

ный спай термопар помещается в ультратермостат б. При таком способе контроля и измерения температуры погрешность составляет не более $\pm 0,25^\circ$. Проведенная проверка линейности системы генератор — возбудитель — датчик — регистратор показала, что система линейна во всем диапазоне изменения выходного сигнала генератора и во всем интервале рабочих частот.

Средние нелинейные искажения выходного сигнала телефона не превышают 1,85%. При проверке линейности образец закаленной стали марки ХВП размерами $180 \times 20 \times 0,5$ мм закрепляли в одном из каналов установки. После этого снимали зависимость амплитуды колебаний образца на уровне установки датчика от выходного сигнала генератора. Измерения проводили при 20° на частотах 20–200 Гц, при изменении сигнала возбуждения от 0 до 60 в. Одновременно регистрировали уровень нелинейных искажений измерителем нелинейных искажений, который включали на вход регистрирующего вольтметра.

Длительный опыт работы с данной установкой позволяет сделать заключение, что при ее использовании значительно сокращается время измерений, возрастает достоверность результатов испытаний однородных образцов и повышается точность измерения температуры образцов.

Московский областной педагогический
институт им. Н. К. Крупской

Поступила в редакцию
10 I 1974

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Чернышев, Сб. Проблемы прочности в машиностроении, Ростов, 1962, вып. 7.
2. Ю. В. Зеленев, С. К. Абрамов, Б. С. Ходырев, Ю. В. Ефремушкин, Механика полимеров, 1972, 152.
3. R. Plankett, Measurement of Damping, N. Y., 1964.

УДК 541.64:543.2

ДИНАМИЧЕСКИЕ ПОГРЕШНОСТИ ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СКАНИРУЮЩЕГО УСТРОЙСТВА АНАЛИТИЧЕСКОЙ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИ

Ю. А. Лотц, А. Х. Марголин, А. И. Самбурский

Приведен анализ динамических погрешностей определения коэффициентов седиментации и стандартного отклонения седиментационной кривой, возникающих при регистрации сканирующим устройством границы в опытах по методу скоростной седиментации.

Аналитические ультрацентрифуги находят все более широкое применение при исследовании полимеров. Однако традиционные методы обработки результатов седиментационного анализа требуют большой затраты времени и не обеспечивают необходимой точности.

Оснащение аналитической ультрацентрифуги фотозелектрическим сканирующим устройством позволило значительно упростить процесс регистрации седиментационной кривой, а также повысить статическую точность измерений. Но в результате сканирования границы, положение и форма которой при скоростной седиментации изменяются из-за воздействия центробежного поля и диффузии, возникают динамические погрешности. Повышение скорости сканирования приводит к понижению динамической погрешности и уменьшению величины усреднения, а следовательно, к увеличению случайных погрешностей результатов измерений, возникающих из-за шума фотоэлектронного умножителя, шумов электронных схем, вибрации элементов оптической системы.

Эффективным методом уменьшения случайных погрешностей является усреднение результатов многократных измерений [1]. При этом единичные измерения, осуществляемые сканирующим устройством с цифровым выходом, подвергаются усреднению либо ЦВМ [2], либо системой автоматической регистрации ультрацентрифуги [3].

С увеличением числа усредненных единичных измерений m случайная погрешность усредненного результата измерения $\gamma_{ср}$ уменьшается в соответствии с выражением

$$\gamma_{ср} = \gamma_i / \sqrt{m}, \quad (1)$$

где γ_i — случайная погрешность единичного измерения.

Так как единичные измерения осуществляются за каждый оборот ротора ультрацентрифуги, усредненный результат получается через m оборотов, и количество

усредненных измерений определяется выражением

$$m = \frac{n}{v_{\text{ск}} Kl \cdot 60}, \quad (2)$$

где n — скорость вращения ротора, об/мин; l — количество усредненных измерений на единицу длины кюветы; $v_{\text{ск}}$ — скорость сканирования, мм/сек; K — коэффициент увеличения оптической системы.

Из уравнения (2) следует, что при заданной величине l требуемое усреднение m может быть достигнуто, в основном, за счет снижения $v_{\text{ск}}$, а следовательно, за счет увеличения динамических погрешностей.

В работе получены выражения, позволяющие исключить динамические погрешности при расчете коэффициентов седиментации. В этом случае понижение скорости сканирования и уменьшение случайных погрешностей результатов измерений не ограничено допустимой величиной динамических погрешностей.

Получены также выражения для динамических погрешностей определения второго центрального момента градиентной кривой σ^2 , который используется для расчета коэффициента диффузии и параметра гетерогенности [4]. На основании этих выражений может быть определена минимальная скорость сканирования, при которой динамические погрешности не превышают заданной величины, или вычислены поправки, корректирующие значения σ^2 на величину динамической погрешности.

В последнем случае допустимая скорость сканирования может быть выбрана более низкой, а следовательно, увеличено количество усреднений и в соответствии с выражением (1) снижена случайная погрешность результатов измерений.

Коррекция динамической погрешности определения коэффициента седиментации. Коэффициент седиментации определяется по формуле

$$S = \frac{\ln r_{f_2}/r_{f_1}}{\omega^2 (t_2 - t_1)}, \quad (3)$$

где r_{f_2} и r_{f_1} — расстояния от центра вращения ротора до границы вращения t_2 и t_1 соответственно; ω — угловая скорость вращения ротора.

Обычно в выражении (3) вместо значения $t_2 - t_1$ подставляется интервал времени между моментами начала двух сканирований — $t_{2\text{ск}} - t_{1\text{ск}}$. Из-за движения границы времени между началом сканирования и моментом пересечения границы сканирующей щелью не постоянно. Поэтому эта замена приводит к возникновению динамической погрешности при расчете S . Возникновение этой погрешности поясняется рис. 1, на котором изображены графики, представляющие зависимость от времени расстояний вдоль радиуса кюветы, проходимых границей (кривая 1) и сканирующей щелью (кривые 2 и 3).

Интервал времени между моментами пересечения щелью границы на расстояниях r_{f_2} и r_{f_1} от центра вращения ротора равен

$$t_2 - t_1 = t_{2\text{ск}} - t_{1\text{ск}} + \frac{r_{f_2} - r_{f_1}}{v_{\text{ск}}} \quad (4)$$

Выражение (3) с учетом уравнения (4) имеет вид

$$S = \frac{\ln r_{f_2}/r_{f_1}}{\omega^2 \left(t_{2\text{ск}} - t_{1\text{ск}} + \frac{r_{f_2} - r_{f_1}}{v_{\text{ск}}} \right)} \quad (5)$$

Коэффициент седиментации, определенный по формуле (5), не имеет динамической погрешности.

Понижение скорости в этом случае ограничено лишь необходимостью получения нескольких записей в течение одного эксперимента для расчета коэффициентов седиментации.

Вместо выражения (5) для расчета коэффициента седиментации можно воспользоваться приближением выражения (6)

$$S \approx S^* (1 - \delta S), \quad (6)$$

где

$$S^* = \frac{\ln r_{f_2}/r_{f_1}}{\omega^2 (t_{2\text{ск}} - t_{1\text{ск}})} \quad (7)$$

$$\delta S = \frac{\omega^2 S (r_{f_2} + r_{f_1})}{2 v_{\text{ск}}} \quad (8)$$

На рис. 2 приведена зависимость δS от скорости вращения ротора для различных S при $(r_{f_2} + r_{f_1})/2 = 65$ мм и $v_{\text{ск}} = 1$ мм/сек. В случае $v_{\text{ск}}$, не равном 1 мм/сек, полученному из рис. 2 значение δS необходимо поделить на $v_{\text{ск}}$.

При выводе уравнения (5) было сделано допущение, что положение границы экспериментально снятой кажущейся кривой совпадает с действительным положением границы. Сканирование движущейся границы приводит к тому, что экспериментально снятая кривая получается искаженной. Поэтому следует проверить, насколько положение кажущейся границы отличается от положения границы действительной кривой.

Ниже показывается, что такое отличие существует, но для случаев измерений, встречающихся на практике, оно пренебрежимо мало.

Рис. 1. К расчету динамической погрешности определения S

Рис. 2. Зависимость δS от скорости вращения ротора при $(r_f + r_{f_1})/2 = 65 \text{ мм}$ и $v_{\text{ск}} = 1 \text{ мм/сек}$ и $S = 10$ (1); 20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6); 120 (7); 140 (8); 160 (9); 180 (10) и 200 (11)

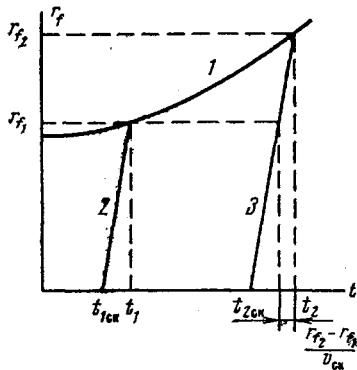


Рис. 1

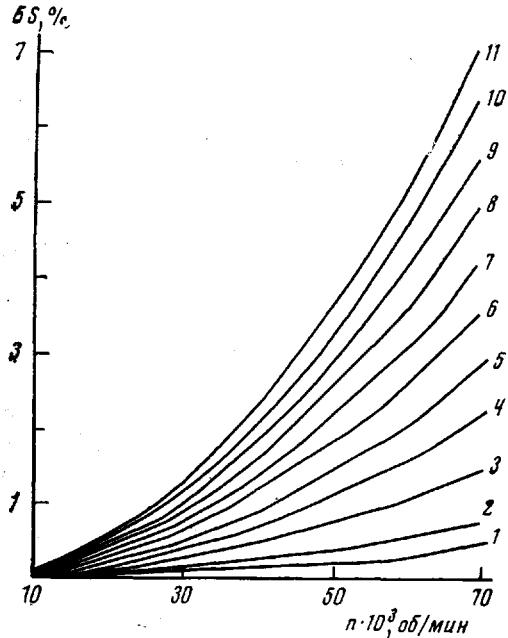


Рис. 2

Определение коэффициентов диффузии и параметра гетерогенности может основываться на втором центральном моменте градиентной кривой σ^2 [4], поэтому ниже определяется разница между вторыми центральными моментами кажущейся и действительной градиентной кривой.

Анализ основывается на следующей методике: 1) определяется уравнение кажущейся интегральной кривой; 2) определяется смещение положения границы кажущейся кривой относительно положения действительной кривой; 3) определяется величина второго центрального момента кажущейся границы кривой и отличие между вторыми центральными моментами кажущейся и действительной градиентной кривой.

Анализ проводится для однокомпонентного раствора при условии, что граница полностью оторвалась от мениска, а также существует область плато, т. е. выполняются условия: в области мениска $c=0$, $dc/dr=0$; в области плато $dc/dr=0$ (c — концентрация исследуемого вещества в растворе; r — расстояние от центра вращения ротора).

Уравнение кажущейся интегральной кривой. Кажущаяся интегральная кривая получается в результате регистрации сканирующим устройством седиментационной кривой в ультрацентрифужной кювете.

Выражение для кажущейся кривой получается следующим образом. Положение каждой точки интегральной седиментационной кривой представляется рядом Тейлора для момента времени t_0

$$C(x) = C(x)_{t_0} + \left[\frac{dC(x)}{dt} \right]_{t_0} (t - t_0) + \left[\frac{d^2C(x)}{dt^2} \right]_{t_0} \frac{(t - t_0)^2}{2} + \dots, \quad (9)$$

где $C(x)_{t_0}$ — распределение концентрации исследуемого вещества в ультрацентрифужной кювете в момент времени t_0 .

Для того чтобы перейти к выражению для кажущейся кривой, учитывается, что регистрация точек кривой происходит в различные моменты времени, определяемые выражением

$$t - t_0 = \frac{r - r_0}{v_{\text{ск}}}, \quad (10)$$

где r — расстояние от регистрируемых точек интегральной кривой в момент времени t до центра вращения ротора.

Поэтому значение $t - t_0$ для кажущейся кривой не будет постоянной величиной, а будет в соответствии с уравнением (10) функцией абсцисс точек кривой. С учетом соотношений (9) и (10) выражение для кажущейся интегральной кривой будет иметь вид

$$C(x)_t = C(x)_{t_0} + \left[\frac{dC(x)}{dt} \right]_{t_0} \frac{r - r_0}{v_{\text{ск}}} + \left[\frac{d^2C(x)}{dt^2} \right]_{t_0} \left(\frac{r - r_0}{v_{\text{ск}}} \right)^2 \cdot \frac{1}{2} + \dots \quad (11)$$

Из численных расчетов следует, что членами выше первого порядка в уравнении (11) можно пренебречь, тогда

$$C^*(x)_t = C(x)_{t_0} + \left[\frac{dC(x)}{dt} \right]_{t_0} \frac{r - r_0}{v_{\text{ск}}} \quad (12)$$

При условии, что в момент времени t_0 сканирующая щель пересекает седиментационную границу в точке r_0 , начало координат можно сместить в точку r_0 .

Тогда абсциссы точек кривой будут $x = r - r_0$, и уравнение кажущейся интегральной кривой запишется в виде

$$C^*(x)_t = C(x)_{t_0} + \left[\frac{dC(x)}{dt} \right]_{t_0} \frac{x}{v_{\text{ск}}} \quad (13)$$

Значение dC/dt определяется уравнением Ламма [5]

$$\begin{aligned} \frac{dC(x)}{dt} &= - \frac{1}{r_0 + x} \frac{\partial}{\partial x} \left\{ (r_0 + x) [\omega^2 S C(x) (r_0 + x) - D \frac{\partial C(x)}{\partial x}] \right\} = \\ &= -\omega^2 S \left[2C(x) + \frac{\partial C(x)}{\partial x} (r_0 + x) \right] + D \left[\frac{1}{r_0 + x} \frac{\partial C(x)}{\partial x} + \frac{\partial^2 C(x)}{\partial x^2} \right], \end{aligned} \quad (14)$$

где D — коэффициент диффузии.

С целью упрощения дальнейших расчетов выражение $1/(r_0 + x)$ заменяется в формуле (14) приближенным значением $\frac{1}{r_0} \left(1 - \frac{x}{r_0}\right)$, отличающимся не более 1% от точного значения, поскольку $x/r_0 \ll 0,1$

$$\frac{dC(x)}{dt} = -\omega^2 S \left[\frac{\partial C(x)}{\partial x} (r_0 + x) \right] + D \left[\left(1 - \frac{x}{r_0}\right) \frac{1}{r_0} \frac{\partial C(x)}{\partial x} + \frac{\partial^2 C(x)}{\partial x^2} \right], \quad (15)$$

а уравнение кажущейся интегральной кривой с учетом выражений (13) и (15) принимает вид

$$\begin{aligned} C^*(x)_t &= C(x)_{t_0} - \omega^2 S \left[2C(x)_{t_0} + \left(\frac{\partial C(x)}{\partial x} \right)_{t_0} (r_0 + x) \right] + \\ &+ D \left[\frac{1}{r_0} \left(1 - \frac{x}{r_0}\right) \left(\frac{\partial C(x)}{\partial x} \right)_{t_0} + \left(\frac{\partial^2 C(x)}{\partial x^2} \right)_{t_0} \right] \end{aligned} \quad (16)$$

Смещение положения границы. Так как за начало координат было принято положение седиментационной границы в момент времени t_0 , а положение границы однокомпонентного раствора с достаточной степенью точности [6] определяется начальным моментом первого порядка градиентной кривой, смещения кажущейся границы определяются величиной

$$\Delta x_{\text{cm}} = \mu_1^* = \frac{1}{C_p^*} \int_{x_m}^{x_p} \frac{\partial C^*(x)}{dt} x dx = \frac{-\omega^2 S x_p^2 + D}{v_{\text{ск}} \left(1 - \frac{\omega^2 S x_p}{v_{\text{ск}}}\right)} \approx \frac{-\omega^2 S x_p^2 + D}{v_{\text{ск}}}, \quad (17)$$

где x_m ; x_p — соответствуют точкам в области мениска и в области плато соответственно; C_p^* — концентрации раствора в точке x_p . Индекс * относится к данным, полученным из кажущейся кривой, зарегистрированной сканирующим устройством.

Оценим максимально возможную величину погрешности $\Delta x_{\text{см}}$. При условии (которое практически всегда выполняется), что скорость сканирования превышает скорость движения границы хотя бы в 5 раз, погрешность определения S не превышает 0,2%. Поэтому величиной $\Delta x_{\text{см}}$ при расчете в большинстве случаев можно пренебречь.

Погрешность определения второго центрального момента кажущейся градиентной кривой. Второй центральный момент кажущейся градиентной кривой определяется из выражения

$$\mu_2^* = \sigma^{*2} = \frac{1}{C_p^*} \int_{x_m}^{x_p} \frac{\partial C^*(x)}{\partial x} (x + \mu^*)^2 dx, \quad (18)$$

где σ^* – стандартное отклонение кажущейся градиентной кривой.

Абсолютная погрешность определения второго центрального момента градиентной кривой

$$\Delta \sigma^2 = \sigma^{*2} - \sigma^2 = \frac{2\omega^2 S}{v_{\text{ск}}} \left[-\frac{5x_p^3}{3} + \sigma^2(r_0 + x_p) \right] - \mu_1^{*2} \quad (19)$$

с учетом уравнения (17) и формулы $\sigma^2 = 2Dt/(1 - \omega^2 St)$ получается

$$\Delta \sigma^2 = \frac{2\omega^2 S}{v_{\text{ск}}} \left[-\frac{5x_p^3}{3} + \sigma^2(r_0 + x_p) \right] + \left[\frac{-\omega^2 S x_p^2 + \sigma^2 \frac{(1 - \omega^2 St)}{2t}}{v_{\text{ск}}} \right] \quad (20)$$

Если при расчете $\Delta \sigma^2$ в формуле (19) положить $\sigma^2 \approx \sigma^{*2}$, тогда выражение (19) можно использовать в качестве поправки при определении σ^2 методом скоростной седиментации.

Пример. Влияние динамических погрешностей на результаты определения S и D для 70 S рибосомы *E. coli*: $S^0_{20\alpha} = 69,1 - 70,5$ ед. свеберга и $D^0_{20\alpha} = 1,83 \cdot 10^{-7}$ см²/сек (даные взяты из [7]).

Скорость вращения ротора $n = 45\,000$ об/мин, $v_{\text{ск}} = 0,2$ мм/сек.

Считая, что количество усредненных измерений на единицу длины кюветы l должно быть не менее 50 измерений/мм, максимально возможная величина усреднения m определяется из выражения (2)

$$m = \frac{45\,000}{0,2 \cdot 50 \cdot 60} = 75$$

Здесь коэффициент увеличения оптической системы K принят равным единице. В соответствии с уравнением (1) случайная погрешность результата измерения в этом случае уменьшится в $\sqrt{75} = 8,6$ раза.

Эквивалентное время от начала разгона, при котором граница будет на расстоянии $r_0 = 65$ мм от центра вращения ротора, определяется выражением

$$t = \frac{\ln r_0 - \ln r_m}{\omega^2 S},$$

где r_m – расстояние мениска от центра вращения ротора. Примем $r_m = 60$ мм, тогда

$$t = \frac{\ln 65 - \ln 60}{1,553 \cdot 10^{-4}} = 515 \text{ сек.}$$

Значение σ^2 определяется из выражения

$$\sigma^2 = \frac{2Dt}{1 - \omega^2 St} = 2,05 \cdot 10^{-2} \text{ мм}^2$$

Динамическая погрешность определения S в соответствии с уравнением (8)

$$\delta S = \frac{1,553 \cdot 10^{-4} \cdot 65}{0,2} = 5 \cdot 10^{-2}$$

Смещение положения границы из-за искажения седиментационной кривой согласно формуле (17) для $x_p = 3\sigma$

$$\Delta x_{\text{см}} = -1,42 \cdot 10^{-4} \text{ мм}$$

т. е. значение $\Delta x_{\text{см}}$ пренебрежимо мало.

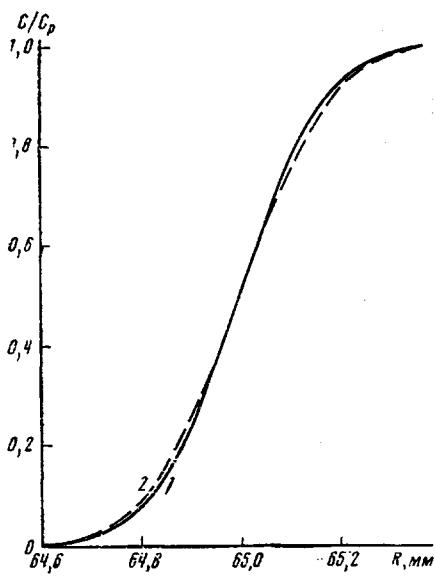


Рис. 3. Действительная (1) и кажущаяся кривые (2) при $v_{sk} \rightarrow \infty$ (1) и $0,2 \text{ мм/сек}$ (2)

Таким образом, при $v_{sk}=2 \text{ мм/сек}$ величиной динамической погрешности $\Delta\sigma^2$ можно пренебречь, поскольку, практически, прочие погрешности определения значительно превышают 1%, но это достигается за счет увеличения случайных погрешностей результатов измерения.

Специальное конструкторское
бюро биофизической аппаратуры

Поступила в редакцию
19 II 1974

ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Новицкий, Основы информационной теории измерительных устройств, «Энергия», 1968.
2. R. H. Stereani, S. J. Edelstein, M. J. Rehmuer, Anal. Biochem., 50, 213, 1972.
3. А. Х. Марголин, Б. М. Левин, А. В. Лабазов, Ю. А. Лонский, А. И. Самбурский, Мед. техника, 1971, № 6, стр. 22.
4. R. S. Trautman, S. P. Spragg, H. B. Halsall, Anal. Biochem., 28, 396, 1969.
5. O. Lamm, Arkiv. Mat. Astr. Fys., 1929, № 2, B21.
6. R. S. Trautman, Ultracentrifuge Analysis in theory and experiment, N. Y., 1963, p. 203.
7. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971.

Погрешность определения второго центрального момента градиентной кривой согласно выражению (20) при $x_p=3\sigma$

$$\Delta\sigma^2 = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ мм}^2$$

Относительное значение погрешности определения σ_2

$$\delta\sigma^2 = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma^2} = 8,8 \cdot 10^{-4},$$

т. е.

$$\delta\sigma^2 = 8,8\%$$

На рис. 3 приведены седиментационные интегральные кривые для 70 S рибосомы *E. coli*. Кривая 1 рассчитана для $v_{sk} \rightarrow \infty$, а кривая 2 — для $v_{sk}=0,2 \text{ мм/сек}$. Значение $\Delta\sigma^2$, рассчитанное на основании данных, полученных из кривых 1 и 2, равно $2,152 \cdot 10^{-3}$, что близко к значению $2,16 \cdot 10^{-3}$, определенному из выражения (20).

Если увеличить скорость сканирования в 5 раз, т. е. принять $v_{sk}=2 \text{ мм/сек}$, тогда величина усреднения будет $m=7$.

Случайная погрешность результатов измерения уменьшится в $\sqrt{7}=2,6$ раза, а динамические погрешности определения S и σ^2 составят $\delta S=0,5\%$ и $\delta\sigma^2=0,98\%$ соответственно.