血样及尿样中游离药物的新型萃取法

Sarah L. Skoczen, Stephan T. Stern, Scott E. McNeil

Nanotechnology Characterization Laboratory, Advanced Technology Program, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, Maryland

摘要

目前，对于游离的和纳米颗粒偶联药物的分离纯化还没有合适的方法。游离药物的纯化对于药代动力学研究中药物的体内稳定性分析、生物效应分析等都是迫切需要的。而这方面的研究对于释放纳米颗粒类药物的释放动力学分析、安全性评估及临床剂量分析都是必须的。本研究建立了一种固相萃取方法，用于从纳米偶联物种纯化游离的多西他赛（DTX）及紫杉醇（PTX）。DTX 主要从纳米脂质体制剂（Azaya Therapeutics）中纯化，PTX 主要从白蛋白纳米粒制剂（Abraxane™, Abraxis BioSiences, Inc.）中纯化，两者均存在于大鼠血浆中。通过 HPLC 方法对分离药物进行分析，纯化效率在 70%。与这些制剂的药代动力学数据（1）相符，这些制剂都是不稳定的，药物易纯化。萃取流出物中未检测出纳米脂质体胆固醇和纳米制剂，说明这些物质未被纯化。萃取流出物的定动态光散射结果说明纯化过程不影响纳米脂质体的颗粒大小，但可影响白蛋白颗粒。本研究为在生物基质中检测游离药物奠定了基础。

材料与方法

材料：

1 mL DPX 反相枪头（Catalog #RP-1）购于 DPX 公司（哥伦比亚，南卡罗莱纳州）。12.75 mm 硼硅酸盐玻璃瓶（Catalog # 14-961-26）购于 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。BSA (Catalog # A4503-100G)、Acetonitrile（gradient grade）(Catalog # 439134-1L) 购于 Sigma (St. Lous, MO)。大 鼠 血 浆 (Catalog # INR-N12) 购 于 Innovative Research (Novi, Michigan). 紫 杉 醇 (PTX)(Catalog # P-9600) 和多西他奇 (DTX) (Catalog # D-100) 购于 LC Laboratories (Woburn, MA). HPLC sample 96 well V 型板 (Catalong # 6008290) 购于 Perkin Elmer (Waltham, MA). 硅胶密封垫(Catalog # AM-2ML-RD) 购于 Axygen (union City, CA).

RP-DPX 枪头准备：
1. 吸入 250 L 乙腈，与空气混合，打出于废液瓶；
2. 吸入 250 L 水，与空气混合，打出于废液瓶；
3. 吸入 250 L 2% BSA ，与空气混合，打出于废液瓶（重复 2 次）；
4. 吸入 250 L 水，与空气混合，打出于废液瓶；

RP-DPX 纯化方法：
1. 吸入 250 L 样品，与空气混合，停留 30s，打出于废液瓶；
2. 吸入 250 L 水，与空气混合，打出于废液瓶；
3. 吸入 250 L 乙腈，与空气混合，打出于收集管；重复一次，打出于相同的收集管；
4. 乙腈萃取物用冰冷的乙腈稀释 5 倍，于-80 度冷冻 10 分钟，融化，于 14kg 离心 20 分钟。
5. 将上清转移至硼硅酸盐玻璃瓶中，于 48 度进行氮气干燥。
6. 干燥的样品复溶于 500 L 50% 乙腈溶液中，HPLC 进行分析。

DTX/PTX HPLC 分析：
1. HPLC 系统包括：LC-20AT 泵, SPD-20A UV, SIL-20AC 自动进样器, C-R3A integrator (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Kyoto, Japan)。
2. 柱子为 ZORBAX-SB-C18, 5m 4.6 x 150mm (Catalog # 883975-902, Agilent Technologies, Inc.,Santa Clara, CA) and Aquapore ODS guard column, 7m, RP-18 (Catalog # 0711-0092, Thomson Instrument Company, Clear Brook, VA)。
3. 50 L 上样
4. 0-5 分钟为 25%乙腈，5-15 分钟线性增加到 80%乙腈，15-17 分钟线性降低到 25% 乙腈。UV 检测 227nm，流速为 1 mL/min。柱子温度为 30 度。DTX 和 PTX 的洗脱时间分别为14.73 和 15.03。
5. 血浆基质标准品用于制作校正曲线，浓度用峰面积比计算。

Abraxane/Azaya 纳米脂质体样品准备：
1. 将 Abraxane 和 Azaya 分别稀释于 25%大鼠血浆-2%BSA，至 PTX 和 DTX 浓度为 25 g/mL 。
2. 内标中 DTX 及 PTX 浓度为 3.13 g/mL 。
3. 样品制备两份，立即放置于冰上。

DLS：
颗粒直径使用 DLS 仪器（Malvern Zetasizer Nano ZS instrument (Southborough, MA) with back scattering detector (173°)）进行测量，温度为 25 度。纯化前及纯化后的样品均进行测量。样品溶解在 25 g/mL 的盐溶液中。每个样品重复三次，结果为三次平均值。

Bradford 蛋白浓度测定：
纯化前及纯化后的样品使用 Bradford protein assay kit 1 (Bio Rad, catalog # 500-0201) 进行蛋白浓度测定。Abraxane 样品溶解在盐溶液中，每毫升含有 25 g PTX 。

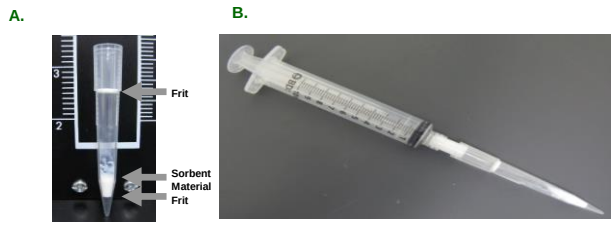


图 1. DPX 反相萃取枪头。
（A）RP-DPX tips，（B）使用的注射

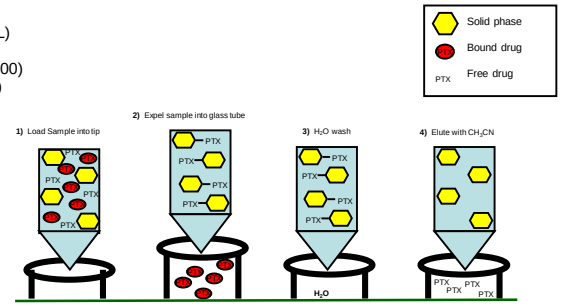


图 2. **RP-DPX tips** 萃取流程。

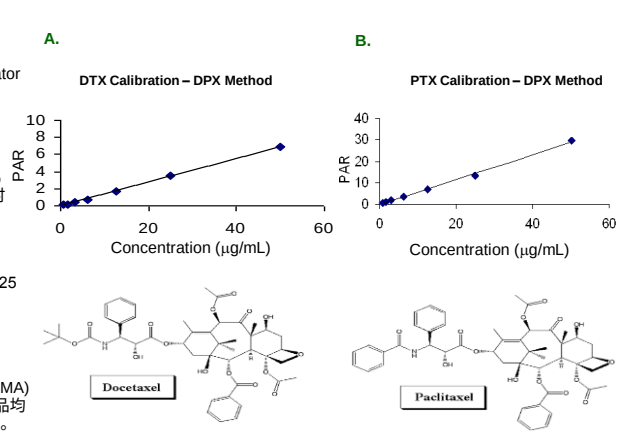


图 **3. DTX/PTX** 校正曲线。
DTX 与 **PTX** 标准品用 **25%**大鼠血清制备，通过 **RP-DPX** 方法进行纯化，并用 **HPLC** 分析。值为复孔的平均值，（**A**）**DTX** 峰面积比（**PAR**）（**DTX/PTX**），（**B**）**PTX** 峰面积比（**PAR**）（**PTX /DTX**）。纯化效率为 **70%**。

参考文献

Randomized crossover pharmacokinetic study of solvent-based paclitaxel and nab-paclitaxel.Gardner ER, Dahut WL, Scripture CD, Jones J, Aragon-Ching JB, Desai N, Hawkins MJ, Sparreboom A, Figg WD. Clin. Cancer Res. 2008 Jul 1;14(13):4200-5.

RP-DPX Extraction: Azaya DTX Nanoliposome

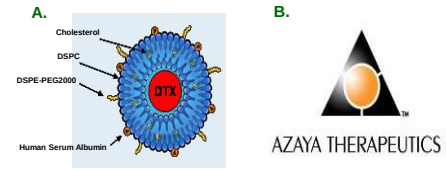


图 4. Azaya 纳米脂质体。
Azaya 纳米脂质体为一种蛋白稳定的 DTX 脂质体制剂，直径为 83 nm。（A）纳米脂质体全貌；（B）Azaya 商品商标。

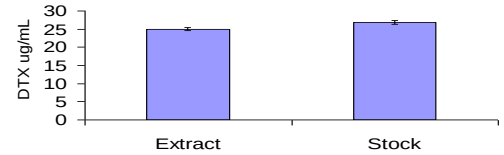


图 **5. Azaya** 纳米脂质体 **RP-DPX** 纯化结果，
包括 **Azaya** 纳米脂质体中 **DTX** 的原始浓度（**Stock**）及纯化后的浓度（**Extract**）。DTX 极易从 Azaya 中纯化。数值为平均值±SD（n=2）。

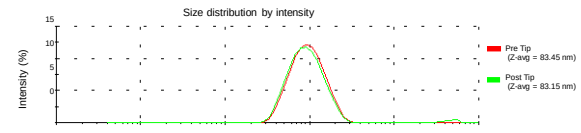


图 6. DLS 分析。
DLS 测量了纯化前及纯化后的颗粒直径（25 µg DTX/mL）。纯化过程对颗粒几乎没有影响。数值为平均值（n=3）。

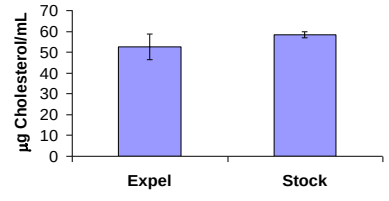


图 7. 胆固醇回收率。
使用 HPLC 分析了纯化前及纯化后胆固醇浓度。纯化前胆固醇的回收率较高，说明纳米脂质体没有被纯化。内源性胆固醇不影响结果测定。数值为平均值±SD（n=2）。

致谢

This project has been funded in whole or in part with federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under contract HHSN261200800001E. The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the U.S. Government.

RP-DPX Extraction: Abraxane™ PTX Albumin Nanoparticle



图 8. Abraxane 纳米脂质体。
Abraxane 为紫杉醇白蛋白纳米颗粒制剂。直径为130 nm。（A）纳米脂质体全貌；（B）临床使用剂量。

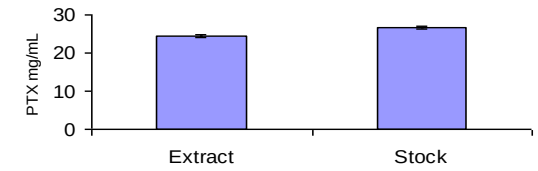


图 9. Abraxane 纳米脂质体 RP-DPX 纯化结果，
包括 Abraxane 纳米脂质体中 PTX 的原始浓度（Stock）及纯化后的浓度（Extract）。PTX 极易从 Abraxane 中纯化。数值为平均值±SD（n=2）。

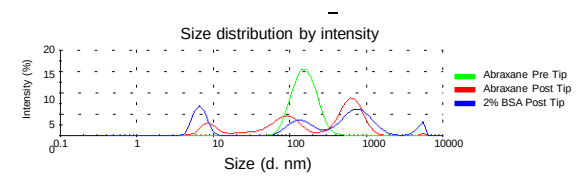


图 10. DLS 分析。
DLS 测量了纯化前及纯化后的颗粒直径（25 µg PTX/mL）。纯化过程对颗粒有影响。数值为平均值（n=3）。

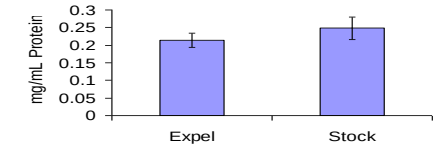


图 **11.** 纯化前及纯化后蛋白的回收率。
纯化前蛋白的回收率较高，说明白蛋白颗粒没有被纯化。**BSA** 封闭不影响结果测定。数值为平均值**±SD**（**n=2**）。

结论

- RP-DPX 方法对 25%大鼠血浆中 DTX 及 PTX 的纯化效率为 70%。
- 待测物极易从生物样品中的纳米试剂中纯化出来，这与药代动力学的结果相一致（1）。相比之下，本方法几乎不会纯化出实际的纳米颗粒。
- DLS 结果说明纯化过程不会对纳米脂质体产生影响，但可能会影响白蛋白颗粒。
- 本研究结果可对后续的生物样品中游离的药物纯化及检测奠定基础。

Advanced Technology Program
SAIC-Frederick, Inc. A subsidiary of Science Applications International Corporation
Contract N01-CO-12400 - Funded by the National Cancer Institute