



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1688878 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 03824208. 7  
 (22) 申请日 2003. 08. 15  
 (30) 优先权数据  
 0219248. 2 2002. 08. 17 GB  
 (85) PCT申请进入国家阶段日  
 2005. 04. 14  
 (86) PCT申请的申请数据  
 PCT/GB2003/003591 2003. 08. 15  
 (87) PCT申请的公布数据  
 W02004/017061 EN 2004. 02. 26  
 (73) 专利权人 帕瑞泰克有限公司  
 地址 英国约克郡  
 (72) 发明人 D·M·古达奥 E·T·博格斯特洛姆  
 N·M·埃林森 K·J·穆恩  
 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
 司 31100  
 代理人 李玲  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 27/447(2006. 01)  
 G01N 21/05(2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 EP 0594327 A1, 1994. 04. 27, 全文.

US 5694215 A, 1997. 12. 02, 全文.  
 CN 1109597 A, 1995. 10. 04, 全文.  
 EP 0616211 A1, 1994. 09. 21, 全文.  
 CN 1146017 A, 1997. 03. 26, 全文.  
 Alfredo E. Bruno, Ernst Gassmann, Nico Pericles, Klaus Anton. On-Column Capillary Flow Cell Utilizing Optical Waveguides for Chromatographic Applications. Analytical Chemistry 61 8. 1989, 61(8), 876-883.  
 熊少祥, 李建军, 程介克. 高效毛细管电泳-电荷耦合器件检测器联用技术研究(VII) - 低聚肽及其降解产物的分离. 高等学校化学学报 17 7. 1996, 17(7), 1062-1064.  
 马明生, 吴晓军, 刘国诠. 增强型电荷耦合器件用于毛细管电泳激光诱导荧光的检测. 高等学校化学学报 17 12. 1996, 17(12), 1862-1864.  
 Edmund T. Bergstrom, David M. Goodall. A Charge Coupled Device Array Detector for Single-Wavelength and Multiwavelength Ultraviolet Absorbance in Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry 71 19. 1999, 71(19), 4376-4384.

审查员 李明瑞

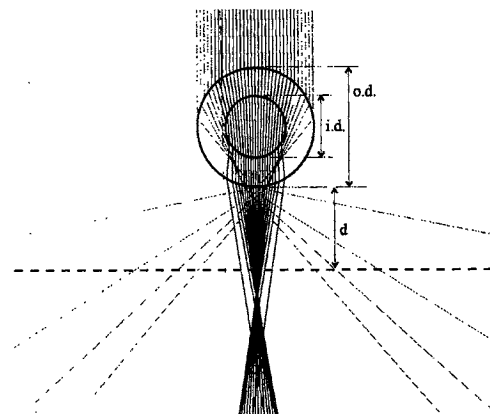
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 15 页

(54) 发明名称  
光学组件和用于检测光传输的方法

(57) 摘要

一种包括光源, 至少一个样品容器和检测器的光学装置, 该至少一个容器, 以能通过该容器传输光的方式, 被设置在由该光源和该检测器之间所建立的光路或诸光路上。其中该光源适于提供基本准直的光, 该检测器包括多个检测位置, 而该容器包括适于包含用于检测样品的相应形状和尺寸的壁和纤芯, 并限定至少两条在空间分开的传输光路, 只进入和离开该容器壁的第一壁路径, 在空间与第二芯路径分开, 该芯路径进入和离开该容器壁, 另外和该容器的芯, 其中在空间分离的壁和芯路径被耦合到在检测器上的专用检测器位置。因此, 并应用它的用于检测的模件或夹位器件

方法。



1. 一种光学组件,包括光源,至少一个样品容器和检测器,这至少一个容器被放置在由该光源和该检测器之间,以能经过该容器实现光的传输的方式建立的光路或诸光路中,其中该光源适于提供一束准直光的光束,该检测器包括多个检测器位置,而该容器包括具有适于容纳用于检测的样品的相应形状和尺寸的壁和芯,并限定至少两条在空间分开的传输光路,只进入和离开容器壁的第一壁路径,与第二芯路径在空间分开,这第二芯路径进入和离开该容器壁,且另外进入和离开该容器的芯,其中在空间分开的壁和芯路径被耦合到在检测器上专用检测器位置,其中该检测器是阵列检测器。

2. 根据权利要求 1 所述的光学组件,其特征在于,其中该组件限定一条中心芯路径和在其两侧的两条周边的壁路径,或一条围绕所述中心芯路径的环状壁路径。

3. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,其中芯和壁路径光束,在空间是靠近的,便于作为芯光束对壁光束之比的直接定位。

4. 根据权利要求 3 所述的光学组件,其特征在于,芯和壁路径光束在阵列检测器上邻接。

5. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,其中该光源包括至少一个波长的光,所述光由一种或多种吸收品种所吸收,所述光的吸收率待检测。

6. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,其中光的波长是在 160 到 1200nm 的范围内。

7. 根据权利要求 6 所述的光学组件,其特征在于,其中光的波长是在 180 到 1200nm。

8. 根据权利要求 6 所述的光学组件,其特征在于,其中光的波长是在 190 到 1200nm。

9. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,其中在本发明组件中的至少一个样品容器包括一根管子或管道,所述管子或管道被形成端部是开口的并形成开口的基底和顶盖,意欲用于动态样品检测。

10. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,其中样品容器是单根管子或在阵列中多根管子中的一根。

11. 根据权利要求 10 所述的光学组件,其特征在于,所述单根管子或多根管子中的一根是单根毛细管,或多根毛细管中的一根,所述阵列是微毛细管阵列。

12. 根据权利要求 10 所述的光学组件,其特征在于,所述单根管子或多根管子中的一根是微制造的沟道,或多根微制造的沟道中的一根,所述阵列是微制造的沟道阵列。

13. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,其特征在于,容器的内直径在 3 微米到 20mm 范围内,容器的外直径在 4 微米到 30mm 范围内,容器的折射率在  $1.3 < n < 1.6$  范围内,样品的折射率在 1.3 到超过 1.5 范围内,从容器的外壁到检测器距离 / 外直径之比为 0.5 到 10,且从容器的外壁到检测器距离在 20 微米到 300mm 的范围之内。

14. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述光学组件,其特征在于,其中阵列检测器包括固态传感器件。

15. 根据权利要求 14 所述的光学组件,其特征在于,所述固态传感器件是电荷耦合器件,电荷注入器件或互补金属氧化物半导体有源像素传感器。

16. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述光学组件,其特征在于,其中阵列检测器包括,包括表面销子的电荷耦合器件,该销子包括一层镀膜来吸收入射光,并以不同的波长再发射,把紫外光变成可见光,以使通过电荷耦合器件实现检测,其中该镀膜直接涂敷到该销子或

到在销子和容器之间交错的覆盖片条,便于在无需调换销子的情况下,通过调换覆盖片条,按需要重新镀膜。

17. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述光学组件,其特征在于,该组件包括用于最佳峰检测和参数化 / 性能鉴定的实时信号处理的装置,和用于自动系统管理的装置,包括设备和系统的封闭回路反馈控制。

18. 根据权利要求 17 所述光学组件,其特征在于,在该组件中,封闭回路反馈控制装置包括:用于按照在检测装置中的初始观察停止或减慢样品的流动,使样品能保存在检测器窗口,并给出用于数据识别的更长时间及已加强的信噪比,或能实现样品的小部分的收集,或把样品的小部分导引到分析装置的装置。

19. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,用于柱或毛细管分离装置,其中该容器是毛细管或柱,包括:

在一端的对接装置,用于插入柱或毛细管分离器件的引出口,或沿其长度插入,该毛细管或柱还任选地包括可在另一端插入分析装置引入的对接装置;或是

夹住器件,包括用于对关于毛细管或柱分离器件的一部分进行定位的装置,该毛细管或柱具有适宜的内直径,外直径和折射率,并被剥离任何表面镀膜,因而被剥离的毛细管或柱提供组件的样品容器。

20. 根据权利要求 1 到 2 的任一项所述的光学组件,用于医药,生物医药和生物科学,农业化肥,兽医,材料领域,用于对包含在容器中样品的检测,分析,性能鉴定和定量,并还可任选地收集其已分离的组分。

21. 用于化学反应或合成以及分析或用于样品分离或运输的装置,其中该装置包括根据权利要求 1 到 20 的任一项所述的光学组件,在该组件中,该样品容器是圆柱形的,在间歇流模式中所监控的反应作为时间的函数,并且所述装置包括反馈控制系统,用于停止反应。

22. 光检测的方法,所述光通过包含在根据权利要求 1 到 21 的任一项所述的光学组件中的至少一个样品容器的芯之内的至少一个样品进行传输,包括用准直的一或多个光源照射这容器,并在检测器中检测所传输的光,其中所传输的光在空间被分开成至少两条光路,只通过该容器壁的一条壁路径,与芯路径在空间分开,而这芯路径通过该壁和芯,其中在空间分开的光束被耦合到在该阵列检测器上的专用检测位置。

23. 根据权利要求 22 所述方法,其特征在于,其中样品包括一种或多种分析剂,这分析剂在产生或消耗作为分析剂品种的化学反应过程中作检测是需要的。

24. 根据权利要求 22 到 23 的任一项所述方法,该方法另外还包括选择用于分析的样品,确定波长,在该波长处,所要的样品组分的吸收为最强,为了选择合适的样品容器,核对样品的折射率,而样品容器当含有该样品,并当被照射时,将产生在空间分离的光束,通过把在空间分离的光束耦合到在检测器阵列上独自的位置来检测阵列分离。

25. 根据权利要求 22 到 23 的任一项所述方法,其特征在于,该方法包括通过利用曝光定位法的检测装置来定位所检测到的光,其中芯光束光强度对壁光束光强度之比给出一个用于在各个位置处的样品强度的值,具有对由于光源起伏而引的过量或闪烁噪声的消除。

## 光学组件和用于检测光传输的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种光学组件,其包括样品容器,以通过该容器能进行光传输的方式、被放于在光源和光检测器之间的直接光路上;一种用于检测通过包含在该容器内样品的光传输的方法;一种包括该组件的装置;具体地说,一种用于例如对高通量筛分(HTS),或图形分布或诸如测定酶的测定的样品分析的装置;并在药品,生物医药和生物科学,农业化肥,兽医,材料及类似的领域中供检测,分析,性能鉴定和定量,或含于容器中的相同的样品之用,并任选地还可收集其已分离的组分;尤其是在组合化学中;在新陈代谢,蛋白质体或基因组的测定和高通过量分析应用中,一般是高灵敏分析,分离和/或定量研究和用于样品分离,例如色层分析或电泳,尤其是柱色层分析,带有实时或后分离分析的毛细管电泳。

### 背景技术

[0002] UV吸收量,荧光性和质谱测定法是在分离科学中用于在样品中分析品种所用的关键计数。一种特别有用的分类法是检查由具有荧光标识和荧光成像的毛细孔电泳分离的样品数目,用于定量,和用于感兴趣的特性分子的MS。

[0003] US5,582,705 揭示一种在多路复用毛细管电泳系统中用于激光感生荧光的检测装置和系统。一束相干光入射到毛细管阵列上并发射荧光,一般是彼此垂直的,以便减少由于光散射引起的背景噪声。在各毛细管壁中的透明部段限定了通过该阵列延伸的透明路径,垂直于该毛细管。设置一种诸如电荷耦合器件(CCD),较佳的是电荷注入器件(CID)的2D图像阵列检测器来检测发射,并把成像透镜放入毛细管阵列和图像阵列之间,以把像素光耦合到毛细管。这成像透镜可以是能把图像转换到图像阵列检测器像素上的任何透镜,诸如相机透镜即会聚透镜。在US5,582,705的图4中示出这耦合的情况,在该图中每第二像素被耦合到毛细管的侧壁,而每个在其间的像素则被耦合到内部的部段。

[0004] 由于只是有限的分子数是本来就有荧光性的,而多数必须以能再现和定量的方式被转化出来,所以荧光性检测在它的应用方面是受到限制的。所以吸收率检测具有能使分子的较宽范围检测的优点。例如在微滴定管进行的酶的测定中,可把技术延伸到发色的,UV和在测定中消耗或产生的vis吸收物质的吸收率检测,测定范围不仅延伸到合成的物质,而且还延伸到天然物质。

[0005] 但是,吸收率检测的限制在于检测的可操作的波长。吸收率检测是在溶液中的物质上进行的。但是通常的溶剂吸收波长在~200nm以下的显著的光量,而最后所得到的溶剂吸收信号变形和掩蔽了由待测物质引起的信号。从而,实际上,吸收率检测被限于在超过190nm的波长处,UV-Vis到近红外(NIR)范围内作检测。而且,单点吸收率检测的基本限制,在比光源还亮的毛细管上检测点处形成源的图像是不可能之事。在Bergstrom和Goodall, Pokric和allinson, anal. Chem. 1999, 71, 4376-4384的“一种用于在毛细管电泳中单波长和多波长紫外吸收率的电荷耦合器件阵列检测器”一文中,揭示了用吸收率检测在毛细管电泳中的光学检测,照射采用光纤束的毛细管长度并采用电荷耦合器件(CCD)相机来成像所照射区的全部长度。在这刊出的文章中,来自光纤束的光通过毛细管纤芯被蓝宝石杆聚

焦,并在毛细管的对面一侧被检测,通过这个方法,增加了目标光的范围,使得能用到更多的灯光输出,并增加了总的光流量。在这情况下,光从毛细管线性发射出,所以,所有检测到的光是有用的,且所得到的发散光束被成像于 CCD 上。

[0006] 一旦引进平行的毛细管阵列来代替单根毛细管,这种系统变得更复杂。在各毛细管的纤芯上聚焦光在光学上是非常复杂的,所以,照射各毛细管的纤芯和壁这两者成为有实用的结论。

[0007] W001/18528(Yeung 等人)揭示了通过多容器的平面阵列中样品的吸收检测用于同时分析多个样品的方法,从而,通过从该阵列隔开检测工具,使来自邻近容器的杂散光被消除,较佳的是,在大于容器直径 10 倍的距离,在合适的 10-100 倍直径例如距离为 1-30cm,容器较佳的是如在本领域所示的圆柱形毛细管子。如果光源不稳定,则阵列包括一控制容器。一般认为容器的横截面和毛细管的厚度不是要求严格的。较佳的是,平的场透镜把容器成像到检测工具上。

### 发明内容

[0008] 现在我们已经发现,在吸收率检测组件中进一步的改进,使其能根据光学部件的简化,在没有毛细管和检测器的不相称大的间距的情况下,通过毛细管 或其它的样品容器增加总的光流量,而这不相称大的间距是不希望有的,并减少兼顾路径长度的光收集效率,从而,光的强度,改进了的组件在多路复用毛细管阵列的检测方面是属于特别有优点的,并在无需成像的镜片的情况下能成像大范围的毛细管阵列。这是一个显著的优点,特别是当在 UV 工作时,对于它要生产合适的镜片那是非常困难的。然而,这组件在单根毛细管和阵列这两者中都有益处,尤其是在无须镜片的情况下,使能实现简单的和改进的曝光定位和可接受低的毛细管间的交叉干扰。除此之外,本发明组件的好处在于根据通过毛细管或其它样品容器纤芯的已增加的总光流量适于在短的路径长度上工作,而在路径长度上的减少可导致机会在不现实地不遇到高水平的溶剂情况下,在低于 190nm 较低波长处进行吸收率检测。

[0009] 因而,在本发明最主要的方面提供一种光学组件,它包括光源,至少一个样品容器和检测器,该至少一个容器以能使经过这容器传输光的方式被设置,在源和检测器之间形成的光路或诸路径中,其中这光源适于提供一束基本准直的光,该检测器包括多个检测器位置,以及该容器包括壁和适于包含用于检测的样品的相对形状尺寸的纤芯,并限定至少两条在空间分开的传输光路,只进入和离开该容器壁的第一壁路径,与进入和离开该容器壁和另外还有容器壁的第二纤芯路径在空间分开,其中在空间分开的壁和纤芯路径被耦合到检测器上的专用检测器位置上。

[0010] 较佳的是,检测器是阵列检测器,较佳的是,该检测器适于检测并提供关于有关的壁和纤芯路径光传输的信息。较佳的是,把该组件耦合到用于显示关于有关的壁和纤芯路径光传输的信息或用于显示关于纤芯路径光传输的已定位的信息,已定位的相对于壁路径的光传输。

[0011] 较佳的是,该组件限定一个中心的纤芯路径和在其两侧的两个周围的壁路径,或在那附近的一个环形的壁路径。诸路径可在离容器出射处重叠并离容器有较大的间距。较佳的是,把壁和纤芯路径耦合到在容器的一外壁到检测器间隙即距离为  $d$  处检测器位置,

在距离  $d$  处就是诸路径在空间被分开的, 较佳的是给出纤芯和壁光束流的大于 90% 的间隙。这组件可把容器放在两个或更多的分开的光路上来产生耦合到两个或更多的检测器或检测器区的两组更多组在空间分开的传输光路。1

[0012] 较佳的是, 该组件由在  $3\mu\text{m}$  到  $20\text{mm}$  的范围内的内部容器尺寸, 在  $4\mu\text{m}$  到  $30\text{mm}$  的范围内的外部容器尺寸, 在  $1.3 < 1.6$  的范围内的容器壁折射率, 在  $10\mu\text{m}$  到  $> 300\text{mm}$  的范围内的容器壁到检测器间隙  $d$  来表出其特征, 并供检测包括在具有折射率在 1.3 到超过 1.5 溶剂中的分析剂 (analyte) 的样品之用。关于本文的一个样品是容器的包含物, 它可包括单一的或多重的组分。多重组分可作为均质或非均质的混合物呈现出来, 并可进行随时间的迁移, 即可以是任意地包括已溶解的相组分的多个液相组分; 或可包括一种或多种分析剂, 它在检测一种或多种溶剂或象颗粒相样品组分中是需要的, 例如在产生或消耗作为分析品种的化学反应的过程中。

[0013] 在一特殊的优点中, 本发明的装置使横过至少一个样品容器的纤芯路径的光束, 通过横过同一样品容器的壁路径的光束, 实现曝光定位。这些光束在空间是靠近的, 较佳的是邻近于这阵列检测器, 便于作为纤芯光束对壁光束之比的直接定位。在另一优点中, 这两束光束是属于邻接的始端, 从而纤芯和壁光束具有高的可能性从在光源中同一区发射, 而消除由于例如不稳定性或空间不均匀性而引起的光源起伏效应。所以, 本发明的组件可以在散粒噪声极限中工作。

[0014] 较佳的是, 光源包括任何有源或无源的光源, 例如, 可在光源产生光或它可被传输到光源并在那里发射, 例如, 它可被光纤传输到光源。较佳的是, 该光源包括被一种或多种吸收品种吸收的至少一个波长, 其中该吸收品种的吸收率是要被检测的。例如, 如对从远的光发生器用于照射的需要, 则可从光纤镜片耦合光源输出, 或可从一个点耦合到用于区域照射的线光纤。把输出耦合到单根光纤减少了由灯管放电在空间分布的起伏而造成的噪声贡献。

[0015] 光的波长可以在  $160$  到  $1200\text{nm}$ , 较佳的是  $180$  或  $190$  到  $1200\text{nm}$  的范围之内, 相当于 UV, UV-vis 到近红外 (NIR), 且较佳的是相当于 UV-vis 的  $180$  到  $700\text{nm}$  的范围之内。它是特殊的优点, 因为本发明能在  $3\text{--}500\mu\text{m}$  范围之内的较低路径长度时实现高灵敏度的吸收检测, 而这样能在相当于 UV 的  $160$  到  $190\text{nm}$  范围之内的较低波长时工作, 而这个范围通过已知技术在某些用于样品吸收率检测的溶剂中是不能实现的。因而, 本方法比正常的 HPLC 或分光光度计法更与溶剂无关。

[0016] 光源可以是适于通过小型容器或细长容器来照射一部段的点光源或线光源。光源可以是单一波长或多个分裂波长或波长范围。光源可以是可调的光源, 给出可调的平滑输出, 线输出灯管只给出在一个波长的非常强烈的输出, 光谱光源沿线光源或诸如此类光源的长度给出一波长范围; 且可以是随时间连续的或脉冲的。当在波长范围上要获得光谱时, 较佳的是具有连续输出的光源。通常线光源在特征波长处提供更强的输出, 且当样品在这些波长吸收时, 是有好处的。在连续波长弧光灯的情况下, 波长选择例如通过诸如在光源和准直装置之间, 或在准直装置和样品容器之间, 较佳的是在准直装置之前放置干涉滤色片的已知技术是适宜的。或者可使用滤色片轮或可变的干涉滤色片, 用来在多个分立波长上顺序的波长检测, 或可使用以诸如光栅或三棱镜单色仪的形式的波长色散装置, 给出沿毛细管长度或与毛细管长度成直角的可变波长, 其中光栅或三棱镜或者可固定于位置上或

者连续地可变,且把光展开为光谱。

[0017] 较佳的是,光源包括碘,锌,镉或汞灯,或激光器作为线光源;或氙,氙或钨灯作为连续输出灯;或氙灯作为脉冲输出灯。

[0018] 更佳的是光源包括氙弧灯(用于UV光吸收)或氙弧灯(用于UV-vis光吸收);或包括钨灯,更佳的是白炽丝灯(用于可见光吸收),及诸如类似的灯;最佳的是,从上面的氙,碘,锌,镉,汞或氙选出的高输出弧光灯;或者光源包括线光源,较佳的是下列中的一种用于UV:碘,锌在214nm时,镉在229nm时,或汞在185,254或365nm时;或者光源包括激光器,例如,在UV时,诸如四倍频的激光器Nd:YAG在266nm时,或Nd:YLF在262nm时,或He-Cd激光器在325nm时。

[0019] 可用已知的方法把光源扩展并重新准直,例如,采用圆柱形如球形透镜元件及诸如此类的透镜,较佳的是采用细长透镜或诸如圆柱形熔凝氧化硅透镜或诸如此类透镜的圆柱形光学部件,来产生适于样品容器阵列区域照射的准直光束。

[0020] 在本发明组件中的至少一个样品容器,可包括一根管子即管道,它可以是做成封闭的或开口的末端和做成封闭的或开口的和顶,意欲用于静态或动态的样品检测。容器可以是对准的,用来在任何适合的平面上通过该容器传输光。适宜的光传输是通过垂直于或含有该容器的末端即基底和顶的平面。

[0021] 较佳的是,该样品容器是单一的管子或在诸如矩形正方形阵列的一阵列中多根管子中的一根,例如在微滴定板,井板或多样品板中的;或者是诸如在微流体的输运和分离领域中熟知的微毛细管或微制造的沟道的毛细管,更佳的是单根毛细管或微沟道,或在平行阵列中多根毛细管或微沟道中的一根。

[0022] 样品容器阵列在垂直于准直光路的平面中是对准的,从而光只经一个容器通过。在照射方向是在含有容器基底和顶的平面中的情况下,光通过侧壁(壁路径)进入和离开各容器,或通过顶进入和通过基底(纤芯路径)离开,且在这个情况下,诸容器可在平行的即方阵阵列中对准;在照射是经过垂直于容器末端的平面的情况下,光通过近侧的侧壁(壁路径)进入和离开各容器,或通过左边侧壁进入和离开,出射到纤芯中,进入并离开对面的侧壁(纤芯路径),且在这个情况下,容器可在平行阵列中对准,即只是一个容器深。

[0023] 对于1:1的照射:检测,准直光路具有基本上对应于检测器阵列宽度和长度的尺寸,且对应于各个要作光学检测的样品容器所需的宽度和长度。在阵列要避免来自相邻容器的光在空间重叠问题的情况下,照射:检测的倍率,较佳的是在0.8-1.5:1的范围之内,而对单个容器则是在0.5-2:1的范围之内。

[0024] 经过容器壁和纤芯通过的光,在进入和离开这些壁,并另外,在进入和/或离开纤芯时被折射。在通过管子或毛细管的长度,或通过做成笔直壁的管子或毛细管的横截面照射的情况下,出射壁和纤芯光路保留它们各自的次序,即基本上没有各自路径的相交或会聚,至少在离容器外壁到检测器的距离d。

[0025] 在本发明的一个特殊实施例中,组件的容器是一个提供正方形横截面毛细管的微制造的器件,且适用于具有通过容器的经过多个通道的加强光吸收的法布里-波罗(Fabry-Perot)照射。在这个情况下,在吸收区之内,用反射的镀膜来镀容器的壁,从而在与壁成小于90°的角,通过左边的侧壁,光进入在邻近吸收区的照射区中的容器纤芯,并至少一部分的光在对面壁上被反射,在整个吸收区作重复的内反射,并最后在吸收区的末端处

从对面的壁出射。为了便于对准,横过壁路径的光可类似地被反射,但较佳的是不被反射,并如正常的那样完成暴光定位。

[0026] 在通过做成弯曲状壁的管子或毛细管的横截面,例如圆形横截面的毛细管,照射情况下,出射壁光路反转它们各自关于中心纤芯光路的次序,即对检测器的距离  $d$  之内,有各自壁路径的相交。在这个情况下,本发明的光学组件,为了能在空间分开壁和纤芯光路,由经过容器的折射图形来表出特征。较佳的是该组件由样品容器各自的外直径和内直径,和由样品容器诸壁各自的折射率来表出特征,因而,壁和纤芯路径在空间被分开,如在本文前面所限定的。

[0027] 较佳的是,容器壁的折射率大于包括在纤芯中任何样品的颗粒相的折射率。较佳的是,该壁的折射率是在 1.34-1.59 的范围之内。较佳的是包括在纤芯中颗粒相样品的折射率是在 1.32-1.48 的范围之内,更佳的是,1.32-1.38。容器壁的折射率可通过包覆来修改,或相反把较高折射率材料结合进容器壁,作为壁的 部段,透镜等。

[0028] 另外,较佳的是,容器的外壁和内壁是属于一种形状和尺寸,由此,通过纤芯传输的光是会聚的,并形成具有未偏转光束路径的光束,即具有与入射的准直光连续的光束路径。在一外侧壁位置处进入该壁,并在第二外侧壁位置处离开,只经过样品容器的壁通过的光,可以被偏转或未被偏转,较佳的是,如果被偏转的光相对于纤芯光路是发散的,使得形成两类光路在空间是分开的。

[0029] 将会理解,根据采用准直光源并知道样品容器和包含在其中的任何样品的折射率,则可对任何给定形状和尺寸的容器外壁和内壁预测经过容器任何点通过的光路,这样来选择使得经过正方形或矩形横截面容器而通过的准直光,正交和平行于各自的壁,基本上出射未折射的和平行的光;而经过呈弯曲的或成角度的横截面容器通过的准直光,则出射具有折射角度的梯度的均匀发散或会聚的光。这能实现高对称性和 / 或均匀性的出射光路的产生,它可被操作来成像和曝光定位,如在本文前面所限定的。

[0030] 较佳的是,至少一个样品容器,包括传输光路的平面上具有是正方形或矩形,呈弯曲的圆形或成角度的,或其组合,且是对称的或非对称的,较佳的是对称的横截面。此外,样品容器包括外壁和内壁,它们可以是相同的横截面即形状,或可以是不同的,例如,一个可以是圆的,而一个可以是正方的。通过这横截面的样品容器壁可以是连续的或非连续的,例如,容器可以是开口的或封闭的,而较佳的是封闭的。封闭的容器可通过它的横截面具有连续的壁,或可包括具有单独的封口即盖的连续的基底和侧壁。较佳的是,外壁是正方形开口或封闭的或圆形封闭的,而内壁是正方形的或很好修整过的开口或封闭的,或基本上是正方形的具有微制造的用作透镜面的凸或凹的内壁部段,或用作透镜面的凹,凸或呈三棱镜形状的外壁部段。

[0031] 较佳的是,样品容器的外壁和内壁中的至少一个是圆形横截面的,从而,获得折射和纤芯与壁光束的空间分离,较佳的是,外壁和内壁是同轴圆形的横截面,因而,这样来限定具有外直径和内直径的环形壁,使能获得折射和纤芯与壁光束的空间分离。

[0032] 将会理解,为了获得所需折射和空间分离,可根据容器材料和形状的性质,以及被包含于纤芯内的样品来选择样品容器尺寸,折射率和 / 或容器到检测器的距离。因而,该装置由下列性质的关系来限定,这些性质在这里作为流程方案,而不是作为数学关系来示出:



[0033]  $i. d./o. d.+r. i. (\text{溶剂})+r. i. (\text{容器}) \rightarrow d_{\min}/o. d. \rightarrow d_{\min}$

[0034] 此处 + 意味着一种空间关系, 将采用合适的光线跟踪软件来计算它, 以给出用于容器和组件尺寸的值。

[0035] 具体地说, 知道尺寸和折射率, 例如采用 Zemax 软件, 可把光线跟踪用来产生能推导出在诸如  $d_{\min}/o. d.$  的尺寸之间关系的示意图。示出圆柱形容器横截面和检测器表面的示意图示于图 5: 在此用括号来给出的符号是用于内直径 ( $i. d.$ ), 外直径 ( $o. d.$ ) 和外壁到检测器的距离 ( $d$ )。较佳的是, 例如对具有圆形外壁或内壁横截面, 并由石英即硅石构成的样品容器, 并对折射率在 1.325-1.345 范围之内的折射率的溶剂 (例如包括典型的反相 HPL (溶剂甲醇, 水和乙腈)), 对采用入射到容器上的准直光的纤芯和壁光束的空间间隔的最小距离可从表 I 中给出的值来计算。例如, 对比例  $i. d./o. d. = 0.50$ , 为获得光束分离  $d/o. d.$  的最小值 (限定为  $> 90\%$  纤芯和壁光束流的间隔) 是 0.5。对具有相当于这个判举的实际尺寸的毛细管来说, 例如,  $i. d. 100 \mu m$  和  $o. d. 194 \mu m$ ,  $d/o. d.$  的最小值为 0.5, 因此  $d$  的最小值为  $100 \mu m$ 。

[0036] 具有尽可能高的  $i. d./o. d.$  的好处是具有低的  $d/o. d.$  值, 以便把在相邻容器间的检测器交叉干扰减为最小。

[0037]  $d/o. d.$  值大于该最小值是允许的, 但该值越大, 对把容器放置得如何靠近则受到越多的约束。

[0038] 在有些情况中, 纤芯和壁光束没有分离是可能的。例如, 对圆柱形容器, 这种情况发生于两个普通的场合中。首先, 在纤芯中, 材料的折射率太低, 例如在硅石或玻璃容器中的空气 (图 6)。其次, 如果比率  $i. d./o. d.$  太低, 例如在  $i. d./o. d.$  比率为 0.2 的硅石或剥离容器中的水 (图 8)。对在图 8 中的毛细管的实际尺寸是  $i. d.$  为  $75 \mu m$  而  $o. d.$  为  $364 \mu m$ , 一种广泛地用于毛细管电泳的毛细管类型。图 7 示出对相同  $i. d.$  但较小的  $o. d. 194 \mu m$ , 容易地获得了光束的分离。

[0039] 对填满圆柱形容器的光学性质的考虑, 指出了折射率和  $i. d./o. d.$  的约束是互相依赖的, 强调对各容器和内含物类型, 各种情况应对它的优点作考虑。

[0040] 在容器内含物的折射率高于容器壁折射率的场合下, 除了在不合理地接近到容器外壁的距离之外, 不可能有光束的分离。

[0041] 容器可与在出射的光路中另外的光学部件有联系, 以聚焦或相反, 操纵在空间分离的光束类型中一种或两种。

[0042] 这阵列可在各样品容器之间包括固定的或可变的垫片, 在对具有壁  $W$  和纤芯  $C$  的容器 123 等的序列中来调节出射光束  $B$  的间距, 如图 A 所述, 例如其中各光束对应于一个阵列检测位置:

[0043]  $B1W1C1W1B2W2C2W2B3W3C3W3 \dots$

[0044] 如果需要, 相邻壁可以是一致的:

[0045]  $B1W1C1W/B2W2C2W/B3W3C3W/\dots$

[0046] 其它的步骤之外的安排是可能的, 但可能需要更复杂的耦合和检出位置的读出。

[0047] 垫片可包括设计来屏蔽壁光路的全部或一部分的细长的滤色片, 或屏蔽部分容器壁, 从而限制壁光路的滤色片, 在两种情况下, 都为相互毛细管间的杂散光和交叉干扰减到最小。

[0048] 所以,垫片可以是任何用来组合间隔和过滤的合适材料,可选择地,还能为至少一个样品容器起到支承工具的作用,且是诸如用玻璃填塞的不透明聚合物的合适不透明材料。

[0049] 样品容器可由任何透明的聚合物,玻璃,石英,硅石,例如熔凝硅石或其它材料组成,较佳的是需达到光学级。光学级聚合物包括诸如聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 的各类硅氧烷,基于降冰片烯的无定形聚环状烯,和聚甲烷丙烯酸酯 (PMMA),聚碳酸酯,以及其它一些透明柔性的聚合物和氟聚合物。作为透明柔性管材的柔性透明聚合物可在市场上买到,诸如象 Ultem 的聚醚亚胺,聚丙烯,包括透明的 PCTFE,ECTFE,ETFE,PTFE,PFA,FEP 或 PVDF 树脂的氟聚合物,较佳的是氟聚合物 Tygon Chemfluor367 及诸如此类的氟聚合物。

[0050] 容器壁可以部分或全部是透明的,且较佳的是整体要用相同的材料。

[0051] 一种如在本文前面所限定的毛细管可包括任何挤压成形的毛细管,或微制造的毛细管或沟道或其它平行细长的封闭管导装置。毛细管可以是柔软的或坚实的,且沿着它长度的全部或部分可以是直的或弯曲的。

[0052] 毛细管阵列如微制造的沟道阵列在市场上可买到。通常,毛细管阵列通过抽拉或挤压而制造的,形成高度均匀尺寸的中空圆形横截面芯。通常,微制造的阵列通过从一工具注入模铸而制造的,形成中空的正方形或矩形横截面的沟道,然后,可任选地,用覆盖薄层将它密封,并提供高度精确沟道绝对的可重复性,和沟道设计的灵活性。

[0053] 一种样品容器,其可包括任何容器数的阵列中的一部分,在市场上能买到的阵列包括 8 到 1536 个容器,较佳的是 8-520 根毛细管或 96 到 1536 个套管 例如 8,12,16,24,32,48,或 96 根毛细管或 96,384 或 1536 个套管。

[0054] 容器可包括大数目容器阵列中的一部分,这种容器可在未来能买到,以成薄层平面的形成,在一系列平面中构筑器件对接已经而制作的微制造阵列正获得认可并有广泛的应用。它们在制造的精确性,可重复性,轻便和灵活性上具有无数的优点。

[0055] 容器可具有任何想要的间隔,适宜的是熔凝或邻接的,或是间隔开的。较低的间隔增加了封装密度,但较高的间隔减少了容器间干扰,尤其是光学干涉。可采用容器间的空隙是本发明的一个特殊优点。这在上面的 Yeung 等人的实施例中是不可能的,例如,它需要最小的容器间隔以把杂散光降至最小。

[0056] 根据所需的应用,容器可有适宜的长度和深度。对毛细管或沟道,较佳的是,长度在 2cm-2m 的范围之内,例如,对微制造的沟道,在 2.5-6cm 的范围之内,或对毛细管,则在 6-100cm 的范围之内,更佳的是 10 到 60cm。较大的长度能在毛细管电泳中施加较高的电压并改善间隔。对微滴定板套管,可选容器间中心到中心的间距与标准微滴定板规格一致,诸如 2.25,4.5 和 9mm。

[0057] 较佳的是,容器的深度或内直径为  $3\mu\text{m}$  到 20mm,而外直径为  $4\mu\text{m}$  到 30mm,更佳的是,深度或内直径为  $9\mu\text{m}$ -3mm,而外直径为  $10\mu\text{m}$  到 3.5mm,更佳的是 10-380  $\mu\text{m}$ ,最佳的是,深度或内直径或外直径为小于或等于 200  $\mu\text{m}$ 。对本发明的光学性质来说,容器壁的适宜厚度是重要的。这时小内直径容器是特别有关的。因此,可选择容器的内直径,即“孔径”,以选定的容器壁材料,和确定的适宜外直径相应地给出所需的光学性质。对具有在 20 到 250  $\mu\text{m}$ ,例如 20,25,50,75 或 100  $\mu\text{m}$  内直径(下文用 i. d.) 的硅石毛细管,其外直径(下文用 o. d.) 较佳的是在 100 到 380  $\mu\text{m}$  的范围之内,例如 150,200 或 360  $\mu\text{m}$ 。例如,容器可

以是 75-100  $\mu$  m i. d. 和 194  $\mu$  m o. d. 或 180  $\mu$  m i. d. 和 364  $\mu$  m o. d.。重要的是要注意,对作为广泛应用于毛细管电泳的具有 75  $\mu$  m i. d. 和 364  $\mu$  m o. d. 的容器来说,在用含水溶液工作时,芯和壁光束不可能有分离。对硅石毛细管,厚度适宜在 30-500  $\mu$  m 的范围之内,例如 30-150  $\mu$  m;低 i. d. 的容器,较佳的是具有低的壁厚,以给出 2-4 例如 0.25 最小的 i. d. 对 o. d. 的比率。

[0058] 当用较大直径反应容器工作时,施加相似的约束,但是正常地, i. d. /o. d. 比率归入给出适合的光束分离的范围之中。例如,具有 i. d. 为 20mm 和 o. d. 为 30mm 的剥离反应容器具有等于 0.67 的 i. d. /o. d. 比率,这个值使得用所有常用的溶剂 能有光束分离(参见表 1)。对聚碳酸酯反应容器和作为溶剂的水来说,对 i. d. 为 0.33cm, o. d. 为 1.0cm 将是适宜的,但 1.5cm 的 o. d. 将是不适宜的。对具有 i. d. 1/16”(1.6mm) 和 o. d. 1/8”(3.2mm), 其 i. d. /o. d. 为 0.50 的代表性的氟聚合物管子, Tygon chemfluor367 来说,对大于 0.4d/o. d. 之比的所有值,即  $d > 1/20$ ”(1.3mm), 获得了用溶剂水的光束分离。但是,当在这种管子中,用己烷作为溶剂工作时,容器内含物的折射率大于壁的折射率(折射率的值在表 1 的脚注中给出),而除了在不合理地靠近容器外壁的距离处之外,不可能有光束分离。

[0059] 样品容器可以是中空的或被装填的,例如可包括稳定、相或可被镀膜或相反用如在本领域中熟知的适宜的材料构造,例如在 HPLC 中。如出现适宜的装填,那么折射率就相当于颗粒相样品或相当于包括在待检测样品中的溶剂。

[0060] 较佳的是,容器包括出现在压力驱动或电驱动分离的柱或毛细管的内部零件和部件特性,包括 HPLC(用于压力驱动)或毛细管电色谱分离法(CEC)(电驱动等价于 HPLC,由结合或分配系数分离,采用例如疏水的稳定相),胶束电动的色层分离法,和毛细管电泳,包括等电位聚焦(通过与分子的尺寸和形状无关的等电位点的 IEF 分离),等速电泳(ITP),毛细管区电泳(通过电荷对尺寸比率的 CZE 分离)和动态、场梯度聚焦(DFGF,此处恒定的流体动力由在这电场中的梯度所反抗,这使带电的分子根据它们明显的电泳迁移率和分析剂,例如蛋白质,选择性的浓度、聚焦—参见“Digitally controlled electrophoretic focusing”Huang and Correlius. Anal. Chem, 1999, 71, 1628-1632)的毛细管电泳。

[0061] 在样品容器和检测器之间的间隙  $d$  是适宜的,使得便于在空间分离的光路对检测器位置的耦合。适宜的是间隔是容器 o. d. 和光路分离程度的函数,且由比率  $d/o. d.$  小于 10 给出的较佳,例如,是在 0.5-5 的范围之内,较佳的是,0.5-1。在本发明光学组件的特殊优点中,当用间隔的量级在 50-360  $\mu$  m,例如 200  $\mu$  m 的毛细管工作时,可实现极为小型的结构。由于  $d$  值越小,组件就越小型和耐用,且在检测器传输的光束就越强,所以这是特别有利的。在有或没有插入光学部件,较佳的是在没有插入光学部件的情况下,间隔  $d$  可适于依次耦合在空间分离的光路,如在本文前面所限定的。

[0062] 有一些在市场上可买到的阵列检测系统,包括例如常用的光两极管和新近可买到的电荷耦合器件(CCD)以及有源像素传感器(APS),例如互补金属氧化物半导体(CMOS)。

[0063] 所以较佳的是,根据本发明的阵列检测器包括固体传感器件,更佳的是, CCD, CID 或 CMOS APS。检测区可以是任何所要的面积尺寸,且适宜的区大小基本上等于与光路垂直的平面上的容器或阵列横截面,对应于一对一的图像。检测区可包括一个或多个阵列检测器。

[0064] 较小的区域尺寸增加了噪声并降低了灵敏度,然而可提供较低的成本。较佳的是,

在诸如  $1024 \times 256$  象素 CCD (MAT CCD30-11) 的相对小面积的器件中, 这装置包括最低的噪声和最高灵敏度的 CCD。

[0065] 供本发明装置之用的 CCD, 在两个尺寸中都可具有 22 到 5000 或更多的象素, 较佳的是 256, 512, 770, 1152, 2048 或 4096 个象素, 象素尺寸 7 到  $35 \mu\text{m}$ , 较佳的是 20 到  $30 \mu\text{m}$ , 更佳的是 22 到  $30 \mu\text{m}$ 。较佳的是, 例如每毛细管 10 个象素, CCD 包括 3 到 28, 例如每个壁 100 个象素则包括 30 到 2500。较佳的是, 不要把成像区外面的象素数字化以减少读出时间。

[0066] 在市场上能买到的 CCD 可包括一销子 (stud), 用来保护 CCD 表面, 它一般嵌入 CCD 的保护封装中来保存图像质量。较佳的是这销子包括一镀层来吸收入射光并以不同的波长再重新发射, 把 UV 转换成可见光, 使得能通过 CCD 检测。镀层则是例如磷光物质的镀层。可把这磷光物质镀层直接涂敷到销子上或到交插在销子和毛细管之间的覆盖率, 可在不需要调换销子的情况下, 便于通过调换这覆盖罩来按需要更换这磷光物质。

[0067] 把各相机的对接到控制装置, 较佳的是, 提供合适的象素读出率的处理控制装置, 适宜的是 MHz 的量级, 较佳的是, 大于 4 或 5MHz。

[0068] 较佳的是, 这处理装置为在芯片上电荷储存程序的选择, 以增加信号电流 (每秒光电子数) 和用于读出感兴趣区域的选择来编程。另外, 这处理装置控制相机的读出并收集, 存储和分析数据。

[0069] 在包括意欲用于动态样品检测的管道样品容器组件的情况下, 较佳的是, 这装置为最佳条件峰检测和参数化 / 性能鉴定, 以及为包括装置和系统的封闭回路反馈控制的自动系统管理的潜力用实时信号处理来工作。例如, 反馈可包括停止或减慢随着在检测窗口初始观察到的流动, 以使样品能保存在检测器窗口中并给出较长时间用于数据识别和加强信号对噪声之比或便于沿容器长度的检测。流速可通过调节电场 (如在毛细管电泳中) 或通过调节压力 (如在液体色谱分析法中), 或通过这两种的组合来控制。对于由离心力驱动流动, 流速控制是通过调节角速度来实现的。

[0070] 适宜的是, 这组件包括检测在检测窗口中样品存在的装置, 和当检测到有迁移到窗口的中央时 (参见图 13), 用来关断电压的反馈控制装置。反馈控制装置适宜包括用于监控由于作为时间函数的扩散而引起的样品峰值接着发生的变宽, 和用于峰方差随时间变化的分析, 和确定扩散系统, 使分析剂的流体动力半径得以导出的装置, 以及用于与在给定的场强下, 从取自到达窗口所花的时间取得的使能导出在分析剂上电荷的迁移率组合的装置。由于具有高斯分布的峰褶合能使峰变宽的高斯分量被取出, 所以这控制装置能用任何启动的峰形状来工作。用本发明组件得到的数据质量是这样的, 使得能以小于 3 分钟的良好精密度来测量扩散系统。这组件可用于测量小分子和大分子这两种的扩散系统, 大小和电荷数, 其中大分子包括蛋白质, DNA, 和多糖分子, 并对分析超速离心机方法提供一种较简单的替代法。

[0071] 或者, 封闭回路反馈可包括诸如峰识别和判定的装置, 使得用于指令开关阀门并控制开关次数的元件能实现小部分收集, 或把小部分引导到质谱仪, 例如, 通过电喷射接口, 或者导引 NMR 光谱仪。用于在阀门前和后观察流束的装置能使开关装置的分析剂开关和效率质量受到监控。图 14 给出封闭回路式反馈控制的示意例子。较佳的是, 这组件把毛细管放在两个分离的光路上并产生耦合到两个检测器即检测区的两套在空间分开传输

的光路,在这两个检测区之间有开关阀门,这洗提液在检测器的第二通道中再次受到监控,以致可监控开关过程的效率。换一种方法是通过检测器的开关阀门要有更多的输出用来目视观察。

[0072] 封闭回路反馈还可在多个容器中例如在毛细管阵列中包括,控制样品的速度,来协调依次离开的时间,或用于把在不同毛细管的样品组合成同时共用离开的方法。可通过控制电压或压力,例如泵抽流率来控制速度,并可用开关器件来工作。速度能在所想要的时间停止样品流以与一事件一致,这事件要在样品上实现或要在样品中发生的。已被控制的离开可能是为了随后的小部分收集或分析,例如把毛细管束的输出通过电喷射对接到质谱仪,或到 NMR 光谱仪或诸如此类的谱仪。

[0073] 较佳的是受控制的回路反馈由建立跨越毛细管长度的电位差和 / 或电改变所加电压来控制样品的迁移来提供的,包括减慢或停止来改善信号 / 噪声比并包括定时的样品迁移来获得所要的样品到达在一点处的时间以转换到诸如质谱仪 的样品收集装置中。这系统可用压差和泵抽,电场驱动器,柱开关等来工作。所以较佳的是,毛细管在其末端处或沿其长度在检测器的附近或与电路系统在一起各检测区包括电极,阀门,或压力调节器以控制电极或便于泵抽的控制。在电压控制的迁移情况下,较佳的是,样品容器被连接到缓冲器供应,并把电场作这样的安排,使得缓冲器供应和样品导入是在毛细管的高电位端,此处高是相对于地来说的可以或者是正的或是负的。

[0074] 在本发明的另一方面中,提供一种柱或毛细管分开的器件使用的光学组件模件,如在本领域中熟知的,其中容器是毛细管或柱,它包括在一端处的对接装置用于插入柱或毛细管分开的器件的引出口,并任选地包括对接装置使在另一端处能插入到分析装置的引入口中,或在两个末端处包括对接装置用于沿毛细管或柱的长度的插入的接口装置。用于沿柱或毛细管长度插入的模件一般具有匹配 i. d. 和 o. d. 的柱或毛细管部段作为能让平滑的流渡越的分开器件或对接装置。

[0075] 在本发明的另一方面中,提供一种适于设置在毛细管或柱的部段附近光学组件的夹住器件,这毛细管有如在本文前面所限定的适宜的 i. d., o. d. 和折射率,包括设置到分开器件的毛细管或柱附近的装置。可任选地,毛细管或柱具有插入到质谱仪中的引出口,在这情况下,这夹住器件尽可能被设置在靠近质谱仪处。在一个夹住器件的情况下,这分开器件的毛细管或柱可被剥离任何表面镀层以便于本发明方法的操作,从而,被剥离的诸如毛细管电泳或微孔 HPLC 部段的毛细管或柱提供组件的样品容器。

[0076] 在本发明的另一方面中,提供一种用于化学反应或合成和分析,或用于样品分离或运输的装置,其中该装置包括如在本文前面所限定的光学组件。这化学反应容器本身可以是圆柱形的,而在束流模式中监测的反应作为时间,以及用于停止反应的反馈控制的函数、- 例如通过淬灭试剂的掺和物,通过温度的变化,或通过排出容器的内含物。或者,反应容器可以是管状的,并用于连续流模式。这装置可包括用于把一种或多种反应物引入到至少一个样品容器,与用于调节反应条件的装置一起,在至少一个样品容器之内形成所要的化学合成反应的多个装置;或可包括用于样品的引入口和引出口以动态的方式进入至少一个样品容器,与用于在跨越容器两末端处施加压力差或电位差的装置和供应诸如缓冲剂的分离媒质的装置一起,以便在至少一个样品容器内完成分离的装置;或可包括诸如在本领域中熟知的具有与至少一个容器的引入口端对接的出口的色层分析法柱的分离装置,如

在本文前面所限定的,用于已分离样品的动态分析。

[0077] 在本发明的另一方面中,提供一种检测通过包含在如本文前面所限定的光学组件的至少一个样品容器纤芯之内的至少一个样品传输的光的方法,它包括用基本准直的光源或几个光源照射这容器,并在检测器中检测透射光,其中透射光在空间被分开为至少两条光路,一条已经只经过容器壁通过的壁路径,与纤芯路径在空间分开,它已经经过壁和纤芯通过,其中在空间分开的光束被耦合到在阵列检测器上专用的检测位置。相适应地,本方法包括对应于装置特点和在上面概述的实施例的任何特点或实施例。

[0078] 较佳的是,本方法是一种用于检测来自在样品分析中的样品的光的方法,例如对高通过量筛分 (HTS) 或图形分布或诸如酶测定的测定;并在医药,生物医药和生物科学,保健,农业化肥,兽医,工业,环境或材料或类似的领域中使用它,用于对包含于容器中的样品检测,分析,特性鉴定和量化等,以及还可任选地收集其已被分离的组分;尤其是在组合化学中;在新陈代谢,蛋白质体或基因组,测定和高通过量筛分分析应用中,一般,高灵敏度分析,分离和 / 或定量研究和例如对色层分析法或电泳的样品分离,尤其是用实时或后分离分析的柱色层分离法,毛细管电泳,在医院或外科血液测试和其它测定中,在工厂的质量控制中,在环境农药程度的监控及诸如此类的监控中。

[0079] 本方法可以是一种用于检测来自静态或动态样品的光的方法。一般,静态样品是包含在如本文前面所限定的末端封闭的样品容器中,更一般,是在管子即探管的形式容器中,它可以是多个容器中的一个,例如在如本文前面所限定的在微滴定板或探管板或样品板中,从酶测定或其它多重样品分析中得到的样品可以在这个形式中作检测。

[0080] 在一实施例中,本方法是一种用于单毛细管或多毛细管吸收率检测的方法,它包括抽取溶剂,然后通过毛细管作用,压力,移液管等取样到诸毛细管中,在样品和溶剂的透射率上进行差异的检测,并把样品安排或吹回到原处。本方法在生物科学中用来对微滴定或更少的小样品体积作吸收率是有用的。酶测定可用一个或两个进入该容器的束流来进行,并检测与时间有关的变化,对酶测定,通常是在分布图形方面。

[0081] 一般,动态样品是用电或压力来驱动的,并出现在如在本文前面所限定的末端开口管道型容器中,诸如具有引入口和引出口末端的毛细管用来经过毛细管的样品流动,这毛细管可以是单根毛细管或如在本文前面所限定的毛细管阵列中的一部分。从高通过量筛分或者从分离或输运技术取得的样品可用这个方法被提供用于检测,其中从分离技术所取得的样品可被提供到用于在毛细管内的分离,随同光透射的同时检测,或可在诸如柱色层分析法的分离方法中被分离,而来自该柱的被分离的样品流直接耦合到用于光透射检测的毛细管中。

[0082] 较佳的是,用于检测动态样品的方法是一种用于如在本领域中熟知的柱或毛细管分离的方法,相应地选自包括 HPL(用于压力驱动)或毛细管电色层分析法 (CEC)(用电驱动等价于 HPLC,通过结合或分配系数,采用例如疏水的定态相分离),胶束电动的色层分离法的压力驱动或电驱动分离,和包括等电位聚焦(通过与分子的尺寸和形状无关的等电位点的 IEF 分离),等速电泳 (ITP),毛细管区电泳(通过电荷对尺寸比率的 CZE 分离),和动态场梯度聚焦 (DFGE,此处恒定的流体动力由在这电场中的梯度所反抗,这使带电的分子根据它们明显的电泳迁移率和分析剂,例如蛋白质的选择性的浓度聚焦 - 参见“Digitally controlled electrophoretic focusing”Huang and Cornelius, Anal. Chem, 1999, 71,

1628-1632) 的毛细管电泳 (CE), 其它的电驱动技术是已知的或可在未来开发。

[0083] 一种用于分子的电泳分离的方法是用如在本文前面所限定的组件, 模件或在连接到缓冲剂供应的毛细管或沟道上的夹位部件来进行的。在跨越毛细管或沟道两个端部加上千伏范围的电场以造成分子迁移。一般, 在高电位一端引入样品, 在电场的影响下, 移向沟道的低电位端。吸收率分析可沿着毛细管或沟道的长度或靠近引出口处进行, 使能观察到发生在毛细管或沟道的长度中的整个过程或其结果。

[0084] 动态检测的另一用处是测量折射率的变化, 通过以高的空间分辨率对垂直于毛细管轴的正光束照射图样的分析, 检测器具有监控在毛细孔中溶剂折射率变化的能力。这将在两种溶剂之间实现区分, 并通过延伸这能力来直接监控在双溶剂混合物中梯度淘析分离期间的游离相成分。如果必要的话, 在垂直于毛细管轴方向上的放大可被用来根据游离相成分来增加分辨率, 这在 HPLC 中是会有好处的。由于溶剂折射率可以是与温度有关的, 所以施加提供检测器温升的向上液流的热脉冲可被用于确定在毛细管 HPIC 中的游离相速度。

[0085] 多毛细管吸收率检测的另一应用是用于快速测量 pKa。此处样品溶液的等分试样被混合到一组覆盖 pH 值范围的缓冲剂溶液, 一般, 范围跨度为 2-12, 然后把所有的混合物按这顺序的缓冲剂抽入进各别的毛细管中, 然后成为缓冲剂加样品的混合物。通过用一个或多个波长做酸和碱形成的测量, 具有不同的吸收率, 可处理由所有毛细管得到的作为 pH 的函数的吸收率来确定 pKa 值。采用适宜的非 - 或弱 - 吸收的无机缓冲剂, 这对包含所有的普通可滴定的功能族, 包括羟基和胺族, 并在浓度降到 100 微克分子时是可适用的。这对于例如医药工业和对高通量筛分是有利的。

[0086] 本发明对于量级微 15-500 的 MW 的小分子样品具有特殊的应用, 但是对于诸如聚合物, 蛋白质, DNA 和其它量级为 500 到  $10^6$  的 MW 的生物分子的较大分子的样品也是有用的。本发明在一实施例中由于它的小尺寸而特别有优点。这可在无须临床的生化实验室的情况下被使用来作样品分析, 例如彩色测定而有益于医院及诸如此类的机构。可在血液样品上进行血液测试, 目前是在实验室中通过快速旋转把它分离为红血细胞和血浆。本发明的组件或者在离心分离之前或者之后可被用来检测红色血液和血浆, 例如可把试剂加到血浆区并观察反应。

[0087] 在另一实施例中, 多个波长检测可沿着毛细管或沟道的长度完成在波长的一个范围中的检测。

[0088] 较佳的是, 本方法是一种有能力或能使在容器中完成某个变换或发生的事件, 并使这事件成像的方法。成像可在变换或整个事件结束时进行, 整个事件的成像需要定时以与在容器中样品的迁移一致, 较佳的是采用如在本文前面所限定的受控回路反馈, 以把样品在容器中的迁移停止在所想要的位置上或为成像的时间间隔上用于成像。

[0089] 例如, 本方法可以是一种用于微生物医药, 生物科学, 保健, 农业化肥, veterinary, 医药, 工业, 或环境的目的观察化学反应的方法, 其中可在引入口和引出口上, 并在耗损中完成多次检测, 以保证所有的反应产品已被收集。这反应可在毛细管形式的容器中进行, 而这容器可被形成弯曲的, 以使采用普通的光源和检测器能易于实现多个位置的检测。

[0090] 在另一实验例中, 本方法包括检测来自医药研究的样品, 这样品是在诸如二甲亚

砒 (DMSO) 的溶剂中以分析剂的形式, 存储在微滴定板中, 这在医药实际中是很普通的。本发明的方法可在样品上完成。这样品或者在微板阵列的原地, 作为在本文前面所限定的容器阵列, 或者在把部分抽取到一根或多根作为单根毛细管或毛细管阵列的毛细管中之后, 少于 9mm, 较佳的是量级为 300  $\mu\text{m}$  或更少的短的路径长度的应用, 使得在没有被 DMSO 溶剂总的光吸收情况下, 实现 UV 吸收率检测。

[0091] 在另一实施例中, 本方法是一种用于测量物理化学性质的方法, 例如分配系数, 包括在容器中的第一溶剂中放置分析剂的样品, 与第二不溶混的溶剂一起, 例如分别为水和辛醇, 并观察该分析剂在两种不溶混相之间的移动。在一特殊优点中, 本发明的方法还能实现溶剂相的成像, 因此他们的界面也是可看到的。

[0092] 在另一实施例中, 本方法可以是一种用于来自对在各容器中不同样品的高通过量分析的多个样品容器的光作检测的方法, 例如用于其比较分析, 或者可以是一种用于检测来自大体积高流量, 或相反颗粒向上流体过程的在各容器中的相同样品, 打算从各样品结合成所想要的成分的高负载方法, 高负载方法可包括从单一 HPLC 引入输出, 例如具有流率超过在单根毛细管中可能的流率, 但适于引入到毛细管阵列中, 然后它可能有效地起着单个检测器的作用。例如本方法可包括检测出现在或离开微孔液体色层分析法柱的样品中的分析剂, 而这柱的直径可以是在微米的范围直到毫米的范围。在多个容器即容器阵列中的高负载比在单一容器中从单一大孔径分离沟道的大规模操作, 在分离方面获得较高分辨率, 并在检测方面获得潜在的较高灵敏度。而且, 在毛细管阵列中可能的路径长度壁在标准 HPLC 管子中可能的路径长度较短, 这使得能实现在如在本文前面所限定的较低波长处工作。

[0093] 一种用于在 DFGF 或多重检测方法中检测的方法, 较佳的是使用如在本文前面所限定的反馈控制。

[0094] 较佳的是, 本方法包括用如在本文前面所限定的范围内选定的包括一个或多个波长的准直光照射至少一个样品容器。在特别有利的照射中是在任何给定的时间中用单一波长准直光源, 因而简化光学检测结果的读出。

[0095] 如在本文前面所限定的样品可包括相适应地出现在用液相溶剂或诸如惰性即非反应液体的潜溶剂溶液中的液相或凝胶相中的一种或多种小的分子的任何样品。溶剂或凝胶体可具有如在前面所限定范围内的折射率。但是相适应地, 这些样品的特征在于其折射率低于样品容器壁的折射率, 但又与他们有相似的量级, 因而, 这样品通常提供会聚的光路。所以较佳的是, 该样品包括一溶液或在溶液中待测的分子悬胶液, 或选自水、乙醇、乙腈、己烷、二氯甲烷、丙酮、DMSO 和其它普通的溶剂和潜溶剂及其混合物的悬浮介质; 或可用好比说 诸如纤维素衍生物例如羟基纤维素和合成聚合物 (例如氧化聚乙烯) 的未交联的聚合物溶液凝胶形式来提供该样品。

[0096] 较佳的是, 本发明的方法包括选择用于分析的样品, 确定被所要的样品的组分吸收最强的专用波长, 为了选择合适的样品容器, 核对样品的折射率, 而样品容器当会有该样品并当被照射时, 将产生如在本文前面所限定的在空间分离的光束, 或选择光学部件, 滤色片等和合适容器的一个合适的组合来检测阵列分离, 以把在空间分离的光束耦合到在检测器阵列上独自的位置。

[0097] 可用已知的方式, 例如, 通过注入、回路注入、移液管、液压静力、电动力、或类似的



注入技术把样品引入到如在本文前面所限定的至少一个样品容器中,并用已知的方式,诸如注入、电喷灯或其它用于排出的接口从该容器移动到到用于储存的另一容器,或到诸如质谱仪的向下液流确认装置。

[0098] 把检测到的光耦合到如在本文前面所限定的阵列检测器上的专用位置。用对应于来自至少一个容器的芯光路的芯检测器位置和对应用于来自容器的周边壁点(或诸壁点)的周边检测器位置的方式,把如在本文上面所限定的至少一个样品容器耦合到多个检测器位置。较佳的是,本发明包括对由检测装置检测到的传输光,例如,如在本领域中熟知的以 CCD 图像的形式成像。较佳的是,本发明还包括由检测装置检测到的光用曝光定位法定位,其中芯光束强度对壁光束强度之比给出一个值,用于在各个位置的样品强度具有或由于光源起伏而引起的闪烁噪声的消除。

[0099] 相应地,所以本方法包括把至少一个样品容器耦合到至少三个检测位置,较佳的是,对微米级直径样品容器的检测位置为了到 25 个,其中可把位置按例如 1 : 1 : 1-5 : 15 : 5 或 8 : 9 : 8 的比例分配,这要根据相对的壁和芯光束的宽度;而对厘米量级的样品容器,每样品容器的像素在 30 到 2500 这个数量,例如根据相对的壁和芯光束宽度,在 5 : 20 : 5 或 10 : 10 : 10 到 500 : 1500 : 500 或 800 : 900 : 800 的比率中。本方法可包括像素相加等用于加强信号强度和噪声减少,如在本领域中所熟知。

[0100] 较佳的是,本方法包括其后通过在样品容器中品种的测量光吸收量,它以在本领域中熟知的方式指出吸收品种的数量,并包括在样品不存在和存在时的光强度。在根据本发明的特别有利的测量中,只是通过测量在壁光束和芯光束中的光强度。取自与样品不存在时一起测量的比率的 $\log_{10}$ ,提供根据皮尔-朗伯特(Beer-Lambert)定律的折射率。

[0101] 吸收率可被成像,例如成为 CCD 的快照,但较佳的是,本方法是用于快照检测的方法,因而,检测被记录在多个有限的曝光之中,例如每秒 5 次曝光,且曝光是超级施加的,在静态例子的情况下是直接的,或在动态样品的情况下是随时间位移的。因而,各别的图像透露出有限的信息,所以检测阵列较佳的是提供被编码的原始数据,并变换到例如以电泳图形式的图解显示。

[0102] 在本发明的另一方面中,提供例如用于高通量筛分(HTS)的样品分析中,例如如在本文前面所限定的阵列中,或者分布图形式诸如酶测定的测定中,使用如在本文在前面限定的光学组件,方法和装置;并在医药,生物医药和生物科学,保健,农业化肥, veterinary, 材料,工业,环境,及类似的领域中使用它们,用来对包含在容器中样品的检测,分析,性能鉴定和量化等,并还可任选地收集其已分离的组分;尤其是在组合化学中;在新陈代谢,蛋白质体或基因组,测定和高通过量分析应用中,一般是高灵敏度分析,在用实时或后分离分析的特殊柱色层分析法,毛细管电泳中,分离和/或量化研究和例如色层分析法或电泳的样品分离;在医院或外科血液测试和其它测定中,在工业质量控制中,在环境农药水平监控中等。

## 附图说明

[0103] 现在相对于下面的例子和图表,以非限制的方式来图示说明本发明,其中

[0104] 图 A 示出本发明的毛细管阵列型容易和光学装置检测器的立视图;

[0105] 图 1 示出用于平行的毛细管吸收率检测的本发明装置的示意图;

[0106] 图 2 示出使用来自 1mm 直径的采用圆柱形和球形熔凝硅石透镜元件的熔凝硅石光纤 (N.A = 0.22) 的输出光的矩形 CCD 面积 (26.6×6.7mm) 的准直照射;

[0107] 图 3 示出本发明光学组件的 CCD 和容器的配置;

[0108] 图 4 示出展示 4 根毛细管 (100  $\mu$  mi. d., 194  $\mu$  mo. d.) 的  $\sim$  3mm 的 CCD 快照中的一部分;成像总面积为 6.7×26.6mm。毛细管的内含物是 1. 空气, 2. 水, 3 和 4 是墨水溶液;

[0109] 图 5 示出根据本发明的光束光线示踪, 该图示出经过充满水的 100  $\mu$  mi. d., 194  $\mu$  mo. d. 毛细管的光路。暗的光线代表经过在毛细管中央的水通过的光, 而亮的光线则表示仅经过毛细管壁而通过的光。虚线示出光纤镜片销子表面的大概位置;

[0110] 图 6 示出不根据本发明的光束光线示踪该图示出经过充满空气的 100  $\mu$  mi. d., 194  $\mu$  mo. d. 毛细管的光路;

[0111] 图 7 示出根据本发明的光束示踪, 该图示出经过充满水的 75  $\mu$  mi. d., 194  $\mu$  mo. d. 毛细管的光路;

[0112] 图 8 示出不根据本发明的光束示踪, 该图示出经过充满水的 75  $\mu$  mi. d., 364  $\mu$  mo. d. 毛细管的光路;

[0113] 图 9 示出注入到 4 根平行的 100  $\mu$  mi. d. 毛细管中每一根的  $\sim$  16mL100 微 M4- 硝基酚的电泳图毛细管总长 500mm, 到检测器 300。分离电压: 5000V。缓冲剂: 磷酸钠 Ph7.5 (15mM 钠);

[0114] 图 10 示出对毛细管之间的交叉干扰作出校正后的 100 微 M4- 硝基酚的电泳图;

[0115] 图 11 示出注入到各根毛细管中的  $\sim$  16nL1 微 M4- 硝基酚的电泳图;

[0116] 图 12 示出通过取示于图 11 的 4 个示踪的平均而产生的电泳图;

[0117] 图 13 示出对注入到毛细管上并通过 CE 迁移到检测区的盐基桃红 700 样品的峰成像和方差, 该图通过激光感生的荧光用 CCD 成像。电压 (在  $\Delta t = 0$ ) 被关掉, 而监控到由于扩散而引起的峰变宽达 1800s (顶部)。在峰的方差变化相对于时间作图 (底部);

[0118] 图 14 示出对封闭回路\* 反馈控制可能的配置的示意图; 在区域检测器第一次通过期间, 监测来自液体色层分析法系统的输出。峰识别和判定使软件能指令开关阀门导引合适的小部分用于收集或例如到质谱仪的接口。在这合适的开关之后, 在检测器的第二通过中, 这洗提液再次被监测, 以致可监测开关过程的效率。另一种替代系统应有更多的来自通过检测器的开关阀门的输出用于目视观察;

[0119] 图 15 示出垂直于由经过放置在检测表面 260  $\mu$  m 处的 75  $\mu$  mi. d., 194  $\mu$  mo. d. 毛细管的芯通过的光建立的毛细管轴的照射图形。图示出了含水和乙腈 (在 20°C, 钠 D 线) 的毛细管; 在照射图形中的差异, 使得能在梯度淘析分离期间直接确定移动相的成分。在 44°C 的乙腈具有水在 20°C 时相同的折射率; 可用相同方法, 通过施加检测器的热脉冲而上液流来确定游离相的速度;

[0120] 图 16 是示出根据本发明光学组件夹住器件的图, 该图示出用于根据本发明吸收率检测的大概尺寸, 诸如 CE 或吸收率。本发明的模件器件通过包括具有接口装置的毛细管, 以插入例如从微 LC 到毛细管中或到质谱仪中将会有差异。

## 具体实施方式

[0121] 例 1

[0122] 图 1 示出实验的配置。来自 75W 氙灯的输出射到单根 1mm 直径的熔凝硅石光纤中。来自该光纤的光输出采用圆柱形和球形熔凝硅石透镜元件（图 2）来成形并准直，以照射 CCD 的矩形面积。所用的 CCD 芯片是 EEV CCD30-11 且是恒温的，并由 York Electronic Centre 所设计和制造的系统控制；它在每 26 平方  $\mu\text{m}$  上具有  $1024 \times 256$  个有源像素，具有的总面积为  $6.7 \times 26.6\text{mm}$ ，CCD 芯片具有保护 CCD 表面的光纤镜片销子（卡盘）。光纤镜片销子对 UV 是不透明的，故把 UV 磷光物质镀到销子的表面上，以使检测器对从 NIR 到低于 200nm 范围的广泛波长都是灵敏的。在一系列的快照中，读出累积在 CCD 上的电荷；以防止抹掉遮光器的图像保证 CCD 在读出期间不受到照射。5Hz 的曝光率供 50% 的占空因子（100ms 曝光和 100ms 读出时间）之用。从每个快照中获得具有 14 比特数字化的  $1024 \times 256$  像素的图像。

[0123] 一种理想的毛细管配置可把它们以  $260 \mu\text{m}$  的间距平行于 CCD 的短轴对准（每根毛细管 10 个像素）。这配置可允许直至 102 根毛细管，如果从标准 96 的壁板取样，这个配置对容纳所用的数目是理想的。在各根毛细管之间的间距意味着有  $66 \mu\text{m}$  的间隙，这将能使比在当前具有包装得更紧的毛细管配置中有更多的参考光到达该 CCD。应从这个配置得出较好的曝光定位和在毛细管间低的交叉干扰。

#### [0124] 毛细管成像

[0125] 在论证实验中，4 根熔凝硅石（ $7100 \mu\text{m i. d.}$ ， $194 \mu\text{m o. d.}$ ，500mm 长）被并排地放置着，约在 CCD 上面  $20075 \mu\text{m}$  处，并平行于 CCD 的长轴，如图 1 和 3 所示。所成像的毛细管部分是离引入口端 273.4 到 300mm 的部段。图 4 示出取自充满空气，水和最后两根充满墨水溶液的 4 根毛细管的一张快照中的一小部分。在没有任何透镜或其它镜片的情况下，可看到对该组件的优良定位。可从毛细管 1 和 2 之间的比较中看到，经过毛细管芯通过的准直光，当毛细管被水充满时是会聚的，产生比背景亮的光线。图 5 和图 6 示出光怎样经过充满水和空气的毛细管而通过的细节；它们还示出在被充满的毛细管的情况下，在经过毛细管芯而通过的光和只经过毛细管壁通过的光之间的 CCD 上有良好的分离。这在图 4 中被证明，此处，在被水和墨水充满的毛细管的图像之间观察到高反差。这对于采用具有小 o. d. 的毛细管来说是重要的；图 7 示出采用如在此处所用一样的相同  $194 \mu\text{m o. d.}$  的毛细管，将得到良好的结果，除非用更为通常使用的  $75 \mu\text{m i. d.}$ 。但是，在毛细管电泳中一般使用的  $364 \mu\text{m o. d.}$  毛细管将是不适宜的；图 8 示出在空气 / 熔凝硅石接口处的较大直径不是充分地把已经经过毛细管芯而通过的光聚焦到与已经只经过毛细管壁而通过的光在空间分开。在实验期间，对来自整个 CCD 的每次曝光的图像被读出进入计算机中；对这个实验包含 4 根毛细管的图像面积为  $32 \times 1024$  个像素。其余的被抹掉以节省计算机的存储器。这数据通过把在 4 个组中的像素值相加在一起降低毛细管长度而被进一步减少对每次快照给出总数为  $32 \times 256$  个的有效像素；各有效像素具有 16 比特的分辨率和尺寸为  $26 \times 10475 \mu\text{m}$ 。

#### [0126] 曝光定位

[0127] 为了从检测器得到最佳的可能性能，需要考虑过量散粒噪声的在曝光时间和光源强度中的起伏。这通常由采用双光束配置来获得，此处，不经过样品而通过的来自光源的光的一部分被检测并被用作参考。这参考和确是经过样品而通过的光之比被用来计算吸收率。在这实验中，已仅经过毛细管壁而通过的、射到 CCD 上的光被用作参考。在它的离子形式的 4- 硝基酚的电泳被用来测试检测系统的性能。把具有中心波长为 405nm 和带通为

10nm 的光滤色片放在输入到光纤镜片处,以匹配 4-硝基酚在 pH7.5 时的吸收率波长(吸收率系数,  $\epsilon_{405} = 1700\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ )。为确定哪些图像像素被用作‘参考像素’和哪些用作与用水充满的毛细管快照的‘样品像素’,要与那些含 4-硝基酚 1mM 溶液的毛细管作比较。平均路径长度为  $\pi d/4 = 79 \mu\text{m}$ ;这对于该溶液相当于 0.13AU 的吸收率。在有 4-硝基酚溶液存在时,在信号上显示出相当于吸收率  $< 0.02$  减少的像素被用作参考像素,而那些具有  $> 0.1$  的被用作样品像素。

#### [0128] 毛细管电泳和数据处理

[0129] 采用 pH7.5, 磷酸钠缓冲剂 (15mM 钠), 在缓冲剂中调制的 4-硝基酚溶液的稀释液, 进行了一系列的平行毛细管电泳实验。把所有毛细管的引入口插入样品溶液中, 它北固定于在引出口管形瓶中缓冲剂水平上的 2cm 处经过 15s, 完成诸如。通过虹吸诸如到各毛细管的体积应是约 16nl。把 +5KV 的电压加到引入口管形瓶而进行电泳;电渗流保证了分析剂流向在引出口处的接地阴极。在试验期间, 快照数据北极据在计算机的 RAM 中, 并在一轮结束时储存到盘中。

[0130] 在实验中收集到的原始数据, 首先对固定的图形噪声作校正, 正如在: 在毛细管电泳中用于单波长和多波长吸收率的电荷耦合器件阵列检测器“一文中详细描述, (Bergstrom and Gaodall, Pokric and Allinson, Auem Chem, 1999, 71, 4376-4384) 然后被处理来产生每根毛细管一图的一组电泳图。这保证了维持高的空间分辨率, 仅受到所用有效像素的尺寸限制, 在本例中是  $106 \mu\text{m}$ 。

[0131] 图 9 示出采用 100M 样品溶液的 4 个电泳图。从基线中的下沉, 在对应于相邻毛细管中峰的次数处, 在毛细管之间存在者交叉干扰是明显的。这主要由经过被用作参考的部分样品而通过的某些光所造成的, 且在较少的程度上, 有某些在经过一根毛细管中的样品通过的光落到一根相邻毛细管的样品像素上。这两个效应的范围已由用样品溶液依次填充每根毛细管来测量。已经假设交叉干扰等级的水平与吸收率是线性的, 而根据在这单个样品浓度测量的校正, 已被应用到所有后来的实验。容易地作出合适的校正, 如由图 10 所说明。

#### [0132] 噪声性能

[0133] 图 11 示出通过注入  $1 \mu\text{M}$  4-硝基酚溶液获得的 4 个电泳图。在图 11 中的峰高度对应于  $\sim 0.6 \mu\text{M}$  的浓度, 根据 3 次  $9.4 \mu\text{AU}$  的 RMS 基线噪声 (1s 上升时间), 计算的检测极限将是  $0.22 \mu\text{M}$ 。通过根据在实验中发现的平均曝光图形和水平产生的模拟数据组并假设一像素的全部恰当的容量为  $5 \times 10^8$  个电子来计算受理论散粒噪声限制的基线噪声水平。这些产生的快照数据组被同样处理到实验的数据组;发现 RMS 散粒噪声水平是  $9.0 \mu\text{AU}$ , 这是非常接近于观察值, 并指出检测器是受散粒噪声限制的。

[0134] 在这实验中用的 CCD, 对要在比容纳超过 30 根毛细管如 4 根对准一样是够大的。对这些毛细管中的每一根的检测灵敏度将与在这个研究中发现是相同的 (即  $\sim 9 \mu\text{AU}$  RMS 噪声具有上升时间为 1s)。或者, 如果它们平行于 CCD 的短尺寸对准, 则可容纳超过 120 根毛细管;这将对每根毛细管导致在信号整体时间上的减少到原量的四分之一, 所以在噪声水平上增加到  $\sqrt{4} = 2$  倍。当分离的数目仅是随阵列的尺寸改变比例可被同时进行时, 很明显, 带有毛细管阵列的毛细管电泳具有对高通量分析的应用。但是, 如果同时把相同的样品注入到所有在阵列中毛细管, 如在本实验中所做的, 它是增加样品负载, 从而动态范围

和浓度灵敏度的一种方法。如果通过在毛细管之间分析剂速度的细微差异作补偿之后取算术平均来组合所有的电泳图,然后可获得在信号对噪声之比增加  $\sqrt{N}$ , 此处  $N$  是毛细管的数目。把大的样品负载分开到许多毛细管中,减少了与超载有连系的问题,这些问题包括由电迁移弥散和大的注入长度感生的差的峰形状和非线性检测器在非常多部件的高吸收率处的响应。图 12 示出平均图 11 的 4 个电泳图结果。RMS 基线噪声水平是  $4.7 \mu\text{AU}$ , 各别迹线降低二分之一,这是对 4 根毛细管所期望的改善。

[0135] 通过组合来自 4 根毛细管的信号测量的噪声性能,仍然是在散粒噪声的极限处,并比以前在上面 Bergstrom 等人获得的性能要好,在他们的工作中提出在成像于光纤从输出上的灯管放电的空间分布的起伏,将导致在 CCD 照明空间分布中的起伏。因为 CCD 的诸分离区监测了信号和参考电平,所以这将导致噪声水平超过散粒噪声。采用单根光纤而不是以前所用的光纤丛,应在很大的程度上寻找灯管放电的空间不均匀性。按比例增加这实验到 30 根平行毛细管应给出组合的 RMS 噪声水平为  $1.7 \mu\text{AU}$ , 对应于一个在  $40\text{nM}$  上的柱 4- 硝基酚浓度 LOD。

[0136] 当分析剂浓度相对于背景电解液浓度是低的时候,于是它仅是注入塞的长度和显著地贡献给测量到的峰宽的分析剂扩散,假设检测器的空间分辨率是高的。可计算由分析剂扩散造成的峰方差,  $\sigma^2 = 2Dt = 1.2 \times 10^{-6}\text{m}^2$ , 此处  $D$  是扩散系数(对 4- 硝基酚是  $8.1 \times 10^{-10}\text{m}^2\text{S}^{-1}$ ), 而  $t$  是时间。来自样品注入栓的长度对峰方差的贡献由  $l_i^2/12 = 0.4 \times 10^{-6}\text{m}^2$  (此处  $l_i$  是  $2.0\text{mm}$  的注入长度) 给出。这两个贡献给出总的标准偏差  $\sigma$  为  $1.3\text{mm}$ ; 被分析剂速度除得出以时间为单位的  $\sigma = 3.2\text{s}$ 。这与通过对图 12 中的峰拟合高斯函数测量的标准偏差为  $3.1\text{s}$  相比是很好的。这是对成像  $26\text{bmm}$  毛细管部段合其后组合平行的电泳图的检测方法并不降低分离效率的实验证明。

[0137] 例 2

[0138] 表 1. 该表示出对具有图形外部合内部横截面的容器,外壁到检测器离  $d$  和容器的外直径  $o.d$  座机比 ( $d/o.d$ ) 的最小值,以便获得在芯和壁的光束之间的空间间隔。作为容器内直径对外直径之比的函数,示出对溶剂和容器材料的范围之值。条目  $\times$  指出无空间分离的可能。

[0139]

	i.d/o.d.	i.d/o.d.	i.d/o.d.	i.d/o.d.
	0.20	0.25	0.33	0.50
水/硅石	x	2.0	1.0	0.5
己烷/硅石	1.6	1.0	0.6	0.4
双氯甲烷/硅石	0.6	0.5	0.4	0.2
水/聚碳酸酯	x	x	2.1	0.5
水/柔性清洁导管 (Tygon chem. fluor 367)	0.5	0.5	0.5	0.4

[0140] 用于光线示踪分析的折射率值为硅石 (1.458), 水 (1.333), 己烷 (1.375), 双氯甲

烷 (1.424), 聚碳酸酯 (1.585), Tygon chem. Fluor 367 (1.34)。其它通用的逆相 HPLC 溶剂, 经常用在与水的混合物中, 是甲醇 (1.329) 和乙腈 (1.344); 这些和它们的混合物将给出用于各种容器类型对水的  $d/d$  的相似值。己烷可与其它两种类似折射率通用的正常相 HPLC 溶剂, 2-丙醇 (1.378) 和乙基醋酸酯 (1.372), 组合起来。这方法用在构筑这个表用于确定对其它诸如 DMSO (1.479) 的溶剂的值也是有效的。

[0141] 从这个表, 对已知  $o. d$  的毛细管, 可从可能性中的一个确定所需的  $i. d$ , 以给出  $d/o. d$  值, 从而  $d$  值, 如在本描述中所描述的。

[0142] 例 3- 反馈控制

[0143] 反馈控制的一个示例是在 CE 实验中, 为停止在检测窗中的样品的应用, 是当样品被检测到已迁移到窗口的中心 (参见图 13) 时通过关断电压来停止的。在停止之后, 由于扩散而引起的样品峰随后的变宽被作为时间的函数来监测。关于峰方差随时间的变化分析可确定扩散系数。于是可用斯托克斯 (Stokes) 定律来计算样品分子的流体动力半径。在给定的场强下, 从取自抵达窗口的时间获得的扩散系数与迁移率的组合可导出在分析剂上的电荷。由于具有高斯峰的褶合, 能使峰变宽的高斯分量被抽出。所以任何开始时的峰形状是可接受的。当样品示出在 30 分钟期间测量的峰变宽, 数据质量是这样的, 可在少于 3 分钟的良好精密度测量扩散系数。

[0144] 图 14 给出封闭回路反馈控制的示意例子。

[0145] 在这里, 在区域检测器的第一通过期间, 监测来自 LC 系统的输出, 峰识别合判定使软件用来指令开关阀门以导引合适的部分用于收集或例如导引到质谱仪的接口。在这合适的开关之后, 在检测器的第二通行中, 再次监测洗提液, 以致可监测开关过程的效率。另一种一代系统应有更多的来自通过检测器的开关阀门的输出用于目视观察。

[0146] 例 4- 应用

[0147] 本发明的检测方法是用于测量折射率的变化, 通过垂直于毛细管轴的芯光束的照射图形, 高的空间分辨率的分析, 检测器有能力在毛细管的溶剂中监测折射率的变化。图 15 示出, 对放在离检测器表面  $260 \mu m$  处  $75 \mu m i. d.$ ,  $194 \mu m o. d.$  的毛细管, 关于从水 (折射率 1.333) 到乙腈 (折射率 1.344) 的改变的芯光束在图形分布上的变化。具有  $10 \mu m$  的象素尺寸, 这将能实现这两个照射图形分布之间的区分, 并通过扩展这能力, 在水-乙腈的混合物中的梯度淘析分离期间, 来直接监测游离相组分。如果必要的话, 在垂直于毛细管轴的方向上的扩尺可被用于根据游离相组分增加分辨率。这在 HPLC 中应是有益的。由于在  $44^\circ C$  时的乙腈具有与水在  $20^\circ C$  时的相同折射率, 所以提供检测器向上流液  $25^\circ C$  温升的热脉冲的施加, 可用来在毛细管 HPLC 中确定游离相的速度。

[0148] 多毛细管吸收率检测的另一用途是用于快速测量  $pK_a$ 。此处, 把样品溶液的等分试样混合到一组覆盖  $pH$  值的一个范围 (通常包括 2-12 的范围) 的缓冲剂溶液中, 然后依次把所有缓冲剂混合物抽上到分开的毛细管中, 然后缓冲剂加样品的混合, 通过在酸和碱形成之处用一个或多个波长做实验具有不同的吸收率, 可处理从所有作为  $pH$  函数的毛细管吸收率得到的结果来确定  $pK_a$ , 采用适宜的非-或弱-吸收的无机缓冲剂, 这适用于有机的或含有所有普通的可滴定的功能族的生物化合物, 包括羟基和氨基族, 并在浓度降至 100 微克分子时。这对于例如医药工业合对高通过量分筛时有益的。

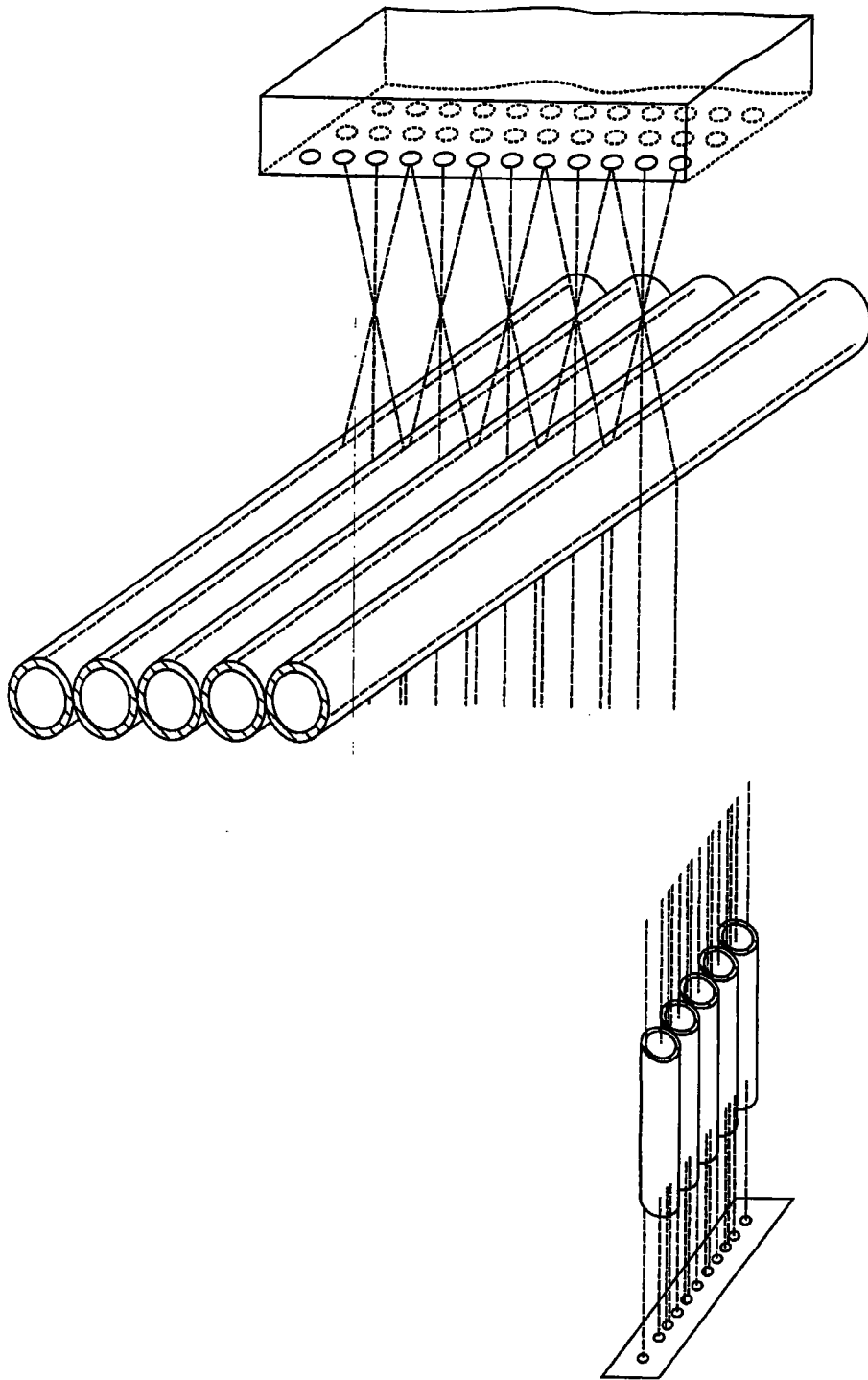


图 1A

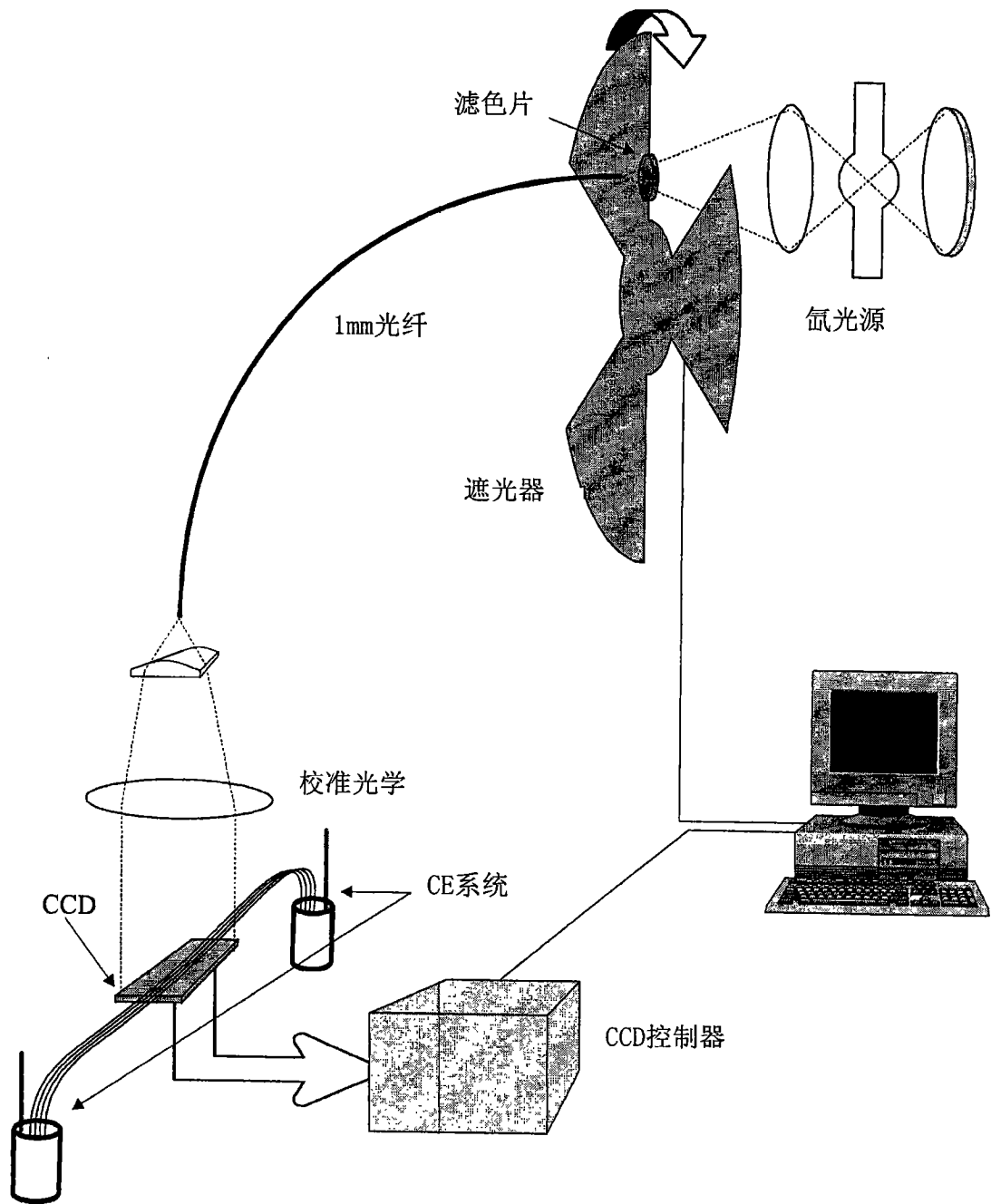


图 1B 用于平行的毛细管吸收率检测的实验装置示意图



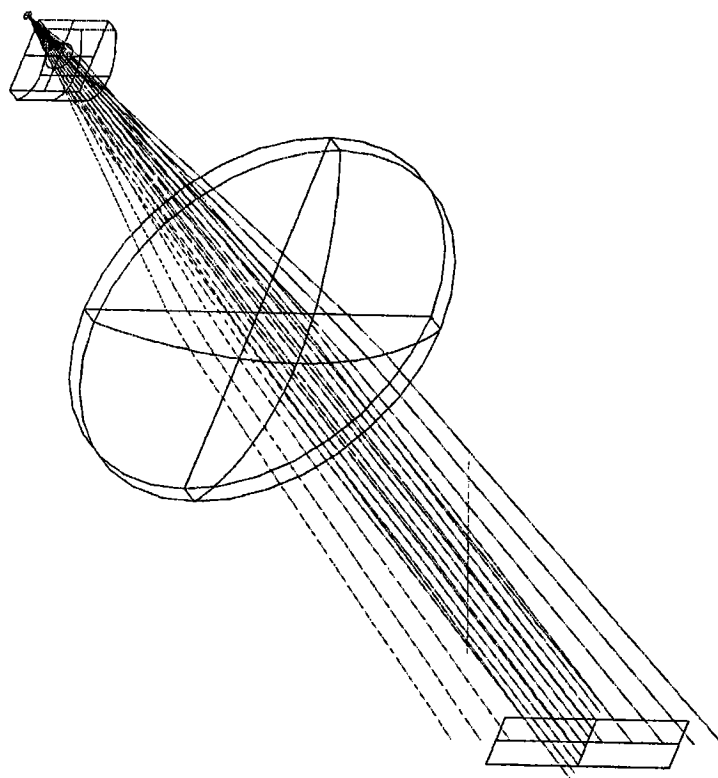


图 2CCD 矩形面积的准直照射 ( $26.6 \times 6.7\text{mm}$ ), 采用圆柱形和球形的熔凝硅透镜元件, 使用来自 1mm 直径熔凝硅石的光纤 ( $\text{NA} = 0.22$ ) 输出的光

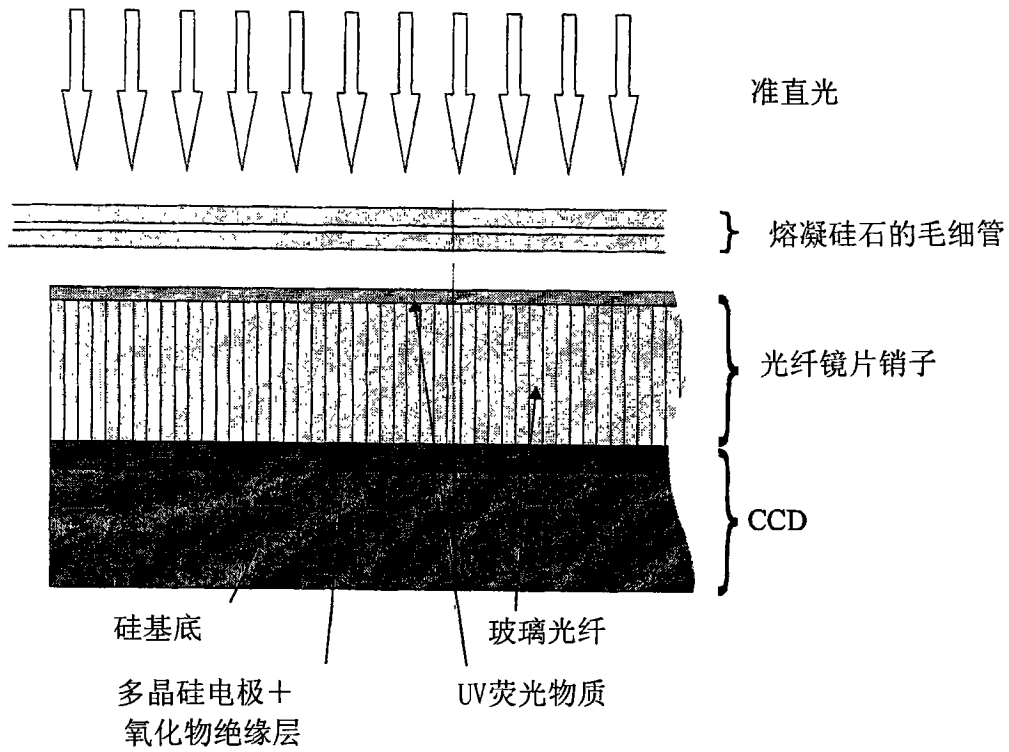


图 3 具有光纤镜片销子和毛细管成像 CCD 的细节

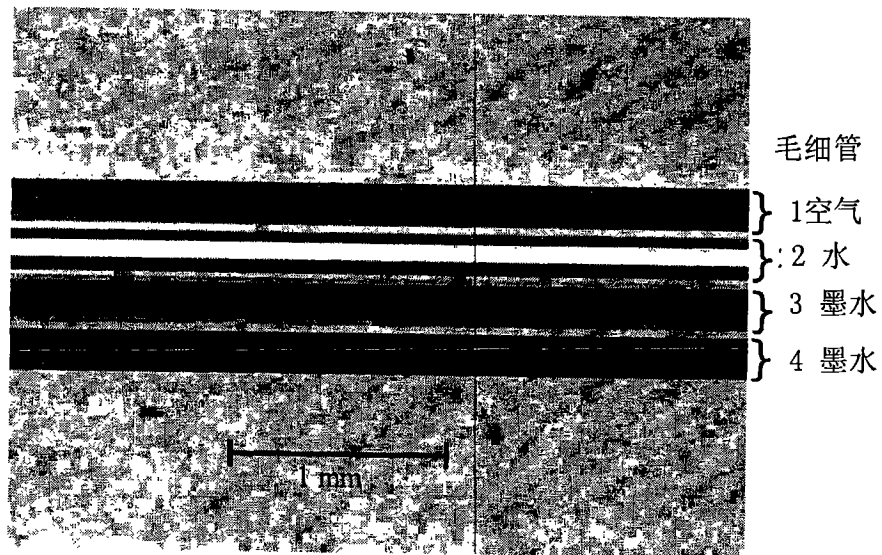


图 4. 示出 4 根毛细管 (100 μ m i. d. , 194 μ m o. d) 的 ~ 3mm CCD 快照中的一部分, 成像的总面积为 6.7 × 26.6 mm。毛细管的内含物为 1 空气, 2 水, 3 和 4 墨水溶液

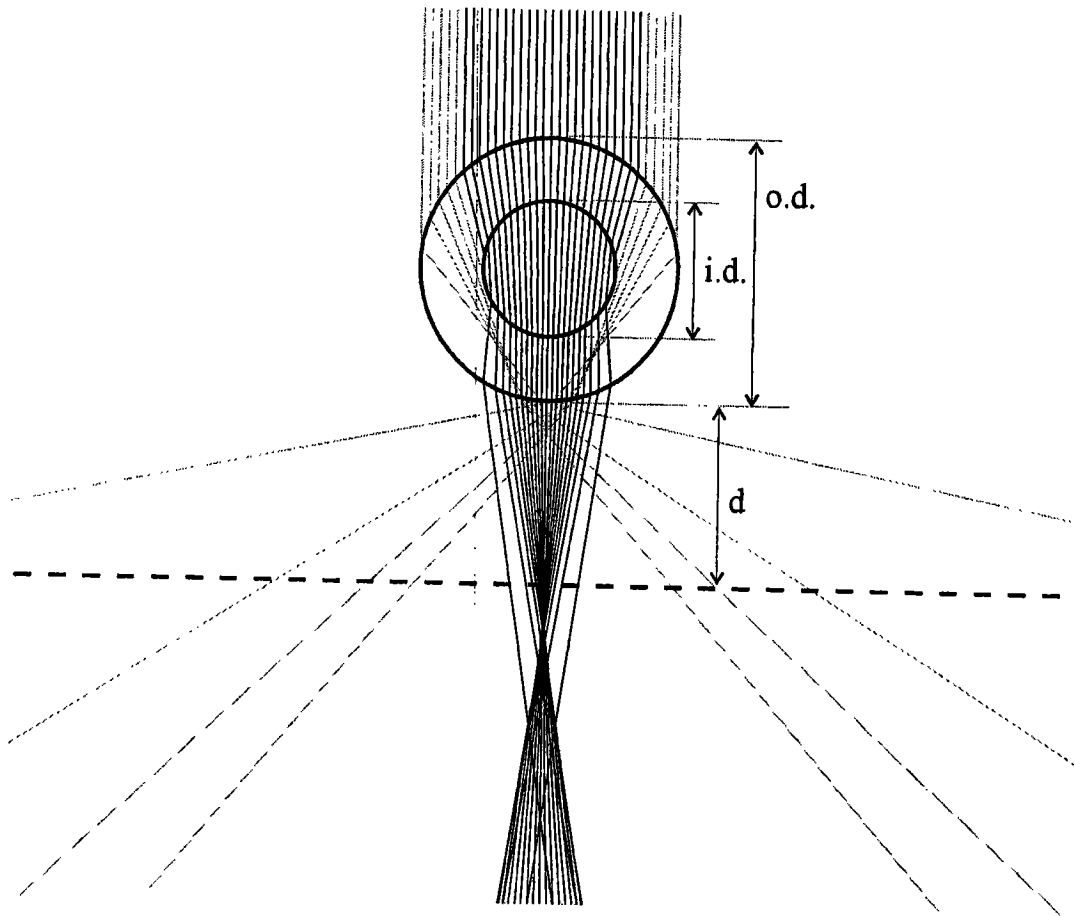


图 5 充满水的  $100\ \mu\text{m}$  i. d.,  $194\ \mu\text{m}$  o. d. 的毛细管

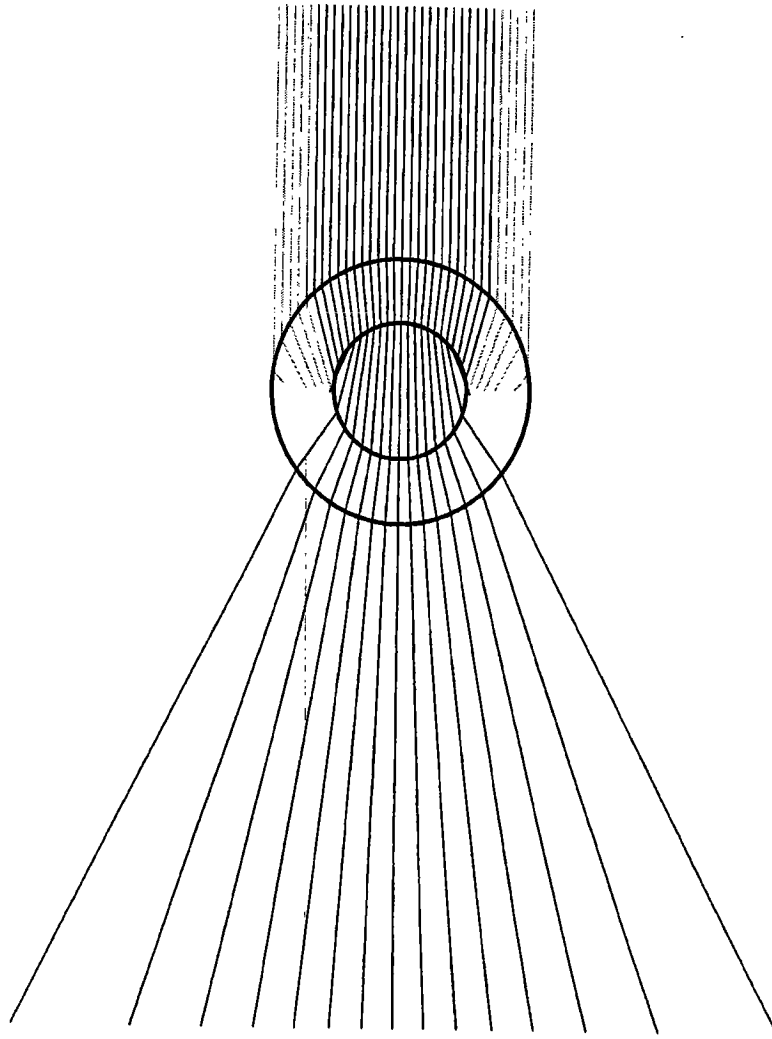


图 6 充满空气的  $100\mu\text{m}$  i. d,  $194\mu\text{m}$  o. d. 的毛细管

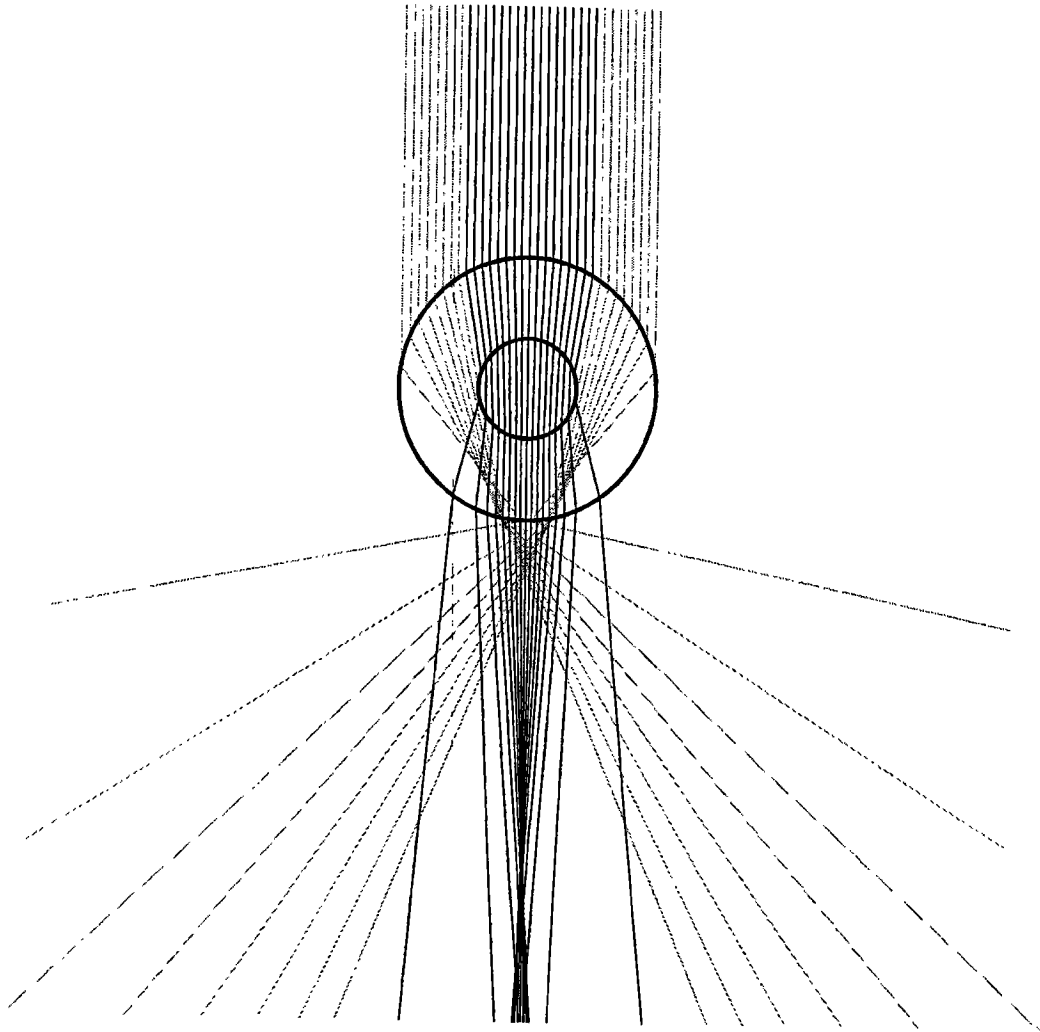


图7 充满水的  $75\mu\text{m}$  i.d,  $194\mu\text{m}$  o.d. 的毛细管

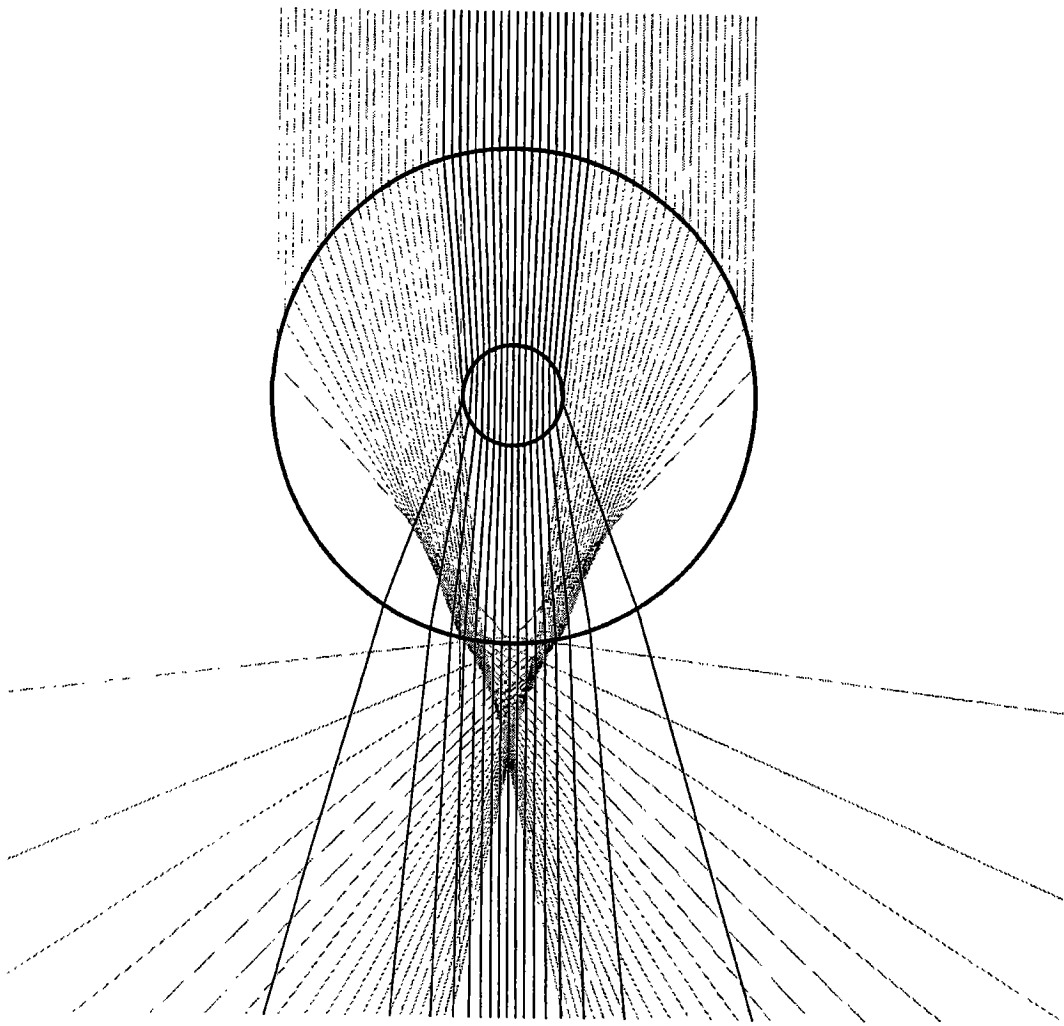


图8 充满水的  $75\mu\text{m}$  i. d,  $364\mu\text{m}$  o. d. 的毛细管

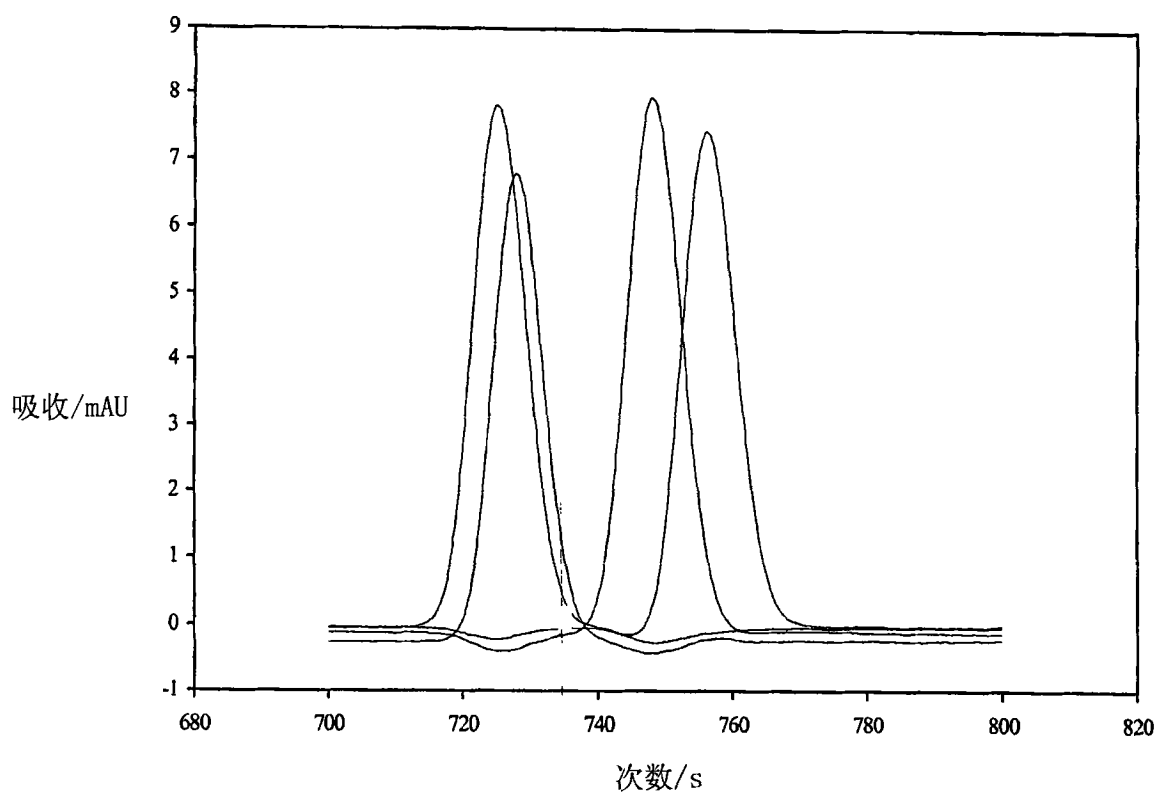


图9注入到4根平行的 $100\ \mu\text{m}$  i. d毛细管中每一根的 $\sim 16\text{nL}$  $100\ \mu\text{M}$  P硝基酚的电泳图。毛细管长度:全长500mm,到检测器300mm,分开电压:5000V,缓冲剂:磷酸钠PH7.5(15mM 钠)

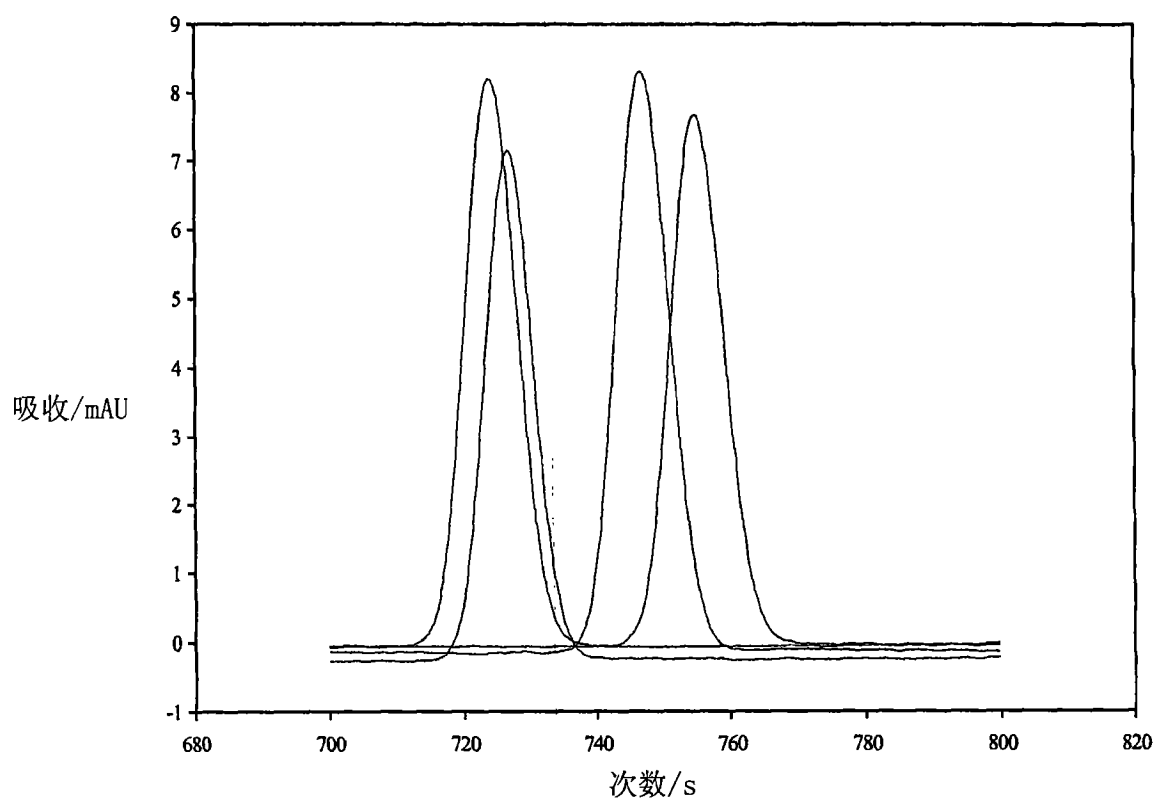


图 10 在对毛细管之间的交叉干扰校正后的  $100 \mu\text{M}$  p- 硝基酚的电泳图



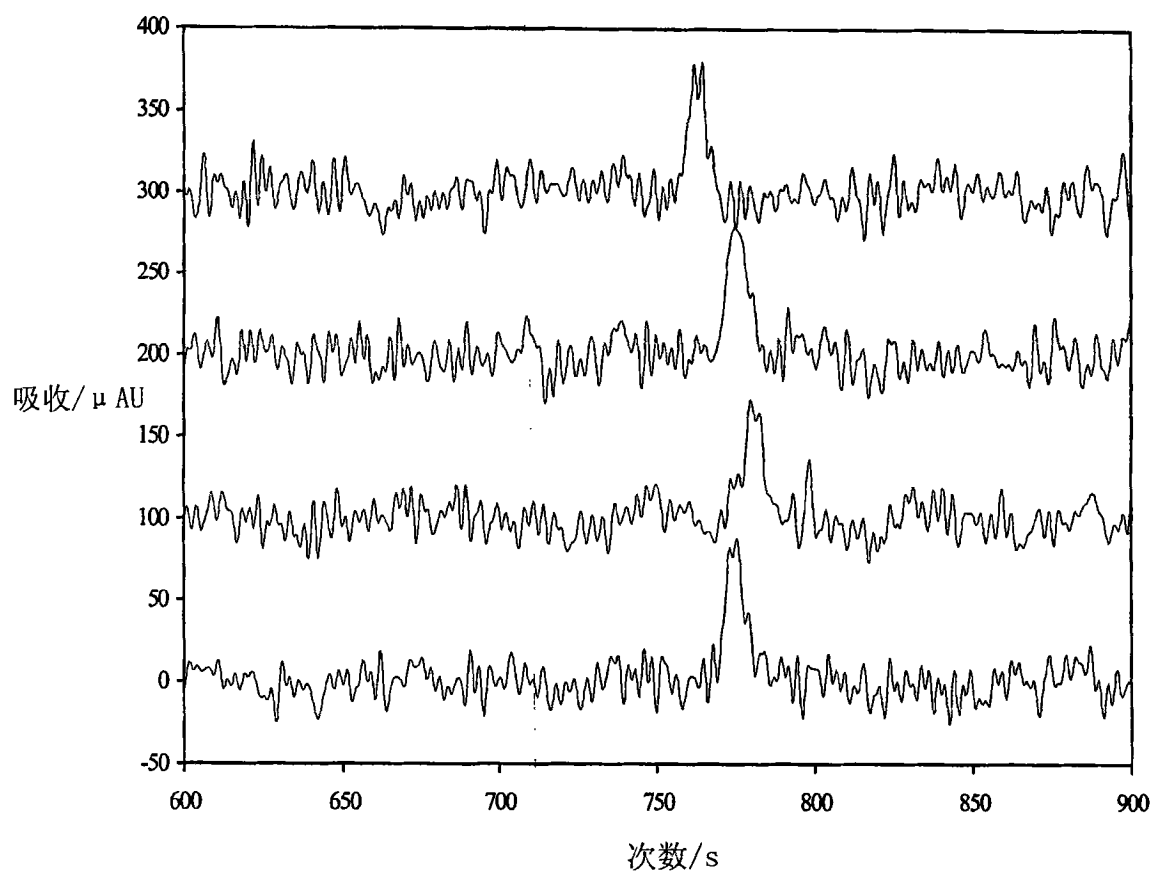


图 11 注入到毛细管中的 $\sim 16\text{nL}$   $1\ \mu\text{M}$  p-硝基酚的电泳图

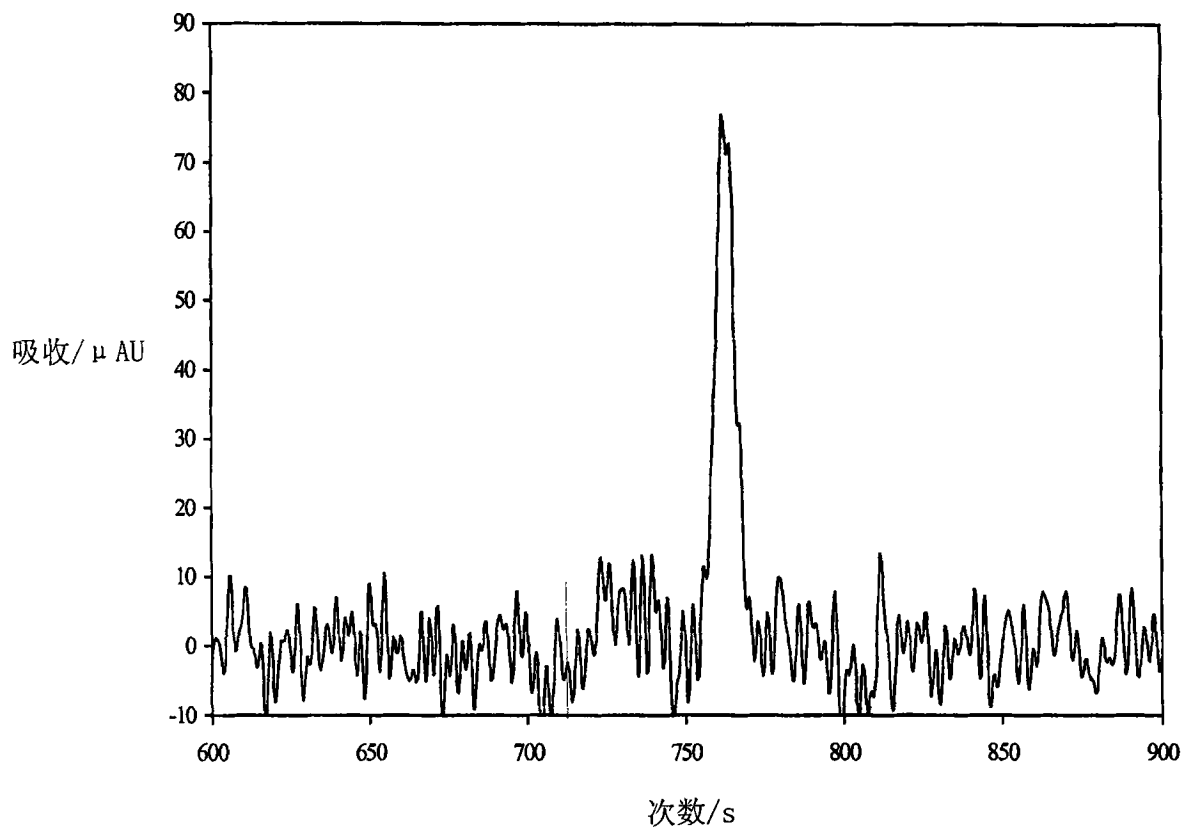


图 12 通过取示于图 11 的 4 根迹线的平均产生的电泳图

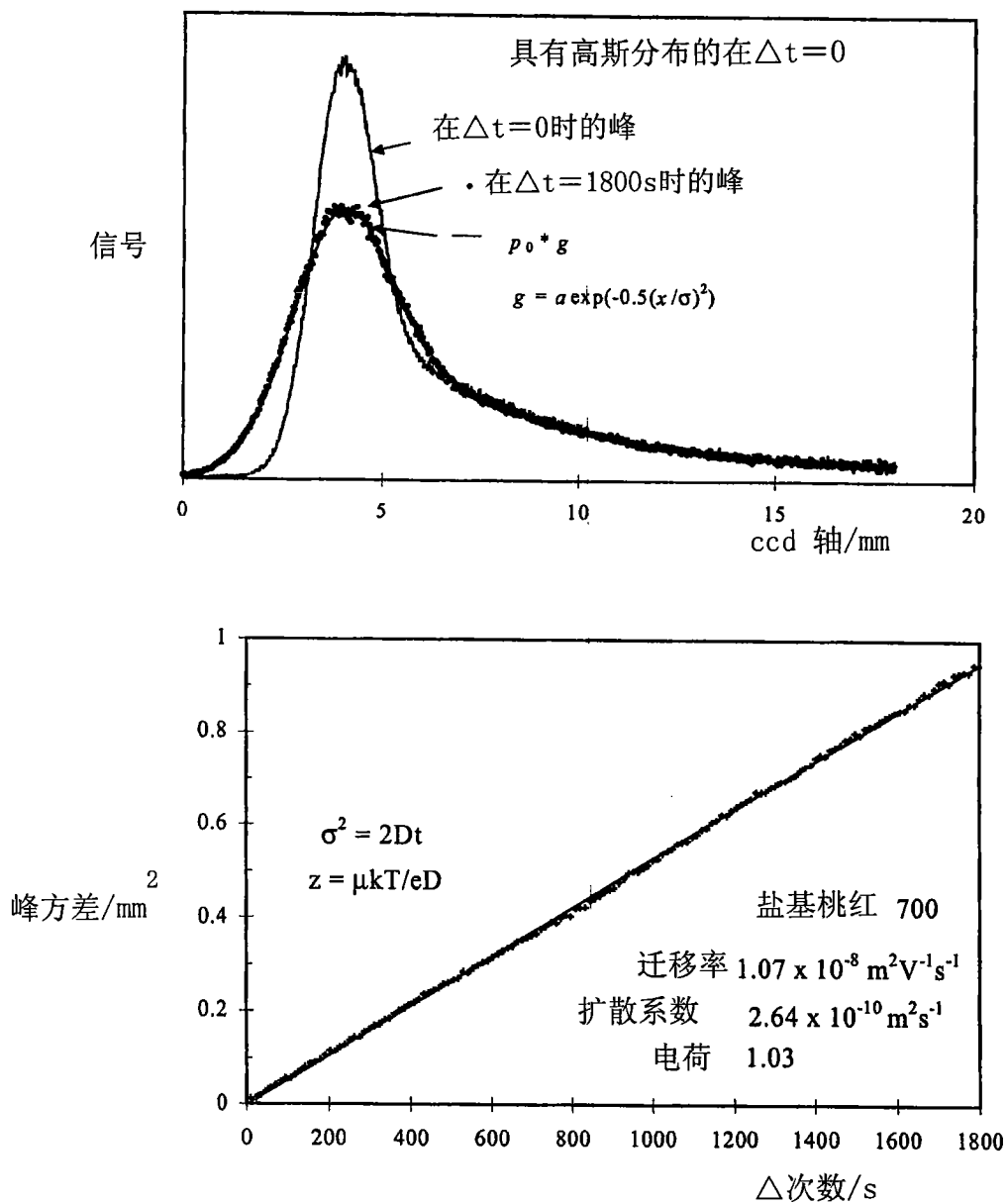


图 13

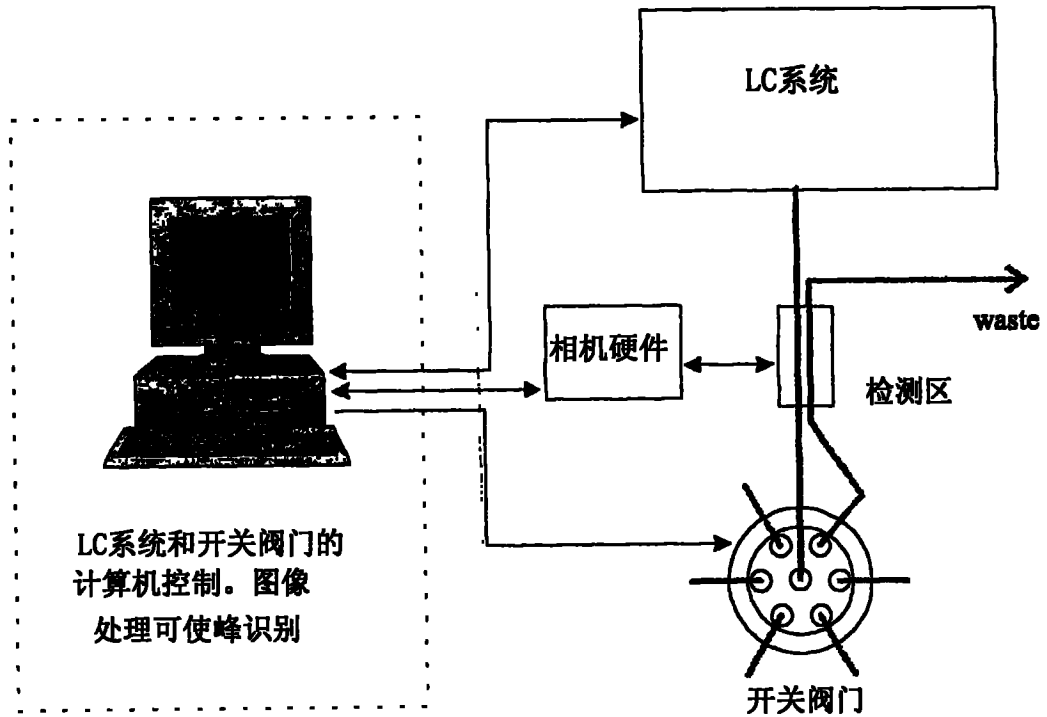


图 14

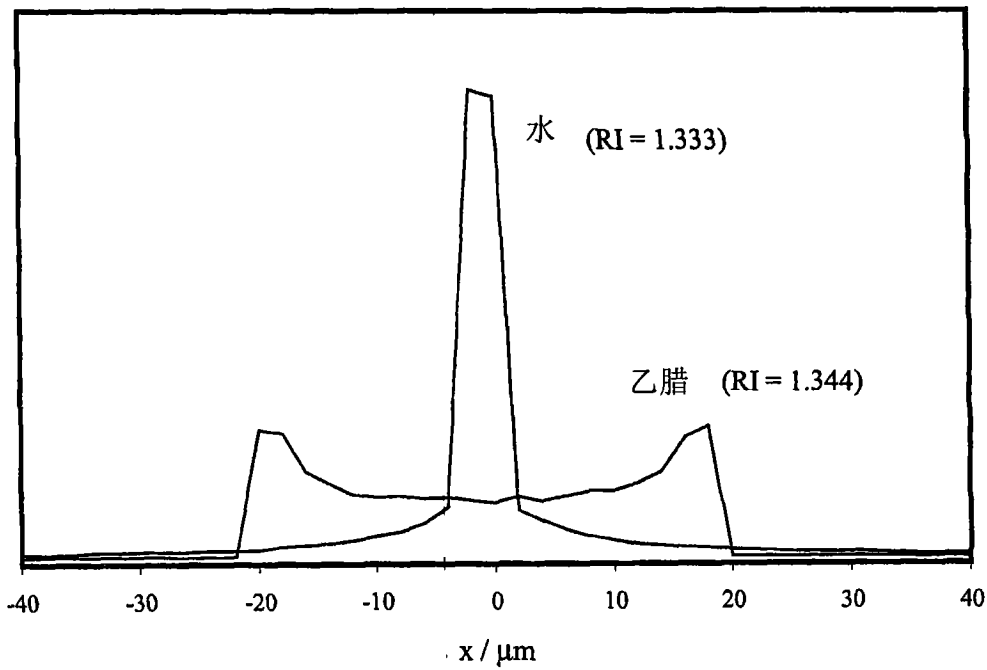


图 15

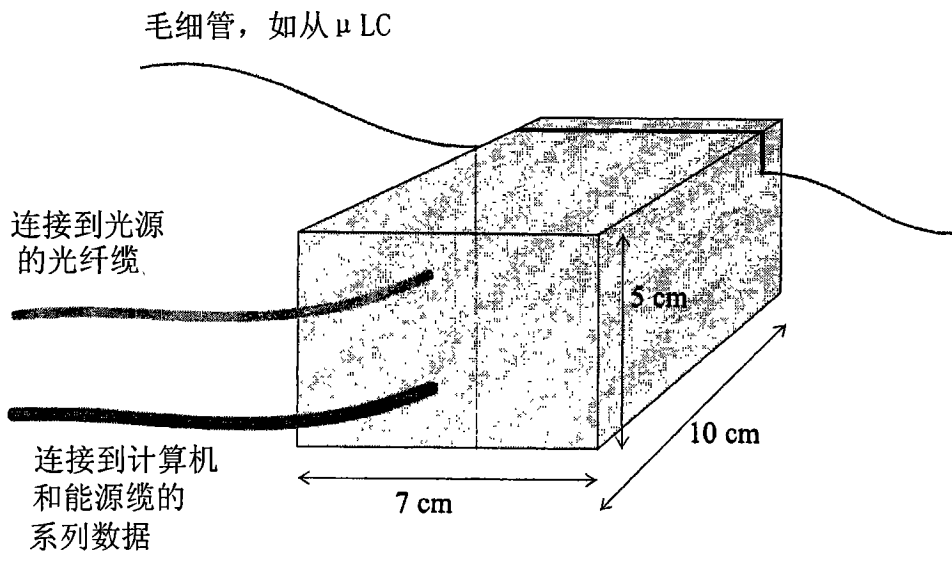


图 16