


NT-1386

Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) Indicativo de Estabilidade para Determinação de Substâncias Relacionadas e Produtos de Degradação de Semaglutida Usando a Aeris™ Peptide XB-C18

 Arunkumar D N¹, Rajesh Babu Dandamudi, PhD¹, e Sean Orłowicz²
¹ India Phenologix Lab, Phenomenex India, Área Industrial do Parque de Defesa e Aeroespacial Hitech, Mahadeva Kodigehalli, Hobli, Jala Taluka, Bengaluru 562149, Índia.

² Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

Introdução

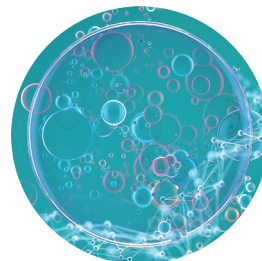
A Semaglutida é um fármaco agonista do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), utilizado no tratamento do diabetes tipo 2 e da obesidade. O mecanismo de ação da Semaglutida envolve o aumento da secreção de insulina, a redução dos níveis de glucagon e o retardo do esvaziamento gástrico. Essas ações resultam em melhor controle da glicemia e favorecem a perda de peso. A semaglutida emula os efeitos do hormônio endógeno GLP-1, responsável pelo controle do apetite e pelo metabolismo da glicose.

A separação de impurezas na produção de semaglutida apresenta desafios devido à natureza complexa das impurezas peptídicas relacionadas. Essas impurezas frequentemente incluem isômeros de aminoácidos D, sequências truncadas, formas oxidada ou reduzida e outras provenientes de desamidação, fosforilação, acilação e glicosilação. Para obter uma separação eficaz dessas impurezas, é necessário um método sistemático e uma seleção cuidadosa da fase estacionária. Retenções e seletividades aprimoradas são exigidas para distinguir entre as inúmeras impurezas peptídicas que se assemelham entre si. Com esse propósito, foi desenvolvido um método HPLC de alta capacidade de separação usando coluna Aeris™ Peptide XB-C18. Essa coluna é especificamente projetada para separações de peptídeos. A superioridade dessa coluna reside em duas características tecnológicas principais. Primeiramente, a fase estacionária é composta por ligantes XB-C18 com cadeias laterais di-isobutílica, que resultam em uma fase ligada de maneira uniforme e com um maior espaçamento entre os ligantes em comparação com as fases C18 convencionais. Esse design permite interações mais eficazes de peptídeos longos (mais de 20 resíduos) com a fase estacionária, otimizando a retenção e a seletividade. Em segundo lugar, a coluna utiliza partículas com morfologia core-shell. Essas partículas consistem em um núcleo sólido e impermeável envolto por uma camada externa porosa. Essa arquitetura minimiza a distância que o analito precisa percorrer dentro da partícula, reduzindo a difusão do analito e, consequentemente, o alargamento da banda cromatográfica. O resultado são picos mais estreitos e eficientes, proporcionando uma resolução e um formato de pico excepcionais, que são cruciais para a separação de impurezas que eluem muito próximas umas das outras.

Nesta nota técnica, estudos de degradação forçada foram conduzidos para avaliar a natureza indicativa de estabilidade do método. A Semaglutida foi submetida a várias condições de estresse, incluindo:

- Degradação ácida (0,1 mL de HCl 1 N à temperatura ambiente por 5 horas)
- Degradação básica (0,1 mL de NaOH 0,1 N à temperatura ambiente por 4 horas)
- Degradação oxidativa (0,1 mL de H₂O₂ 1% à temperatura ambiente por 1 hora)
- Degradação térmica (banho-maria a 80 °C por 15 horas)

Este método separou efetivamente a Semaglutida de suas 8 impurezas conhecidas e de até 35 impurezas de degradação desconhecidas, demonstrando especificidade e capacidade indicativa de estabilidade. O teste de pureza de pico com detector PDA confirmou a pureza de pico de Semaglutida em todas as amostras de degradação.



Relação de Impurezas:

Os padrões de Semaglutida e suas impurezas foram adquiridos localmente das empresas ManoTri Pharma e Simson Pharma.

No S	Analito	IUPAC (Sequência)
1	D-Asp (9) - Semaglutida	H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
2	D-His (1) - Semaglutida	D-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
3	D-Phe (6) - Semaglutida	H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-D-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
4	D-Ser (8) - Semaglutida	H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-D-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
5	3-31 Semaglutida	H-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
6	Semaglutida sem Cadeia Lateral	H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
7	(3-31)linear - Semaglutida	H-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH
8	D-Ser (11) - Semaglutida	H-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-D-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-carboxi heptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Condições Cromatográficas para Substâncias Relacionadas

Coluna:	Aeris Peptide XB-C18, 2,6 μm (Ref: 00G-4505-E0)		
Dimensões:	250 x 4,6 mm		
Tampão	11,5 g de fosfato de amônio di-hidrogenado em 1000 mL de água Milli Q (100 mM)		
Fase Móvel:	A: Preparar 900:100 v/v (Tampão: Acetonitrila) e adicionar 1 mL de ácido perclórico a 70%. B: Preparar 600:300:100 v/v/v (Acetonitrila: Metanol: Água) e adicionar 1 mL de ácido perclórico a 70%.		
Diluíente	acetonitrila e água (50:50 v/v)		
Gradiente:	Tempo (min)	% A	% B
	0	50	50
	3	50	50
	20	45	55
	30	34	66
	95	32	68
	100	25	75
	118	25	75
	119	50	50
	125	50	50
Fluxo:	0,6 mL/min		
Volume de Injeção:	5 μL		
Temperatura:	25 °C		
Sistema HPLC:	HPLC Waters® Arc com PDA		
Detector:	UV @ 210 nm		

	Análito	Tempo de Retenção	Área	% de Área	Altura	Resolução USP	Fator de Cauda USP
1	Semaglutida sem Cadeia Lateral	25,786	132364	1,16	6297		1,9
2	3-31 Semaglutida Linear	27,031	103660	0,91	9559	3,2	1,0
3	Impureza Desconhecida 1	32,714	17506	0,15	1396	18,6	0,7
4	D-Ser (11) Semaglutida	67,086	75088	0,66	2304	59,2	1,2
5	D-Ser (8) Semaglutida	70,811	74264	0,65	2183	4,3	1,0
6	Impureza de Degradação 1	72,301	8341	0,07	365	2,0	0,8
7	D-Asp (9) Semaglutida	73,119	50461	0,44	1638	1,1	1,3
8	Impureza Desconhecida 2	75,258	33417	0,29	849	2,3	0,9
9	Impureza de Degradação 2	77,007	21300	0,19	669	1,9	1,0
10	Impureza Desconhecida 3	78,024	19598	0,17	628	1,2	1,3
11	D-Phe (6) Semaglutida	79,584	65330	0,57	1936	1,8	1,1
12	Semaglutida	81,030	10623482	93,32	209534	1,3	2,5
13	Impureza de Degradação 3	85,580	25188	0,22	608	3,6	1,1
14	D-His (1) Semaglutida	87,214	65980	0,58	1402	1,4	1,5
15	3-31 Semaglutida	90,808	68189	0,60	1518	3,0	1,0



Figura 2. Solução padrão de Semaglutida 1 mg/mL para substância relacionada como amostra.

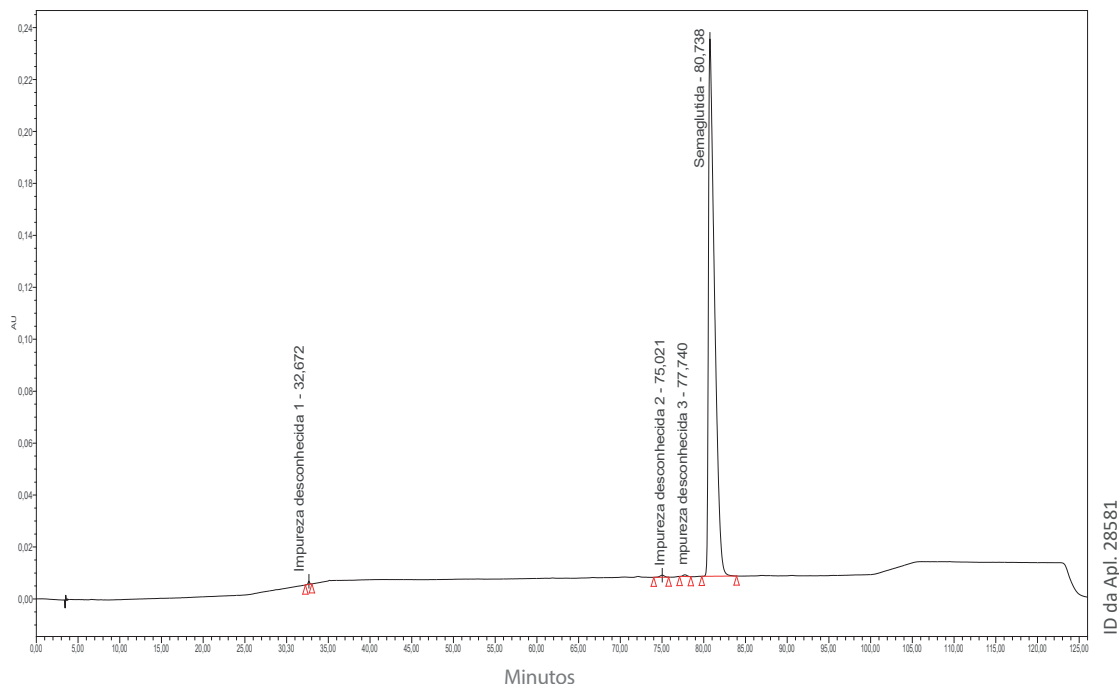
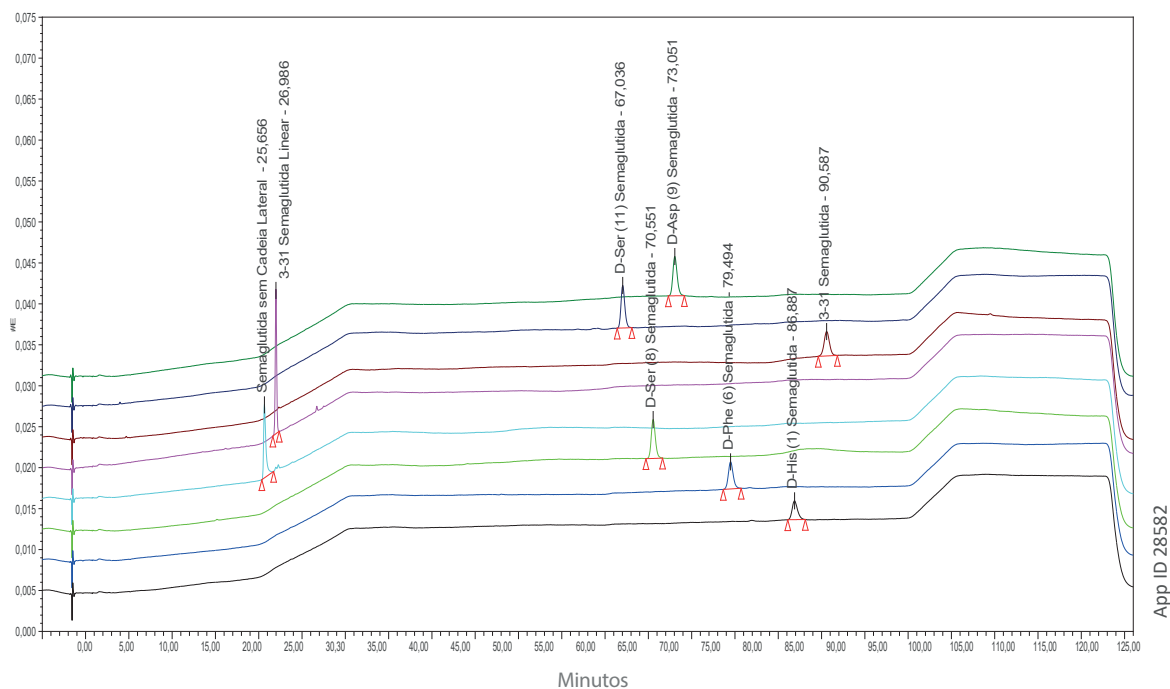


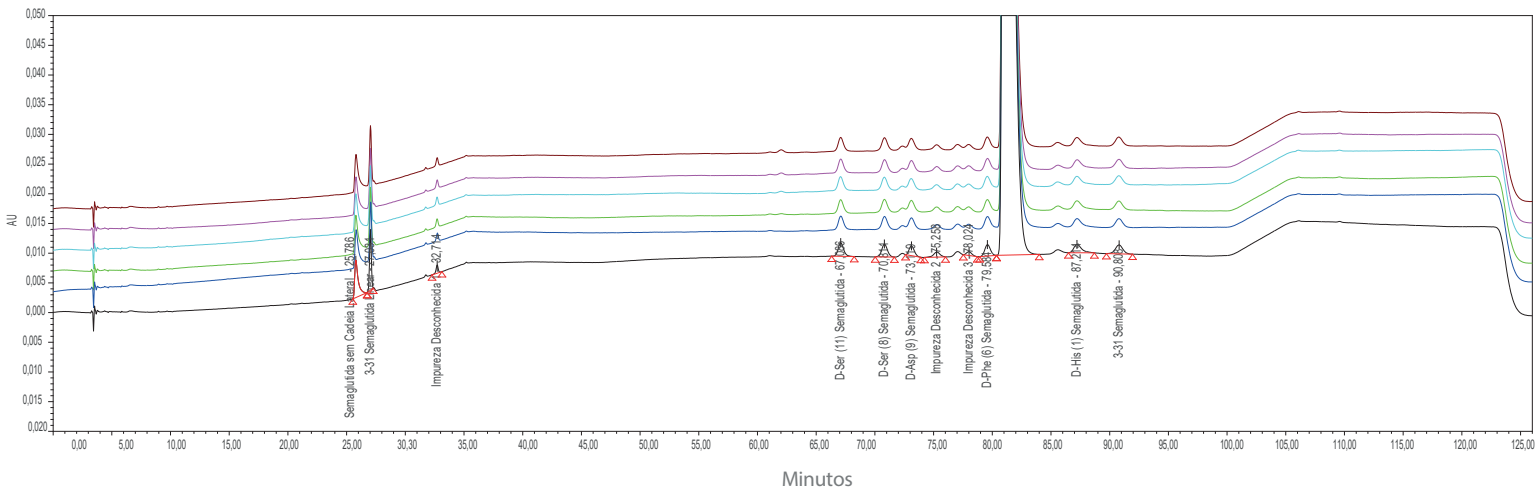
Figura 3. Cromatograma sobreposto de impurezas individuais conhecidas.



O cromatograma da solução padrão de semaglutida fortificada com as impurezas relacionadas conhecidas é apresentado na **Figura 1**. Conforme observado, o método proporcionou uma excelente separação cromatográfica da semaglutida das oito impurezas conhecidas adicionadas, juntamente com três impurezas desconhecidas presentes na amostra. Três impurezas de degradação também foram observadas, possivelmente devido à degradação adicional das impurezas conhecidas. O cromatograma da solução padrão de semaglutida (não fortificada) é mostrado na **Figura 2**. Observou-se que o padrão continha três impurezas não identificadas em baixas concentrações, as quais foram efetivamente separadas do pico de Semaglutida. Todas as impurezas identificadas foram bem resolvidas do pico de Semaglutida, com resolução $\geq 1,3$, e foram confirmadas usando padrões de referência individuais. Uma sobreposição dos cromatogramas dos padrões individuais é apresentada na **Figura 3**. A adequação do sistema foi validada por meio de seis injeções replicadas da solução amostra, demonstrando alta reprodutibilidade tanto nos tempos de retenção quanto nas áreas dos picos, conforme mostrado na **Figura 4**.



Figura 4. Cromatograma sobreposto de seis injeções replicadas do Padrão fortificadas com impurezas conhecidas em 1,0%.

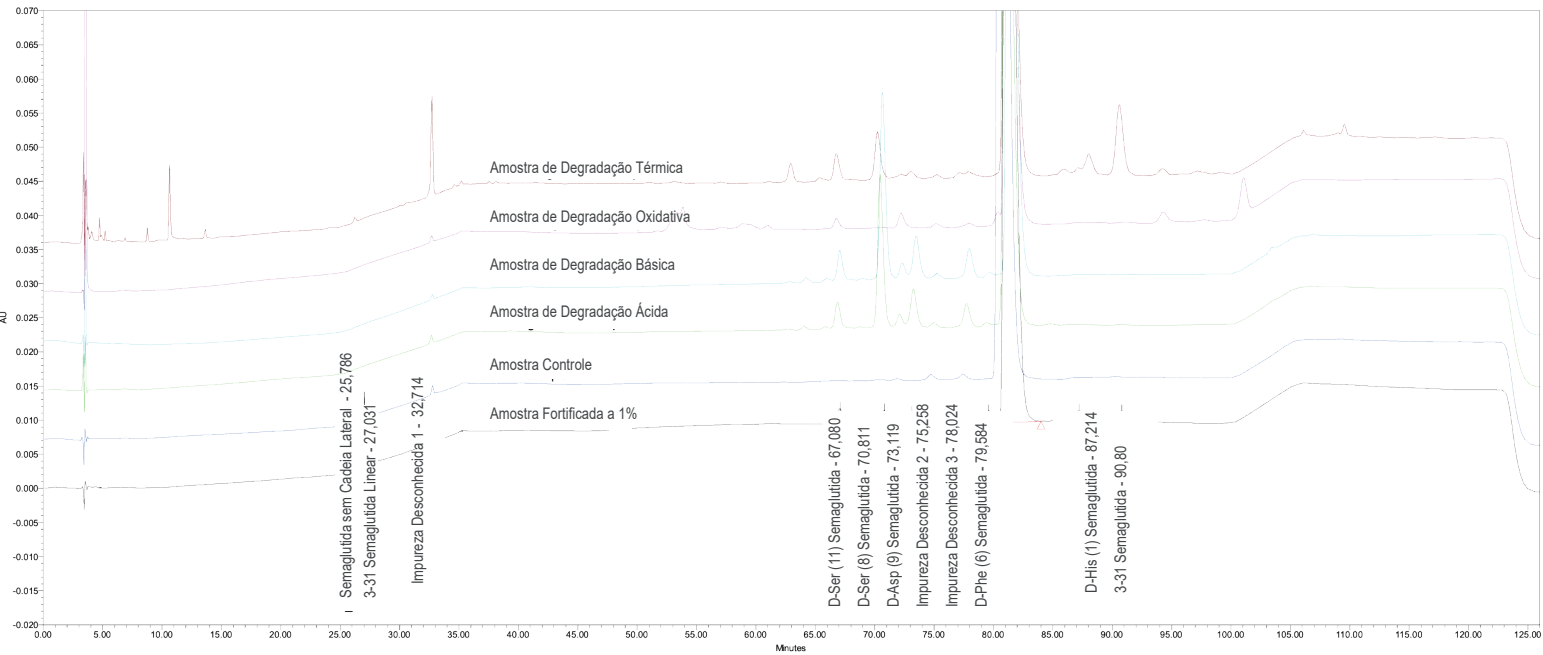


	Semaglutida sem Cadeia Lateral		3-31 Semaglutida Linear		D-Ser (11) Semaglutida		D-Ser (8) - Semaglutida		D-Asp(9) Semaglutida		D-Phe(6) Semaglutida		Semaglutida		D-His (1) - Semaglutida		3-31 Semaglutida	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
Média	25,794	132255	27,034	104010	67,087	74437	70,816	74628	73,114	50777	79,580	66687	81,024	10664374	87,214	64569	90,786	65344
DP	0,011	480	0,010	331	0,011	981	0,007	571	0,007	433	0,012	842	0,009	25733	0,010	2199	0,018	1660
DPR %	0,0	0,4	0,0	0,3	0,0	1,3	0,0	0,8	0,0	0,9	0,0	1,3	0,0	0,2	0,0	3,4	0,0	2,5

N=6 Injeções

Estudos de Degradação Forçada

Figura 5. Cromatograma sobreposto de amostras expostas a tipos variados de abordagens de degradação forçada.





Nome da Amostra	Condição de Degradação Forçada	Porcentagem de Impurezas de Degradação	Número de picos de degradação
Amostra Controle	-	0,68	3
Amostra de Degradação Ácida	0,1 ml de HCl 1N por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C)	16,16	14
Amostra de Degradação Básica	0,1 ml de NaOH 1N por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C)	18,61	13
Amostra de Degradação Oxidativa	0,1 ml de H ₂ O ₂ 1% por 1 hora em temperatura ambiente (25 °C)	9,36	18
Amostra de Degradação Térmica	Em banho-maria a 80 °C por 15 horas	13,66	35

O padrão de Semaglutida (1 mg/mL) foi submetido a uma série de testes de estresse, que incluíram degradação ácida (0,1 mL de HCl 1 N à temperatura ambiente por 5 horas), degradação básica (0,1 mL de NaOH 0,1 N à temperatura ambiente por 4 horas), degradação oxidativa (0,1 mL de H₂O₂ 1% à temperatura ambiente por 1 hora) e degradação térmica (banho-maria a 80 °C por 15 horas). Os resultados das análises cromatográficas para cada amostra após o tratamento são apresentados como um cromatograma de sobreposição na **Figura 5**. Como esperado, a amostra de controle (padrão de semaglutida sem tratamento) continha apenas 3 impurezas desconhecidas detectadas em níveis baixos. Durante a degradação ácida, um total de 14 impurezas foram identificadas; na degradação básica, 13 impurezas foram observadas, enquanto que na degradação oxidativa, 18 impurezas de degradação foram encontradas. A degradação térmica resultou na formação de quase 35 impurezas de degradação. Todos os picos de degradação foram distintamente separados uns dos outros. As impurezas de degradação resultantes das degradações ácida e básica apresentaram semelhanças, enquanto impurezas distintas foram geradas nas degradações térmica e oxidativa.

Conclusões

Foi empregada uma coluna Aeris Peptide XB-C18 (250 × 4,6 mm, 2,6 µm) para estabelecer um método indicativo de estabilidade para as substâncias relacionadas da Semaglutida. O objetivo deste método é quantificar com precisão as impurezas e os produtos de degradação associados à Semaglutida sob várias condições de estresse, garantindo a separação efetiva da Semaglutida de suas impurezas. Estudos de degradação forçada foram realizados para avaliar a estabilidade e a degradação do fármaco em diferentes condições de estresse, que incluíram degradações ácida, básica, oxidativa (peróxido) e térmica. Os resultados demonstram que o método desenvolvido é altamente eficaz na resolução tanto das impurezas relacionadas ao processo quanto daquelas geradas por degradação forçada. Ademais, o método apresenta excelente reprodutibilidade, tornando-o uma ferramenta confiável para estudos indicativos de estabilidade da Semaglutida.