

# Thalidomid és analógjainak királis elválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával ciklodextrin állófázisokon

Szabó-Zoltán István<sup>1</sup>, Foroughbakhshfasaei Mohammadhassan<sup>2</sup>, Dobó Máté<sup>2</sup>, Noszál Béla<sup>2</sup>, Tóth Gergő<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Ipari Gyógyszerészet és Management Tanszék

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia Kábító- és Doppingszer-tudományi Társult Kutatócsoport

## AUTHOR AFFILIATION

<sup>1</sup>Department of Drugs Industry and Pharmaceutical Management, University of Medicine, Pharmacy Sciences and Tehnology

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Semmelweis University, Research Group of Drugs of Abuse and Doping Agents, Hungarian Academy of Sciences

## CORRESPONDING AUTHOR

### Tóth Gergő

Department of Pharmaceutical Chemistry, Semmelweis University, H-1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9, Hungary  
Email: toth.gergo@pharma.semmelweis-univ.hu

## ARTICLE HISTORY

Received: 10-Nov-2018  
Accepted: 10-Dec-2018

DOI: 10.2478/orvtudert-2018-0014

## Liquid chromatographic enantioseparation of thalidomide and its derivatives on cyclodextrin-bonded stationary phases

### ABSTRACT

The chiral separation of three racemic immunomodulatory drugs, thalidomide, pomalidomide and lenalidomide was studied, using three cyclodextrin bonded stationary phases ( $\beta$ -, hydroxypropyl- $\beta$ - and carboxymethyl- $\beta$ -CD) in reversed-phase and polar organic mode. In polar organic mode, using acetonitrile and methanol, no chiral separation was observed. In reversed-phase mode pomalidomide showed chiral interactions with all selectors, while lenalidomide showed no chiral interactions with any of the cyclodextrins employed. Thalidomide showed chiral interactions with  $\beta$ - and carboxymethyl- $\beta$ -CD, only. Based on these observations it can be concluded that the oxo group at position two is necessary for chiral recognition, while the aromatic primary amine group enhances it. Orthogonal experimental design was used to investigate the effect of the eluent composition, flow rate, and the column temperature on chiral separation. Concentration of the organic modifier was the most important factor among the investigated three variables showing high impact on the chiral separations. In the case of thalidomide optimized parameters ( $\beta$ -cyclodextrin-based stationary phase, 0.1% acetic acid/acetonitrile 95/5 (v/v), 5 °C column temperature, 0.6 ml/min flow rate) resulted in a resolution of  $1.68 \pm 0.02$  between enantiomers. For pomalidomide, this value was  $2.70 \pm 0.02$ , under the circumstances as follows:  $\beta$ -cyclodextrin-based stationary phase, 0.1% acetic acid/acetonitrile 90/10 (v/v), 15 °C column temperature and 0.8 mL/min flow rate. Utilizing the experimental conditions employed on an LC-MS/MS system, concentrations as low as 2 ng/mL could be determined from mouse plasma for both substances. Elution sequences were determined with enantiopure standards and in both cases the *R*-enantiomers eluted first. The methods developed are suitable for the chiral separation of the abovementioned compounds and are sound starting points for bioanalytical method development.

**Keywords:** thalidomide; pomalidomide; cyclodextrin; chiral separation; cyclodextrin based chiral stationary phase

### KIVONAT

Jelen munkánkban három, a mieloma multiplex kezelésében alkalmazott vegyületnek, a thalidomidnak, a pomalidomidnak és a lenalidomidnak kromatográfiás viselkedését tanulmányoztuk három ciklodextrin alapú állófázison (natív  $\beta$ -, hidroxipropil- $\beta$ - és karboximetil- $\beta$ -ciklodextrin) fordított fázisú és polár organikus módban. Polár organikus módban tiszta acetonitrilt

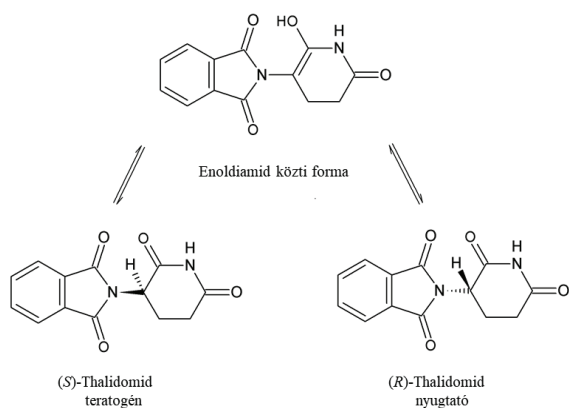
vagy metanolt használva nem sikerült elválasztást elérni egyik anyagra sem. Megállapítható, hogy fordított fázisban a pomalidomid mindhárom szelektorral királis kölcsönhatást alakít ki, a thalidomid csak a  $\beta$ -ciklodextrinnel és a karboximetil- $\beta$ -ciklodextrinnel, míg a lenalidomid egyik vizsgált ciklodextrin alapú állófázissal sem. Ez arra utal, hogy a vegyületcsoportban a 2-es helyzetű oxocsoport szükséges feltétele a királis felismerésnek, az aromás primer aminocsoport pedig javítja azt. Ortogonális kísérlettervezéssel vizsgáltuk az eluens összetétel, az áramlás és az oszlophőmérséklet hatását az elválasztásra. Vizsgálataink alapján az elválasztást elsősorban a mozgófázis szerves komponensének hányada befolyásolja. A thalidomid esetén az optimalizált körülményekkel ( $\beta$ -ciklodextrin állófázis, 0,1%-os ecetsav/acetonitril 95/5 (v/v), oszlop hőmérséklet

5°C, áramlás 0,6 ml/perc)  $1,68 \pm 0,02$ , a pomalidomid esetén ( $\beta$ -ciklodextrin állófázis, 0,1% ecetsav/metanol 90/10 (v/v), oszlop hőmérséklet 15°C, áramlás 0,8 ml/perc)  $2,70 \pm 0,02$  felbontást értünk el. Ezekkel a kísérleti körülményekkel LC-MS/MS kapcsolással mindkét vegyület esetén legalább 2 ng/mL hatóanyagot sikerrel mutattunk ki egér vérplazmából. Az elúciós sorrendet enantiomertiszta származékok segítségével állapítottuk meg, mindkét vegyület esetén az *R*-enantiomer eluálódik elsőnek. Módszereink alkalmasak a vegyületek királis elválasztására vagy akár ezek optikai tisztaságának nyomon követésére is, illetve jó kiindulópontot jelentenek biológiai mintákból történő meghatározásra.

**Kulcsszavak:** orvostörténelem, közegészségtan, közegészség-tani intézet, orvostudományok

## Bevezetés

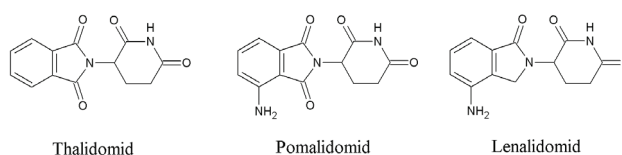
A thalidomidot 1957-ben hozták forgalomba. Hányingercsillapító, enyhe nyugtató hatása okán várandós nők is használták. A szer később kiderült teratogén hatása miatt több ezer gyermek született fejlődési rendellenességgel, korunk legnagyobb gyógyszertragédiáját okozva (1-3). A hatóanyagot 1961-ban kivonták a forgalomból. Későbbi kutatások rámutattak arra, hogy - míg az *R*-enantiomer nyugtató hatással rendelkezik - a teratogén hatást az *S*-enantiomer okozza (4-7). További kutatások során az is tisztázódott, hogy az enantiomertiszta *R*-thalidomid alkalmazása sem előzte volna meg a tragédiát, mivel a thalidomid enantiomerek az emberi szervezetben racemizálódnak. Ennek oka, hogy a thalidomid sztereokémiailag instabil, az egyes enantiomerekből ki tud alakulni egy enoldiamid tautomer forma, amiből mindkét enantiomer egyforma valószínűséggel képződhet (1. ábra) (8, 9).



1. ábra. A thalidomid racemizációjának mechanizmusa

A thalidomid kivonása után közel 40 évvel a szer antiangiogén hatásának köszönhetően visszakerült a

terápiába, kezdetben mint lepra ellenes szer (10), később a rák egy típusának, a mieloma multiplexnek a kezelésére (11). A thalidomidot újabb, hatékonyabb származékok forgalomba kerülése követte (12, 13). Ilyen a pomalidomid, melyet a thalidomidtól a 4-es helyzetű aromás primer aminocsoport különböztet meg, valamint a lenalidomid, amely a pomalidomidtól a 2-es helyzetű oxocsoport hiányában különbözik. Az egyes szerkezeteket a 2. ábrán tüntettük fel.



2. ábra. A thalidomid és analógjainak szerkezete

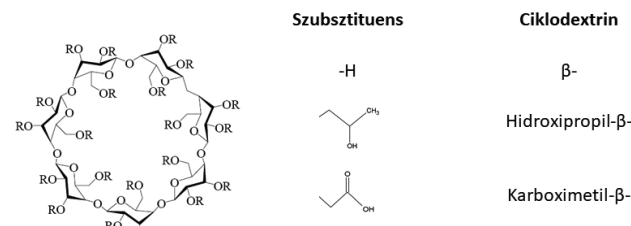
A molekulák mindegyike egy aszimmetrikus szénatomot tartalmaz. Racemátként vannak forgalomban a fent említett *in vivo* racemizáció miatt. Mivel a mieloma kezelésében csak az *S*-enantiomer hatásos, élénk kutatás folyik a thalidomid és analógjainak racemizációjának gátlására (14-16). Ezt a törekvést erősítik azok a közelmúltban publikált eredmények, melyek szerint a cereblon nevű fehérjéhez, e vegyületek fő molekuláris célpontjához, az *S*-enantiomer kötődik erősebben (14). A kiralitáscentrumban lévő hidrogén cseréje más csoportokra nem hozott sikert az előállított vegyületek kisebb hatáserőssége, kémia instabilitása, vagy a nagyobb toxicitása miatt (17, 18). A megfelelő deuterált analógok előállítása viszont ígéretes megközelítésnek tűnik, elsősorban a lenalidomid esetén (15), és előkészítheti az utat új enantiomertiszta thalidomid analógok kifejlesztésé-

hez. Ezenkívül az újonnan szintetizált deuterált vegyületek lehetőséget nyújtanak az enantiomerek közötti lehetséges farmakokinetikai és farmakodinámiai különbségek vizsgálatára is (14). Ehhez enantiomerszelektív, érzékeny, pontos és megbízható analitikai módszerekre van szükség.

Jelen közleményünkben célunk a thalidomid, pomalidomid és lenalidomid kromatográfiás viselkedésének összefoglalása; ennek keretében a ciklodextrin alapú királis állófázisokon fordított fázisban illetve polár organikus módban végzett vizsgálataink áttekintése (19-21).

A ciklodextrinek ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok, amelyek D-glükopiranoz egységekből épülnek fel  $\alpha$ -(1,4)-glikozidos kötésekkel keresztül. Az egyes ciklodextrineket a felépítő glükóz egységek száma alapján nevezzük el, így 6, 7 ill. 8 egység esetén  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ciklodextrinnek különböztetünk meg. A natív ciklodextrinek és félszintetikus származékaik kiemelkedő szerepet játszanak a királis analitikában. A gyűrű hidrofób belseje és jól definiált átmérője alkalmassá teszi a ciklodextrineket zárványkomplexek képzésére számos szerves vegyülettel (22-24). A ciklodextrinek számos aszimmetria centrumot tartalmaznak (glükóz monomerenként ötöt), ezért belső üregük királis mikrokozmoszt képez. Racém vegyületek ciklodextrin komplexeinek képződésekor az enantiomerek eltérő kötődése miatt különböző stabilitású diasztereomer komplexpárok keletkeznek. A kialakuló komplexek stabilitását a cukor-egységek által alkotott üreg mérete, a vendégmolekula üregbeli elhelyezkedése és az esetleges oldalláncokkal kialakuló kölcsönhatások erőssége befolyásolja (25). Mivel a ciklodextrinek glükózegységenként egy primer és két szekunder hidroxilcsoportot tartalmaznak, szilikagélhez való kapcsolásuk könnyen megoldható, így számos ciklodextrin alapú folyadékkromatográfiás állófázis került kifejlesztésre (26, 27). Ezek az állófázisok normál, polár organikus, polár ionos és fordított fázisú

$k_2$  a retenciós tényezője az első illetve második csúcshoz.



**3. ábra.** Az elválasztás során alkalmazott királis szelektorok szerkezete

Jelen munkánkban vizsgáltuk és összehasonlítottuk az eluens összetétel, a szerves módosító, az áramlás és az oszlop hőmérséklet hatását a thalidomid és analógjainak elválasztására polár organikus és fordított fázisú módban, három ciklodextrin alapú állófázison. Ezek a natív  $\beta$ -ciklodextrin, illetve két félszintetikus származéka, a hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin és a karboximetil- $\beta$ -ciklodextrin voltak. A királis szelektorként alkalmazott ciklodextrinek szerkezetét a **3. ábrán** tüntettük fel. Célunk volt továbbá, hogy a három szerkezetileg nagyon hasonló anyag felhasználásával kijelöljük a molekulák azon szerkezeti elemeit, amelyek befolyásolják a királis elválasztást, ezzel is segítve új, hatékonyabb királis szelektorok előállítását. További célunk volt egy olyan módszer kidolgozása, amely a későbbiekben bioanalitikai célokra is felhasználható, ezért tömegspektrometriás detektálást alkalmazva próbáltunk kimutatni legalább 2 ng/mL koncentrációjú hatóanyagot szpájkolt egér vérplazmából.

## Anyag és módszer

### Anyagok

A ciklodextrin oszlopok (250 X 4.0 mm, 5  $\mu$ m részecskemérettel) -  $\beta$ -CD (Quest-BC), hidroxipropil- $\beta$ -CD (Quest-C2), karboximetil- $\beta$ -CD (Quest-CM) - a ChiroQuest Kft. termékei. A racém thalidomidot, az S-(-)-thalidomidot, az R-(+)-thalidomidot, a pomalidomidot és a lenalidomidot a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük. Az S-pomalidomid a Beijing Mesochem Technology Co. Ltd. (Beijing, China) terméke. A HPLC minőségű metanolt, etanolt, 2-propanolt, 1-propanolt és acetonitrilt, illetve az ecetsavat, hangyasavat, ammónium-formiátot és az ammónium-acetátot a Merck Kft.-től szereztük be. A HPLC minőségű desztillált vizet Milli-Q Direct 8

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

módban is alkalmazhatók (26, 28).

ahol  $t_1$  és  $t_2$  a retenciós ideje,  $w_1$  és  $w_2$  a csúcshélessége,  $k_1$  és

Millipore víztisztító rendszerrel állítottuk elő.

### Módszerek

#### HPLC-DAD körülmények

A HPLC-UV vizsgálatokhoz Jasco HPLC rendszert használtunk (Jasco PU-2089 Plus bináris pumpa, AS-4050 automata mintaadagoló és MD-2010 Plus diódasoros detektor). A módszerfejlesztés során az UV detektálás 220 nm-en történt mindhárom vegyület esetén. Az adatok feldolgozása ChromNAV programmal történt.

#### HPLC-QqQ-MS körülmények

A vizsgálatokhoz Agilent 1260 Infinity HPLC rendszert használtunk, amelyhez egy Agilent 6460 hármass kvadrupól tömegspektrométer kapcsolható JetStream (ESI) ionforással (G1312B bináris pumpa, G1367E automata mintaadagoló, G1315C diódasoros detektor). Az adatok feldolgozása Agilent MassHunter B.03.01 szoftverrel történt. A pomalidomid és thalidomid tömegspektrometriás detektálása során az alábbi körülményeket alkalmaztuk: ionforrás: ESI, pozitív mód, a szárító gáz (N<sub>2</sub>) hőmérséklete 300 °C, áramlási sebessége 10 L/perc, a porlasztó gáz (N<sub>2</sub>) nyomása 45 psi, a kapilláris feszültség 3500 V. A pomalidomid meghatározása során az alábbi két átmenetet monitoroztuk kiválasztott ionfolyamat követés módban 100 V fragmentor feszültség mellett: 274.1 → 201.0 ionátmenet 20 eV ütközési energiával és 274.1 → 152.4 ionátmenet 8 eV ütközési energiával. A thalidomid esetén 96 V fragmentor feszültség mellett a 259.07 → 186.0 ionátmenetet 24 eV ütközési energiával és a 259.07 → 84.1 ionátmenetet 8 eV ütközési energiával vizsgáltuk. Az optimalizált paramétereket az Optimizer program segítségével határoztuk meg.

A főbb kromatográfiai teljesítményjellemzőket (felbontás (Rs) és szelektivitás (α)) az alábbi képletek segítségével számoltuk:

#### Plazma minták előkészítése

A pomalidomidot és a thalidomidot szpájkolt egér vérplazmából is kimutattuk 2 ng/mL-es koncentrációban. A mintaelőkészítés során a vizsgált hatóanyag megfelelő koncentrációjú oldatából 10 µL-t adtunk 100 µL vér-

plazmához, majd a fehérjék kicsapásához további 1 mL ACN-t. Az így kapott mintát 1 percig vortexeltük (Velp Scientifica, Usmate Velate, Olaszország) majd 10000 g-n 15 percig centrifugáltuk (Sartorius 2-16P benchtop centrifuga, Goettingen, Németország). A felülúszót megfelelő üvegedénybe pipettáztuk át, és nitrogén-áramban teljesen szárazra pároltuk. A visszamaradt mintát 100 µL 0,1% vizes ecetsavban oldottuk vissza, majd ezt injektáltuk az LC/MS rendszerbe.

## Eredmények és következtetések

### Előzetes vizsgálatok

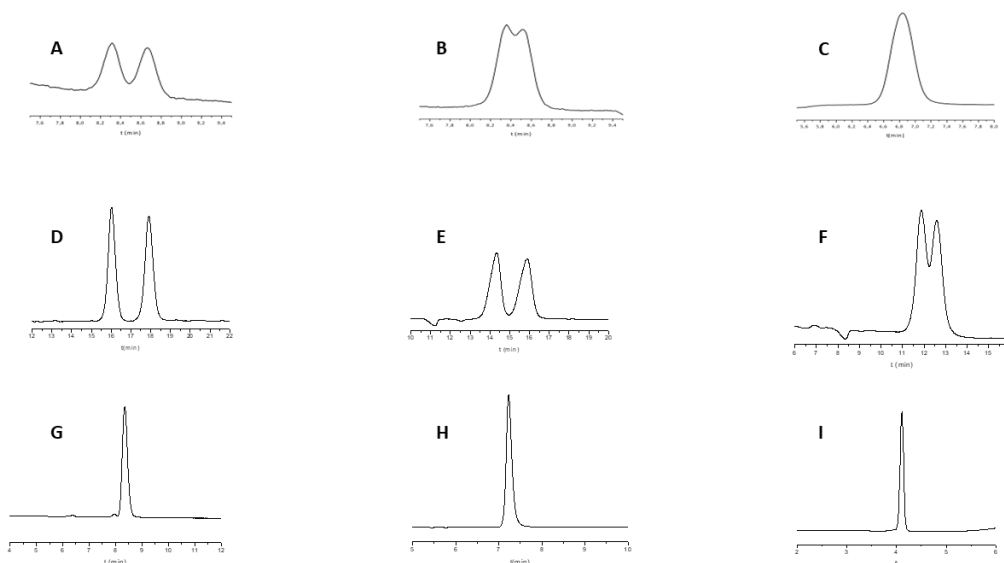
Három széles körben használt ciklodextrin állófázisnak (β-CD, HP-β-CD, CM-β-CD) a királis elválasztóképességét teszteltük a vizsgált anyagainkra fordított fázisú és polár organikus módban. Polár organikus módban tiszta acetonitrilt vagy metanolt használtunk 0,7 mL/perc áramlási sebesség és 20 °C-os oszlop hőmérséklet mellett. Ezzel a módszerrel egyik vegyület izomerjeit sem sikerült elválasztanunk királis állófázistól függetlenül (**1. táblázat**). Érdekes viszont megfigyelni, hogy az eluenstől és a királis állófázistól függetlenül a lenalidomid retenciósideje a legnagyobb, ő alakítja ki a legerősebb kölcsönhatást az állófázisokkal.

Fordított fázisban az alábbi paraméterek mellett vizsgáltuk a három oszlop királis felismerő képességét: víz/metanol 90:10 v/v elegy, 0,7 ml/perces áramlási sebesség és 25 °C-os oszlop hőmérséklet. A fordított fázisú vizsgálatok során kapott kromatogramok a **4. ábrán** láthatóak.

A kromatogramokon látható, hogy a pomalidomid mind a három szelektorral királis kölcsönhatást alakít ki, sőt mind a β-ciklodextrin mind a CM-β-ciklodextrin oszlopon alapvonal elválasztás érhető el. Legjobb eredményt a natív β-ciklodextrin királis szelektort tartalmazó Quest-BC oszlopon sikerült elérnünk 2,11 ± 0,02-es felbontás mellett. A thalidomid két ciklodextrinnel, a natív β- és a CM-β-

**1. táblázat.** Az egyes vegyületek retenciósideje (percben kifejezve) a polár organikus módban történő szűrés során. Enantiomer elválasztást ezzel a módszerrel nem sikerült elérni.

	β-CD		HP-β-CD		CM-β-CD	
	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN
Thalidomid	3,87	4,12	3,64	3,89	3,9	4,85
Pomalidomid	3,86	4,28	3,69	4,05	3,9	4,33
Lenalidomid	4,16	8,23	3,89	6,97	4,3	8,76



**4. ábra.** A ciklodextrin királis állófázisok fordított fázisú szűrése során kapott kromatogramok a három vizsgált vegyületre. Kromatográfiai körülmények: víz/metanol 90/10 (v/v) elegy, áramlási sebesség 0,7 ml/min, oszlop hőmérséklet 25 °C

ciklodextrinnel alakít ki enantioszelektív kölcsönhatást. A HP- $\beta$ -ciklodextrin oszlop (Quest-C2) az alkalmazott körülmények között nem alkalmas a thalidomid enantiomerek elválasztására. A legjobb elválasztást ebben az esetben is a  $\beta$ -ciklodextrin oszlopon érték el  $1,05 \pm 0,03$ -as felbontás mellett. A lenalidomid enantiomerjeit egyik oszlopon sem sikerült elválasztanunk a kromatográfiai paraméterek változtatásával sem. A három rokon vegyület vizsgálata alapján az alábbi következtetéseket tudjuk levonni a királis felismerhetőséggel kapcsolatban fordított fázisú módban:

1. A ligand 2-es helyzetű oxocsoportja szükséges a királis elválasztáshoz, mivel a lenalidomid és a pomalidomid között ez az egyetlen különbség. Feltételezhetően az aszimmetria centrum közelében lévő oxocsoportok enantioszelektív másodlagos kölcsönhatást, hidrogén-hidat képesek kialakítani a ciklodextrinnekkel. Az erős másodlagos kölcsönhatás hiányát az is bizonyítja, hogy a lenalidomid retenció tényezője a legkisebb a vizsgált oszlopokon.
2. A 4-es helyzetben lévő aromás primer aminocsoport bevitel segíti a királis elválasztást, valószínűleg ebben az esetben is egy új, másodlagos kölcsönhatás tud kialakulni az aromás primer amin és a ciklodextrin hidroxilcsoportjai között. Ezt az is mutatja, hogy a pomalidomid enantiomerek retenció ideje nagyobb, mint a thalidomidé a ciklodextrin oszlopokon.

3. Az egyes oszlopokon számolt retenció tényező mindhárom vegyület esetén az alábbi sorrendet követi:  $\beta$ -ciklodextrin > CM- $\beta$ -ciklodextrin > HP- $\beta$ -ciklodextrin. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a natív  $\beta$ -ciklodextrin szubsztitúciója nemcsak a királis felismerést rontja, de a zárványkomplexek stabilitását is csökkentheti.

Mivel a natív  $\beta$ -ciklodextrint tartalmazó oszlop mutatta a legbiztosabb eredményeket, a további vizsgálatokhoz ezt az oszlopot alkalmaztuk kizárólag fordított fázisú módban.

### A mozgófázis összetételének hatása az elválasztásra

A további optimalizálás során célunk a mozgófázis szerkesztés módosításának kiválasztása volt. A fordított fázisú kromatográfiában alkalmazott öt leggyakoribb szerves oldószert – acetonitrilt, metanolt, etanolt, 1-propanolt és 2-propanolt – vizsgáltuk 90:10 víz/szerves oldószer arány mellett 0,7 ml/perces áramlással és 25°C-os oszlop hőmérséklettel.

1-propanol és 2-propanol esetén az elválasztás hatékonysága jelentősen romlott, aminek oka feltételezhetően az oldószer erősebb kölcsönhatása a ciklodextrin üregével.

**2. táblázat** L16-os ortogonális kísérletterv paraméterei és a felbontási értékek a thalidomid és a pomalidomid enantiomerek elválasztása során.

Kísérlet	t (°C)	szerves módosító (%)	áramlás(ml/min)	Rs (THAL)	RS (POM)
1	20	20	0,8	0	0,9
2	20	15	0,7	0,3	1,8
3	20	10	0,6	1,2	2,3
4	20	5	0,5	1,5	2,3
5	15	20	0,7	0	1,5
6	15	15	0,8	0,3	2,3
7	15	10	0,5	1,3	2,9
8	15	5	0,6	1,6	2,8
9	10	20	0,6	0,1	1,9
10	10	15	0,5	0,7	2,4
11	10	10	0,8	1,2	2,8
12	10	5	0,7	1,6	3,0
13	5	20	0,5	0,1	1,8
14	5	15	0,6	0,8	2,4
15	5	10	0,7	1,3	2,9
16	5	5	0,8	1,6	3,0
	THAL/POM	THAL/POM	THAL/POM		
K1	0,75/1,83	0,08/1,53	0,78/2,25		
K2	0,80/2,83	0,53/2,23	0,82/2,30		
K3	0,90/2,53	1,28/2,73	0,93/2,35		
K4	0,97/2,53	1,57/2,78	0,93/2,35		
R	0,22/0,70	1,49/1,25	0,15/0,10		

A másik három oldószert nagyon hasonló eredményeket kaptunk, mindhárom alkalmas lehet a thalidomid és a pomalidomid királis elválasztására. A thalidomid esetén az acetonitrilt tartalmazó mozgófázist alkalmaztuk a későbbiekben, mivel ezen oldószerral jobb csúcsalakot és rövidebb retenciós időt tapasztaltunk. A pomalidomid esetén a metanolt választottuk a mozgófázis szerves módosítójának, mivel ennél a vegyületnél a tömegspektrometriás detektálásban a legjobb ionizációs képességgel a metanol rendelkezett. Vizsgáltuk a mozgófázis látszólagos pH-jának hatását az elválasztásra ecetsavat, ammónium-acetátot és ammónium-formiátot alkalmazva. A vizsgált tartományban a mozgófázis látszólagos pH-jának változtatása nem befolyásolta az elválasztást lényegesen. Ennek ellenére 0,1 %-os ecetsavat alkalmaztunk a mozgófázis vizes részeként, mivel savas környezetben a vizsgált vegyületek stabilabbak, illetve a tömegspektrometriás detektálás érzékenysége is növekedett ezáltal.

## Módszer optimalizálás ortogonális kísérlettervezéssel

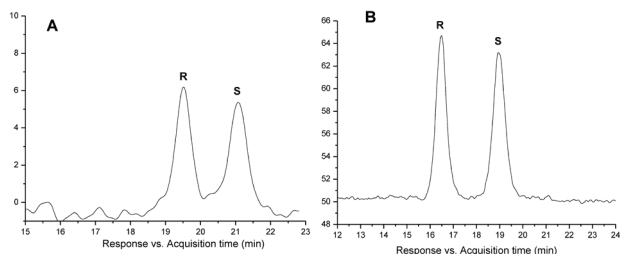
Egy elválasztástechnikai módszer fejlesztése során a legjelentősebb kísérleti paraméterek optimalizálása alapvető

fontosságú. Ennek egyik formája az egyváltozós, hagyományos módszer, amely során egyszerre csak egy változót módosítunk, a többi változót konstans értéken tartjuk. Az optimális rendszer megtalálásához így igen nagy számú kísérletet kell elvégezni, ami erősen anyag- és időigényes. A királis elválasztást ezért, mind a thalidomid, mind a pomalidomid esetén ortogonális kísérlettervezéssel végeztük el, melyben egyszerre több, az elválasztás hatékonyságát befolyásoló paramétert tudunk vizsgálni, illetve lehetőségünk van a paraméterek közötti esetleges kölcsönhatást is tanulmányozni. További előnye a technikának az egyváltozós módszerrel szemben, hogy segítségével az elválasztás szempontjából lényeges és kevésbé lényeges paraméterek jól megkülönböztethetők, a paraméterek között fontossági sorrend állítható fel (21, 23, 29-31). Mind a thalidomid, mind a pomalidomid enantiomerjeinek elválasztása során három változót – a hőmérsékletet, a szerves módosító százalékos arányát és az áramlást – optimalizáltunk négy szinten. Ezen változókból egy standard ortogonális táblát készítettünk, mely 16 kísérletben tartalmazza az egyes paraméterek szisztematikusan párosított értékeit (2. táblázat). A kiértékelés során az egyes kísérletekben mért felbontási értékeket elemeztük. A felbontási értékek segítségével megállapítható, hogy mely paraméterek befolyásolják az elválasztást

jelentősen, és melyek kevésbé. A K1, K2, K3, K4 értékek azt az átlagos felbontási értéket jelzik, melyet az adott paraméter adott értékénél a mérések során elértünk. A **2. táblázatban** R-rel a négy K érték közül a legnagyobb és legkisebb különbségét adtuk meg ( $K_{max} - K_{min}$ ) minden paraméterre. Minél magasabb ez az érték, annál nagyobb befolyással bír az adott paraméter az egyes enantiomerek közti felbontás értékekre.

A második táblázat eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált paraméterek közül a szerves módosító aránya befolyásolja legnagyobb mértékben az elválasztás hatékonyságát, ezt követi a hőmérséklet, míg az áramlási sebesség a vizsgált tartományban szignifikánsan nem befolyásolja a felbontást, azonban más paramétert, mint például a retenció időt lényegesen befolyásolja. Például a pomalidomid esetén 0,5 mL/perces áramlás mellett és 0,8 mL/perces áramlás mellett is hasonló felbontás érhető el, de magasabb áramlási sebességnél a retenció idő jelentősen csökkenthető. A thalidomid esetén  $\beta$ -ciklodextrin állófázissal 5°C-os oszlophőmérséklettel 0,1%-os ecetsav/acetonitril 95/5 (v/v) mozgófázissal és 0,6 mL/perces áramlási sebességgel érhető el az optimális, legnagyobb felbontás, ami  $1,68 \pm 0,02$ -nek adódott (21).

A pomalidomid esetén is a legnagyobb felbontás 5°C-os oszlophőmérséklet és 5% szerves módosítót tartalmazó mozgófázis mellett érhető el, de ebben az esetben még 0,8



**5. ábra.** 2 ng/mL hatóanyagot tartalmazó szpájkolt egér vérplazma HPLC-MS/MS kromatogramja az optimalizált körülmények között.

**5.A** Thalidomid (Quest-BC állófázis, 0,1%-os ecetsav/acetonitril 95/5 (v/v), oszlop hőmérséklet 5 °C, áramlás 0,6 ml/perc; MRM mód: 96 V fragmentor feszültség 259,07 → 186,0 ionátmenet 24 eV ütközési energia)

**5.B** Pomalidomid (Quest-BC állófázis, 0,1% ecetsav/metanol 90/10 (v/v), oszlop hőmérséklet 15 °C, áramlás 0,8 ml/perc; MRM mód: 100 V fragmentor feszültség 274,01 → 201,0 ionátmenet 20 eV ütközési energia)

mL/perces áramlás mellett is mindkét enantiomer retenció ideje meghaladja a 30 percet ( $t_2=36,1$  perc).

20 perc alatti analízis idővel  $\beta$ -ciklodextrin tartalmazó Quest-BC állófázist alkalmazva 15°C-on 0,1%-os ecetsav/acetonitril 90/10 (v/v) mozgófázis mellett 0,8 ml/perces áramlási sebességgel is jelentős,  $2,70 \pm 0,02$ -es felbontás érhető el, így ezt választottuk optimális módszernek (20).

Ezekkel a paraméterekkel 2 ng/mL vizsgált hatóanyagot sikerrel mutattunk ki szpájkolt egér vérplazmából az optimalizált ionátmenetekkel egyszerű mintaelőkészítést alkalmazva tandem tömegspektrometriás (QqQ) detektálással (**5. ábra**), ami jól mutatja, hogy módszereink alkalmazhatók bioanalitikai vizsgálatok során is. Az enantiomer sorrendet is meghatároztuk enantiomertiszta vegyületek segítségével. Ez alapján mindkét vegyület esetén az R-enantiomer eluálódik elsőként a vizsgált ciklodextrin állófázisokon (**5. ábra**).

## Összefoglalás

Thalidomid és rokonvegyületei racemizációjának gátlásával kapcsolatban számos kutatás van folyamatban. Ehhez újabb enantiomerszelektív és érzékeny analitikai módszerekre van szükség. Jelen közleményünkben három, a kereskedelmi forgalomban elérhető ciklodextrin állófázis ( $\beta$ -CD (Quest-BC), hidroxipropil- $\beta$ -CD (Quest-C2), karboximetil- $\beta$ -CD (Quest-CM)) királis felismerő képességét vizsgáltuk a thalidomid és két származéka (pomalidomid és lenalidomid) esetén. A három vegyület közül a thalidomid és a pomalidomid enantiomerjeit el tudtuk választani fordított fázisban, a lenalidomidét nem. Vizsgálataink alapján kijelölhetővé váltak a királis felismerő képességet befolyásoló szerkezeti elemek. A királis elválasztásokat ortogonális kísérlettervezéssel optimalizáltuk, melynek alapján megállapíthatjuk, hogy az elválasztást legnagyobb mértékben a szerves módosító aránya befolyásolja ezt követi a hőmérséklet, majd az áramlási sebesség. Az optimalizált paraméterekkel mind a thalidomid ( $\beta$ -ciklodextrin állófázis, 0,1%-os ecetsav/acetonitril 95/5, oszlop hőmérséklet 5 °C, áramlás 0,6 ml/perc), mind a pomalidomid esetén ( $\beta$ -ciklodextrin állófázis, 0,1% ecetsav/metanol 90/10, oszlop hőmérséklet 15 °C, áramlás 0,8 ml/perc) alapvonal elválasztást értünk el. Ezek a módszerek jó kiindulópontok az egyes enantiomerek biológiai mintákból történő meghatározására.

## Köszönetnyilvánítás

SzZI és TG szerzőket az Erdélyi Múzeum- Egyesület Orvostudományi és Gyógyszerészeti Szakosztálya támogatta.

Jelen közlemény a Semmelweis Tudományos és Innovációs Alap STIA-M-17 pályázat támogatásának segítségével valósult meg.

## Irodalomjegyzék

- Eriksson T, Bjorkman S, Hoglund P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001; 57(5):365-376.
- Melchert M, List A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(7-8):1489-1499.
- Ridings JE. The thalidomide disaster, lessons from the past. *Methods Mol Biol.* 2013; 947:575-586.
- Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Hoglund P. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52(7):807-817.
- Höglund P, Eriksson T, Björkman S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. *J Pharmacokinetics and Biopharm.* 1998; 26(4):363-383.
- Nishimura K, Hashimoto Y, Iwasaki S. (S)-form of alpha-methyl-N(alpha)-phthalimidoglutaramide, but not its (R)-form, enhanced phorbol ester-induced tumor necrosis factor-alpha production by human leukemia cell HL-60: implication of optical resolution of thalidomide effects. *Chem Pharm Bull.* 1994; 42(5):1157-1159.
- Wnendt S, Finkam M, Winter W, Ossig J, Raabe G, Zwingerberger K. Enantioselective inhibition of TNF- $\alpha$  release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality.* 1996; 8(5):390-396.
- Tian C, Xiu P, Meng Y, Zhao W, Wang Z, Zhou R. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions. *Chemistry.* 2012 5; 18(45):14305-14313.
- Wolf C. Dynamic stereochemistry of chiral compounds: principles and applications: RSC Publishing; 2008. p. 29-135.
- Sheskin J. Thalidomide in the Treatment of Leprosy Reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1965; 6:303-306.
- Licht JD, Shortt J, Johnstone R. From anecdote to targeted therapy: the curious case of thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2014; 25(1):9-11.
- Knight R. IMiDs: a novel class of immunomodulators. *Semin Oncol.* 2005; 32(4 Suppl 5): S24-30.
- Łączkowski KZ, Baranowska-Łączkowska A. Recent studies on the thalidomide and its derivatives. *Future Med Chem.* 2018; 10(18) 2133-2136.
- Jacques V, Czarnik AW, Judge TM, Van der Ploeg LH, DeWitt SH. Differentiation of antiinflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112(12):E1471-1479.
- Uttamsingh V, Gallegos R, Cheng C, Aslanian A, Liu JF, Tung R, Wu L. CTP-221, a deuterated S-enantiomer of lenalidomide, is greatly stabilized to epimerization and results in a more desirable pharmacokinetic profile than racemic lenalidomide. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2013;73(8 Suppl):Abstract nr 3357. doi:10.1158/1538-7445.AM2013-3357 AACR; 2013.
- Wu L, Aslanian AM, Liu JF, Hogan K, Tung R. CTP-221, a Deuterated S-Enantiomer of Lenalidomide, Possesses Significantly Enhanced Immunomodulatory and Anti-Proliferative Properties Relative to the R-Enantiomer and to Racemic Lenalidomide. *Blood* 2012, 120:2463.
- Chung F, Palmer BD, Muller GW, Man HW, Kestell P, Baguley BC, et al. Effect of 3-fluorothalidomide and 3-methylthalidomide enantiomers on tumor necrosis factor production and antitumor responses to the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Oncol Res.* 2003; 14(2):75-82.
- Knabe J, Omlor G. [Synthesis of racemates and enantiomers of 3-alkylthalidomide analogs and determination of their absolute configuration]. *Arch Pharm (Weinheim).* 1989; 322(8):499-505.
- Szabo ZI, Foroughbakhshfasaei M, Gal R, Horvath P, Komjati B, Noszal B, Tóth G. Chiral separation of lenalidomide by liquid chromatography on polysaccharide-type stationary phases and by capillary electrophoresis using cyclodextrin selectors. *J Sep Sci.* 2018; 41(6):1414-1423.
- Szabo ZI, Szocs L, Horvath P, Komjati B, Nagy J, Janoska A, Noszal B., Toth G. Liquid chromatography with mass spectrometry enantioseparation of pomalidomide on cyclodextrin-bonded chiral stationary phases and the elucidation of the chiral recognition mechanisms by NMR spectroscopy and molecular modeling. *J Sep Sci.* 2016; 39(15):2941-2949.
- Szabó ZI, Mohammadhassan F, Szócs L, Nagy J, Komjati B, Noszal B, Toth G. Stereoselective interactions and liquid chromatographic enantioseparation of thalidomide on cyclodextrin-bonded stationary phases. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2016; 85(3-4):227-236.
- Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 2004; 39(9):1033-1046.
- Szabo ZI, Toth G, Volgyi G, Komjati B, Hancu G, Szenté L, Beni S, Muntean DL, Noszal B. Chiral separation of asenapine enantiomers by capillary electrophoresis and characterization of cyclodextrin complexes by NMR spectroscopy, mass spectrometry and molecular modeling. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 5(117):398-404.
- Szejtli J. Cyclodextrin inclusion complexes. *Cyclodextrin technology: Springer; 1988. p. 79-185.*
- Tóth G, Mohácsi R, Rácz Á, Rusu A, Horváth P, Szenté L, Béni Sz, Noszal B. Equilibrium and structural characterization of ofloxacin-cyclodextrin complexation. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2013; 77(1-4):291-300.
- Armstrong DW, DeMond W. Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. *J Chrom Sci.* 1984; 22(9):411-415.
- Kawaguchi Y, Tanaka M, Nakae M, Funazo K, Shono T. Chemically bonded cyclodextrin stationary phases for liquid chromatographic separation of aromatic compounds. *Anal Chem.* 1983; 55(12):1852-1857.
- Hinze WL, Riehl TE, Armstrong DW, DeMond W, Alak A, Ward T. Liquid chromatographic separation of enantiomers using a chiral  $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase and conventional aqueous-organic mobile phases. *Anal Chem.* 1985;57(1):237-242.
- GuangáLan W, KayáChee K, KeongáWong M, KeeáLee H, MináSin Y. Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 4. Mixed-level design and its application to the high-performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst.* 1995; 120(2):281-287.
- Neumajer G, Sohajda T, Darcsi A, Toth G, Szenté L, Noszal B, Béni Sz Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated-gamma-cyclodextrin: a validated capillary electrophoresis method. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 ;62:42-47.
- Wan HB, Lan WG, Wong MK, Mok CY. Orthogonal array designs for the optimization of liquid chromatographic analysis of pesticides. *Anal Chim Acta.* 1994; 289(3):371-380.