

УДК 543.545

© Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин, В. Л. Суханов

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР ДЛЯ ПРИБОРОВ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Обсуждаются новые технические решения при создании детектора для приборов капиллярного электрофореза. Предложены методики измерения вкладов основных источников шума, введено понятие коэффициента шума фотоприемника и приведены рекомендации для оптимизации детектора.

Кл. сл.: электрохроматограф, капиллярный электрофорез, спектрофотометрический детектор, источники шума

ВВЕДЕНИЕ

Методы капиллярного электрофореза обладают рядом достоинств: они просты и эффективны, обеспечивают высокую воспроизводимость и точность анализа при предельно малых объемах пробы (несколько нанолитров) и низкой стоимости расходных материалов.

Выполнена разработка капиллярного жидкостного электрохроматографа НАНОФОР 04, предназначенного для системного анализа пептидов и белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов, сложных комплексных биополимеров, низкомолекулярных биологически активных веществ, а также других биопродуктов и синтетических лекарственных средств.

Электрохроматограф является универсальным аналитическим прибором, который в отличие от обычных приборов капиллярного электрофореза позволяет работать с капилляром, с монолитной или набивной капиллярной колонкой, а также использовать спектрофотометрический детектор с обычной или с Z-образной кюветой или флуориметрический детектор. Метод аналитического разделения веществ электрохроматографа с монолитной или набивной капиллярной колонкой соединяет преимущества высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза.

ОПИСАНИЕ ДЕТЕКТОРА

При спектрофотометрическом детектировании концентрация компонентов в капилляре определяется путем измерения поглощения света, прошедшего через оптическое окно капилляра или через измерительную кювету на рабочей длине волны.

В электрохроматографе НАНОФОР 04 использованы и усовершенствованы некоторые технические решения, предложенные ранее при раз-

работке капиллярного ионного анализатора НАНОФОР 01 [1–3]. В качестве источника света в электрохроматографе использована дейтериевая лампа L6565 типа L2-4000 с блоком питания M9596-2510 японской фирмы Hamamatsu. По справочным данным максимальные флуктуации яркости лампы (двойной размах) равны 0.05 %.

Основной характеристикой такого детектора можно считать предел чувствительности по стандартному образцу, например по бензойной кислоте. Обычно при испытаниях детектора определяется отношение сигнал/шум M как отношение высоты пика бензойной кислоты массовой концентрации K (мг/дм³) к величине уровня флуктуаций шумов нулевого сигнала (двойной размах) при интервалах между отсчетами одна секунда. Затем вычисляется предел чувствительности (предельная концентрация) $K_{пр}$ для отношения сигнал/шум, равного 2 / 1, по формуле:

$$K_{пр} = 2K / M.$$

Детектор анализатора НАНОФОР 04 обладает существенными преимуществами по сравнению с известными детекторами, в которых применяется линейный усилитель и аналого-цифровой преобразователь. В этом детекторе используется фотоприемник с накоплением оптического сигнала. Фотоприемник выполнен в микросхемном исполнении и содержит устойчивый в ультрафиолетовой области кремниевый фотодиод и интегрирующий преобразователь фототоков во временные интервалы [2]. Такое техническое решение значительно увеличивает динамический диапазон детектора и уменьшает погрешность измерений за счет дискретизации. Нелинейный преобразователь тока I фотодиода в интервал времени T реализует

$$T = C U / I,$$

где C — емкость конденсатора в цепи обратной связи; U — перепад напряжения на конденсаторе.

Разработанная компьютерная программа обеспечивает в реальном времени обратное преобразование интервала времени в фототок $I = C U / T$, вычисление приращения оптической плотности и визуализацию электрофореграммы. Оптимизация технических решений при создании детектора усложнена теми обстоятельствами, что не определен вклад собственных шумов U_n интегрирующего преобразователя в шум детектора U_d и не определены границы его применения со стороны малых фототоков.

ИЗМЕРЕНИЕ ШУМОВ ДЕТЕКТОРА

Детекторы приборов капиллярного электролиза имеют существенные отличия от традиционных спектрофотометров: внутренний объем капилляра, заполненный жидкостью, имеет круглое сечение малого диаметра D (порядка 50 мкм) и находится в сходящемся световом пучке [4]. Дополнительные особенности детектор приобретает при использовании Z-образной кюветы: с одной стороны линейно увеличивается путь световых лучей и поглощение их пробой, выраженного в единицах оптической плотности (е.о.п.), а с другой стороны увеличиваются шумы детектора (в тех же единицах), поскольку нелинейно уменьшается интенсивность света, попадающего на фотодиод детектора. При малой интенсивности света значительный вклад в шум детектора может добавлять дробовой шум.

Дробовой шум i фототока I может быть вычислен по известной формуле [2]

$$i = (2 e I / f)^{1/2}, \quad (1)$$

где e — заряд электрона, равный $1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл. При реально достижимом фототоке $I = 3.2 \cdot 10^{-9}$ А в полосе частот $f = 1$ Гц шумовой ток фотодиода равен $i = 3.2 \cdot 10^{-14}$ А.

Динамический диапазон интегрирующего преобразователя фототоков со стороны малых сигналов определяется выбором емкости C конденсатора в цепи обратной связи. При малых световых сигналах приходится уменьшать емкость конденсатора, т. к. выходные сигналы детектора отсутствуют, если длительность выходного импульса преобразователя становится более одной секунды. При больших сигналах можно только предполагать, что вклад шумов интегрирующего преобразователя значительно уменьшается по сравнению с вкладом других источников шума.

Для определения собственных шумов интегрирующего преобразователя и шумовых вкладов других компонентов детектора на вход интегрирующего преобразователя подавался начальный ток, имитирующий фототок малой интенсивности.

Прежде всего с целью уменьшения погрешности измерения шумов детектора вместо оценки ве-

личины флуктуаций шумов нулевого сигнала по двойному размаху использовались цифровая обработка сигналов фототока (устранение дрейфа) и вычисление среднеквадратического отклонения (СКО).

Было выполнено сравнение результатов измерения СКО при различных длительностях наблюдаемых временных участков. С учетом обычной длительности пиков 10–20 с для измерения СКО можно выбрать 10 участков длительностью по 50 с или 1 участок — 500 с. При фототоке $I = 4.47 \cdot 10^{-9}$ А среднее значение СКО, вычисленное для 10 участков по 50 с, было равно $I_{ш} = 3.15 \cdot 10^{-13}$ А, а на 1 участке 500 с — $I_{ш} = 3.33 \cdot 10^{-13}$ А; различие этих величин менее 7 %, в то время как максимальный разброс среди 10 измерений составляет $\pm 0.7 \cdot 10^{-13}$ А, или ± 22 %. Учитывая эти результаты, можно с целью упрощения вычислений применить измерение СКО на одном участке длительностью 500 с. Экспериментально установлено, что для вычисления привычного значения шумов (D — двойной размах, от пика до пика) можно увеличить величину СКО в 5 раз, т. е. $D = 5 \cdot I_{ш}$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для имитации фототока при изготовлении фотоприемника на вход интегрирующего преобразователя подавался начальный, стабильный ток от опорного источника. К этому же входу подключен фотодиод, поэтому шумы детектора можно измерить как в темноте, так и в присутствии света (токи суммируются на входе преобразователя). Были изготовлены два фотоприемника с разными начальными токами. При включенной лампе уровень токов определяется заполнением капилляра жидкостью, наличием Z-образной кюветы и светофильтров. Результаты измерений СКО шума и расчетные величины дробового шума при различных значениях начального и суммарного токов I приведены в таблице и на рисунке.

Из них видно, что на начальном участке происходит быстрое нарастание шума $I_{ш}$, при этом вклад дробового шума i уменьшается. При включенной лампе (фототок $I = 2.02 \cdot 10^{-10}$ А и более) зависимость шума от тока приближается к линейной, при этом отношение N шума к току стремится к величине $N = 5.5 \cdot 10^{-5}$.

СКО шума, выраженного в единицах оптической плотности, вычисляется по формуле

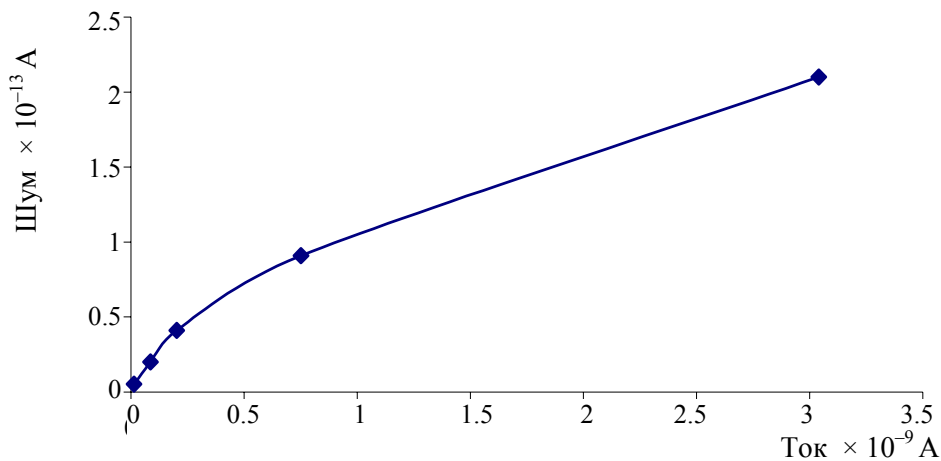
$$A = \log(1 + N).$$

Для малых N можно принять $A = 0.34 \cdot N$. Значению $N_0 = 5.5 \cdot 10^{-5}$ соответствуют минимальные шумы, выраженные в единицах оптической плотности:

$$A_0 = 1.9 \cdot 10^{-5} \text{ (е.о.п.)}, \quad D_0 = 8.5 \cdot 10^{-5} \text{ (е.о.п.)}.$$

Шумы в различных измерительных конфигурациях

Тип приемника и светофильтра	Ток I (А)	Шум $I_{ш}$ (А)	$N = I_{ш} / I$	Дробовой шум i (А)
Приемник № 1, без света	$1.28 \cdot 10^{-11}$	$5.20 \cdot 10^{-15}$	$4.0 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-15}$
Приемник № 2, без света	$8.60 \cdot 10^{-11}$	$2.41 \cdot 10^{-14}$	$2.8 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-15}$
Приемник № 1, 214 нм и Z-кювета	$2.02 \cdot 10^{-10}$	$4.10 \cdot 10^{-14}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	$8.0 \cdot 10^{-15}$
Приемник № 1, 214 нм (пустой капилляр)	$7.52 \cdot 10^{-10}$	$9.10 \cdot 10^{-14}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-14}$
Приемник № 2, 520 нм	$3.04 \cdot 10^{-9}$	$2.10 \cdot 10^{-13}$	$7.0 \cdot 10^{-5}$	$3.1 \cdot 10^{-14}$
Приемник № 2, 214 нм (заполненный капилляр)	$4.47 \cdot 10^{-9}$	$3.33 \cdot 10^{-13}$	$7.5 \cdot 10^{-5}$	$3.8 \cdot 10^{-14}$
Приемник № 2, 280 нм	$9.7 \cdot 10^{-9}$	$6.19 \cdot 10^{-13}$	$6.4 \cdot 10^{-5}$	$5.6 \cdot 10^{-14}$
Приемник № 2, 254 нм	$1.35 \cdot 10^{-8}$	$7.45 \cdot 10^{-13}$	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$6.6 \cdot 10^{-14}$



Зависимость СКО шума от тока

Для капилляра и рабочей длины волны 214 нм при $N_1 = 7.5 \cdot 10^{-5}$ получаем:

$$A_1 = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ (е.о.п.)}, D_1 = 1.25 \cdot 10^{-4} \text{ (е.о.п.)}.$$

Для Z-кюветы и рабочей длины волны 214 нм при $N_2 = 2 \cdot 10^{-4}$ получаем:

$$A_2 = 8.7 \cdot 10^{-5} \text{ (е.о.п.)}, D_2 = 4.35 \cdot 10^{-4} \text{ (е.о.п.)}.$$

Это расчетное значение хорошо согласуется с прямым измерением двойного размаха шумов по графику электрофореграммы.

Отношение шумов $K_{нм} = A_n / A_m$ предлагается использовать для сравнения двух определенных режимов. Это отношение можно назвать *коэффициентом шума* детектора.

Для капилляра и светофильтров с рабочими длинами волн 214 и 254 нм получаем

$$K_{10} = 2.5 / 1.9 = 1.3.$$

Таким образом, шумы возрастают на 30 % за счет уменьшения фототока примерно в 4 раза по отношению к максимальному значению.

В случае Z-кюветы получаем $K_{21} = 8.7 / 2.5 = 3.5$, т. е. шумы в единицах оптической плотности в 3.5 раза больше по сравнению с шумами, соответствующими режиму с капилляром (при рабочей длине волны 214 нм). Однако поглощение света в этой кювете пропорционально пути светового луча L , а при $L = 1.5$ мм поглощение возрастает по сравнению с обычным капилляром диаметром 0.075 мм по меньшей мере в 20 раз. В итоге реальная чувствительность возрастает ориентировочно в $20 / 3.5 = 5.7$ раза.

Полученные результаты позволяют оценить параметры Z-кюветы при других величинах пути светового луча. Если $L = 1$ мм, количество света увеличивается пропорционально квадрату апертуры, т. е. в 2.25 раза, при этом фототок будет равен $I_3 = 4.5 \cdot 10^{-10}$ А, а шум (согласно графику рисунка) $I_{ш3} = 6 \cdot 10^{-14}$ А. Остальные расчетные параметры: $N_2 = 1.3 \cdot 10^{-4}$, $A_3 = 4.5 \cdot 10^{-5}$ (е.о.п.), $K_{31} = 4.5 / 2.5 = 1.8$.

При $L = 1$ мм поглощение возрастает по сравнению с обычным капилляром диаметром 0.075 мм приблизительно в 13 раз, а реальная чувствительность — в $13 / 1.8 = 7.2$ раза.

Для $L = 0.75$ мм после выполнения аналогичного расчета получим результат: реальная чувствительность возрастает в 6.3 раза.

Z-кювета имеет еще одно преимущество по сравнению с обычным капилляром: весь световой поток взаимодействует с анализируемой пробой. При использовании обычного капилляра часть света минует центральную часть капилляра и не несет информации о пробе, при этом так называемый коэффициент заполнения капилляра не равен единице [4]. Дополнительный выигрыш в чувствительности можно получить при вторичной обработке сигналов за счет сглаживания шумов: при использовании Z-кюветы в несколько раз увеличивается ширина пиков, а это означает, что фильтрацию шумов можно использовать более эффективно.

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены преимущества и особенности спектрофотометрического детектора, разработанного для приборов капиллярного электрофореза.

2. Предложена методика определения вкладов основных источников шума. Показано, что при малых фототоках (при использовании Z-кюветы)

заметный вклад вносит дробовой шум, а наибольший вклад дают шумы интегрирующего преобразователя. При работе с обычными капиллярами зависимость шума от величины фототока приближается к линейной, что свидетельствует о преобладании шумов, возникающих за счет флуктуаций света дейтериевой лампы.

3. Для количественной оценки шумов при разных режимах работы детектора введено понятие коэффициента шума фотоприемника.

4. На основании экспериментальных результатов обоснованы рекомендации для конструирования Z-кюветы: максимальный выигрыш в чувствительности можно получить при длине хода светового луча около 1 мм.

Авторы выражают благодарность д.ф.-м.н. Новикову Л.В. за ценные советы при обсуждении данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савушкин А.В., Суханов В.Л., Забродский В.А. и др. Спектрометрический детектор для капиллярного электрофореза и капиллярной жидкостной хроматографии. Лабораторный спектрофотометр // Тезисы докладов Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов", 2000. С. 316–317.
2. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Комяк Н.И. и др. Спектрометрический детектор для капиллярного электрофореза и капиллярной жидкостной хроматографии. Патент РФ на изобретение № 2189038 от 10 сентября 2002 г.
3. Бессонова Е.А., Мальцев В.Г., Филиппов В.Н., Шмыков А.Ю., Щеглов А.А. Применение прибора капиллярного электрофореза "Нанофор 01" для диагностики микроальбуминурии при сахарном диабете // Тезисы докладов II Международного симпозиума, 25–30 сентября, 2005, Краснодар. С. 318.
4. Беленький Б.Г., Белов Ю.В., Савушкин А.В., Суханов В.Л. Спектрофотометрический детектор для капиллярного электрофореза и капиллярной жидкостной хроматографии. Возможность абсолютного определения оптической плотности раствора в круглом капилляре // Научное приборостроение. 2001. Т. 11, № 1. С. 47–51.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Белов Ю.В., Курочкин В.Е.)

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург (Суханов В.Л.)

Материал поступил в редакцию 10.03.2009.

THE SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR FOR DEVICES OF A CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Yu. V. Belov¹, V. E. Kurochkin¹, V. L. Sukhanov²

¹*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

²*Ioffe Physical-Technical Institute RAS, Saint-Petersburg*

New technical solutions are discussed in creating the detector for devices of capillary electrophoresis. Procedures for measuring of contributions of the main noise sources are suggested, the concept of noise of photodetector noise coefficient is introduced and recommendations for detector optimization are made.

Keywords: electrochromatograph, capillary electrophoresis, spectrophotometric detector, noise sources