

УДК 543.422: 543.545

© Б. Г. Беленький, А. А. Евстапов, Р. А. Козулин

ВЛИЯНИЕ ОТРАЖЕННОГО КАПИЛЛЯРОМ ИЗЛУЧЕНИЯ ЛАЗЕРА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФЛУОРИМЕТРА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Изучено влияние отраженного капилляром излучения лазера на чувствительность флуоресцентных измерений. Приведена оценка уровня отраженного излучения. Предложен способ для эффективного снижения фона от отраженного излучения. Рассмотрен вариант простой юстировки лазерного флуориметра.

ВВЕДЕНИЕ

В аналитических системах, в частности в приборах высокоэффективного капиллярного электрофореза, наряду с фотометрическими детекторами широко используются флуориметрические детекторы, работающие в диапазоне видимой и ближней ИК-области спектра [1]. В качестве источников возбуждающего излучения используют лазеры. Такие детекторы обладают высокой чувствительностью и позволяют регистрировать предельно низкие концентрации веществ — на уровне отдельных молекул [2–4]. Поскольку сигнал флуоресценции при таких концентрациях чрезвычайно слаб, то требуется обеспечить минимальные потери при передаче флуоресценции на фотоприемник и добиться максимального подавления фона для увеличения отношения сигнал/шум. Серийно выпускаемых приборов с такими детекторами мало, в основном это лабораторные установки в исследовательских учреждениях.

ОСОБЕННОСТИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Флуориметрические детекторы, использующие в качестве источника излучения лазер, обычно имеют традиционную оптическую схему с регистрацией излучения флуоресценции под углом 90° (рис. 1).

Лазерный луч, отражаясь от зеркала 2, фокусируется линзой (микрообъективом) 3 в центр капилляра 4. Луч попадает в капилляр перпендикулярно его оси и возбуждает пробу, находящуюся в капилляре. Собранный в телесном угле Ω поток флуоресценции от пробы с помощью параболического зеркала 5 направляется на светофильтры 6. Затем излучение флуоресценции фокусируется линзой 7 на точечной диафрагме 8, после чего попадает на фотоприемник 9. В качестве фотоприемника может быть использован лавинный фотодиод, фотоэлектронный умножитель либо другое фотоприемное устройство. В некоторых детекторах применяются конфокальные системы, в которых излучение флуоресценции собирается фокусирующим объективом и (обычно с помощью дихроичного зеркала) перераспределяется на фотоприемник.

В детекторе для прибора высокоэффективного капиллярного электрофореза свет от источника излучения приходится фокусировать в канал капилляра, имеющий диаметр от 10 до 100 мкм. Так как внутренний диаметр капилляра и детектируемый объем пробы чрезвычайно малы, то взаимное положение возбуждающего излучения и капилляра относительно друг друга критично. Для фотометрических систем в отличие от флуориметрических отклонение сфокусированного пучка света от центра капилляра допускается в большем диапазоне. Это возможно благодаря тому, что при фотометрии в качестве источников излучения в подавляющем большинстве случаев используются лампы, излучение от которых фокусируется в пятно большего диаметра, чем канал капилляра, и, чтобы не допустить прохождения неинформатив-

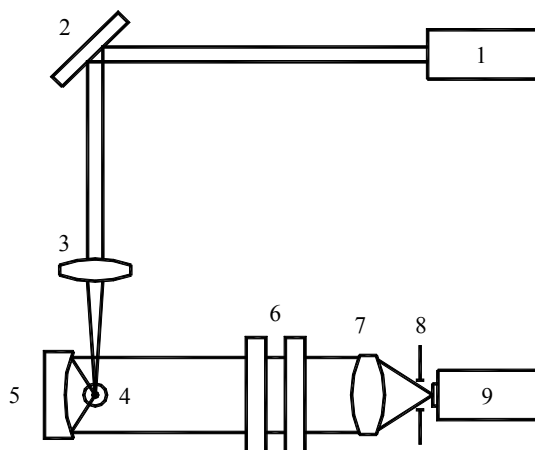


Рис. 1. Оптическая схема флуориметрического детектора. 1 — лазер, 2 — зеркало, 3 — фокусирующая линза, 4 — капилляр, 5 — собирающее зеркало, 6 — набор светофильтров, 7 — линза, 8 — диафрагма, 9 — фотоприемник

ного излучения через стенки капилляра, перед ним устанавливается диафрагма. Максимальная чувствительность тем не менее достигается только в том случае, когда оптическая система тщательно юстирована. Достаточно трудно найти при настройке и поддерживать во время анализа положение капилляра, когда излучение проходит через его центр.

Как показывает практика, подобная схема обладает некоторыми недостатками. Это, к примеру, трудоемкость и неудобство при юстировке детектора, особенно если лазер работает в невидимой области спектра. В процессе эксплуатации прибора (особенно при замене капилляра) не избежать дополнительной юстировки. Из-за малого внутреннего диаметра капилляра малейшее отклонение в положении капилляра или фокусирующей оптики приводит к тому, что лазерный луч смещается от центра капилляра. Отклонение капилляра от центра может возникнуть при его смене или даже во время измерений, т.к. при приложении электрического поля капилляр нагревается и меняет свое положение в пространстве. Контролировать юстировку луча в центр капилляра можно следующими способами.

— Так как большая часть лазерного излучения выходит сквозь капилляр наружу, то прошедшее излучение можно контролировать визуально, установив за капилляром микроскоп. В проходящем свете можно наблюдать за смещением капилляра относительно луча лазера. Это позволяет достаточно точно осуществить юстировку детектора, но такая процедура опасна для зрения, неудобна и может использоваться только в экспериментальных установках. Кроме того, при использовании лазеров вне видимого оптического диапазона такой способ юстировки вообще не применим.

— За прохождением луча лазера в капилляре можно наблюдать со стороны (сбоку относительно направления его распространения). Такой метод требует определенного опыта и на практике также неудобен.

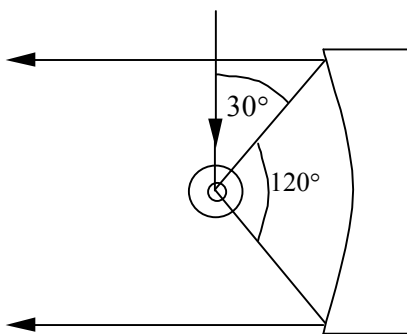


Рис. 2. Угол сбора флуоресценции зеркалом

— Положение луча в капилляре определяют по максимуму регистрируемого сигнала флуоресценции при перемещении фокусирующей оптики. Способ относительно прост, но за сигнал флуоресценции можно принять излучение лазера, которое отражается от внешней и внутренней поверхностей капилляра. При этом часть отраженного света будет собрана зеркалом и попадет на фотоприемник, в результате чего увеличится фон, ухудшится соотношение сигнал/шум.

ВЛИЯНИЕ ЮСТИРОВКИ НА ВЕЛИЧИНУ ФОНА

Основной вклад в интенсивность фоновой засветки в детекторах для систем капиллярного электрофореза вносит отраженное от капилляра излучение лазера.

Для оценки отраженного от капилляра излучения лазера, которое может попасть на фотоприемник, предположим, что через капилляр проходит квазипараллельный световой поток. Если ось зеркала, собирающего флуоресценцию в полном угле 120° (рис. 2), установлена перпендикулярно лазерному лучу, то на него попадет отраженный свет, имеющий угол к нормали поверхности капилляра от 15 до 75° .

Фоновый световой поток формируется при отражении от внутренней поверхности капилляра на границе раздела двух сред кварц—вода, т.к. здесь будет иметь место полное внутреннее отражение (ПВО). Сбор флуоресценции от пробы необходимо осуществлять в максимально возможном телесном угле, но чем больше телесный угол сбора зеркала, тем больше отраженного света будет захвачено.

Угол полного внутреннего отражения можно найти из закона преломления [5]:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_{\text{в}}}{n_{\text{кв}}},$$

где $n_{\text{в}}$ — коэффициент преломления воды, $n_{\text{кв}}$ — коэффициент преломления кварца, при условии

$$\sin \beta = \frac{n_{\text{в}}}{n_{\text{кв}}}. \text{ Для } \lambda = 488 \text{ нм и } n_{\text{кв}} = 1.46 \quad \beta = 65^\circ.$$

Так как $\sin 65^\circ = 0.91$, то, следовательно, 90 % потока, падающего на внутреннюю поверхность капилляра, полностью отразится. На зеркало попадет свет ПВО в диапазоне углов от 65 до 75° . С учетом того, что зеркало собирает флуоресценцию с одной стороны капилляра, на фотоприемник попадет около 3 % мощности излучения лазера. Интенсивность отраженного излучения по остальным направлениям можно найти из формул Френеля. При этом возможны следующие варианты.

1. Падающая волна поляризована так, что электрический вектор лежит в плоскости падения (p -компонента). Интенсивность отраженного света

$$I_p = I_0 \frac{\operatorname{tg}^2(\alpha - \beta)}{\operatorname{tg}^2(\alpha + \beta)}.$$

2. Падающая волна поляризована так, что электрический вектор перпендикулярен к плоскости падения (s -компонента):

$$I_s = I_0 \frac{\sin^2(\alpha - \beta)}{\sin^2(\alpha + \beta)}.$$

В этих формулах α и β — углы падения и преломления соответственно, I_0 — интенсивность падающего света. Для p -компоненты будет иметь место более низкое суммарное отражение света, чем для s -компоненты, т.к. при падении под углом Брюстера свет полностью проходит во вторую среду. Угол

Брюстера находится из выражения $\operatorname{tg} \alpha = \frac{n_e}{n_{\kappa\phi}}$. Что

соответствует $\alpha = 42^\circ$ ($15^\circ < \alpha < 65^\circ$). Таким образом, поляризацию лазерного излучения определяют уровень фонового отражения.

Для неполяризованного света

$$I_r = \frac{1}{2} I_0 \left\{ \frac{\sin^2(\alpha - \beta)}{\sin^2(\alpha + \beta)} + \frac{\operatorname{tg}^2(\alpha - \beta)}{\operatorname{tg}^2(\alpha + \beta)} \right\}. \quad (1)$$

При этом отражение увеличивается при увеличении угла падения. Чтобы найти общий отраженный световой поток, надо проинтегрировать выражение (1) в интервале углов 15 – 65° , выразив β

через $\arcsin\left(\frac{n_e}{n_{\kappa\phi}} \sin \alpha\right)$. Метод численного интегрирования

дает оценку $I_r = 3.8\%$. Исходя из полученного, можно определить оценку мощности отраженного лазерного излучения, которое с помощью зеркала сфокусируется на фотоприемнике, — 1.2% . В конечном итоге всего 4.2% от общего излучения, падающего на капилляр, перераспределится на фотоприемное устройство. Сравним эту величину с потоком флуоресценции.

Сигнал флуоресценции от пробы при облучении световым потоком мощностью P можно найти по формуле:

$$F = PKT(1 - 10^{-\varepsilon bC}) \approx PKT\varepsilon bC[\ln 10],$$

где F — поток флуоресценции, K — квантовый выход пробы, T — коэффициент пропускания оптической системы, ε — молярный коэффициент экстинкции пробы, b — оптический путь (диаметр

капилляра), C — концентрация флуоресцирующего вещества (моль/л).

При мощности светового потока 30 мВт в капилляре с внутренним диаметром 75 мкм, пропускании оптической системы $T = 0.5$ для флуорофора с $\varepsilon = 200\,000$ л/моль и квантовым выходом $K = 0.15$ получим

$$F = 0.03 \text{ Вт} \times 0.15 \times 0.5 \times 200\,000 \text{ л/моль} \times \\ \times 0.0075 \times \ln 10 \times C = (8 \times |C|) \text{ Вт}.$$

Это означает, например, что концентрации пробы 10^{-12} моль/л соответствует световой поток флуоресценции 8 пВт. В капилляре с внутренним диаметром 75 мкм и засвечиваемой высотой 100 мкм такой концентрации будет соответствовать 260 молекул в облучаемом объеме. Этот поток флуоресценции равномерно распределен в пространстве в телесном угле $\omega = 4\pi$. Поскольку зеркало собирает флуоресценцию в телесном угле $\omega_{\text{зер.}} = 2\pi(1 - \cos(120^\circ/2)) = \pi$, т.е. 25% , на фото-

приемник попадает около 2×10^{-12} Вт потока флуоресценции. В то же время при этой мощности лазера на фотоприемник попадет 1.3×10^{-3} Вт отраженного света, что на 9 порядков больше сигнала флуоресценции. Хотя отраженный свет значительно ослабляется светофильтрами, он все же вносит существенный (определяющий) вклад в сигнал фона. Чем больше фон, тем выше амплитуда его шума и тем хуже обнаружительная способность детектора. Чтобы выделить флуоресценцию из такого фона применяются различные светофильтры, что ведет к снижению пропускания оптической системы. Для подавления отраженного и рассеянного света лазера применяют голографические фильтры, которые ослабляют излучение более чем на 4 порядка. Интерференционные светофильтры обладают более скромными характеристиками. Простые светофильтры из цветных стекол в ряде случаев неприменимы из-за флуоресценции материала светофильтра (стекла). Полностью подавить фон, вызванный отраженным светом, не удастся. Например, при использовании дополнительных светофильтров при измерении растворов флуоресцеина общее пропускание оптической системы снижается до 10 – 15% , что ухудшает чувствительность почти на порядок. Чтобы исключить ПВО от капилляра, достаточно диафрагмировать луч лазера или уменьшить его сечение с помощью линзы до такого размера, когда условие ПВО выполняться не будет, т.е. $d \leq r \sin 65^\circ$, где d — ширина луча, r — внутренний радиус капилляра.

При $d = r \sin 65^\circ$ осуществляется полная засветка капилляра, при меньшей ширине луча будет засвечиваться часть пробы. Это позволяет в несколько раз снизить фон, но в этом случае тре-

буется очень точное позиционирование капилляра относительно падающего луча. При установке капилляра с другим диаметром наблюдается увеличение фона. На рис. 3 приведен график зависимости сигнала на фотоумножителе (ФЭУ) при перемещении луча поперек капилляра. В экспериментах использовался капилляр с внутренним диаметром 80 и внешним 360 мкм. Луч лазера фокусировался линзой ($f = 42$ мм) в пятно диаметром около 70 мкм. За "нулевой" уровень сигнала принимался сигнал, соответствующий темновому току фотоумножителя, — примерно 200 отн. ед. При перемещении луча от стороны собирающего зеркала к центру капилляра вначале наблюдается плавное увеличение отраженного света от внешней поверхности. Когда луч доходил до внутреннего диаметра, фиксировался резкий скачок сигнала, связанный с прохождением падающего луча через область полного внутреннего отражения. Это соответствует максимуму отраженного света — 720 000 отн. ед. Когда луч находится в центре капилляра, сигнал становится минимальным — в 100–200 раз выше, чем темновой ток. При дальнейшем перемещении луча появляется меньший по интенсивности второй пик. Его появление связано с тем, что свет испытывает в капилляре сильное преломление и отклоняется на зеркало. Из графика видно, что смещение луча на 10 мкм при-

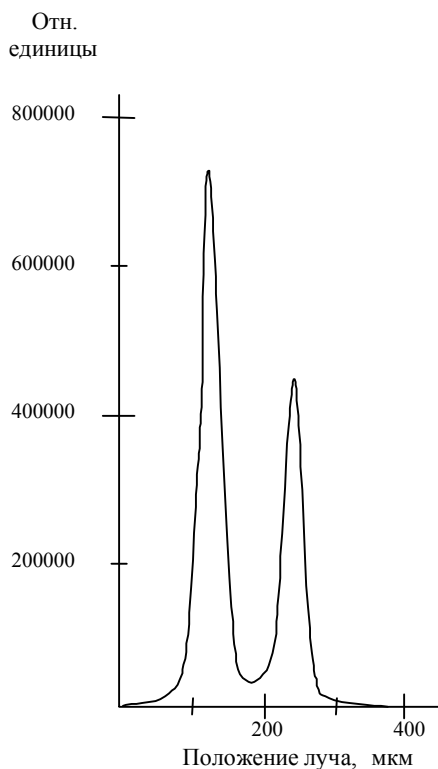


Рис. 3. Зависимость интенсивности фона от положения луча на капилляре

водит к увеличению фона в 2 и более раза.

В выражение для монохроматического порогового потока ФЭУ $\Phi_{пор.ф}$ при наличии постоянных засветок сомножителем входит член

$$\Phi_{пор.ф} \sim \sqrt{1 + \frac{\Phi_{\phi} S_{\phi}}{I_T}},$$

где Φ_{ϕ} — фоновый поток, S_{ϕ} — интегральная чувствительность ФЭУ к потоку фона и I_T — темновой ток ФЭУ. Для ФЭУ-79 отношение $\frac{\Phi_{\phi} S_{\phi}}{I_T} \gg 1$, поэтому можно принять, что минимальный обнаруживаемый поток пропорционален квадратному корню из потока фона. Это означает, что отклонение луча от центра капилляра может ухудшить предел детектирования в 4–5 раз. Кроме этого, даже при минимальном фоновом сигнале, в 100–200 раз превышающем темновой ток ФЭУ, предел ухудшается более чем в 10 раз.

Так как с помощью светочувствительных не удастся полностью подавить отраженный свет, то избавиться от него можно путем пространственного разделения лучей: лазерный луч направить на капилляр под углом к его оси, а зеркало оставить в том же положении (рис. 4, а). В этом случае отраженные и прошедшие через капилляр лучи образуют конус с углом при вершине 2γ (γ — угол между лучом и капилляром). Из рисунка видно, что при $\gamma < 90 - \phi$, где ϕ — половина угла сбора флуоресценции, отраженный свет не будет попадать на собирающее зеркало, что практически полностью устранил фоновую засветку, от которой останется лишь слабое рассеяние на неоднородностях капилляра.

ВЫВОДЫ

1. Используя схему пространственного разделения лучей можно значительно снизить фоновую засветку и повысить чувствительность детектирования.

2. Отраженный свет удобно использовать для юстировки. При перемещении луча поперек оси капилляра в отраженном конусе света наблюдается движение в противоположные стороны двух пучков света (рис. 4, б). Они появляются при отражении от передней и задней поверхностей внешнего диаметра капилляра. Хотя свет отражается еще и от внутренней поверхности, которая заполнена пробой, его интенсивность более чем в 10 раз слабее, и поэтому он не так заметен. Когда падающий луч проходит точно через центр капилляра, отраженные лучи совпадают. Расчеты показывают, что отклонение луча лазера на 10 мкм от центра капилляра с внутренним и внешним диаметрами соответственно 80 и 360 мкм вызывает расхождение между отражен-

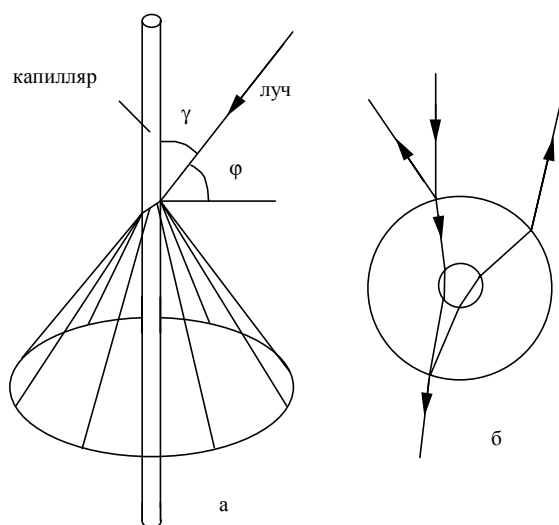


Рис. 4. Распространение света при наклонном падении луча на капилляр

ными лучами на 12° , что можно устойчиво регистрировать при юстировке.

В принципе, направляя в капилляр луч под углом, можно вообще отказаться от фокусировки излучения и возбуждать пробу параллельным пучком, который имеет диаметр больше, чем капилляр. Но, как уже упоминалось, фокусировка помогает снизить отраженный свет, который в данном случае уже не столь критичен. Обычно стараются сфокусировать лазерный луч в пятно, которое имеет размеры меньше, чем канал капилляра. С одной стороны, это уменьшает отражение, т.к. лучи сходятся на поверхности капилляра под углом, близким к нормали. С другой стороны, это приводит к тому, что часть пробы в канале не засвечивается, что снижает вероятность детектирования отдельных молекул. При облучении капилляра параллельным пучком света суммарный отраженный поток увеличится, но он не попадает на зеркало и не вызывает фоновой засветки. Вместе с этим, из-

за того, что луч шире, чем капилляр, отпадает необходимость в юстировке и точном позиционировании оптики и капилляра. Однако снижается плотность излучения в объеме пробы, но, при некотором запасе мощности лазера, ее вполне может хватить для возбуждения флуоресценции без фокусировки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Owens C.V., Davidson Y.Y., Kar S., Soper S.A. High-resolution separation of DNA restriction fragment using capillary electrophoresis with near-IR, diode-based, laser-induced fluorescence detection // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 1256–1261.
2. Williams D.C., Soper S.A. Ultrasensitive Near-IR fluorescence detection for capillary gel electrophoresis and DNA sequencing application // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3427–3432.
3. Middendorf L., Amen J., Bruce R. et al. Near-infrared fluorescence instrumentation for DNA analysis // *Near infrared dyes for high technology application: NATO ASI Series.* Kluwer Academic Publishers, 1998. Series 3, V. 52. P. 21–54.
4. Sauer M., Drexhage K.H., Herten D., Lieberwirth U. et al. Ultrasensitive detection and identification of biomolecules with diode-laser from DYES to DNA // *Near infrared dyes for high technology application: NATO ASI Series.* Kluwer Academic Publishers, 1998. Series 3, V. 52. P. 57–86.
5. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука. 1973. 719 с.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Б. Г. Бельский, А. А. Евстапов)

Санкт-Петербургский государственный институт точной механики и оптики (Технический университет) (Р. А. Козулин)

Материал поступил в редакцию 06.04.2001.

INFLUENCE OF LASER RADIATION REFLECTED FROM THE CAPILLARY ON THE FLUORIMETER SENSITIVITY IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

B. G. Belenkii, A. A. Evstrapov, R. A. Kozulin*

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg,
St. Petersburg State Institute of Fine Mechanics and Optics (Technical University)

The reflected laser radiation present in the capillary electrophoresis system with a laser-induced fluorescence detector is considered. A method to effectively reduce background and simplify optical system alignment is proposed.