

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035524**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.30

(51) Int. Cl. **B01D 11/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201792107

(22) Дата подачи заявки
2016.10.21

(54) **ВЫСОКОТОЧНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА НЕРАЗЛИЧИМЫХ НЕВООРУЖЕННЫМ ГЛАЗОМ ЧАСТИЦ**

(31) **62/269,465**

(56) US-A1-20030024877
US-A1-20100151446
US-A-5385672
US-A1-20090049742

(32) **2015.12.18**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/US2016/058011**

(87) **WO 2017/105625 2017.06.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕЛЛИДЖЕНТ ВАЙЕРЭС
ИМЭДЖИНГ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Нордстром Рикард, Синторн Ида-
Мария, Хааг Ларс (SE)**

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(57) Данный способ предназначен для количественной оценки неразличимых невооруженным глазом частиц. Предложена фильтрующая мембрана (116), имеющая множество пор (138), определенных в ней. Фильтрующая мембрана (116) находится в функциональном взаимодействии с вакуумной камерой (104). Поры загерметизированы герметизирующим материалом (140). Каплю образца (126), содержащего жидкость (144) и неразличимые невооруженным глазом частицы (142), наносят на фильтрующую мембрану (116). Жидкость (144) растворяет герметизирующий материал (140) в порах (138e-138h), расположенных непосредственно под каплей образца (126). Жидкость (144) течет сквозь поры (140), в которых герметизирующий материал был растворен, а неразличимые невооруженным глазом частицы (142) остаются на вершине фильтрующей мембраны (116). Частицы (142) подсчитывают посредством электронной микроскопии.

B1

035524

035524

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу высокоточного определения количества неразличимых невооруженным глазом частиц, например микрочастиц и/или наночастиц, с помощью микроскопии, например сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Уровень техники и сущность изобретения

Точный подсчет количества неразличимых невооруженным глазом частиц, например вирусных частиц, вирусоподобных частиц, неорганических и полимерных гранул и других наночастиц и микрочастиц в жидких образцах, имеет важное значение во множестве процессов. Например, модифицированные вирусные векторы обычно используются в генно-терапевтических применениях. Количество активных векторов на мл (инфекционный титр образца вируса) можно определять с помощью стандартных оценок инфицированности. Однако с помощью имеющихся в настоящее время способов невозможно точно определить общее количество частиц в образце, включая неинфекционные частицы. Отношение инфекционных к неинфекционным частицам предоставляет ценную информацию о качестве и эффективности конечного генно-терапевтического продукта и предшествующих процессов разработки.

Одним из основных ограничений доступных в настоящее время способов, например количественной проточной цитометрии (QFCM), является то, что интересующие наночастицы обнаруживаются не напрямую. Вместо этого количественно оценивают число связанных зондов к популяции наночастиц. Поскольку число зондов, связывающихся с одной наночастицей, меняется, точность обычных непрямых способов обычно является низкой и зависит от сродства между образцом и зондом. Способ, в котором интересующие наночастицы могут быть обнаружены непосредственно, должен преодолеть это ограничение. Кроме того, если бы указанный способ позволял визуализировать частицы с достаточным разрешением, можно было бы идентифицировать и, таким образом непосредственно подсчитать отдельные частицы на основании их размера и морфологии. Даже частицы внутри кластеров могут быть подсчитаны и оценены. Это невозможно с помощью доступных в настоящее время способов на основе сродства или светорассеяния.

Новый высокоточный прямой способ для частиц согласно настоящему изобретению можно применять для подсчета неорганических и органических неразличимых невооруженным глазом частиц, например наночастиц, в жидких образцах. Одной важной особенностью является то, что образцы наносят на четко определенный и измеримый отпечаток. Еще одной важной особенностью является то, что образцы распределены более равномерно, чем это было возможно ранее, что снижает необходимость пробоотбора и теперь можно проводить анализ с таким разрешением, при котором отдельные частицы могут быть легко идентифицированы. Неразличимые невооруженным глазом частицы непосредственно обнаруживают без необходимости использования сигнальных зондов и их можно визуализировать на обычных двумерных изображениях. Способ определения количества частиц SEM (pqSEM) согласно настоящему изобретению предпочтительно основан на фильтрации в условиях низкого вакуума, сканирующей электронной микроскопии (SEM) или других методиках электронной микроскопии и анализа изображений. Настоящее изобретение можно использовать с или без внутренними стандартами, примером которых являются, охарактеризованные Национальным институтом стандартов и технологий (NIST), характеризующий полистироловые гранулы.

Настоящее изобретение обеспечивает решение для вышеописанных проблем. Конкретнее, данный способ предназначен для определения количества неразличимых невооруженным глазом частиц. Обеспечена фильтрующая мембрана, имеющая множество пор, определенных в ней. Фильтрующая мембрана находится в функциональном взаимодействии с вакуумной камерой. Поры загерметизированы герметизирующим материалом. Каплю образца, содержащего жидкость с неразличимыми невооруженным глазом частицами, наносят на фильтрующую мембрану. Жидкость растворяет герметизирующий материал в порах, расположенных непосредственно под каплей образца. Жидкость течет сквозь поры, в которых герметизирующий материал был растворен, а неразличимые невооруженным глазом частицы остаются наверху фильтрующей мембраны. Фильтрующую мембрану с частицами, расположенными на ней, переносят под электронный микроскоп и подсчитывают на изображениях, полученных на микроскопе.

Данный способ также включает этап предварительной установки узла фильтра, содержащего фильтрующую мембрану, на опору SEM.

Данный способ также включает этап размещения монтажной ленты на опоре SEM.

Данный способ также включает этап обеспечения опоры SEM, содержащей удлиненный канал, определенный в ней, использования инжектора, содержащего каплю образца, и выравнивания инжектора наверху удлиненного канала до нанесения капли образца на фильтрующую мембрану.

Данный способ также включает этап присоединения опоры SEM к вакуумной камере, подключенной к источнику вакуума, и подвергания фильтрующей мембраны воздействию всасывающей силы через удлиненный канал.

Данный способ также включает этап размещения капли образца на фильтрующей мембране без касания каплей образца любого внешнего края фильтрующей мембраны.

Данный способ также включает этап растворения жидкостью герметизирующего материала только в порах, находящихся непосредственно под каплей образца, в то время как соседние поры по сторонам от

капли остаются загерметизированными, поскольку жидкость не контактировала с герметизирующим материалом, расположенным в этих порах.

Данный способ также включает этап образования неразличимыми невооруженным глазом частицами определенного и измеримого отпечатка на фильтрующей мембране и получения серии изображений частиц от внешней периферии отпечатка к центру отпечатка.

Данный способ также включает этап подсчета частиц на электронно-микроскопических изображениях, полученных с разрешением, при котором частицы отчетливо видны, вручную или автоматически с использованием способов анализа изображения.

Данный способ также включает этап оценки общей площади отпечатка на фильтрующей мембране на микроскопических изображениях, охватывающих весь отпечаток (одном изображении с малым увеличением, охватывающем весь отпечаток, или нескольких частичных изображениях отпечатка с более высоким увеличением, соединенных друг с другом).

Данный способ также включает этап вычисления общего количества частиц в образце на основе площади всего отпечатка и количества частиц на единицу площади, полученных из изображения с достаточно высоким разрешением, позволяющим отчетливо видеть одиночные частицы.

Данный способ также включает этап возможной компенсации неравномерного радиального распределения частиц на отпечатке, информацию о котором получают путем получения серии изображений от периферии отпечатка через центр отпечатка при достаточно большом увеличении, позволяющем отчетливо видеть отдельные частицы.

Данный способ также включает этап вычисления концентрации частиц в растворе, используя оценку общего количества частиц на отпечатке, нанесенного объема и разбавления жидкого образца.

Данный способ также включает этап использования разбавителя жидкости для растворения герметизирующего материала в порах, расположенных непосредственно под каплей образца. Препарат должен быть в жидкой форме, а разбавитель должен быть совместим с разбавителем и обладать свойством эффективного растворения используемого герметизирующего материала.

Данный способ также включает этап использования глицина в качестве герметизирующего материала. Другие герметизирующие материалы, которые можно использовать, включают герметизирующие материалы на основе трегалозы/сахарозы, но не ограничиваются ими.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематический вид вакуумного устройства согласно настоящему изобретению сбоку в вертикальной проекции.

Фиг. 2 представляет собой схематический вид узла фильтра сбоку в разрезе.

Фиг. 3А представляет собой необработанное SEM-изображение полистироловых гранул, прилипших к полиэфирсульфоновому фильтру, с большим увеличением.

Фиг. 3В представляет собой SEM-изображение обнаруженных и подсчитанных полистироловых гранул, прилипших к полиэфирсульфоновому фильтру, с большим увеличением.

Фиг. 3С представляет собой увеличенное SEM-изображения, приведенное выше на фиг. 3В.

Фиг. 4А представляет собой схематический вид изображения края отпечатка капли, полученного с помощью SEM (первичные электроны) с большим увеличением.

Фиг. 4В представляет собой схематический вид изображения края отпечатка капли, полученного с помощью SEM (первичные электроны) с малым увеличением.

Фиг. 5А представляет собой схематический вид сбоку в разрезе мембраны согласно настоящему изобретению с открытыми порами.

Фиг. 5В представляет собой схематический вид сбоку в разрезе мембраны согласно настоящему изобретению, показанной на фиг. 5А, но с загерметизированными порами.

Фиг. 5С представляет собой схематический вид сбоку в разрезе мембраны согласно настоящему изобретению, показанной на фиг. 5В, с нанесенной на нее каплей образца.

Фиг. 5D представляет собой схематический вид сбоку в разрезе мембраны, показанной на фиг. 5С, с каплей, абсорбированной в мембрану согласно настоящему изобретению; и

Фиг. 6 представляет собой увеличенное изображение фиг. 5D.

Подробное описание

Способ согласно настоящему изобретению описан со ссылками на фиг. 1-6.

Фиг. 1 представляет собой схематический вид спереди вакуумного узла 100, содержащего вакуумное устройство 102, подсоединенное к вакуумной камере 104 посредством трубопровода 106, расположенного между ними. Трубопровод 106 предпочтительно содержит подходящий клапан, например клапан Люэра 108. Вакуумный манометр 110 находится в функциональном взаимодействии с вакуумной камерой 104 для измерения давления вакуума в ней. Узел фильтра 112 смонтирован посредством монтажного элемента узла фильтра 114 на вершине вакуумной камеры 104. Фильтрующая мембрана 116 расположена на узле фильтра 112. Инжектор 118 расположен над фильтрующей мембраной 116.

Фиг. 2 представляет собой схематический вид узла фильтра 112 в разрезе. Весь процесс анализа согласно настоящему изобретению можно упростить путем предварительной установки фильтрующей мембраны 116 на опору SEM (подложку (stub) из оксида алюминия) 120 вместо осуществления этого

вручную, когда фильтрующая мембрана 116 содержит образец/препарат для анализа и подсчета. Установку можно выполнить путем простого сверления отверстия в подложке для SEM 120. Использование такого устройства минимизирует риск потери препарата или повреждения фильтрующей мембраны 116 во время предыдущей установки, при которой с фильтрующей мембраной 116, содержащей препарат, обращаются вручную во время установки на подложку для SEM 120. Подробности о подготовке фильтрующей мембраны 116 обсуждается ниже. Такие аналитические расходные устройства для *rqSEM* относительно недороги в производстве.

Более конкретно, узел фильтра 112 предпочтительно содержит модифицированную подложку для SEM 120 из оксида алюминия, на которой размещена двусторонняя углеродная монтажная лента 122.

Фильтрующая мембрана 116 с герметизированными порами размещена поверх углеродной монтажной ленты 122. Процесс герметизации фильтрующей мембраны 116 подробно описан ниже, в частности, со ссылкой на фиг. 5-6. Инжектор 118, содержащий анализируемый препарат или образец 124, размещен или спозиционирован над фильтрующей мембраной 116 и используются для нанесения капли образца 126 на фильтрующую мембрану 116. Поскольку подложка 120 герметично присоединена к монтажному элементу узла фильтра 114, который, в свою очередь, смонтирован на вакуумной камере 104, внутри подложки 120 имеет место вакуум, так что вакуум оказывает всасывающую силу на фильтрующую мембрану 116 снизу узла фильтра 112. Это обеспечивается тем, что удлиненная полость или канал 128, определенный внутри подложки 120, находится в сообщении по текучей среде с фильтрующей мембраной 116 и вакуумной камерой 104. Как описано ниже, важно, чтобы инжектор 118 был правильно расположен над фильтрующей мембраной 116, так чтобы, когда капля образца 126 нанесена на фильтрующую мембрану 116, капля образца 126 не соприкасалась с краями фильтрующей мембраны 116 и располагалась непосредственно над расширенной частью полости 129, определенной между каналом 128 и нижней стороной монтажной ленты 122. Каплю 126 предпочтительно помещают на центр или вблизи от центра части полости 129, который совмещен с продольной осью (L), проходящей через канал 128.

Фиг. 3А-3С представляют собой SEM-изображения с большим увеличением полистироловых гранул, прилипших к полиэфирсульфоному фильтру. Фиг. 3А представляет собой необработанное изображение 130, а фиг. 3В представляет собой изображение 132 после обнаружения и подсчета. Фиг. 3С представляет собой вид крупным планом 133 изображения из фиг. 3В и участка 131 на фиг. 3А. На этих типичных изображениях обнаружено 77 частиц в поле зрения размером 131,47 мкм². Это соответствует приблизительно 0,59 частиц на мкм². Вид 133 показывает пронумерованные частицы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 28, 29, 30.

На фиг. 4А, 4В показан край отпечатка капли, изображение которого получено с помощью SEM (первичные электроны). На фиг. 4А показано изображение 134 при большом увеличении, а на фиг. 4В показано изображение отпечатка 136 при малом увеличении. Местоположение изображения 134 с большим увеличением, показанного на фиг. 4А, отмечено белой стрелкой на фиг. 4В, т.е. на изображении 134 показана часть всего изображения отпечатка 136. Край капли четко определен пренебрежимо малым количеством частиц вне отпечатка. При малом увеличении весь отпечаток 136 капли визуализирован, и можно точно измерить площадь отпечатка. В данном примере измеренная площадь отпечатка (A_{total}) составила 8,436 мм².

Фиг. 5А-5Д представляют собой виды фильтрующей мембраны 116 в разрезе сбоку и описывают процесс герметизации фильтрующей мембраны 116 и последующего растворения герметизирующего материала. На фиг. 5А фильтрующая мембрана 116 содержит открытые поры 138, определенные между удлиненными элементами решетки 139 фильтрующей мембраны 116 и проходящие через фильтрующую мембрану 116. На фиг. 5В поры 138 заполнены герметизирующим материалом 140. На фиг. 5С каплю 126 образца 124, который является жидкостью 144, содержащей анализируемые частицы 142, нанесена на фильтрующую мембрану 116. Капля 126 предпочтительно нанесена на фильтрующую мембрану 116 с помощью инжектора 118, описанного выше. При контакте капли 126 с герметизирующим материалом 140 жидкость 144 растворяет герметизирующий материал 140, располагающийся непосредственно под каплей 126 так, что жидкость 144 абсорбируется и проходит сквозь поры 138 только под каплей 126. Поскольку размер подсчитываемых частиц 142 имеет размер, больший, чем поры 138 мембраны, частицы 142 оседают на вершине фильтрующей мембраны 116, в то время как жидкость и любые загрязнители 144 меньшего размера абсорбируются или втекают в поры 138 под каплей 126 по мере растворения герметизирующего материала 140 в указанных порах и подвергания жидкости 144 всасыванию со стороны удлиненной камеры 128 вакуумной камеры 104 под фильтрующей мембраной 116.

Фиг. 6 представляет собой увеличенный вид фильтрующей мембраны 116 с фиг. 5Д. Неразличимые невооруженным глазом частицы 142 остаются на фильтрующей мембране 116; размер частиц 142 превышает размер пор 138а-138j, поэтому они не проходят сквозь поры, даже если поры открыты и подвержены всасыванию из вакуумной камеры 104 (показано на фиг. 1). Поры 138а-d и 138i-j по-прежнему заполнены герметизирующим материалом 140, так как они не были растворены жидкостью 144, поскольку они не контактировали с жидкостью 144 капли образца 126 (см. фиг. 5С). Более конкретно, разбавитель, например, подходящий буфер, в жидкости 144, растворяет герметизирующий материал 140. Как указывалось выше, разбавитель должен быть совместим с препаратом, т.е. оказывать минимальное влияние на

морфологию и состояние агрегации препарата. Разбавитель также должен быть способен растворять герметизирующий материал. Это позволяет гарантировать, что вакуум поддерживается только в области отпечатка, и что таким образом установка не теряет вакуум за счет "открытия" пор вне интересующей области. По мере растворения жидкостью 144 герметизирующего материала 140, расположенного в порах 138e-138h, жидкость 144 заполняет поры 138e-138h, замещая герметизирующий материал 140. Это облегчает подсчет частиц 142, поскольку частицы 142 лежат на верху сегмента фильтра 116 и равномерно распределены по фильтрующей мембране 116.

Пример.

Ниже приведен пояснительный пример способа подготовки фильтрующей мембраны 116 согласно настоящему изобретению.

1. Образец, содержащий неразличимые невооруженным глазом частицы 142, например микрочастицы и/или наночастицы, получен с целью подсчета путем последовательного разбавления образца подходящим разбавителем (обычно водой, физиологическим раствором с фосфатным буфером, HEPES-буфером, трис-буфером или гистидиновым буфером) в зависимости от буферных условий в каждом конкретном образце.

2. Для стабилизации и сохранения структуры частиц, а в некоторых образцах - для предотвращения нежелательной агрегации частиц 142, в разбавленный раствор образца 124, также содержащий неразличимые невооруженным глазом частицы 142, могут быть введены фиксирующий реагент (обычно глутаральдегид или формальдегид) и/или стабилизирующий агент (обычно сахароза или глицерин). Фиксирующие/стабилизирующие реагенты и разбавитель соответствуют жидкости 144 и вместе с частицами 142 образуют образец/препарат 124 и каплю образца 126. Фиксирующие/стабилизирующие агенты используют для предотвращения разрушения или повреждения частиц 142 при манипулировании и от нежелательного слипания друг с другом, что затрудняет последующий подсчет частиц 142.

3. Узел фильтра 112, состоящий из пористой фильтрующей мембраны 116 (обычно изготовленной из полиэфирсульфона или поликарбоната) с порами 138, имеющими определенный размер (обычно от 0 до 15 нм) и открывающейся кассеты фильтра, изготовленной из пластика или эквивалентного материала, используется для отделения частиц 142 от жидкости. Подходящий узел фильтра 112 лучше всего показан на фиг. 2. В общем случае фильтры покупают общей массой как одноразовые фильтры, и поэтому должны быть установлены на что-то. Некоторые поставщики также продают держатели фильтра, и эти устройства исходно выполнены для присоединения к шприцу и продавливания жидкости и, таким образом, не всасывают жидкость с использованием вакуума. Поэтому необходимо установить фильтр в узел фильтра, чтобы гарантировать сохранность вакуума. После некоторых экспериментов неожиданно выяснилось, что фильтр можно установить непосредственно на опору SEM, что экономит время и позволяет избежать критических этапов ручного манипулирования фильтрами, содержащими образец. Понятно, что такой узел может быть недорог при изготовлении и продаваться в качестве расходного материала для SEM.

4. Узел фильтра 112 установлен на верху пластиковой вакуумной камеры 104, которая в свою очередь присоединена к вакуумному устройству 102 через трубопровод 106.

5. Вакуум в вакуумной камере 104 контролируется с помощью трехходового клапана Люэра 108 и отслеживается с использованием вакуумного манометра 110. Также можно ввести автоматическую систему с использованием магнитных клапанов, управляемых электронной системой мониторинга.

6. Поры 138 в фильтрующей мембране 116 предпочтительно загерметизированы герметизирующим материалом 140, например глицином (или эквивалентным), до нанесения образца капли образца 126, как наилучшим образом показано на фиг. 5B и 5C. Удивительно и неожиданно было обнаружено, что за счет применения герметизирующего материала 140 в фильтрующей мембране 116 частицы 142 внутри капли 126 были распределены более равномерно (до удаления жидкости 144 капли 126), а необходимость в использовании вакуума большой силы для снижения риска неравномерного распределения капли на фильтрующей мембране отсутствовала. Следует отметить, что распределение частиц не обязательно должно быть одинаковым на внешней периферии и в центре. Картину распределения частиц можно определить путем сканирования отпечатка 134/136 (см. фиг. 4A, 4B) образца частиц, помещенного на фильтрующую мембрану, от внешней периферии или внешнего края 137 отпечатка 136 к центру 139 отпечатка образца частиц. Если отсканированная часть образца частиц демонстрирует определенную картину распределения частиц, можно достоверно предположить, что эта же картина распределения частиц имеет место на всем отпечатке образца частиц 136 круглой формы, отчасти потому, что частицам давалось время осесть до растворения герметизирующего материала 140 жидкостью капли 126. Поскольку вначале, капля 126 нанесена на загерметизированную фильтрующую мембрану 116, внешний край 137 отпечатка 136 капли 126 становится относительно различимым или резким, что важно для определения места, где начать подсчет и сканирование к центру 139 образца частиц круглой формы или отпечатка 136, нанесенного на растворенную фильтрующую мембрану 116. Неожиданно выяснилось, что преимущества относительно равномерного распределения частиц на фильтрующей мембране перевешивают недостатки необходимости удаления герметизирующего материала для обеспечения протекания жидкости капли через фильтрующую мембрану перед началом подсчета частиц. Любая неравномерная или нечеткая периферия отпечат-

ка капли на фильтрующей мембране затрудняет определение ее отпечатка и областей, подлежащих анализу с целью подсчета всех частиц в капле. Посредством нанесения капли образца 126 на фильтрующую мембрану 116 со всеми порами 138, загерметизированными герметизирующим материалом 140, частицы 142 равномерно распределяются внутри капли 126 по мере растекания капли 126 по герметизированной верхней поверхности фильтрующей мембраны 116. Требование растворения герметизирующего материала 140 вначале замедляет поток жидкости 144 через поры 138. Без использования герметизирующего материала 140 жидкость 144 капли 126 немедленно бы начинала течь через поры 138 и, поскольку капля 126 является наиболее толстой в центре и более тонкой на периферии, большее количество частиц 142 стремится разместиться в центре капли. Это часто приводит к неравномерному распределению частиц по фильтрующей мембране и внешний край отпечатка образца частиц не является четким. Следует отметить, что в центре капли не всегда находится большее количество частиц, поскольку некоторые препараты могут характеризоваться тенденцией концентрироваться в направлении границы раздела воздух-вода. Как правило, трудно точно предвидеть поведение и распределение различных образцов.

Поскольку весь отпечаток 136 капли образца 126 используется для расчета концентрации частиц 142, капля 126 не должна касаться внутреннего края держателя фильтра фильтрующей мембраны 116. Таким образом важно, чтобы только определенная часть фильтрующей мембраны 116 была покрыта каплей образца 126. Это необходимо, чтобы гарантировать, что все частицы 142 в капле 126 пронумерованы или подсчитаны. Также положение капли образца 126 следует совместить с полостью 129 и каналом 128, определенным внутри подложки 120. Без предобработки фильтрующей мембраны 116 герметизирующим материалом 140 окружающие поры фильтра, т.е. поры 138a-138d и 138i-138j на фиг. 6, остаются открытыми, и вокруг капли 126 и через фильтрующую мембрану 116 течет воздух, так что капля образца 126 не абсорбируется и не фильтруется достаточно быстро для получения хорошего распределения образца частиц 142. Другими словами, использование герметизирующего материала 140 имеет преимущество, заключающееся в создании более различимой внешней периферии 137 отпечатка 136 капли 126, когда жидкость начинает растворять герметизирующий материал 140, расположенный под каплей 126. Без использования герметизирующего материала 140 частицам 142 не хватает времени для равномерного распределения внутри капли 126, поскольку жидкость 144 немедленно начинает течь через поры 138, не давая частицам 142 времени осесть и равномерно распределиться внутри капли 126. Таким образом, одним очень важным свойством герметизирующего материала 140 является создание состояния вакуума, так что формируется определенный отпечаток препарата. Более конкретно, без обработки герметизирующим материалом 140 согласно настоящему изобретению капля 126 нежелательно высыхает за счет диффузии и испарения. Это приводит к весьма неравномерному распределению частиц из-за эффектов высыхания. Было неожиданно обнаружено, что нежелательное испарение может вызывать осмотические эффекты, потенциально вызывающие разрушение частиц и образование кристаллов из-за увеличения концентрации соли в оставшейся капле. Дополнительно это затрудняет обнаружение и подсчет частиц из-за разрушенных частиц и частиц, скрытых осадками солей. В настоящем изобретении при нанесении капли образца 126 на загерметизированную фильтрующую мембрану 116 жидкость 144 в капле образца 126 медленно растворяет герметизирующий материал 140 для открытия пор 138e-138h, расположенных под каплей 126. Затем жидкость 144 быстро всасывается через поры 138e-138h фильтрующей мембраны 116 за счет вакуума, приводя к хорошему распределению частиц образца 142 по верхней поверхности фильтрующей мембраны 116.

7. Перед нанесением капли образца 126 на фильтрующую мембрану 116 активируется вакуумное устройство 102 и снижается давление в вакуумной камере 104, чтобы создать всасывание на фильтрующей мембране 116. Вакуум в вакуумной камере 104 гарантирует, что жидкость 144 капли 126 абсорбируется равномерно на фильтрующей мембране 116. Сочетание использования герметизирующего материала и вакуума приводит к равномерному распределению частиц 142 по отпечатку 136 на фильтрующей мембране 116.

8. Капля образца 126 подходящего объема (обычно 5 мкл) наносится на пористую герметизированную фильтрующую мембрану 116. Как указывалось выше, важно, чтобы диаметр частиц 142 был больше диаметра пор 138 фильтрующей мембраны 116 и чтобы капля 126 не касалась краев монтажного элемента фильтра. Можно нанести объем более 5 мкл с помощью инъекционной системы, где любое из нескольких капель или больших объемом наносится в то же положение на фильтрующей мембране 116. В общем случае использование больших объемов минимизирует ошибку пробоотбора и позволяет анализировать менее концентрированные образцы.

9. Капля образца 126 обычно абсорбируется фильтрующей мембраной 116 обычно в течение 60 с под вакуумным давлением, обеспечиваемым вакуумной камерой 104. Точные значения давления можно корректировать частично в зависимости от размера пор, типа, объема, чистоты и вязкости образца.

10. После абсорбции фильтрующую мембрану 116 можно снять с узла фильтра 112, установленного на подложке для SEM 120 из оксида алюминия (обычно с использованием адгезива и проводящей углеродной ленты 122).

11. Затем фильтрующая мембрана 116 с помещенными на нее связанными частицами 142 может быть покрыта напылением, например, тонкой пленкой из углерода (обычно толщиной 20 нм) с помощью

испарителя углерода при подходящем давлении в камере, обычно 1×10^{-5} мбар. Напыленное покрытие улучшает проводимость фильтрующей мембраны 116, повышает отношение сигнал-шум фильтрующей мембраны 116 и снижает повреждение пучком электронов и зарядовые эффекты. Эту методику часто необходимо использовать для получения изображения фильтрующего материала с использованием SEM. Использование углеродного покрытия может быть нетрадиционно, однако оно обеспечивает повышенное разрешение SEM-изображения по сравнению с металлическим напылением с более крупным размером зерна.

12. Фильтрующую мембрану 116 можно перенести на SEM и сигнал от рассеянных первичных электронов (с использованием внутривалинзового детектора) или вторичных электронов (например, с помощью SE2-детектора) записывают как при малом (для охвата всего отпечатка), так и при большом увеличении (обычно от 10000 до 30000) для подсчета. Если используется эталонный стандарт с отличающейся сигнатурой вторичных электронов (хотя это не является обязательным для определения концентрации частиц), интересующие частицы можно отличить от эталонных частиц путем объединения информации об интенсивности с различных детекторов (например, внутривалинзового и SE2-детектора).

13. Изображения с малым увеличением 136 (см. фиг. 4B) используют для определения размера отпечатка капли и общего распределения препарата, в то время как изображения с большим увеличением используют для подсчета частиц.

14. Изображения с большим увеличением, например, изображение 134, получают по всему отпечатку образца, начиная от края 137 через центр 139 и к противоположному краю капли для минимизации любых влияний различия в распределении частиц по отпечатку капли.

15. На основании изображений с малым увеличением, например, изображения 136, рассчитывают площадь отпечатка образца (A_{total}) путем очерчивания края отпечатка. Охваченные пиксели подсчитывают и подсчитанное количество умножают на размер пикселя.

16. На изображениях с большим увеличением обнаруживают и подсчитывают частицы 142. Эту процедуру можно выполнить посредством ручной маркировки или автоматической маркировки с помощью подходящего программного обеспечения, например, проприетарного программного обеспечения Analyzer компании Vironova или любого другого подходящего программного обеспечения для анализа изображений. На основании набора данных изображений рассчитывают среднее количество частиц на единицу площади (n/A_{FOV}).

17. Количество частиц на мл в образце частиц предпочтительно рассчитывают с использованием следующей формулы:

$$C = A_{total} \times \frac{n}{A_{FOV}} \times df \times \frac{1000 \text{ мкл}}{V \text{ мкл}}$$

где C - концентрация частиц, df - коэффициент разбавления, а V - нанесенный объем образца.

Кроме того, можно использовать формулу, учитывающую, что распределение частиц может меняться при сканировании образца частиц от периферии к центру.

Резюмируя, подход количественной сканирующей электронной микроскопии частиц (pqSEM) согласно настоящему изобретению представляет собой высокоточную методику прямого обнаружения и подсчета частиц. Важной особенностью настоящего изобретения является то, что прямое обнаружение не зависит от сродства между зондом и препаратом, как происходит во многих существующих общепринятых способах. Можно контролировать все параметры, например, коэффициент разбавления, наносимый объем, отпечаток капли и непосредственно измерять количество частиц на единицу площади при минимизации ошибок, вызванных аппроксимациями и допущениями. Кроме того, разрешающая способность pqSEM позволяет обнаруживать отдельные неразличимые невооруженным глазом частицы в кластерах и две популяции частиц с различными размерами или другими морфологическими особенностями могут быть подсчитаны в одном и том же образце. Частицы и отпечаток на высококонтрастных изображениях, полученных с помощью методики pqSEM согласно настоящему изобретению, могут быть легко обнаружены с помощью автоматизированного анализа изображений. Это обеспечивает средства для быстрого сбора больших наборов данных и получения надежных статистических результатов.

Хотя настоящее изобретение описано в соответствии с предпочтительными композициями и вариантами воплощения, следует понимать, что в нем могут быть сделаны некоторые замены и изменения без отхода от сущности и объема следующих пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения количества неразличимых невооруженным глазом частиц в жидком образце с использованием фильтрующей мембраны (116), содержащей множество пор (138), определенных в ней, поры имеют размер, меньший размера неразличимых невооруженным глазом частиц (142), причем фильтрующая мембрана (116) находится в функциональном взаимодействии с вакуумной камерой (104), включающий

герметизацию пор фильтрующей мембраны (116) герметизирующим материалом (140), растворимым жидкостью (144) капли образца (126);

нанесение капли образца (126), содержащего жидкость (144) и неразличимые невооруженным глазом частицы (142), на фильтрующую мембрану (116) без касания каплей образца (126) любого внешнего края фильтрующей мембраны (116); и

подсчет неразличимых невооруженным глазом частиц (142) с использованием электронной микроскопии после растворения жидкостью (144) герметизирующего материала в порах (138e-138h), расположенных под каплей образца (126), и истечения жидкости с поверхности фильтрующей мембраны (116).

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает этап предварительной установки узла фильтра (112), содержащего фильтрующую мембрану (116), на опору сканирующего электронного микроскопа (120).

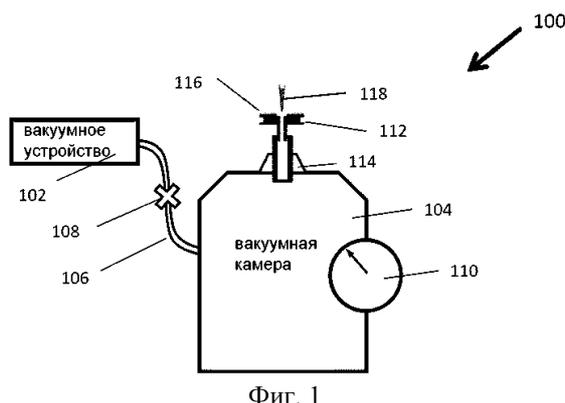
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что дополнительно включает этап размещения монтажной ленты (122) на опоре сканирующего электронного микроскопа (120).

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что опора сканирующего электронного микроскопа (120) содержит удлиненный канал (128) и инжектор (118), расположенный над фильтрующей мембраной и содержащий каплю образца (126), причем инжектор (118) установлен над удлиненным каналом (128).

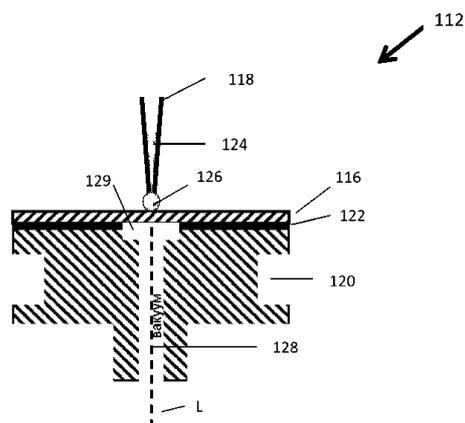
5. Способ по п.2, отличающийся тем, что опора сканирующего электронного микроскопа (120) содержит удлиненный канал (128), присоединенный к вакуумной камере (104), соединенной с источником вакуума (102), и что дополнительно включает этап воздействия всасывающей силы на фильтрующую мембрану (116) посредством удлиненного канала (128).

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает этап образования неразличимыми невооруженным глазом частицами (142) отпечатка (136) на фильтрующей мембране (116) и сканирования неразличимых невооруженным глазом частиц (142) от внешней периферии (137) отпечатка (136) к центру (139) отпечатка (136).

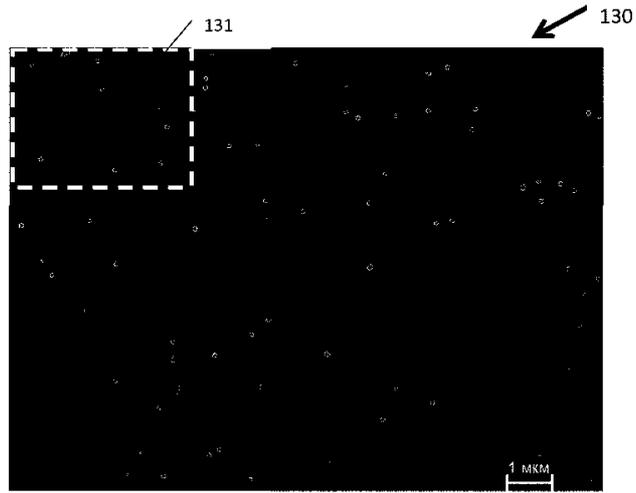
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве герметизирующего материала (140) используется глицин.



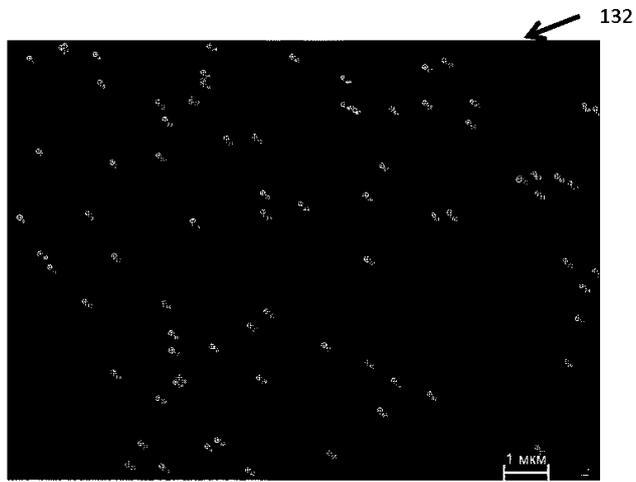
Фиг. 1



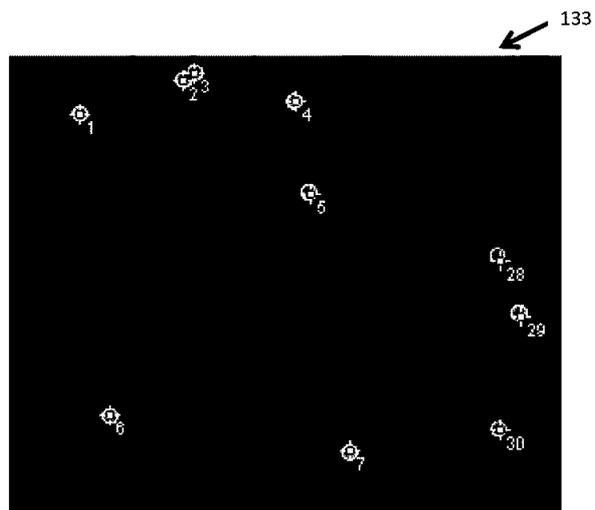
Фиг. 2



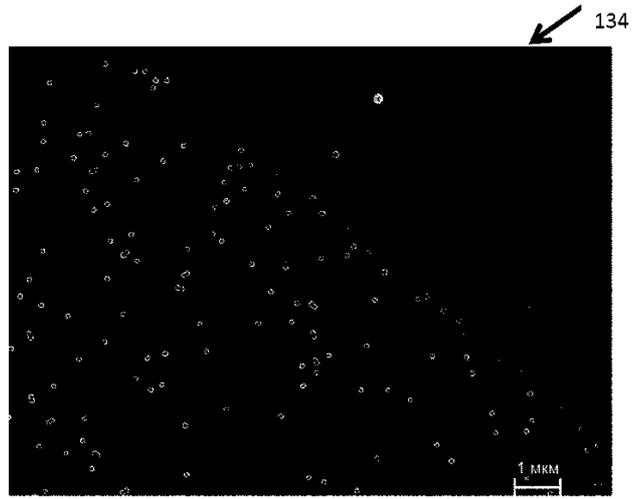
Фиг. 3А



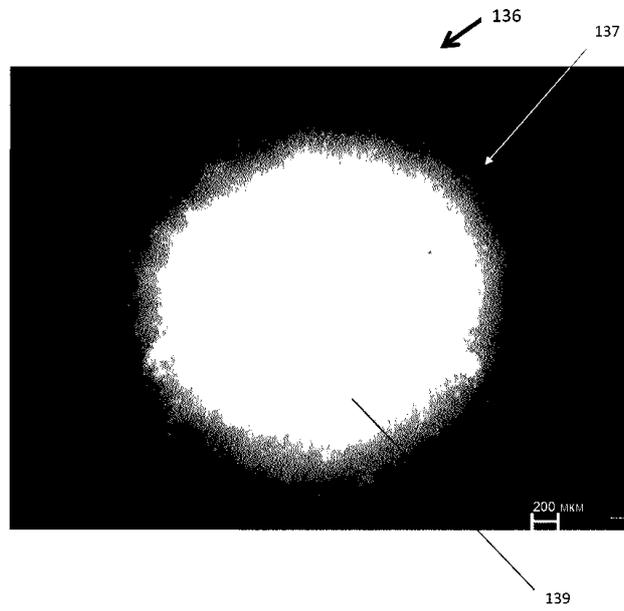
Фиг. 3В



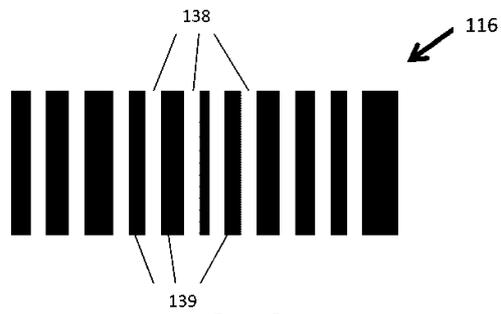
Фиг. 3С



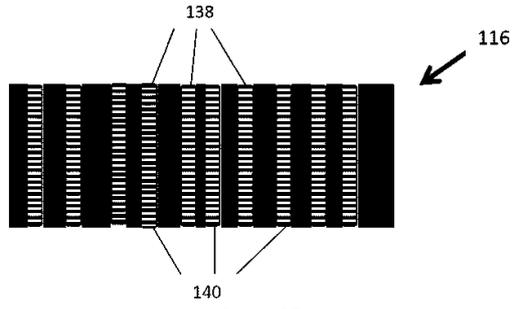
Фиг. 4А



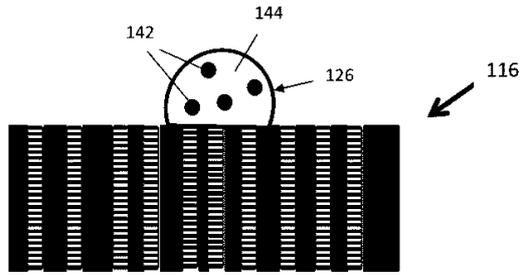
Фиг. 4В



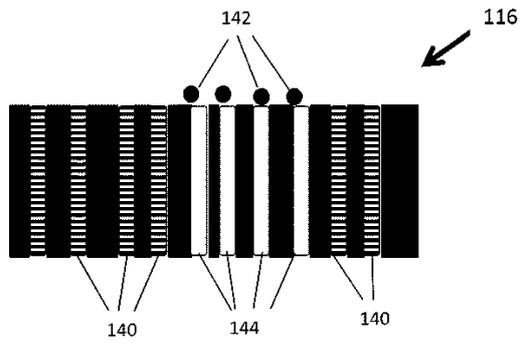
Фиг. 5А



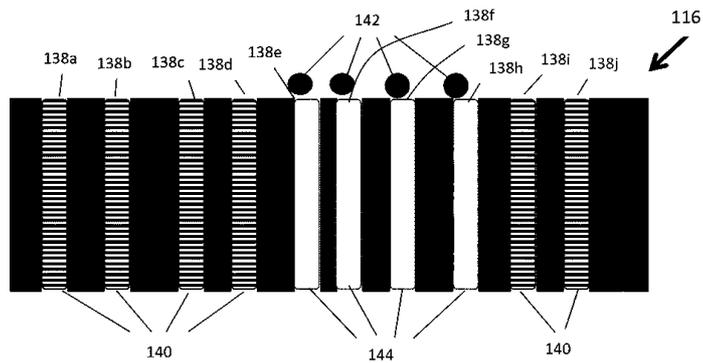
Фиг. 5B



Фиг. 5C



Фиг. 5D



Фиг. 6

