MicroSep 无锡微色谱生物科技有限公司
WuXi MicroSep Biological Science Co.,Ltd

一种从生物基质纳米颗粒制剂中提取游离药物的新方法

该文章资料由Sarah L. Skoczen, Stephan T. Stern, Scott E. McNeil, Nanotechnology Characterization Laboratory, Advanced Technology Program, SAIC-Frederick, Inc., National Cancer Institute-Frederick, Frederick, Maryland提供。

关键词: 高效提取 RP-XTR

引言

为确定药物的体内稳定性、药代动力学特征及可用性，需要一种一致、可靠的方法能从生物基质纳米颗粒中分离出游离药物。这种方法将有利于开发更优释放特性的纳米制剂，评估药物的安全性和临床起始剂量。本研究利用INTip™枪头式分散固相微萃取技术，从两种纳米制剂中提取游离多西他赛（DTX）和紫杉醇（PTX）。DTX提取自纳米脂质体（Azaya Therapeutics），PTX提取自白蛋白纳米脂质体（Abraxane™,Abraxis BioSiences, Inc.），样品均含有25%的大鼠血浆。提取后药物经高效液相色谱分析，提取率均为70%。药代动力学数据显示，两种制剂都不稳定，药物易于从生物基质的纳米制剂中提取。对提取过程中胆固醇和白蛋白的化学性质分析表明，纳米制剂本身没有被提取。通过动态光散射对样品的生理盐水流出液尺寸分析表明，白蛋白纳米颗粒被破坏，而纳米脂质体的尺寸不受提取过程的影响。以上数据为生物基质中游离药物的提取的未来研究提供了依据。

材料和方法

1 mL反相（RP）XTR tips购于DPX Technologies, LLC（Columbia, SC）。12.75 mm硅硼酸玻璃试管购于Fisher Scientific （Pittsburgh, PA）。牛血清白蛋白和HPLC级乙腈购于Sigma（St. Louis, MO）。大鼠血浆购于Innovative Research（Novi, Michigan）。紫杉醇（PTX）（Catalog # P-9600）和多西他赛（DTX）购于LC Laboratories （Woburn, MA）。HPLC 96孔V型底样品板购于Perkin Elmer （Waltham, MA）。硅胶密封垫购于Axygen （Union City, CA）。

样品准备：

RP-XTR tips吸入250 µL乙腈（ACN）平衡，弃去废液。



图 1. 1 mL反相（RP）XTR 分散固相微萃取柱。

吸入去离子水并弃去。吸入250 µL 2% BSA，封闭树脂，减少纳米颗粒的非特异性吸附，弃去废液，重复2次。再次吸打去离子水洗涤。

吸头经封闭处理后吸取250 µL样品，停留30秒，弃去废液。再吸取250 µl去离子水，弃去废液。吸打250 µl 100% ACN 2次，混合后洗脱至收集管。按1:5的比例加入冰ACN，去除样品中的蛋白质。-80°C冷冻10分钟，复温融化后，14 kg离心20分钟。将上清液转移至试管中，置于TurboVap®中48°C下氮吹。加入500 µL 50/50 ACN-水溶解残渣，供高效液相色谱测定。

HPLC 分析:

HPLC组成：LC-20AT泵, SPD-20A紫外检测器, SIL-20AC自动进样器和CR3A 积分器 （岛津科学仪器有限公司, Kyoto, Japan）。色谱柱：ZORBAX-SB-C18, 5µm 4.6 x 150mm （Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA），Aquapore ODS色谱柱：7 µm, RP-18（Thomson Instrument Company, Clear Brook, VA）。HPLC条件：进样量50 µL；梯度洗脱程序：水-乙腈（25% ACN, 0-5 min, 80% ACN, 5-15 min, 25% ACN, 15-17 min, 柱再生时间8 min）。UV 检测：λmax 227nm，流速 1.0 mL/min， 柱温 30°C。DTX和PTX 洗脱时间分别为14.73和15.03 分钟。血浆基质加标制作标准曲线，峰面积比计算DTX和PTX浓度。

Abraxane/Azaya纳米脂质体样品制备:

Abraxane和Azaya纳米脂质体样品分别用25%大鼠血浆-2% BSA稀释PTX或DTX浓度至25 µg/mL。 Abraxane和Azaya纳

米脂质体样品分别加入3.13 µg/mL的DTX和PTX内标。样品一式两份，置于冰上待提取。

动态光散射：

采用Malvern Zetasizer Nano ZS仪器（Southborough, MA）配备反向散射检测器(173°)，样品置于石英管中，在25°C时批量测量流体动力学直径。测量萃取前及洗脱液中样品颗粒大小。于25µg/mL的生理盐水中制备样品。每个样品重复采集3次数据，最后取平均值。

Bradford蛋白检测:

采用Bradford快速蛋白检测试剂盒1（Bio Rad, catalog # 500-0201）检测样品萃取前及洗脱液中蛋白浓度。于25 µg/mL PTX生理盐水中制备Abraxane样品。

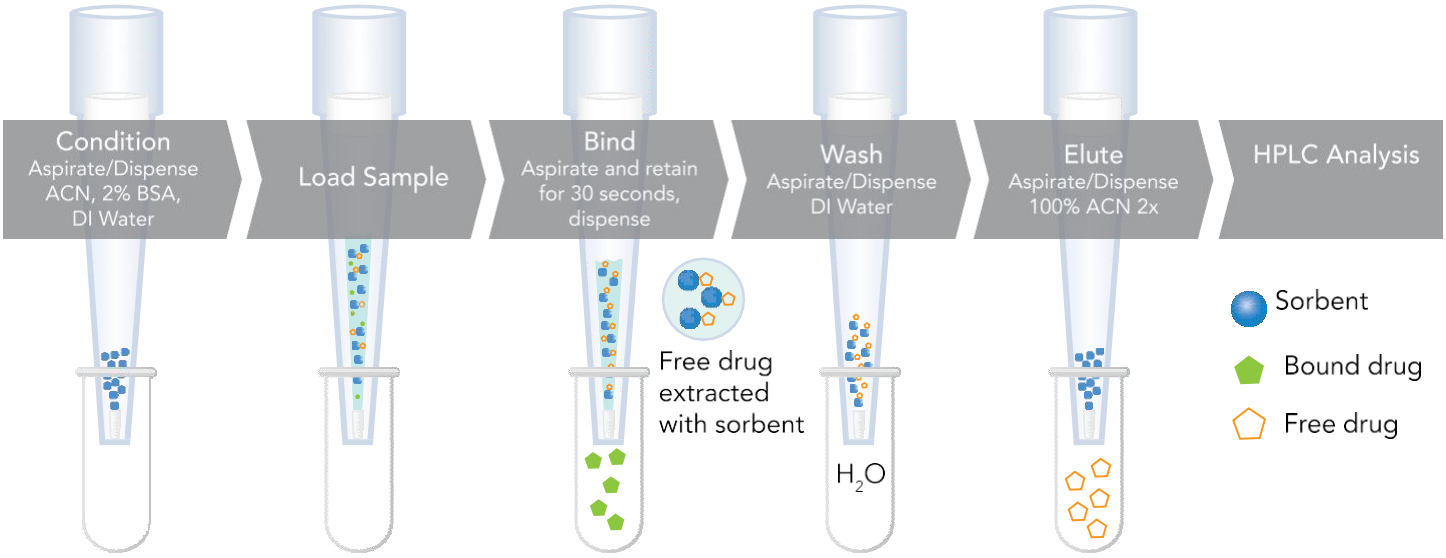


图2. 使用RP-XTR tips进行枪头式分散固相萃取。

结果

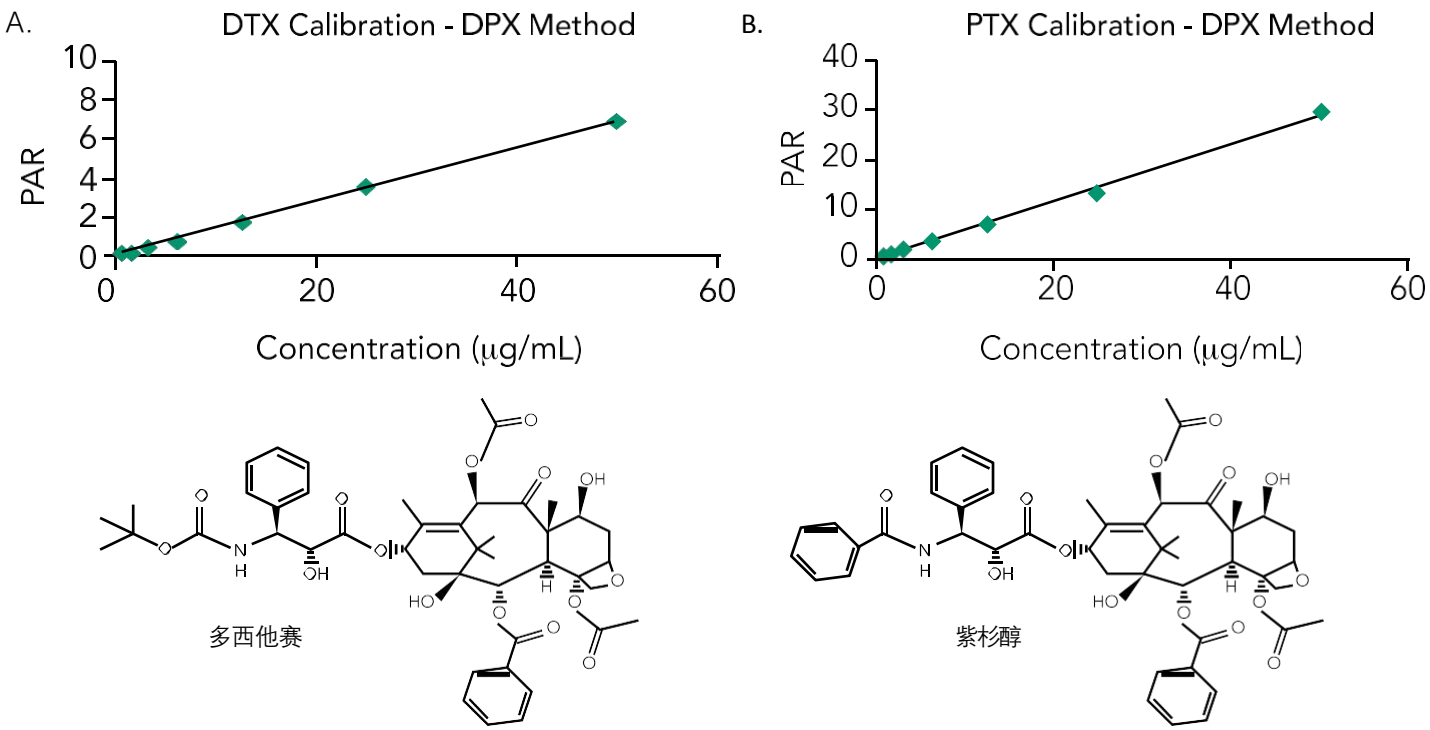


图3. 采用1 mL RP-XTR tips提取25%大鼠血浆中DTX和PTX制作标准曲线，并进行HPLC定量分析。曲线以各浓度下重复实验标准差均值表示，DTX（A）为DTX/ PTX峰面积比（PAR），PTX（B）为PTX/ DTX峰面积比（PAR）。结果表明，DTX和PTX的提取率均为70%。

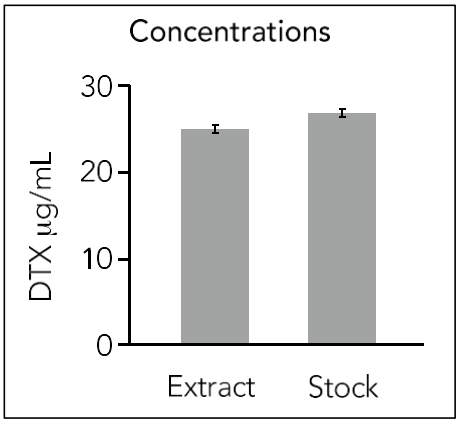


图4. Azaya纳米脂质体血浆原液和RP-XTR提取物中DTX 浓度结果。DTX易于从Azaya血浆中提取。结果以均值±SD（n=2）表示。

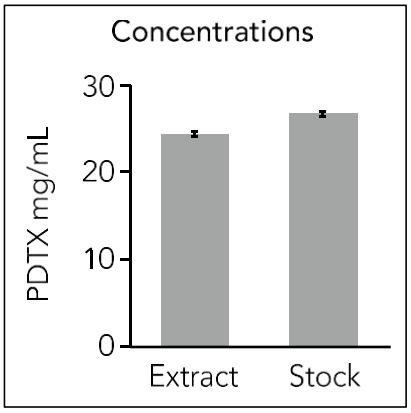


图7. Abraxane纳米脂质体血浆原液和RP-XTR提取物中DPTX浓度结果。PTX 易于从Abraxane血浆中提取。结果以均值±SD（n=2）表示。

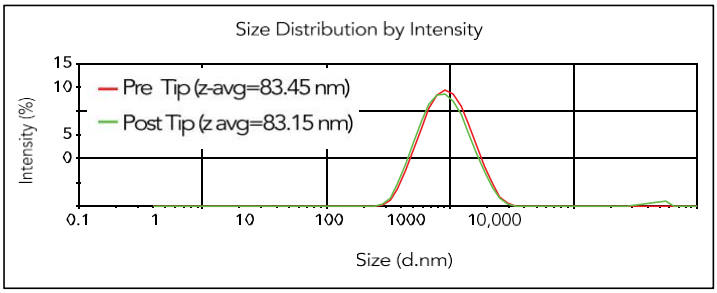


图5. 采用动态光散射法测定tips提取前后生理盐水中（25 µg/mL DTX）样品的粒径。结果表明，提取过程对颗粒的破坏最小。结果以均值（n=3）表示。

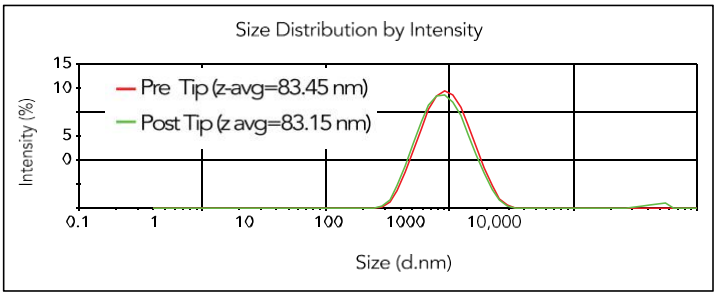


图8. 采用动态光散射法测定tips提取前后生理盐水中（25 µg/mL PTX）样品的粒径。结果表明，颗粒在提取过程中被破坏。结果以均值（n=3）表示。

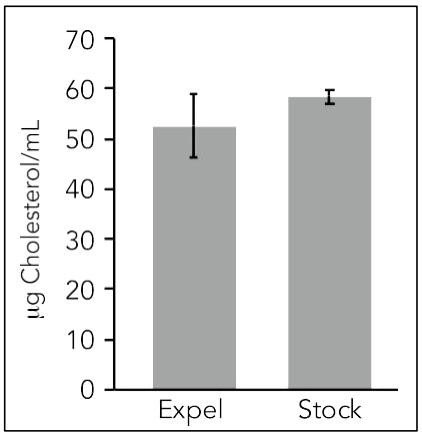


图6. 采用HPLC测定Azaya纳米脂质体血浆原液和RP-XTR tip提取液中胆固醇浓度。大部分胆固醇在提取后被回收，表明纳米脂质体没有被提取。内源性胆固醇不影响实验。结果以均值± SD表示，N=2。

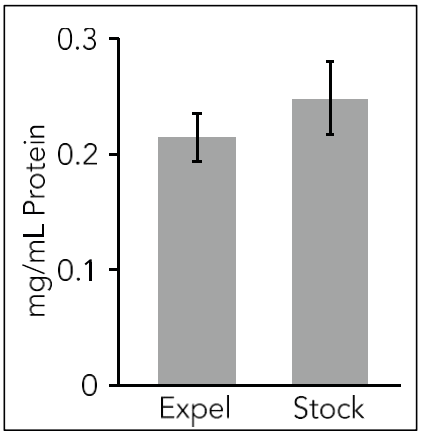


图9. 测定Abraxane生理盐水和RP-XTR tip提取液中蛋白浓度。大部分蛋白在提取后被回收，表明白蛋白未被提取。BSA封闭液不影响实验。结果以均值± SD表示， N=2。

结论

- 采用RP – XTR枪头式分散固相微萃取柱，从25%的大鼠血浆中提取DTX和PTX的效率为70%。
- 两种分析物均可以从生物基质的纳米制剂中提取出来，结果与现有的药代动力学数据一致。相反，用该方法提取的实际纳米颗粒数量极少。
- 动态光散射实验结果表明，纳米脂质体不受提取过程影响，而白蛋白纳米颗粒被破坏。
- 以上数据支持该方法从生物基质中提取游离药物的进一步研究，并可估计控制纳米制剂中的药物释放量，以确定适用的药物和纳米颗粒类型。

无锡微色谱生物科技有限公司
地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号
电 话：17715681752
邮 箱：custserv@micro-sep.com

MicroSep Biotechnology LLC
ADD: 2411 Monroe ST, Columbia, SC, USA
Phone : 001-803-767-8196
Web: www.micro-sep.com