Nota de aplicação

Indústrias biofarmacêutica e farmacêutica

Investigação de química de coluna para a degradação forçada de um fármaco de molécula pequena de GLP-1

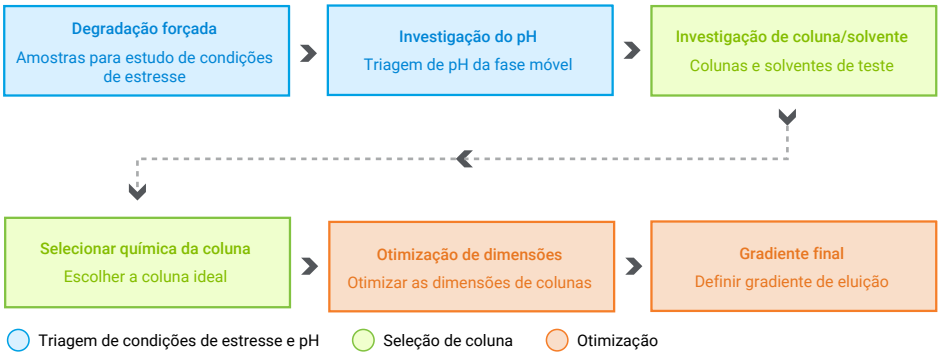
Autor

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

O orforglipron é um agonista oral do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1), não peptídico, recentemente aprovado, que representa um avanço significativo em relação às terapias tradicionais injetáveis de GLP-1 à base de peptídeos. Para auxiliar na caracterização de impurezas e no desenvolvimento de métodos, foram realizados estudos de degradação forçada com o objetivo de gerar produtos de degradação representativos e testar as condições de separação cromatográfica. Um estudo sistemático de triagem de métodos por cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC/MS) foi conduzido utilizando seis químicas de fase estacionária, incluindo fases de C18, à base de fenil, pentafluorofenil (PFP) e de modo misto, avaliadas com fases móveis de acetonitrila e metanol. O desempenho da coluna foi avaliado com base na retenção do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), na separação das impurezas e no número total de picos de impurezas detectados. A coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 proporcionou a melhor seletividade geral e a melhor resolução de impurezas. Uma otimização adicional, utilizando uma coluna de 100 mm com partículas de 1,9 µm e um gradiente prolongado de 26 minutos, melhorou significativamente a separação dos produtos de degradação e das impurezas relacionadas. O método final permitiu uma caracterização eficaz, por UV e MS, do orforglipron e de suas impurezas.

Investigação sistemática de métodos de LC para a separação de produtos de degradação forçada do orforglipron



Introdução

Os agonistas do receptor do GLP-1 constituem uma importante classe de agentes terapêuticos utilizados no tratamento do diabetes tipo 2 e da obesidade. Historicamente, a maioria das terapias de GLP-1 tem sido composta por medicamentos à base de peptídeos que apresentam baixa biodisponibilidade por via oral devido à degradação enzimática e à absorção limitada no trato gastrointestinal, exigindo a administração por injeção subcutânea. Embora a semaglutida oral tenha demonstrado que as terapias de GLP-1 à base de peptídeos podem ser administradas por via oral, são necessárias formulações especializadas para superar esses desafios. A aprovação do orforglipron (Figura 1) representou um avanço significativo na área, pois se trata de um agonista do receptor do GLP-1 não peptídico de molécula pequena, que pode ser administrado por via oral, oferecendo potencialmente maior conveniência e melhor acesso aos pacientes em comparação com as terapias injetáveis.

Com a introdução desse novo terapêutico, a caracterização e o monitoramento de potenciais impurezas são fundamentais para garantir a qualidade e a segurança do produto. Os estudos de degradação forçada fornecem informações valiosas sobre o perfil de estabilidade do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), gerando produtos de degradação que podem se formar durante a fabricação, o armazenamento ou o uso. As misturas de produtos de degradação resultantes podem ser utilizadas para testar métodos cromatográficos e garantir a separação adequada do IFA com relação às impurezas relacionadas e produtos de degradação. Neste estudo, foi empregada uma abordagem sistemática de triagem de métodos de LC/MS para desenvolver um método de caracterização de impurezas para o orforglipron. Foram avaliadas seis composições químicas de fase estacionária com mecanismos de seletividade distintos, incluindo colunas de fase reversa, seletivas para compostos aromáticos e de modo misto, antes da seleção e otimização do método cromatográfico final.

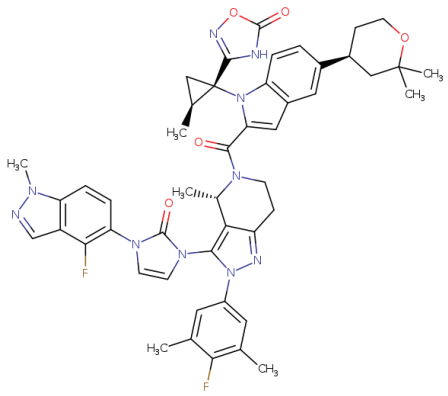


Figura 1. Estrutura do orforglipron.

Parte Experimental

Produtos químicos

O orforglipron foi adquirido da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan).
O hidróxido de amônio e o ácido fórmico de grau LC/MS foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Utilizaram-se água, acetonitrila e metanol do InfinityLab de grau LC/MS como solventes das amostras e componentes da fase móvel.

Instrumentação

Uma bomba binária Agilent 1290 Infinity II (G7120B) foi acoplada a um acionador de válvula externo e a uma válvula seletora de solventes de 13 portas (G4235A) para facilitar a investigação da fase móvel. As amostras foram introduzidas por meio de um multiamostrador Agilent (G7167B) em um compartimento termostatizado com várias colunas (G7116B) equipado com uma válvula seletora de 8 colunas (G4239C). A detecção de impurezas foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos configurado de acordo com as configurações descritas na Tabela 1. O eluente foi, em seguida, encaminhado ao Agilent InfinityLab LC/MSD Pro iQ para detecção por espectrometria de massas. Os parâmetros de operação de MS estão resumidos na Tabela 2. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas com o Agilent OpenLab CDS, versão 2.8.

Tabela 1. Configurações do detector DAD.

Detector DAD	
Parâmetro	**Configuração**
Sinal	254 nm
Largura de banda	4
Taxa de dados	40 Hz
Espectro	190 a 400 nm
Etapa	2 nm

Tabela 2. Configurações de MS.

IQ Pro	
Parâmetro	**Configuração**
Temperatura do gás	325°C
Fluxo de gás	11 L/min
Nebulizador	30 psi
Voltagem do capilar	3.500 V
Modo de aquisição	
Varredura (+)	70 a 1.000 *m/z*
SIM (+)	883,4 *m/z*

Preparo de amostras e degradação forçada

Dez miligramas de orforglipron foram dissolvidos em 4 ml de uma mistura de acetonitrila e água na proporção de 60:40 (v/v) e submetidos à sonicação até a dissolução completa. Alíquotas de 900 µl dessa solução foram transferidas para três vials distintos para estudos de degradação forçada. A degradação foi induzida pela adição de 100 µl de ácido clorídrico 1 M (degradação ácida), 100 µl de hidróxido de sódio 1 M (degradação básica) ou 100 µl de peróxido de hidrogênio a 30% (degradação oxidativa).

As amostras de degradação ácida e básica foram aquecidas a 70°C por 2 horas, enquanto a amostra de degradação oxidativa foi aquecida a 70°C por 1 hora. Após a incubação, as três amostras degradadas foram combinadas para interromper a continuidade das reações de degradação. A mistura resultante foi transferida para um vial de HPLC para análise.

Também foram preparados e analisados, para fins de comparação, um branco de solvente e uma amostra de referência de orforglipron não degradada.

Triagem de métodos

No OpenLab, é possível realizar alterações automatizadas nos parâmetros do método por meio de modificações no painel de sequências. É possível adicionar à sequência uma seleção de colunas para substituição nos métodos, permitindo que configurações específicas dos métodos sejam substituídas (Figura 2).
Por exemplo, quando uma válvula de seleção de 8 colunas está instalada, é possível avaliar diferentes químicas de colunas utilizando o mesmo método, avançando a posição da válvula na lista de trabalho e executando um método de equilíbrio rápido antes da análise da amostra. Outros parâmetros disponíveis para a substituição nos métodos incluem a temperatura da coluna, a composição inicial do gradiente e a vazão.

Seis colunas, todas configuradas como 2,1 × 50 mm, com partículas de 2,7 µm, foram selecionadas para os testes e são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Colunas de HPLC da Agilent avaliadas.

Química (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	Número de peça
InfinityLab Poroshell HPH-C18	699775-702
InfinityLab Poroshell 120 CS-C18	699775-942
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18	699775-902
InfinityLab Poroshell 120 PFP	699775-408
InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	699775-912
Altura Poroshell 120 PFAS	227205-007
Dimensões adicionais	
Infinity Lab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 2,7 µm	695775-902
Infinity Lab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 1,9 µm	695675-902

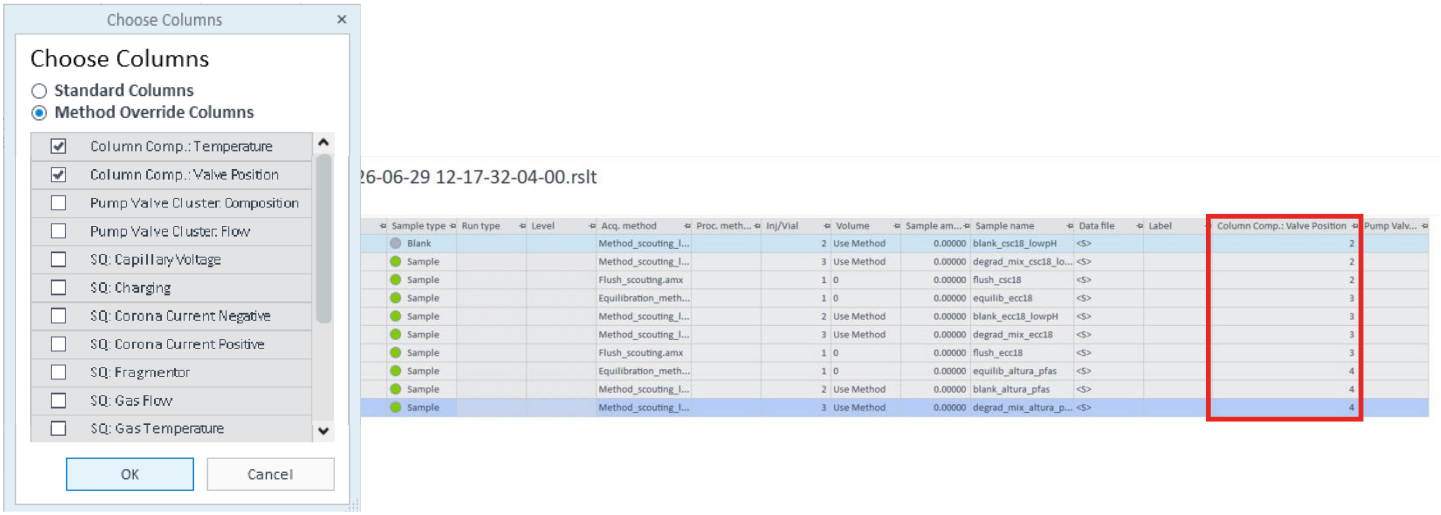


Figura 2. Colunas de substituição de métodos disponíveis no painel de sequências do OpenLab.

Resultados e discussão

Resultados da triagem de métodos

A triagem inicial de pH foi realizada utilizando a coluna Poroshell HPH-C18, uma vez que ela é compatível com uma ampla faixa de pH. A fase móvel aquosa consistia em água com 0,1% de ácido fórmico ou 10 mM de hidróxido de amônio e era combinada com o modificador correspondente na fase orgânica de acetonitrila. Após a constatação de que as condições de baixo pH proporcionavam melhor retenção (Figura 3), preparou-se uma fase móvel orgânica à base de metanol contendo 0,1% de ácido fórmico, que foi incorporada ao fluxo de trabalho de teste automatizado por meio da comutação da válvula seletora de solvente de 12 portas.

No gradiente de triagem inicial, o IFA e todas as impurezas foram eluídos em um intervalo de um minuto sob condições de elevada proporção de solvente orgânico. Uma linha de base crescente abaixo dos picos indicou uma coeluição significativa. Para permitir uma avaliação mais eficaz das diferentes químicas de colunas, foi desenvolvido um gradiente suave, iniciando com uma alta porcentagem de solvente orgânico (Figura 4), que foi utilizado para testar as colunas adicionais.

A coluna Poroshell EC-C18 foi incluída porque suas características de superfície e da fase ligada diferem das da coluna Poroshell HPH-C18 e, portanto, poderiam proporcionar retenção e seletividade complementares para o orforglipron e seus produtos de degradação. A coluna Poroshell CS-C18 foi incluída porque sua seletividade alternativa para C18 poderia, potencialmente, melhorar a separação de impurezas, enquanto a fase Poroshell PFP foi avaliada devido à sua seletividade exclusiva em relação a compostos aromáticos, como o orforglipron. A coluna Poroshell Altura PFAS também foi incluída na triagem porque seu mecanismo de retenção de modo misto proporciona seletividade além das interações tradicionais de fase reversa e pode oferecer vantagens na resolução de impurezas que não são adequadamente separadas em fases C18 convencionais.

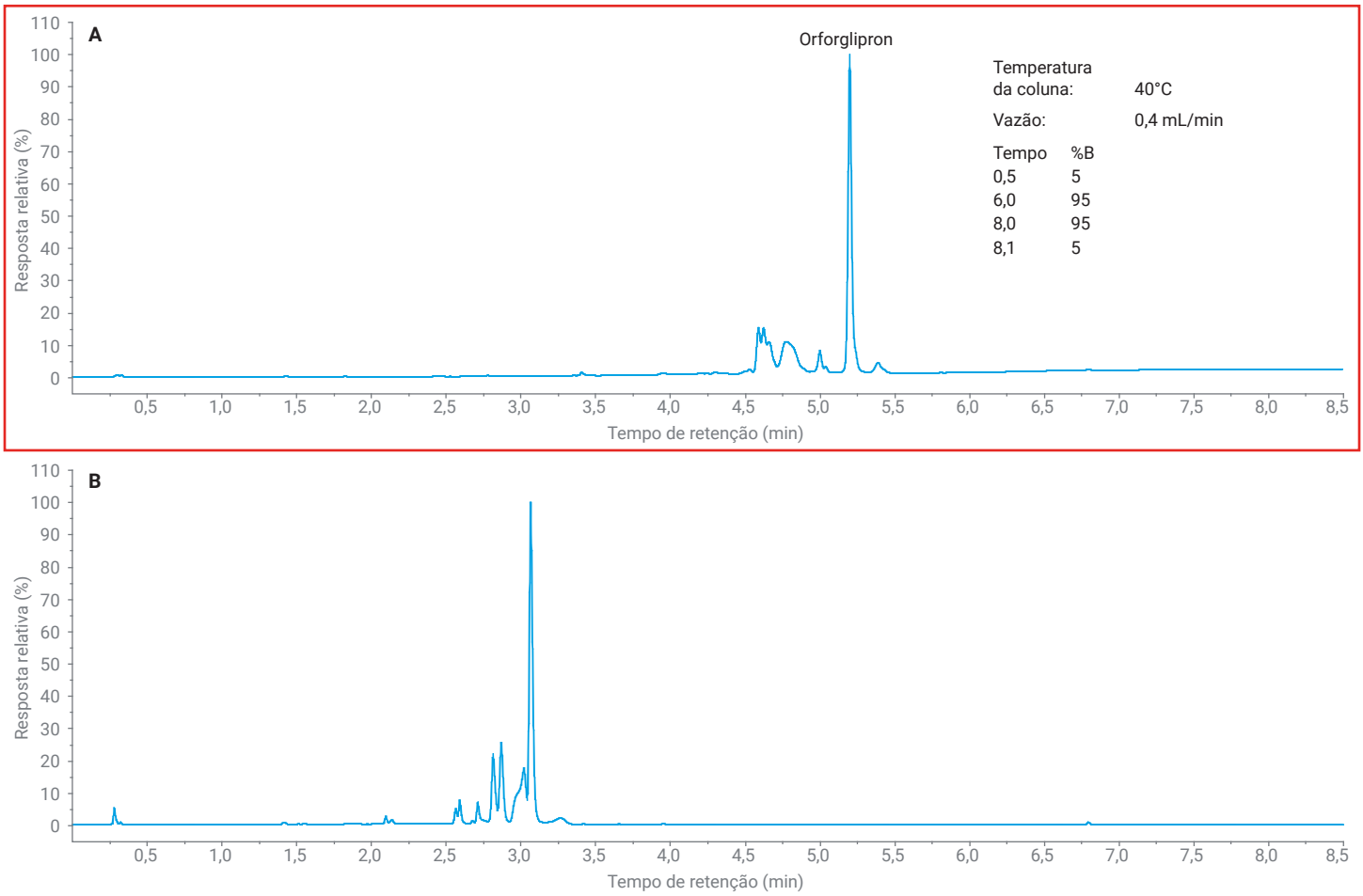


Figura 3. Cromatogramas de misturas de degradação com uma coluna Agilent Poroshell HPH-C18: (A) gradiente de ácido fórmico; (B) gradiente de hidróxido de amônio.

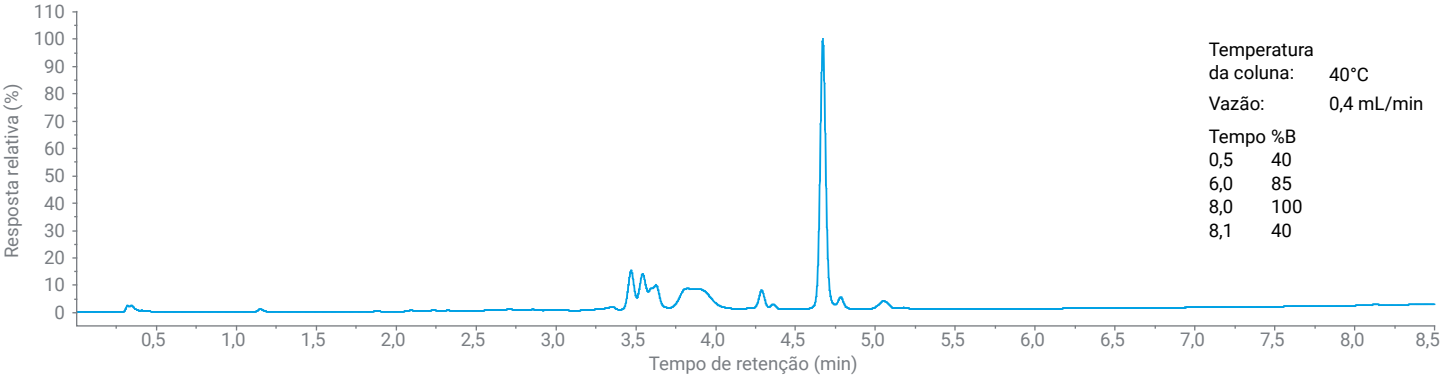


Figura 4. Cromatograma da mistura de degradação com uma coluna Agilent Poroshell HPH-C18 e gradiente de triagem focado em pH baixo.

A Figura 5 apresenta cromatogramas de fases estacionárias selecionadas. O desempenho da coluna foi avaliado por meio de três métricas principais: separação das impurezas do IFA, retenção do IFA e número total de picos de impurezas detectados. Com base nesses critérios, a coluna Poroshell EC-C18 apresentou o melhor desempenho geral.

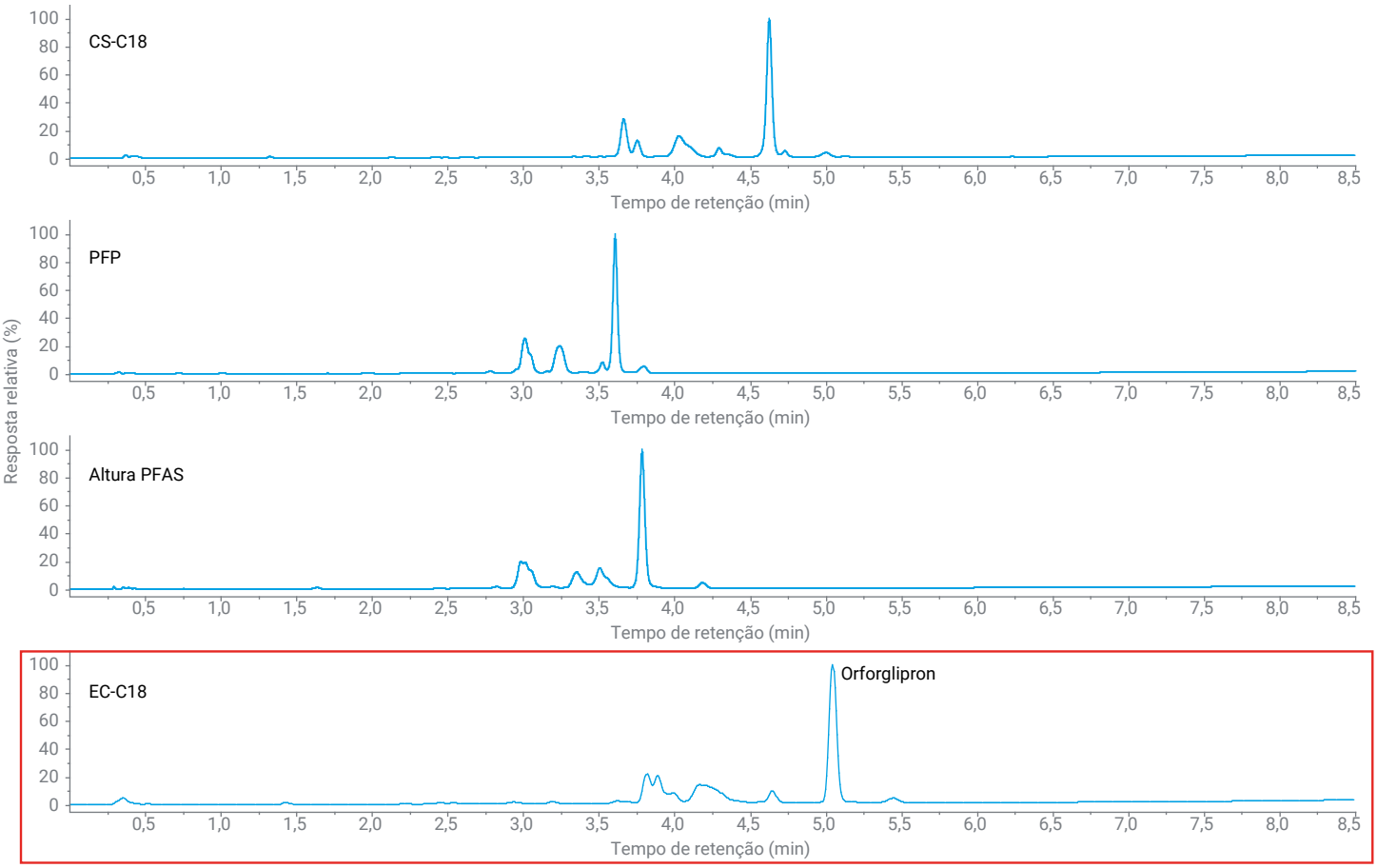


Figura 5. Cromatogramas da mistura de degradação.

Todas as colunas foram avaliadas utilizando a acetonitrila e metanol como modificadores orgânicos. Na maioria dos casos, a acetonitrila apresentou desempenho superior, resultando em maior separação entre os picos do IFA e das impurezas. A única exceção foi a coluna PhenylHexyl. A Figura 6 compara as separações obtidas na coluna PhenylHexyl utilizando (A) acetonitrila e (B) metanol. Essa fase estacionária foi incluída porque pode proporcionar uma seletividade única por meio de interações π-π com compostos altamente aromáticos, como o orforglipron. Sabe-se que o metanol altera a seletividade das fases de fenil-hexil em relação à acetonitrila e, neste caso, observou-se uma maior separação das impurezas com o metanol. No entanto, nenhuma das condições com PhenylHexyl apresentou desempenho superior ao da coluna Poroshell EC-C18 no que diz respeito à separação de impurezas do IFA ou ao número total de picos de impurezas detectados.

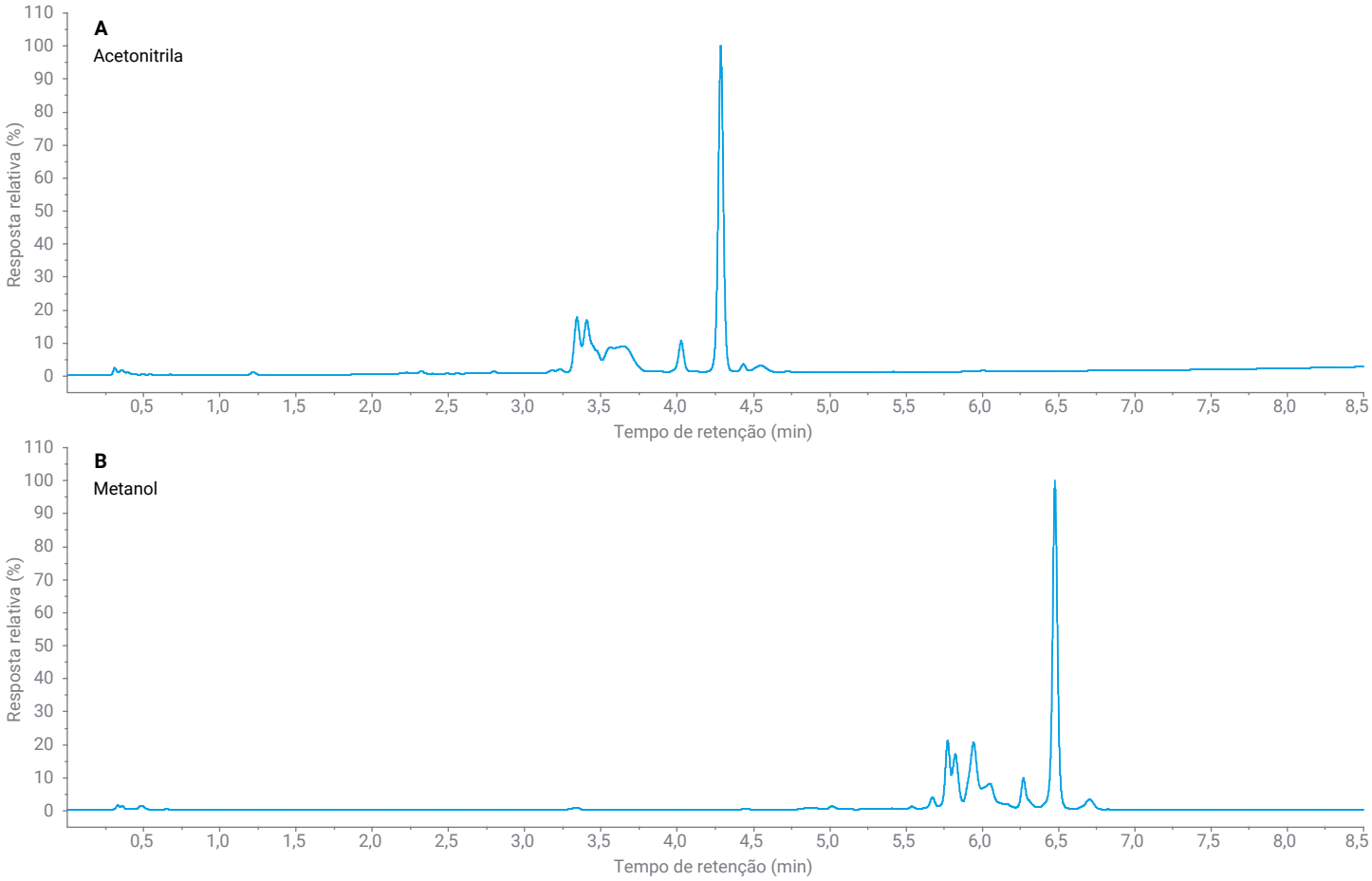


Figura 6. Cromatogramas da mistura de degradação em uma coluna Agilent Poroshell PhenylHexyl com (A) acetonitrila e (B) metanol como fase móvel orgânica.

Otimização da separação com Poroshell EC-C18

Outra abordagem para melhorar a resolução das impurezas consistiu em aumentar o comprimento da coluna. A química da coluna Poroshell EC-C18, identificada durante a triagem inicial, foi, portanto, avaliada no formato de 100 mm, com tamanhos de partículas de 2,7 e 1,9 µm, utilizando um gradiente de 8,5 minutos. A coluna de 100 mm × 1,9 µm proporcionou a melhor separação geral e foi selecionada para o desenvolvimento posterior do método. Além disso, o espectro de massas do IFA apresentou um íon molecular protonado puro em *m/z* 883,4, juntamente com um íon fragmento na fonte em *m/z* 797,3, resultante de uma perda neutra (Figura 7).

Embora o gradiente de 8,5 minutos tenha proporcionado uma separação na linha de base das principais impurezas em relação ao IFA, vários picos de impurezas permaneceram apenas parcialmente resolvidos. Para melhorar ainda mais a resolução, foi desenvolvido um gradiente mais longo e totalmente otimizado.

O método final utilizou um gradiente de 26 minutos, o que melhorou significativamente a separação das impurezas e permitiu uma caracterização mais completa do perfil de impurezas (Tabela 4). O gradiente inicial suave foi necessário para separar totalmente as impurezas. Na Figura 8 são apresentados cromatogramas representativos de UV e MS obtidos com o método otimizado. A resolução aprimorada obtida com o gradiente mais longo facilitou uma melhor detecção e caracterização de picos individuais de impurezas, mantendo, ao mesmo tempo, a retenção e o formato do pico do IFA aceitáveis.

Tabela 4. Método de LC otimizado final para o perfil de impurezas do orforglipron.

Parâmetro	Condição final
Coluna	coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
Dimensões	2,1 × 100 mm, 1,9 µm
Fase móvel A	Água com 0,1% de ácido fórmico
Fase móvel B	Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico
Vazão	0,5 mL/min
Temperatura da coluna	40°C
Volume de injeção	1 µL
Programa do gradiente	Tempo (min) %B 0,5 40 16 52 18,4 70 24 100

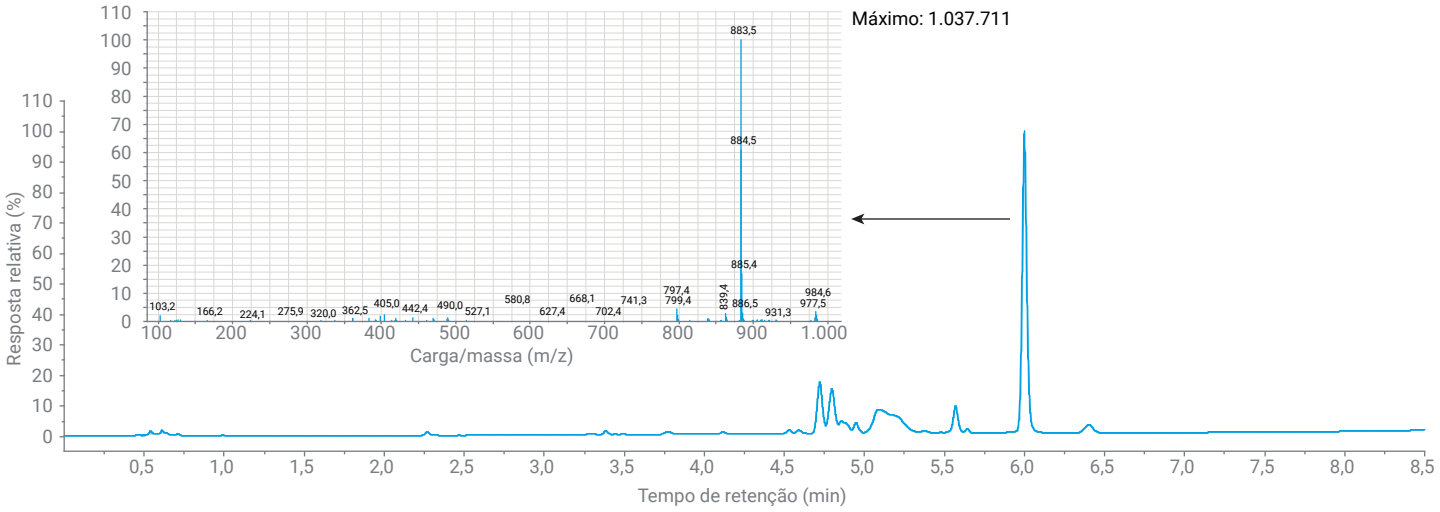
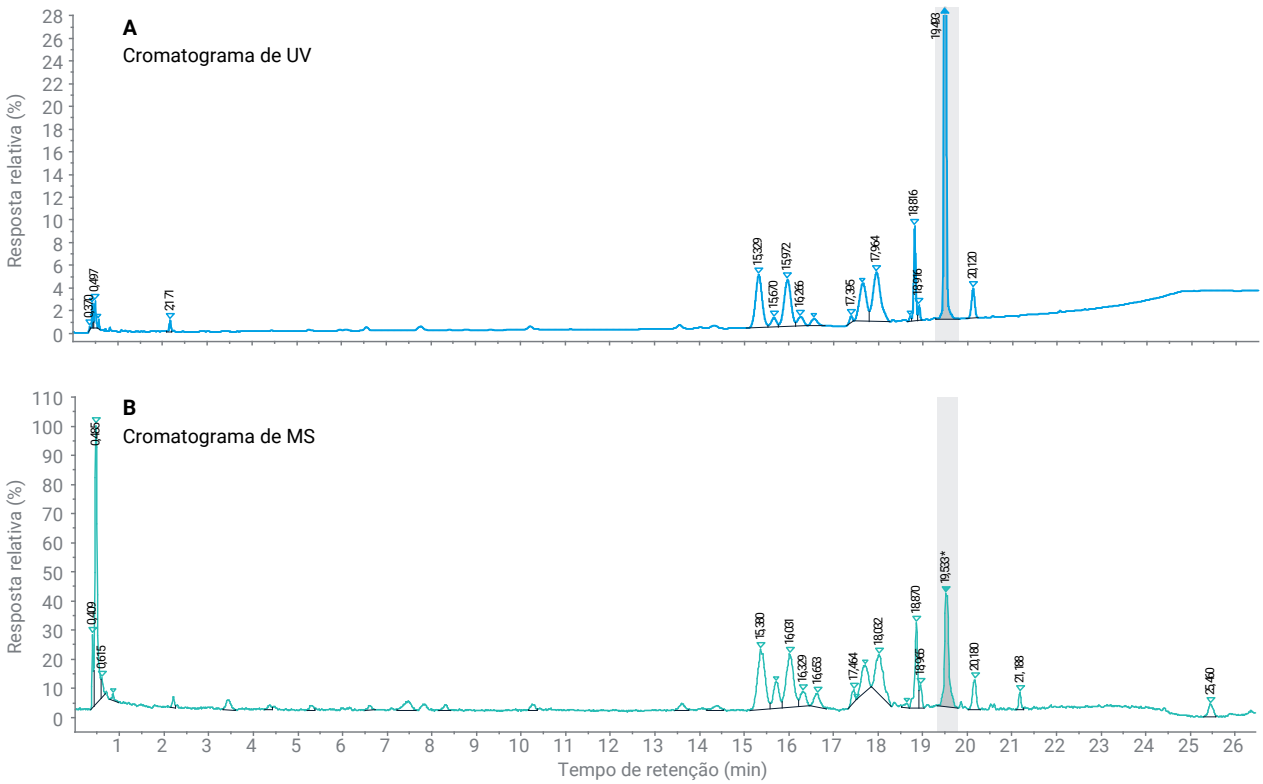


Figura 7. Cromatograma de UV da mistura de degradação, utilizando uma coluna Agilent EC-C18 2,1 × 100 mm e 1,9 µm, com gradiente de 8,5 minutos, e espectros de MS do pico do IFA.



RT	*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. Mistura de degradação [(A) Cromatograma de UV, (B) Cromatograma de MS] utilizando o gradiente final para a coluna Agilent Poroshell EC-C18 e tabela de MS de todos os picos em *m/z*.

Conclusão

A triagem de colunas identificou a fase Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 como a melhor opção geral entre as fases estacionárias avaliadas para o perfil de impurezas do orforglipron, proporcionando retenção do IFA, separação de impurezas e detecção de picos de impurezas superiores. Em geral, a acetonitrila proporcionou melhores separações do que o metanol, embora o metanol tenha melhorado a seletividade na coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 PhenylHexyl.

Outras otimizações demonstraram que o aumento do comprimento da coluna e a redução do tamanho das partículas melhoraram a resolução, sendo que a coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 de 100 mm empacotada com partículas de 1,9 µm apresentou o melhor desempenho. Embora um gradiente de 8,5 minutos tenha separado as principais impurezas do IFA, o prolongamento do gradiente para 26 minutos melhorou ainda mais a resolução do perfil de impurezas. O método final permitiu uma análise eficaz por UV e MS do orforglipron e de suas impurezas, incluindo a detecção do íon molecular protonado em *m/z* 883,4, e foi selecionado como a abordagem preferida para a análise de impurezas.

www.agilent.com

DE-017712

Essas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2026
Impresso nos EUA, 8 de outubro de 2026
5994-9501PTBR

Agilent
Trusted Answers