Knowledge (WOK) database were found even higher values and similar increasing trends, which provides extra confidence on the results.

The first part of this study presents an overview of the data published in the last two decades related to the subject. The large number of articles shows the increased interest on this topic and the general trends points to a promising future in electrophoretic separations research.

The second part of this study highlights the most recent enantiomer separation strategies applied in capillary electrophoresis, using nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) 2-arylpropionic acids as model compounds. It is mainly focused on method development and validation, along with pharmaceutical and biomedical application, where chiral selectors (CSs) are used. There is a large number of CSs that have, over the years, been synthesized and used in electrophoretic enantioseparations. I have found that the use of NSAIDs as chiral compounds is the choice of a limited number of research teams. Enantioseparation and increasing the resolution is not an easy analytical problem to be solved. This review presents also the chiral recognition

mechanisms and the role of the chemical structure in molecular recognition, the stability of the model compounds in different buffer solutions and the influence of the nature of the support electrolyte in molecular modeling.

## Study 2. Profen enantiomers separation by CE using native-CD

The starting point of this study was a theoretical plan of chiral compounds enantioseparation in non-aqueous medium (NACE) using as CSs the three native cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ - și  $\gamma$ -CD), considering the fact that the use of NACE medium may reduce the interaction between the analyte and the capillary walls, increasing the resolution. The experimental design involved the use of MeOH:ACN as background electrolyte (BGE) and a formic acid/ammonium formate buffer to adjust the pH.

An Agilent 3D capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Walbronn, Germany) equipped with a spectrophotometric detector was used. Separation were performed with the 50 $\mu$ m ID fused silica capillaries (L=48.5cm, l=40cm) thermostated at 25°C. 3D-CE Chemsation Rev. A.08.03 (843) software was used for data processing and storage. Samples of racemic mixture of ibuprofen and ketoprofen were provided by Terapia-Rambaxy S.A., Cluj-Napoca, Romania, and cyclodextrins were purchased from Cyclolab Hungary.

Because the high molecular weight and low solubility of native cyclodextrins in non-aqueous solution ( e.g.  $\alpha$ -CD solubility in MeOH < 0.3 g/l) to increase the solubility of CD, it was necessary to add water to the electrolyte solution, resulting in a diluted organic solution (MeOH/H<sub>2</sub>O/ACN).

The results of the analyzes performed shows that the enantioseparation of ibuprofen and ketoprofen it is influenced by the nature and the concentration of CSs. The increased selectivity of native  $\alpha$ -CD to profens is primarily due to the small size of the cyclodextrin cavity capable of incorporating and forming strong bonds with the 2-arylpropionic acid molecules. In the case of ibuprofen, the increase in the migration rate is observed with the increase of the CD molecule, but under the same conditions in the case of ketoprofen there is a deceleration effect, with the increase of the migration time, but although the intensity of the signal increases, the selectivity and the resolution decrease. Increasing the CD concentration influences electrophoretic mobility by increasing the retention time and also increases the intensity of the electrophoretic signal and decreases the surface of the peaks.

This study explored also the influence of the BGE-related parameters on the enantioseparation. The MeOH:ACN ratio (v/v) influences the enantioseparation of the two profens differently, so in the case of ibuprofen the increase in the ratio lowers the selectivity and resolution, and in the case of ketoprofen, the increase in the ratio leads to better results. To note that the separation efficiency in aqueous organic medium (MeOH/H<sub>2</sub>O/ACN) are in low range (Rs: 0.39-1.29), most likely due to the adsorption of the analyte on the capillary walls.

The pH-value influences the electroosmotic flow mobility (EOF) and also can modify the electric charge or the structure of the analytes. Generally it is stated that a compound is completely protonated / deprotonated if between pH and pKa is at least a two units difference. At the experimental values (pH = 5) can be considered that the profens molecules, being weak acids (pKa<sub>1</sub>=4.6, pKa<sub>2</sub>=4.0) are partially dissociated and in the higher range (6.5 < pH < 6.95) they are in completely deprotonated form. The results shows that increasing pH extend migration time, but decreases selectivity and resolution.

### **Study 3. Chiral discrimination of model compounds using cyclodextrin derivatives**

The methodology and apparatus described in the previous study were maintained, but the experimental design was practically completely modified. This time the experiments was performed in aqueous medium, at pH 2.5, adjusted with a phosphate buffer (100mM phosphoric acid/20mM triethanolamine). Using water in the CE, offers important advantages such as reduced viscosity, lack of volatility, safety and reduced price, but the use of an aqueous solutions can significantly increase EOF.

This time two CD derivates were used as *single CD system*: one positively charged, permethylated 6-monoamino-6-monodeoxy- $\beta$ -cyclodextrin (PMMA- $\beta$ -CD) and one neutral derivative: heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (TM- $\beta$ -CD) at a wide concentration ranges (0-40 mM).

The substitution of the hydroxyl groups modifies not only the hydrophobicity but also the cyclodextrin charge, having a great affect on the properties of cyclodextrin, particularly on the inclusion of the solute. The combining ratio is determined by the size of the analyte, which must be in accordance with the size of the cyclodextrin cavity. This two  $\beta$ -cyclodextrin derivatives were chose as chiral selectors, based on ther enantiodiscrimination ability of small molecules such as those from the 2-arylpropionic acid group studied: *ibuprofen* and *ketoprofen*.

The use of PMMA- $\beta$ -CD as a chiral selector has proven successful. The long migration time is due to the fact that PMMA- $\beta$ -CD is a cationic cyclodextrin derivative and using uncovered fused silica capillary, there have been electrostatic interactions and adherence of the positively charged cyclodextrin to the capillary walls. This may be the reason why peak tailing have been obtained.

The enantioseparation of the two profens using TM- $\beta$ -CD was possible only by increasing the pH of the electrolyte solution, ment to achieve a partial dissociation of the analytes. The results obtained in this study provides important information on the influence of different factors on the enantioseparation of the two profens.

In order to detect migration order of the enantiomers a sample containing only the S-enantiomer was used simultaneously with the racemic mixture separation. It was observed that the migration order is dependent on the affinity for the chiral selector. By



using PMMA- $\beta$ -CD as chiral selector, first migrates the R-enantiomer having a stronger affinity, while the lower affinity S-enantiomer migrates later.

Structures of the complexes formed between the analyte enantiomers and the chiral selector were confirmed by NMR spectroscopy. The concordance between the size of the CD cavity and the size of the ibuprofen molecule allows the obtaining of an almost complete inclusion complex. The isobutyl group being a hydrophobic group it's playing an important role in the formation of the complex. In the case of ketoprofen the benzoyl group, located deep within the cyclodextrin cavity, is the chemical group involved in the formation of the inclusion complex, even if it is not right next to the chirality center. Inclusion complex formation is a reversible reaction. The stoichiometry of the inclusion complexes between the analyte and the cyclodextrin is 1:1.

#### **Study 4. Enantioseparation of NSAIDs by CE using a dual selector system**

This study aimed not only a new approach of the enantioseparation of the ibuprofen and ketoprofen, namely to use the two CD derivatives as a *dual selector system*, but also it is attempt of a new experimental design to correct some deficiencies found in previous studies.

The equipment and methodology are similar to those described in previous studies. To avoid electrostatic interaction and adherence of positively charged cyclodextrin to the capillary walls, capillaries coated with polyvinyl alcohol (PVA) have been used, which also eliminates the electroosmotic flow (EOF).

The use of a cationic cyclodextrin derivative (PMMA- $\beta$ -CD) along with a neutral derivative (TM- $\beta$ -CD) at a wide range concentrations (0-40 mM) allowed us to evaluate the influence of such a dual selector system on enantioseparation racemic mixtures of neutral NSAIDs. The results obtained shows that the value of selectivity and resolution decreases with increasing concentrations of the two CDs, which can be attributed to the fact that both positively charged cyclodextrin (PMMA- $\beta$ -CD) and neutral CD-derivative (TM- $\beta$ -CD) have same binding pattern forming 1:1 molar ratio inclusion complexes and both have the same type of affinity being higher toward the R-enantiomer.

The affinity constants of the enantiomers with the two cyclodextrins were determined by mathematical methods or using linear regression in a two-step approach. Results shows that the affinity of the studied compounds is higher toward TM- $\beta$ -CD compared to PMMA- $\beta$ -CD ( $K_{A,C1} < K_{A,C2}$ ). Therefore when it is used in a dual selector system, TM- $\beta$ -CD produces a deceleration effect on the mobility of the enantiomers, increasing migration time, even resulting in incomplete separation. Under the given experimental conditions the use of a single selector system containing only PMMA- $\beta$ -CD in the optimal concentration is preferred for the enantioseparation of the two profens.

## GENERAL CONCLUSIONS AND ORIGINALITY OF THE THESIS

The article published in the *Farmacia Journal*, volume 64, year 2016, contains the results of the first study. It is the only review article in the literature which presents exclusively the enantioseparation strategies of non-steroidal anti-inflammatory drugs in capillary electrophoresis using different CSs.

The high interest toward NSAID molecules is primarily due to their biopharmaceutical importance, currently being the most commonly used drugs for the treatment of acute and chronic pain. Their use as chiral bioactive substances has made it possible to develop and validate new methods for the separation of enantiomers, which can be potential models for the separation of other chiral compounds in the pharmaceutical industry.

Multivariate analysis in aqueous-organic medium using native CDs as chiral selectors, allow us to understand the mechanisms behind the enantioseparation of ibuprofen and ketoprofen molecules, as well as the influence of some experimental design factors on electrophoretic mobility and selectivity.

Increasing the MeOH:ACN ratio (v/v) influences the enantioseparation of the two profens differently. Increasing pH extends migration time and decreases selectivity and resolution.

The nature of native-CD affects the separation of the enantiomers primarily through the different capacity to form inclusion complexes. Increasing the concentration of CSs leads to increased retention time due to CD adsorption on the capillary walls.

Choosing an aqueous medium as background electrolyte and using PMMA- $\beta$ -CD as single chiral selector have been proven effective. By using PMMA- $\beta$ -CD in a wide concentration range (0-40mM) it was demonstrated that at extreme concentrations the resolution value is zero. The optimal concentration of CDs is that where the difference between the affinity constants ( $K$ ) and the effective mobility ( $\mu$ ) of the two enantiomers is maximum.

Using a dual selector system containing PMMA- $\beta$ -CD and TM- $\beta$ -CD, did not improve the enantioseparation as expected, but the studies helped us understand the mechanisms of chiral recognition, the role of chemical structure in molecular recognition, the influence of BGE electrolyte on electrophoretic mobility and the selector-selectand interactions.

Using mathematical models and having the affinity constants and the value of the mobility of the analyte-CD complexes determined, it is possible to predict the effective enantiomer mobility as well as selectivity and resolution in a dual cyclodextrin system at any concentration of the two selectors.