

УДК 543.422: 543.545

© Б. Г. Беленький, Ю. В. Белов, А. В. Савушкин, В. Л. Суханов

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР ДЛЯ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И КАПИЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ. ВОЗМОЖНОСТЬ АБСОЛЮТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ РАСТВОРА В КРУГЛОМ КАПИЛЛЯРЕ

Обсуждаются оптимальные технические решения при создании СФ-детектора. Предложена методика измерения абсолютных значений оптической плотности при круглых капиллярах малого диаметра. Для этого введены понятия коэффициентов заполнения светового пучка пробой и приведены формулы для корректировки экспериментальных результатов. Приведены оценочный расчет и рекомендации для определения этих коэффициентов по результатам экспериментов при различных вариантах настройки оптической системы.

### ВВЕДЕНИЕ

Анализ современного состояния высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ) и перспектив его применения для важнейших аналитических задач представлен в ряде обзорных и методических работ [1–6]. Настоящая статья посвящена усовершенствованию спектрофотометрического (СФ) детектора прибора ВЭКЭ, разработанного в Институте аналитического приборостроения РАН, и методики его использования.

Создание СФ-детектора для капиллярных сепарационных методов — ВЭКЭ и капиллярной жидкостной хроматографии (КЖХ,  $\mu$ -ВЭЖХ) — является серьезной технической проблемой. Здесь приходится решать по крайней мере шесть сложных научно-технических задач:

1) максимально увеличить интенсивность излучения в измерительном (с пробой) и сравнительном каналах;

2) обеспечить их высокоточное сравнение (в диапазоне линейности  $\geq 10^6$ );

3) надежно монохроматизировать излучение в диапазоне  $\lambda = 200 \div 700$  нм;

4) минимизировать габариты детектора и число оптических деталей, резко уменьшить габариты электронной части прибора и его энергопотребление, снизить цену детектора;

5) использовать световые зонды диаметром  $\varnothing = 50$  мкм (для ВЭКЭ) и  $\varnothing = 500$  мкм (для  $\mu$ -ВЭЖХ), снизив при этом флуктуационный шум и дрейф: для ВЭКЭ до  $\Delta A = 3 \cdot 10^{-5}$  е.о.п.,  $\Delta A/\text{ч} = 10^{-4}$  е.о.п. и для  $\mu$ -ВЭЖХ до  $\Delta A = 10^{-5}$  е.о.п.,  $\Delta A/\text{ч} \leq 10^{-4}$  е.о.п. при ширине щели монохроматора  $\Delta \lambda \leq 15$  нм;

6) обеспечить возможность абсолютного измерения оптической плотности в круглом капилляре.

Решению задач 1, 3, 4, 5 и 6 способствовали оптимизация конструкции прибора, использование светосильного монохроматора, задач 2 и 5 — применение принципа сравнения световых потоков на основе специально разработанных интегрирующих фотоприемных устройств, задачи 4 — разработка специальных микросхем и специализированного микропроцессорного контроллера, задачи 6 — введение нового понятия "коэффициента заполнения светового потока пробой" с соответствующей корректировкой результатов измерений.

### ИСТОЧНИКИ ИЗЛУЧЕНИЯ

В качестве источников излучения выбраны дуговая дейтериевая лампа типа ДДС-30 и кварцевая галогенная лампа накаливания КГМ-6.3-15. Световой поток этих ламп переключается на монохроматор с помощью зеркала, перемещаемого пневматическим устройством. Для этих ламп разработан комбинированный источник питания, обеспечивающий форсированный режим запуска и продолжительную работу при нестабильности накальных напряжений и анодного тока не более 0,01% за 1 час. При этом решена проблема автономного питания лампы с ограничением энергопотребления и тепловыделения, без высокочастотных наводок в фотоприемном устройстве (ФПУ).

### МОНОХРОМАТОР

Решалась задача создания недорогой светосильной зеркальной оптической системы. Для этого:

— в сравнительном канале используется малая часть (не более нескольких процентов) полного излучения лампы;

— основное излучение используется в измерительном канале;

— применен созданный светосильный монохроматор, обеспечивающий универсальную возможность фотометрического детектирования в диапазоне  $\lambda = 200 \div 700$  нм при резком уменьшении постороннего света в измерительном канале до величины менее 1%.

В монохроматоре использована оптическая система Монка — Джилисона (плоская решетка в сходящемся пучке) с относительным отверстием монохроматора 1:1. Монохроматор включает следующие оптические элементы: 2 зеркала (плоское — светоделитель и вогнутое) и плоскую дифракционную решетку (180 штрихов / мм). Уменьшение изображения источника излучения в 2.5 раза определяет выходное относительное отверстие монохроматора  $\approx 1:1$  (что невозможно при вогнутой решетке). Изображение источника излучения в горизонтальной плоскости выходной щели монохроматора составляет примерно 0.15 мм, а при выделяемом интервале длин волн  $\Delta\lambda \approx 15$  нм дисперсия монохроматора  $\Delta\lambda/d$  составляет 100 нм / мм.

### ФОТОПРИЕМНЫЕ УСТРОЙСТВА (ФПУ)

Фотоприемные устройства выполнены в микросхемном исполнении в виде светостойких к ультрафиолетовому излучению кремниевых фотодиодов (чувствительность не менее 0.1 А / Вт) и преобразователей фототоков во временные интервалы с накоплением оптического сигнала и обеспечивают пороговую чувствительность до  $I = 10^{-15}$  А при широком динамическом диапазоне (более  $10^6$ ) линейного преобразования входного сигнала в выходную величину. ФПУ согласованы по размерам светового пятна и коэффициенту преобразования в измерительном и сравнительном каналах.

### МИКРОПРОЦЕССОРНЫЙ КОНТРОЛЛЕР

Микропроцессорный контроллер разработан на элементной базе "Intel" и "Atmel". Контроллер:

1) измеряет начальные и текущие временные интервалы ФПУ измерительного и опорного каналов  $T_n, T_0$  и вычисляет фототоки  $I_n, I_0$ ;

2) вычисляет текущее изменение оптической плотности  $\Delta A = \Delta \lg(I_1/I_2)$ ;

3) выдает значения сигналов  $\Delta A, I_n, I_0$ .

### МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Для идентификации компонентов пробы и выполнения количественных измерений нужно преобразовать результаты вычислений микропроцес-

сорного контроллера по пункту 2 — текущее изменение оптической плотности  $\Delta A$  — в абсолютные значения оптической плотности  $A$  (в единицах оптической плотности на сантиметр). При этом следует учесть особенности метода и конструкции прибора капиллярного электрофореза.

Принцип действия традиционных лабораторных спектрофотометров основан на сравнении световых потоков. В этих приборах используется световой пучок параллельных лучей, падающий перпендикулярно на стенку прямоугольной измерительной ячейки. Границы измерительной ячейки охватывают световой пучок полностью, длина пути всех лучей в жидкости одинакова и равна расстоянию между передней и задней стенками измерительной ячейки.

Детекторы приборов капиллярного электрофореза имеют существенные отличия от традиционных спектрофотометров: внутренний объем капилляра, заполненный жидкостью, имеет круглое сечение малого диаметра  $D$  (порядка 50 мкм) и находится, как это показано в методической работе [6], в сходящемся световом пучке. Этот пучок света имеет две неравные части. Лучи света первой части пучка просвечивают капилляр поперек, но длина пути лучей в жидкой среде капилляра неодинакова: чем луч дальше отстоит от оси к периферии, тем его путь короче, вплоть до нуля. Вторая часть светового пучка проходит мимо внутреннего объема капилляра и не поглощается пробой. Поэтому в круглом капилляре общее затухание светового пучка меньше, чем затухание светового пучка в измерительной ячейке прямоугольного сечения.

Ниже приводится оценка погрешностей измерения, возникающих за счет особенностей прибора капиллярного электрофореза, и рекомендации для корректировки результатов измерений. Для этого предлагается ввести два логарифмических коэффициента заполнения светового луча пробой  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  и использовать их для преобразования численного значения оптической плотности  $A_D$ , полученного при измерении на круглом капилляре с внутренним диаметром  $D$ , в эквивалентное ему значение оптической плотности  $A'_0$  для плоской кюветы с расстоянием между стенками, равным  $D$ , с помощью следующих формул:

$$A'_0 = K_{\lambda 1} A_D \quad (1)$$

или

$$A'_0 = K_{\lambda 1} A_D + K_{\lambda 2} A_D^2. \quad (2)$$

Формула (1) линейна и предлагается для относительно малых значений оптической плотности, а формула (2) — для учета нелинейности детектора с круглым капилляром при больших значениях оптической плотности.

В настоящей работе предлагается методика оценочного расчета коэффициентов заполнения светового луча пробой для различных вариантов настройки оптической системы. Расчет производится путем численного интегрирования по слоям.

На рис. 1, а изображен сходящийся световой пучок. На рис. 1, б сходящийся пучок представлен как суперпозиция параллельных лучей (для круглого капилляра затухание не зависит от угла падения луча, а зависит только от длины пути). На этих рисунках штриховой линией выделены границы 10 слоев в направлении лучей света, сплошной линией обозначены средние лучи в каждом слое. Поглощение каждого среднего луча определяется длиной пути внутри капилляра.

Сравнивая рис. 1, а и рис. 1, б, можно сделать вывод, что средние лучи с одинаковыми номерами имеют почти одинаковую длину, поэтому оценочный расчет, выполненный для параллельных лучей, будет пригоден и для сходящегося пучка.

В рассматриваемых примерах используется относительная ширина светового пучка  $N$ , которая определяется конструкцией и настройкой оптической системы и равна отношению ширины светового пучка  $X$  и диаметра капилляра  $D$ :

$$N = X / D .$$

Далее приведены варианты расчета при величинах  $N \leq 1$  (световой пучок внутри капилляра) и  $N \geq 1$  (капилляр внутри светового пучка).

Длина пути средних лучей внутри капилляра определяется по известной формуле длины хорды  $2A$ :

$$A = (hD - h^2)^{0.5} .$$

Здесь  $h$  — расстояние от середины хорды до стенки капилляра (см. рис.1, в).

В каждом слое вычисляется отношение  $L$  длины среднего луча к диаметру:

$$L = 2A / D = 2[(h / D) - (h / D)^2]^{0.5} .$$

Если обозначить величиной  $A_0$  оптическую плотность образца, приведенную к диаметру (в численных примерах для вычисления коэффициента  $K_{\lambda 1}$  величина  $A_0$  выбрана равной 0.01 е.о.п.), то оптическая плотность вещества (в единицах оптической плотности) в каждом слое  $A_D$  вычисляется следующим образом:

$$A_D = A_0 L .$$

Коэффициент пропускания каждого слоя будет равен

$$\tau = 1/10^{A_D} . \quad (3)$$

Далее вычисляется средний коэффициент пропускания для  $n$  слоев:

$$\tau_{S1} = \sum \tau / n . \quad (4)$$

Эквивалентное ему значение оптической плотности вещества в капилляре равно

$$A_{D1} = \log(1/\tau_{S1}) . \quad (5)$$

Коэффициент заполнения первого порядка вычисляется следующим образом:

$$K_{\lambda 1} = A_0 / A_{D1} . \quad (6)$$

С целью вычисления коэффициента заполнения второго порядка предварительно вычисляются по формулам (3–6) величины  $\tau_{S2}$  и  $A_{D2}$  при  $A_0 = 0.1$  е.о.п. (по отношению к величине  $A_0 = 0.01$  е.о.п. это сравнительно большая величина). Затем вычисляется эквивалентное ему приближенное значение оптической плотности  $A'_0$  с коэффициентом заполнения первого порядка  $K_{\lambda 1}$  по формуле (1):

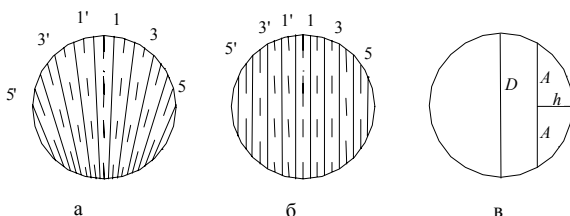
$$A'_0 = K_{\lambda 1} A_{D2} . \quad (7)$$

Вычисляется коэффициент  $K_{\lambda 2}$ :

$$K_{\lambda 2} = (A_0 - A'_0) / A_{D2}^2 . \quad (8)$$

В табл. 1 приведены результаты вычислений коэффициентов  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  для узких световых пучков при  $N = 0.6, 0.8$  и  $1.0$ . Результаты при  $N = 1.0$  свидетельствуют о том, что функция  $A'_0 = f(A_D)$  нелинейна. Подстановка двух коэффициентов в формулу (2) показывает полную компенсацию нелинейности этой функции.

Далее рассмотрены наиболее часто встречающиеся случаи, когда капилляр находится внутри светового пучка. При этом первая часть  $F_1$  светового потока взаимодействует с пробой, а вторая часть  $F_2$  проходит, минуя внутренний объем капилляра.



**Рис. 1.** Деление внутреннего объема капилляра на слои.

а — слои при сходящемся световом пучке,  
б — слои при параллельном световом пучке,  
в — пример вычисления пути светового луча  $2A$  при заданных величинах  $D$  и  $h$

Табл. 1. Результаты вычислений  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$ 

$N$	$K_{\lambda 1}$	$K_{\lambda 2}$
0.6	1.0660	0
0.8	1.1340	0
1.0	1.2510	0.2253
1.5	1.8967	1.2230
2.0	2.5330	3.3016
2.5	3.1690	5.9971
3.0	3.8050	9.8190

Соотношение потоков определяет величину  $N$ :

$$N = X/D = (F_1 + F_2) / F_1. \quad (9)$$

Средний коэффициент пропускания  $\tau_{S1S}$  вычисляется при малой величине  $A_0$ , равной 0.01 е.о.п.:

$$\tau_{S1S} = [\tau_{S1} + (N - 1)] / N. \quad (10)$$

Здесь используется ранее вычисленная величина  $\tau_{S1}$  при  $N=1$ .

Далее вычисляются средняя величина оптической плотности  $A_{D1S}$  и средний коэффициент  $K_{\lambda 1S}$  по формулам (5) и (6).

С целью вычисления среднего коэффициента заполнения второго порядка предварительно вычисляется по формулам (9), (10) и (5) величина  $A_{D2S}$  при  $A_0 = 0.1$ . Затем вычисляются эквивалентное ему приближенное значение оптической плотности  $A'_0$  с коэффициентом заполнения первого порядка  $K_{\lambda 1S}$  по формуле (7) и коэффициент  $K_{\lambda 2S}$  по формуле (8).

Результаты вычислений при разных величинах  $N$  представлены в табл. 1 и на рис. 2.

По результатам вычислений можно сделать вывод о том, что коэффициенты  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  сильно растут при увеличении доли светового потока, проходящей мимо канала капилляра. Эти коэффициенты могут служить одним из критериев качества проектирования и настройки СФ-детектора прибора капиллярного электрофореза.

Коэффициенты  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  можно определить экспериментально. Для этого следует приготовить растворы с малой и большой концентрациями одного из компонентов пробы в буферном растворе, измерить величины их оптических плотностей  $D_{O1}$  и  $D_{O2}$  по отношению к буферному раствору на стандартном лабораторном спектрофотометре и привести к длине, равной диаметру капилляра:

$$A_{O1} = D_{O1} \cdot D \quad \text{и} \quad A_{O2} = D_{O2} \cdot D.$$

Эти же растворы последовательно вводятся как пробы в прибор капиллярного электрофореза, и с помощью СФ-детектора измеряются величины оптической плотности  $A_{D1}$  и  $A_{D2}$  этих растворов относительно буферного раствора. Коэффициенты  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  вычисляются по формулам (1) и (2).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительно были измерены величины оптической плотности раствора бензойной кислоты 0.01 мг/мл в боратном буфере на трех длинах волн на лабораторном спектрофотометре СФ-46 (производства ЛОМО) и расчетным путем приведены к диаметру капилляра 0.08 мм. Эти значения оптической плотности (в е.о.п.) приведены в столбце  $A_{O1}$  табл. 2. В столбце  $A_{O2}$  табл. 2 приведены значения оптической плотности второго раствора с концентрацией бензойной кислоты 0.1 мг/мл.

Значения  $A_{D1}$  и  $A_{D2}$  этих же растворов измерены на разработанном нами спектрофотометре прибора ВЭКЭ "Нанофор-01".

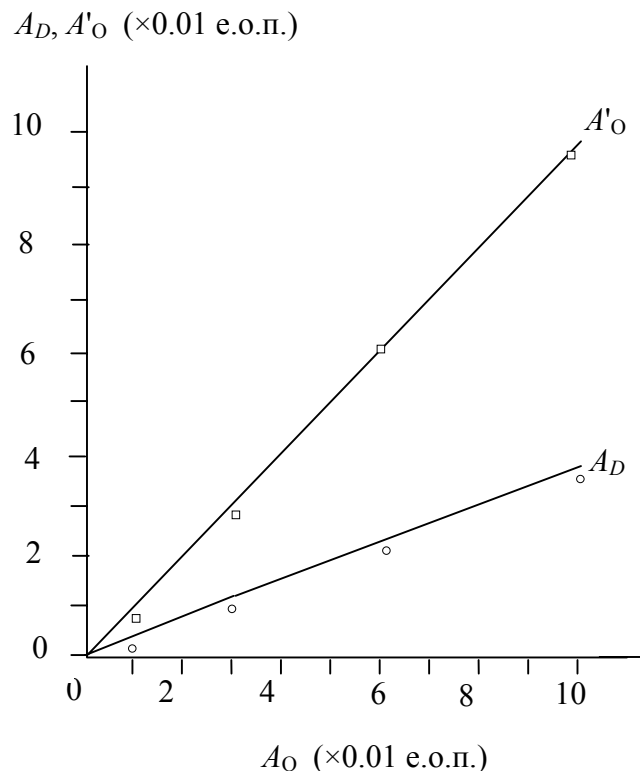


Рис. 2. Графики функций  $A_D = f(A_0)$  и  $A'_O = f(A_0)$ , полученные по расчетным значениям  $A_D$  и  $A'_O$  при  $N=2$

Табл. 2. Экспериментальные результаты

Длина волны нм	$A_{O1}$	$A_{D1}$	$A_{O2}$	$A_{D2}$	$K_{\lambda 1}$
224	0.0200	0.0200	0.200	0.210	1.00
254	0.0043	0.0030	0.043	0.036	1.19
274	0.0025	0.0017	0.025	0.017	1.47

В результате сравнения значений вычисленных коэффициентов  $K_{\lambda 1}$  в табл. 2 и в табл. 1 можно сделать следующие выводы:

— коэффициент  $K_{\lambda 1}$  незначительно возрастает с увеличением длины волны;

— его величина соответствует относительной ширине светового пучка  $N < 1.5$ , т.е. большая часть света проходит через капилляр.

### ВЫВОДЫ

1. Коэффициенты  $K_{\lambda 1}$  и  $K_{\lambda 2}$  позволяют привести результаты измерений величин оптической плотности  $A_D$  при измерении в круглом капилляре к эквивалентным результатам  $A'_O$  для прямоугольной измерительной ячейки.

2. Экспериментальное определение коэффициентов  $K_{\lambda 1}$  позволяет оценить качество настройки оптической системы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленький Б.Г. // Заводская лаборатория. 1993. Т. 59, №12. С.1–13.
2. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е. // Ж. анал. хим. 1996. Т. 51, № 8. С. 817–834.
3. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е. и др. // Анал. хим. 1998. Т. 53, № 3. С. 329–333.
4. Беленький Б.Г., Касалайнен Г.Е., Наследов Д.Г. и др. // Анал. хим. 1998. Т. 53, № 10. С. 1081–1088.
5. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Касалайнен Г.Е. и др. // Научное приборостроение. 1999. Т. 9, № 1. С. 44–47.
6. Руководство по капиллярному электрофорезу / Пер. под ред. А.М. Волощука. М.: Научный совет Российской академии наук по хроматографии, 1996. 245 с.

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 24.01.2001.

## SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY. POSSIBILITY FOR ABSOLUTE OPTICAL DENSITY MEASUREMENT OF SOLUTION IN A CIRCULAR CAPILLARY

**B. G. Belenkii, Yu. V. Belov, A. V. Savushkin, V. L. Sukhanov**

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

Optimal technical solutions for development of a spectrophotometric detector are discussed. A technique for measuring absolute optical density in small diameter circular capillaries is offered. To this end, a notion of light beam filling factors is introduced and formulas for correction of experimental results are given. The calculations and recommendations for estimation of these ratios from the experimental data for various adjustments of the optical system are presented.