



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 032**

51 Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04767038 .5**

96 Fecha de presentación : **10.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1668346**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Procedimiento para calibrar un fluorómetro de polarización.**

30 Prioridad: **10.09.2003 FI 20031294**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Thermo Fisher Scientific Oy
Ratastie 2
01620 Vantaa, FI**

72 Inventor/es: **Tuunanen, Jukka**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 317 032 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para calibrar un fluorómetro de polarización.

5 Campo de la técnica

La invención se refiere a un fluorómetro de polarización y está dirigida a la calibración del fluorómetro. La invención es aplicable a analizadores para examinar las propiedades químicas de muestras mediante fluorometría de polarización. Estos estudios se realizan en biotecnología y en particular en laboratorios de química clínica.

10 Antecedentes tecnológicos

En la fluorometría, la luz de excitación en una longitud de onda dada se dirige a una muestra. La iluminación genera fluorescencia en cualquier fluoróforo presente en la muestra, generando así la emisión de luz que tiene una longitud de onda más larga.

Si se polariza la luz de excitación, actuará en las moléculas del fluoróforo depositadas correctamente respecto a la polarización de la luz de excitación, y también se polariza la luz de emisión. El ángulo de polarización de la emisión es específico para el fluoróforo independiente de la longitud de onda.

Una emisión se puede despolarizar por diferentes razones. La despolarización se provoca mediante el cambio del estado de la molécula entre excitación y emisión. La diferencia de tiempo típica es de aproximadamente 10 nanosegundos. La despolarización se puede utilizar de diferentes maneras, por ejemplo para monitorizar reacciones químicas. Una causa principal de la despolarización es la oscilación circular de una molécula. La extensión del movimiento circular depende, entre otras cosas, de la forma y del tamaño de la molécula y de la viscosidad del medio. La despolarización se ve así afectada mediante el movimiento circular promedio de las moléculas de la substancia durante la diferencia de tiempo entre la excitación y la emisión. Si una molécula fluorescente está asociada con otra molécula, esto provocará un movimiento circular retardado del fluoróforo y una polarización aumentada de la emisión.

En particular en aplicaciones biotecnológicas, frecuentemente se ha asociado un fluoróforo fluorescente con una molécula que se refiere específicamente a moléculas que se pueden identificar. Un tamaño de molécula aumentado provoca un movimiento circular retardado de la molécula, reteniendo así mejor el fluoróforo el nivel de polarización original. Así, una medición de la polarización permite la medición directa y rápida de esta reacción específica. Una medición de la polarización espectral también puede proporcionar información importante sobre la muestra, que implica la medición de la polarización de la muestra en diferentes longitudes de onda de excitación o emisión.

La fluorescencia de la polarización es particularmente adecuada en el análisis de grandes cantidades de muestras debido al rápido crecimiento y al proceso de medición fiable.

La polarización se mide mediante un fluorómetro que comprende un filtro de polarización, tanto en el canal de excitación como en el de emisión.

Se requieren dos mediciones para calcular la polarización:

1. Un filtro de polarización de excitación y un filtro de polarización de emisión en alineación;
2. Un filtro de polarización de excitación y un filtro de polarización de emisión con un ángulo entre sí de 90 grados.

La polarización P se deriva de la fórmula:

$$P = (I_{II} - I_T)/(I_{II} + I_T) \quad \text{fórmula (1)}$$

en la cual:

I_{II} : intensidad de emisión con filtros paralelos

I_T : intensidad de emisión con filtros perpendiculares

La cantidad de polarización también se describe con el término de anisotropía r:

$$r = (I_{II} - I_T)/(I_{II} + 2I_T) \quad \text{fórmula (2)}$$

P y r se pueden calcular así entre sí:

$$P(r) = 3r/(2 + r) \quad \text{fórmula (1a)}$$

Los fluorómetros de polarización normalmente utilizan geometría llamada L, en la cual la luz de emisión se mide con un ángulo de 90 grados respecto a la luz de excitación. Esto reduce de manera eficiente el acceso de la luz de

ES 2 317 032 T3

excitación al detector de emisión. En la configuración usual, el canal de excitación utiliza un filtro de polarización estacionario y el filtro de emisión utiliza un filtro de polarización reemplazable, pero esta configuración también se puede invertir.

5 De una manera asumida, el canal de excitación comprende un filtro de polarización estacionario cuyo plano de polarización es X. La emisión de la muestra se mide con esta polarización, produciendo I_{XX} . Una segunda medición se realiza con la polarización de emisión girada 90 grados (plano Y), produciendo I_{XY} . En el caso ideal, la polarización se puede calcular directamente a partir de los resultados de la medición de la emisión I_{XX} y I_{XY} :

$$10 \quad P = (I_{XX} - I_{XY}) / (I_{XX} + I_{XY}) \quad \text{fórmula (3)}$$

Sin embargo, el nivel de transmisión de la señal desde el canal de emisión y la transmitancia del filtro de polarización de la emisión puede variar en intensidad en diferentes planos de polarización. Esto es porque es necesario un factor de calibración para compensar la diferencia entre las sensibilidades de medición de diferentes polarizaciones. El factor de calibración se llama el factor G. la polarización así compensada se deriva de la fórmula:

$$15 \quad P = (I_{XX} - GI_{XY}) / (I_{XX} + GI_{XY}) \quad \text{fórmula (4)}$$

Con las sensibilidades de la medición de la emisión en planos de polarización diferentes que son S_Y y S_X , siendo el factor G su relación mutua:

$$20 \quad G = S_X / S_Y \quad \text{fórmula (5)}$$

El factor G se puede determinar si está también disponible un filtro de polarización reemplazable en el lado de excitación. G se calcula mediante la medición de la polarización de la muestra con las dos polarizaciones. Sin embargo, esta manera de medición implica numerosos problemas:

1. Un diseño complejo; un filtro de polarización dual, que requiere que el filtro se coloque con un ángulo de exactamente 90 grados.
2. La medición consiste en cuatro mediciones y, por lo tanto, es lenta. El factor G se puede medir por adelantado en una muestra adecuadamente representativa en un nivel de señal alto. Esto es poco práctico si la medición se realiza en una muestra cuya polarización es desconocida. El reemplazo de los filtros de polarización es también una operación relativamente lenta, considerando el período de medición real.
3. Ruido; el ruido de P consiste en todos de los cuatro componentes de la medición de la polarización. La medición requiere una muestra con una fluorescencia adecuada para minimizar los factores de ruido.

Debido a los problemas citados anteriormente, de hecho, el factor G se mide en los casos más concretos mediante la utilización de una muestra de referencia cuya polarización P es conocida. G se puede derivar entonces a partir del término de P (fórmula (4)). La fluoresceína, por ejemplo, es esta sustancia de referencia. Este procedimiento también implica problemas:

1. El mantenimiento de la solución para cualquier medición incidental; por ejemplo, la fluoresceína exacta solamente para aplicaciones que utilizan la fluoresceína como fluoróforo.
2. Las mediciones de la polarización espectral como una función de la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión ($P(\lambda)$) son difíciles de realizar. Es necesario conocer exactamente tanto el espectro $P(\lambda_{\text{excitación}})$ como el $P(\lambda_{\text{emisión}})$ de la sustancia de referencia.

El documento WO 91/07652 propone ópticas y un procedimiento para medir la polarización de fluorescencia corregida de la fuente. En esta disposición, el fluorómetro se basa en un fotodetector de referencia para monitorizar la intensidad de la fuente de luz y para corregir las intensidades fluorescentes medidas. En el canal de excitación hay un polarizador ajustable, y en el canal de emisión uno fijo. Solamente son necesarias dos mediciones para la corrección: una en cada posición del polarizador de excitación. Las mediciones de corrección se podrán realizar con una cubeta modelo o sin cubeta.

El documento US 4074939 describe un aparato con dos canales de emisión completos, mediante los cuales se calibra la medición de la polarización. El documento US 6297018 describe un aparato con filtros de polarización reemplazables, tanto en el canal de excitación como en el canal de emisión. Los procedimientos de SPIE Vol. 4625 (2002) 126-130 describen un instrumento con un polarizador horizontal o vertical y un detector de referencia al cual se conducen una parte de la luz polarizada en el canal de excitación, antes de alcanzar la muestra.

Sumario de la invención

Un procedimiento para calibrar un fluorómetro de polarización, según la reivindicación 1, se ha inventado ahora. Las otras reivindicaciones definen algunas de las realizaciones de la invención.

ES 2 317 032 T3

Según la invención, el canal de emisión utiliza un filtro de polarización estacionario y el canal de excitación utiliza un filtro de polarización reemplazable. La calibración del dispositivo meramente requiere la medición de la intensidad de excitación en los dos planos de polarización. No es necesaria ninguna muestra para esto, y la medición se puede realizar directamente sobre la trayectoria de la luz de excitación. Así, un dispositivo con geometría L puede comprender un detector de excitación especial (especialmente libre de polarización) específicamente adecuado para medir la intensidad de la excitación. También hay un detector de referencia, al cual se puede conducir la luz polarizada desde el canal de excitación, especialmente a través de un separador de rayos, antes de conducirse a la muestra o al detector de excitación. Este detector de referencia se puede calibrar sobre la base del detector de excitación, de manera que las sensibilidades de la medición del fluorómetro sobre los planos de polarización se pueden calcular también sin conducir la luz al detector de excitación. Por lo tanto, se pueden medir de manera correcta los espectros de fluorescencia.

Dibujos

Los dibujos adjuntos forman parte de la descripción escrita de la invención y se refieren a la siguiente descripción detallada de la invención. En los dibujos

- La figura 1 muestra un principio de medición de fluorómetro de polarización con geometría L;

- La figura 2 muestra un fluorómetro de polarización realizado con óptica de lente y diseñado para medir pocillos sobre una placa de matriz; y

- La figura 3 muestra un fluorómetro de polarización realizado con óptica de espejo para medir pocillos sobre una placa de matriz.

Descripción detallada de la invención

Según la invención, el canal de emisión utiliza un filtro de polarización estacionario y el canal de excitación utiliza un filtro reemplazable. Cuando el plano de polarización del canal de emisión se marca con una X y el plano de polarización perpendicular a éste se marca con una Y, la polarización P se deriva a partir de la fórmula:

$$P = (I_{XX} - GI_{YX}) / (I_{XX} + GI_{YX}) \quad \text{fórmula (6)}$$

$$G = E_X / E_Y \quad \text{fórmula (7)}$$

I_{XX} = intensidad de emisión con el plano de excitación X

I_{YX} = intensidad de emisión con el plano de excitación Y

E_X = intensidad de excitación sobre el plano X

E_Y = intensidad de excitación sobre el plano Y

Combinando las fórmulas (6) y (7) se consigue

$$P = (I_{XX}/E_X - I_{YX}/E_Y) / (I_{XX}/E_X + I_{YX}/E_Y) \quad \text{fórmula (8)}$$

Así, la determinación del factor G solamente requiere dos mediciones. Los componentes del factor G en este caso se han formado antes de la muestra, pudiéndose realizar las mediciones para determinar el factor G en ausencia de la muestra utilizando un detector de excitación, que se coloca sobre la trayectoria del rayo de excitación, en otras palabras, sin conducir la luz a través del canal de emisión.

La medición del factor G de excitación de esta manera provoca ventajas significativas, entre otras cosas:

1. La medición es completamente independiente de la muestra. La medición se realiza preferiblemente sin ninguna muestra y también sin utilizar ningún recipiente de muestra.

2. La medición es rápida, considerando que la determinación real requiere solamente dos mediciones. Respecto al canal de referencia calibrado, la determinación solamente requiere dos mediciones.

3. No se requieren componentes adicionales si la medición fotométrica ya se ha previsto en el dispositivo, es decir, permite simultáneamente la medición fotométrica.

4. Con bajas concentraciones de la muestra, el ruido P de la polarización es bajo, porque el resultado solamente consiste en dos componentes del resultado de la medición de bajo nivel. Los otros dos factores requeridos para calcular el factor G de la polarización prácticamente no presentan ruido gracias al alto nivel de la señal.

ES 2 317 032 T3

Con el uso de filtros de polarización de excitación separados, el filtro se puede reemplazar con un movimiento lineal, permitiendo un fácil posicionamiento de alta precisión. Uno podría utilizar opcionalmente un único filtro, que se gira entre las mediciones.

5 La fuente de luz puede comprender, por ejemplo, una bombilla incandescente (por ejemplo, una lámpara halógena), que genera un amplio espectro uniforme y es así adecuado para mediciones versátiles. Una lámpara de deuterio también se puede utilizar, específicamente cuando se desea un fuerte efecto de iluminación en el intervalo ultravioleta. Una luz de flash de xenón, sin embargo, es una fuente de luz particularmente adecuada. Esta fuente de luz permite cubrir un intervalo de longitudes de onda de excitación muy grande. La fuente de luz de flash genera cortos pulsos
10 de luz de una intensidad muy alta. El uso de una lámpara de luz de flash es eficiente, porque la lámpara está en funcionamiento solamente en el momento de la medición.

Para la determinación del factor G, es posible utilizar un detector de excitación que está específicamente libre de polarización y adecuado de una manera óptima y precisa para medir la intensidad de la excitación. El detector se puede
15 colocar, por ejemplo, después del área de muestra, permitiendo que el detector esté en una posición fija sin interferir con la colocación de la muestra. El detector de excitación puede ser, por ejemplo, un fotodetector de silicio o un tubo multiplicador fotográfico (PMT). Un fotodetector de silicio situado perpendicularmente respecto a la luz de excitación que se debe medir es un detector particularmente adecuado. Por ejemplo, se pueden prever ópticas de lente o espejo frente al detector en vista a ampliar el área efectiva del detector. El detector de la excitación que mide el factor G
20 también se puede colocar delante del recipiente de la muestra.

Según la invención, también hay un segundo detector, llamado detector de referencia, y este detector de referencia está colocado antes de dicho detector de excitación y también antes de la muestra. El detector de referencia se puede utilizar también cuando una muestra colocada en el fluorómetro evita el uso del detector de excitación. Una parte
25 de la luz polarizada se conduce al detector de referencia preferiblemente a través de unos medios adecuados. Estos medios provocan la polarización tanto en el rayo de luz transmitido como en el rayo de luz reflejado. Estos fenómenos dependen de la longitud de onda. Por esta razón, una medición realizada a través de estos medios será imprecisa, a menos de que se calibre por separado. Esta calibración se puede realizar antes de colocar la muestra en el fluorómetro mediante el detector de excitación. Cuando el detector de referencia se ha calibrado, se puede utilizar para medir el
30 factor G en tiempo real durante la medición de la muestra, también cuando la muestra está sobre la trayectoria de la luz del detector de excitación. De esta manera, las desviaciones de los componentes eléctricos y ópticos se pueden tener en cuenta de una manera muy fiable en los cálculos. Esto es una ventaja significativa, especialmente cuando se miden los espectros de fluorescencia. En estas mediciones, es necesario aproximadamente 10 minutos para medir en cada plano de polarización.
35

Los medios para conducir una parte de la luz pueden ser, por ejemplo, una placa de vidrio, un espejo semitransparente, un espejo menor que el área del canal de excitación, o una fibra óptica.

El detector de excitación permite la calibración del detector de referencia para hacer que mida correctamente las características de polarización del canal de excitación. El detector de referencia como tal no proporciona mediciones exactas de las características de polarización del canal de excitación, especialmente debido al comportamiento de la polarización de los medios para conducir parte de la luz. Sin embargo, estos medios tienen un comportamiento de polarización estable, de manera que, después de una medición mediante un detector fotométrico y un detector de referencia, el detector de referencia se puede calibrar en vista a la medición de la polarización del canal de excitación.
40 Esto hace que el proceso de medición sea incluso más rápido, ya que no se requiere una calibración del factor G antes de la medición. Sin embargo, será necesaria una calibración periódica en los casos donde se requiera un factor G de alta precisión.
45

Si el detector de excitación proporciona en los planos vertical y horizontal las señales F_V y F_H , y el detector la referencia al mismo tiempo las señales R_V y R_H , y si las señales reales obtenidas mediante el detector de referencia durante las mediciones de la muestra son R_{Va} y R_{Ha} , el factor G corregido G_{corr} es

$$G_{corr} = k * G = k * R_X/R_Y \quad \text{fórmula (A)}$$

55 $k = (F_{XC}/F_{YC}) * (R_{YC}/R_{XC}) \quad \text{fórmula (B)}$

$$P = (I_{XX} - G_{corr}I_{YX})/(I_{XX} + G_{corr}I_{XY}) \quad \text{fórmula (C)}$$

en las que

60 R_{XC} = intensidad del canal de referencia en la fase de calibración en el plano X

R_{YC} = intensidad del canal de referencia en la fase de calibración sobre el plano Y

65 F_{XC} = intensidad del foto detector en la fase de calibración sobre el plano X

F_{YC} = intensidad del foto detector en la fase de calibración sobre el plano Y

ES 2 317 032 T3

R_X = intensidad del canal de referencia en la fase de medición sobre el plano X

R_Y = intensidad del canal de referencia en la fase de medición sobre el plano Y

5 I_{XX} = intensidad de emisión con el plano de excitación X

I_{YX} = intensidad de emisión con el plano de excitación Y

10 Combinando las fórmulas (A) y (B) y (C) se obtiene

$$P = (I_{XX}/R_X - kI_{YX}/R_Y)/(I_{XX}/R_X + kI_{YX}/R_Y) \quad \text{fórmula (D)}$$

$$k = (F_{XC}/F_{YC} / * (R_{YC}/R_{XC}) \quad \text{fórmula (E)}$$

15 La fórmula (E) contiene información solamente de la fase de calibración y la fórmula (D) contiene información solamente de la fase de medición.

20 A no ser que la intensidad de la fuente de luz permanezca suficientemente constante a lo largo de varias etapas de medición, también se debe medir la intensidad de la fuente de luz antes de la muestra. En la práctica, la medición de la intensidad es necesaria. Esto es especialmente en el caso cuando se utiliza iluminación de luz de flash de xenón. La luz de flash de xenón tiene una inestabilidad del orden de 0,5 ... 1%. En la práctica, se requerirá una medición de referencia en cada etapa de medición.

25 En el fluorómetro según la invención, la medición de la intensidad de referencia se puede realizar utilizando detector de referencia ya utilizado para la medición del factor G. El nivel de fluctuación de la fuente de luz se tiene en cuenta mediante una señal a partir del detector de referencia. Como en la fórmula P cada valor de la intensidad de emisión (I_{XX} , I_{YX}) se mide con el valor de excitación correspondiente (E_X , E_Y), la fluctuación del flash se cancela automáticamente. No es necesario ningún procesamiento de señal adicional.

30 Para medir exactamente la emisión, las longitudes de onda de la excitación y de la emisión se deben filtrar de manera cuidadosa. La elección de la longitud de onda de emisión debe evitar que la luz de excitación proceda directamente del detector de medición de la emisión.

35 La longitud de onda se selecciona en los canales de excitación y emisión mediante un monocromador. El monocromador se puede basar en la interferencia, especialmente sobre membranas finas, o sobre la transmitancia natural de la sustancia. El monocromador, por ejemplo, puede ser un monocromador de grabado o el filtro de color. Las configuraciones del monocromador pueden comprender varias etapas para aumentar el efecto del filtro. El término monocromador, por lo tanto, puede indicar un aparato que comprende 1 ... n elementos de monocromador idénticos o diferentes.

Se pueden utilizar ópticas de lente o espejo para la conducción de la luz.

45 Un tubo fotomultiplicador se utiliza frecuentemente como un detector de la medición de la luz de emisión, porque las señales ópticas que se debe medir son muy pequeñas, requiriendo así una alta sensibilidad de medición. También se utilizan fotodetectores de silicio. Estos detectores tienen el beneficio de una estabilidad excelente.

50 El filtro de polarización del canal de emisión también puede ser reemplazable según el intervalo de longitud de onda a utilizar. A menudo, un filtro de polarización cubre el intervalo ultravioleta, otro el intervalo visible, y un tercero el intervalo próximo a infrarrojos.

55 En muchos casos, una medición fluorométrica y una medición de la transmisión de una muestra se refieren a mediciones de las muestras en la misma área. Es ventajoso para el usuario que el mismo aparato realice tanto las mediciones fluorométricas como las mediciones fotométricas de densidad óptica, porque un aparato combinado es más económico que dos separados. Los grandes laboratorios también favorecen el uso de equipos combinados.

60 Las muestras se tratan usualmente sobre placas, donde unos recipientes de muestras, por ejemplo pocillos, están situados en una matriz bidimensional. Hay típicamente 6 ... 1536 pocillos, mientras que el área de la placa es bastante constante. En la mayoría de los casos, hay 96 ó 384 pocillos sobre la placa. Las dimensiones externas y el número de pocillos pueden variar en aplicaciones especiales.

65 Con los pocillos formando una matriz muy estrecha sobre la placa, la geometría de medición L no es aplicable. Las direcciones de medición libres se permiten desde el lado superior o el lado inferior del pocillo. Debido a problemas de la fluorescencia de fondo, la medición a través de la ventana inferior se evita preferiblemente en fluorometría. Además, el poliestireno, que es el material más frecuentemente utilizado en las placas, no es apto para mediciones de polarización a través del fondo, porque interfiere con los planos de polarización de manera aleatoria.

ES 2 317 032 T3

A un rayo de excitación se le puede dar una forma troncoconica en el pocillo para que el tamaño del rayo de excitación sea menor que el diámetro del pocillo. Esto consigue una buena separación del canal entre los pocillos y las tolerancias de posicionamiento del pocillo perjudicarán los resultados de la medición lo mínimo posible.

5 En consecuencia, se utiliza un filtro de polarización de excitación reemplazable: uno puede elegir un filtro en V o en H, o el filtro se puede eliminar de la medición de la intensidad de la fluorescencia. Los filtros de polarización se pueden cambiar óptimamente según la longitud de onda. El filtro de polarización también puede ser rotativo. Un filtro rotativo permite una medición precisa del valor angular del máximo de polarización cuando la polarización de la sustancia a determinar tiene un ángulo de rotación característico, con el cual la oscilación de la molécula interfiere posteriormente. Un filtro rotativo es particularmente adecuado para medir muestras viscosas.

Así, la dirección de medición preferida es desde el lado superior del pocillo: la luz de excitación y la medición de la emisión se realizan desde la parte superior del pocillo. Con la excitación y la emisión utilizando la misma trayectoria, están separadas entre sí mediante un separador de rayos. Unos medios de este tipo se describen en el documento 15 WO 97/11354, en el cual la óptica fluorométrica se ha realizado con ópticas de lentes. Mediante la incorporación de filtros de polarización en los canales de excitación y emisión, la medición del factor G descrita anteriormente se puede realizar con la ayuda de un fotodetector colocado por debajo del pocillo. Al mismo tiempo, esto proporciona la opción de medición fotométrica.

20 El separador de rayos puede ser especialmente un espejo semitransparente, en particular de manera que está dividido en superficies de espejo mediante sectores. Respecto al efecto de baja difracción, esta ventana no interferirá con la calidad del rayo de medición de la excitación. El espejo también se puede vivir, por ejemplo, en círculos concéntricos, o más ventajosamente en elipses. Si la luz de excitación es lineal, el espejo tiene un orificio en el centro y su área de los bordes es reflectante. En este caso, la luz de excitación tendrá un ángulo sólido estrecho comparado con la trayectoria de la luz de emisión. Esto es ventajoso para la fotometría, considerando que la transmisión de la luz a través de un pocillo estrecho es difícil en fotometría. La luz de excitación fotométrica tendrá que penetrar a través de una superficie 25 líquida cóncava de manera afilada (usualmente un detergente se utiliza para establecer la superficie con una concavidad máxima y por esta razón la luz de excitación tendrá un ángulo sólido muy estrecho y se debe focalizar exactamente a la altura correcta. El espejo también puede ser dicróico. Este espejo refleja diferentes longitudes de onda de diferentes maneras. Como la longitud de onda de excitación es menor que la longitud de onda de emisión, las características de longitud de onda del espejo se pueden adaptar para producir una eficiencia conjunta óptima. Un espejo distróico implica el problema de ser practicable solamente en un par de longitudes de onda de excitación-emisión.

30 El separador de rayos que separa la excitación y la emisión también sirve como separador de rayos para que la luz de excitación se separe en el detector de referencia, de manera que la construcción será así directa.

La medición de la placa también se puede realizar mediante ópticas de espejo. El uso de dos espejos esféricos conectados en secuencia se prefiere especialmente. Sin embargo, un espejo esférico genera un fuerte astigmatismo y así degrada las características de imagen en la medición de pocillos estrechos. Sin embargo, si los espejos conectados en secuencia tienen planos de giro según un ángulo de 90 grados, el astigmatismo se compensará. En otras palabras, el error se hace doble, pero el error del astigmatismo del segundo espejo compensa el error del astigmatismo del primer espejo y el resultado de la imagen será bueno con vista a la medición fluorométrica y fotométrica. Este principio se ha descrito en detalle en el documento WO 03/016979. Los espejos son esféricos y cóncavos. Estos espejos son precisos y tienen costes de producción bajos comparados con los espejos esféricos. Las ópticas de espejo se pueden realizar 45 también con la ayuda de espejos esféricos substancialmente más caros, que permiten el uso de, por ejemplo, un único espejo para generar un rayo de luz de excitación cónico y preciso.

En las ópticas de espejo, un separador de rayos puede ser uno de los utilizados en ópticas de lente tal como se han mencionado anteriormente.

50 Las ópticas de espejo tienen la ventaja de ser independientes de la longitud de onda.

Cuando las ópticas de espejo utilizan un monocromador de grabado como monocromador de excitación, se representa la hendidura de salida del grabado al pocillo. Los filtros de polarización de excitación se colocan preferiblemente 55 en la proximidad de la hendidura. Los filtros de polarización de excitación están colocados después del monocromador, porque los monocromadores provocan la despolarización (es decir, la degeneración de la polarización). El filtro de polarización de emisión se coloca preferiblemente la proximidad de la hendidura de entrada del monocromador de emisión. Los rayos de luz de excitación y emisión se pueden separar entre sí a lo largo de su eje de medición óptico común mediante un pequeño espejo plano (por ejemplo, circular o elíptico). La luz de emisión volverá desde el pocillo a la óptica y pasa mediante este espejo. Además, se puede prever un separador de rayos para el canal de referencia justo por encima del pocillo. Este separador de rayos es, por ejemplo, una placa de vidrio, especialmente una placa de sílice (cuarzo sintético). Una placa de sílice típicamente refleja un máximo del 10%, y así habrá una pérdida de señal relativamente pequeña. La placa de vidrio protege simultáneamente la óptica contra vapores desde los pocillos.

65 El detector de excitación está situado en el otro lado del pocillo. Un sistema de lentes se puede prever frente al detector (por ejemplo, dos lentes plano-convexas), para la luz de excitación ampliada mediante la superficie líquida en el pocillo para focalizarse mejor sobre la superficie del fotodetector. Las ópticas del ente se pueden remplazar con

ES 2 317 032 T3

ópticas de espejo mediante la utilización, por ejemplo, de dos espejos cóncavos de la misma manera que las ópticas de excitación.

La fuente de luz de excitación y el monocromador, y también el monocromador de emisión y el detector, pueden requerir un espacio relativamente grande. Para un tamaño de analizador más pequeño, el uso de ópticas de fibra puede ser conveniente, aunque provocarán una pérdida de señal en ese caso. El analizador puede comprender, por ejemplo, tres módulos: un módulo de excitación, un módulo de ópticas de medición y un módulo de emisión, con ópticas de fibra utilizadas para conducir la luz entre los mismos.

Ejemplos

Ejemplos de diferentes realizaciones de la invención se proporcionan a continuación. Los ejemplos utilizan un plano de polarización horizontal en el canal de emisión, sin embargo, disposiciones similares se pueden realizar de manera natural como por ejemplo, mediante polarización de emisión vertical. La posición mutua relativa de los filtros de polarización del canal de excitación y el canal de emisión es esencial en este caso.

En la medición fluorométrica representada en la figura 1, la luz de excitación desde la fuente de luz 1 se conduce al monocromador de excitación 2 y a través del filtro de polarización de excitación 3H o 3V al recipiente de muestra 4. La luz de emisión generada en el recipiente de muestra se conduce en una dirección perpendicular a la luz de excitación a través del filtro de polarización de emisión 5H y el monocromador de emisión 6. La luz de emisión así generada se conduce al detector 7. El filtro de polarización de emisión es así estacionario, mientras que el filtro de excitación es reemplazable.

Para la determinación del factor G, se prevé un detector 8 sobre la trayectoria de la luz de excitación, por detrás del recipiente de muestra 4, perpendicular a la luz. Puede ser un fotodetector de silicio en particular.

Para una determinación simple del factor G, el recipiente de muestra se retira y la intensidad de excitación se mide en los dos filtros de excitación 3_H y 3_V . A continuación, el factor G se deriva a partir de la fórmula 7 anterior.

Con el uso de los filtros de excitación separados 3_H y 3_V , el filtro se puede reemplazar con un movimiento lineal, permitiendo la factibilidad de una orientación precisa. Opcionalmente, uno podría utilizar un único filtro, que se gira entre las mediciones.

El canal de excitación también comprende, después del filtro de polarización 3_H (o 3_V), un separador de rayos 9, a través del cual la luz se conduce a un detector de referencia 10. Mediante este detector de referencia es posible determinar el factor G en tiempo real también cuando la muestra está en su posición. A continuación, el factor G se deriva según la fórmula A anterior.

Una señal desde el detector de referencia permite también que se tenga en cuenta el nivel de fluctuación de la fuente de luz.

Cuando se retiran los filtros de polarización 3_H y 3_V del canal de excitación, se puede realizar una medición y fotométrica utilizando el detector 8. Esto permite el uso del aparato como equipo combinado sin ningún componente suplementario.

En la figura 2, el fluorómetro de polarización tiene una fuente de luz 1, a partir de la cual la luz de excitación se condensa mediante un sistema de lentes 11 a una abertura de excitación 12. La luz de excitación desde la abertura de excitación se colima con un sistema de lentes 13, y la luz colimada se conduce a través de un monocromador 2 (filtro de longitud de onda) y un filtro de polarización horizontal o vertical 3H o 3V a un espejo semitransparente 9.1.

La luz que ha pasado a través del espejo 9.1 converge mediante un sistema de lentes de focalización 14 a un pocillo de muestra 4.1 situado por debajo. De esta manera, se obtiene un punto luminoso en un área espacial definida en la muestra en el pocillo.

La porción de la luz de excitación reflejada desde el espejo 9.1 se conduce a un detector de referencia 10. Una muestra representativa de la luz de excitación se obtiene desde el espejo. Con la mitad de la luz utilizada para la excitación, la otra mitad se puede utilizar en la determinación de la amplitud de excitación. Un rayo de luz paralelo se puede dirigir a un detector que tiene un área grande, o utilizando una lente convergente, a un detector más pequeño.

La luz de emisión que emana para la medición desde el punto de luz sobre la muestra en el pocillo 4.1 pasa a través de un sistema de lentes de focalización 14 a la superficie inferior del espejo 9.1. La porción reflejada desde el mismo se utiliza para formar una imagen del punto con la ayuda de un sistema de lentes convergente 15 en una abertura de emisión 16. Desde la abertura, la luz de emisión se conduce a través de un sistema de lentes de colimación 17, un filtro de polarización de emisión 5_H , un monocromador 6 (filtro de longitud de onda) y un sistema de lentes de condensador 18 al detector 7 (tubo fotomultiplicador).

ES 2 317 032 T3

Para una medición a través, un sistema de lentes de medición a través 19 (por ejemplo dos lentes plano-convexas) y un detector 8 (por ejemplo un fotodetector de silicio) están previstos por debajo del pocillo 4.1. Esto permite realizar la calibración de la invención descrita anteriormente (sin un pocillo) o por ejemplo una medición fotométrica.

5 El haz de excitación se ha conformado mediante ópticas de lentes con una forma troncocónica en el pocillo 4.1 para obtener una buena separación del canal entre los pocillos y evitar cualquier efecto perjudicial de las tolerancias de posicionamiento del pocillo sobre los resultados de la medición.

10 El filtro de excitación es reemplazable: uno puede elegir un filtro vertical 3_v o un filtro horizontal 3_H , o el filtro se puede eliminar en la medición de la intensidad de la fluorescencia.

Un espejo semitransparente 9.1 puede ser una ventana dividida en superficies de espejo mediante sectores. Esta ventana no interfiere con la calidad del rayo de medición de la excitación respecto a su efecto de baja difracción.

15 En el fluorómetro de la figura 3, la luz de excitación desde una fuente de luz 1 se conduce a través de un monocromador 2 (monocromador de grabado) y un filtro de polarización de excitación 3_H y 3_v de manera perpendicular respecto a una abertura de excitación 12.1 en la pared de la carcasa como un objeto a modo de punto. Desde la abertura de excitación 12.1, el rayo de luz se refleja con un espejo plano de pequeño tamaño 20 a un primer espejo cóncavo 21, de manera que un rayo de luz paralelo se emite a un segundo espejo cóncavo idéntico 22, cuyo plano de inclinación está
20 según un ángulo de 90 grados respecto al plano de inclinación del primer espejo. En esta disposición, el astigmatismo se compensa y el segundo espejo cóncavo forma una imagen a modo de punto a través de una ventana de vidrio 9.2 prevista en el fondo de la carcasa en un pocillo de medición 4.1 situado por debajo. La ventana de vidrio 9.2 está ligeramente inclinada respecto a la trayectoria de la luz. Una porción de la luz de excitación se refleja desde la superficie de la ventana a un detector de referencia 10. El detector de referencia está situado en el plano de la imagen formado
25 por la óptica, ya que es el pocillo de medición. El detector de referencia monitoriza las variaciones en la intensidad del rayo de luz, y las variaciones se tienen en cuenta en el cálculo de las intensidades. Como el rayo de luz converge hacia el pocillo 4.1, el rayo de luz incidente sobre el detector de referencia se converge en consecuencia. Con la reflexión de la ventana siendo aproximadamente del 10%, la pérdida de señal total será de aproximadamente el 20%. Esto no disminuye la sensibilidad del aparato substancialmente. Para evitar fluorescencia del fondo, la ventana se puede prever
30 con un espesor mínimo la ventana también proporciona protección para las ópticas de medición, estando situado el pocillo demuestra en un espacio cerrado, en el cual la humedad, u otros gases o vapores perjudiciales, no tienen acceso al interior de la óptica. El material de la ventana es preferiblemente sílice. La ventana está preferiblemente colocada a un nivel suficientemente alto por encima del pocillo de medición para evitar salpicaduras desde cualquier dispositivo de dosificación que alcancen la superficie de la ventana.

35 La luz de emisión generada en el pocillo de medición 4.1 sigue a través del segundo espejo 22 al primer espejo 21 y desde ahí hacia el espejo plano 20. Parte de la luz de emisión pasa mediante el espejo sobre su exterior, formando una imagen a modo de punto con un astigmatismo corregido de manera perpendicular respecto a una abertura de emisión 16.1 sobre la superficie de la carcasa. Así, el espejo plano 20 tiene la función de separar la luz de excitación de la luz de emisión. Para una eficiencia máxima, la relación de división es preferiblemente del 50%: 50%.

Desde la abertura de emisión 16.1, la luz de emisión se conduce a través de un filtro de polarización de emisión 5_H y un monocromador de emisión 6 (monocromador de grabado) a un detector 7.

45 Para una medición a través, un sistema de lentes de medición a través 19 (por ejemplo, dos lentes plano-convexas) y un detector 8 (por ejemplo un fotodetector de silicio) están previstos por debajo del pocillo 4.1. Esto permite realizar la calibración de la invención (sin un pocillo) o, por ejemplo, una medición fotométrica.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para calibrar un fluorómetro de polarización, comprendiendo el fluorómetro un canal de excitación para conducir una luz de excitación polarizada a una muestra (4; 4.1) y un canal de emisión para conducir una luz de emisión desde la muestra, comprendiendo el canal de emisión un filtro de polarización (5_H), en cuyo procedimiento

- un primer filtro de polarización (3_H) está colocado en el canal de excitación, la luz se conduce a través del canal de excitación y la intensidad de la luz transmitida se mide mediante un detector de excitación (8),

10 - a continuación, el primer filtro de polarización se retira y se reemplaza con un segundo filtro de polarización (3_V), cuyo plano de polarización está invertido, preferiblemente 90 grados, respecto al plano de polarización del primer filtro de polarización, conduciéndose la luz a través del canal de excitación, y midiéndose la intensidad de la luz transmitida mediante el detector de excitación,

15 **caracterizado** porque

- el fluorómetro también comprende un detector de referencia (10), de manera que una parte de la luz polarizada del canal de excitación se conduce a través de unos medios adecuados (9; 9.1; 9.2) al detector de referencia antes de conducirse a la muestra o al detector de excitación y porque una parte de la luz polarizada del canal de excitación se conduce al detector de excitación (8), y porque

- sobre la base de las dos mediciones de la intensidad del detector de excitación (8), el detector de referencia se calibra para medir de manera precisa las sensibilidades del fluorómetro sobre los planos de polarización.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el detector de excitación (8) es un detector libre de polarización.

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que, frente al detector de excitación (8), hay un sistema óptico (19), tal como un sistema de lentes o de espejos, que aumenta su área efectiva.

35 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los medios (9; 9.1; 9.2) en el canal de excitación para conducir una parte de la luz polarizada desde el canal de excitación al detector de referencia (10) y una parte al detector de excitación (8) o a la muestra, es una placa de vidrio, un espejo semitransparente, un espejo menor que el área del canal de excitación, o una fibra óptica.

40 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polarizador de excitación comprende un primer filtro de polarización (3_H) y un segundo filtro de polarización (3_V), de manera que uno de los mismos puede colocarse a su vez, preferiblemente con un movimiento lineal, sobre la trayectoria de la luz dirigida desde una fuente de luz, o en el que el polarizador de excitación es un polarizador rotativo.

45

50

55

60

65

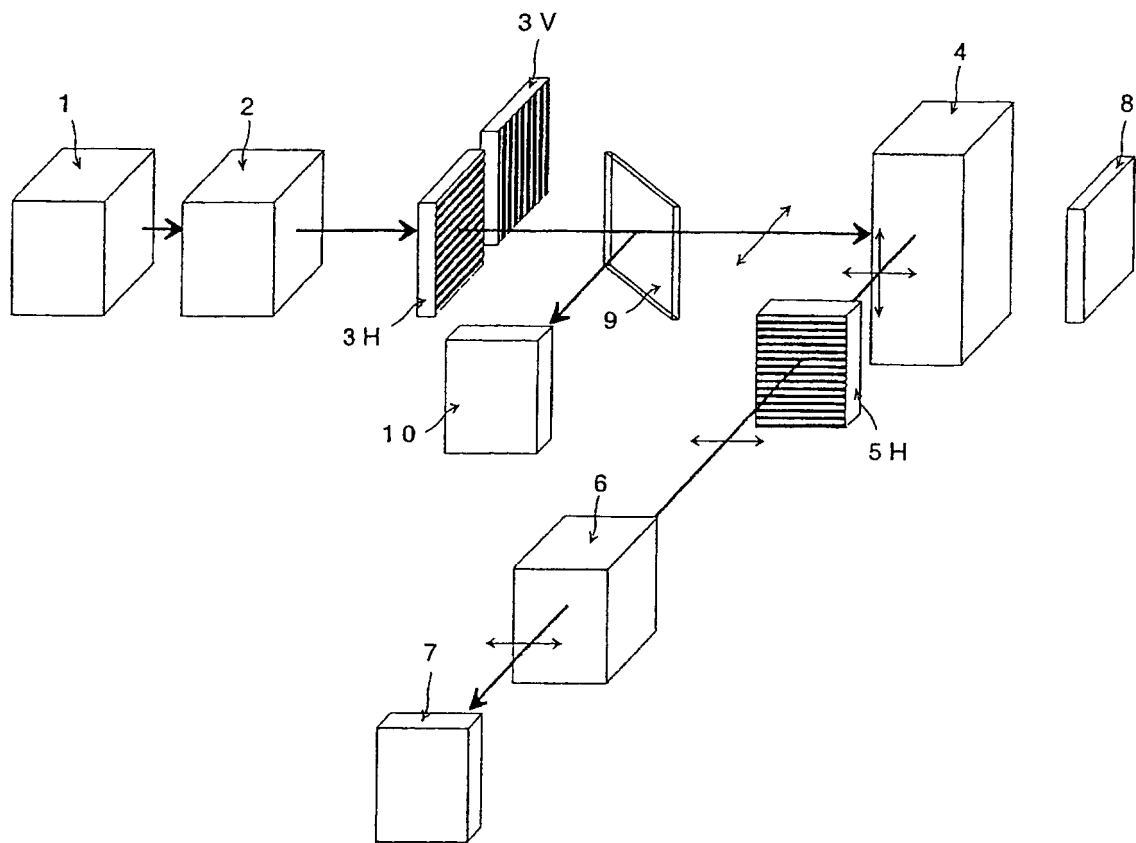


Fig. 1

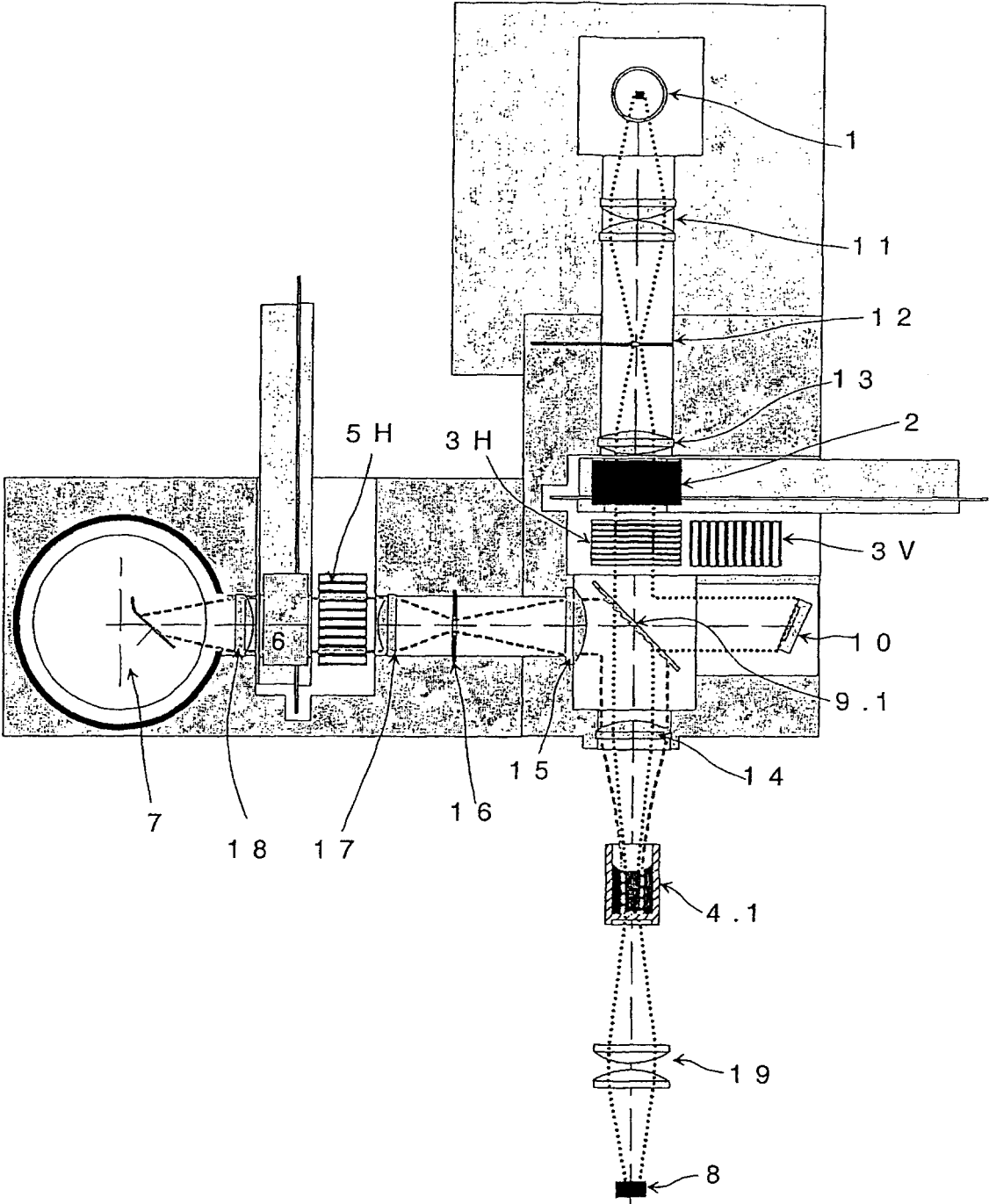


Fig. 2

Fig. 3

