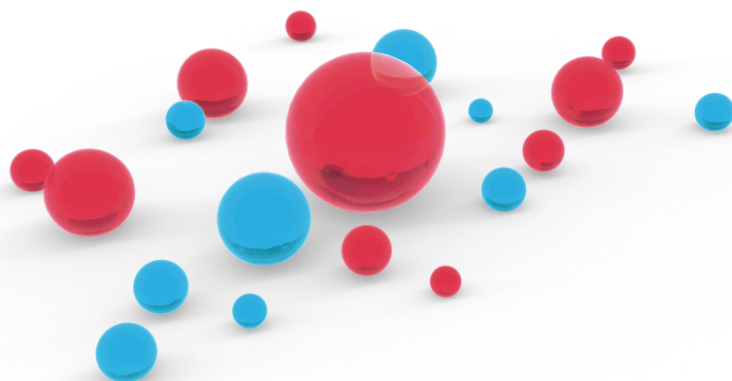


纳米颗粒/微球的纯化

超滤法快捷分离、换液与浓缩

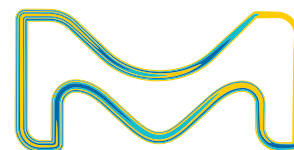
纳米颗粒 (Nano-sized particle, NP) 可采用有机 / 无机材料、聚合物和金属制造, 在材料科学、环境科学等行业中有多样化的用途。近年来, 通过表面改性赋予纳米颗粒特定的生物学功能并增强生物相容性, 在药物开发、生物诊断与治疗等医学领域作为载体和传感器的应用突飞猛进, 常见的有生物成像、生物传感、靶向药物递送、药物控释等等。



纳米颗粒/材料种类	举例	应用方向
金属或合金纳米颗粒	Au, Ag, Cu, Ni, Co, Pt, Fe等; Ag-Cu, Au-Cu等	在污水处理中, 用于修饰微滤或者超滤膜, 改善膜通量、抗污染性等。 如纳米银颗粒, SiO ₂ 纳米颗粒, 无机纳米颗粒等
碳化物或氮化物纳米颗粒	SiC, Si ₃ N ₄ 或Cr, Ti, V, Zr, Hf, Mo, Nb, Ta, W等金属碳化物或氮化物	纳米金颗粒可以与蛋白质相连, 如与特定抗体相连, 检测其相应的抗原等作用, 用于疾病诊断领域
氧化物和复合金属氧化物纳米颗粒	SiO ₂ , TiO ₂ , ZnO, Fe ₂ O ₃ , Al ₂ O ₃ 等; BaTiO ₃ , BaSnO ₃ , MnFe ₂ O ₄ 等	纳米金颗粒与烷基修饰的寡核苷酸通过共价键相连, 组成纳米生物探针, 可用于 DNA 序列的检测
无机盐纳米颗粒	CdS, CdSe, CdTe, AgCl, CaCO ₃ , BaSO ₄ 等	磁性标记疗法: 将药物附着在磁性纳米颗粒载体上, 生物相容的磁性载体和药物的复合体通过系统的循环被注射到病人体内, 定位于病灶处后, 释放出药物进行治疗
有机纳米颗粒	聚苯胺、有机染料纳米粒子等	纳米颗粒改善生物大分子 (例: 酶) 的活性。如纳米金颗粒, 二氧化硅纳米颗粒等。细胞磁性分离: 磁性纳米颗粒透过表面包覆可以用于标记所研究的生物实体从而进行磁性分离
脂质体、囊泡、胶束	直径50~500nm的细胞外泌体、人工制备脂质体、聚合胶束等	在纳米材料内部包裹或外部附着 / 连接药物或生物信息分子, 进行基础研究、靶向药物递送和生物治疗

参考文献

1. Fang RH, Aryal S, Hu CJ, Zhang L. 2010. Quick Synthesis of Lipid?Polymer Hybrid Nanoparticles with Low Polydispersity Using a Single-Step Sonication Method. Langmuir. 26(22):16958-16962. <https://doi.org/10.1021/la103576a>
2. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. 2012. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. Chem. Rev.. 112(11):5818-5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>
3. Weingart J, Vabbilisetty P, Sun X. 2013. Membrane mimetic surface functionalization of nanoparticles: Methods and applications. Advances in Colloid and Interface Science. 197-19868-84. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.04.003>



纳米颗粒分离、纯化和浓缩的超滤技术

就纳米材料的生产而言，高效的颗粒收集和制备方法非常关键。磁性纳米颗粒、量子点、金属纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒、聚合纳米颗粒是生物医学常用的材料。

粗制的纳米颗粒很多不能直接使用。其水相基质中可能含有需要去除的未结合药物，裂解物、体液、血清、缓冲液、培养基等试剂中的生物分子、化学品和其它污染物也需要进一步分离，其中某些物质会对周围的生物环境造成不利影响。因此，浓缩、富集、洗涤和纯化纳米颗粒的可靠方法在这种新材料的应用中发挥越来越重要的作用。

超滤 (Ultrafiltration, UF) 技术广泛用于纳米颗粒合成后的制备和纯化。过去一直采用加压超滤装置 (pUF)，之后引入的离心超滤 (cUF) 适合小体积的纳米颗粒制备和纯化。

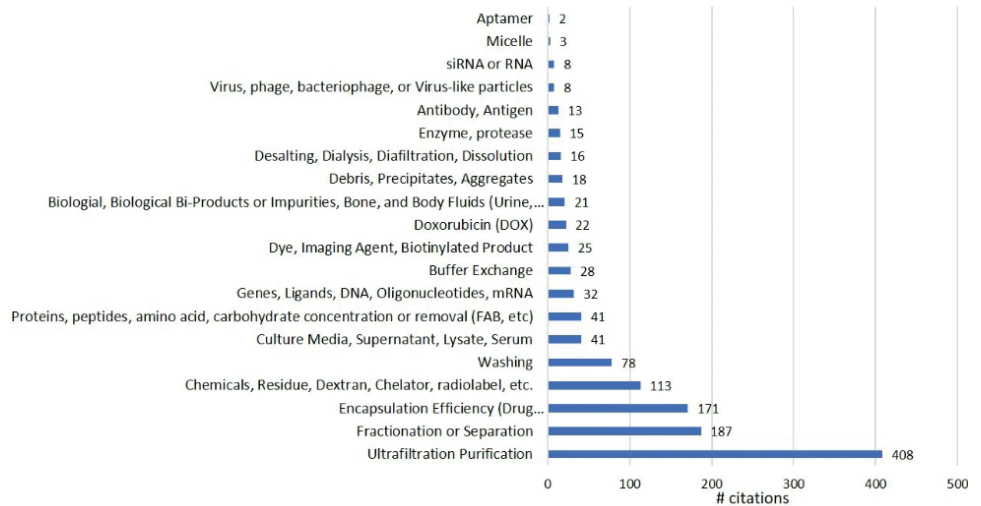


图 1. 纳米颗粒制备和纯化中超滤技术的应用。

超滤膜的选择

初步过滤后，可进一步通过离心对纳米颗粒进行洗涤和缓冲液置换或再浓缩。对截留或滤过的溶质可收集并分析，测定纳米颗粒的纯度、包封效率、结合性和药物浓度。

超滤主要通过基于大小的筛分作用分离和浓缩分子。大部分生物分子的分子量均低于 500kDa，正好是纳米颗粒的大小范围。默克生命科学的 Amicon® Ultra 超滤管等带有的再生纤维素超滤膜具有均匀的特定截留分子量 (nominal molecular weight limits, NMWL)，即超滤膜应该截留至少 90% 以上的截留分子量大小的颗粒。这些超滤系统滤膜的截留分子量有 3kDa、10kDa、30kDa、50kDa 和 100kDa。一项针对纳米颗粒制备发表文章的调查表明，按照纳米颗粒大小和应用选择适当的滤膜孔径比较复杂，需要在具体条件下进行选择和尝试。

分析 1988~2019 年间 421 篇关于纳米颗粒用超滤法处理的文献，统计整理不同类型材料用到的截留分子量数据如下：

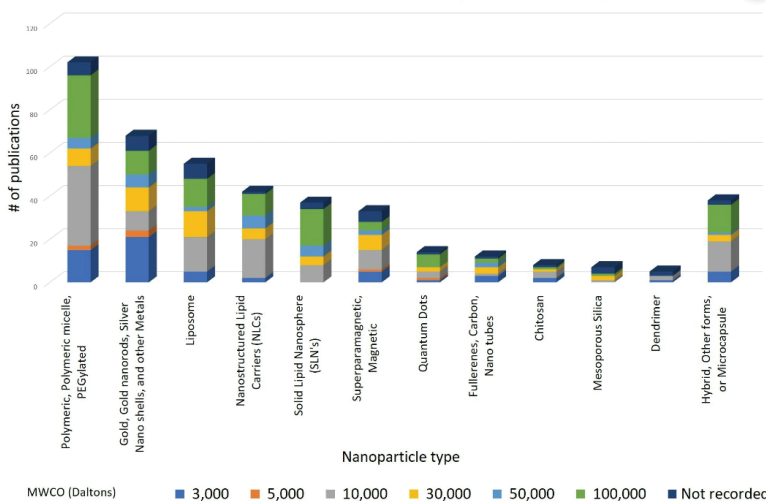


图 2. 按纳米颗粒类型比较发表文章的滤膜孔径大小。提示应同时根据纳米颗粒大小和应用选择滤膜孔径 (例如，复杂样品纯化、浓缩、缓冲液置换、脱盐)。

离心超滤或超滤 NMWL (Da)	标称孔径 (nm)	推荐的超滤标称截留大小范围			
		直径 (nm)		分子量 (Da)	
		最小	最大	最低	最高
3000	0.3	1	1.5	6,000	20,000
5,000	0.5	2	3	10,000	30,000
10,000	1	3	9	20,000	90,000
30,000	3	9	15	60,000	180,000
50,000	5	15	30	100,000	300,000
100,000	10	30	90	200,000	900,000

表 1. 按照纳米颗粒大小选择超滤膜的 NMWL。

应用实例:

脂质-聚合物杂化纳米颗粒 (LPN) 的制备

LPN 已被用于输送药物, 如多西他赛, 紫杉醇, 姜黄素和多柔比星等, 也用于各种疾病适应症的诊断分子。这些纳米颗粒的特性使其成为药物输送应用的理想选择, 包括加载多种药物的能力, 精确控制药物负载和药物释放, 以及通过靶向部分功能化。

尽管 LPN 以前已使用两步合成方法配制, 但新的一步合成法更简便且可重复性更好。这种方法产生的 LPN 在尺寸上多分散性较小, 并且可以精确控制其物理化学性质。

LPN 由大豆卵磷脂, DSPE-PEG 和 PLGA 采用一步纳米沉淀法结合自组装合成

(来自南洋理工大学 Juliana Chan 教授的研究小组)

1. 通过将以下内容添加到玻璃小瓶 (乙醇, Sigma-Aldrich Cat#E7023):

- 大豆卵磷脂由 90-95% 磷脂酰胆碱组成 (MP Biomedicals)
- DSPE-PEG2000-COOH (1,2-二硬脂酰基-sn-甘油 3-磷酸乙醇胺-N-羧基(聚乙二醇)2000) (Avanti)。
大豆卵磷脂 /DSPE-PEG 摩尔比的范围可以从 7:3 到 8.5:1.5。

2. 有机溶液是通过向水溶性有机溶剂 (如乙醇) 中加入以下内容来制备的:

- 聚(d, l-丙交酯-共乙交酯) (PLGA), 单体比例为 50:50, 酯封端, 粘度为 0.72-0.92 dl/g (Durect Corporation)。改变单体比例和粘度将产生具有不同尺寸、生物降解速率以及药物负载和释放特性的 LPN。
- 小分子药物, 如多西他赛。

初始药物重量不得超过聚合物重量的 10-30%, 药物才能被聚合物正确封装。脂质 / 聚合物重量比范围为 15%-20%。

- 将水溶液在加热板搅拌器上在温和搅拌条件下加热至 65°C 3-5min。

- 一旦达到反应温度, 在温和搅拌条件下将有机溶液滴加到水溶液中, 然后立即剧烈涡旋 3min。

- 将混合物返回到温和搅拌条件, 并使 LPN 在室温下自组装 2 小时。

- 使用截留分子量为 10 kDa 的 Amicon® Ultra-4 超滤管 (Millipore) 洗涤 LPN 三次。将洗涤后的 LPN 以最终所需浓度重新悬浮在水或缓冲液中。

- LPN 立即使用, 在 4°C 下储存过夜, 或冻干以在 -80°C 下延长储存。

此后的样品的换液、过滤和浓缩, 都可以借助 Amicon® Ultra 系列超滤管方便地处理。

注: 引自 POLYMERIC DRUG DELIVERY TECHNIQUES Translating Polymer Science for Drug Delivery Polymeric Drug Delivery Techniques Second Edition Second Edition

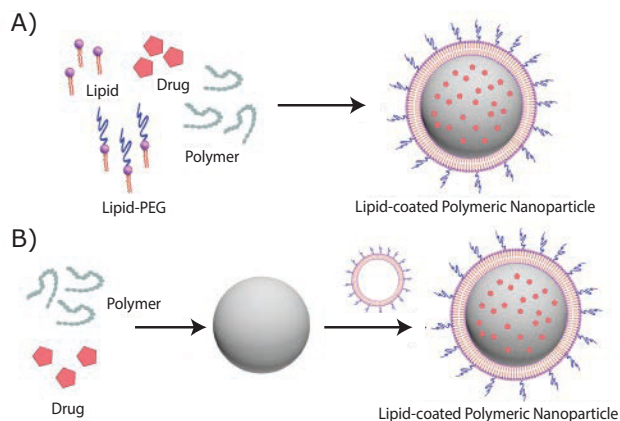


图 3. LPN 合成策略 A) 一步法, B) 两步法

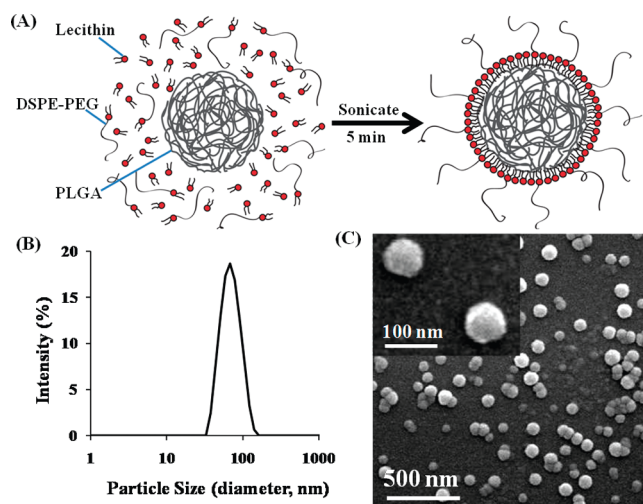


图 4. 脂质-聚合物杂化纳米颗粒的合成和表征。

A) 一步声波法合成脂质-PLGA杂化纳米颗粒的示意图。左边包括 PLGA 聚合物, 卵磷脂脂质和 DSPE-PEG 偶联物在内的所有组分都混合在一起作为“鸡尾酒”。超声处理 5min 后, 这些构件自组装成核壳结构纳米颗粒。

B) 通过动态光散射 (DLS) 测量所得杂化纳米颗粒的流体动力学尺寸 (直径, nm)。

C) 杂化纳米颗粒的代表性扫描电镜 (SEM) 图像。

注: 引自 Quick Synthesis of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles with Low Polydispersity Using a Single-Step Sonication Method, Langmuir 2010, 26(22), 16958-16962

默克生命科学提供的多样化超滤工具选择

离心超滤和加压超滤在纳米颗粒纯化和制备中发挥了重要作用。超滤可用于纳米颗粒的分离、浓缩、缓冲液置换、药物监测，以及除去纳米颗粒制品中的染料、酶和未结合成分。有许多论文在纳米颗粒和大分子的纯化和浓缩中，提到采用了 Amicon® 和 Centricon® 离心超滤管，以及 Amicon® 搅拌式超滤杯用于加压超滤。由于杂质可能是离子、分子或颗粒形式，优化超滤选择会大幅改善收率、结果可重复性和滤液质量。

Amicon® 和 Centricon® 过滤装置均使用 Ultracel® 再生纤维素滤膜，其复杂的结构可去除样品中可能影响关键的生物和化学测定、下游分析和检测性能的杂质。超滤技术可用于实验室规模纳米颗粒制品的分离、纯化和富集。离心超滤和加压超滤均是快速、简单和高效的超滤方法，通过过滤较小的组分和液体截留分离纳米材料。进行过滤选择时，需要考虑的重要因素包括颗粒的物理组成、大小和形状。Amicon® 超滤系列提供一系列用于纳米颗粒纯化和生产的超滤工具。

产品系列	Amicon® Pro 纯化超滤管	D-tube™ 透析管	Amicon® Ultra 超滤管	Centricon® Plus 超滤管	Amicon® 搅拌式超滤杯
					
操作方法	离心	透析，辅以磁力搅拌可加速透析过程	离心	离心	(氮气) 加压，以磁力搅拌加速
样品体积	~10 ml	0.1~15 ml	0.5/2/4/15 ml	70 ml	50/200/400 ml
截留分子量	依配套使用的AU0.5超滤管而定	3.5/7/13 kDa	3/10/30/50/100 kDa	3/10/30/100kDa	配套相应尺寸的再生纤维素或聚醚砜(PES)超滤膜片或PVDF微滤膜片使用1/3/5/10/30/50/100/300/500kDa, 0.1/0.22/0.45 μm
推荐用途	纯化浓缩一体化	温和换液除盐	快速分离纯化、换液除盐、浓缩	大体积样品快速分离纯化、换液除盐、浓缩	大体积样品温和分离纯化、换液除盐、浓缩

Tips

选择超滤方法和滤膜孔径时需要考虑的因素：

1. 纳米颗粒大小：可根据公开资料估计大小，或通过显微镜、激光衍射和动态光散射等测量技术观测大小。
2. 溶液中主要分离目标的大小：蛋白、抗体、药物、化学品等待分离颗粒大小会影响膜大小的选择。
3. 样品体积：≤0.5 mL 到 70 mL 范围的样品处理量适合离心超滤 (cUF) 装置。更大体积适合加压超滤 (pUF) 装置。
4. 为了截留纳米颗粒，滤膜的截留分子量需要小于纳米颗粒大小 (约为纳米颗粒分子量 1/3~1/2)，同时也要足够大到可以滤过较小的组分。
5. 当采用微滤及微柱离心法时，推荐使用 Ultrafree® 微滤管 (如右图)。在这个 0.5 或 2 mL 容积、带有微孔滤膜的小离心管中，可以直接加样，或者加入与选定琼脂糖凝胶混合处理的样品。



产品订购信息

产品描述	截留分子量 MWCO				
	3,000	10,000	30,000	50,000	100,000
15 ml Amicon® Ultra超滤管 (96/PK)	UFC900396	UFC901096	UFC903096	UFC905096	UFC910096
4 ml Amicon® Ultra超滤管 (96/PK)	UFC800396	UFC801096	UFC803096	UFC805096	UFC810096
2 ml Amicon® Ultra超滤管 (24/PK)	UFC200324	UFC201024	UFC203024	UFC205024	UFC210024
0.5 ml Amicon® Ultra超滤管 (500/PK)	UFC5003BK	UFC5010BK	UFC5030BK	UFC5050BK	UFC5100BK
Amicon Pro 纯化超滤管 (24/pk) [搭配以上AU 0.5一起使用]			ACS500024		
70 ml Centricon® Plus-70超滤管 (8/PK)	UFC700308	UFC701008	UFC703008		UFC710008
50ml Amicon® 搅拌式超滤杯	配套相应尺寸的膜片一起使用				UFSC05001
200ml Amicon® 搅拌式超滤杯	再生纤维素或聚醚砜 (PES) 超滤膜片:				UFSC20001
400ml Amicon® 搅拌式超滤杯	1/3/5/10/30/50/100/300/500kDa PVDF 微滤膜片: 0.1/0.22/0.45 µm				UFSC40001
D-Tube™ 透析管	按体积分为 Mini(10-250 µl), midi(50-800 µl), maxi(100 µl-3 ml) mega(3-10 ml/10-15 ml) 截留分子量: 3.5kDa, 7kDa, 13kDa 包装: 10/pk, 50/pk 高通量格式: 7kDa 和 13kDa 提供 96 孔板形式 提供配套浮漂				目录号举例: 71504-3 71506-3 71507-3 71508-3 71510-3
Ultrafree®微滤管/离心小柱	按体积分为 MC(0.5 mL) 和 CL(2 mL) 有 0.1 ~ 5.0 µm 五种膜孔径供选择 微滤膜材质: PVDF, 亲水 PTFE 包装: 50/pk, 100/pk, 250/pk 提供无菌包装和非无菌包装形式产品				目录号举例: UFC30GVNB UFC30GV0S UFC30HV00

上海

上海市浦东新区东育路227弄3号
前滩世贸中心(二期)C栋15-18层
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 200126

北京

北京市朝阳区将台路甲2号
诺金中心25层
电话: (010)59072688
传真: (010)59072699
邮编: 100016

广州

广州市天河区洗村路5号
凯华国际中心1201-1204
电话: (020)32255333
传真: (020)32255380
邮编: 510623

成都

成都市锦江区人民南路二段1号
仁恒置地广场1706室
电话: (028)80740222
传真: (028)80740227
邮编: 610016



默克生命科学
致力于解决生命科学
中的棘手问题



默克生命科学微客服
一站式产品货期、定单物流、
发票、账款查询平台

默克生命科学技术服务热线: 400 620 3333或400 889 1988转2号线 中国技术服务中心: tscn@merckgroup.com
更多详情, 敬请登录: www.merckmillipore.com www.sigmaaldrich.cn
资料编号: 10/2023

默克生命科学业务部在美国和加拿大以MilliporeSigma名称运营。

Merck KGaA
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany
merckgroup.com

© 版权归德国达姆施塔特默克集团 (Merck KGaA) 及其附属公司所有。保留一切权利。
默克和活力M是德国达姆施塔特Merck KGaA及其子公司的商标。所有其他商标均为其各自所有者的财产。
商标的详细信息可通过公开访问的资源了解。

普通合伙企业 商业注册: AG Darmstadt HRB 6164 注册办公地址: 达姆施塔特 监督委员会主席: Wolfgang Büchele
执行委员会和普通合伙人: Stefan Oschmann (董事长兼首席执行官), Belén Garjo, Kai Beckmann, Peter Guenter, Matthias Heinzel, Marcus Kuhnert