

# 折光率对微流成像法检测蛋白制剂不溶性微粒的影响

郭莎<sup>1#</sup>, 李萌<sup>2#</sup>, 贾哲<sup>1,3</sup>, 梅玉婷<sup>1</sup>, 贺鹏飞<sup>1</sup>, 田向斌<sup>4</sup>, 吴昊<sup>2\*</sup>, 王兰<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016; 3. 烟台大学药学院, 烟台 264005; 4. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070)

**摘要** 目的: 蛋白制剂中不溶性微粒的含量是衡量样品质量的重要指标之一, 为了更为准确地检测不溶性微粒的含量和粒径, 本研究探讨了溶液折光率对于微流成像系统检测不溶性微粒的影响。方法: 本研究以牛血清白蛋白 (BSA) 为例, 通过常见的外界刺激条件 (冷冻-解冻) 制备高浓度的蛋白质不溶性微粒, 并将此微粒稀释至不同折光率的溶液 (由 PEG1000、海藻糖制备) 中, 利用微流成像系统检测不溶性微粒的含量。结果: 当溶液的折光率接近蛋白质不溶性微粒折光率时, 利用微流成像技术检测的不溶性微粒含量低于实际的微粒含量。此外, 随着溶液折光率的增加, 采用微流成像技术检测出的不溶性微粒的粒径也随之减小。结论: 蛋白质溶液的折光率发生改变, 会影响利用微流成像技术检测不溶性微粒的准确性。因此, 利用微流成像技术检测蛋白制剂中不溶性微粒时, 需要考虑到制剂处方的折光率对于检测不溶性微粒的影响, 必要时可以采用稀释的方法降低折光率对蛋白质颗粒的屏蔽作用。

**关键词:** 不溶性微粒; 折光率; 微流成像技术; 制剂处方; 牛血清白蛋白

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)08-0944-10

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.08.012

## The Effect of Refractive Index on Flow Imaging Detection of Subvisible Particles in Protein Formulations

Guo Sha<sup>1#</sup>, Li Meng<sup>2#</sup>, Jia Zhe<sup>1,3</sup>, Mei Yuting<sup>1</sup>, He Pengfei<sup>1</sup>, Tian Xiangbin<sup>4</sup>, Wu Hao<sup>2\*</sup>, Wang Lan<sup>1\*</sup> (1. National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 4. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China)

**Abstract Objective:** The concentration of subvisible particles is one of the key factors to evaluate the quality of protein formulation. In order to accurately measure the concentration and size of subvisible particles, this

基金项目: 2020年国家药品标准提高项目课题-眼用注射剂的不溶性微粒检测 (编号 2020S11); 辽宁省科技厅省博士科研启动基金计划项目 (编号 2021-BS-131)

作者简介: 郭莎 Tel: (010) 53852177; E-mail: guosha@nifdc.org.cn

共同第一作者: 李萌 Tel: 18801313865; E-mail: 18801313865@163.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

吴昊 Tel: 13904221830; E-mail: haowu@syphu.edu.cn

study investigated the effect of refractive index of formulation on the subvisible particles measurement by flow imaging microscopy (FIM). **Methods:** In this study, bovine serum albumin (BSA) was taken as an example which was treated with the common stress, froze and thaw, for multiple times to generate high concentration of protein subvisible particles, and the particles were diluted by solutions with different refractive indexes (prepared by trehalose, PEG1000). The concentration of subvisible particles was quantified by FIM. **Results:** When the refractive index of solution was similar to protein subvisible particles, the concentration of subvisible particles measured by FIM was underestimated compared to the actual result. In addition, with the increase of solution refractive index, the size of subvisible particles detected by FIM was decreased. **Conclusion:** The change of refractive index in protein solution will affect the accuracy of subvisible particles detected by FIM. Therefore, the effect of the refractive index of protein formulation on the measurement of subvisible particles should be carefully evaluated if using FIM to detect the concentration of subvisible particles in any protein formulations. Dilution methods may be needed to reduce the effect of refractive index on subvisible particle detection.

**Keywords:** subvisible particle; refractive index; flow imaging microscopy; formulation; bovine serum albumin

蛋白质制剂因其独特的分子结构在临床治疗领域得到广泛的应用。随着生产工艺的发展和进步,越来越多的蛋白质制剂通过审批进入市场供患者使用,同时药品质量安全问题也会引起关注<sup>[1-3]</sup>。蛋白质药物如单克隆抗体、双特异性抗体及抗体偶联药物等具有良好的靶向性,但因其分子量较大,空间结构复杂,很容易受外界因素的影响失去空间构象并导致活性的降低,甚至发生聚集并引发不良反应<sup>[4-5]</sup>。无论是医药企业,还是监管机构都需要准确地监控和检测蛋白质药品稳定性,避免出现药品安全隐患。蛋白质注射剂中的不溶性微粒含量是近些年来衡量蛋白质制剂稳定性的重要指标和参数<sup>[2]</sup>。相较于常用的分子排阻色谱法,蛋白质注射剂中不溶性微粒含量能更灵敏地检测到蛋白质制剂早期的聚集。此外,注射剂中不溶性微粒也能够反映药包材与药物的兼容性,例如胶塞和预充针上的硅油与蛋白质溶液接触会有一些的硅油液滴进入到制剂中,导致不溶性微粒浓度升高和蛋白质的聚集<sup>[6-7]</sup>。因此,各国药典对于大于等于10  $\mu\text{m}$ 的颗粒都有明确的规定和限制,一般采用光阻法和显微计数法对注射剂中的不溶性微粒进行统计和检测<sup>[8-10]</sup>。但是光阻法和显微计数法因样品消耗量大、检测通量较低以及漏检风险等限制了其应用<sup>[11]</sup>。为了满足药品研发和管理的需求,很多医药企业和研发机构使用微流成像技术检测蛋白质注射剂中的不溶性微粒浓度<sup>[12]</sup>,其原理为样品通过透明微通道流通池时,仪器在

短时间内对样品中不溶性微粒进行高频拍照并收集不溶性微粒图片,统计出样品中不溶性微粒浓度。相较于药典检测不溶性微粒方法,微流成像技术需要更少的样品体积、可提供更高的检测通量并能得到更为准确的不溶性微粒信息<sup>[2]</sup>。

微流成像技术虽然能够利用微通道流通池和高速摄影机对样品中不溶性微粒进行快速的检测,但其检测结果也受限于样品的光学特性<sup>[13]</sup>。当蛋白质在与水性质接近的缓冲液中,水溶液与蛋白质形成的不溶性微粒有明显的折光率区别,检测结果相对准确,但当蛋白质所处缓冲体系折光率发生变化时,会使不溶性微粒检测结果和图像参数发生偏移,无法真实反映制剂中不溶性微粒的浓度和粒径情况。尤其是在高浓度蛋白质制剂中,所处溶液体系的折光率与蛋白质不溶性微粒接近,不溶性微粒的检测结果与实际有较大的偏差。本试验通过制备不同浓度的聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)和海藻糖溶液,考察折光率对微流成像系统检测不溶性微粒的影响。PEG是一种亲水性非离子聚合物,可作为保护蛋白质的辅料加入到制剂处方中<sup>[14-15]</sup>。海藻糖作为疫苗、抗体制剂的冻干保护剂及稳定剂,常在生物制剂产品中应用使得生物制品可常温保存,并提高制剂在储存和运输中的安全性和稳定性<sup>[16]</sup>。因此,本试验探讨这两种处方成分折光率的变化对于微流成像检测不溶性微粒结果的影响,以便更为准确地分析微流成像技术检测蛋白质注射剂中不溶性微粒的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PEG1000, 上海麦克林生化科技有限公司; 海藻糖, Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; 牛血清白蛋白 (Bovine Albumin, BSA), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, Merck Millipore LTD; 10 $\times$  PBS (pH 7.4), 索莱宝生物科技有限公司; 液氮, 辽宁嘉医特种气体有限公司; 试验所用试剂均为分析级。

### 1.2 仪器

天平, 沈阳杰龙仪器有限公司; 阿贝折射仪, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; 微流成像仪 (FlowCAM), 美国Yokogawa Fluid Imaging Technologies Inc; 水浴锅 (DF-101S 型), 巩义市予华仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 不同折光率溶液的制备

取10 $\times$  PBS溶液, 用去离子水稀释成1 $\times$  PBS溶液, 将海藻糖溶于1 $\times$  PBS溶液制备成1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%海藻糖溶液; 同样的方法, 制备1%、5%、10%、15%、20% PEG1000溶液。每组取100  $\mu\text{L}$ 置于阿贝折射仪中, 测量每组溶液的折光率。

#### 1.3.2 BSA不溶性微粒的制备

取10 $\times$  PBS溶液, 用去离子水稀释成1 $\times$  PBS溶液, 用1 $\times$  PBS溶液配制1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA溶液, 将1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA溶液置于7 mL中硼硅西林瓶中。将BSA溶液完全置于液氮中冷冻2分钟, 取出, 再置于30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅解冻10分钟, 重复10次, 得到高粒子浓度蛋白质溶液。1 $\times$  PBS缓冲溶液在配制溶液之前均需过0.22  $\mu\text{m}$  PES材质的滤膜。

#### 1.3.3 处于不同折光率溶液中的BSA不溶性微粒的制备

使用1 $\times$  PBS缓冲溶液配制1%、5%、10%、15%PEG1000溶液。取200  $\mu\text{L}$ 高粒子浓度蛋白质溶液分别加入5 mL 1%、5%、10%、15% PEG1000溶液。轻轻摇匀, 取1 mL混合后溶液进行微流成像法检测。

使用1 $\times$  PBS缓冲溶液配制1%、10%、20%、30%海藻糖溶液。取200  $\mu\text{L}$ 高粒子浓度蛋白质溶

液分别加入5 mL 1%、10%、20%、30%海藻糖溶液。轻轻摇匀, 取1 mL混合后溶液进行微流成像法检测。

#### 1.3.4 稀释对蛋白质溶液中颗粒含量的影响

取高浓度BSA不溶性微粒, 用1 $\times$  PBS溶液对蛋白质颗粒溶液进行稀释, 分别稀释为原溶液的0.2倍、0.4倍、0.6倍、0.8倍、1倍。轻轻混匀, 防止气泡生成, 取1 mL稀释后溶液检测溶液中颗粒含量。

取高浓度BSA不溶性微粒, 以1:3 (v/v) 的比例将蛋白质颗粒溶于30%海藻糖溶液中, 此时, 海藻糖浓度为22.5%。再用1 $\times$  PBS溶液, 以1:1 (v/v) 的比例对蛋白质颗粒溶液进行梯度稀释, 溶质分别稀释为11.25%海藻糖溶液、5.63%海藻糖溶液、2.81%海藻糖溶液、1.41%海藻糖溶液、0.70%海藻糖溶液、0.35%海藻糖溶液、0.18%海藻糖溶液、0.09%海藻糖溶液、0.04%海藻糖溶液。轻轻混匀, 防止气泡生成, 取1 mL稀释后溶液检测溶液中颗粒含量。

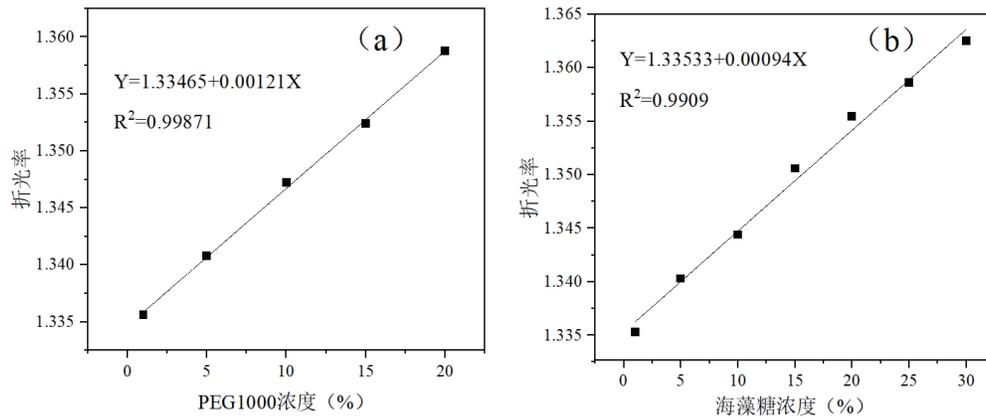
#### 1.3.5 微流成像法检测参数

微流成像仪 (Flow Imaging Microscopy, FIM) 使用高倍率的照相机来检测样品中的不溶性微粒。在FIM中缓慢添加1 mL “1.3.2” 项方法、“1.3.3” 项方法、“1.3.4” 项方法样品, FIM配备了长1600  $\mu\text{m}$ 、宽800  $\mu\text{m}$ 、深80  $\mu\text{m}$  的流池, 具有10 $\times$  物镜进行图像采集。样品为手动进样, 流速为0.15  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 自动成像速率为每秒27帧; 黑色像素为15.00, 白色像素为15.00。

## 2 结果

### 2.1 折光率变化趋势

对于PEG1000、海藻糖来说, 随着浓度的增高, 折光率均呈现上升趋势, 且二者浓度与相应折光率间存在很好的线性关系, 结果如图1所示, PEG1000溶液折光率随浓度的关系为 $Y=1.33465+0.00121X$ ,  $R^2=0.99871$ ; 海藻糖折光率随浓度的关系为 $Y=1.33533+0.000942376X$ ,  $R^2=0.9909$ 。说明采用添加不同浓度的海藻糖和PEG1000, 皆可以得到不同折光率的溶液, 即该种方式可以作为改变溶液折光率的方法。



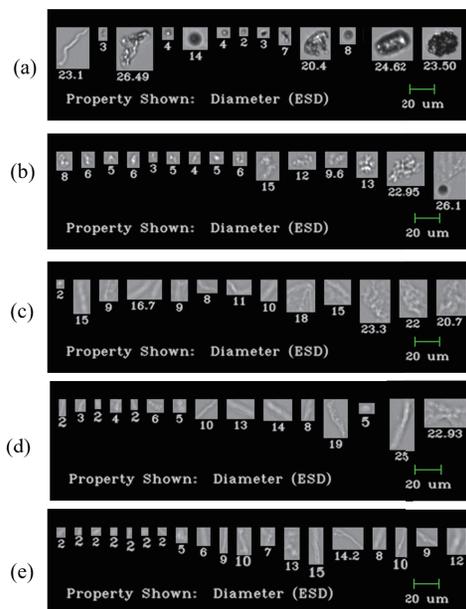
a. PEG1000 和折光率的线性回归曲线；b. 海藻糖和折光率的线性回归曲线。

图 1 PEG1000 及海藻糖浓度与折光率关系图

### 2.2 BSA在不同浓度PEG1000中颗粒变化情况

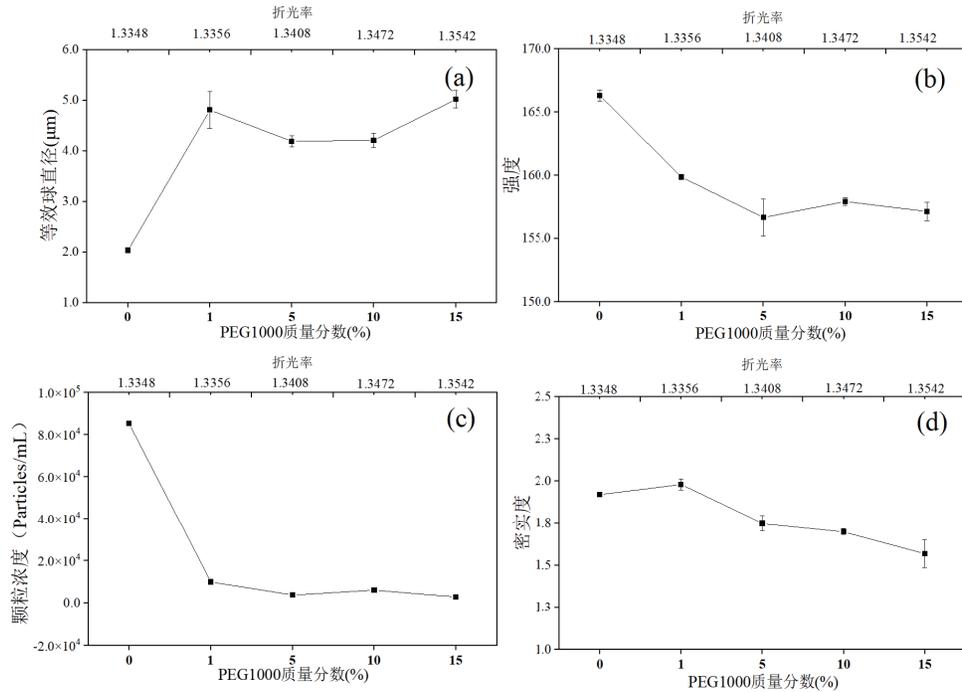
将制备的高粒子浓度BSA溶液分别加入不同浓度的PEG1000溶液中，考察折光率改变对微流成像法检测不溶性微粒结果的影响。如图2所示，颗粒在PBS溶液中的图像较清晰，随着PEG1000浓度的升高，颗粒图像呈现出逐渐模糊的特点。颗粒具体检测参数如图3所示，颗粒平均等效球直径在PBS溶液中最小，添加PEG1000后明显增大，且随着PEG1000浓度的增加有增大的趋势；颗粒平均强度值在PBS溶液中最大，随着PEG1000含量增加而减小最后保持稳定；颗粒浓度和平均密实度相

对于PBS组均出现减小趋势，其中颗粒浓度在1% PEG1000溶液中即有明显下降，降幅接近90%，不过随着PEG1000浓度提高，颗粒浓度进一步降低的趋势较缓；平均密实度则随着PEG1000浓度提高逐渐减小。图4为颗粒粒径分布图，从中可以看出蛋白颗粒在PBS溶液中，以1~2 μm粒径范围内颗粒分布最多，而颗粒在PEG1000溶液中主要分布范围为2~5 μm，说明随着PEG1000浓度的增加，折光率增加，不仅不溶性微粒浓度明显下降，不溶性微粒粒径分布也发生偏移。



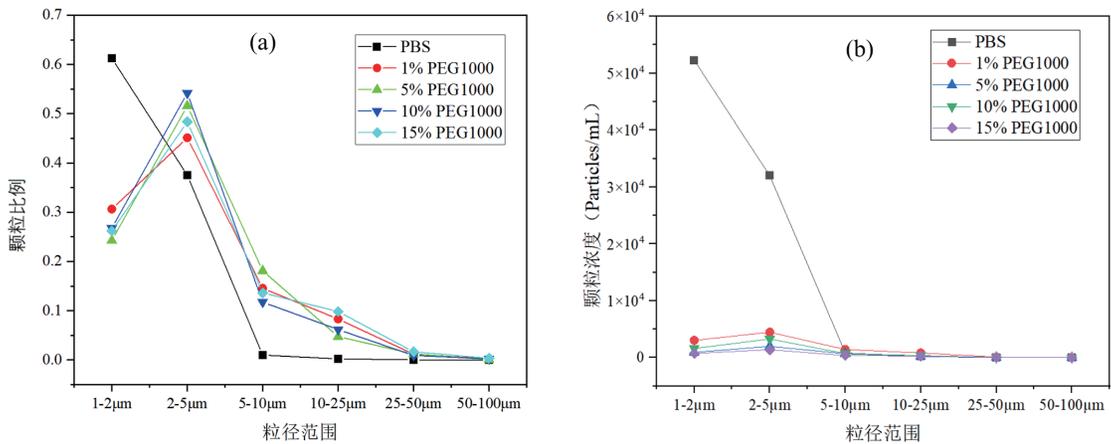
(a) 颗粒在 PBS 溶液中的颗粒形态；(b) 颗粒在 1%PEG1000 溶液中的形态；(c) 颗粒在 5%PEG1000 溶液中的形态；(d) 颗粒在 10%PEG1000 溶液中的形态；(e) 颗粒在 15%PEG1000 溶液中的形态。

图 2 颗粒在 PBS、1%PEG1000、5%PEG1000、10%PEG1000 及 15%PEG1000 溶液中的形态



(a) 颗粒加入不同浓度PEG溶液后平均等效球直径变化情况；(b) 颗粒加入不同浓度PEG溶液后溶液平均强度变化情况；(c) 颗粒加入不同浓度PEG溶液后颗粒浓度变化情况；(d) 颗粒加入不同浓度PEG溶液后溶液平均密度变化情况。

图3 颗粒在 PBS、1%PEG1000、5%PEG1000、10%PEG1000 及 15%PEG1000 溶液中的形态参数



(a) 颗粒比例在不同浓度PEG溶液中变化示意图；(b) 颗粒浓度在不同浓度PEG溶液中变化示意图。

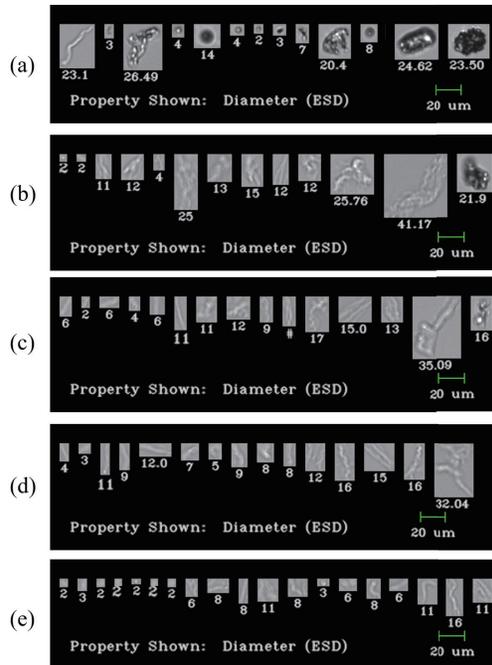
图4 颗粒在 PBS、1%PEG1000、5%PEG1000、10%PEG1000 及 15%PEG1000 溶液中颗粒粒径分布

### 2.3 BSA在不同浓度海藻糖中颗粒变化情况

将制备的高粒子浓度BSA溶液分别加入不同浓度的海藻糖溶液中，考察折光率改变对微流成像法检测不溶性微粒结果的影响。如图5所示，与在PEG1000溶液中的情况类似，颗粒在PBS溶液中的图像较清晰，随着海藻糖浓度的升高，颗粒图像呈现出逐渐模糊。颗粒具体参数如图6所示，颗粒平均等效球直径在PBS溶液中最小，在海藻糖溶液中有明显增大；颗粒平均强度和密实度在PBS溶液中

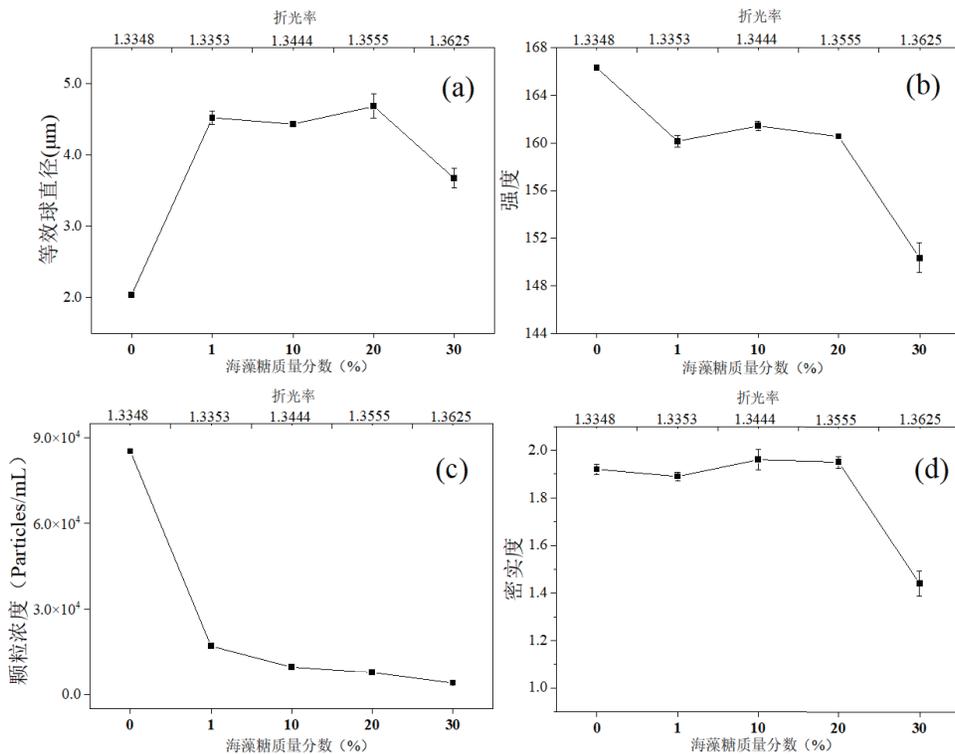
均为最大，随着海藻糖的加入逐渐减小，在30%时达到最小；颗粒浓度在1%海藻糖溶液中比在PBS中有明显下降，降幅可达80%，随后在10%、20%、30%海藻糖溶液中，颗粒浓度缓慢降低。从图7 (a)的颗粒粒径分布可以看出，在PBS溶液中，颗粒在1~2 μm粒径范围内分布最多，占比在60%以上，而颗粒在不同浓度海藻糖溶液中主要分布范围为2~5 μm，占比为45%~55%。并通过图7 (b)可以观察到，随着海藻糖浓度的增加，颗粒数逐渐

减小,尤其在1~5 μm范围内,因此当小粒径的颗粒被漏检时,颗粒的平均参数值将更加趋向于反映大颗粒的参数特点。



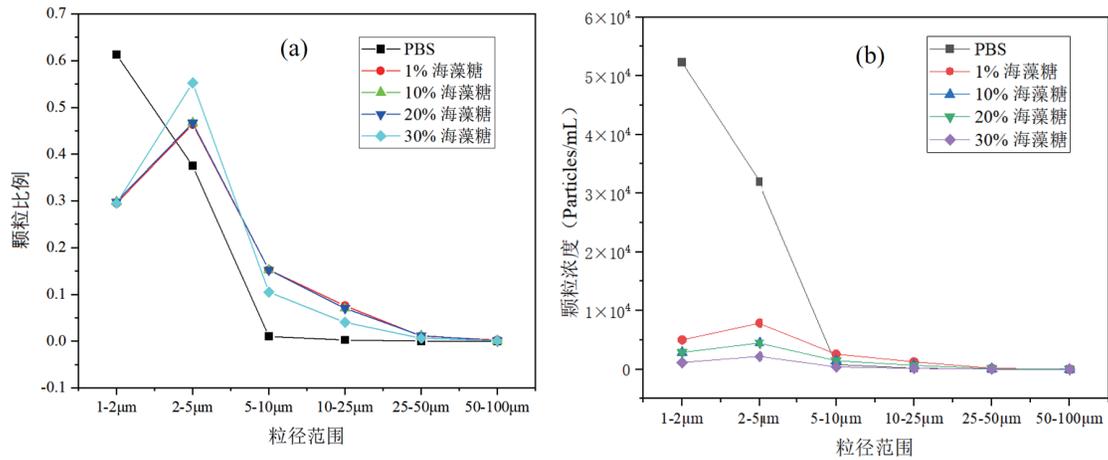
(a) 颗粒在 PBS 溶液中的颗粒形态; (b) 颗粒在 1% 海藻糖溶液中的形态; (c) 颗粒在 10% 海藻糖溶液中的形态; (d) 颗粒在 20% 海藻糖溶液中的形态; (e) 颗粒在 30% 海藻糖溶液中的形态。

图 5 颗粒在 PBS、1% 海藻糖、10% 海藻糖、20% 海藻糖及 30% 海藻糖溶液中的形态



(a) 颗粒加入不同浓度海藻糖后平均等效球直径变化情况; (b) 颗粒加入不同浓度海藻糖溶液后溶液平均强度变化情况; (c) 颗粒加入不同浓度海藻糖溶液后颗粒浓度变化情况; (d) 颗粒加入不同浓度海藻糖溶液后溶液平均密度变化情况。

图 6 颗粒在 PBS、1% 海藻糖、10% 海藻糖、20% 海藻糖及 30% 海藻糖溶液中的形态参数



(a) 颗粒比例在不同浓度海藻糖溶液中变化示意图；(b) 颗粒浓度在不同浓度海藻糖溶液中变化示意图。

图7 颗粒在 PBS、1% 海藻糖、10% 海藻糖、20% 海藻糖及 30% 海藻糖溶液中粒径分布

#### 2.4 稀释后蛋白质溶液中颗粒含量变化

通过图8可以观察到BSA溶液 (PBS) 中颗粒浓度和稀释倍数之间存在较强的线性关系。线性关系

为 $Y=511873X-12434$ ，随着稀释倍数的增加颗粒含量逐渐下降。

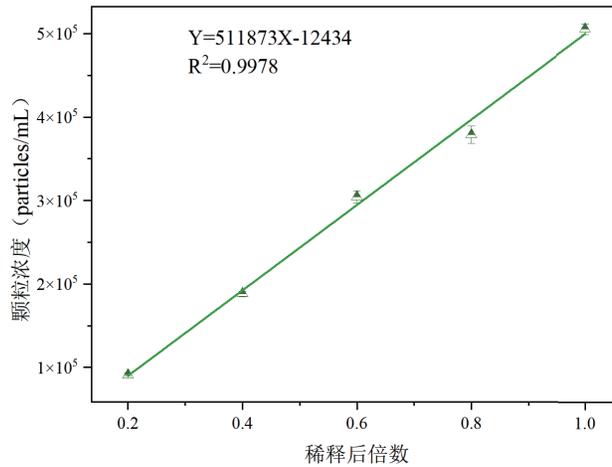


图8 BSA 溶液 (PBS) 颗粒浓度随稀释倍数的变化关系

通过图9可以观察到BSA溶液 (22.5%海藻糖) 中颗粒浓度和稀释倍数之间线性关系较差。当溶剂浓度大于0.18%时, 溶液颗粒呈现不规则下降; 直到溶剂浓度下降为0.18%以后再继续稀释, 溶液中颗粒浓度才会随稀释倍数的增加等梯度下降。若在颗粒浓度不受折光率影响的理想情况下, 颗粒浓度会随着稀释倍数增加呈现梯度下降, 即为不同海藻糖浓度下的理论颗粒含量, 从表1可见, 理论颗粒含量与实测颗粒含量之间存在较大差异, 当海藻糖含量为1.41%时, 理论颗粒含量与实测颗粒含量差异最大, 可达19倍之多, 说明实测颗粒含量受海

藻糖 (也即折光率) 影响较大。根据海藻糖浓度在0.18%以下时, 溶液颗粒呈现梯度下降的检测结果, 说明在该海藻糖浓度以下, 其引起的折光率的改变不足以影响检测结果, 故以试验中最低浓度海藻糖溶液 (0.04%) 实测颗粒含量反向推测, 得到各海藻糖含量下的推测颗粒含量。在图9和表1中, 可以发现理论颗粒含量和推测颗粒含量基本一致。因此, 当溶液中颗粒受到折光率影响时, 可以考虑通过稀释降低溶液折光率后检测, 并反向推测得到高海藻糖浓度溶液中的真实颗粒数。

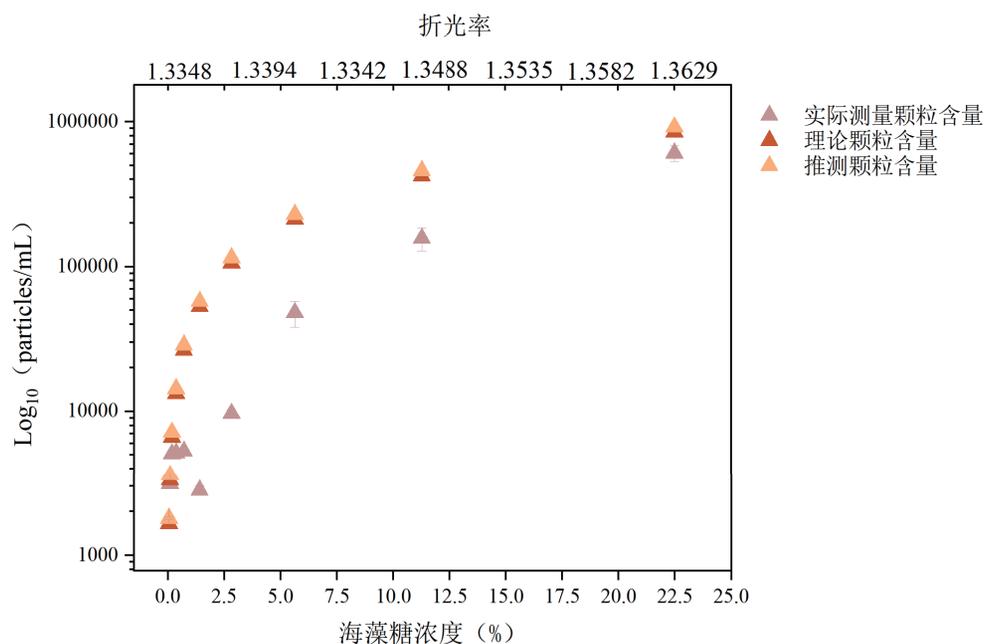


图9 BSA 溶液（海藻糖）颗粒浓度随稀释倍数的变化关系

表1 BSA 溶液（海藻糖）颗粒浓度随稀释倍数的变化关系

溶质浓度	折光率	实测颗粒含量 ( Particles/mL )	理论颗粒含量 ( Particles/mL )	推测颗粒含量 ( Particles/mL )
原颗粒	1.3348	3386062 ± 327688	3386062	3672064
22.50% 海藻糖	1.3629	607070 ± 74558	846516	918016
11.25% 海藻糖	1.3493	157110 ± 28933	423258	459008
5.63% 海藻糖	1.3407	47938 ± 9804	211628	229504
2.81% 海藻糖	1.3353	9655 ± 621	105814	114752
1.41% 海藻糖	1.3379	2816 ± 213	52907	57376
0.70% 海藻糖	1.3348	5313 ± 257	26453	28688
0.35% 海藻糖	1.3348	5136 ± 301	13226	14344
0.18% 海藻糖	1.3348	5073 ± 266	6613	7172
0.09% 海藻糖	1.3348	3132 ± 204	3306	3586
0.04% 海藻糖	1.3348	1793 ± 41	1653	1793

### 3 讨论

#### 3.1 折光率对不溶性微粒检测的影响

本研究以BSA为模型蛋白并制备不溶性微粒,选取了PEG1000和海藻糖两种辅料作为改变溶液折光率的成分,通过将微粒加入不同浓度辅料,即不同折光率溶液中,考察折光率改变对微流成像法检测不溶性微粒结果的影响,发现折光率增高会使颗粒图片变模糊,从参数来看,体现为等效球直径平均值增大,浓度降低,导致粒径的分布特征改变,此外颗粒强度值和密实度均有下降趋势。本研究所选用的辅料为PEG和海藻糖,其中PEG本身是一种亲水分子,可提高蛋白分子的稳定性,通过氢键和分子间疏水作用,形成分子间相互缠绕的网状结构<sup>[15]</sup>,也有研究表明PEG可与色氨酸残基发生作用,从而使色氨酸残基所处微环境的亲水性有所升高<sup>[17]</sup>。海藻糖常在蛋白质类制剂中当作冻干保护剂,海藻糖稳定性强,还原性低,使蛋白质保持其天然状态,从而避免在干燥、热冲击和冷藏期间变性<sup>[18]</sup>。因此,本文中所使用的两种辅料并不会降低蛋白质制剂的稳定性导致颗粒的产生,而仅仅是作为折光率改变的一种手段。

样品中不溶性微粒以层流的流动状态通过微流成像仪的微通道流通池,高速摄影机借助高倍光学显微镜,对流经微通道流通池中的不溶性微粒进行拍照,得到颗粒图片<sup>[19]</sup>。基于不溶性微粒在仪器下得到的像素与所处溶液在仪器中得到的像素的区别,对溶液中大于1  $\mu\text{m}$ 的不溶性微粒进行浓度、粒径和形态特征的统计。因此,当溶液中的光学性质改变,会影响仪器检测不溶性微粒的准确性。通过微流成像法可以得到颗粒的光学性质参数,比如强度和密实度。强度为组成一个粒子像素的平均灰度值,等于灰度总和与组成该粒子的像素数之比。其值越大,像素越深<sup>[20]</sup>。密实度由仪器算法所得,等于周长<sup>2</sup>/(4 $\times$  $\pi$  $\times$ 面积),形状越复杂,值越大。圆的形状最简单,值为1。根据Zolls等人的报道<sup>[21]</sup>,蛋白质不溶性微粒的折光率大概在1.41左右,当溶液的折光度增大时,蛋白质不溶性微粒在显微镜下的像素逐渐变小,当蛋白质不溶性微粒的折光率接近溶液折光率时,则蛋白质不溶性微粒会逐渐变得透明而不易检测到,从而会导致检测到的颗粒数小于实际颗粒数。在结果中也可观察到当像素区别变小,一些小粒径的不溶性微粒

会被漏检,粒径范围为1~2  $\mu\text{m}$ 的颗粒数大幅度降低。此外,由于大粒径的不溶性微粒图片一般强度较低,小粒径的不溶性微粒的强度一般较大,当大量的小粒径的不溶性微粒被漏检,导致大粒径的不溶性微粒比例升高,总体强度则会降低。当溶液的折光率逐渐升高接近蛋白质不溶性微粒的折光率时,蛋白质不溶性微粒图片边缘会变得模糊,导致计算的粒径小于实际粒径,使大于等于10  $\mu\text{m}$ 的不溶性微粒及更大粒径的不溶性微粒浓度低于实际情况,不能够真实地评估药品的风险;此外,对于不同制剂处方的原研药和生物类似药之间的不溶性微粒结果的比较,也存在由于处方成分不同导致结果间存在偏差的风险。最后,溶液的折光率接近蛋白质不溶性微粒的折光率也会导致微流成像法收集的颗粒图片与真实图像有差别,即颗粒图片的特征结构会变得模糊,影响未来对图片进一步的分析。

#### 3.2 对高折光率溶液中不溶性微粒检测结果的修正

蛋白质不溶性微粒在与其相近折光率的溶液中,由于溶液的光学屏蔽作用,会存在检测数量和浓度低于实际值的情况。因此,在对蛋白质溶液中不溶性微粒检测时,可首先考察溶液的折光率,若制剂溶液折光率接近蛋白质不溶性微粒的折光率时,可以将高折光率的溶液稀释到与水溶液接近的折光率,去除折光率对蛋白质颗粒的屏蔽作用,再通过稀释倍数反推出原液中颗粒的真实浓度。该方法对于所形成的不溶性微粒处于较稳定状态的情况是适用的,如本文中的BSA蛋白质在冻融过程中形成的不溶性微粒,对于其他蛋白质通过实际应力所形成的不溶性微粒等复杂情况,还应考察稀释操作本身对微粒形成的影响,具体分析微粒含量。

### 4 结论

本研究探讨利用微流成像系统检测蛋白质制剂中不溶性微粒时,折光率对于检测结果的影响。通过对比颗粒形态、颗粒等效球直径、强度、颗粒浓度、密实度、粒径分布在不同折光率溶液中的区别,发现当溶液的折光率接近蛋白质颗粒自身的折光率时,不溶性微粒浓度检测结果偏低,且微粒形态、粒径分布较之原处方环境有较大区别。因此,为了能够真实反映蛋白质制剂中不溶性微粒情况,在利用微流成像法检测微粒时应该考虑折光率对于检测结果的影响。

## 参考文献：

- [1] Kotarek J, Stuart C, De Paoli SH, et al. Subvisible Particle Content, Formulation, and Dose of an Erythropoietin Peptide Mimetic Product are Associated with Severe Adverse Postmarketing Events[J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105 (3) : 1023–1027.
- [2] 郭莎, 武刚, 崔永霏, 等. 2种型号微流成像分析仪测定微粒标准品及单抗样品的结果对比[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41 (4) : 655–665.
- [3] 郭莎, 张峰, 于传飞, 等. 单抗制剂多维度稳定性分析[J]. *中国药学杂志*, 2021, 56 (15) : 1241–1248.
- [4] Chisholm C F, Behnke W, Pokhilchuk Y, et al. Subvisible Particles in IVIg Formulations Activate Complement in Human Serum[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109 (1) : 558–565.
- [5] 郭莎, 王开芹, 武刚, 等. 抗PD-L1单抗的质量控制研究[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39 (1) : 13–22.
- [6] Strehl R, Rombach-Riegraf V, Diez M, et al. Discrimination Between Silicone Oil Droplets and Protein Aggregates in Biopharmaceuticals: A Novel Multiparametric Image Filter for Sub-Visible Particles in Microflow Imaging Analysis[J]. *Pharm Res*, 2012, 29 (2) : 594–602.
- [7] Basu P, Blake-Haskins A W, O' Berry K B, et al. Albinterferon Alpha(2b) Adsorption to Silicone Oil-Water Interfaces: Effects on Protein Conformation, Aggregation, and Subvisible Particle Formation[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103 (2) : 427–436.
- [8] <789> Particulate Matter in Ophthalmic Solutions[S]// USP, 2011: 2.
- [9] <788> Particulate Matter in Injections[S]//USP, 2012: 4.
- [10] 郭莎, 曹俊霞, 倪永波, 等. 光阻法检测治疗性抗体不溶性微粒的取样方式探讨[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37 (8) : 1370–1376.
- [11] Guo S, Yu C, Guo X, et al. Subvisible Particle Analysis of 17 Monoclonal Antibodies Approved in China Using Flow Imaging and Light Obscuration[J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111 (4) : 1164–1171.
- [12] Shibata H, Harazono A, Kiyoshi M, et al. Quantitative Evaluation of Insoluble Particulate Matters in Therapeutic Protein Injections Using Light Obscuration and Flow Imaging Methods[J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111 (3) : 648–654.
- [13] Sharma D K, Oma P, Pollo M J, et al. Quantification and Characterization of Subvisible Proteinaceous Particles in Opalescent MAb Formulations Using Micro-Flow Imaging[J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99 (6) : 2628–2642.
- [14] 胡勇, 扶雄, 陈旭东, 等. 蛋白质与聚乙二醇之间相互作用的光谱法研究[J]. *分析试验室*, 2010, 29 (8) : 1–4.
- [15] Cheng Z, Zhang Y. Fluorometric Investigation on the Interaction of Oleanolic Acid with Bovine Serum Albumin[J]. *J Mol Struct*, 2008, 879 (1–3) : 81–87.
- [16] 白姝, 常颖, 刘小娟, 等. 海藻糖和氨基酸之间相互作用的分子动力学模拟[J]. *物理化学学报*, 2014, 30 (7) : 1239–1246.
- [17] 胡勇, 扶雄, 陈旭东, 等. 聚乙二醇与蛋白质相互作用的荧光和共振散射光谱研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25 (4) : 353–357.
- [18] Olsson C, Jansson H, Swenson J. The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins[J]. *J Phys Chem B*, 2016, 120 (20) : 4723–4731.
- [19] Pedersen J S, Persson M. Unmasking Translucent Protein Particles by Improved Micro-Flow Imaging™ Algorithms[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103 (1) : 107–114.
- [20] Donahue N M, Ortega I K, Chuang W, et al. How Do Organic Vapors Contribute to New-Particle Formation? [J]. *Faraday Discuss*, 2013, 165: 91–104.
- [21] Zölls S, Weinbuch D, Wiggenhorn M, et al. Flow Imaging Microscopy for Protein Particle Analysis—A Comparative Evaluation of Four Different Analytical Instruments[J]. *AAPS J*, 2013, 15 (4) : 1200–1211.

(收稿日期 2022年11月10日 编辑 王雅雯)