综述

应用光散射法测定生物医药原料与制剂粒度参数的研究进展

陈孙楠[1]，米 薇[2]，王建东[2]，兰 晶[3]，张振兴[3]，金尚忠[1*]，胡志上[2*]

（1. 中国计量大学光学与电子科技学院，浙江杭州 310020；2. 中国计量科学研究院，北京 100029；3. 美国怀雅特技术公司北京代表处，北京 100082）

摘要：在生物制剂领域，颗粒的尺寸、形态、聚集状态等参数可反映药物的稳定性，进而用于评估其安全性和潜在免疫原性。粒径和粒度分布的测定方法众多，其中，光散射法具有快速、非侵入性、高灵敏度等特点，应用前景广阔。应用该技术时样品无需稀释，能快速测量多个参数等，如蛋白质溶液中颗粒的大小、形态和聚集状态等，为药品质量控制、生产工艺优化和新药研发提供重要支持。该文从粒度测定方法、主流光散射仪器的应用现状，以及生物医药原料与制剂的测量需求等方面，提出了测量前的校准策略，以期提升实际测量的准确性。

关键词：生物医药；颗粒；粒度；光散射法；准确性；测量；校准策略

中图分类号：R917；O657.3 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255(2025)07-0849-08

引用：陈孙楠，米 薇，王建东，等．应用光散射法测定生物医药原料与制剂粒度参数的研究进展［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(7): 849-856．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.07.002

Research Progress in Particle Size Parameter Determination in Biomedical Materials and Preparations by Light Scattering Methodology

CHEN Sunnan[1], MI Wei[2], WANG Jiandong[2], LAN Jing[3], ZHANG Zhenxing[3], JIN Shangzhong[1*], HU Zhishang[2*]

(*1. College of Optical and Electronic Technology, China Jiliang University, Hangzhou 310020; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100029; 3. Wyatt Technology Corporation Beijing Representative Office, Beijing 100082*)

ABSTRACT: In biological preparations, parameters such as particle size, shape, and aggregation state can reflect drug stability and serve as critical indicators for safety assessment and immunogenicity prediction. There are various methods for determining particle size and size distribution, among which light scattering method stands out as a rapid, non-invasive, and highly sensitive technique with broad application potential. Its advantages include no requirement for sample dilution, simultaneous measurement of multiple parameters (e.g., size, morphology, and aggregation state of proteins). This technology can make significant contributions to protein solution analysis, drug quality control, optimization of production processes, and drug development. This review summarizes particle size measurement methods, current applications of mainstream light scattering instruments, and how these instruments achieve measurement requirements of biomedical materials and preparations, offering calibration strategies for practical measurements to enhance measurement accuracy for biomedical materials and preparations.

Key Words: biopharmaceuticals; partical; particle size; light scattering method; accuracy; measurement; calibration strategy

生物医药原料与制剂中颗粒的粒度及其分布特性，将直接决定药品的溶出速率、生物利用度以及长期稳定性等关键质量指标。为了确保制剂的品质和疗效，必须采用精确、可靠的测量技术来对颗粒粒度进行细致分析，并建立起一套严格的粒度分布接受标准。这一过程对于保障药品的整体质量和患者安全具有不可或缺的意义。选择粒度测定技术的依据，主要是所设定的粒度分布可接受标准以及测试的具体需求（包括测试的分辨率和精确度）[1]。在现行的 ChP 2020 年版四部通则 0982 中，关于粒度和粒度分布的测定方法主要有以下 3 种：显微镜法、筛分分析法和光散射法。其中，光散射法在粒度分析中的应用范围最广泛，其优势主要体现在快速、非破坏性和高灵敏度等方面[2]。

1　光散射法的优势与挑战

相较于传统测量方法，光散射法无需对样品进行复杂的处理或标记，能直接测量，保持了样品的原始性质，大幅节省了试验时间和成本[3—6]。另外，光散射法灵敏度较高，尤其适用于生物制剂领域中颗粒浓度较低的样品。此外，该技术还具备多参数同时测量的功能，能获取颗粒的大小、形态、分布和聚集状态等多项信息，为样品的综合分析提供更全面的数据支持。总体而言，光散射法凭借快速、高灵敏度和全面性的特点，成为药品质量分析中不可或缺的重要工具，为药品质量控制、生产工艺优化和新药研发提供了可靠的技术支持，有力推动了生物制剂行业的不断发展与创新[7—8]。

尽管光散射法在生物制剂领域已取得了一定的进展和应用，但仍然面临着一些问题。生物样品通常是复杂的多组分体系，其中可能存在多种颗粒，如蛋白质、聚合物、胶体等。如何准确分析这些复杂样品仍然是一个挑战。此外，光散射法获取的数据通常是复杂的，需要对数据进行准确解析才能得到有意义的结果。因此，深入理解光散射现象的原理、进一步开发光散射法的应用，对于满足生物医药领域的检测需求是十分必要的。本文将列举主流光散射仪测量生物颗粒样品的校准方法及模型，为生物医药原料与制剂中颗粒的粒径测定提供思路。

2　光散射仪器及其应用

光散射仪器被广泛应用于相对分子质量测定、粒径分析、形态学研究、相互作用分析、聚集和沉淀状态监测、质量控制以及纯化过程优化，对提高生物药物的研发效率、产品质量和稳定性起到了积极作用。下面介绍当前主要的光散射仪器。

2.1　动态光散射（dynamic light scattering，DLS）仪器

2.1.1　原理

DLS 法可用于研究液体中颗粒或分子的尺寸、形状和布朗运动[9]。当激光照射到样品中的颗粒或分子上时，会被这些做布朗运动的颗粒散射。通过测量散射光强度随时间的变化情况，可获取颗粒的平移扩散信息，而这种信息与颗粒的尺寸和形状有关。因此，通过分析光强度的自相关函数（autocorrelation function，ACF），可确定颗粒的尺寸分布、聚集状态以及扩散系数等参数[10—13]。

2.1.2　优势与短板

DLS 法具有快速、非侵入性的特点，适用于宽范围粒径的纳米粒子测量，是大多数情况下的首选方法。例如，近年来提交至美国 FDA 药物评价与研究中心的含纳米材料的药物产品中，超过 50％都依赖 DLS 技术来表征粒径信息[13]。尽管 DLS 在纳米颗粒表征中占据压倒性优势，但其测量结果的一致性和可重复性一直是一个重大挑战，主要原因是该方法的分辨率较低、潜在的环境影响变量多，并且数据分析的可确定性相对复杂。

2.1.3　实际应用中的校准现状

ZHENG 等[14]报道在使用 DLS 测量金纳米粒子（AuNP）时，若 AuNP 悬浮液的浓度较高，会引发多重散射，导致 DLS 法测得的平均粒径出现显著

收稿日期：2024-11-16

基金项目：国家重点研发计划“国家质量基础设施体系”重点专项课题（课题编号 2021YFF0600702）、中国计量科学研究院基本业务费重点领域项目课题（课题编号 AKYZD2114-1）

作者简介：陈孙楠，男，硕士研究生，专业方向：光散射法校准研究。

通信作者：金尚忠，男，教授，从事现代光电仪器研制，光与物质作用的光镊、拉曼、红外、紫外 - 可见等光谱分析与仪器的研究与开发。

E-mail：jinsz@cjlu.edu.cn

胡志上，男，教授，从事蛋白及肽类生物活性颗粒含量、结构计量表征技术的研究及应用。

E-mail：huz@nim.ac.cn

误差。他们通过数据分析展示了多重散射对 DLS 测量结果的影响，还比较了不同 DLS 仪器的散射角度对多重散射效应的影响，并得出如下结论：无论使用哪种型号的 DLS 仪器，都必须仔细考虑 AuNP 等强散射纳米材料的多重散射效应。同时，AuNP 的散射强度与其粒径成正比，因此 DLS 测量结果会受到样品浓度和激光功率的共同影响。

优化 DLS 测量条件的方法有如下 3 种。①控制散射光强度：通过调整激光衰减器，使散射光强度（即光子计数率）处于仪器的最佳检测范围内，避免探测器饱和。②选择合适的散射角度：一般是固定散射角的角度，主要选用直角和高角度；若选用背向散射角度（例如 173°），可以缩短散射光路径，从而降低多重散射效应。③浓度：使用稀溶液样品，有助于降低多重散射的影响。

DLS 测量的基本量是散射光强度的时间自相关函数，通常有 2 种分析方法：累积分析法和直接反演法［非负约束最小二乘（non-negative least squares，NNLS）反演法］。

MAGUIRE 等[15] 使用累积分析法和 NNLS 反演法研究了 DLS 法测得的纳米粒子尺寸和尺寸分布结果。而文献[16] 报道，无论是使用反演法还是累积分析法，DLS 法测得的 PDI 在描述窄分布标准粒子和典型的宽分布生物医药纳米粒子的分布特性方面都不可靠。DLS 测量结果的平均值和分布值都可能存在明显偏差，这将导致对纳米粒子与制剂结构功能关系的解释模糊不清，或在计量兼容性方面难以进行实验室间的有效比较。因此，必须采用测量单个颗粒大小的方法进行交叉检验，以确保纳米粒子尺寸测量报告（包括平均尺寸和分布）的可靠性[17]，从而有效应对 DLS 在纳米粒子测量中的局限性，并提升其结果的可比性。

MALM[18] 介绍了一种使用自适应和统计驱动的时间分辨技术分析数据的改进 DLS 方法，可更精确地分析纳米级和微米级颗粒的尺寸分布。传统 DLS 技术容易受到样品中杂质和聚集体的干扰，导致测量结果不准确。而该改进方法将光子到达时间数据分割成极短的子测量，并对每个子测量进行单独的相关分析；然后，通过分析子测量结果的统计分布，识别并区分稳态和瞬态的散射事件，从而分别计算稳态和瞬态的粒子尺寸分布。

ALEANDRI 等[19] 讨论了激光功率对 DLS 法分析稀释蛋白质样品的影响。通过理论分析和试验验证，证明激光功率是影响 DLS 法测量灵敏度和结果的关键因素。在应用 DLS 法测量稀释蛋白质样品时，使用更高功率的激光可显著提高信噪比、缩短测量时间，并降低最小可测量浓度。

SOUZA 等[20] 报道应用 DLS 法测量纳米级颗粒尺寸时容易出现误差，主要原因是存在分散剂和颗粒尺寸分布较宽。分散剂会增大颗粒的流体动力学直径，导致 DLS 法测得结果偏高。此外，DLS 法对多分散体系测得结果的解释较为复杂，当尺寸分布较宽时，较大颗粒的光散射能力更强，进而导致测量结果偏向于更大的值。

2.2 多角度激光光散射（multi-angle light scattering，MALS）仪器

1993 年，WYATT[21] 提出了用于测定溶液中大分子（如蛋白质、聚合物和核酸等）相对分子质量和形状的 MALS 技术，同样具有非侵入性、非破坏性的特点。MALS 技术利用从多个角度收集的散射光强度进行定量分析，这些角度涵盖小角度（接近直射光方向）和大角度。散射光强度与粒子的相对分子质量、均方根半径、浓度、折射率增量等因素有关，因此利用 MALS 技术可计算出粒子的相对分子质量、均方根半径等物理参数。根据前端分离原理的不同，MALS 技术具体可以分为尺寸排阻色谱 - 多角度激光光散射（size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering，SEC-MALS）和非对称场流分离技术 - 多角度激光光散射（asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multi-angle light scattering，AF4-MALS）。

2.2.1 SEC-MALS 仪器

2.2.1.1 原理

首先，使样品通过一个充满固定相（通常是一种多孔材料，如凝胶）的色谱柱，分离样品中的不同分子[22]。然后，经分离的组分依次进入 MALS 检

测器，利用 MALS 技术对每个组分进行光散射检测，从而得到相应的相对分子质量、尺寸等信息。

2.2.1.2 优势与短板

SEC-MALS 技术能在不破坏样品的情况下提供颗粒的精确相对分子质量和形状信息，且无需频繁校准，与多种检测器的兼容性良好，因而在分析相对分子质量较大的物质时具有显著优势。该技术的局限性在于：①在操作和维护上，对人员专业技能要求高，且流程复杂，涉及校准、调试、部件清洗更换等；②对样品纯度和浓度的要求严格，不然会干扰检测结果；③检测范围受限，对相对分子质量过大或过小，以及结构复杂大分子的检测效果均不理想；④数据分析难度大，数据多且复杂，增加了分析的难度与复杂性。

2.2.1.3 实际应用中的校准现状

检测器间延迟体积（interdetector delay volume，IDV，即 MALS 检测器和示差折光检测器之间的延迟体积）值不准确，会导致 M_w、M_n、微分质量分布函数和回转半径等参数的估算出现偏差。水相体系的 IDV 校准可以使用窄分布的牛血清白蛋白或抗体参比品，有机相体系可使用窄分布的聚苯乙烯。

MATSUMOTO 等 [23] 提出了一个更准确、可靠的 IDV 确定方法：先使用相对分子质量较低的样品（如乙苯）和超洁净的 5 μm 柱进行 SEC-MALS 测量，再通过外推法使流动相流速和样品相对分子质量降至 0，以消除流动相流速和样品相对分子质量对 IDV 值的影响，从而获得更准确的 IDV 值。

2.2.2 AF4-MALS 仪器

2.2.2.1 原理

AF4 基于物理场驱动，通过交叉流场与轴向流场的协同作用实现无固定相分离，理论上能分离粒径从 1 nm 到 1 μm 的颗粒 [24—28]，示意图如图 1 所示。通道内的流体呈抛物线形，中心和外侧具有不同的流速，中心高、外侧低。由横流产生并垂直于通道流的交叉流推动样品颗粒向半透膜表面聚集，而扩散作用会使样品远离堆积壁。由于小颗粒具有较高的扩散系数，在通道内位于流速较高的中心流层；而较大的颗粒扩散慢，会在流速较低的流层中达到平衡。因此，在正常的分离模式下，小颗粒物质的传输速度更快，并先于大颗粒物质被洗脱，后者更靠近膜。随后，采用 MALS 检测器对每个被分离的组分进行检测，根据散射光强度计算出相应的相对分子质量、均方根半径等参数。

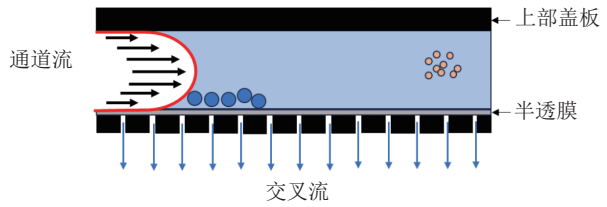


图 1　AF4 流道示意图

Fig.1　Schematic Diagram of AF4 Flow Channel

2.2.2.2 优势与短板

在分离与检测能力上，AF4 的高分辨率分离性能结合 MALS 检测器的宽动态范围检测，能精准处理多种分子；分析过程温和，不破坏样品结构，适用于检测生物大分子与聚合物等多种物质；可提供绝对相对分子质量信息。然而，该技术的联用系统结构复杂，含多个精密部件，AF4 的分离通道及 MALS 仪器的光源、探测器都需定期维护、校准，从而保证测量的准确性；此外，操作人员需熟悉相关原理、操作与维护知识，否则易导致仪器故障和测量误差。AF4-MALS 联用还会生成大量复杂数据，包括分离数据与多角度激光光散射数据，需进行整合分析，分析时要考虑诸如峰形变化、光散射角度依赖性、溶液折射率等多方面因素，对数据分析能力的要求较高。

2.2.2.3 实际应用中的校准现状

影响 AF4 样品分离效果的因素众多。交叉流作为进行物质分离的主要驱动力 [29]，其初始流速会影响分离效果。通道高度决定纵流梯度，影响分离范围与分辨率，因此不同样品需适配相应高度。聚焦流速和时间关乎聚焦效果。因通道容量有限，需通过聚焦来浓缩样品、提高效率，从而防止颗粒聚集，获得清晰的分离峰。AF4 通道底部半透膜的孔径与材质也会影响样品的通过性和分离效果，如再生纤维素膜的兼容性较高，可避免粒子的非特异性结合。输入样品量则受样品池容量与检测器灵敏度的制约，

需依据样品的复杂程度和目标分离效果择取合适的用量[30]。

在光散射试验中要确保激光的准直性，以保证试验结果的准确性[31]。溶剂分子（如甲苯）在光散射试验中通常被用作参照物质，因其相对分子质量较小，在试验条件下不会形成聚集体。而校正散射体积是为了确保测得的散射光强度能准确反映溶液中散射体的浓度。

校正散射体积后，可消除散射光的角度依赖性，使散射体系满足瑞利散射的条件，即散射体的粒径远小于入射光波长。这种情况下，散射光强度主要与溶剂分子的浓度成正比，而与角度无关，从而简化对散射光强度的测量和分析。

MANH 等[32]使用磺化聚苯乙烯（polystyrene sulfonate，PSS）标准胶体和球形蛋白标准胶体进行校准。由于 AF4 系统胶体间的电荷排斥作用，PSS 标准胶体的洗脱体积会随着浓度的增加而减小，导致“过载”效应。采用外推法将 PSS 浓度外推至无限低浓度，可消除电荷排斥效应及其影响，从而得到更准确的扩散系数和相对分子质量。此外，球形蛋白标准胶体和 PSS 标准胶体因形状不同，导致其扩散系数和相对分子质量之间的关系也存在差异。

LI[33]利用 AF4-MALS 系统建立了 2 个模型，分别用于预测纳米塑料的浓度和颗粒数量。浓度模型基于 MALS 峰面积与浓度的校准曲线，将 MALS 信号强度和尺寸关联起来；而颗粒计数模型则利用纳米塑料的浓度和颗粒数量的关联来进行预测。

2.3 流式细胞术（flow cytometry，FCM）

2.3.1 原理

流式细胞仪基于流体动力学聚焦原理，通过将样本注入高速鞘液流中心形成同轴流，使细胞单行通过检测区，再利用细胞与激光相互作用产生的前向散射光（forward scatter，FSC）反映细胞大小，而利用侧向散射光（side scatter，SSC）则可揭示细胞内部结构的复杂度和颗粒性，从而在高速流动中实现对细胞群体的快速定量及多参数分析。

2.3.2 优势与短板

流式细胞仪作为一种强大而多用途的分析工具，能在短时间内高通量地分析大量细胞，并能同时检测单个细胞的多种参数，如形态、大小和蛋白质表达等[34—37]。该法具有高精度、高灵敏度和能快速获取结果的特点，在免疫学、血液学、肿瘤学，以及细胞治疗的研究与应用中发挥了重要作用。然而，FCM 对样本的要求苛刻，必须为单细胞悬液，若样品中存在团块或聚集体则会干扰检测结果；此外，数据处理较为复杂，并在与多色荧光检测技术联用时面临荧光补偿等棘手的技术难题，若处理不当，易致结果偏差。

2.3.3 实际应用中的校准现状

HU 等[38]选择一系列已知大小和数量的微球标准品（如聚苯乙烯微球、二氧化硅微球等，这些微球标准品应与待测样品的颗粒大小和密度相似），分别制备成不同浓度的溶液（浓度范围覆盖待测样品中颗粒的预期浓度范围），再用 FCM 对每个浓度的标准品溶液进行多次测量，记录每个颗粒的光散射信号强度（FSC 和 SSC）。使用线性回归或非线性回归方法进行拟合，建立光散射信号强度与颗粒大小和数量之间的标准曲线方程，从而获得待测样品中颗粒的相关信息，达到准确识别、表征和量化蛋白质颗粒的目的。

文献[39]报道使用米氏光散射理论计算球形粒子在不同方向上的散射光功率，再通过最小二乘法拟合计算散射角和校正因子，可建立散射强度与粒径和折射率之间的数学模型；因而提出可用流式细胞术散射比（flow cytometry scatter ratio，Flow-SR）确定单个纳米颗粒（200 ～ 500 nm）的直径和折射率。该法无需标记，可区分细胞外囊泡（extracellular vesicles，EV）和脂蛋白颗粒（lipoprotein particles，LP），并提高数据解释和比较的准确性。

RICO 等[40]提出了一种使用流式细胞仪对 $CD34^+$ 细胞进行计数的全新方法。该法无需使用微球，而是直接测量细胞体积。比较研究显示，本法与传统的免疫学标准流式细胞分析方案在 $CD34^+$ 细胞计数上具有可比性；并且，本法的优势在于可简化样品制备流程，减少分析的主观性，并避免微球“消失”带来的计数误差。

TIAN 等[41] 通过使用表达水平标准化的抗原，实现了不同仪器和实验室之间 FCM 检测结果的可靠比较。使用 Cytotrol™ 冻干对照细胞和标准化方法，并基于每细胞抗体结合数（antibodies bound per cell，ABC）的检测结果，可有效评估和验证抗原表达水平，为抗原导向免疫治疗的临床应用提供了支持。

SIMEONE 等[42] 采用基于 Rosetta Calibration 微珠和荧光触发阈值的 FCM，分析间充质干细胞衍生的 EV。该法克服了传统 FCM 在散射光检测器灵敏度方面的限制，通过使用 Rosetta Calibration 微珠确定 EV 的直径，并在荧光通道上设置触发阈值，从而提高了 EV 分析的准确性和可重复性。同时，该法无需预先进行分析处理，避免了 EV 的丢失，并能可靠地对 EV 进行识别和计数。

3　结论与展望

在粒径和粒度分布的测定方法中，光散射法是测定颗粒相对分子质量、尺寸的少数几种绝对方法之一。对于生物医药原料和制剂来说，样品的复杂特性使得精确测量更具挑战性，如传统光源的信号易受背景噪音干扰，低浓度或细微聚集的粒子信号弱，因样品聚集、沉淀或不均匀分布带来的测量误差等问题。但相信随着科技进步，仪器性能可进一步提高，如新型光源如超连续谱激光光源能提供更精准波长范围与高强度的激光、单光子计数探测器可提升信号捕捉灵敏度等。自适应光学技术（可用于优化光路）和微流控技术（可使样品均匀、稳定地流动）均有助于提高测定精度。并且，基于人工智能和机器学习算法，研究者处理数据、校正偏差的方法将更加智能化，针对误差源的校正方法及统一标准操作规程也将不断得到完善。因此，光散射法在生物医药领域颗粒粒度测定的准确性有望获得显著提升，能够为药物研发、生物大分子研究等提供更为可靠的数据支持与技术保障，并引领该行业朝着更精准、高效、标准化的方向稳步前行。

参考文献：

[1] 谢　莉，粟　立，肖　瑶，等. 激光衍射法测定吸入用布地奈德混悬液的粒度分布 [J]. 药物分析杂志，2024, **44**(11): 2004-2010.

[2] SINGH S K, AFONINA N, AWWAD M, *et al*. An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2010, **99**(8): 3302-3321.

[3] ALEXANDROV E A, LITVINENKO A L, YASTREBOVA E S, *et al*. 4π light scattering flow cytometry: enhancing the identification and characterization of individual cells [J]. *Anal Methods*, 2023, **15**(39): 5218-5224.

[4] IJÄS H, LIEDL T, LINKO V, *et al*. A label-free light-scattering method to resolve assembly and disassembly of DNA nanostructures [J]. *Biophys J*, 2022, **121**(24): 4800-4809.

[5] KWAN T O C, REIS R, MORAES I. *In situ* measurements of polypeptide samples by dynamic light scattering: membrane proteins, a case study [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, **2208**: 189-202.

[6] DONG C, REN J. Resonance light-scattering correlation spectroscopy and its application in analytical chemistry for life science [J]. *Acc Chem Res*, 2023, **56**(19): 2582-2594.

[7] SHEKUNOV B Y, CHATTOPADHYAY P, TONG H H Y, *et al*. Particle size analysis in pharmaceutics: principles, methods and applications [J]. *Pharm Res*, 2007, **24**(2): 203-227.

[8] DHAMOON R K, POPLI H, AGGARWAL G, *et al*. Particle size characterization- techniques, factors and quality-by-design approach [EB/OL]. [2024-09-01]. https://www.taylorfrancis.com/chapters/mono/10.1201/9781420028706-47/synthetic-amorphous-silicas-horacio-bergna-william-roberts.

[9] BURCHARD W, RICHTERING W. Dynamic light scattering from polymer solutions [J]. *Stud Polym Sci*, 1988, **21**(1): 10-21.

[10] RAHDAR A, AMINI N, ASKARI F, *et al*. Dynamic light scattering: a useful technique to characterize nanoparticles [J]. *J Nanoanalysis*, 2019, **6**(2): 80-89.

[11] STETEFELD J, MCKENNA S A, PATEL T R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences [J]. *Biophys Rev*, 2016, **8**(4): 409-427.

[12] PECORA R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids [J]. *J Nano Res*, 2000, **2**(2): 123-131.

[13] FARKAS N, KRAMAR J A. Dynamic light scattering distributions by any means [J]. *J Nano Res*, 2021, **23**(5): 120.

[14] ZHENG T, BOTT S, HUO Q. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation [J]. *Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(33): 21585-21594.

[15] MAGUIRE C M, RÖSSLEIN M, WICK P, *et al*. Characterisation of particles in solution-a perspective on light scattering and comparative technologies [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2018, **19**(1): 732-745.

[16] LIU Z, CHEN M, GUO Y, *et al*. Self-assembly of cationic amphiphilic cellulose-*g*-poly(*p*-dioxanone) copolymers [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, **204**: 214-222.

[17] BARBERIO A E, SMITH S G, CORREA S, *et al*. Cancer cell coating nanoparticles for optimal tumor-specific cytokine delivery [J]. *ACS Nano*, 2020, **14**(9): 11238-11253.

[18] MALM A V. Improved dynamic light scattering using an adaptive and statistically driven time resolved treatment of correlation data [J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 13519.

[19] ALEANDRI S, VACCARO A, ARMENTA R, *et al*. Dynamic light scattering of bio-pharmaceutics-Can analytical performance be enhanced by laser power? [J]. 2018, *Pharmaceutics*, 2018, **10**(3): 94.

[20] SOUZA T G F, CIMINELLI V S T, MOHALLEM N D S. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles [J]. *J Phys Conf*, 2016, **733**(1): 12039.

[21] WYATT P J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1993, **272**(1): 1-40.

[22] SAHIN E, ROBERTS C J. Size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering for elucidating protein aggregation mechanisms [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, **899**: 403-423.

[23] MATSUMOTO Y, KIKUCHI M, UEDA K, *et al*. Highly reliable determination of the interdetector delay volume in SEC-MALS for precise characterization of macromolecules having narrow and broad molar mass distributions [J]. *Polymer J*, 2023, **55**(3): 239-251.

[24] CALDWELL K D. Field-flow fractionation[EB/OL]. [2024-06-10]. https://pubs. acs. org/doi/pdf/10. 1021/ac00168a001.

[25] ZHANG H, LYDEN D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization [J]. *Nat Protoc*, 2019, **14**(4): 1027-1053.

[26] GONZÁLEZ-ESPINOSA Y, SABAGH B, MOLDENHAUER E, *et al*. Characterisation of chitosan molecular weight distribution by multi-detection asymmetric flow-field flow fractionation (AF4) and SEC [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **136**: 911-919.

[27] LESPES G, DE CARSALADE D P V. Field-flow fractionation for nanoparticle characterization [J]. *J Sep Sci*, 2022, **45**(1): 347-368.

[28] LIANG Q, WU D, QIU B, *et al*. Present situation and development trends of asymmetrical flow field-flow fractionation [J]. *J Chrom*, 2017, **35**(9): 918.

[29] PLAVCHAK C L, WERNER A Z, BETZ E, *et al*. Determination of particle number concentration for biological particles using AF4-MALS: dependencies on light scattering model and refractive index [EB/OL]. [2024-06-10]. https://chemrxiv. org/engage/chemrxiv/article-details/65dcbddbe9ebbb4db94f5165.

[30] BOLINSSON H. On Advances in Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation for Biosample Characterization [EB/OL]. [2024-06-10]. https://www. semanticscholar. org/paper/Asymmetrical-Flow-Field-Flow-Fractionation-(AF4)-of-Cho-Cha/5f16e608bb108c1497e24d1a9cd3c9af8154126f.

[31] AUSTIN J, MINELLI C, HAMILTON D, *et al*. Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering [J]. *J Nano Res*, 2020, **22**(5): 108.

[32] MANH T N, GECKEIS H, KIM J I, *et al*. Application of the flow field flow fractionation (FFFF) to the characterization of aquatic humic colloids: evaluation and optimization of the method [J]. *Colloids Surf A*, 2001, **181**(1-3): 289-301.

[33] LI H. An optimized multi-technique based analytical platform for identification, characterization and quantification of nanoplastics in water [J]. *Microchem J*, 2024, **203**(1): 10.

[34] WANG L, HOFFMAN R A. Flow cytometer performance characterization, standardization, and control [EB/OL]. [2024-06-10]. http://link. springer. com/10. 1007/978-981-10-4499-1_8.

[35] KALINA T. Reproducibility of flow cytometry through standardization: opportunities and challenges [J]. *Cytometry Part A*, 2020, **97**(2): 137-147.

[36] FINAK G, LANGWEILER M, JAIMES M, *et al*. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human immunophenotyping consortium [J]. *Sci*

Rep, 2016, **6**(1): 20686.

[37] MAECKER H T, MCCOY J P, NUSSENBLATT R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, **12**(3): 191-200.

[38] HU Z, MI W, YE C, *et al*. Global analysis of aggregation profiles of three kinds of immuno-oncology mab drug products using flow cytometry[J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(10): 4768-4775.

[39] VAN DER POL E, DE ROND L, COUMANS F A W, *et al*. Absolute sizing and label-free identification of extracellular vesicles by flow cytometry[J]. *Nanomedicine*, 2018, **14**(3): 801-810.

[40] RICO L G, BARDINA J, SALVIA R, *et al*. True volumetric counting of $CD34^+$ cells using flow cytometry[J]. *J Immun Met*, 2024, **527**: 113649.

[41] TIAN L, NELSON A R, LOWE T, *et al*. Standardization of flow cytometric detection of antigen expression[J]. *Cytometry Part B*, 2024, **106**(1): 25-34.

[42] SIMEONE P, CELIA C, BOLOGNA G, *et al*. Diameters and fluorescence calibration for extracellular vesicle analyses by flow cytometry[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(21): 7885.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

848、**928 页**：公益广告