Nota de aplicación

Biofarmacia/Farmacia

Evaluación preliminar de fases estacionarias para la degradación forzada de un agonista de bajo peso molecular del receptor del GLP-1

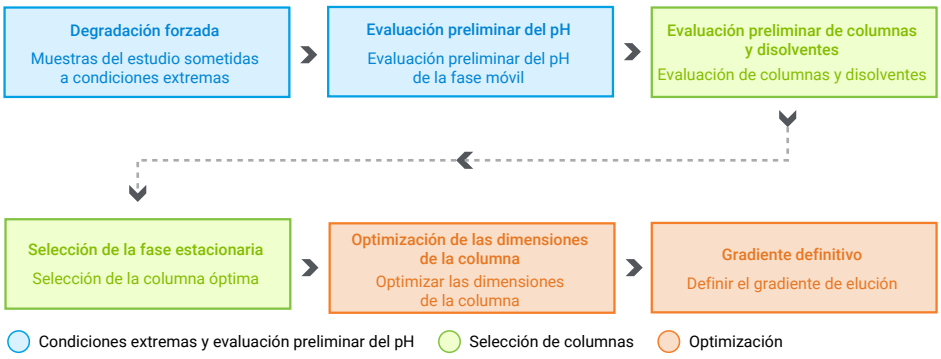
Autor

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El orforgliprón es un agonista no peptídico del receptor del péptido análogo al glucagón de tipo 1 (GLP-1) de administración por vía oral aprobado recientemente que ofrece una mejora significativa en comparación con los tratamientos inyectables de agonistas peptídicos del receptor del GLP-1. Para facilitar la caracterización de impurezas y el desarrollo de métodos, se realizaron estudios de degradación forzada con el objetivo de generar productos de degradación representativos y optimizar las condiciones de separación cromatográfica. Se llevó a cabo una evaluación preliminar sistemática de métodos de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS) con 6 fases estacionarias, como C18, fases de fenilo, pentafluorofenilo (PFP) y de modo mixto; estas se evaluaron tanto con fases móviles de acetonitrilo como de metanol. La evaluación del desempeño de las columnas se basó en la retención de principios activos, en la separación de impurezas y en el número total de picos de impurezas detectadas. La columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 logró los mejores resultados de selectividad y resolución de impurezas. Se obtuvo una mejora significativa en la separación de los productos de degradación y las impurezas asociadas gracias a una optimización adicional en la que se utilizó una columna de 100 mm con partículas de 1,9 µm y un gradiente ampliado de 26 minutos. El método definitivo permitió caracterizar de forma efectiva el orforgliprón y sus impurezas mediante UV y MS.

Evaluación preliminar sistemática de métodos de LC para la separación de productos de degradación forzada del orforgliprón



Introducción

Los agonistas del receptor del GLP-1 son una clase importante de fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y la obesidad. Históricamente, la mayoría de los agonistas del receptor del GLP-1 eran fármacos peptídicos con una baja biodisponibilidad por vía oral debido a la degradación enzimática y a su limitada absorción en el tubo gastrointestinal, por lo que se requería la administración mediante inyección subcutánea. Aunque con la semaglutida por vía oral se ha demostrado que es posible administrar por vía oral agonistas peptídicos del receptor del GLP-1, se requieren formulaciones especializadas para superar estos obstáculos. La aprobación del orforgliprón (Figura 1) ha representado un avance significativo en este campo terapéutico debido su composición: se trata de un agonista no peptídico del receptor de GLP-1 de bajo peso molecular que puede administrarse por vía oral, lo que aporta comodidad y mejora el acceso a pacientes en comparación con los fármacos inyectables.

Debido a la introducción de este nuevo fármaco, son esenciales la caracterización y el control de las posibles impurezas para garantizar la calidad y seguridad del producto farmacéutico. Los estudios de degradación forzada proporcionan información valiosa sobre el perfil de estabilidad del principio activo, ya que generan los productos de degradación que podrían formarse durante su fabricación, almacenamiento o uso. Las mezclas de productos de degradación pueden utilizarse para optimizar los métodos cromatográficos y garantizar una separación adecuada entre el principio activo de y sus impurezas relacionadas y productos de degradación. En este estudio, se llevó a cabo una evaluación preliminar de métodos de LC/MS con el fin de desarrollar un método de caracterización de impurezas para el orforgliprón. Se evaluaron 6 fases estacionarias con diferentes mecanismos de selectividad, incluidas columnas de fase inversa, de selectividad aromática y de modo mixto, antes de seleccionar y optimizar el método cromatográfico definitivo.

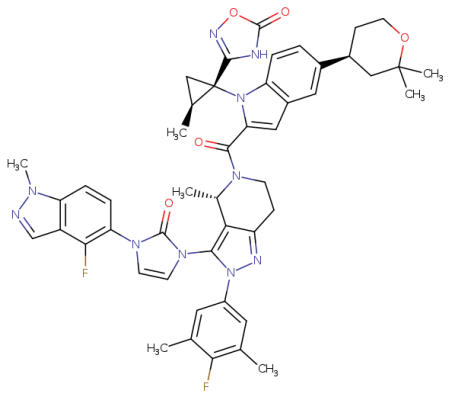


Figura 1. Estructura química del orforgliprón.

Parte experimental

Productos químicos

El orforgliprón se obtuvo de Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). El hidróxido de amonio y el ácido fórmico de calidad para LC/MS se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). El agua, el acetonitrilo y el metanol de calidad para LC/MS InfinityLab se utilizaron como disolventes de las muestras y componentes de la fase móvil.

Instrumentos

Se acopló una bomba binaria Agilent 1290 Infinity II (G7120B) a un controlador de válvula externo y una válvula de conmutación de disolventes de 13 puertos (G4235A) para facilitar la evaluación preliminar de las fases móviles. Se utilizó un muestreador múltiple Agilent (G7167B) para introducir las muestras en un compartimento multicolumna termostatizado (G7116B) equipado con una válvula de conmutación de 8 columnas (G4239C). La detección de impurezas se llevó a cabo utilizando un detector DAD configurado de acuerdo con los parámetros descritos en la Tabla 1. Después, se dirigió el eluyente al sistema de LC/MSD Agilent InfinityLab Pro iQ para su detección por espectrometría de masas (MS). Los parámetros operativos de la MS se describen en la Tabla 2. La adquisición y el análisis de datos se llevó a cabo con el software Agilent OpenLab CDS, versión 2.8.

Tabla 1. Configuración de DAD.

Detector de DAD	
Parámetro	**Ajuste**
Señal	254 nm
Ancho de banda	4
Velocidad de adquisición de datos	40 Hz
Espectro	De 190 a 400 nm
Incremento	2 nm

Tabla 2. Configuración de MS.

IQ Pro	
Parámetro	**Ajuste**
Temperatura del gas	325 °C
Flujo de gas	11 l/min
Nebulizador	30 psi
Voltaje del capilar	3.500 V
Modo de adquisición	
Barrido (+)	De 70 a 1000 *m/z*
SIM (+)	883,4 *m/z*

Preparación de muestras y degradación forzada

Se disolvieron 10 mg de orforgliprón en 4 ml de una disolución de acetonitrilo:agua al 60:40 (v/v) y se aplicaron ultrasonidos hasta su completa disolución. Se transfirieron alícuotas de 900 µl de esta solución a 3 viales diferentes para llevar a cabo estudios de degradación forzada. Para forzar la degradación, al primer vial se añadieron 100 µl de ácido clorhídrico 1 M (degradación en medio ácido), al segundo vial se añadieron 100 µl de hidróxido de sodio 1 M (degradación en medio básico) y al tercer vial se añadieron 100 µl de peróxido de hidrógeno al 30 % (degradación oxidativa).

Las muestras de los estudios de degradación en medio ácido y básico se calentaron a 70 °C durante 2 horas, mientras que la muestra del estudio de degradación oxidativa se calentó a 70 °C durante 1 hora. Después de la incubación, se mezclaron las 3 muestras degradadas para detener las reacciones de degradación. La mezcla resultante se transfirió a un vial de HPLC para su análisis.

Para poder realizar la comparación, también se prepararon y se analizaron un blanco de disolvente y una muestra de referencia de orforgliprón sin degradar.

Evaluación preliminar de métodos

OpenLab permite que los cambios automatizados de los parámetros del método se realicen a través de modificaciones en el panel de secuencias. Se puede añadir a la secuencia una selección de columnas con capacidad para modificar los parámetros del método, lo que permite cambiar ajustes específicos del método (Figura 2). Por ejemplo, cuando se instala una válvula de selección de 8 columnas, es posible evaluar diferentes fases estacionarias con el mismo método modificando la posición de la válvula en la lista de trabajo y ejecutando un breve método de equilibrado antes del análisis de muestras. Otros parámetros ajustables del método incluyen la temperatura de la columna, la composición inicial del gradiente y el flujo.

Se seleccionaron 6 columnas, todas de 2,1 × 50 mm y partículas de 2,7 µm, para su análisis; estas se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Columnas para HPLC de Agilent evaluadas.

Fase estacionaria (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	Número de referencia
InfinityLab Poroshell de HPH-C18	699775-702
InfinityLab Poroshell 120 de CS-C18	699775-942
InfinityLab Poroshell 120 de EC-C18	699775-902
InfinityLab Poroshell 120 de PFP	699775-408
InfinityLab Poroshell 120 de fenil-hexilo	699775-912
Altura Poroshell 120 para PFAS	227205-007
Otras dimensiones	
InfinityLab Poroshell de EC-C18, 2,1 × 100, 2,7 µm	695775-902
InfinityLab Poroshell de EC-C18, 2,1 × 100, 1,9 µm	695675-902

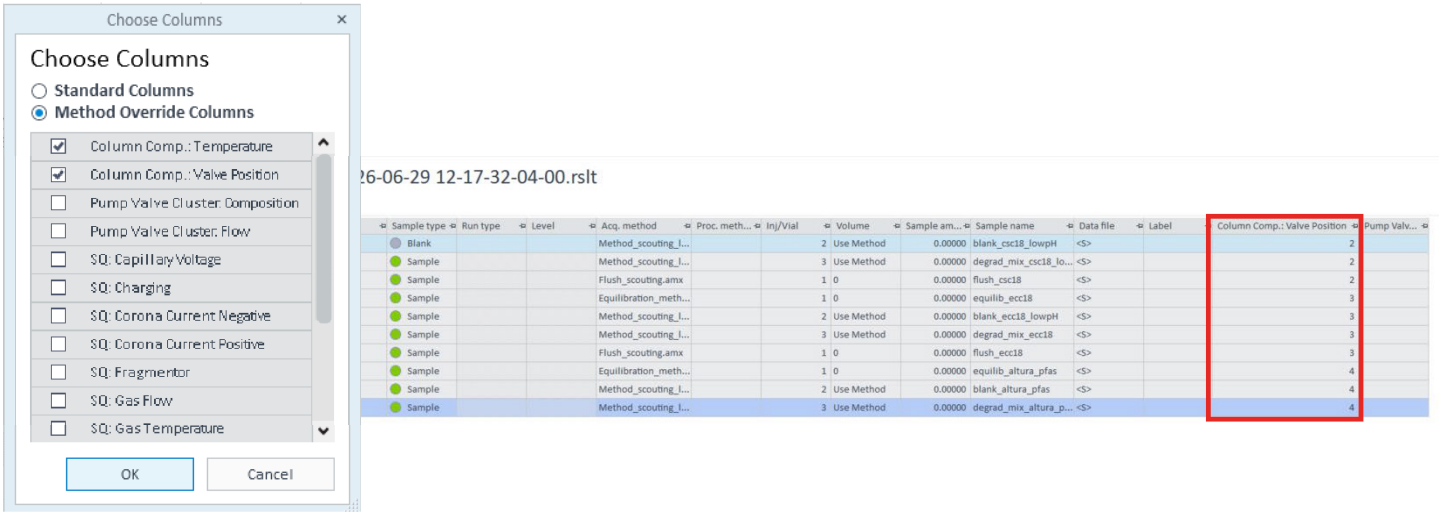


Figura 2. Columnas con capacidad para modificar los parámetros del método disponibles en el panel de secuencias de OpenLab.

Resultados y comentarios

Resultados de la evaluación preliminar de métodos

La evaluación preliminar inicial del pH se realizó con una columna Poroshell de HPH-C18 debido a su compatibilidad con un amplio intervalo de pH. La fase móvil acuosa estaba formada por agua con ácido fórmico al 0,1 % o por hidróxido de amonio 10 mM y se complementó con el modificador correspondiente en la fase orgánica de acetonitrilo. Tras descubrir que las condiciones de pH bajo favorecían la retención (Figura 3), se preparó una fase móvil orgánica de metanol que contenía ácido fórmico al 0,1 %. Esta solución se añadió al flujo de trabajo de pruebas automatizadas activando la válvula de conmutación de disolventes de 12 puertos.

En el gradiente inicial de la evaluación preliminar, tanto el principio activo como todas las impurezas eluyeron en una franja de 1 minuto a un alto porcentaje de disolvente orgánico. Un aumento de la línea de base por debajo de los picos indica una coelución importante. Para poder evaluar de manera más efectiva las diferentes fases estacionarias, se desarrolló un gradiente superficial iniciado con un alto porcentaje de disolvente orgánico (Figura 4) y se utilizó para evaluar las demás columnas.

Se añadió la columna Poroshell de EC-C18 debido a la diferencia de características de la superficie y de la fase enlazada respecto a la columna Poroshell de HPH-C18, y podría, por tanto, ofrecer una retención y una selectividad adicionales en el análisis del orforgliprón y sus productos de degradación. Se añadió la columna Poroshell de CS-C18 porque era posible que su selectividad alternativa a las fases de C18 pudiese mejorar la separación de impurezas, mientras que la fase Poroshell de PFP se evaluó debido a su selectividad específica respecto a los compuestos aromáticos como el orforgliprón. También se incluyó la columna Poroshell Altura para PFAS a esta evaluación preliminar, ya que su mecanismo de retención de modo mixto proporciona una selectividad más allá de las interacciones habituales de la fase inversa y ofrece ventajas respecto a la resolución de impurezas que no se separan de manera adecuada con las fases de C18 convencionales.

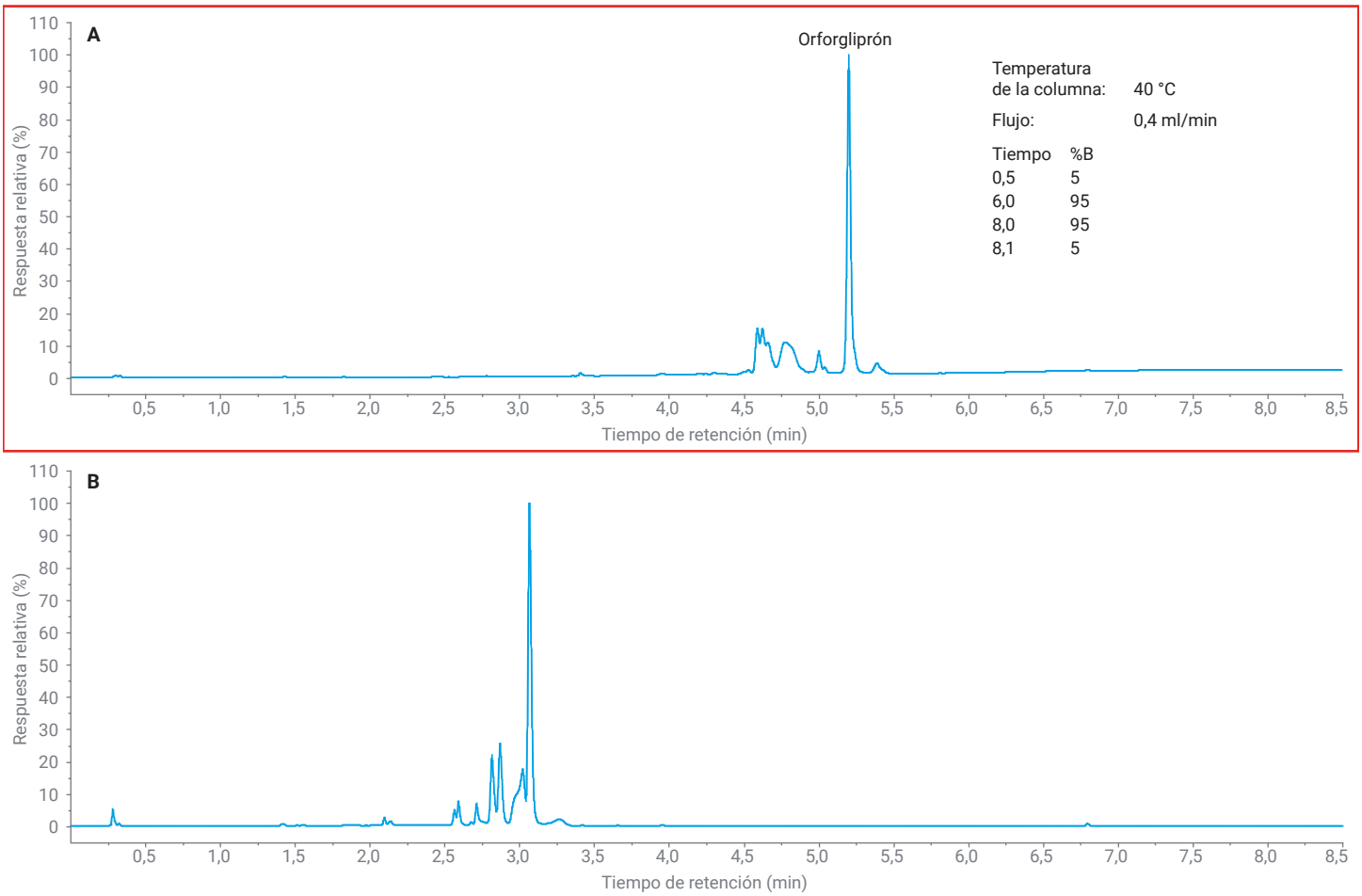


Figura 3. Cromatogramas de mezclas de productos de degradación obtenidos con la columna Agilent Poroshell de HPH-C18 al aplicar (A) un gradiente de ácido fórmico y (B) un gradiente de hidróxido de amonio.

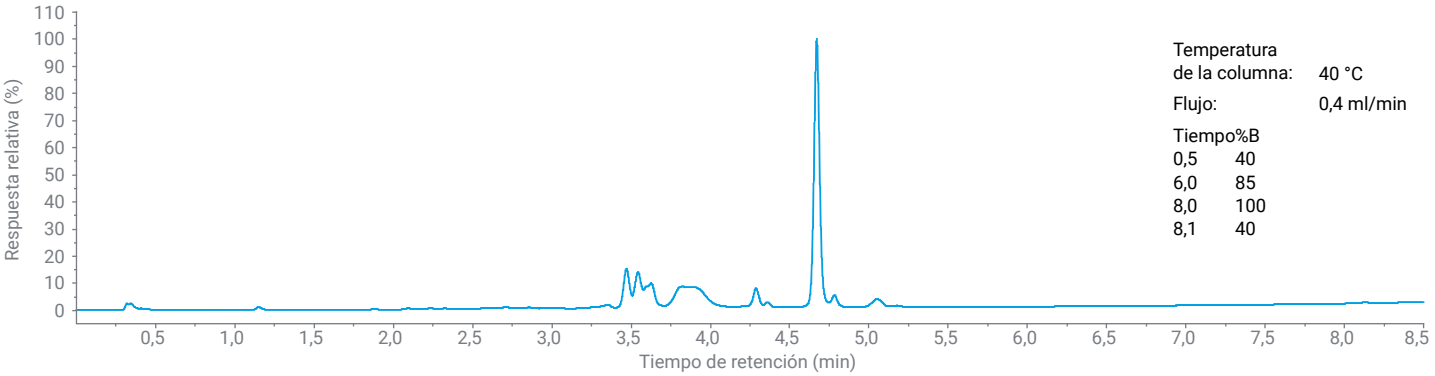


Figura 4. Cromatograma de una mezcla de productos de degradación obtenido con la columna Agilent Poroshell de HPH-C18 y un gradiente de evaluación preliminar a valores bajos de pH.

La Figura 5 muestra los cromatogramas de las fases estacionarias seleccionadas. El desempeño de las columnas se evaluó utilizando tres parámetros principales: la separación entre las impurezas y el principio activo, la retención del principio activo y el número total de picos de impurezas detectadas. Atendiendo a estos parámetros, la columna Poroshell de EC-C18 obtuvo el mejor desempeño general.

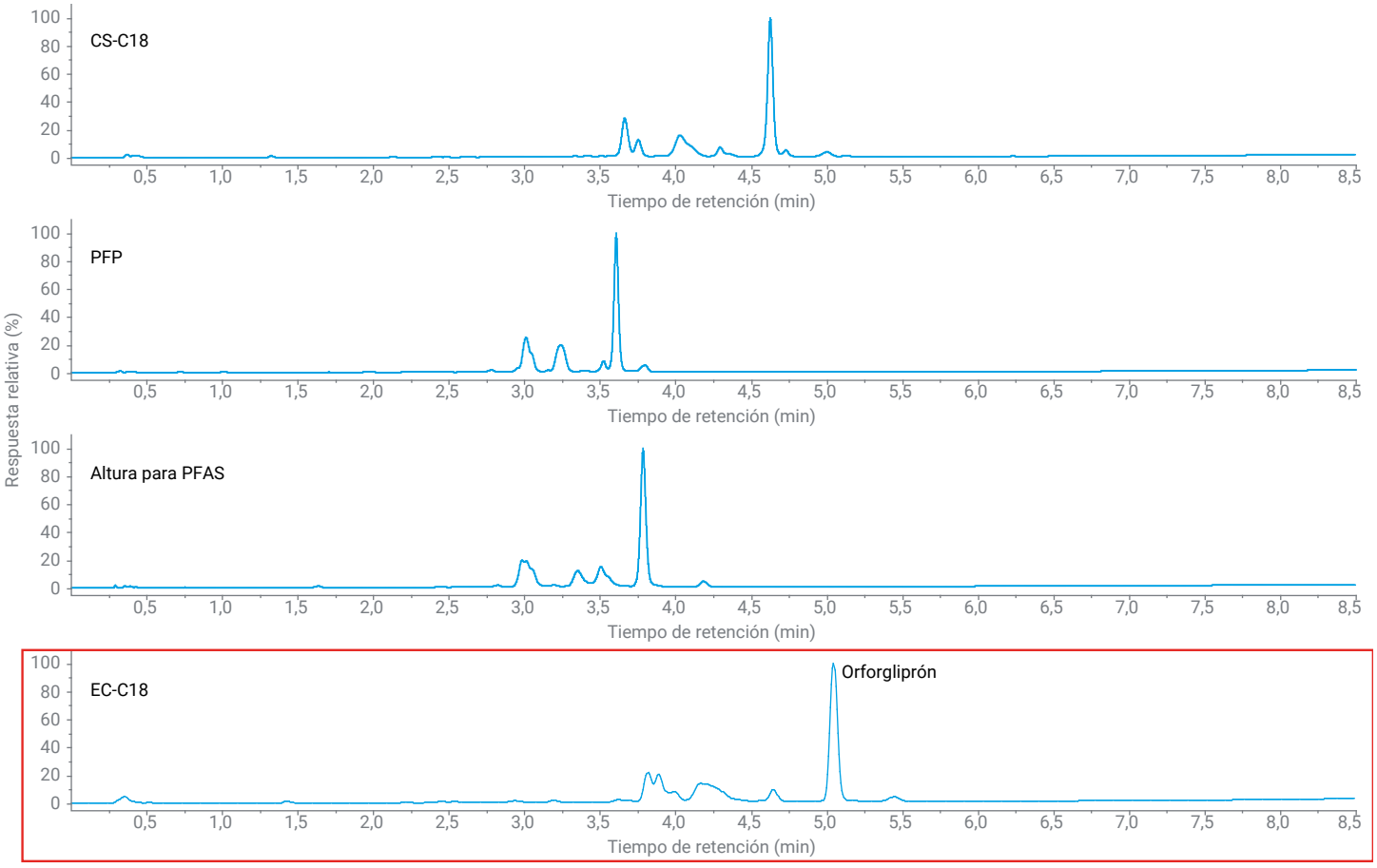


Figura 5. Cromatogramas de mezclas de productos de degradación.

Todas las columnas se evaluaron utilizando acetonitrilo y metanol como modificadores orgánicos. En la mayoría de los casos, el acetonitrilo mostró resultados superiores, lo que se tradujo en una mejor separación de los picos correspondientes al principio activo y las impurezas. La única excepción fue la columna de fenil-hexilo. La Figura 6 compara las separaciones obtenidas con la columna de fenil-hexilo utilizando (A) acetonitrilo y (B) metanol. Esta fase estacionaria se incluyó porque puede proporcionar una selectividad específica a través de interacciones por apilamiento π-π con compuestos altamente aromáticos, como el orforgliprón. Es conocido que el metanol altera la selectividad de las fases de fenil-hexilo en comparación con el acetonitrilo, y en este caso se pudo observar una mejora de la separación de las impurezas al utilizar metanol. Sin embargo, ninguna de estas dos opciones con la columna de fenil-hexilo mejoró el desempeño de la columna Poroshell de EC-C18 con respecto a la separación entre las impurezas y el principio activo o al número total de picos de impurezas detectadas.

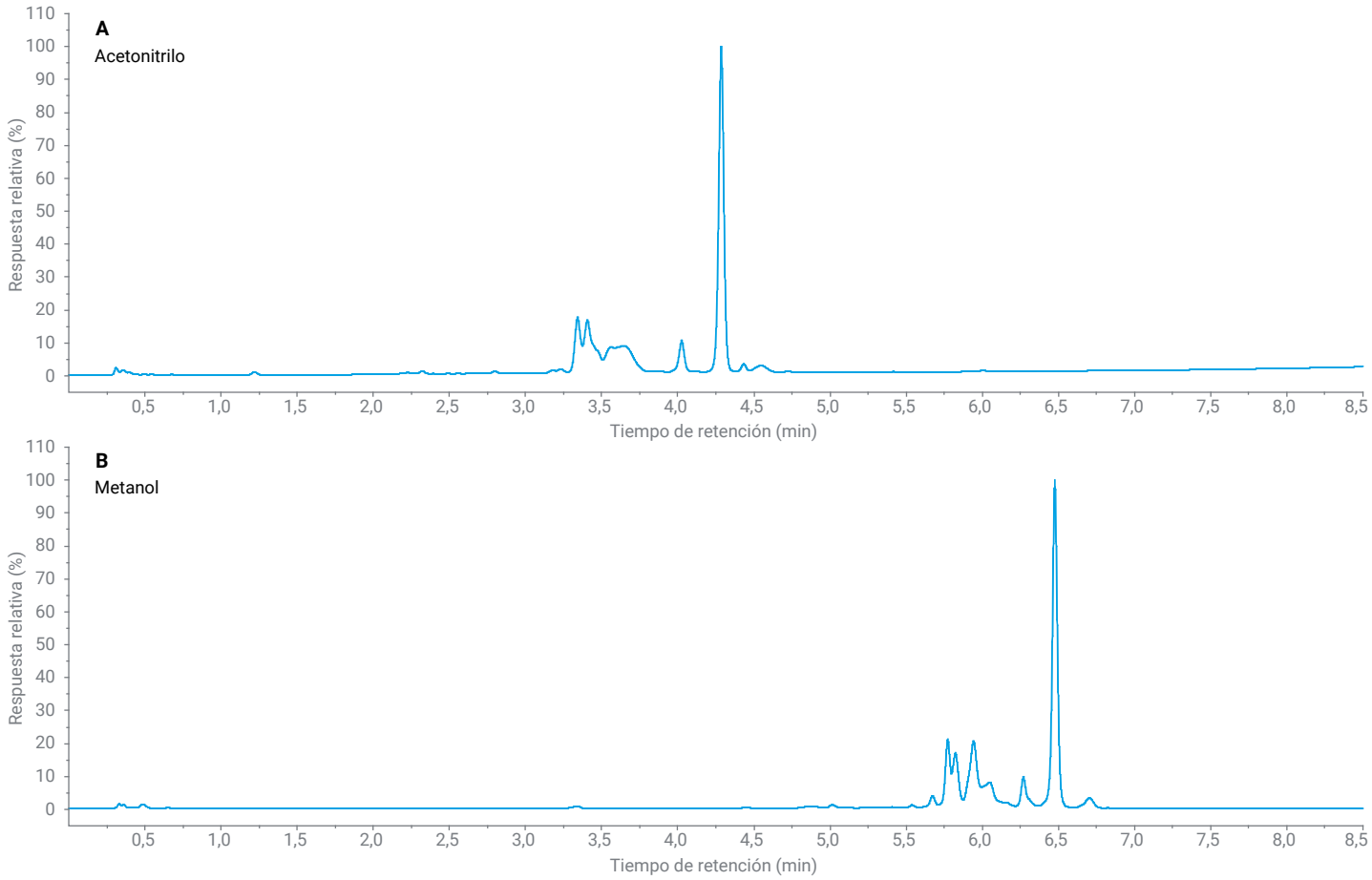


Figura 6. Cromatogramas de mezclas de productos de degradación obtenidos con la columna Agilent Poroshell de fenil-hexilo utilizando (A) acetonitrilo y (B) metanol como fase móvil orgánica.

Optimización de la separación en la columna Poroshell de EC-C18

Otro enfoque de mejora de la resolución de impurezas consistió en aumentar la longitud de la columna. La fase estacionaria Poroshell de EC-C18 identificada durante la evaluación preliminar inicial se evaluó posteriormente en un formato de 100 mm con partículas de 2,7 y 1,9 µm aplicando un gradiente de 8,5 minutos. La columna de 100 mm × 1,9 µm mostró la mejor separación general y se seleccionó para continuar con el desarrollo del método. Además, el espectro de masas del principio activo mostró un ion molecular protonado limpio a 883,4 *m/z* junto con un ion fragmentario producido en la fuente a 797,3 *m/z* como resultado de una pérdida neutra (Figura 7).

Aunque el gradiente de 8,5 minutos proporcionó una separación en la línea de base entre las impurezas principales y el principio activo, varios picos de impurezas seguían mostrando una resolución parcial. Para mejorar la resolución, se desarrolló un gradiente más largo y totalmente optimizado.

El método definitivo empleó un gradiente de 26 minutos, lo que mejoró de manera significativa la separación de impurezas y permitió llevar a cabo una caracterización más completa del perfilado de impurezas (Tabla 4). El gradiente superficial inicial resultó necesario para separar por completo las impurezas. Los cromatogramas representativos de MS y UV obtenidos mediante el método optimizado se muestran en la Figura 8. La mejora de la resolución obtenida al aplicar un gradiente más largo permitió mejorar la detección y caracterización de los picos individuales de impurezas sin afectar a la retención ni a la forma del pico de principio activo.

Tabla 4. Método de LC optimizado definitivo para la caracterización de impurezas del orforgliprón.

Parámetro	Condición definitiva
Columna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 de EC-C18
Dimensiones	2,1 × 100 mm, 1,9 µm
Fase móvil A	Agua con ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %
Flujo	0,5 ml/min
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	1 µl
Programa de gradiente	Tiempo (min) % B 0,5 40 16 52 18,4 70 24 100

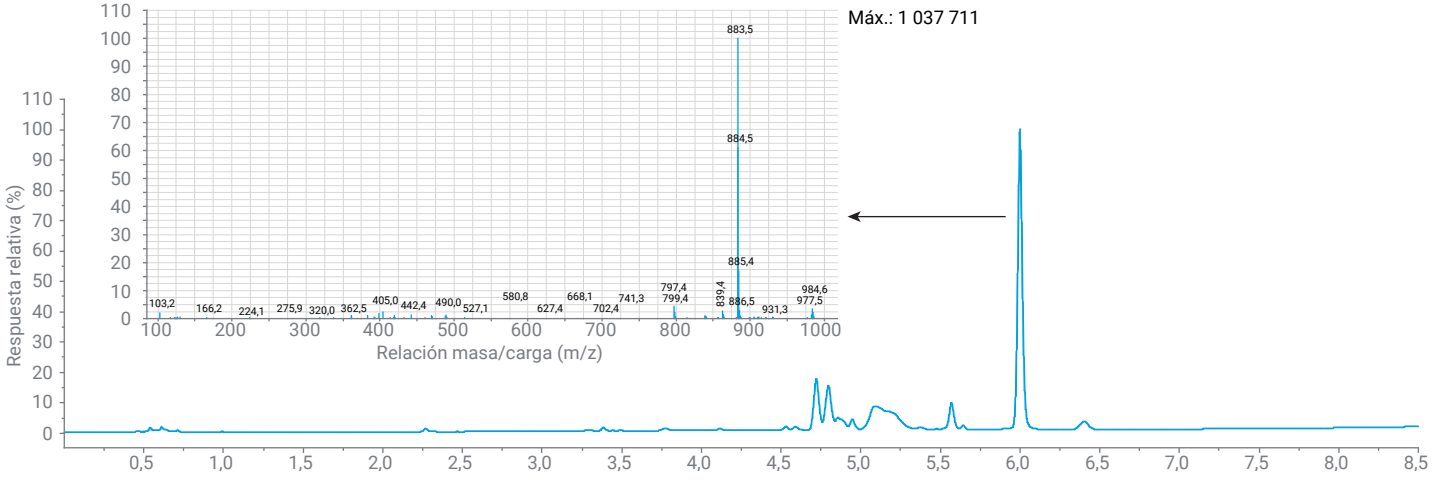
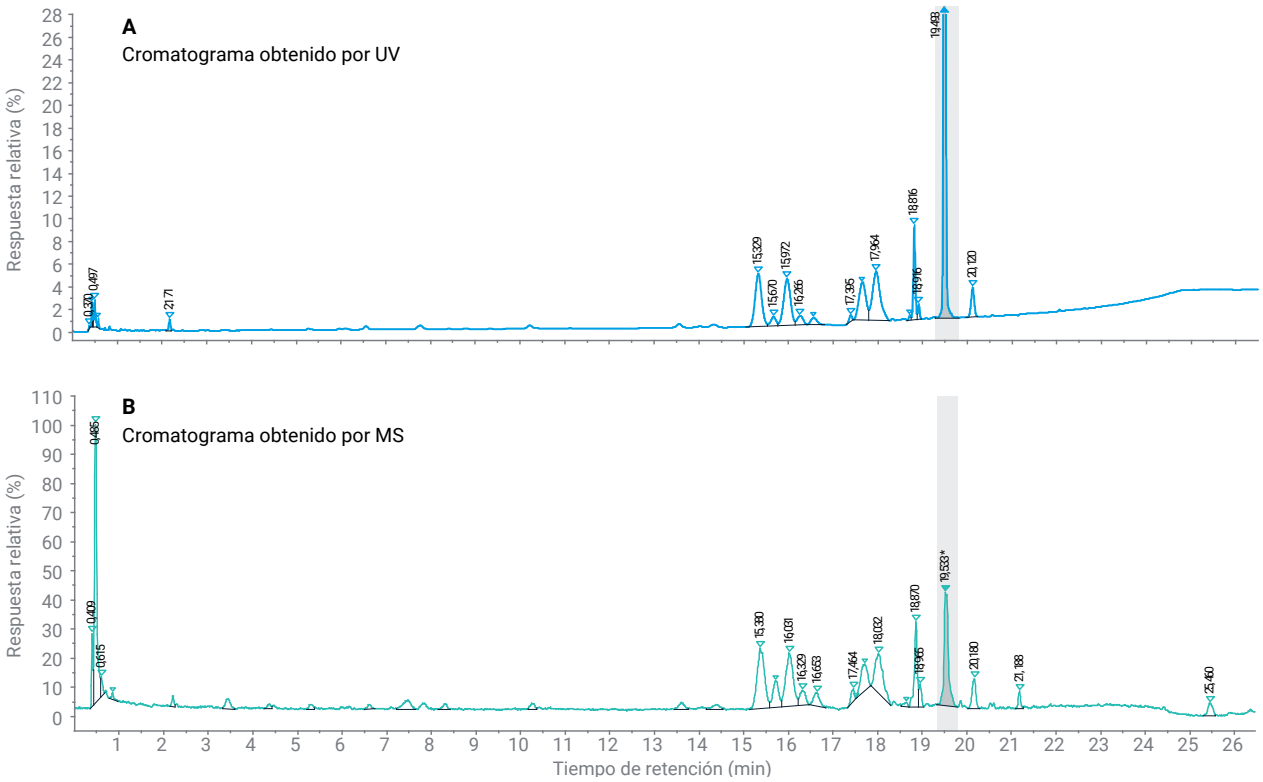


Figura 7. Cromatograma obtenido por UV de una mezcla de productos de degradación con una columna Agilent de EC-C18 de 2,1 × 100 mm y partículas de 1,9 µm y un gradiente de 8,5 minutos; espectro de MS del pico de principio activo.



TR	*m/z*
0,496	130,1
15,329	917,4
15,670	696,3
15,972	917,4
16,266	917,4
16,568	917,4
17,395	859,5
17,657	951,4
17,964	951,4
18,816	887,4
18,916	887,4
19,493	883,4
20,120	917,5

Figura 8. (A) Cromatograma obtenido por UV y (B) cromatograma obtenido por MS de una mezcla de productos de degradación al aplicar el gradiente definitivo para la columna Agilent Poroshell de EC-C18; tabla de MS de los *m/z* de todos los picos.

Conclusión

Tras la evaluación preliminar de las columnas se estableció que la fase Agilent InfinityLab Poroshell 120 de EC-C18 era la mejor opción entre todas las fases estacionarias evaluadas para la caracterización de impurezas del orforgliprón, ya que proporcionó mejores resultados en la retención del principio activo, en la separación de impurezas y en la detección de picos de impurezas. Con el acetonitrilo, por lo general, se obtuvieron mejores separaciones que con el metanol, aunque con este último se mejoró la selectividad en la columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 de fenil-hexilo.

Un paso adicional de optimización demostró que es posible mejorar la resolución aumentando la longitud de las columnas y reduciendo el tamaño de partículas; la columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 de EC-C18 de 100 mm empaquetada con partículas de 1,9 µm mostró los mejores resultados. Mientras que el gradiente de 8,5 minutos consiguió separar las impurezas principales del principio activo, al aumentar el gradiente a 26 minutos se obtuvo una mejor resolución del perfil de impurezas. El método definitivo permitió llevar a cabo un análisis mediante UV y MS del orforgliprón y sus impurezas, incluida la detección del ion molecular protonado a una *m/z* de 883,4, por lo que se seleccionó como enfoque de referencia para el análisis de impurezas.

www.agilent.com

DE-017712

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2026
Impreso en EE. UU., 8 de octubre de 2026
5994-9501ES

Agilent
Trusted Answers