

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

10	ES	11	NUMERO	10	A1
21		22	FECHA DE PRESENTACION		
			469049		

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
789.636	21-Abril-1977	U.S.A.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 01N	
54 TITULO DE LA INVENCION		
POLARIMETRO DE FLUORESCENCIA PARA ANALISIS MOLECULARES.		
71 SOLICITANTE (S)		
(de nacionalidad norteamericana)		
D. NATHAN SCHIFF BROMBERG		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
461 Conant Road		
WESTON, MASSACHUSETTS 02193 (U.S.A.)		
73 INVENTOR (ES)		
El Solicitante.		
75 TITULAR (ES)		
72 REPRESENTANTE		
D. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO N/Ref.: O.G. 34.004/JM/PP		

BAD ORIGINAL

Esta invención se relaciona con la polarización de fluorescencia y más particularmente con un sistema y un método de medición de la magnitud de la polarización de fluorescencia de soluciones.

5. La polarización de la luz emitida por una solución fluorescente adecuadamente excitada puede ser definida por la intensidad de dos componentes linealmente polarizados, uno de los cuales vibra a lo largo de un eje ortogonal al plano definido por los ejes de la luz excitante y de la luz emitida, vibrando el otro a lo largo de un eje situado en aquel plano y ortogonal al primer componente. Si las intensidades de los componentes primero y segundo se designan respectivamente por I_1 y I_2 , la polarización de la emisión fluorescente es:

15.
$$P = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}$$

- La medición de la polarización de fluorescencia es útil en el estudio de las reacciones inmunes y en ensayos biológicos, siendo también más generalmente útil en el análisis molecular. Por ejemplo, la polarización de fluorescencia es interesante en la detección de cambios en la forma molecular, tal como en la desnaturalización de proteínas, estudios de polimerización, supervisión de reacciones de cracking de petróleo y supervisión de procesos en alimentos.

25. En un sistema conocido de medición de la polarización de fluorescencia, se alinea un polarizador primero a lo largo de un eje paralelo al de polarización de la luz de excitación y luego a lo largo de un eje ortogonal al de polarización de la luz de excitación y el primer eje, efectuándose una medición de la intensidad de la
- 30.

- luz fluorescente emitida en cada posición de polarizador. Luego se efectúa un cálculo de los componentes de la suma y diferencia y de la relación entre ellos, de acuerdo con la anterior ecuación. Puede emplearse un polarizador que
5. se mueva entre dos posiciones mutuamente ortogonales o que se gire de modo continuo. Como variante, se han empleado canales ópticos múltiples, presentando cada canal luz respectivamente polarizada en una de las dos posiciones ortogonales. La luz vertical y horizontalmente polarizada -
10. es recibida por un solo tubo fotomultiplicador o por uno separado por cada canal. Con frecuencia se emplea un fotomultiplicador adicional para supervisar la intensidad de la fuente de excitación a utilizar en un circuito de control de ganancia automático.
15. Las instrumentaciones del sistema conocidas en la técnica han sido muy complejas tanto en relación con - con los dispositivos ópticos empleados como con el sistema circuital destinado a computar la polarización. El cálculo de la ecuación de polarización se ha realizado en ge-
20. neral mediante computadora analógica o digital o específicos aparatos determinadores de relaciones, tales como un registrador de relaciones.
- Resumiendo, la presente invención proporciona un sistema y un método de medición de la polarización de fluorescencia, capaces de producir, de manera fiable, repetible y precisa, mediciones de polarización incluso extremadamente pequeña de fluorescencia de bajo nivel. La invención emplea un número relativamente pequeño de componentes ópticos para reducir al mínimo la fluorescencia, polarización y diseminación falsas que a menudo pueden produ-
25. rizar
- 30.

5. cirse en muchos materiales ópticos, y utiliza un laser CW como fuente colimada y linealmente polarizada que proporciona un haz de entrada de intensidad relativamente elevada y de pequeña sección transversal. En el lado de una muestra correspondiente a la excitación, no es necesario emplear ninguna lente ni polarizadores o colimadores separados, eliminándose así componentes ópticos que, si se hallaran presentes, podrían afectar a la polarización y fluorescencia de fondo. Sólo se emplea una trayectoria óptica para ambos componentes de polarización, de tal manera que éstos son igualmente afectados por la trayectoria común, con el resultado de que pueden suprimirse los efectos de tal trayectoria por el procesamiento de las señales.

10. La señal eléctrica proporcionada en respuesta a la polarización de fluorescencia de luz emitida por una muestra, y como representación de tal polarización, se procesa mediante un sistema circuital relativamente sencillo que ofrece una exacta medición de la salida. El sistema circuital procesador de las señales produce directamente señales primarias y segundas representativas de los componentes de la diferencia y suma de la ecuación de polarización, proporcionándose la relación de estos componentes sin un efectivo cómputo de división, simplificándose así el aspecto computativo del procesamiento de las señales.

25. Descripción de los dibujos

Se comprenderá mejor la invención mediante la siguiente descripción detallada, considerada conjuntamente con los dibujos que se acompañan, en los cuales:

30. La figura 1 es una vista esquemática de un polarímetro de fluorescencia de acuerdo con la invención.

La figura 2 es un diagrama en bloque del sistema circuital de procesamiento de señales según la invención.

La figura 3 es un diagrama esquemático del sistema circuital de procesamiento de señales de la figura 2.

5. La figura 3A es un diagrama esquemático de la lógica autocero de la figura 3.

Las figuras 4A a 4G son formas de onda útiles para ilustrar el funcionamiento de la lógica de impulsos de sincronización de la figura 3.

10. La figura 5 es una vista ilustrativa parcialmente cortada de un polarizador rotatorio empleado en la invención.

La figura 6 es una vista esquemática de una disposición variante de una célula de muestras.

15. La figura 7 es un diagrama en bloques de un circuito variante de procesamiento de señales.

La figura 8 es una representación muy ampliada de un filtro de excitación empleado en la invención.

20. La figura 9 es una representación muy ampliada de un filtro de emisión empleado en la invención.

La figura 10 es una vista esquemática de una versión variante de la figura 1, que emplea un despolarizador.

25. La figura 11 es una vista esquemática de una versión variante de la figura 1, que emplea una placa de sondas u otro analizador rotatorio en el lado de emisión de la célula de muestras; y

La figura 12 es una vista esquemática de una versión variante de la figura 1, que emplea un analizador rotatorio en el lado de excitación de la célula de muestras.

30. Descripción detallada de la invención

Con referencia a la figura 1, se muestra un laser CW 10 que proporciona una fuente colimada de luz monocromática linealmente polarizada a través de un filtro 12 dotado de una banda de paso óptica centrada alrededor de la frecuencia fundamental del laser 10 y que funciona excluyendo la luz por encima y debajo de la banda de frecuencias interesante. Puede disponerse un obturador 11 frente al laser 10 para ocluir el haz excepto durante una operación de medición. La luz procedente del filtro 12 se dirige a una célula de muestras 14 que contiene una muestra líquida, cuya polarización de fluorescencia ha de medirse. Desde la muestra se emite radiación fluorescente a lo largo de un eje ortogonal al de la luz que incide sobre dicha muestra. La radiación fluorescente de la célula de muestras 14 se dirige a través de un polarizador lineal 16 en continua rotación y desde él a través de un filtro 18 dotado de una banda de paso centrada en la frecuencia de emisión.

La luz transmitida por el filtro 18 es recibida por un fotodetector 20, típicamente un tubo fotomultiplicador, cuya señal de salida eléctrica se aplica al sistema circuital 22 de procesamiento de señales. La posición rotatoria y velocidad del polarizador 16 son detectadas por un sensor 24 que proporciona una señal eléctrica representativa de tales posición rotatoria y velocidad del polarizador 16 al sistema circuital 22 para su uso como señal de sincronización, tal como se explicará. En una versión típica, el sensor 24 incluye un sensor magnético u óptico que funciona detectando unos elementos magnéticos u ópticos 17 dispuestos alrededor de la periferia del po-

larizador 16 y proporcionando impulsos eléctricos representativos de la posición y velocidad rotatorias del polarizador 16. La señal de salida del sistema circuital 22 se aplica a un indicador 25, tal como un indicador numérico, para señalar la polarización de fluorescencia de la muestra objeto de investigación. La señal de salida puede aplicarse también a una impresora, computadora u otro dispositivo de salida para su almacenamiento o uso.

La célula de muestras 14 es de construcción conocida, que presenta una cámara a temperatura estabilizada destinada a contener una determinada cantidad de líquido de muestra. Debido al pequeño área transversal del haz laser empleado en la invención, la cantidad de muestra puede ser muy pequeña, aproximadamente 3 microlitros normalmente. El tiempo de análisis variará dependiendo de la naturaleza de la muestra, de la intensidad del haz laser y de la precisión requerida. Este tiempo puede variar entre fracciones de un segundo y decenas de segundos. El análisis es no destructivo, de manera que pueden efectuarse repetidas mediciones sobre una muestra sin que se produzca ningún daño en la misma.

El sistema circuital 22 de procesamiento de señales se muestra en un diagrama en bloques en la figura 2. La señal del fotodetector 20 se aplica a los filtros 30 y 32. El filtro 30 es uno de banda de paso dotado de una frecuencia central doble a la frecuencia rotatoria nominal del polarizador rotatorio y que proporciona una señal de salida directamente representativa del componente diferencial de la polarización de fluorescencia y cuya señal se aplica a un amplificador de corriente alterna

- 34 y desde él a un detector 36 sensible a las fases. El filtro 32 es uno de paso bajo que proporciona una señal de salida directamente representativa del componente de suma de la polarización de fluorescencia y cuya señal se aplica a un integrador 38 que proporciona una señal integrada que se aplica a una entrada de un comparador 40, cuya segunda entrada es una señal de referencia derivada de una adecuada fuente de referencia 42. La señal de salida del comparador 40 se aplica a la lógica 44, que proporciona una señal de inhibición al detector 36 sensible a las fases. La lógica 44 proporciona señales a un contador 48 provisto de un reloj asociado 50 y cuyo contador acciona al indicador 26. Los filtros 30 y 32 sirven también para discriminar contra un ruido de 60 y 120 ciclos producido por la línea conductora de energía.
- El filtro 30 impide que los armónicos impares de la frecuencia portadora sean detectables por el detector sensible a las fases e impide asimismo la saturación del amplificador 34. La anchura de banda del filtro 30 es suficiente para producir la deseada respuesta plana dentro de la cual puede conseguirse una regulación del polarizador rotatorio.

- El sensor 24 (figura 1) proporciona una señal de referencia de la frecuencia al detector 36 sensible a las fases. La salida de este detector 36 se acopla a un integrador 54, cuya salida se aplica a un comparador 56 que tiene una adecuada fuente de referencia 55. Una fuente 46 de corriente convertidora se acopla mediante la puerta 52 al integrador 54 en respuesta a una señal de control procedente de la lógica 44. La señal de salida del comparador 56 se aplica a la puerta 57, que recibe también la señal de salida del comparador 40, cuya salida se aplica a la lógica

ca 44.

Preferiblemente, se disponen unos circuitos de autocero en asociación con los integradores 38 y 54 para compensar los desplazamientos variables que pueda haber.

5. La salida del integrador 38 se aplica a la lógica de autocero 97, cuya salida se aplica como señal compensadora al integrador 38. La lógica 97 funciona durante un ciclo de autocero, tal como vuelve a explicarse luego, para derivar una señal compensadora que cancele sustancialmente el desplazamiento medido. Análogamente, la lógica 99 proporciona la puesta en autocero del integrador 54.
- 10.

- Un componente de corriente continua y otro de corriente alterna derivan respectivamente de la señal fotodetectora, representando al componente de corriente continua el término de suma de la ecuación de polarización, mientras que el componente de corriente alterna representa el término de la diferencia. El componente de corriente continua, después de su filtración por el filtro 32 se integra en el integrador 38. El componente de corriente alterna se convierte mediante detección sincrónica en el detector 36 en una señal de corriente continua que es luego integrada por el integrador 54. Cuando la señal de salida del integrador 38 alcanza el nivel del voltaje de referencia de la fuente 42, determinado por el comparador 40, se produce una señal de arranque por el comparador para el contador 48 por medio de la lógica 44 para que el contador 48 acumule los impulsos del reloj 50. Esta señal del comparador 40 hace también que la lógica 44 proporcione una señal de apertura a la puerta 52 para determinar la aplicación de una señal de corriente constante desde la fuente 46 al integrador 54.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

- en lugar de la señal de salida anteriormente aplicada desde el detector 36 sensible a las fases. La señal de corriente constante es de polaridad opuesta a la señal del detector 36 anteriormente aplicada al integrador 54, de manera que éste ha de descargar a un ritmo uniforme. La descarga del integrador continúa hasta que se alcanza un voltaje de referencia, típicamente cero, determinado por el comparador 56, que seguidamente proporciona una señal de parada a través de la lógica 44 al contador 48 para interrumpir la operación de conteo. El conteo acumulado por el contador 48 es representativo del tiempo de descarga del integrador 54, que a su vez es representativo de la polarización. El conteo acumulado se aplica al indicador 26 para la presentación numérica de la medición de polarización.
15. Se apreciará que el integrador 54, conjuntamente con el contador 48, funciona a modo de convertidor analógico a digital de inclinación doble, en el que el integrador se carga a un nivel representativo de una cantidad de entrada a medir y se descarga a un ritmo uniforme, siendo representativa la duración de la descarga de la magnitud de la entrada y durante cuyo intervalo de descarga se pone en funcionamiento un contador para proporcionar una indicación digital de tal magnitud. En este caso, el integrador 54 se carga a un nivel determinado por el integrador 38, de tal manera que el intervalo de descarga representa la relación entre la señal de corriente alterna, que representa el término diferencial de la ecuación de polarización, y la señal de corriente continua, que representa el término de la suma. La puerta 57 funciona inhibiendo el funcionamiento del comparador 56 para impedir una falsa conmutación del
- 20.
- 25.
- 30.

5. mismo en presencia de niveles de señales muy bajos en el canal de diferencia. El comparador 56 es inhabilitado ligando a masa su salida mediante la puerta 57 cuando el integrador 38 está cargando y el comparador 40 no se halla activado.

10. La polarización se define como el componente diferencial dividido por el componente de suma, y para cada medición se efectúa la del componente diferencial para un número fijo de fotones del componente de suma. El denominador de la ecuación es siempre el mismo y por tanto no es preciso realizar una división efectiva, sino que automáticamente proporcionada la relación, que es proporcional a la polarización. El contador 48 se pone en funcionamiento por la señal procedente del comparador 40, y se detiene por la señal del comparador 56. Se proporciona un conteo para un valor normalizado del denominador, para aplicar una señal de contador al indicador 26, que es una medida directa de la polarización, sin requerir un cómputo efectivo de la división entre los términos de diferencia y suma de la ecuación.

20. El sistema circuital procesador de señales se muestra con más detalle en la figura 3. La señal de foto detector se aplica a un filtro de entrada que incluye los capacitores C1, C2, C3, C4, C5, C7 y C7* y los resistores R1, R2, R3, R4, R5, R7 y R7* conectados como se muestra. El filtro de entrada incluye los filtros 30 y 32 de la figura 2, pero no necesariamente como componentes filtrantes distintos. Los capacitores C1 y C2, en asociación con los resistores R1 y R2, sirven de filtro de paso bajo, como el capacitor C4 y el resistor R4, al tien

po que el capacitor C5 y el resistor R5 proporcionan un adicional filtrado de paso bajo. La filtración de paso alto es proporcionada por el capacitor C2 y el resistor R2, por el capacitor C3 y el resistor R3 y por los capacitores C7 y -
 5. C7' y los resistores R7 y R7'. La combinación del capacitor C6 y el resistor R6' proporcionada en derivación con el amplificador operacional 64 es sustancialmente a efectos de - estabilidad de tal amplificador operacional.

El componente de corriente alterna de la señal de
 10. entrada se acopla por medio del capacitor C2 a la entrada - positiva del amplificador operacional 60, que incluye un resistor de realimentación R4 y un capacitor de realimentación C4 conectados entre la salida del amplificador operacional 60 y su entrada inversora, y un resistor R3 y un capacitor
 15. C3 conectados en serie desde la entrada inversora del amplificador operacional 60 a masa. Esta fase 34 del amplificador de corriente alterna funciona como seguidor de voltaje con ganancia a las frecuencias de interés y con ganancia - unitaria a otras frecuencias por encima y debajo de la banda de interés. El amplificador 60 está acoplado a una entrada de un comparador 61, cuya otra entrada está acoplada a - una fuente de referencia V1. El comparador 61 produce una -
 20. indicación de salida de una condición de sobrecarga causada por una señal de entrada suficientemente grande para saturar el amplificador 60. La señal de sobrecarga se aplica típicamente a un indicador visual u otro adecuado. La salida del amplificador operacional 60 se acopla a través de un resistor en serie R5 y de un capacitor en derivación C5 al detector 36 sensible a las fases, que incluye un primer canal
 25. compuesto de un capacitor C7 y de un resistor R7 conectados
 30.

- en serie a un par de conmutadores S3 y S4, y un canal inversor compuesto de un inversor 62 de amplificador operacional y un capacitor C7' y un resistor R7' en conexión en serie entre el inversor 62 y un par de conmutadores S5 y S6. El inversor 62 incluye un amplificador operacional 64 que tiene su entrada positiva acoplada a masa y su entrada negativa acoplada, a través del resistor R6, a la señal de entrada en la unión del resistor R5 y el capacitor C5, y una red de realimentación compuesta por el resistor R6' y el capacitor C6. Un terminal de los interruptores S3 y S5 está acoplado a masa, mientras que el segundo terminal de los mismos se acopla a respectivos terminales de los interruptores S4 y S6. Los segundos terminales de los interruptores S4 y S6 se acoplan en común al integrador 54, instrumentado por el amplificador operacional 66 y el capacitor C8 en conexión de realimentación con él. Se dispone un interruptor S2 a través del capacitor C8 y se emplea para descargar éste antes y después de un ciclo de procesamiento de señales para retirar la carga residual antes de una operación de medición.
- Los interruptores S7 y S8 conectan alternativamente una fuente de corriente calibrada 46 al integrador 66 ó a masa. Los interruptores S7 y S8 funcionan como la puerta 52 de la figura 2. El terminal común de los interruptores S3 y S4 se acopla por medio de un resistor R13 al contacto móvil de un potenciómetro R14. Análogamente, un resistor R13' conecta el terminal común de los interruptores S5 y S6 al contacto móvil del potenciómetro. Este último se conecta entre respectivas fuentes de voltaje +V y -V y proporciona un control manual para corrección a cero a fin de compensar los constantes desplazamientos del sistema circuital electrónico.

- tales como los debidos a fenómenos transitorios de conmutación de los interruptores S3-S6 y a la corriente y voltaje desviados del integrador 54. Los resistores R13 y R13' son del mismo valor y el potenciómetro R14 se ajusta para proporcionar una corriente compensadora de una magnitud y sentido que anulen sustancialmente las particulares desviaciones presentes. La anulación automática del error de desviación puede obtenerse también mediante uso de conocidas técnicas de autocero.
10. El detector 36 sensible a las fases funciona proporcionando una versión en corriente continua de la señal de entrada de corriente alterna. El terminal de salida del detector, que está acoplado a la entrada negativa del amplificador operacional 66, se mantiene virtualmente ligado a masa mediante la acción de realimentación de este amplificador operacional; con los interruptores S4 y S5 cerrados y los interruptores S3 y S6 abiertos, la señal de entrada se aplica a través del capacitor C7 y el resistor R7 a la entrada del integrador 54, mientras que la señal del inversor 62 se enlaza a masa. Con los interruptores S3 y S6 cerrados y los interruptores S4 y S5 abiertos, la señal de entrada invertida es proporcionada a través del capacitor C7' y del resistor R7' a la entrada del integrador 54, mientras que la señal de entrada no invertida se pasa a masa. El capacitor y el resistor en serie de cada trayectoria del detector 36 sirve de filtro de paso alto para bloquear el paso de corriente continua y bloquear por consiguiente todo voltaje desviado y atenuar frecuencias inferiores a la de corte del filtro. El integrador 54 integra el voltaje de salida del detector para conseguir un filtrado de paso bajo teórica-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

mente óptimo.

La señal del fotodetector se aplica también a través del resistor R1 al canal de corriente continua, que incluye al integrador 38 compuesto por el amplificador operacional 68 y el capacitor de realimentación C8'. La salida del amplificador operacional 68 se acopla a través de los resistores en serie R8 y R9 a una fuente de voltaje $+V_k$. Un interruptor S1 está conectado entre la unión de los resistores R8 y R9 y la entrada negativa del amplificador operacional 68. Antes y después de un ciclo de procesamiento de señales, se cierra el interruptor S1 para producir un voltaje negativo en el capacitor C8' y causar un nivel de salida del comparador de elevado valor lógico. Cuando se abre el interruptor S1, permitiendo que el capacitor C8' quede positivamente cargado en respuesta a una señal recibida del fotodetector, el comparador 70 cambia a un nivel lógico bajo cuando la señal de salida del integrador 38 es igual al nivel de referencia en la entrada positiva del comparador 70. Los interruptores S1 y S2 de los respectivos integradores 38 y 54 funcionan conjuntamente en respuesta a señales de control de la lógica de control 44, tal como se describirá adicionalmente luego. La salida del amplificador operacional 68 se aplica a la entrada negativa del comparador 70, que con su resistor de realimentación R10 y su resistor R11 acoplados entre el terminal positivo del comparador y masa, sirve de comparador 40 con histéresis.

La salida del amplificador operacional 66 se aplica a la entrada negativa del comparador 56, cuya entrada positiva se aplica a masa como referencia cero. La salida del comparador 56 se conecta al emisor de un transistor que sir

ve de puerta 57, conectándose la base a la salida del comparador 40. El colector del transistor de puerta, en lugar de su emisor, se enlaza a masa para conseguir unas mejores características de conmutación. Una entrada de nivel relativamente elevado aplicada por el comparador 40 a la base causará el acoplamiento de la salida del comparador 56 a masa. Con un accionamiento de base relativamente bajo, el transistor es no conductor y el comparador 56 se acopla al contador 48 por medio de la lógica operante, que se describirá luego.

La lógica de control 44 recibe señales de salida de los comparadores 40 y 56 y funciona proporcionando señales de control para la regulación de los interruptores S1 a S8 a fin de producir una medición de polarización numéricamente indicativa en el indicador 26. Los interruptores S1 a S8 son en la práctica interruptores en estado sólido que funcionan en respuesta a una señal de control eléctrica conmutando entre estados conductor y no conductor. Tales interruptores son ya bien conocidos en la técnica. En la versión ilustrada, un nivel lógico bajo causa el cierre de los interruptores, mientras que un nivel lógico elevado causa su apertura.

La lógica de control incluye un circuito biestable 72 cuyo terminal de reajuste se acopla a la salida del comparador 40, acoplándose el terminal de salida Q a una entrada de las puertas NAND 74 y 76. El terminal de ajuste del circuito biestable 72 se acopla a la lógica de arranque, que incluye un control de arranque 80, tal como un interruptor acoplado a un circuito multivibrador 82, cuya salida se acopla a un inversor 83, al terminal de reajuste -

- de un circuito biestable 84 y a una entrada de una puerta OR 94. La salida del inversor 83 se aplica a una entrada de una puerta OR 85, cuya salida se acopla al terminal de ajuste del circuito biestable 84. La salida \bar{Q} de este circuito biestable proporciona señales de control a los interruptores S1 y S2. La salida del inversor 83 se acopla también a la entrada despejada del contador 48, al terminal de ajuste del circuito biestable 72 y al terminal de reajuste del circuito biestable 79. La salida del comparador 56 se acopla a un inversor 77, cuya salida se acopla a una entrada de la puerta OR 85 y a una entrada de la puerta OR 94. La salida del inversor 77 se acopla también a una entrada de la puerta NAND 78, cuya salida se acopla al terminal de ajuste del circuito biestable 79. La otra entrada de la puerta NAND 78 se acopla a la salida de un inversor 75, cuya entrada se acopla a la base del transistor de puerta 57 y a la salida del comparador 40.

- Un circuito biestable 86 proporciona salidas Q y \bar{Q} a respectivas entradas de las puertas NAND 74 y 76. Las salidas de estas puertas 74 y 76 se acoplan respectivamente a la entrada de los inversores 88 y 90. Las señales de salida de las puertas 74 y 76 se aplican a los terminales de control de respectivos interruptores 84 y 86, mientras que las señales de salida de los inversores 88 y 90 se aplican a los terminales de control de respectivos interruptores 83 y 85. Las salidas Q y \bar{Q} del circuito biestable 79 se aplican a los respectivos terminales de control de los interruptores 88 y 87. La señal de salida de la puerta OR 94 se aplica a la puerta 95 para permitir la transferencia de un conteo del contador 48 al indica-

5. dor 26. El reloj 50 está acoplado al contador por medio de una puerta NAND 92, que también recibe una señal de entrada de la salida Q del circuito biestable 79 y es habilitada por ella para aplicar impulsos de cronometración al contador. El reloj permanece energizado en todos los momentos en que el sistema está en funcionamiento para mantener la estabilidad y reducir al mínimo las condiciones transitorias.

10. La lógica de autocero 97 se muestra más detalladamente en la figura 3A y funciona como servo digital, con un incremento positivo o negativo proporcionado durante sucesivos ciclos hasta que se consigue una anulación. Este circuito recibe una señal de entrada de la salida del integrador 38 y proporciona una señal de salida a la entrada negativa del integrador para ajustar desviaciones variables, tales como la corriente oscura del fotodetector, y la polarización y desviación del amplificador operacional. Este circuito de autocero incluye un comparador 125 acoplado a la salida del integrador 38 por un resistor R103 y acoplado a la fuente de voltaje + V a través del resistor R102. El comparador 125 proporciona primeras y segundas salidas a un contador ascendente-descendente 127, cuya salida se aplica a un convertidor 129 de digital a analógico, cuya salida analógica se acopla a la entrada negativa del integrador 38. Las salidas del comparador se acoplan también a través de una puerta OR 131 a un multivibrador 133, cuya salida se aplica a un cronometrador 135. La salida de éste proporciona una señal de cierre al contador 127. La señal de salida del multivibrador 133 sirve también de señal de control para el interruptor S1 del integrador 38.

15.

20.

25.

30.

Inicialmente, el interruptor SI está cerrado, como asimismo el obturador 11, para resguardar la fuente de iluminación. Para un ciclo de autocero, se produce un mando CERO por un control adecuado, que causa la provisión de una salida de alto nivel lógico por el multivibrador 133 y un bajo nivel lógico del inversor 134, que cierra el interruptor SI. Al final del intervalo de cronometraje del multivibrador, éste proporciona una salida de bajo nivel lógico, que determina la apertura del interruptor SI y la activación del cronometrador 135. El comparador 125 proporciona un nivel de salida positivo como primera salida si la señal de entrada e_{in} , que es la señal de salida del integrador, es mayor que un umbral de referencia positivo, y un nivel de salida negativo como segunda salida si la señal de entrada es menor que un umbral de referencia negativo. La salida positiva del comparador 125 causa un incremento del contador 127 en una unidad de conteo, mientras que éste disminuye en una unidad de conteo en respuesta a una salida negativa del comparador 125. El conteo almacenado por el contador 127 es convertido por el convertidor de digital a analógico 129 en una corriente que se aplica a la entrada del integrador 38. El contador es sucesivamente incrementado o decrementado hasta que la señal e_{in} queda dentro del campo de tolerancia del comparador 125, en cuyo momento tampoco se proporciona una salida de éste. El conteo entonces almacenado en el contador 127 se convierte en una correspondiente corriente para mantener el voltaje de salida del integrador a un nivel que compense las desviaciones. El cronometrador 135 se reactiva a cada recepción de una señal del multivibrador 133. El ciclo de autocero

continúa hasta que se produce una corriente compensadora - que causa una señal de salida del integrador dentro del - campo de tolerancia del comparador 125. Cuando se ha alcan- zado una condición nula, el cronometrador 135 funciona du- 5. rante su intervalo predeterminado, al final del cual se aplica una señal de cierre al contador 127 para mantener - el conteo entonces existente, a partir del cual deriva la corriente compensadora. El cronometrador 135 define el in- 10. tervalo de cronometración durante el cual el integrador 38 ha de permanecer dentro de la tolerancia.

Las señales del sensor 24 se aplican a un circui- to de impulsos 100, tal como un activador Schmidt, cuya sa- lida se aplica a un circuito multivibrador 102, a su vez - acoplado a un circuito multivibrador 104. La salida del - 15. multivibrador 104 se acopla a un inversor 106, cuya salida se aplica a una entrada de la puerta NAND 108, cuya segun- da entrada es recibida de la salida del circuito activador 100. La señal del circuito 100 se aplica también a una en- 20. trada de la puerta NAND 110, cuya segunda entrada es la se- ñal de salida del multivibrador 104. La salida de la puer- ta 108 se aplica al terminal de reloj del circuito biesta- ble 86, mientras que la salida de la puerta 110 se acopla al terminal de ajuste del circuito biestable 86. La señal 25. de salida del multivibrador 104 se aplica también como se- ñal de realimentación a una válvula reguladora del aparato de control de velocidad neumático del polarizador rotatorio, que se describirá luego. Típicamente, el circuito activa- dor 100 presenta una demora de un microsegundo, mientras - que los multivibradores 102 y 104 tienen demoras de 50 mi- 30. crosegundos y 3 milisegundos, respectivamente. Este sis-

tema circuital lógico destinado a proporcionar impulsos de sincronización está asociado a un polarizador rotatorio - provisto de seis piezas magnéticas dispuestas alrededor de la periferia del mismo, como se muestra en la figura 5. -

5. Cuatro piezas 17 se hallan equiespaciadas a 90° entre sí - alrededor del perímetro, mientras que dos se encuentran - dispuestas a través de un diámetro, cada una de ellas a mi - tad de camino entre un par adyacente de piezas.

La lógica de sincronización funciona como sigue,

10. con referencia a las formas de onda de las figuras 4A-4D. Las formas de onda están marcadas por asociadas designa- ciones literales en la figura 3. Los impulsos proporcionados por el sensor 24 se muestran en la figura 4A y las se- ñales proporcionadas, en respuesta a las señales del sensor,
15. por el circuito activador Schmidt 100 son impulsos agudos como se ilustra en la figura 4B, siendo proporcionado ca- da uno de los impulsos tras la detección del paso de una - pieza magnetizable en el polarizador rotatorio. Cada uno - de los impulsos proporcionados por el circuito 100 causa -
20. la activación del multivibrador 102 para producir impulsos, como se ilustra en la figura 4C. El borde posterior de los impulsos producidos por el multivibrador 102 causa la acti- vación del multivibrador 104, que es del tipo no reactiva- ble, de manera que, una vez activado, funciona durante su
25. intervalo de tiempo predeterminado. Así, los impulsos de - salida del multivibrador 104 son como se muestran en la fi- gura 4D. La señal de salida del multivibrador 104 sirve - para inhibir la provisión de un impulso de cronometración al circuito biestable 86. Se producen cuatro señales de -
30. sincronización por revolución del polarizador rotatorio, -

- con dos señales adicionales producidas por revolución, al objeto de proporcionar el deseado ajuste de fases. Normalmente, los impulsos de la puerta 108 (figura 4E) son regularmente producidos para cronometrar el circuito biestable 5. 86, que produce la señal Q (figura 4G) para accionar los interruptores del detector 36 sensible a las fases. Si se pierde la sincronización o no se ha establecido todavía, como ocurre durante la puesta en funcionamiento del sistema, o como resultado de una condición falsa, sólo se necesita media revolución del polarizador para volver a sincronizar. Mediante la lógica antes descrita, en respuesta a los impulsos de la figura 4B, los impulsos de las figuras 4E y 4F serán puestos en la fase debida para cronometrar adecuadamente el circuito biestable 86.
15. Para el funcionamiento del sistema, es preferible dejar energizados el laser 10, el fotodetector 20, el polarizador rotatorio 16 y el circuito 22 procesador de señales, a fin de reducir al mínimo los fenómenos transitorios. El obturador 11 dispuesto frente al laser 10 se cierra para resguardar el haz de luz de la célula de muestras 14, excepto durante una operación de medición, a fin de evitar el calentamiento o la fotodecomposición de la muestra. Para prolongar la duración de laser, puede aplicarse una plena energía al mismo solamente durante un ciclo de funcionamiento, y en caso contrario se le aplicará una energía mínima. Antes de una operación de medición, puede efectuarse un ciclo de autocero, como se describe anteriormente. Luego se cierran los interruptores S1 y S2 para acondicionar inicialmente los integradores 38 y 54 durante el intervalo de carga de un ciclo de medición. Durante este ci-
- 20.
- 25.
- 30.

clo, se abren los interruptores S1 y S2 para permitir la carga de los capacitores asociados. Tras la indicación de una medición, se cierran de nuevo estos interruptores para acondicionar los asociados capacitores durante una subseguiente operación de medición. Antes y después de una operación de medición, se cierran los interruptores S3 y S5 del detector 36 sensible a las fases, mientras que los interruptores S4 y S6 quedan abiertos. De este modo la entrada al integrador 54 es de circuito abierto, mientras que la salida del detector 36 se deriva a masa para impedir la aplicación de cualquier señal falsa al integrador 54.

Inicialmente, la salida del comparador 40 se hallará a un elevado nivel lógico para que la puerta 57 acople la salida del comparador 56 a masa, independientemente de las entradas que se produzcan en el mismo. Las salidas de los comparadores 40 y 56 se acoplan a través de los inversores 75 y 77 y de la puerta NAND 78 al circuito biestable 79, que produce salidas Q y \bar{Q} para el respectivo control de los interruptores S8 y S7. El interruptor S7 está abierto y el interruptor S8 inicialmente cerrado antes y después de una operación de medición y durante un intervalo de integración. Inicialmente, el circuito biestable 72 proporciona una señal de salida de bajo nivel lógico a las puertas 74 y 76, causando la provisión por las mismas de salidas de elevado nivel lógico, independientemente del nivel lógico de las señales del circuito biestable 86. Las señales proporcionadas por las puertas 74 y 76 a los interruptores S4 y S6 son así de elevado nivel lógico para que éstos últimos permanezcan abiertos, mientras que las señales de los inversores 88 y 90 son de bajo nivel lógico

para determinar el cierre de los interruptores S3 y S5.

Tras una señal de puesta en funcionamiento procedente de la fuente 80, el multivibrador 82 pasa a un nivel elevado, causando una salida baja del inversor 83, que ajusta el circuito biestable 72 y reajusta al circuito biestable 79. El primero de estos circuitos produce una salida de elevado nivel lógico para las puertas NAND 74 y 76, que producen respectivas señales de salida de nivel lógico opuesto al de las respectivas señales del circuito biestable 86. Así, las puertas 74 y 76 y los asociados inversores 88 y 90 determinan el funcionamiento de los interruptores S3 y S6 al unísono y de los interruptores S4 y S5 también al unísono, cerrándose estos dos últimos cuando están abiertos los dos primeros, y viceversa. Después de un intervalo de demora proporcionado por el multivibrador 82, suficiente para la descarga de los capacitores C8 y C8' y para eliminar los fenómenos transitorios de la conmutación, se ajusta el circuito biestable 84 para proporcionar una señal de salida de elevado nivel lógico que cause la apertura de los interruptores S1 y S2. La señal de puesta en funcionamiento despeja también el contador 48.

Los integradores 38 y 54 integran las respectivas señales de entrada en los mismos durante un intervalo de integración determinado por una emisión fluorescente detectada, por la capacitancia de los integradores y por el voltaje de referencia V_k . Cuando el integrador 38 pasa a un nivel elevado, el comparador pasa a un nivel bajo, reajustando al circuito biestable 72, que causa, a través de las puertas 74, 76, 88 y 90, la apertura de los interruptores S4 y S6 y el cierre de los interruptores S3 y S5.

- Cuando el comparador 40 pasa a un nivel bajo, la puerta 75 pasa a un nivel elevado, determinando el funcionamiento de la puerta 78 como inversor. El transistor 57 es no conductor, permitiendo la aplicación de la salida del comparador
5. 56 a la puerta 77. Si el comparador 56 está bajo, la puerta 77 está elevada y la puerta 78 pasa a un nivel bajo, - ajustando así el circuito biestable 79. Se cierra el interruptor 87 y se abre el interruptor 88. Si el comparador -
10. 56 pasa a nivel elevado, la puerta 77 pasa a nivel bajo, - causando la transferencia del conteo entonces existente en el contador 48 al indicador 26 u otro dispositivo de salida, por medio de una señal de transferencia proporcionada por la puerta 94 a la 95. Se ajusta el circuito biestable 84, causando el cierre de los interruptores 81 y 82.
15. Cuando el transistor 57 pasa a ser no conductor, el comparador 56 podría pasar inmediatamente a un nivel - elevado si no se hubiese acumulado ninguna señal por el integrador 54, en cuyo caso el contador 48 presentará un con - teo cero, puesto que no ha transcurrido ningún tiempo en -
20. el que pueda almacenarse un conteo, cuyo conteo cero será transferido al indicador para señalar que se ha efectuado - una medición de valor cero.
25. Cuando el integrador 38 alcanza el nivel de referencia del comparador, éste conmuta para proporcionar una señal de salida de bajo nivel lógico, que causa la conmutación del circuito biestable 79 para producir el cierre del interruptor 87 y la apertura del interruptor 88 a fin de - comenzar un intervalo de descarga. Cuando la señal de sali - da del integrador 54 alcanza el nivel de referencia cero,
30. el comparador 56 conmuta para producir una señal de salida

de nivel lógico opuesto (elevado) para el circuito biestable 84, a fin de causar el cierre de los interruptores S1 y S2. La conmutación del comparador 56 causa también la producción de una señal de transferencia por la puerta 94 a la 95 para la transferencia del conteo entonces existente al indicador 26. Esta señal de transferencia puede emplearse también para energizar una impresora u otro aparato de salida para la recepción de datos del contador 48.

El contador 48, en la versión preferida, permanece en funcionamiento y es momentáneamente ligado al indicador 26 u otro aparato de salida cuando se desea una lectura de salida. El contador en funcionamiento puede utilizarse para probar visualmente el indicador 26 a fin de verificar la funcionalidad de los señaladores numéricos, que típicamente son de segmentos múltiples, y la funcionalidad de los decodificadoras del indicador.

Para tal prueba, se pasa una señal de prueba del indicador, producida por un control adecuado, a través de la puerta 94, para causar el acoplamiento de la salida del contador al indicador 26, causando los datos transferidos desde el contador la energización de los señaladores del indicador.

El polarizador rotatorio 16 se muestra en una versión preferida en la figura 5 e incluye un cojinete de aire provisto de un alojamiento estacionario 200 y de un rotor 202 dispuesto para su rotación en aquél con una fricción y vibración mínimas. Es importante una verdadera rotación concéntrica para reducir la modulación del haz de luz que puede ser causada por un movimiento excéntrico del rotor y para reducir la vibración mecánica que puede causar

- también una modulación. Además, el haz de luz pasa continuamente a través del mismo material óptico durante la rotación, reduciendo así al mínimo la modulación que podría producirse por variaciones en el propio material. El alojamiento 200 está compuesto por una cápsula 204 provista de un núcleo 206 de material poroso y dotada de una superficie cilíndrica 208 situada frente a la superficie cilíndrica 210 del rotor 202. Se dispone una cámara anular 212 alrededor de la porción exterior del núcleo 206, que comunica con una entrada de aire 214 acoplada a una fuente de aire u otro gas operante. Alrededor de los respectivos extremos del rotor 202 se disponen unos rebordes 216 y 218 para retener dicho rotor en el alojamiento. Alrededor de la periferia del reborde 216 se forma una superficie molateada 220 y se dispone una tobera de aire 222 en relación con la superficie 220 para dirigir un chorro de aire u otro gas operante sobre la superficie molateada a fin de causar la rotación del rotor 202. La tobera de aire está acoplada a un regulador 224 que a su vez recibe aire de una fuente adecuada. El regulador funciona en respuesta a una señal de control para ajustar el flujo de aire al rotor 202 al objeto de mantener la velocidad del mismo.

- La señal de control deriva del circuito de sincronización de la figura 3, que proporciona impulsos derivados del sensor 24, para conseguir un control de velocidad en circuito cerrado del polarizador rotatorio. La regulación de la velocidad de rotación del polarizador se establece dentro de un deseado campo de tolerancia. Sin embargo, es de destacar que la regulación no es crítica, puesto que un procesamiento de la señal de salida del fotomultiplicador

cador es sincrónica con el ritmo de impulsos derivados del polarizador rotatorio, pudiéndose tolerar una variación dentro de la anchura de banda de los canales de señales.

- El aire introducido en la cámara 212 se difunde a través del núcleo poroso 206 para formar una capa de aire entre las superficies 208 y 210, que proporciona un cojinete de aire para el rotor. El aire que fluye al exterior del espacio confrontado entre el rotor y el alojamiento tiende a mantener al primero en una posición axial fija dentro del segundo. Tales cojinetes de aire son ya conocidos en la técnica e incluyen unas superficies confrontadas que contienen la capa de aire, de muy estrecha tolerancia. El rotor 202 incluye una abertura 226 extendida axialmente a través de él, típicamente de un diámetro aproximado de 1 cm, con una placa polarizadora 228 montada en un extremo del rotor. El elemento polarizador puede ser también un prisma montado dentro del peso 225 del rotor 202. El haz de luz pasa a través del centro del polarizador, existiendo así el mismo material óptico durante la rotación. Esto es preferible al uso de un polarizador rotatorio en el que el haz de luz pasa a través de una porción periférica de aquél que puede ser de características ópticas variables.

- Unas piezas magnéticas 230 están montadas en aberturas dispuestas en el reborde 218, de las cuales se ilustran seis, estando cuatro de ellas equiespaciadas alrededor de la circunferencia del reborde y otras dos diametralmente dispuestas entre respectivos pares de piezas. El sensor 24, en este caso un dispositivo sensor magnético, se dispone adyacentemente al reborde 218 para producir una señal eléctrica en respuesta al paso de cada pieza 230 jun-

to al sensor para la provisión de impulsos de sincronización. El rotor 202 es naturalmente no magnético si se emplean piezas magnéticas como elementos detectados. El sensor 24 es angularmente ajustable alrededor de la circunferencia del rotor 202 para ajustar la fase de los impulsos de sincronización respecto a las señales fotodetectoras que sean procesadas.

A fin de incrementar la intensidad de la luz excitante que incide sobre una muestra, puede emplearse la variante de célula de muestras de la figura 6, que puede proporcionar también un acentuamiento de la intensidad de la fluorescencia polarizada emitida y recibida por el fotodetector. Con referencia a la figura 6, se ilustra una célula de muestras 300 que contiene una muestra a medir, con un espejo 302 dispuesto para reflejar el haz de excitación y un segundo espejo 304 dispuesto para reflejar la fluorescencia emitida. El haz de excitación se transmite a través de la célula de muestras y, después de su reflexión por el espejo 302, es retransmitido de nuevo a través de dicha célula para incrementar así la energía de excitación absorbida por la muestra, proporcionando una distribución más uniforme de la absorción de la energía por todo el volumen de la muestra. La luz excitante se incrementa aproximadamente en un factor de dos. La fluorescencia emitida y transmitida hacia el espejo 304 se retransmite luego hacia el fotodetector junto con la fluorescencia emitida y dirigida inicialmente hacia el fotodetector, que incrementa más aún la fluorescencia detectable. El espejo 304 puede ser construido de modo que refleje a la longitud de onda de emisión y sea sustancialmente no reflector a otras longitudes de on-

da que no sean de interés para la recepción por el fotodetector. El espejo 302 puede construirse también de modo que refleje solamente a la longitud de onda de excitación, especialmente si se emplea una fuente de iluminación de banda ancha, para reducir la diseminación. Tales espejos selectivamente reflectores son ya conocidos y pueden fabricarse mediante técnicas de filtros de interferencia, también conocidas ya. Si no se emplea ningún espejo 302, se utilizará preferiblemente una trampa de luz, ya conocida, para evitar la diseminación de la excitación.

Como variante, puede emplearse el circuito de la figura 7 para minimizar los efectos de una variación en la velocidad rotatoria del polarizador. Como se describe anteriormente, la variación de velocidad del polarizador rotatorio debe quedar dentro de la anchura de banda del canal de señales para un preciso procesamiento de éstas. Mediante la versión variante a describir seguidamente, puede tolerarse una adicional variación de la velocidad mediante uso de una señal de referencia local derivada de los impulsos de sincronización del polarizador rotatorio, pero independiente de toda variación en el mismo. Con referencia a la figura 7, la señal del amplificador 60 (figura 3) se aplica, a través de un filtro de paso bajo compuesto por el resistor R5 y el capacitor C5, a un mezclador 320, cuya salida se aplica a un amplificador 322 y a un filtro de paso de banda 324, cuya salida se aplica al detector 36 sensible a las fases, del sistema circuital de la figura 3. Un oscilador 325 produce una señal de onda senoidal de frecuencia f_0 para un bucle 328 bloqueador de fase, aplicándose se la señal de salida de frecuencia f_1 al mezclador 320.

El bucle bloqueador de fase recibe una señal de referencia f_x de la salida \bar{U} del circuito biestable 86 (figura 3). El oscilador 326 proporciona también una señal de onda cuadrada de frecuencia f_0 para la puerta NAND 76 a través de un inversor 330 para la puerta NAND 74. Las puertas NAND 74 y 76 son las mismas de la figura 3 y producen señales para los interruptores S3-S6 del detector 36 sensible a las fases de la manera anteriormente descrita. La frecuencia de señal f_y proporcionada por el bucle bloqueador de fases 328 es igual a la suma de las frecuencias de señales f_0 del oscilador 326 y f_x del circuito biestable 86. La señal de salida del mezclador 320 contiene componentes de suma y diferencia de frecuencias f_0 y f_y . La frecuencia de señal f_s es igual a la frecuencia f_x , puesto que ambas señales derivan del polarizador rotatorio; por consiguiente, la señal de salida del mezclador contiene frecuencias f_0 y $2f_x$ de los componentes de la misma. El filtro de paso de banda 324 es de elevada Q centrada en f_0 y proporciona así una señal de frecuencia f_0 al detector 36 sensible a las fases. El amplificador 60, que proporciona la frecuencia f_s de la señal de entrada en esta versión, puede ser de anchura de banda mayor que en la versión de la figura 3. Este circuito de la figura 7 funciona como un amplificador bloqueador heterodino, ya conocido en la técnica. Se proporciona un medio de calibración de fases como parte del amplificador bloqueador. Tal como se emplea en la invención, al detector sensible a las fases se suministra una señal referenciada respecto al oscilador 326 y el procesamiento de señales se efectúa sin efecto por la variación de velocidad del polarizador rotatorio.

El filtro de excitación 11 y el filtro de emisión 18 están contruidos para evitar una fluorescencia indeseada y para lograr estos resultados tales filtros emplean capas filtrantes reflectoras para el bloqueamiento de anchura de banda tanto superior como inferior, en lugar de los vidrios absorbentes más convencionales. El filtro de excitación 11 funciona como filtro de espiga para pasar solamente la longitud de onda de excitación del laser 10 y para bloquear por reflexión todas las longitudes de onda falsas emitidas por el laser, tales como las emitidas por el plasma gaseoso y cualesquiera fugas de la luz ambiental. El filtro de emisión 18 funciona pasando la banda de emisión y bloqueando por reflexión la luz diseminada a la longitud de onda de excitación, así como luz a la longitud de onda Raman de la solución de muestra, y cualesquiera otras longitudes de onda falsas presentes.

El filtro de excitación se ilustra en la figura 8 a escala muy ampliada e incluye un sustrato 340 de cuarzo no fluorescente. Sobre una superficie de este sustrato se dispone una capa 342 consistente en un filtro de interferencia que pasa solamente la longitud de onda de excitación, por ejemplo de 488 nanómetros. Una capa 344 refleja longitudes de onda superiores, mientras que la capa 346 sirve para reflejar longitudes de onda más cortas del laser. La reflexión se consigue mediante efectos de interferencia de la estructura del filtro. Se apreciará que las capas 342, 344 y 346 pueden formar parte de hecho de una estructura de filtro óptico con revestimientos múltiples secuenciales, o bien pueden asociarse diferentes combinaciones de interferencia con respectivos sustratos.

El filtro de emisión se ilustra a escala exagerada en la figura 9 e incluye un sustrato 348 de cuarzo no fluorescente, provisto de las capas 350, 352, 354 y 356 sobre el mismo. La capa 350 proporciona una banda de paso a la longitud de onda de emisión y es un filtro de interferencia cuya banda de paso está ajustada al espectro del particular tinte fluorescente empleado. Para la fluorescencia, la banda de emisión es de 514 a 530 nanómetros aproximadamente. La capa 352 sirve para reflejar la longitud de onda de excitación, mientras que la capa 354 sirve para reflejar la longitud de onda Raman. La capa 356 proporciona una reflexión de banda ancha para bloquear otras longitudes de onda indeseadas. Las capas filtrantes descritas pueden instrumentarse también de hecho como parte de una estructura filtrante de capas múltiples.

Una característica particular de los filtros ópticos anteriormente descritos es el uso de capas reflectoras múltiples para filtrado, sin empleo de ningún vidrio absorbente filtrador. Tales vidrios absorbentes pueden producir fluorescencia y añadir por consiguiente una emisión fluorescente falsa dentro de la banda de interés. Sin embargo, puede emplearse una capa de vidrio como última capa de filtro para que sirva de atenuador y en casos adecuados pueda producir una absorción de indeseadas longitudes de onda mayores que la emisión falsa en la banda de interés. Con referencia a la figura 10, se muestra una versión variante de la invención, en la que se dispone un despolarizador 19, que preferiblemente será un despolarizador Lyot o un difusor de vidrio opalino, frente al fotodetector 20 para reducir cualquier error causado por la sensibilidad

a la polarización del tubo fotomultiplicador. Todos los tubos fotomultiplicadores muestran alguna sensibilidad a la polarización y el despolarizador 19 desordena efectivamente la polarización de la luz transmitida a través de él de tal manera que el fotodetector recibe luz no polarizada.

En la versión preferida aquí descrita, se emplea una fuente de laser 0W; sin embargo, pueden usarse otras fuentes de iluminación en la práctica de la invención. La fuente luminosa puede colimarse o presentarse de lo contrario una mínima sección transversal y una máxima limitación de banda, como es sabido. Por ejemplo, puede disponerse una lámpara incandescente u otra adecuada conjuntamente con un polarizador lineal para producir un haz de excitación linealmente polarizado, que se filtra luego mediante un filtro de excitación que funciona excluyendo las particulares longitudes de onda falsas presentes en la particular lámpara empleada. La fuente de iluminación puede proporcionar luz polarizada o no polarizada. En general, es preferible el uso de luz de excitación linealmente polarizada para un acentuamiento de la resultante polarización de fluorescencia emitida por la muestra. Sin embargo, las mediciones deseadas pueden efectuarse también con luz sin polarizar como fuente excitadora.

Se contempla la posibilidad de emplear un analizador en rotación continua distinto al polarizador lineal anteriormente descrito, en el lado de excitación de la célula de muestras o en el lado de emisión de la misma. Con referencia a la versión de la figura 11, se dispone una placa de retardamiento de media onda casi acromática 21 en el lado de emisión de la célula de muestras 14 para reci-

bir de ella radiación fluorescente, siendo dicha placa continuamente rotatoria mediante la turbina neumática antes descrita u otros medios. La placa de retardamiento de media onda puede ser de cualquier construcción bien conocida y es acromática en la banda de interés. Entre esta placa 21 y el filtro 18 se dispone un polarizador lineal fijo 23, orientado con su eje de polarización a lo largo de un eje de referencia deseado. En la figura 12 se muestra otra versión variante en la que se dispone una placa de retardamiento de media onda 25 en el lado de excitación de la célula de muestras 14, en continua rotación. Entre la célula de muestras 14 y el filtro 18 se dispone un polarizador lineal fijo 27. La placa de retardamiento de media onda 25 necesita funcionar como tal solamente a la longitud de onda del laser, puesto que la fuente de éstos es monocromática. Los analizadores rotatorios tales como los mostrados en las figuras 11 y 12 pueden ser también rotadores electro-ópticos, tales como los de Faraday o Kerr, que proporcionan una rotación óptica de manera conocida en respuesta a una señal energizadora aplicada, construidos para funcionar como placa retardadora de media onda o como polarizador lineal. La fuente de laser o el fotodetector podrían ser también rotatorios; sin embargo, esto no resultaría práctico debido al tamaño y sensibilidad de la fuente y el detector y debido a las conexiones eléctricas con ellos.

Si se emplea una fuente de excitación no polarizada, ha de disponerse un polarizador lineal fijo si se desea usar una placa retardadora de media onda para su rotación por el lado de la excitación. Además, cuando se emplea una placa retardadora de media onda, un ciclo de rotación

- ción mecánica producirá cuatro ciclos de rotación del vector de polarización y los elementos sensibles dispuestos alrededor de la periferia de la estructura rotatoria, de los cuales derivan señales de posición y velocidad, deberán establecerse para cada ciclo óptico, en lugar de emplear dos grupos de tres piezas magnéticas u otros elementos sensibles por cada mitad circunferencial del polarizador rotatorio anteriormente descrito. En cada cuadrante de la placa retardadora de media onda rotatoria se sitúa un grupo de tres elementos sensibles, a fin de proporcionar señales de ajuste de fases por cada ciclo de rotación óptica.

- El analizador rotatorio puede accionarse continuamente por medios distintos a la turbina neumática antes descrita. La rotación puede proporcionarse también mediante un motor eléctrico, tal como un motor sincrónico de construcción precisa, para conseguir una suave rotación con una vibración mínima. Tal accionamiento mediante motor sincrónico puede incluir un árbol rotor hueco en el que se monta el analizador para su rotación. Si se emplea un analizador eléctricamente accionado, deberá cuidarse el reducir al mínimo el que los campos de dispersión afecten al fotodetector. La colocación del accionador eléctrico en el lado de excitación de la muestra es ordinariamente preferible para incrementar la distancia desde el fotodetector.

- Se apreciará que el sistema circuital de procesamiento de señales puede instrumentarse de distintas maneras también. La invención no requiere el uso de técnicas de integración con doble inclinación como se describe anteriormente, sino que puede emplear otras técnicas circuitales para la provisión de una medición de salida de la pola

5. rización de fluorescencia. Por ejemplo, el integrador 54, que se carga a un nivel determinado por el integrador 38 -- puede acoplarse a una muestra y activarse el circuito de -- retención por el comparador 40 para derivar una señal de -- salida de una magnitud representativa de la polarización -- de fluorescencia y que puede procesarse para proporcionar una indicación de salida.

La presente invención puede emplearse también pa
 10. ra el análisis espectral de la fluorescencia emitida. Para tal uso se emplea un elemento dispersante, tal como una re-
 jilla o prisma de difracción, en lugar del filtro de emi-
 sión, para producir un espectro para análisis. Si se em-
 15. pleva un laser como fuente de iluminación, se dispone un me-
 dio para la sintonización de la fuente a la longitud de on-
 da seleccionada. Tal sintonización puede realizarse para --
 la selección de longitudes de onda de resonancia del laser,
 o bien puede proporcionarse una sintonización continua si
 se emplea un laser con tinte. Además de la sintonización de
 la propia fuente del laser, puede emplearse un elemento --
 20. dispersante en el lado de excitación de la muestra. Pueden
 producirse espectros de excitación mediante sintonización
 por el lado de la excitación y espectros de emisión median-
 te sintonización por el lado de la emisión. Si se explora
 el elemento dispersante de excitación, se fija la longitud
 25. de onda de emisión observada. Como variante, si se explora
 el elemento dispersante de emisión, se fija la longitud de
 onda de excitación. El procesamiento de la señal de salida
 del fotodetector puede efectuarse como se describe antes.
 Sin embargo, en esta versión, el procesamiento de señales
 30. se realiza por cada par de longitudes de onda de excita--

ción y de emisión para proporcionar mediciones de las que derive un espectro.

A la vista de las muchas y diferentes configuraciones ópticas que pueden emplearse en la instrumentación de la invención, seguidamente se expone una tabla en la que se perfilan las diversas configuraciones:

	<u>Fuente</u>	<u>Lado de Excitación de la muestra</u>	<u>Lado de emisión de la muestra.</u>
10.	Sin Po- larizar	Filtro	Polarizador lineal rotatorio + despolarizador + filtro o elemento dispersante
15.	No pola- rizada + despola- rizador	Filtro + polarizador lineal rotatorio	Polarizador lineal + filtro o elemento dispersante
20.	Polari- zada	Filtro o elemento dispersante	Polarizador lineal rotatorio + despolarizador + filtro o elemento dispersante
25.	Polari- zada	Filtro o elemento dispersante	Placa retardadora de media onda rotatoria + polarizador + filtro o elemento dispersante
30.	Polariza- da	Filtro o elemento dispersante + placa retardadora de media onda rotatoria	Polarizador + filtro o elemento dispersante

Ha de emplearse un despolarizador si se usa un -

- elemento dispersante y el componente observado se halla en rotación, pero de lo contrario es discrecional. El despolarizador situado en el lado de excitación o en el de emisión se destina a obtener una no polarización más ideal, si se desea. El polarizador lineal rotatorio puede ser también un rotador electro-óptico y un polarizador lineal fijo. La placa retardadora de media onda rotatoria puede ser también un rotador electro-óptico.

- El uso de un elemento rotatorio en el lado de excitación de una muestra presenta varias ventajas. Como el diámetro del haz de excitación es ordinariamente menor que el del haz de emisión, especialmente si se emplea una fuente de laser, el elemento rotatorio situado en el lado de excitación puede ser pequeño. La colimación del haz de excitación reduce también al mínimo el carácter crítico de la longitud de la trayectoria del elemento rotatorio, que ordinariamente es el elemento de más larga trayectoria óptica. Además, la colocación del fotodetector más cerca de la muestra permite una mayor captación de luz.

20.

N O T A

- La Patente de Invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente legislación, deberá recaer sobre: "POLARIMETRO DE FLUORESCENCIA PARA ANALISIS MOLECULARES", con Prioridad de la Solicitud de Patente en U.S.A. nº 789.636, de fecha 21 de Abril de 1977, según las características esenciales de las siguientes:

.../...

.../...

.../...

30.

.../...

REIVINDICACIONES

- 1.- Polarímetro de fluorescencia para análisis -
moleculares, que comprende una fuente de iluminación que -
proporciona un haz de luz de banda estrecha y definido; --
5. una célula de muestras destinada a contener una solución -
de muestra y dispuesta para recibir luz de la citada fuer-
te de iluminación y permitir radiación fluorescente desde
tal solución de muestra; un analizador; medios para produ-
cir la rotación continua de dicho analizador; un filtro óp-
10. tico que recibe radiación fluorescente de la célula de mues-
tras y tiene una banda de paso centrada en la frecuencia --
de emisión de dicha radiación fluorescente; un medio foto-
detector que funciona en respuesta a la radiación pasada -
por el referido filtro óptico proporcionando una señal de
15. salida óptica representativa de la intensidad de radiación;
un medio procesador de señales que funciona en respuesta a
la señal de salida del medio fotodetector e incluye medios
para producir primeras y segundas señales respectivamente
representativas del componente de diferencia y del compo-
20. nente de suma de la polarización de fluorescencia, medios
que proporcionan un intervalo de tiempo representativo de
la relación entre la primera y segunda señales, y medios -
que funcionan en respuesta a dicho intervalo de tiempo pro-
porcionando una señal representativa de la polarización de
25. fluorescencia.

- 2.- Polarímetro de fluorescencia para análisis -
moleculares, según la reivindicación 1, en el que dicha --
fuente de iluminación proporciona un haz de luz linealmen-
te polarizada y en el que el referido analizador incluye -
30. una placa retardadora de media onda dispuesta entre la fuer-

te de iluminación y la célula de muestras, y un polarizador lineal fijo que recibe radiación fluorescente de la citada muestra y tiene su eje de polarización orientado a lo largo de un deseado eje de referencia.

5. 3.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 1, en el que dicha fuente de iluminación incluye un laser CW que proporciona un haz de luz linealmente polarizado, monocromático y colimado y puede incluir un segundo filtro óptico que recibe un haz de luz del citado laser y tiene una banda de paso centrada alrededor de la frecuencia fundamental del laser y que funciona excluyendo luz por encima y debajo de una banda deseada, incluyendo el segundo filtro óptico, discretionalmente, una estructura de filtro de interferencia que funciona pasando solamente la longitud de onda de excitación de la referida fuente de iluminación, una estructura de filtro de interferencia que funciona reflejando las longitudes de onda más largas que dicha longitud de onda de excitación y una estructura de filtro de interferencia que funciona reflejando las longitudes de onda más cortas que tal longitud de onda de excitación.
10. 20. 15.

- 4.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares según la reivindicación 1, en el que dicho analizador incluye un polarizador lineal en continua rotación o una placa retardadora de media onda acromática dispuesta para recibir radiación fluorescente de la citada muestra y un polarizador lineal fijo que recibe radiación fluorescente de dicha muestra y tiene su eje de polarización orientado a lo largo de un eje de referencia deseado.
- 25.

30. 5.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares

leculares, según la reivindicación 1, en el que dicho analizador incluye un rotador electro-óptico dispuesto entre la citada fuente de iluminación y la célula de muestras o entre esta célula y el fotodetector, y un polarizador lineal
 5. fijo que recibe radiación fluorescente de la citada muestra y tiene su eje de polarización orientado a lo largo de un eje de referencia deseado.

6.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 1, en el que dicho filtro óptico incluye una estructura de filtro de interferencia que funciona proporcionando una banda de paso ajustada al espectro de la emisión fluorescente recibida, una estructura de filtro de interferencia que funciona reflejando la luz diseminada a la longitud de onda de excitación, una estructura de filtro de interferencia que funciona reflejando luz a la longitud de onda Raman de la solución de muestra y una estructura de filtro de interferencia que funciona reflejando otras longitudes de onda falsas de la luz recibida.
 10.
 15.

7.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 1, que incluye además un despolarizador dispuesto frente al medio fotodetector para despolarizar la luz recibida por él.
 20.

8.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 1, que incluye además un elemento dispersante, por lo menos, dispuesto en la trayectoria óptica comprendida entre la citada fuente y el medio fotodetector y que funciona proporcionando un espectro.
 25.

9.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 1, en el que dicho medio procesador de señales comprende medios para producir una se
 30.

ñal de corriente alterna directamente representativa del ---
 componente de diferencia de la polarización de fluorescen-
 cia, medios para producir una señal de corriente continua -
 directamente representativa del componente de suma de la po-
 5. larización de fluorescencia; un contador; medios que funcio-
 nan en respuesta a dicha señal de corriente continua inician-
 do el funcionamiento del citado contador, y medios que fun-
 cionan en respuesta a la señal de corriente alterna deteni-
 do el funcionamiento del contador, proporcionando éste últi-
 10. mo un conteo acumulado durante el intervalo comprendido en-
 tre las citadas señales de iniciación y de detención, que -
 representa la polarización de fluorescencia.

10.- Polarímetro de fluorescencia para análisis -
 moleculares, según la reivindicación 1, en el que el referi-
 15. do medio procesador de señales incluye un medio filtrante
 de paso de banda que proporciona una primera señal directa-
 mente representativa del componente de diferencia de la po-
 larización de fluorescencia; un medio filtrante de paso ba-
 20. jo que proporciona una segunda señal directamente represen-
 tativa del componente de suma de la polarización de fluores-
 cencia; un medio amplificador acoplado al citado medio fil-
 trante de paso de banda y que proporciona una versión ampli-
 ficada de la primera señal mencionada; un detector sensible
 a las fases, que recibe dicha primera señal amplificada y -
 25. produce una señal de salida; un primer medio integrador ---
 que funciona en respuesta a la segunda señal citada produ-
 ciendo una primera señal de salida integrada; un segundo me-
 dio integrador que funciona en respuesta a la referida se-
 ñal de salida produciendo una segunda señal de salida inte-
 30. grada; un primer medio comparador que produce una primera

- señal de salida comparadora cuando la primera señal de salida integrada excede de un umbral de referencia; un segundo medio comparador que produce una segunda señal de salida comparadora cuando la segunda señal de salida integrada excede de un umbral de referencia; medios que funcionan en respuesta a la primera señal de salida comparadora permitiendo el funcionamiento del citado detector sensible a las fases y que funciona en respuesta a la segunda señal de salida comparadora inhibiendo el funcionamiento de tal detector sensible a las fases; un medio contador habilitado en respuesta a la primera señal de salida comparadora e inhabilitado en respuesta a la segunda señal de salida comparadora; y medios que funcionan en respuesta a la primera señal de salida comparadora causando la descarga controlada del segundo medio integrador.

- 11.- Polarímetro de fluorescencia para análisis moleculares, según la reivindicación 10, en el que el primer medio integrador incluye un circuito integrador amplificador operacional; un primer medio interruptor conectado en derivación al primer circuito integrador y cerrado excepto durante una operación de medición; y en el que el primer medio comparador incluye un circuito comparador amplificador operacional acoplado a la salida del primer circuito integrador y que produce una primera señal de salida comparadora de un primer nivel lógico cuando el primer medio interruptor está cerrado y de un segundo nivel lógico cuando este primer medio interruptor está abierto y la señal de salida del citado circuito integrador es igual al nivel de referencia del primer medio comparador; y en el que el segundo medio integrador incluye un circuito integrador amplifica-

- dor operacional; un segundo medio interruptor en derivación
 con el segundo circuito integrador y cerrado excepto duran-
 te una operación de medición para retirar la carga residual
 en el segundo circuito integrador; y en el que el segundo -
 5. medio comparador incluye un circuito comparador amplifica-
 dor operacional acoplado a la salida del segundo circuito -
 integrador y que produce una segunda señal de salida compa-
 radora de un primer nivel lógico cuando el segundo medio in-
 10. terruptor está cerrado y de un segundo nivel lógico cuando
 este segundo medio interruptor está abierto y la señal del
 segundo integrador es igual al nivel de referencia del se-
 gundo comparador; y en el que el citado medio de descarga -
 controlada incluye una fuente de corriente; medios que funci-
 onan en respuesta a la primera señal de salida del compa-
 15. rador acoplado la mencionada fuente de corriente al segun-
 do medio integrador, proporcionando esta fuente de corrien-
 te una de una polaridad tal que causa la descarga del segun-
 do medio integrador; y en el que el detector sensible a las
 20. fases incluye un circuito de calibración que funciona com-
 pensando las desviaciones de los circuitos.

- 12.- Polarímetro de fluorescencia para análisis -
 moleculares, según la reivindicación 10, en el que el refe-
 rido detector sensible a las fases incluye un primer y un -
 segundo medios interruptores cerrados antes y después de -
 25. una operación de medición para derivar la salida del citado
 detector a masa e impedir la aplicación de cualquier señal
 falsa al segundo medio integrador; un tercer y un cuarto me-
 dios interruptores abiertos antes y después de una operación
 de medición para abrir el circuito a la entrada al segundo
 30. medio integrador, funcionando tales medios interruptores -

primero y cuarto durante una operación de medición de modo que se abran y cierran sincronizadamente y funcionando los medios interruptores segundo y tercero de modo que se abran y cierran sincronizadamente para proporcionar una detección

5. sensible a las fases; un medio filtrante que funciona reduciendo las frecuencias de ruidos armónicos y de la línea — conductora de energía; y un medio interruptor que funciona derivando la salida del detector a masa, excepto durante —

10. una operación de medición, y abriendo el circuito a la entrada al segundo medio integrador, excepto durante una operación de medición.

13.- Polarímetro de fluorescencia para análisis — moleculares, según la reivindicación 10, que incluye además por cada uno de los citados medios integradores, un circui-

15. to de autocero que funciona compensando determinadas desviaciones.

14.- Polarímetro de fluorescencia para análisis — moleculares, según la reivindicación 1, en el que el referido medio proveedor de intervalos de tiempo incluye medios —

20. integradores cargados a un nivel predeterminado y descargados a un ritmo uniforme, definiendo la duración de la descarga el citado intervalo de tiempo.

15.- Polarímetro de fluorescencia para análisis — moleculares, según la reivindicación 14, en el que dichos —

25. medios integradores incluyen un primer medio integrador que recibe la segunda señal citada y produce una primera señal de salida integrada, y un segundo medio integrador que recibe una señal derivada de la primera señal citada y produce una segunda señal de salida integrada de un máximo nivel de

30. terminado por el nivel máximo de la primera señal de salida

integrada.

16.- "POLARIMETRO DE FLUORESCENCIA PARA ANALISIS MOLECULARES".

Según queda sustancialmente descrito en la presente Memoria que consta de cuarenta y seis hojas, escritas a máquina por una sola cara y acompañada de dibujos.

21 ABR. 1978

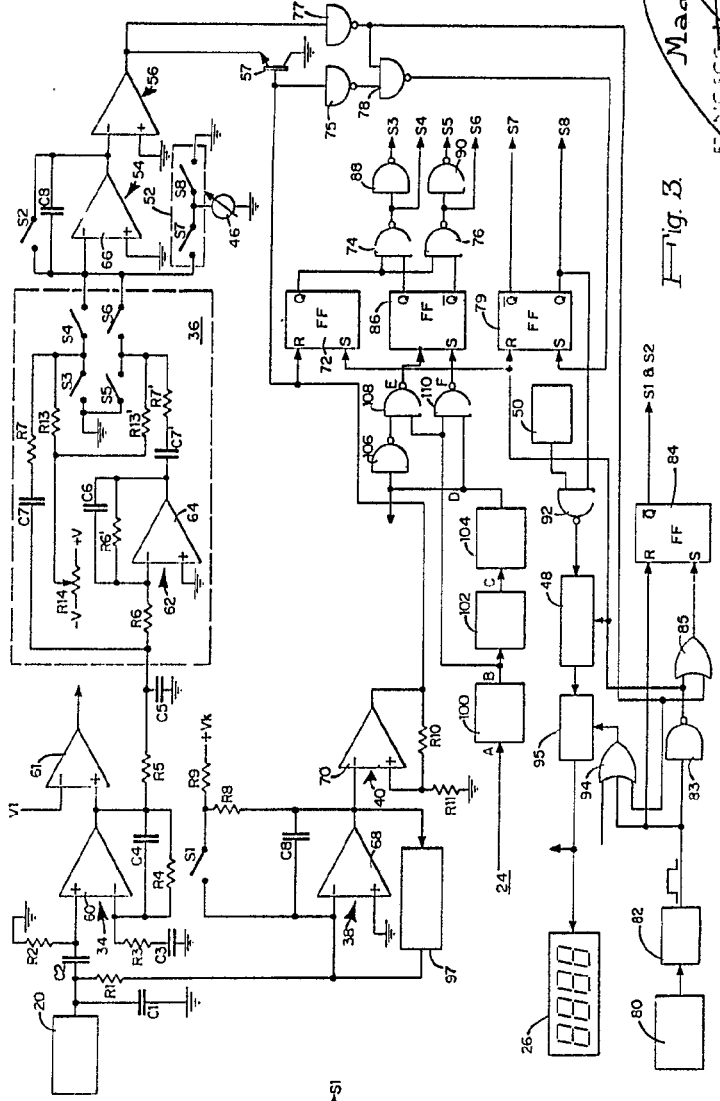
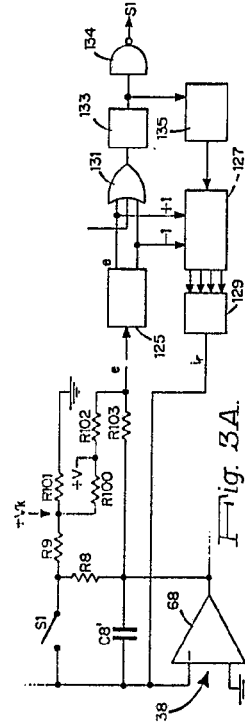
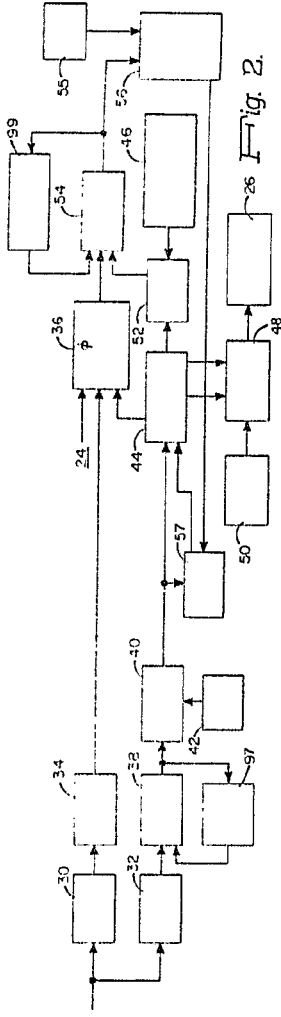
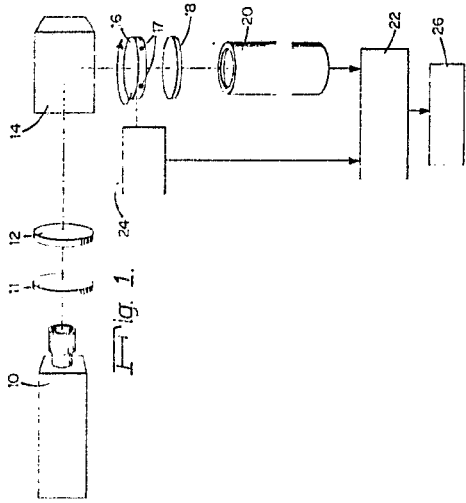
Madrid,

D. NATHAN SCHIFF BROMBERG

P.P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: M.^a Dolores Jerquera



Madrid
Francisco P. Calderín
Francisco Calderín Calderín

Nathan Schiff Bromberg

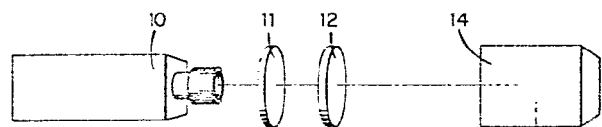


Fig. 1.

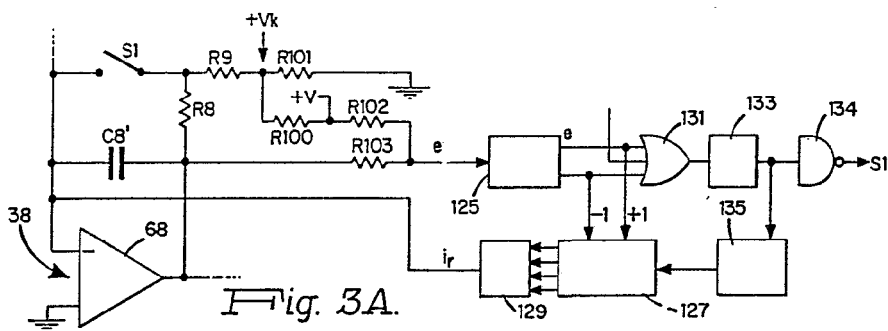
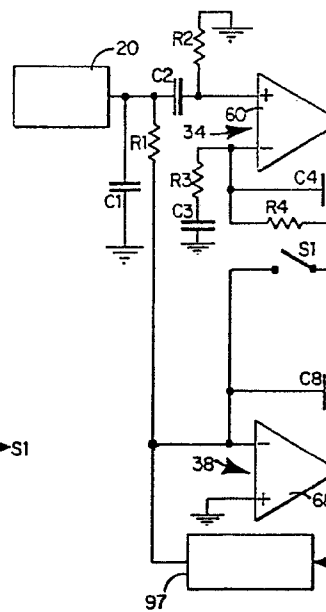
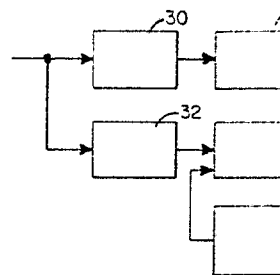
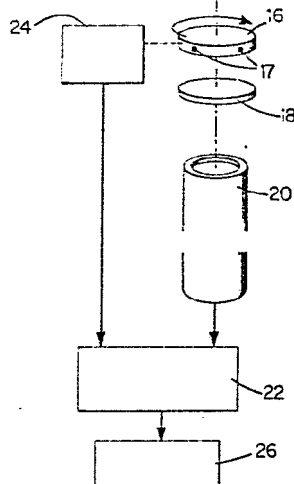
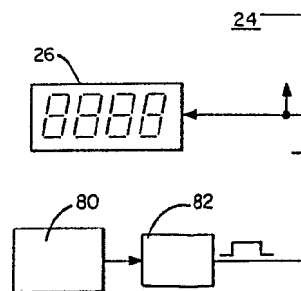


Fig. 3A.



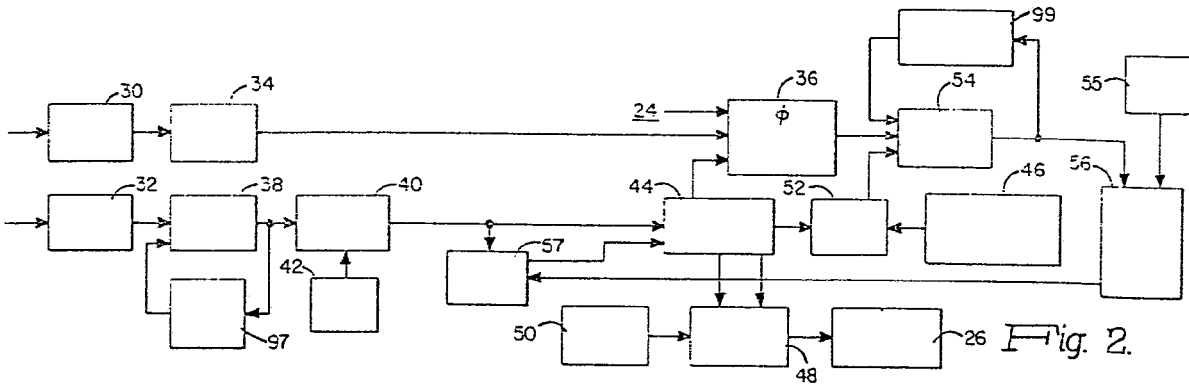


Fig. 2.

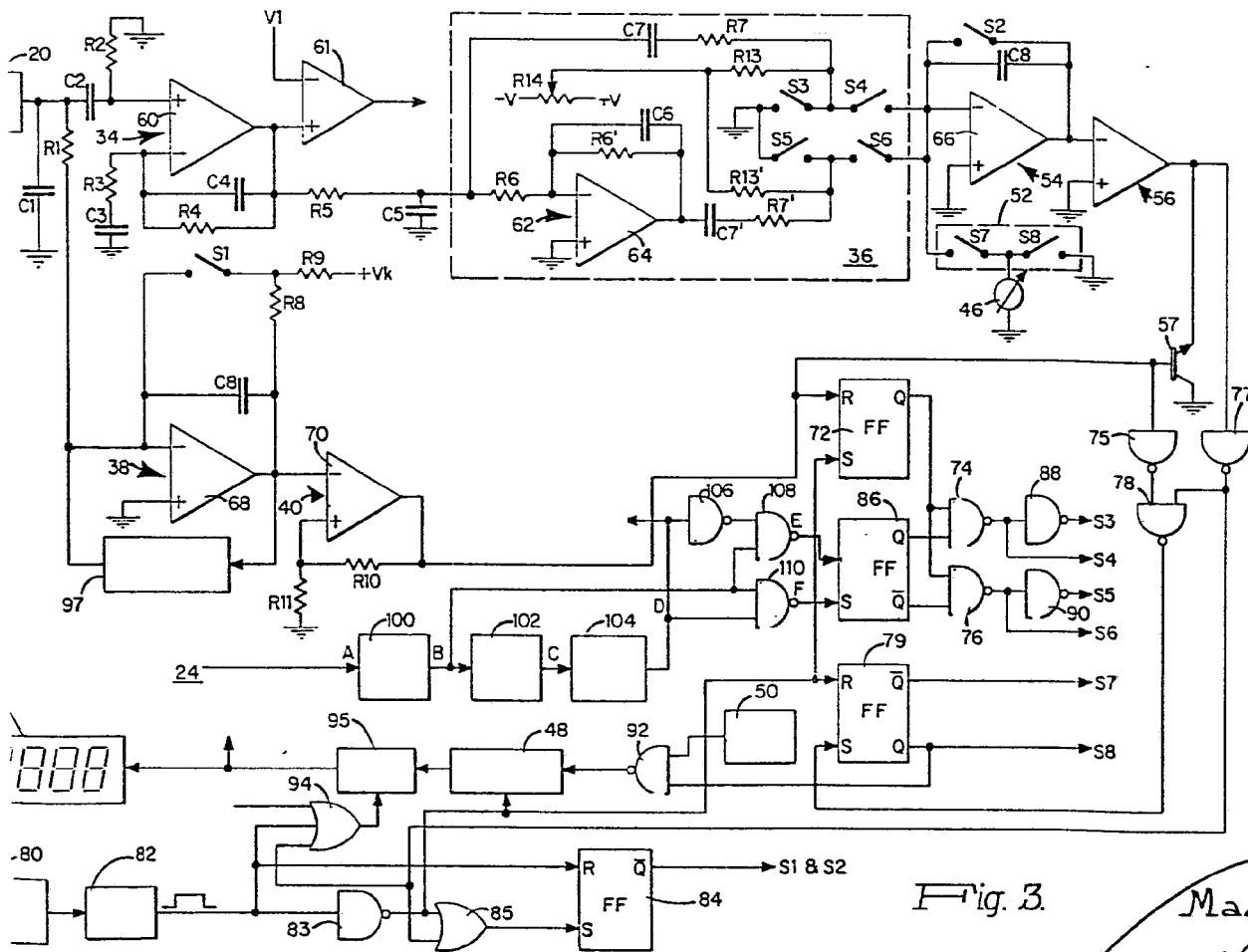


Fig. 3.

29 ABR. 1961
 Madrid
 FRANCISCO DE P. CABREZO
 F. F.
 Firmado: Sr. Dolores Jorquera

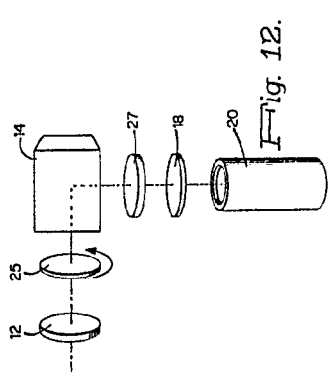
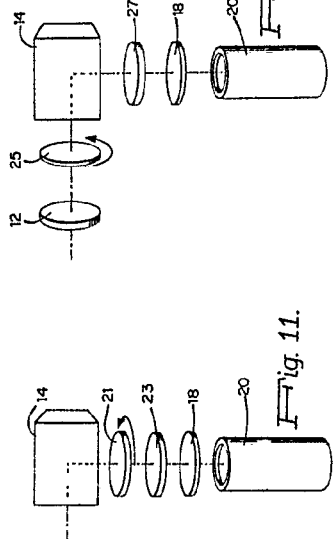
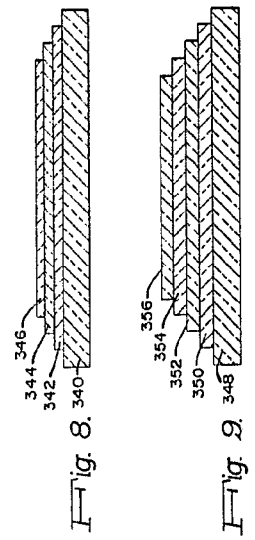
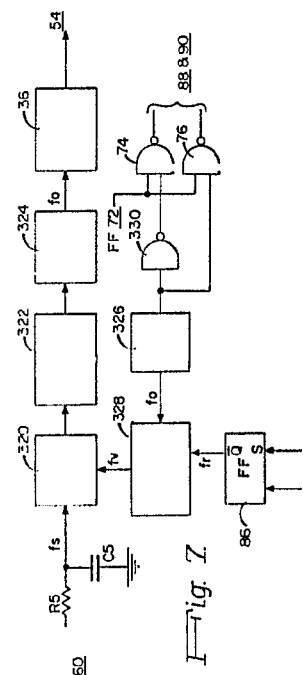
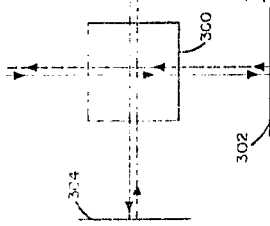
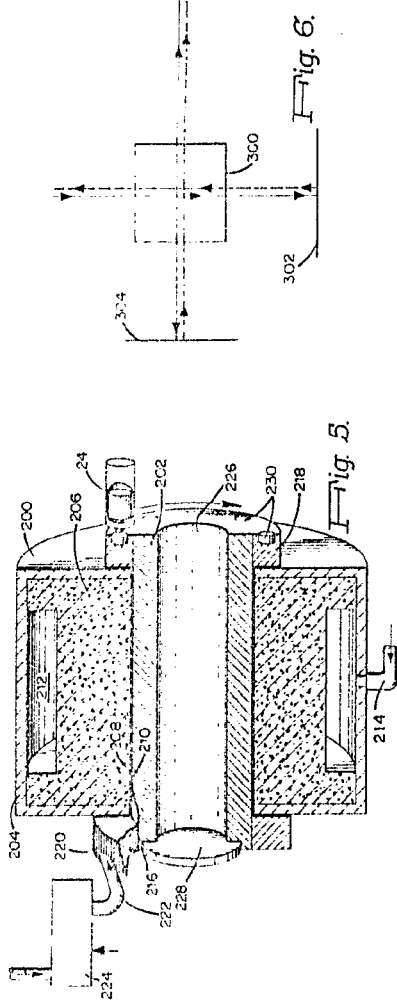
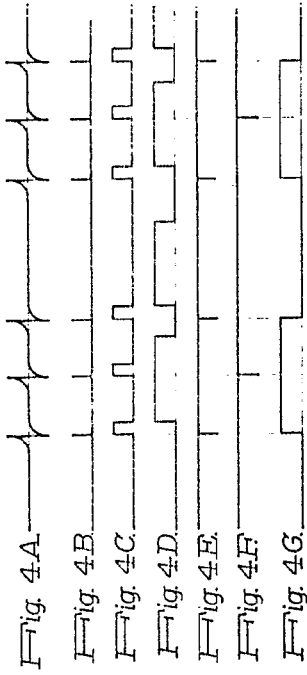


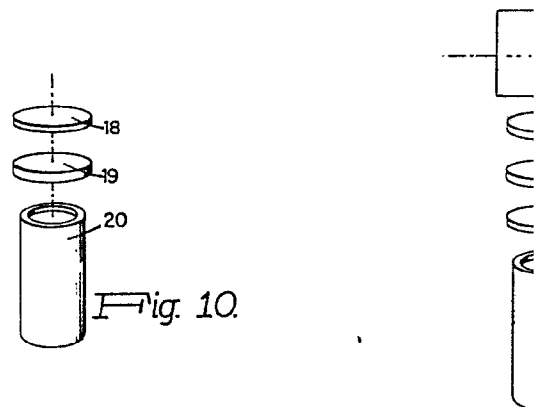
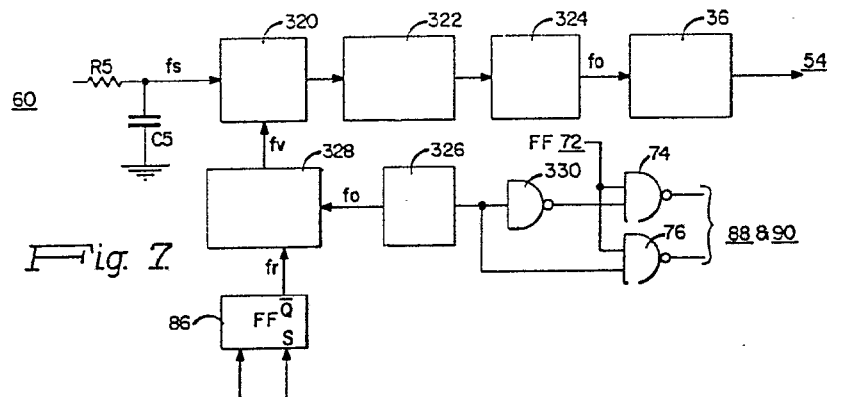
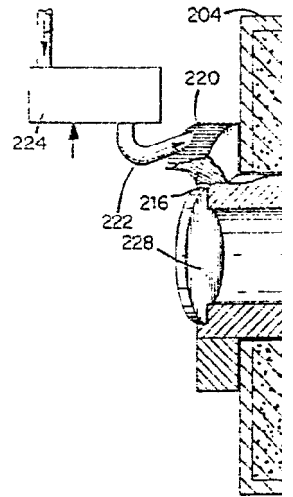
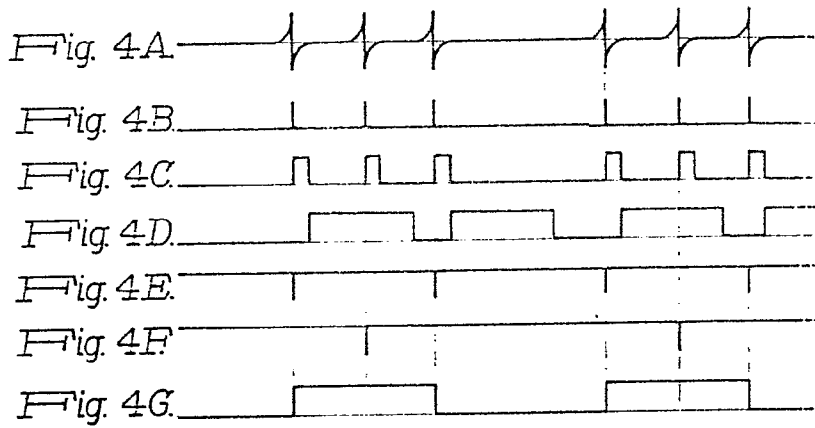
Fig. 10.

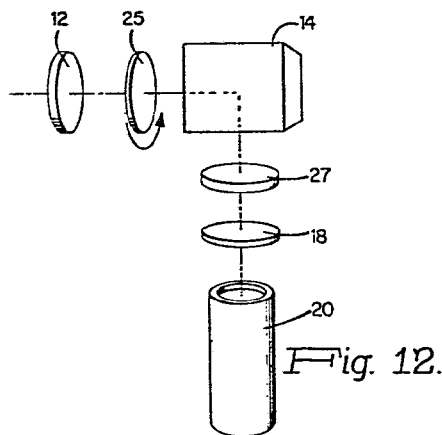
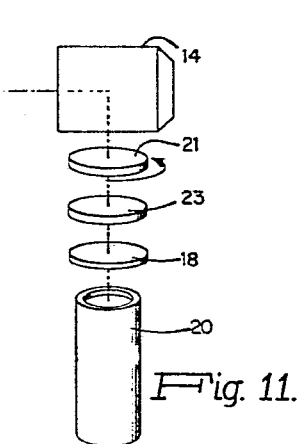
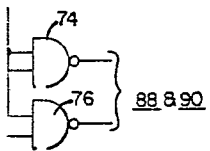
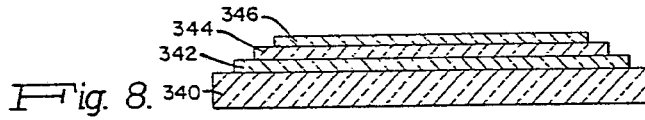
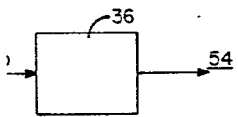
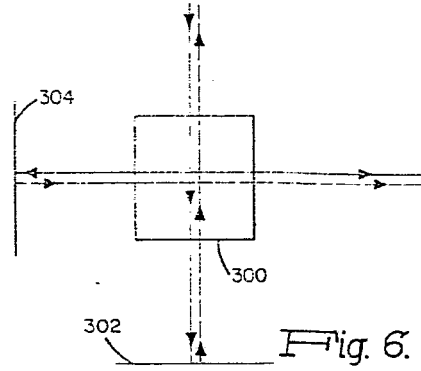
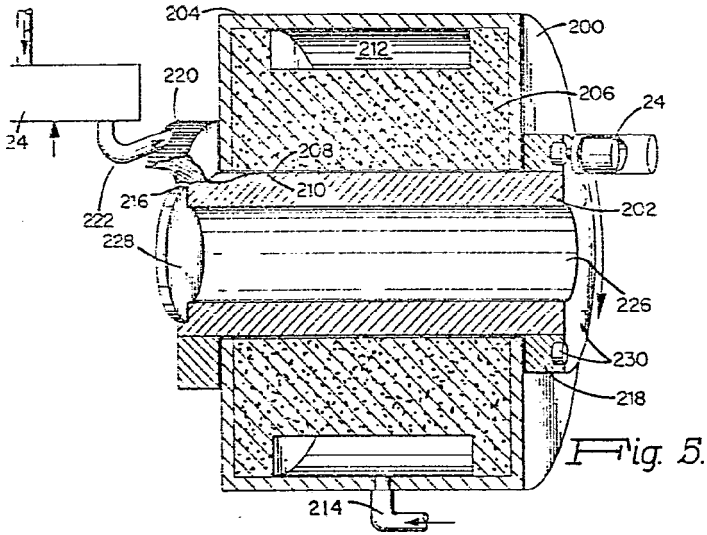
Fig. 11.

Fig. 12.

Madrid 21 ABR. 1911
 S. C. G. P. P. A. CABRERO
 Firmado: M. Delicias Jorquera

Nathan Schiff Bromberg





Madrid 21 ABR. 1970
 P. P.
 FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
 P. E.
 Firmado: M. Dolores Jorquera