

使用MaxPeak™ Premier HPLC色谱柱在Alliance™ HPLC™系统上进行Janus激酶抑制剂巴瑞替尼的强制降解研究

Kenneth D. Berthelette, Maureen DeLoffi, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

巴瑞替尼是一种免疫调节药物，通过抑制Janus激酶亚型JAK1和JAK2发挥作用。该药物用于治疗类风湿性关节炎、斑秃，最近还被用来治疗COVID-19。巴瑞替尼是首个用于治疗COVID-19的免疫调节药物，于2022年获得批准¹。与许多新型药物一样，在用药前需要对工艺杂质和降解物进行适当分析，确保药物的安全性。

本研究在Alliance HPLC系统上使用XBridge™ Premier色谱柱开展了强制降解研究。在强制降解之前，研究中还比较了MaxPeak Premier色谱柱与不锈钢色谱柱，评估该技术对巴瑞替尼峰的分析优势。我们观察到MaxPeak Premier色谱柱具有显著优势，因此使用该色谱柱来分析强制降解样品。

优势

- 使用XBridge Premier色谱柱时，巴瑞替尼和杂质的峰面积有所增加
- 在降解条件下获得新的降解物峰
- 使用XBridge Premier BEH™ C₁₈色谱柱和高pH值流动相可完全分离巴瑞替尼及其降解物

简介

了解药物的降解方式是治疗性化合物开发和放行的重要一环。因此需要进行强制降解研究和稳定性研究，以确保制剂样品不仅稳定，且形成的任何降解物对消费者来说都是安全的。这类研究通常分为两部分，第一部分为强制降解。在此测试中，活性药物成分(API)会在不同条件下进行降解，以展示该化合物在不同化学环境下的降解情况。通常采用酸性和碱性水解、过氧化物、光解和热降解等手段尝试来及时降解化合物。第二部分是稳定性测试，将制剂样品储存在最终包装中，并在合理条件下存放，并定期测试，确保其不会降解，或者包装不会影响制剂样品。稳定性和可浸出物测试的设置时间要长得多，因为样品没有像在强制降解研究中那样受到“降解”。这些研究对于产品开发至关重要，有助于快速获得准确的结果，从而加快产品的上市速度。

使用常规系统和色谱柱硬件很难快速获得准确的结果。不锈钢硬件可能会对分析物回收率和峰形产生不良影响，导致结果不佳²⁻⁵。此外，众所周知，不锈钢硬件会随着时间的推移而钝化，导致螯合或对金属敏感的化合物的峰面积增加²。对于关键分析，如果峰面积随着时间的推移而变化，或者结果的重现性较差，可能导致代价高昂的返工，或者更严重的是，导致结果失败。但是，借助采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的MaxPeak Premier色谱柱可以缓解这些问题，从首次进样就能获得更准确的结果。

为了展示MaxPeak Premier色谱柱的优势，我们对JAK抑制剂巴瑞替尼进行了强制降解研究。在强制降解测试之前，我们比较了不锈钢色谱柱与MaxPeak Premier色谱柱，以评估MaxPeak HPS技术的影响。然后使用XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱进行强制降解研究和分析。使用配备TUV检测器的Alliance HPLC系统检测降解物，发现降解物分离良好且对称。最终的方法条件可用于进一步研究，例如通过LC-MS鉴定降解物或通过制备型LC纯化降解物。

实验

样品描述

用50:50 (v:v)乙腈:水溶液配制浓度为1 mg/mL的巴瑞替尼储备液。取1 mL储备液加入100 μ L 1 N氢氧化钠或1 N盐酸，用于强制降解研究。将降解样品在70 °C下加热24 h，合并后进行分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:

配备TUV检测器的Alliance HPLC系统

| | |
|-------|---|
| 检测: | UV 260 nm |
| 色谱柱: | XBridge Premier BEH C ₁₈ 色谱柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186010660) |
| 柱温: | 30 °C |
| 样品温度: | 10 °C |
| 进样体积: | 10 μL |
| 流速: | 2.0 mL/min |
| 流动相A: | 水 |
| 流动相B: | 乙腈 |
| 流动相D: | 200 mM氢氧化铵水溶液 |
| 梯度条件: | 5% D保持不变, 以保持添加剂的浓度。B/C线性梯度在16.43分钟内从5%增加至95%。在95%有机相下保持2.7分钟, 然后在0.02分钟内恢复到5%有机相。重新平衡色谱柱5.51分钟。总运行时间: 25分钟 |

数据管理

色谱软件: Empower™ 3 Feature Release 5

结果与讨论

强制降解和稳定性测试对于新药开发工作流程至关重要。这些研究能够提供宝贵的视角，了解化合物在降解或储存条件下如何降解，以及降解是否会产生任何潜在的危险化合物。随着制药的复杂性不断提高，强制降解研究可能会在活性药物成分(API)存在的情况下产生各种浓度水平的降解物峰。这些低浓度化合物随后可以进行纯化以评估其潜在毒性，或者将其报告为相关化合物并在批次检测中监测其含量。为了获得准确结果，为这些研究选择合适的技术非常重要。对于液相色谱柱，使用MaxPeak HPS技术的MaxPeak Premier色谱柱可以获得非常准确的结果。

MaxPeak Premier色谱柱能够减少分析物与色谱柱硬件中任何金属表面之间的次级相互作用。这些相互作用包括酸性基团与不锈钢中铁离子之间的离子吸附效应，以及其他非特异性吸附(NSA)效应。研究表明，MaxPeak Premier色谱柱能够为多种化合物（即使是不含酸性基团的化合物）提供更高的峰回收率和更好的峰形²⁻⁵。在进行强制降解测试之前，我们评估了MaxPeak Premier色谱柱用于强制降解Janus激酶抑制剂巴瑞替尼的优势。图1和表1分别展示了其代表性色谱图和表格数据。

色谱图显示所得结果几乎没有变化。峰形或峰高无明显变化。图1中所有星标化合物在两根色谱柱上均存在，表明不存在由NSA或离子相互作用引起的分析物损失。但是，如表1所示，与标准不锈钢硬件色谱柱相比，使用XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱获得的这些化合物的峰面积更大。唯一在两根色谱柱上具有大致相同峰面积的分析物是最晚洗脱的峰。

| T _r | XBridge Premier BEH C ₁₈ 色谱柱 | | XBridge BEH C ₁₈ 色谱柱 | | 峰面积增加百分比(%) |
|----------------|---|-------|---------------------------------|-------|-------------|
| | 峰面积 | 峰面积% | 峰面积 | 峰面积% | |
| 2.962 | 38305 | 0.58 | 36222 | 0.58 | 5.44 |
| 3.374 | 50702 | 0.77 | 49139 | 0.78 | 3.08 |
| 3.704 | 13127 | 0.20 | 12699 | 0.20 | 3.26 |
| 4.181 | 7143 | 0.11 | 6906 | 0.11 | 3.32 |
| 巴瑞替尼 | 6431541 | 98.06 | 6152289 | 98.05 | 4.34 |
| 5.663 | 17783 | 0.27 | 17635 | 0.28 | 0.83 |

表1.在XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱和XBridge BEH C₁₈色谱柱上分析巴瑞替尼储备液获得的表格数据。

在两种色谱柱之间，峰面积有3%~5%的适度提高，表明使用MaxPeak Premier色谱柱提高了分析的整体分离质量。如表1所示，两种色谱柱之间的峰面积百分比计数大致相同，这意味着无需重新设计方法来适应所用的新技术。

在这种情况下，对于用MaxPeak Premier色谱柱，只需改变所用的色谱柱即可提供更准确的结果。

鉴于此改进，接下来使用XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱分析强制降解样品。巴瑞替尼储备液使用酸性(1 N HCl)和碱性(1 N NaOH)条件，在70 °C下强制降解24 h。然后将这两个样品合并进行分析，这样不仅能终止降解，还可以结合两种条件的影响。强制降解样品的分析结果如图2所示。

如图所示，酸性和碱性水解降解导致产生了大量的降解物，这些降解物大约为报告的典型0.1%峰面积阈值。如果不使用MaxPeak Premier色谱柱，其中一些分析物的浓度将低于该限值，这意味着它们将不会被报告，如果以后发现它们具有致癌性或潜在毒性，可能会引发问题。尽可能获得准确的数据有助于获得更出色的结果，并最终减少重复工作的需要。MaxPeak Premier色谱柱现在提供3.5 µm粒径配置，使用任何系统的用户都可以借助这项技术快速获得正确结果，并消除分析中的疑虑。

结论

MaxPeak Premier色谱柱采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术，可减少分析物与色谱柱硬件金属表面之间的次级相互作用，从而改善LC的分离效果。通过消除这些相互作用，保留时间的重现性更好，峰的回收率得到改善，并且在许多情况下峰形更加对称。即使对于可能不与金属表面发生相互作用的化合物，MaxPeak Premier色谱柱也已被证明能够改善其分离性能。例如，在分析Janus激酶抑制剂巴瑞替尼时，MaxPeak Premier色谱柱不仅提高了主峰的峰面积，还提高了一些微量杂质的峰面积。更准确的结果有助于减少重复工作，以及缩短关键研究（例如强制降解研究）的周转时间。通过标准化使用MaxPeak Premier色谱柱，可以轻松获得这些优势。

参考资料

1. "FDA Roundup: May 10, 2022". U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Press release). 2022年5月10日.2022年5月10日自原始网站存档.2022年5月10日获取.<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-roundup-may-10-2022>. <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-roundup-may-10-2022>>
2. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A,

Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal.Chem.* 93. 2021. 5773–5781.

3. Zabala G, Berthelette K, Gu W, Haynes K. 使用改为2.5 μm 颗粒的MaxPeak Premier色谱柱提高USP专论方法分析对乙酰氨基酚的重现性.沃特世应用纪要. [720007938ZH](#). 2023年7月.
4. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette K, Boissel C, DeLano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplements*.2022.28-34.
5. Layton C, Rainville P. 使用MaxPeak HPS技术分析靶向癌症生长抑制剂治疗药物的优势.沃特世应用纪要. [720007565ZH](#).2021年3月.

特色产品

Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720008113ZH , 2023年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号