

Agilent NanoDis 系统方法开发指南

作者

Emre Türeli 博士
MyBiotech

Karen Krauel-Göllner 博士
安捷伦科技有限公司

前言

现代药物开发所面临的主要挑战之一是许多候选药物的水溶性差。纳米颗粒制剂是提高低水溶性药物生物利用度的一种极具吸引力的解决方案。溶出度研究是在体外条件下表征预期的体内生物利用度重要的方法之一。因此，在纳米颗粒开发过程中需要一个有效的溶出方法，以便选择预期具有更高生物利用度的先导化合物剂型。在后期的产品质量控制阶段，溶出度测试方法也同样重要。已溶出和未溶出药物的分离是影响所有溶出度研究重要的因素之一。

纳米颗粒被看作是未溶出的物质，需要与溶媒分离。目前的溶出方法面临着无法有效从溶媒中分离出纳米颗粒的问题，而这与用于溶出度研究的设备无关。此外，在取样过程中，常规制剂的标准过滤方法不足以从溶媒中分离出纳米颗粒。用滤膜过滤是分离未溶出 API 的一种常用方法。可以使用孔径为 0.22 μm 或 0.45 μm 的针头过滤器，但这也带来了挑战。此方法的缺点是平均粒径小于 500 nm 的任意颗粒，或会堵塞过滤器使之破裂，或会直接通过导致溶出度值过高。还有个选择是使用较小孔径的过滤器，如 0.02 μm 。而在取样过程中，特别是在溶媒中纳米颗粒浓度高的情况下，这类过滤器很快就会被堵塞。由于纳米颗粒分离效果不佳，分离后仍有纳米颗粒留在溶媒中，从而导致溶出曲线分析的读数虚高。总之，由于过滤方法不当，目前开发实验室中使用的溶出过程不足以预测纳米制剂的体内性能。

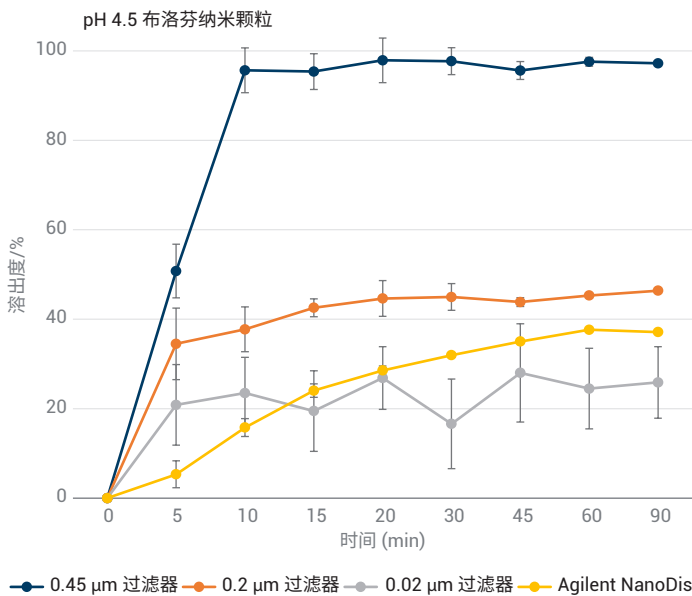


图 1. 使用不同针头过滤器 (0.45 μm、0.2 μm 和 0.02 μm) 以及 Agilent NanoDis 系统获得的布洛芬纳米颗粒 200 mg/900 mL 在 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中的溶出曲线

用于溶出分析的 Agilent NanoDis 系统

Agilent NanoDis 系统的过滤原理基于错流过滤 (CFF) 与常规溶出度仪相结合, 旨在实现过滤过程的自动化。NanoDis 系统利用 CFF 的优势将纳米颗粒从溶媒中分离出来。由于 CFF 是开放式过滤系统, 可防止滤饼的形成, 且纳米颗粒不会在

强压作用下进入过滤器 (通常导致全流过滤器堵塞的原因)。此外, 可以根据制剂中纳米颗粒的粒径来选择 CFF 过滤器的滤膜孔径。在 NanoDis 系统中, 将含有纳米颗粒的溶媒泵入 CFF 过滤器, 使用 Agilent 850-DS 溶出取样工作站收集不含颗粒的滤液。过滤效率和收集滤液所需的时间取决于制剂和溶媒中纳米颗粒的浓度。而使用 NanoDis 系统时, 即使是挑战性制剂, 最低过滤速率也大于 10 mL/min, 由此可产生足够体积的样品用于溶出样品的定量分析, 并可采用非常短的时间点间隔。

滤膜孔径和类型的选择

根据纳米颗粒的粒径和类型选择溶出度研究中使用的错流过滤器类型和孔径, 以确保实现完全分离。这些规格的选择可确保溶出药物的测定不受未溶出纳米颗粒的干扰。

市场上有许多具有不同化学性质的 CFF 膜可供选择。需要进行过滤器验证测试, 以选择具有正确化学性质的滤膜, 防止纳米颗粒和 API 吸附到过滤器上。可使用滤膜与 CFF 膜化学性质相同的标准针头过滤器进行过滤器验证。对于 API 过滤器验证, 通常将已知浓度的 API 溶于溶媒中, 通过例如孔径为 0.45 μm 的针头过滤器过滤后进行浓度测定, 以与过滤前浓度进行对比。请注意, 纳米颗粒制剂的过滤器验证可能需要更大孔径的针头过滤器。

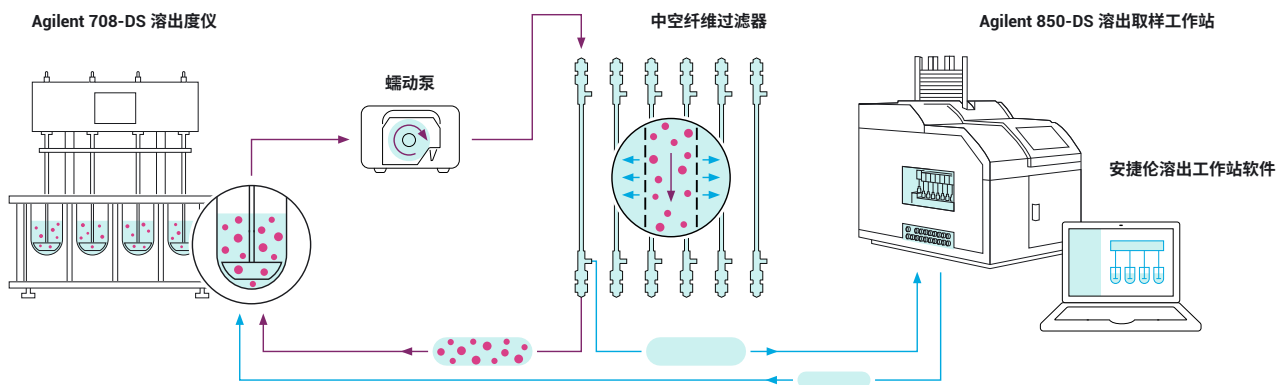


图 2. NanoDis 系统示意图, 展示使用符合 USP 要求的 Agilent 708-DS 溶出度仪和 850-DS 溶出取样工作站时, 溶出的 API 和分散纳米颗粒的定向流动和分离, 并使用安捷伦溶出工作站软件 (DWS) 进行操作和电子记录

将已知浓度的纳米颗粒制剂分散在溶媒中，并用具有适当孔径的针头过滤器过滤，确保纳米颗粒能通过过滤器。过滤前后的浓度差可用于计算纳米颗粒在过滤器上的可能吸附量。

药物制剂的平均粒径是首要考虑因素，而粒径分布和溶出介质中的粒径分布也是需要考虑的重要参数。在不均一的颗粒制剂中，样品中最小颗粒的粒径可以远低于平均粒径，反之亦然（即样品中最大颗粒的粒径可显著高于平均粒径）。此外，特别是当颗粒分散在 FeSSIF 和 FaSSIF（人工肠液）等生理相关溶媒中时，颗粒表面会形成晕层，从而增加平均粒径。

通常，可参照表 1 选择合适的滤膜孔径：

表 1. 膜孔径的选择

平均粒径 (nm)	膜孔径 (kDa)
< 10	10
10-25	50
25-50	100
50-150	300
> 150	500

如果粒径分布较宽或为样品中存在较小颗粒的双峰分布，则需要相应调整 CFF 滤膜孔径，同时考虑最小粒径的比例。另一个重要参数是胶束的粒径，在溶媒中使用表面活性剂时会形成胶束。溶出 API 的胶束也可以保留在 CFF 膜上。因此，需要根据胶束粒径选择膜孔径。如需了解有关过滤器验证的更多信息，请参阅参考文献部分^[1] 和 Repligen 网站^[2]。



图 3. 配备错流过滤器的 Agilent NanoDis 系统

仪器与软件参数

设备和软件参数的优化是溶出方法开发过程的一部分，以确保纳米颗粒从溶媒中有效分离。

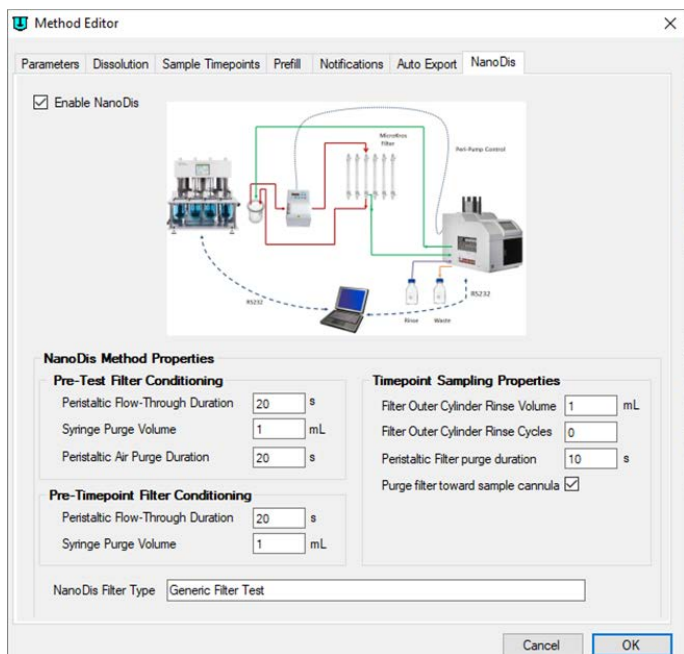


图 4. 安捷伦溶出工作站软件 NanoDis 选项卡的屏幕截图

NanoDis 系统由安捷伦溶出工作站软件 (DWS) 控制。下文是指导用户完成方法开发过程重要参数设置的概述。

NanoDis 系统的方法运行分两个阶段：溶出运行开始前的过滤器预处理阶段，然后是实际的溶出运行。溶出运行期间的每个时间点前都会进行一个额外的过滤器预处理步骤。因此，常见顺序如下：

第 1 阶段：过滤器预处理

泵速：手动调节蠕动泵上的泵速。CFF 膜的跨膜压力随流速的增加而增加，从而增加滤液的渗透量。总之，通过增加流速可以增加滤液样品的收集量。

测试前过滤器的预处理：测试前过滤器的预处理就是用当前溶媒润湿过滤器。在溶出开始前即将产品引入溶出杯前进行预处理。由 CFF 膜过滤的溶媒直接返回溶出杯，因此测试前过滤器的预处理期间溶媒没有损失。在测试前过滤器的预处理步骤结束时，用空气吹扫 CFF 膜，使全部溶媒流回溶出杯。

通过测试前过滤器预处理准备好 CFF 膜，对于第一个时间点的取样至关重要。如果没有充分进行测试前的过滤器预处理，则第一个时间点的样品量将减少。获得正确的样品体积对于准确计算溶出结果 (%) 至关重要。

可使用以下起始参数进行测试前过滤器的预处理：

操作	推荐设置
蠕动泵流通持续时间 泵送溶媒通过过滤器的时间 (单位为 s)	240 s
注射器吹扫体积 从切向流过滤器的外筒泵出返回溶出杯的溶液体积 (单位为 mL)	4 mL
蠕动泵空气吹扫持续时间 反转蠕动泵，以使过滤器核心的溶媒清空并流回溶出杯	50 s

第 2 阶段：溶出

将制剂加入溶出杯后即开始溶出运行。使用 NanoDis 系统时，溶出度测试序列略有修改。在每个时间点之前，需要在到达该时间点前再次进行过滤器预处理。

时间点前过滤器预处理变量

操作	推荐设置
蠕动泵流通持续时间 泵送溶媒通过过滤器的时间 (单位为 s)	100 s
注射器吹扫体积 从切向流过滤器的外筒泵出返回溶出杯的溶液体积 (单位为 mL)	2 mL

时间点取样属性

操作	推荐设置
填充损失体积 从取样插管尖端到针头 (850-DS) 的管路体积，以便在正确时间进行取样	3.5 mL
样品体积 分液到样品盘的体积	1.0–5 mL (取决于具体分析)
过滤器外筒冲洗体积 泵入过滤器外筒的冲洗溶媒体积； 总吹扫体积 = 吹扫体积 + 过滤器外筒冲洗体积	4 mL
蠕动泵过滤器吹扫持续时间 取样后，对过滤器核心内的样品溶媒进行吹扫，使其流回溶出杯。参数决定了蠕动泵将运行多长时间来吹扫核心。吹扫方向由“Purge filter toward sample cannula” (吹扫过滤器朝向取样插管) 勾选框控制。	30 s
注射器吹扫 注射器吹扫循环清空过滤器外筒，以及注射器管路中过滤器和溶出杯之间的所有管路。注射器吹扫体积 = 过滤器外筒冲洗体积 + 吹扫体积	4 mL
过滤器外筒冲洗循环 在某个时间点结束时，可使用冲洗溶媒冲洗过滤器的外芯。可将该值设为零，以取消冲洗循环。	1–3 次， 每次 4 mL

窍门与技巧

滤膜首次使用、清洗和储存

将 CFF 膜置于甘油中运输，以保护其孔结构。建议在首次使用前用至少 500 mL 纯净水清洗滤膜；或使用溶媒清洗滤膜。根据纳米颗粒制剂的不同，使用纯净水、醇溶液（20% 乙醇或 20% 异丙醇）或 0.1 N NaOH 在溶出运行之间清洗滤膜。最好将滤膜储存于室温下合适的储存介质中，如 0.1 N NaOH。这有助于避免微生物生长并防止纤维变干。

滤膜完整性测试

用具有所需平均粒度的标准纳米颗粒控制 CFF 膜的完整性测试，并调整至 CFF 所需膜孔径。PLGA-Lumogen 纳米颗粒可在样品有色或无色的情况下直观显示滤膜完整性。

滤膜堵塞测试

用水进行溶出实验并对过滤样品进行定量，来确定 CFF 膜的堵塞情况。

参考文献

1. 过滤器验证方案：Agilent 850-DS 溶出取样工作站。安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-3341CHCN，**2013**
2. Repligen 'Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' selection tool (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE.1479976852

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020年10月26日，中国出版
5994-2347ZHCN

