

走出高浓度样本粒度检测的误区

摘要: 目的 探讨高浓度样本的粒度检测是否真正可行, 探讨高浓度样本检测所需要关注的重点, 以及如何避免误区。 方法 查阅国内外相关文献及进行实验验证。 结论 浓度过高会导致检测结果产生偏差, 真正的高浓度检测应当建立在科学的统计学意义基础之上, 并且尽量避开重合限。

关键词: 高浓度、粒径检测、粒度检测、动态光散射 (DLS)、单颗粒光学传感技术 (SPOS)。

粒度检测是一门严谨的科学, 粒度检测应当建立在科学的统计学意义基础之上, 并且尽量避开重合限。现行的粒度检测手段主要是激光粒度仪, 激光粒度仪主要分为三类: 1、激光衍射粒度仪 (Laser diffraction, 简称LD), 利用光衍射的物理现象, 使用米氏散射理论和夫琅禾费理论, 通过数学模型计算得到粒度分布; 2、动态光散射激光粒度仪 (Dynamic light scattering, 简称DLS), 利用光散射的物理现象, 使用斯托克斯爱因斯坦方程式 (Stokes-Einstein 方程) 计算得到粒度分布; 3、单颗粒光学传感计数粒度仪 (Single particle optical sizing, 简称SPOS), 利用光阻 (light extinction, 或称光消减) 效应, 得到粒子的数量和分布。

本文试图对高浓度样本的检测误区进行分析, 并试图找到解决方案。

粒度检测的两个关键点

粒度检测最主要关注的两个关键点为统计学意义和重合限。这两个关键点影响着检测结果是否可靠以及是否准确。因为粒度检测是一门严谨的科学, 其呈现形式为累积分布数据。这就决定了只有足够量的大数据才能反映样本的整个体系, 这就是统计学意义。利用光散射现象来检测粒度的激光粒度仪, 都会碰到粒子重合造成的干扰问题, 尽量避开粒子的重合现象, 才是得到准确结果的正确思路。

统计学意义是在数据样品较少的情况下, 无法反映此样品是好还是坏, 只有当数据量较多, 能够反映样品的基本情况, 从而判定数据是否可靠的一种方式。简单的说, 在测量过程中, 获得的数据越多, 越能证明这个测试结果越具有可靠性和有效性。美国药典<USP729>对乳剂注射液的粒度分布做了明确规定, 其中大乳粒的检测标准是0.05%, 根据我们的经验, 每次检测中一个样品至少需要统计到25万个粒子才能使结果可信, 换句话说才具有统计学意义。

下图1和图2来自ISO13322-1, 粒径分析, 图像分析方法。

Table A.2(a)- Number of particles required n^* , $\delta = 0,05$, $p = 0,95$, ($u = 1,96$)

δ	GSD	$n^*(MMD)$	$n^*(Sauter)$	$n^*(MVD)$
0.05	1,10	585	389	131
	1,15	1 460	934	294
	1,20	2 939	1 808	528
	1,25	5 223	3 103	843
	1,30	8 526	4 920	1 247
	1,35	13 059	7 355	1 750
	1,40	19 026	10 504	2 363
	1,45	26 617	14 457	3 096
	1,50	36 007	19 295	3 956
	1,55	47 358	25 093	4 952
	1,60	60 811	31 919	6 092

图1

Table A.2(b)- Number of particles required n^* , $\delta = 0,1$, $p = 0,95$, ($u = 1,96$)

δ	GSD	$n^*(MMD)$	$n^*(Sauter)$	$n^*(MVD)$
0.1	1,10	146	97	33
	1,15	365	233	73
	1,20	735	452	132
	1,25	1 306	776	211
	1,30	2 131	1 230	312
	1,35	3 265	1 839	438
	1,40	4 756	2 626	591
	1,45	6 654	3 614	774
	1,50	9 002	4 824	989
	1,55	11 839	6 273	1 238
	1,60	15 203	7 980	1 523

图2

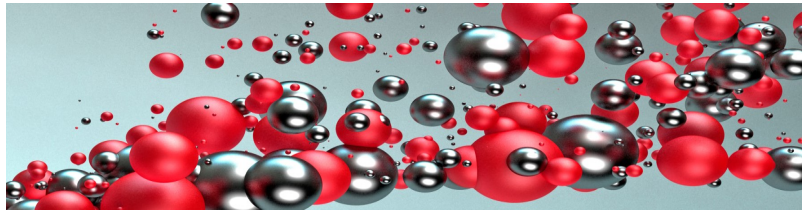
可以看到, 如果得到一个相对误差5%的数据, 在几何标准偏差 (GSD)1.60下, 所需要检测到的粒子数是60811个; 如果相对误差是10%, 在几何标准偏差 (GSD) 1.60下, 所需要检测到的粒子数是15203个。这说明如果使结果可信, 必须得到足够的数量。



ALP-TN-CN-10

走出“高浓度”样本 粒度检测的误区

Date: 2019.10



重合限：顾名思义为颗粒的重合极限值，在此范围之内粒子几乎没有重合现象。样本中有很多颗粒，激光若照射到颗粒上会产生散射现象和光阻效应，当然哪种效应做主导是更具实际测试环境所决定的，比如颗粒大小。试想当两个颗粒紧靠在一起，他们产生的信号将无法区分，在仪器看来，这就是一个粒子。另外光散射会在不同的粒子之间传递，造成多重散射现象（Multiple light scattering, 简称MLS, 如图3所示）。在实际测试中要尽量避开上述干扰因素。

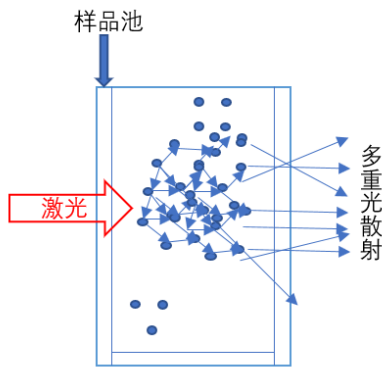


图3

换言之，若测试浓度超过该检测仪器的重合限，测试结果将会产生偏差。在中国药典中，针对于单颗粒光学传感技术（SPOS），不溶性微粒检测要求的重合限是10000#/ml。

图4解释了何为重合限，在测试浓度在10000#/mL之前，检测的结果与实际的样品浓度结果十分接近，甚至可以说检测的结果就可以代表真实结果，当超过重合限（10000#/mL）之后，检测结果并不会因为样品浓度的增长而增长，而是有一个下降的趋势，原因在于仪器将两个或多个粒子当成了一个粒子，从而造成数量减少。

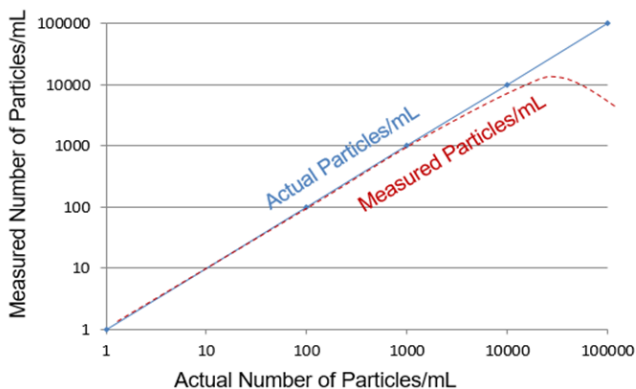


图4

表1是针对于动态光散射（DLS）所做的八组试验，该试验样品为DUKE—92nm标准粒子，测试仪器为PSS-Nicomp Z3000。我们改变其配置浓度，来监控其测试结果的变化。

表1——标准粒子不同浓度下测试结果比较

备注	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值
氯化钠溶液, 温度23摄氏度, 圆形样品池,	10uL in 1.0mL 100倍	95.77	0.147	0.022	0.41	328	10uL in 1.7mL 170倍	95.91	0.143	0.020	0.31	314
		95.69	0.162	0.026	0.6	328		95.54	0.163	0.027	0.33	316
		95.54	0.194	0.038	0.75	330		95.44	0.133	0.018	0.35	314
		95.42	0.194	0.038	0.68	332		95.38	0.189	0.036	0.23	323
		95.60	0.174	0.031	0.61	329.5		95.56	0.157	0.025	0.305	316.75
	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值
	10uL in 1.3mL 130倍	94.38	0.212	0.045	0.28	314	10uL in 1.9mL 190倍	97.71	0.262	0.069	0.4	314
		94.26	0.161	0.026	0.28	319		96.77	0.205	0.042	0.32	316
		94.45	0.137	0.019	0.31	321		96.47	0.179	0.032	0.28	315
		94.46	0.148	0.022	0.35	332		96.6	0.203	0.203	0.32	340
		94.38	0.164	0.028	0.305	321.5		96.88	0.212	0.086	0.33	321.25
	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值
	10uL in 1.5mL 150倍	94.1	0.088	0.008	0.53	306	10uL in 2.1mL 210倍	96.02	0.193	0.037	0.62	305
		94.41	0.073	0.005	0.64	307		96.52	0.224	0.050	0.44	309
		94.86	0.084	0.007	0.78	313		96.4	0.208	0.043	0.41	307
		95.03	0.127	0.016	0.79	313		96.36	0.205	0.042	0.69	304
94.6		0.093	0.009	0.685	309.75	96.32		0.207	0.043	0.54	306.25	
浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值	浓度	mean	S.D	P.I	Chi	光强值	
10uL in 1.6mL 160倍	95.42	0.102	0.010	0.32	325	10uL in 2.3mL 230倍	96.52	0.186	0.035	0.33	305	
	95.65	0.106	0.011	0.33	327		96.5	0.214	0.046	0.33	309	
	95.75	0.154	0.024	0.31	330		96.43	0.236	0.056	0.37	307	
	95.72	0.129	0.017	0.37	330		96.56	0.227	0.052	0.38	304	
	95.63	0.122	0.015	0.332	328		96.50	0.215	0.047	0.352	306.25	

经实验所得，92标粒当稀释至900倍时，ND值达到192，此时光强值能达到300KHz。建议稀释倍数小于900倍。

从表1可以看出，当稀释150倍时，所测得的平均粒径最接近标称值。当增加或减少稀释倍数时，检测结果明显变大，远离标称值。从而可以认为该样品稀释150倍的浓度下多重光散射效应最低。

Particle Sizing Systems

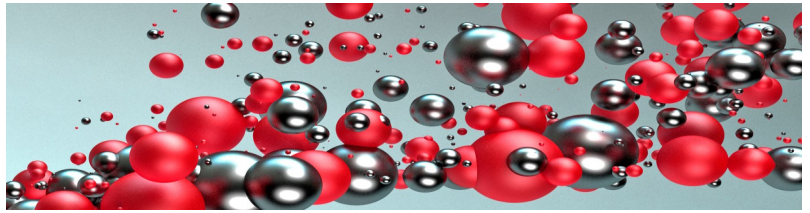
Building solutions one particle at a time.



ALP-TN-CN-10

走出“高浓度”样本 粒度检测的误区

Date: 2019.10



Sample PJ06 measured without dilution showed dramatic change in curve near 0.5 μm

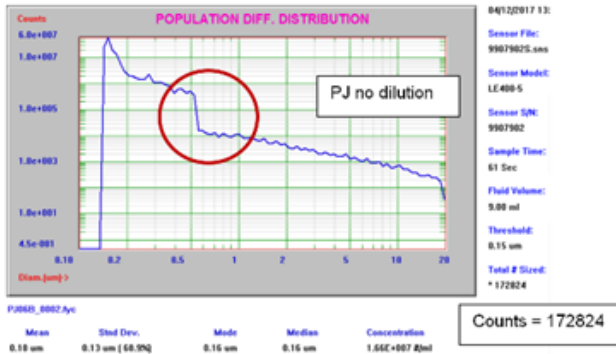


图5

Sample diluted 4:1 shows less change near 0.5 μm . Counts closer to 50% decrease (0.58).

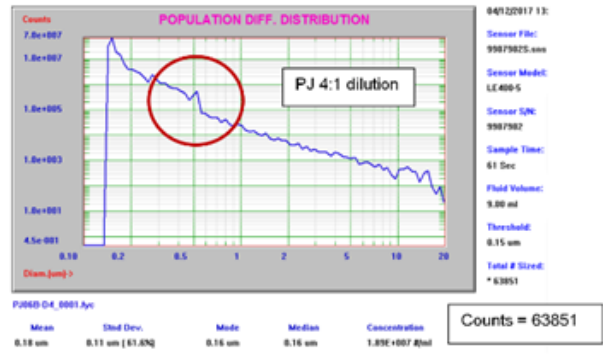


图7

Sample diluted 2:1 still has pronounced slope change near 0.5 μm . Counts did not drop 2:1

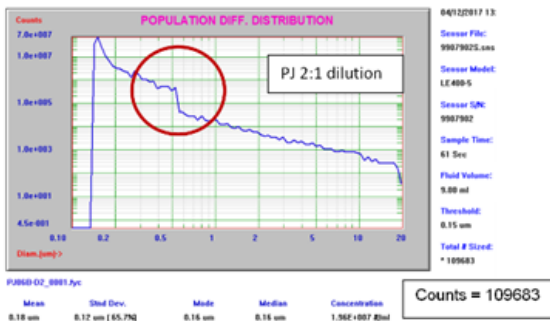


图6

Sample diluted 10:1 shows little slope change near 0.5 μm . Counts drop close to half (0.53).



图8

图5-8为相同样品不同浓度的检测结果，假设颗粒之间没有重合现象，如果加倍稀释的话，稀释后的样本粒子数量应该为稀释前的50%。图5为原样检测，它的浓度很高，超过了重合限。图6为稀释两倍后的检测结果，但是它的粒子数并没有根据稀释倍数的增大两倍而下降一半。图7为稀释四倍后的检测结果，这时检测到的粒子数在63000颗左右，而当稀释到八倍时，这时检测到的粒子数为33000颗左右，很明显是稀释四倍时检测到的粒子数的一半左右，此时的浓度在重合限之内。

结果与讨论

浓度过高会导致检测结果产生偏差，真正的高浓度检测应当建立在科学的统计学意义基础之上，并且尽量避免重合限。但是在实际的工作、研究和学习中，不可能每个样本浓度正合适。这就要求我们自行去寻找合适的浓度，以此来保证我们的测试结果准确、真实、可信。在ISO-22412动态光散射中，也提及需要考察浓度。在乳剂检测标准中，无论是美国USP729还是中国的药典都对浓度做了特别规定。

上海奥法美嘉科技有限公司作为美国PSS粒度仪公司在中国的代表，一直致力于传授粒度真知，在对高浓度样品的检测中，提倡进行科学有效的方法学开发及研究。而PSS粒度仪也开发上市了自动稀释模块和高性能的最新一代传感器，来应对高浓度样本的检测。我们深信只有遵循严谨科学的态度以及求真务实的原则，方能促进技术的进步以及产品品质的提升。

Particle Sizing Systems

Building solutions one particle at a time.

