

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 022**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2005** **E 09153880 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020** **EP 2068141**

54 Título: **Kit, su uso y procedimiento para la calibración de un sistema de medición de fotoluminiscencia**

30 Prioridad:

10.09.2004 DE 102004044717

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.04.2021

73 Titular/es:

**BAM BUNDESANSTALT FÜR
MATERIALFORSCHUNG UND -PRÜFUNG (50.0%)
Unter den Eichen 87
12205 Berlin, DE y
SIGMA-ALDRICH GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RESCH-GENGER, UTE;
SCHÖNENBERGER, BERNHARD;
PFEIFER, DIETMAR;
MONTE, CHRISTIAN;
HOFFMANN, ANGELIKA;
NORDING, PIERRE;
HOFFMANN, KATRIN;
SPIELES, MONIKA y
RURACK, KNUT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 819 022 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

Kit, su uso y procedimiento para la calibración de un sistema de medición de fotoluminiscencia

5 La invención se refiere a un kit para la calibración de un sistema de medición de fotoluminiscencia, en particular, de un sistema de medición de fluorescencia, así como al uso de este kit para la calibración de sistemas de medición de fotoluminiscencia. D.F. Eaton (1988) describe en PURE & APPL CHEM, vol. 60, n.º 7, páginas 1107-1114, materiales de referencia para mediciones de fluorescencia. El documento WO 97119188 A1 describe la determinación de moléculas biológicas por medio de refuerzo químico y sensores ópticos. El documento WO 02/104072 A2 describe sistemas multicromóforos emisivos. El documento US 2003/096419 A1 describe un procedimiento para determinar si se ha modificado un líquido en una instalación de aire acondicionado o un sistema de refrigeración, usándose para la marcación de agentes de refrigeración y lubricantes fluorescentes. Rance A. Velapoldi et al. (2004) describen en Journal of Fluorescence, tomo 14(4), páginas 465-472 espectros de emisión corregidos y rendimientos cuánticos de una serie de compuestos fluorescentes en la región espectral visible.

10 Cualquier técnica de medición de luminiscencia proporciona datos de medición que están compuestos de aportaciones específicas de analito y de aparato.

15 Las aportaciones específicas de aparato no deseadas reflejan la dependencia de la longitud de onda y de la polarización de componentes de aparato del aparato de medición usado. Responsables de estas dependencias son en particular, los elementos de construcción ópticos contenido en el canal de excitación y emisión del aparato, la fuente de luz de excitación y los sistemas de detección usados. La capacidad de comparación de datos luminiscentes más allá de los límites del aparato y del laboratorio, la detección del envejecimiento del aparato, la exigencia de la trazabilidad de datos de luminiscencia con respecto a normales primarias radiométricas (que corresponden al requerimiento general en EN ISO/IEC 17025), así como muchas señales de fluorescencia cuantitativas, la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia relativos y la optimización de métodos de luminiscencia requieren la determinación de estas aportaciones específicas del aparato. Esto se aplica en particular para valoraciones de comparación de perfiles de luminiscencia espectralmente desplazados uno con respecto a otro o para mediciones de emisión con distintas longitudes de onda de excitación.

20 Los aparatos de medición de fotoluminiscencia están constituidos por un canal de excitación, que entre otras cosas, contiene una fuente de luz de excitación y un elemento de construcción óptico que selecciona la longitud de onda y un canal de emisión dispuesto en la mayoría de los casos de manera rectangular con respecto a la trayectoria de los rayos de la luz de excitación, con el que se registra la luz emitida (fotoluminiscencia) por el cromóforo que se encuentra en el espacio de muestra tras la absorción de luz. Con frecuencia, se acopla a través de un divisor de haz una parte definida de la luz de excitación en un canal de referencia, que contiene un elemento de construcción óptico tal como un espejo o un dispersor y un detector (de referencia). Con el canal de referencia se registra la actual intensidad de luz de excitación con la longitud de onda de excitación, para detectar así oscilaciones breves de la intensidad de luz de excitación. La detección de las aportaciones específicas del aparato mencionadas anteriormente con respecto a la señal de fluorescencia puede realizarse mediante la determinación de las denominadas funciones correctoras, que describen las dependencias de la longitud de onda y de la polarización de estos efectos para el canal de emisión y el canal de excitación del respectivo aparato. Estas funciones correctoras se determinan a este respecto por separado. La función correctora de emisión contiene a este respecto, la eficacia de transmisión dependiente de la longitud de onda y de la polarización de las piezas de construcción ópticas en el canal de emisión y la sensibilidad espectral dependiente de la longitud de onda y de la polarización del sistema de detección usado. La función correctora de excitación describe la intensidad específica de radiación espectral dependiente de la longitud de onda de la fuente de luz de excitación y la eficacia de transmisión dependiente de la longitud de onda y de la polarización de las piezas de construcción ópticas en el canal de excitación.

30 Se conoce el uso de patrones de transferencia físicos certificados para la detección de los efectos específicos del aparato. Para la calibración del canal de excitación se usan a este respecto, normalmente, normales receptoras certificadas y para la calibración del canal de emisión lámparas estándares certificadas. Para el uso de normales de transferencia físicas son desventajosos los conocimientos ópticos buenos necesarios para la aplicación del usuario, nuevas calibraciones costosas, modificaciones dependientes de la duración de alumbrado de la intensidad específica de radiación espectral de lámparas estándares y en el caso de la corrección de emisión con lámparas estándares, las distintas características de emisión de lámpara y la muestra y las intensidades específicas de radiación espectrales distintas en al menos más de tres órdenes de magnitud de la norma de transferencia y una muestra luminiscente típica. Todo esto puede conducir a funciones correctoras sujetas a fallo y poco satisfactorias y es además costoso y caro. Los estándares de transferencia físicos no son adecuados además en la mayoría de los casos para la calibración de sistemas de medición de fotoluminiscencia compactos sencillos.

45 Para la corrección de la excitación se usan también los denominados contadores de cuantos. Éstos son soluciones de colorante altamente concentradas que absorben completamente los cuantos de luz incidentes y emiten con un rendimiento cuántico fluorescente independiente de la longitud de onda. Los contadores de cuantos proporcionan datos de medición muy dependientes de la concentración y geometría y son, además, propensos a efectos de polarización. Los procedimientos de calibración normalizados con concentraciones definidas en combinación con geometrías de medición definidas no están disponibles para contadores de cuantos.

Se conocen igualmente los denominados patrones de fluorescencia, que normalmente se basan en la fotoluminiscencia de un compuesto químico. Los patrones de fluorescencia espectrales o los denominados patrones de emisión y excitación con espectros de emisión o bien de excitación conocidos, corregidos (para efectos específicos del aparato) pueden usarse para la determinación de las características espectrales de sistemas de medición de fotoluminiscencia en el contexto de una calibración del aparato. Tales patrones de fluorescencia se usan en distintas formas, en particular, en forma de soluciones o incrustados en matrices de polímero o de vidrio sólidas. La ventaja de los patrones de fluorescencia, en particular, en forma de soluciones, es que éstos se asimilan mucho con las muestras luminiscentes que van a someterse a estudio en cuanto a su intensidad de luminiscencia y características de emisión. Los patrones de fluorescencia permiten por consiguiente la calibración (espectral) en las condiciones aplicadas con las mediciones de muestras típicas. Los patrones de fluorescencia pueden medirse en muchos tipos de aparatos, formatos y geometrías de medición distintos y son adecuados por consiguiente también para la calibración de sistemas de medición de fluorescencia con especiales geometrías o formatos de muestras, por ejemplo, con microcubetas, placas de microtitulación o sistemas criostatos. Todos los patrones de fluorescencia permiten la realización de la calibración en la misma disposición de cubetas y medición que la verdadera medición de muestra y proporcionan de esta manera resultados de calibración óptimos. En el caso de patrones de fluorescencia, es problemática la multiplicidad de propiedades de materia y luminiscencia que van a definirse. Condición previa para la idoneidad de un patrón de transferencia es la completa caracterización de todas las propiedades relevantes de aplicación incluyendo el método usado y la indicación de la seguridad de medición y una suficiente estabilidad a largo plazo en el estado puro sólido y en solución o bien incrustado en una matriz.

En la bibliografía técnica se han discutido de manera extensa numerosas recomendaciones con respecto a patrones de fluorescencia, también con respecto a patrones de emisión y excitación, así como con respecto a patrones de rendimiento cuántico de fluorescencia. El sulfato de quinina dihidratado (SRM936) es, hasta el momento, el único patrón de emisión cuyo espectro de emisión corregido se ha certificado por un instituto estatal, en este caso, por el National Institut for Standards and Technology (NIST, EE. UU.), con un fluorímetro de referencia caracterizado de manera trazable con seguridad de medición conocida (R.A. Velapoldi, K.D. Mielenz, NBS Spec. Publ. 1980, 260-264, PB 80132046, Springfield, VA). Únicamente para este patrón están disponibles indicaciones con respecto a la pureza de colorante, con respecto a la calibración del espectrómetro usado, con respecto a los parámetros de medición usados y con respecto a la seguridad de medición.

La región espectral, en la que puede usarse un patrón de fluorescencia para la calibración, está limitada por la posición y anchura de la banda de fluorescencia, debiéndose usar en el caso de patrones de excitación, a ser posible, sólo la banda de onda más larga. El patrón de emisión sulfato de quinina cubre, por ejemplo, sólo la región espectral de aprox. 400 a 550 nm. Para calibrar un sistema de medición de fotoluminiscencia en toda la región espectral UV/vis/NIR, se requiere por consiguiente la combinación de varios cromóforos adaptados uno a otro en cuanto a sus espectros de fluorescencia. Sin embargo, hasta ahora existen sólo pocos ejemplos de combinaciones de patrones. Se conoce, por ejemplo, una combinación – que ya no puede obtenerse comercialmente – de patrones de emisión que están constituidos por láminas de polímero que contienen fluoróforos con espectros de emisión certificados por NIST (A. Thommpson, K. L. Eckerle, SPIE 1989, 1054, J.W. Hofstraat & M.J. Latuhihin, Appl. Spectrosc. 1994, 48, 436). Este sistema requiere una geometría de medición definida, el uso de polarizadores y la realización de mediciones de luminiscencia en geometría Front-Face y, por consiguiente, no es adecuada para la calibración de sistemas de medición sencillos. También se desvían las condiciones de medición de las condiciones típicas para muestras líquidas. Una combinación de las funciones correctoras parciales individuales para dar una función correctora total no se describe.

Además, se conocen bloques de poli (metacrilato de metilo) (PMMA) que contienen fluoróforo en forma de cubetas como patrones de emisión y de excitación. Los fluoróforos usados presentan en general espectros de emisión y excitación muy estructurados, así como flancos que ascienden de manera empinada, de manera que se produce una dependencia, ya no despreciable de los perfiles de fluorescencia del paso de banda del monocromador y un aumento de la seguridad de calibración. Además, las incertidumbres en la exactitud de onda conducen así a grandes defectos en la intensidad de fluorescencia. Los espectros no son trazables, no se adaptan uno a otro y no pueden enlazarse a una función correctora total.

Otras soluciones de colorantes conocidas de distintos fluoróforos están afectadas con frecuencia por el problema de bandas de emisión estrechas, que ascienden de manera empinada, así como de una distancia espectral insuficiente de bandas de absorción y de emisión. Esto hace que sean inadecuadas como patrones de emisión. Algunas sustancias presentan estabilidades demasiado bajas y forman en condiciones típicas de excitación y medición fotoproductos con aportaciones espectrales propias. Muchas sustancias usadas presentan una anisotropía de fluorescencia demasiado grande, lo que significa una fuente de defectos adicional en la calibración y requiere el uso de polarizadores. En general, no son trazables los espectros indicados, faltan indicaciones con respecto a la seguridad de medición y sólo en casos excepcionales (sulfato de quinina dihidratado), están certificados los espectros por un sitio autorizado. Con frecuencia es incompleta además la caracterización de las propiedades espectroscópicas relevantes en la aplicación y faltan indicaciones con respecto a la pureza de colorantes en la mayoría de los casos.

Un planteamiento estadístico para el enlace de funciones correctoras parciales de distintos patrones de colorante para dar una función correctora total con aplicación de una estadística de velocidad de cómputo (estadística de Poisson) se describe por J.A. Gardecki y M. Maroncelli (Appl. Spectrosc. 1998, 52 1179). Los patrones de fluorescencia allí usados presentan parcialmente las deficiencias descritas anteriormente, tal como, por ejemplo, desarrollos de banda empinados

5 y estructurados (α -NPO), fotoestabilidad insuficiente en solución (triptófano, cumarina 102) o una anisotropía de fluorescencia demasiado alta (LDS 751). De acuerdo con el planteamiento matemático usado de una estadística numérica, está diseñado el procedimiento sólo a aparatos que trabajan en el modo Photo-Counting y por consiguiente con valores numéricos absolutos muy grandes. La aplicación de la estadística numérica para aparatos en el modo
 10 analógico, donde se obtienen valores numéricos esencialmente más pequeños para las intensidades, conduce a claros artefactos en las funciones correctoras así obtenidas. Además, se ha diseñado el procedimiento para el uso por personas con experiencia en espectroscopía de fluorescencia. Es problemático en el procedimiento además que, en el enlace de las curvas correctoras parciales de los patrones de emisión individuales entre sí para los espectros de emisión distribuidos en muchos fluorímetros, relativos de la luz de referencia (formación de cocientes de emisión y referencia), se generan a veces artefactos en la función correctora total. Éstos resultan cuando tras la corrección del valor en blanco entran en el cálculo valores negativos muy pequeños o incluso insignificantes – tal como en la zona de estribaciones de bandas de fluorescencia.

15 En total puede determinarse por consiguiente que actualmente no existe ningún sistema de calibración que permita una calibración eficaz, trazable y fácilmente manejable de toda la región espectral de un sistema de medición de fotoluminiscencia y recurra a patrones de colorantes con incertidumbre conocida de las propiedades de fluorescencia relevantes de la aplicación, que cumplan todos los requerimientos de una calibración reproducible y trazable. Por consiguiente, el objetivo de la presente invención consiste en facilitar un sistema de calibración extenso con el uso de patrones de fluorescencia, así como un procedimiento para la calibración, que permitan la calibración manejable de
 20 manera sencilla y reproducible, que pueda recurrir a normales primarias radiométricas (radiador negro; criorradiómetro) y eficaz de una región espectral muy grande de un sistema de medición de fotoluminiscencia.

Este objetivo se soluciona mediante un kit de patrones de fluorescencia (patrones de emisión y/o patrones de excitación), así como un procedimiento con las características de las reivindicaciones independientes.

25 Está previsto que la intensidad mínima relativa que ha de cumplirse en las longitudes de onda de solapamiento individuales ascienda en cada caso a al menos el 20 % de la intensidad máxima de las bandas de fluorescencia. Se obtienen resultados aún poco sujetos al fallo con una intensidad de al menos el 25 %, preferentemente con al menos el 30 % de la intensidad de banda máxima. En aplicaciones concretas se encuentran estas intensidades en aproximadamente el 40 % de la intensidad de banda máxima. Los valores mencionados anteriormente se refieren a la región espectral UV/vis con $\lambda \leq 700$ nm. Dado que en la región NIR con $\lambda > 700$ nm se encuentran rendimientos cuánticos básicamente más bajos y con ello, intensidades absolutas, pueden registrarse en esta región intensidades
 30 mínimas más bajas en los puntos de solapamiento de al menos el 10 %, en particular, en aproximadamente el 12 %, preferentemente el 15 % de la intensidad máxima de la respectiva banda flanqueante. En unión con la región de solapamiento limitada, para la que se realiza la determinación estadística de los factores de enlace α_i , se garantiza por consiguiente que al menos en la región UV/vis se incorporen en la estadística exclusivamente intensidades de los espectros corregidos o bien de los espectros medidos (normalizados) de al menos el 10 %, en particular de al menos el
 35 15 %, preferentemente de al menos el 20 %, con respecto a las intensidades máximas de los correspondientes espectros.

El kit de acuerdo con la invención, que comprende eventualmente en cada caso un juego de patrones de emisión y de excitación, para la calibración trazable de un sistema de medición de fotoluminiscencia, en particular, de un sistema de medición de fluorescencia, comprende los siguientes componentes, cuyas fórmulas están mencionadas aún a
 40 continuación:

(a) patrones de fluorescencia i según las fórmulas generales (1), (2), (5), (7), (8), (9) y (10) y

(b) espectros de fluorescencia corregidos $I_i(\lambda)$ de los patrones de fluorescencia i en forma legible por ordenador y/o una indicación de una página de internet, en la que están disponibles los espectros de fluorescencia corregidos $I_i(\lambda)$,

45 en el que los patrones de fluorescencia i se seleccionan de manera que sus espectros de fluorescencia corregidos de manera espectral $I_i(\lambda)$ cubren juntos una región espectral predeterminada de manera que en la región espectral UV/vis con bandas de fluorescencia de $\lambda \leq 700$ nm de los espectros de fluorescencia $I_i(\lambda)$ corregidos, en cada caso, espectralmente sucesivos en sus longitudes de onda de solapamiento $A_{i/i+1}$ presentan una intensidad mínima predeterminada al menos del 20 % de la respectiva intensidad de banda máxima, sus bandas de fluorescencia en cada caso, presentan una semianchura (FWHM) al menos de 1400 cm^{-1} así como un desarrollo de banda no estructurada,
 50 libre de hombro con, en cada caso, sólo un máximo en la región espectral relevante con una resolución espectral de 1 nm.

La composición de acuerdo con la invención del (o de los) kit(s) permite al usuario realizar una calibración del sistema de medición a través de una amplia región espectral (310 a 730 nm, en particular, de 300 a 950 nm para el espectro de emisión y para el espectro de excitación de 280 a 600 nm, en particular de 240 a 800 nm) de manera eficaz,
 55 reproducible y económica. En particular, la adaptación de acuerdo con la invención de los patrones de fluorescencia individuales, es decir, sus semianchuras, así como la intensidad mínima requerida en las longitudes de onda de solapamiento, permite la generación de una función correctora total para el aparato en calidad hasta ahora no disponible.

5 Está previsto, además, preferentemente que el kit comprenda para cada espectro de fluorescencia corregido un desarrollo de incertidumbre de medición espectral independiente del aparato en forma legible por ordenador. También en este caso es posible opcional o adicionalmente facilitar la indicación de una página de internet, en la que están disponibles los datos de medición junto con los desarrollos de incertidumbre de medición espectral. Estos últimos permiten la creación de un desarrollo de incertidumbre de medición total para la función de corrección total, de manera que puede determinarse un equilibrio de incertidumbre de medición dependiente de la longitud de onda para el sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse.

10 El kit puede contener además unas instrucciones para el uso de acuerdo con lo determinado de los componentes del kit y/o una indicación de una página de internet, en la que están disponibles las instrucciones. Las instrucciones contienen, por ejemplo, indicaciones con respecto a las condiciones de medición y ajustes del aparato y similares.

15 Los patrones de fluorescencia del kit se miden como soluciones, dado que, de esta manera, puede realizarse la calibración en gran parte, en condiciones de medición típicas de rutina. Por consiguiente, es posible básicamente que el kit contenga los colorantes en forma de sus sólidos o sus soluciones acabadas. A este respecto puede estar previsto además que el kit comprenda los disolventes que van a usarse, usándose preferentemente para todos los patrones de transferencia el mismo disolvente en alta pureza.

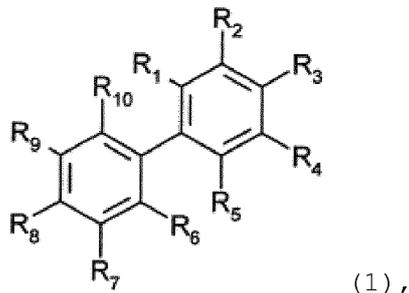
20 Además de la intensidad mínima requerida de los espectros de fluorescencia corregidos en sus respectivas longitudes de onda de solapamiento en la región espectral UV/vis de al menos el 20 %, en particular de al menos el 25 %, preferentemente de al menos el 30 % de la intensidad máxima de las bandas de luminiscencia (en la región NIR al menos el 10 %, en particular al menos el 15 %), así como de la semianchura mínima requerida, que en particular asciende a al menos 1600 cm^{-1} , preferentemente a al menos 2000 cm^{-1} y en el caso ideal incluso a al menos 2400 cm^{-1} (por encima de 700 nm 1200 cm^{-1} , en particular 1400 cm^{-1}), cumplen, según otras configuraciones de la invención, todos los patrones de fluorescencia otros requerimientos descritos a continuación. Según una configuración especialmente ventajosa de la invención se seleccionan todos los patrones de colorante de modo que sus bandas de luminiscencia presenten un desarrollo de banda liso y no estructurado, es decir, con una resolución espectral de 1 nm presentan las bandas sólo un máximo, ningún hombro, así como un desarrollo de banda empinado. Al igual que la semianchura mínima requerida, que va acompañada de una pendiente de flancos plana de las bandas, también el desarrollo no estructurado y liso de las bandas garantiza una independencia mejor posible de los espectros medidos de las condiciones de medición, así como del equipamiento de aparatos o bien ajustes de parámetros de los espectrómetros usados, en particular, de la anchura de paso de banda del monocromador y anchura de ranura del canal de medición. Las características de banda de acuerdo con la invención conducen por consiguiente a un aumento de la seguridad de calibración.

35 Está previsto además facilitar todos los patrones de colorante con una pureza de al menos el 98 %, preferentemente de al menos el 99,7 %. Además, los patrones de colorante presentan un solapamiento bajo de sus bandas de excitación y de emisión. En particular, existe una distancia entre bandas de excitación y de emisión de al menos 2000 cm^{-1} , en particular al menos 2400 cm^{-1} y en el caso ideal, de al menos 2800 cm^{-1} . Los patrones de colorante presentan además en un intervalo de temperatura de 20 a 30 °C una anisotropía de la fluorescencia en el disolvente que va a usarse en la región espectral UV/vis con $\lambda \leq 700\text{ nm}$ de como máximo $0,05$ y preferentemente de como máximo $0,04$, en la región espectral NIR de como máximo 15 y preferentemente de como máximo $0,07$. Otras fuentes de fallos de la calibración se evitan debido a que los patrones de colorante propuestos en el intervalo de temperatura de medición típico de 20 a 30 °C presentan sólo una baja dependencia de la temperatura de los espectros de fluorescencia. Los colorantes están caracterizados además por una alta estabilidad térmica y fotoquímica de sus sustancias puras y también de sus soluciones. Finalmente, se garantiza que no forman fotoproductos en las condiciones de medición y excitación típicas para mediciones de fotoluminiscencia estáticas, que presenten aportaciones espectrales propias en la región espectral relevante. En particular, presentan una degradación como máximo al 10% , preferentemente como máximo al 2% de las bandas de fluorescencia con radiación incidente de 5 horas de la luz de una lámpara de máxima presión de xenón de 150 W en la zona de la máxima absorción de mayor longitud de onda con una anchura del paso de banda de aprox. 15 nm , de modo que la estabilidad térmica y fotoquímica sea suficiente para las aplicaciones planeadas. En particular, la totalidad de las propiedades espectroscópicas y químicas mencionadas de los patrones de fluorescencia garantiza una alta seguridad de calibración y una trazabilidad según la norma EN ISO/IEC 17025.

50 El kit puede contener básicamente una multiplicidad de distintos patrones de emisión y sus espectros de emisión espectralmente corregidos para la creación de una función correctora total para el canal de emisión (función correctora de emisión) como también puede comprender una multiplicidad de distintos patrones de excitación y sus espectros de excitación corregidos para la creación de una función correctora total para el canal de excitación (función correctora de excitación). Preferentemente, el kit comprende tanto patrones de emisión como también de excitación, así como sus espectros de emisión y de excitación espectralmente corregidos de forma electrónica sobre un soporte de datos o bien disponible a través de la internet.

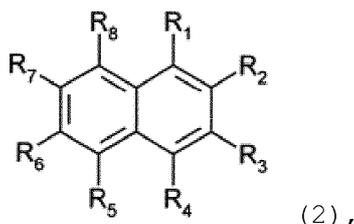
60 Un juego de patrones de emisión preferentes contiene compuestos seleccionados en particular del grupo de los derivados de bifenilo, naftaleno, cumarina, oxazina, merocianina, hemicianina y estirilo. Como patrones de excitación se seleccionan preferentemente derivados del grupo que contiene derivados de bifenilo, terfenilo, oxadiazol, cumarina, oxazina, merocianina, hemicianina y estirilo. A continuación, se mencionan algunos patrones de emisión y/o de excitación explícitos, que se corresponden con los criterios mencionados anteriormente.

Un primer patrón de emisión y/o de excitación preferente es un derivado de bifenilo según la fórmula general 1



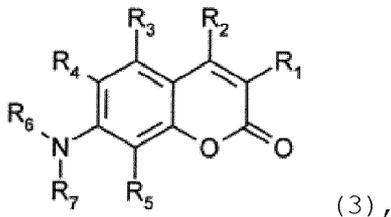
5 en la que los restos R_1 a R_{10} independientemente entre sí significan un resto hidrógeno, un resto alquilo o alcoxi o parcialmente en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, hetero- o homonuclear. Preferentemente, significan R_1 y R_6 en cada caso un resto alcoxi y los demás restos independientemente entre sí un resto hidrógeno o alquilo, en la que los grupos alcoxi y alquilo independientemente entre sí son cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados. De manera especialmente preferente significan R_1 y R_6 en cada caso, un resto metoxi y los demás restos en cada caso un resto hidrógeno. Este compuesto se usa preferentemente como patrón de emisión y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de emisión de 290 a 410 nm con una longitud de onda de excitación en 280 nm. La semianchura asciende a aproximadamente 4250 cm^{-1} y la distancia entre el máximo de excitación y de emisión a aprox. 5410 cm^{-1} .

Un segundo patrón de emisión y/o de excitación preferente es un derivado de naftaleno según la fórmula general 2



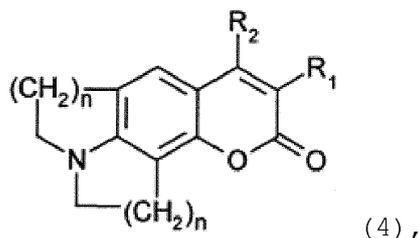
15 en la que los restos R_1 a R_5 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o alcoxi o parcialmente en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, hetero- o homonuclear. Preferentemente, al menos uno de los dos anillos de naftaleno está sustituido con dos restos alcoxi en una disposición de simetría especular (por ejemplo, R_1 y R_4 y/ o R_2 y R_3) y los demás restos son, en cada caso, hidrógeno, en la que los grupos alcoxi son acíclicos, ramificados o no ramificados y no presentan restos hidrógeno en posición β con respecto al átomo de oxígeno de éter. De manera especialmente preferente, R_1 y R_4 independientemente entre sí, son un resto metoxi o neopentiloxi y los demás restos en cada caso restos hidrógeno. Estos compuestos se usan preferentemente como patrón de emisión y presentan, por ejemplo, en etanol una banda de emisión en aproximadamente 330 a 500 nm con una longitud de onda de excitación en 320 nm. La semianchura asciende a 4400 cm^{-1} y la distancia entre el máximo de excitación y de emisión a aprox. 4930 cm^{-1} .

Un tercer patrón de emisión y/o de excitación preferente es un derivado de cumarina según la fórmula general 3



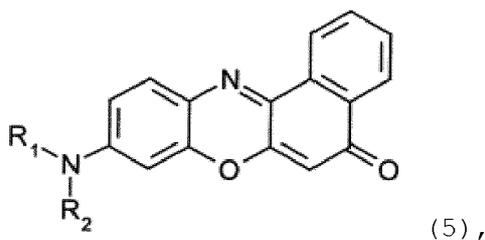
25 en la que los restos R_1 a R_7 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o parcialmente en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, homonuclear. En particular, R_1 y R_2 independientemente entre sí significan un hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o un anillo condensado, saturado, homonuclear, R_3 a R_5 en cada caso un resto hidrógeno y R_6 y R_7 independientemente entre sí un resto hidrógeno o alquilo. Preferentemente, R_1 a R_5 en cada caso son un resto hidrógeno y R_6 y R_7 en cada caso un grupo etilo. Este compuesto se usa como patrón de emisión y/o de excitación y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de emisión en aproximadamente 400 a 600 nm con una longitud de onda de excitación en 380 nm, así como una banda de excitación de 325 a 430 nm con una longitud de onda de detección de 460 nm. La semianchura de las bandas de emisión asciende a aproximadamente 2850 cm^{-1} y la distancia entre el máximo de excitación y de emisión a aprox. 4340 cm^{-1} . La banda de excitación tiene una semianchura de aproximadamente 3780 cm^{-1} .

Un cuarto patrón de emisión y/o de excitación preferente es un derivado de cumarina según la fórmula general 4



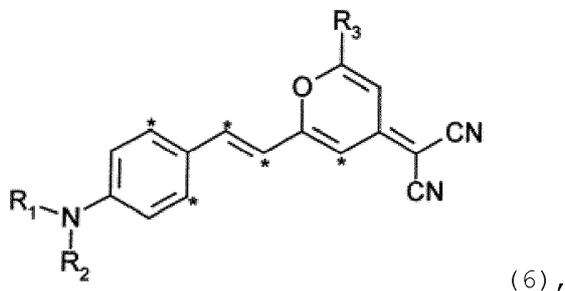
5 en la que los restos R_1 y R_2 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, homonuclear y n es igual a 1 o 2. Preferentemente, R_1 es un hidrógeno, R_2 es un resto alquilo no sustituido o sustituido y n es en cada caso igual a 1 o 2. De manera especialmente preferente, R_1 es hidrógeno, R_2 es un resto trifluorometilo y n es en cada caso igual a 2. Este compuesto se usa como patrón de emisión y/o de excitación y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de emisión en aproximadamente 460 a 700 nm con una longitud de onda de excitación en 420 nm, así como una banda de excitación de 330 a 490 nm con una longitud de onda de detección de 530 nm. La semianchura de la banda de emisión asciende a 2890 cm^{-1} y la distancia entre el máximo de excitación y de emisión a aprox. 4940 cm^{-1} . La banda de excitación tiene una semianchura de aproximadamente 4010 cm^{-1} .

10 Un quinto patrón de emisión y/o excitación es un derivado de oxazina, en particular, un derivado de 3H-fenoxazin-5-ona según la fórmula general 5



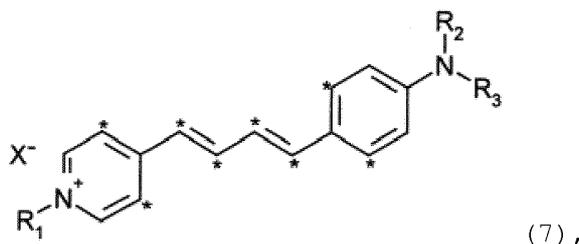
15 en la que los restos R_1 y R_2 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido. Preferentemente, R_1 y R_2 en cada caso significan un resto alquilo no sustituido, no ramificado, en particular, en cada caso un resto etilo. El compuesto se usa como patrón de emisión y/o de excitación y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de emisión en aproximadamente 570 a 750 nm con una longitud de onda de excitación de 550 nm, así como una banda de excitación a 440 a 630 nm con una longitud de onda de detección de 630 nm. La semianchura de la banda de emisión asciende a 1630 cm^{-1} y la distancia entre el máximo de excitación y de emisión a aprox. 2440 cm^{-1} . La banda de excitación tiene una semianchura de aproximadamente 2960 cm^{-1} .

20 Un sexto patrón de emisión y/o de excitación es un derivado de merocianina según la fórmula general 6



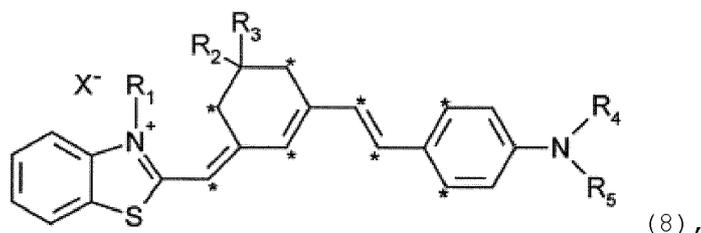
25 en la que R_1 , R_2 y R_3 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido. Los átomos de C caracterizados con una estrella pueden estar puenteados entre sí, independientemente entre sí, a través de un puente C2 o C3 saturado, siempre que se encuentren en posición 1,3 uno con respecto a otro. Preferentemente, R_1 a R_3 son en cada caso, un resto metilo y no está presente ningún puente. Este compuesto se usa preferentemente como patrón de emisión y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de emisión en aproximadamente 530 a 750 nm con una longitud de onda de excitación en 460 nm. En acetona asciende la semianchura de la banda de emisión a 2323 cm^{-1} y la distancia entre la excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 462 \text{ nm}$) y el máximo de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 626 \text{ nm}$) a 5670 cm^{-1} .

30 Otro patrón de emisión y/o de excitación es un derivado de estililo, en particular, un derivado de hemicianina según la fórmula general 7



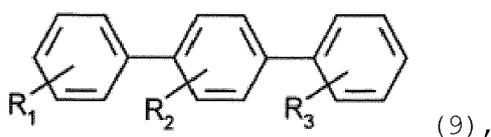
5 en la que R_1 a R_3 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido y X^- un anión discrecional. Los átomos de C caracterizados con una estrella pueden estar puenteados entre sí, independientemente entre sí, a través de un puente C2 o C3 saturado, siempre que se encuentren en posición 1,3 uno con respecto a otro. Preferentemente, R_1 es un resto etilo, R_2 y R_3 en cada caso son un resto metilo y X^- es un anión perclorato y no está presente ningún anillo de puente. Este compuesto se usa preferentemente como patrón de emisión y presenta una banda de emisión en aproximadamente 600 a 800 nm con una longitud de onda de excitación en 500 nm. En acetona asciende la semianchura de la banda de emisión a 2008 cm^{-1} y la distancia entre la excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$) y el máximo de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 719 \text{ nm}$) a 6417 cm^{-1} .

10 Otro patrón de emisión y/o de excitación es un derivado de estililo, en particular, un derivado de hemicianina según la fórmula general 8



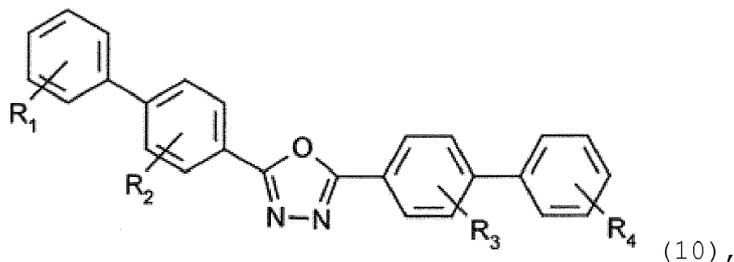
15 en la que los restos R_1 a R_5 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido y X^- un anión discrecional. Los átomos de C caracterizados con una estrella pueden estar puenteados entre sí, independientemente entre sí, a través de un puente C2 o C3 saturado, siempre que se encuentren en posición 1,3 uno con respecto a otro. Preferentemente, R_1 a R_5 en cada caso son un grupo metilo, X^- un anión perclorato y no se encuentra ningún puente. El compuesto se usa preferentemente como patrón de emisión y presenta una banda de emisión en aproximadamente 700 a 920 nm con una longitud de onda de excitación en 580 nm. En acetona asciende la semianchura de la banda de emisión a 1460 cm^{-1} y la distancia entre la excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 564 \text{ nm}$) y el máximo de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 810 \text{ nm}$) a 5380 cm^{-1} .

20 Otro patrón de emisión y/o de excitación preferente es p-terfenilo según la fórmula general 9



25 en la que R_1 a R_3 independientemente entre sí significan hidrógeno o un resto alquilo o alcoxi, preferentemente hidrógeno. El compuesto se usa preferentemente como patrón de excitación y presenta, por ejemplo, en etanol una banda de excitación en aproximadamente 240 a 320 nm, cuando la fluorescencia se detecta en 335 nm. La semianchura de la banda de excitación asciende a 5580 cm^{-1} .

Otro patrón de emisión y/o de excitación preferente es un derivado de 1,3,4-oxadiazol según la fórmula 10



30 en la que R_1 a R_4 independientemente entre sí significan hidrógeno o un resto alquilo o alcoxi, preferentemente en cada caso, hidrógeno. Este compuesto se usa preferentemente como patrón de excitación y presenta, por ejemplo, en acetonitrilo una banda de excitación en aproximadamente 275 a 350 nm y un máximo de emisión en 373 nm. La

semianchura de la banda de excitación asciende a 4880 cm^{-1} .

Un kit de acuerdo con una configuración especialmente preferente comprende un juego de patrones de emisión, que contiene al menos en cada caso un patrón de fluorescencia según las fórmulas generales 1 a 5. Un kit de este tipo cubre la región espectral de aproximadamente 310 a 730 nm. Adicionalmente, puede comprender este kit de calibración para el canal de emisión al menos otro patrón de emisión, seleccionado de las fórmulas generales 6, 7 y 8, para permitir, por consiguiente, la creación de una función correctora total para una región de aprox. 300 a 950 nm.

5

Un kit especialmente preferente para la creación de una función correctora total para el canal de excitación comprende un juego de patrones de excitación, que contiene al menos en cada caso un patrón de excitación según las fórmulas generales 3, 4, 5, 9 y 10.

10

Ninguno de los compuestos de fórmulas generales 1, 2, 5 a 10 se ha usado hasta ahora como patrones de fluorescencia (patrones de emisión y/o de excitación), en particular, no en relación con juegos de colorantes adaptados uno a otro. por este motivo, el uso de una de estas sustancias para la calibración de un sistema de medición de luminiscencia representa otro aspecto importante de la presente invención.

15

El kit de acuerdo con la invención o bien sus patrones de colorante pueden usarse, además de para la calibración espectral anteriormente descrita de aparatos de medición de fotoluminiscencia, también como patrones de rendimiento cuántico de fluorescencia para la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia relativa en la región espectral UV/vis/NIR, es decir, para la calibración cuantitativa de las intensidades. A este respecto, el rendimiento cuántico de fluorescencia está definido como la relación del número de fotones emitidos por una muestra con respecto al número de fotones absorbidos por la muestra. Además, es concebible usar el kit o bien sus patrones de colorantes para la determinación de la zona de linealidad de un sistema de detección de un sistema de medición de fotoluminiscencia. A este respecto, se determina la zona de un detector, en la que la intensidad indicada por éste aumenta linealmente con la intensidad irradiada, es decir, en la que una información cuantitativa eficaz es posible a través de una concentración de un cromóforo en la muestra.

20

Otras configuraciones ventajosas de la invención son objeto de las demás reivindicaciones dependientes.

25

La invención se explica en más detalle a continuación en ejemplos de realización por medio de las figuras. Muestran:

la figura 1: espectros de emisión y excitación de un juego de acuerdo con la invención de cinco patrones de emisión,

la figura 2: bandas de emisión de los patrones de emisión C y D de la figura 1;

30

la figura 3: un diagrama de flujo de un procedimiento para la calibración de un espectrómetro de luminiscencia usando el kit descrito;

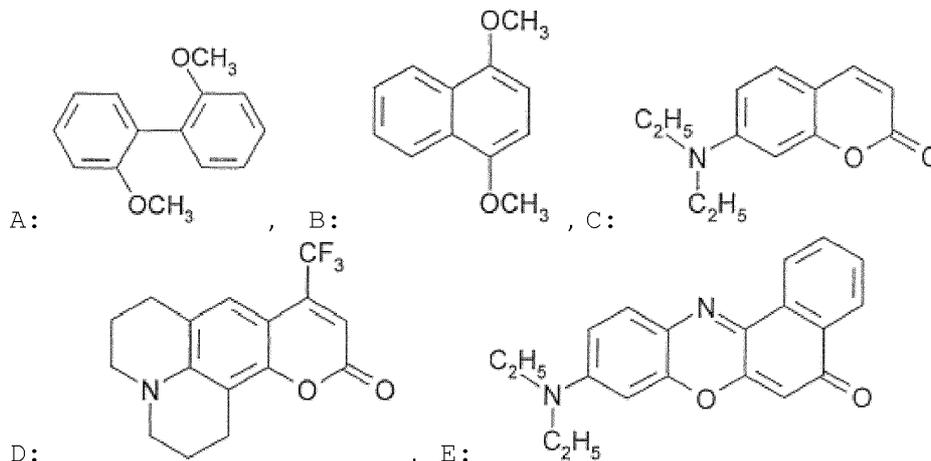
la figura 4: el desarrollo de espectros de emisión corregidos (certificados) y medidos de los patrones de colorante A a E, así como de las funciones correctoras parciales y de la función correctora total;

la figura 5: la aplicación de la función correctora total en un espectro de fluorescencia de sulfato de quinina y

la figura 6: la aplicación de la función correctora total en un espectro de fluorescencia de DCM.

35

Para la calibración del canal de emisión de un sistema de medición de luminiscencia, en este caso, de un espectrómetro de fluorescencia (fluorímetro), se usa de acuerdo con el presente ejemplo un juego de cinco patrones de fluorescencia (patrones de emisión) A, B, C, D y E, siendo A un derivado de bifenilo, B un derivado de naftaleno, C y D en cada caso, un derivado de cumarina y E un derivado de oxazina. En el ejemplo concreto se trata de los siguientes colorantes:



5 Todos los colorantes presentan una pureza por encima del 99 %, son estables a largo plazo en particular, como sólido en el almacenamiento en oscuridad a 4 °C en presencia de oxígeno del aire. Las soluciones saturadas de aire son estables a largo plazo de manera suficiente en el almacenamiento en oscuridad a 4 °C y no forman fotoproductos en las condiciones de medición y excitación típicas para mediciones de fotoluminiscencia, que absorban o emitan en la región espectral usada para la calibración. La figura 1 muestra los espectros de emisión espectralmente corregidos y normalizados de los patrones de emisión A a E (anteriormente), así como los espectros de excitación corregidos y normalizados de los cinco patrones de excitación AX a EX. Es distinguible que todos los espectros de patrón presentan un desarrollo de banda ancho y no estructurado con sólo en cada caso un máximo y ningún hombro o discontinuidad en la región espectral usada para la calibración. Además, en la elección de los colorantes de fluorescencia se dio importancia a distancias de longitudes de onda, a ser posible grandes entre los máximos de los espectros de emisión (Em) y aquellos de los espectros de absorción correspondientes (Abs) (desplazamiento de Stokes), para evitar la absorción reiterada de fotones emitidos una vez debido al solapamiento de bandas de Em-Abs. En particular, asciende esta distancia a aprox. 5400, 4900, 4300, 4900 y 2400 cm^{-1} para los colorantes A, B, C, D o bien E. Los colorantes presentan además una baja anisotropía con $r = 0,05$ (región espectral UV/vis con A 700 nm), así como una dependencia de la temperatura suficientemente baja de la forma de las bandas de fluorescencia en el intervalo de temperatura entre 20 °C y 30 °C.

10 En el ejemplo de los espectros de emisión corregidos y normalizados de los patrones de fluorescencia C y D muestra la figura 2 otras propiedades esenciales de los colorantes seleccionados. En primer lugar, es distinguible que la intensidad $I(\lambda_{C/D})$ de ambos espectros $I_C(\lambda)$ e $I_D(\lambda)$ en su punto de solapamiento $\lambda_{C/D}$ sea mayor que el 20 % de la respectiva intensidad $I_C(\lambda_{\text{max}})$ e $I_D(\lambda_{\text{max}})$ (normalizada) máxima. Esta condición se cumple también para todas las otras longitudes de onda de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$. En el presente ejemplo de los compuestos A a E se cumple para todos los puntos de solapamiento incluso una intensidad de al menos el 40 % de las intensidades máximas. Para el colorante D se ha indicado además la semianchura FWHM_D , que de acuerdo con la invención para todos los colorantes al menos en la región UV/vis es mayor de 1400 cm^{-1} . En cuestión, las semianchuras de los espectros de emisión de los compuestos A a E ascienden a aproximadamente 4250, 4400, 2850, 2890 o bien 1630 cm^{-1} .

15 La región espectral de las combinaciones de patrones presentadas puede extenderse mediante la integración de otros colorantes tal como, por ejemplo, de los compuestos de merocianina y estirilo mencionados de acuerdo con las estructuras generales 6, 7 y 8 descritas anteriormente en la región espectral NIR. En este caso se aplican criterios análogos de selección y requerimiento, requiriéndose en la región con $\lambda > 700 \text{ nm}$ únicamente una intensidad mínima en los puntos de solapamiento de en particular al menos el 12 % de la intensidad máxima, una semianchura de en particular al menos 1200 cm^{-1} , así como una anisotropía de en particular $r \leq 0,07$.

20 El desarrollo del procedimiento de calibración está representado en la figura 3 en unión con la figura 4. Empezando en la etapa S1 de acuerdo con la figura 3 se realiza, en primer lugar, el registro de los espectros de emisión brutos $J_i^R(\lambda)$ de los cinco (o más) patrones de fluorescencia A a E mencionados anteriormente, contenidos en el kit con el sistema de medición que va a calibrarse. Las condiciones de medición en el aparato de medición de fotoluminiscencia – tal como anchuras de ranura, tensiones del detector, modo y velocidad de barrido, filtros, polarizadores y ángulo del polarizador etc. – se ajustan a los parámetros, entre los que se registran habitualmente espectros de fluorescencia o bien se requieren para los espectros de luminiscencia espectralmente corregidos. En las condiciones de cada medición de colorante se mide también en cada caso un espectro de valor en blanco $J_i^B(\lambda)$ del disolvente usado.

25 El siguiente cálculo fácil de una función correctora total para el fluorímetro se realiza mediante un algoritmo de programa que realiza las siguientes etapas. En la siguiente etapa S2 se leen los espectros brutos medidos $J_i^R(\lambda)$ y los espectros de valor en blanco $J_i^B(\lambda)$ por el programa. El programa calcula al menos 2 o más espectros de fluorescencia medidos de colorantes espectralmente sucesivos y de los correspondientes espectros de valor en blanco en formato ASCII-DAT o CSV. Se fomentan incrementos espectrales $\Delta\lambda(J_i)$ de los puntos de medición entre 0,1 y 10 nm, prefiriéndose incrementos entre 0,5 y 2,0 nm.

30 En la etapa S3 se analizan los espectros leídos mediante distintas subrutinas. Éstas comprenden, por ejemplo, una comprobación de los espectros en cuanto a su compatibilidad de formato y, dado el caso, su conversión en un formato legible por el programa, su clasificación en cuanto al intervalo de longitud de onda y pertenencia al grupo de colorantes o bien al grupo de valor en blanco. Además, en esta etapa se cortan todas las regiones espectrales por debajo de un umbral de intensidad del 5 % con respecto a la correspondiente intensidad máxima. Otra rutina asigna los espectros medidos $J_i(\lambda)$ a los correspondientes espectros certificados $I_i(\lambda)$.

35 En la etapa S4 se realiza la corrección de valor en blanco, substrayéndose los espectros de disolvente $J_i^B(\lambda)$ de los respectivos espectros medidos $J_i^R(\lambda)$, obteniéndose los espectros medidos $J_i(\lambda)$ corregidos con respecto al valor en blanco. La corrección del valor en blanco se realiza sólo cuando la rutina determina una coincidencia de todos los límites espectrales (λ_{inicio} y λ_{final}) de los espectros de colorante $J_i^R(\lambda)$ con aquellos de los espectros de valor en blanco $J_i^B(\lambda)$. En caso contrario, el programa parte de que la corrección de valor en blanco se realizó ya por el usuario y emite una indicación correspondiente en el archivo de Log.

40 A continuación, se leen en la etapa S5 los espectros espectralmente corregidos y certificados $I_i(\sim)$ para los cinco patrones de fluorescencia junto con sus incertidumbres combinadas de un archivo binario. Los espectros $I_i(\lambda)$ se midieron con un espectrómetro de fluorescencia calibrado de manera trazable con seguridad de medición conocida, se

5 corrigieron con respecto al valor en blanco y espectralmente y son, con ello, independientes del aparato y trazables con respecto a la normal primaria radiométrica “radiador negro” o “criorradiómetro”. Dado que para todas las etapas individuales en la obtención de las curvas de fluorescencia y para todos los certificados usados se dispusieron balances de fallo, puede indicarse para los patrones de fluorescencia una incertidumbre dependiente de la longitud de onda combinada de las intensidades medidas.

10 En la etapa S6 se adapta – siempre que sea necesario – el incremento de barrido $\Delta\lambda_i$ de los espectros certificados $I_i(\lambda)$ al incremento de barrido $\Delta\lambda_j$ de los espectros medidos $J_i(\lambda)$. Para ello, se realiza usando una función polinómica de tercer grado (spline) una interpolación de los valores intermedios $I_i(\lambda_k)$ que faltan entre en cada caso ocho puntos de datos (k-3... k... k+4) existentes sucesivos de los patrones de fluorescencia en la distancia $\Delta\lambda_i$ (más pequeña). La ventana spline se mueve sucesivamente por todos los puntos de cada espectro $I_i(\lambda)$. Como resultado, se encuentran los espectros certificados $I_i(\lambda)$ y los espectros corregidos con respecto al valor en blanco $J_i(\lambda)$ en la misma base $\Delta\lambda$.

La figura 4 muestra en la parte inferior las curvas obtenidas en una calibración en el fluorímetro Perkin-Elmer LS 50 B de los espectros de emisión corregidos con respecto al valor en blanco $J_i(\lambda)$ (líneas discontinuas), así como las de los espectros de emisión certificados, normalizados en intensidad $I_i(\lambda)$ (líneas continuas).

15 A continuación, se realiza en la etapa S7 de acuerdo con la figura 3 un análisis limitado a la zona de los máximos de las relaciones de señal/ruido S/N de los espectros medidos $J_i(\lambda)$. La calidad de datos estadística desempeña un papel en tanto que el ruido de fondo de las curvas medidas se transmite directamente a la función correctora espectral que va a crearse y, por consiguiente, se incorpora también con la corrección espectral en cada espectro medido. Para todos los espectros medidos $J_i(\lambda)$ se estiman en la región de sus máximos (intensidad de flancos del 97...100...97 %) parámetros para ecuaciones polinómicas hasta como máximo de 9º grado mediante resolución de las matrices. Para cada colorante i se acepta el polinomio con la más baja desviación de los datos de medición (suma de error cuadrático) como la “curva verdadera libre de ruidos” en la que se basa el espectro. La desviación estándar recíproca de los puntos de medición de las mejores curvas polinómicas en cada caso se considera como medida de ruido en la zona alrededor del respectivo máximo de banda. Si éste se encuentra por del valor empíricamente acordado de, por ejemplo 1000, entonces se anota en el archivo de Log una recomendación, tal como debía repetir con frecuencia el usuario la medición del respectivo cromóforo para llegar a una función correctora total con dispersión suficientemente baja.

20 A continuación, el programa pasa a la etapa S8, donde se realiza una determinación de los puntos de solapamiento (longitudes de onda de solapamiento exactas) $\lambda_{i/i+1}$ de en cada caso dos espectros de emisión espectralmente sucesivos (véase la figura 2). El punto de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$ (o bien $\lambda_{i/i+1}^j$) de dos espectros es aquella longitud de onda en la que se aproxima más la intensidad del espectro precedente normalizado (decreciente) al espectro siguiente normalizado (creciente), es decir, donde las curvas se cruzan entre sí. El punto de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$ (por ejemplo $\lambda_{A/B}$) se determina para, en cada caso, pares de espectros que solapan uno en otro tanto para los espectros medidos $J_i(\lambda)/J_{i+1}(\lambda)$: $\lambda_{i/i+1}^j$ (por ejemplo $J_A(\lambda)$, $J_B(\lambda)$) como también los espectros certificados correspondientes $I_i(\lambda)/I_{i+1}(\lambda)$: $\lambda_{i/i+1}$ (por ejemplo $I_A(\lambda)$, $I_B(\lambda)$) y se promedia. El punto de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$ de los dos pares resulta como valor de longitud de onda próximo redondeado, probado en todos los cuatro espectros adyacentes con respecto al promedio de los dos valores promedio del par $\lambda_{i/i+1}^j$ y $\lambda_{i/i+1}$.

25 Entonces se determinan en la etapa S9 factores de enlace α_i para cada colorante i mediante promediación estadística de regiones espectrales que solapan una en otra en la región $\pm\Delta\lambda$ alrededor de la respectiva longitud de onda de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$ de todos los cuatro espectros adyacentes $I_i(\lambda)$, $I_{i+1}(\lambda)$, $J_i(\lambda)$ y $J_{i+1}(\lambda)$ de acuerdo con las ecuaciones 1 a 3. En esta etapa se realiza de manera implícita el cálculo de las funciones correctoras parciales $F_i(\lambda)$ de acuerdo con la ecuación 2 mediante formación de cociente de los espectros corregidos $I_i(\lambda)$ y de los correspondientes espectros medidos $J_i(\lambda)$ para los patrones de fluorescencia individuales i. Los desarrollos de los espectros correctores parciales (no ponderados) $F_A(\lambda)$ a $F_E(\lambda)$ para los patrones A a E se han representado en la parte superior de la figura 4.

$$\alpha_{i+1} = \frac{\sum_{\lambda} \left[\frac{F_i(\lambda)}{F_{i+1}(\lambda)} / \sigma_{i/i+1}^2(\lambda) \right]}{\sum_{\lambda} 1 / \sigma_{i/i+1}^2(\lambda)} \quad (1)$$

$$F_i(\lambda) = \frac{I_i(\lambda)}{J_i(\lambda)} \quad (2)$$

$$\sigma_{i/i+1}^2(\lambda) = \left[\frac{1}{J_i(\lambda)} + \frac{1}{J_{i+1}(\lambda)} \right] \cdot \left[\frac{F_i(\lambda)}{F_{i+1}(\lambda)} \right]^2 \quad (3)$$

Para el primer factor de enlace se aplica $\alpha_i \equiv 1$. A este respecto se determina el sumando en la ecuación 1 para el factor de enlace α_{i+1} sólo en cada caso a través de una región de solapamiento espectral optimizada predeterminada $\pm\Delta\lambda_{oi}$.

alrededor de la respectiva longitud de onda de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$. En el presente ejemplo se realiza la promediación estadística para el cálculo de α_{i+1} de acuerdo con la ecuación 1 por una región de ± 8 nm que sigue en ambos lados a las respectivas longitudes de onda de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$. Cuando, por ejemplo, el punto de solapamiento $\lambda_{A/B}$ se encuentra en 350 nm, se determina α_B mediante promediación estadística de las funciones correctoras parciales $F_A(\lambda)$ y $F_B(\lambda)$ por la región de 350 ± 8 nm.

En la etapa S10 se determinan factores de conexión β_i para cada patrón de fluorescencia i de acuerdo con la ecuación 4 mediante multiplicación de todos los factores de enlace espectralmente anteriores α_i . A partir de $\alpha_i \equiv 1$ sigue $\beta_i = 1$.

$$\beta_i = \prod_{k=1}^i \alpha_k \quad (4)$$

Finalmente, se realiza en las etapas S11 a S13 el cálculo de la función correctora total $F(\lambda)$. Aunque estas etapas de acuerdo con el algoritmo de programa usado no representan etapas separadas una de otra (sino una única etapa de cálculo que existe en la suma según la ecuación 5), están representadas S11 a S13 en la figura 3 para un mejor entendimiento como etapas separadas. Según esto, se determinan en la etapa S11, en primer lugar, los valores de la función $F(\lambda)$ en una zona de enlace predeterminable $A_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$ alrededor de los respectivos puntos de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$ de acuerdo con las ecuaciones 5 y 6. En la zona de enlace $\lambda_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$ se realiza por consiguiente una promediación estadística de las funciones correctoras parciales $F_i(A)$ que solapan en cada caso uno en otro, ponderadas mediante β_i . En el presente ejemplo se aplica, de acuerdo con un modo de realización preajustado del programa, la ecuación 5 en cada caso sólo de manera exacta para las longitudes de onda de solapamiento $A_{i/i+1}$ determinadas en S8, es decir, $\Delta\lambda_{LK} = 0$.

$$F(\lambda) = \frac{\sum_{i=1}^N \beta_i \cdot F_i(\lambda) / \sigma^2(\lambda)}{\sum_{i=1}^N 1 / \sigma^2(\lambda)} \quad (5)$$

con

$$\sigma^2(\lambda) = \frac{[\beta_i F_i(\lambda)]^2}{J_i(\lambda)} \quad (6)$$

Todos los otros puntos de la función correctora $F(A)$, es decir, en las regiones $\lambda \neq A_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$, no se promedian tras la etapa S12 de acuerdo con el modo de realización preajustado del programa, sino que se calcula fácilmente según la ecuación 7. (Esto es sinónimo de una suma según la ecuación 5 a través de sólo un i .) Con otras palabras, la función correctora total $F(A)$ fuera de las regiones de enlace $A_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$, en particular, para todas las longitudes de onda fuera de los puntos de solapamiento $\lambda_{i/i+1}$, corresponde a las funciones correctoras parciales $F_i(A)$, ponderadas con los factores β_i determinados para éstas.

$$F(\lambda) = \beta_i \cdot F_i(\lambda) \quad (7)$$

Con la entrada de correspondientes variables de control por el usuario puede ensancharse la zona de acción de las ecuaciones 5 y 6 en el programa opcionalmente también a regiones de enlace espectrales $\lambda_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$ más anchas alrededor de las longitudes de onda de corte. Que esto sea, sin embargo, con frecuencia no ventajoso puede deducirse del conjunto de datos de ejemplo en la figura 4 (arriba), donde las funciones correctoras parciales $F_C(\lambda)$ y $F_D(\lambda)$ en cada caso, en sus inicios y el cociente parcial $F_E(\lambda)$ en el final muestran claras desviaciones del comportamiento empinado de las curvas en su otro desarrollo. Para la función correctora de emisión $F(\lambda)$ representada igualmente arriba en la figura 4 se usó, por lo tanto, el programa en modo predeterminado, es decir, únicamente las partes que aparecen sombreadas de los cocientes individuales $F_i(\lambda)$ entre las longitudes de onda de corte $A_{i/i+1}$ se calcularon con los factores de conexión β_i de acuerdo con la ecuación 7 y en los sitios de corte $A_{i/i+1}$ se promedió entre los dos cocientes parciales colindantes de acuerdo con la ecuación 5 y así se obtuvo la función correctora total $F(\lambda)$ (línea negra). Ésta presenta de manera distinguible un desarrollo continuo liso. Debido a ($\alpha_i = 1$ y $\beta_i = 1$) corresponde $F(\lambda)$ hasta el primer punto de solapamiento $\lambda_{A/B}$ a la función correctora parcial $F_A(\lambda)$ ponderada con β_A .

En la etapa S13 se entregan los valores de la función correctora total $F(\lambda)$ interconectada como tabla ASCII en el archivo "CorrF.TXT" y se documentan en un archivo de Log "LINKLOG#.TXT" todas las acciones, así como mensajes de error del programa.

Todos los espectros medidos en un espectrómetro de luminiscencia calibrado de esta manera y con los ajustes de calibración se corrigen espectralmente – tras la sustracción de correspondientes espectros de valor en blanco –

mediante multiplicación sencilla con la función correctora $F(\lambda)$. Los valores del espectro medido y de la función correctora espectral $F(\lambda)$ deben multiplicarse sólo entre sí, cuando están asignados a la misma longitud de onda, es decir, a la misma base $\Delta\lambda$. Se obtienen de esta manera espectros de luminiscencia trazables, corregidos espectralmente en unidades de intensidad relativas.

- 5 El ejemplo descrito previamente se refiere a la creación de una función correctora total para la emisión usando patrones de emisión. Si se mide un juego de patrones de excitación en un espectrómetro de luminiscencia de la misma manera y se calculan los espectros de excitación obtenidos con un juego de datos para los espectros de excitación (certificados) espectralmente corregidos de los patrones de fluorescencia de manera correspondiente al desarrollo del programa en la figura 3, entonces se obtiene una función correctora de excitación espectral.
- 10 La figura 5 muestra en el ejemplo de la fluorescencia de sulfato de quinina la aplicación de la función correctora total $F(\lambda)$ obtenida de acuerdo con las figuras 3 y 4. La curva continua muestra el espectro de emisión $J(A)$ corregido con respecto al valor en blanco, espectralmente no corregido medido en un fluorímetro (SPEX Fluorolog) con una longitud de onda de excitación de 348 nm. Tras la multiplicación con la función correctora de emisión $F(A)$ obtenida para el fluorímetro mediante aplicación del kit de patrones de fluorescencia de acuerdo con la invención se obtuvo el espectro de emisión espectralmente corregido (curva punteada). A diferencia del espectro espectralmente no corregido, se encuentra éste en todas las regiones dentro de los límites de error predeterminados por NIST (triángulos grises).
- 15 En la figura 6 se vuelve evidente qué influencia puede tener la corrección espectral sobre la posición espectral del máximo de fluorescencia. El espectro de emisión en bruto $J(A)$ de DCM en acetonitrilo se registró en un fluorímetro LS 50 B de la empresa Perkin Elmer. Mediante la corrección de emisión espectral (multiplicación del espectro bruto medido $J(A)$ con la función correctora de emisión $F(A)$ se obtiene el espectro desplazado en 11 nm de manera batocrómica, espectralmente corregido (curva punteada). Éste se desvía sólo de manera insignificante del espectro que se midió con el fluorímetro SLM 8100 y se corrigió espectralmente con una función correctora de emisión $F(\lambda)_{tr}$ creada por medio de la normal de transferencia de intensidad específica de radiación (curva gris).

20

Lista de números de referencia/abreviaturas

- 25 i n.º correlativo de un patrón de fluorescencia en el kit con $1 \leq i \leq N$
- $I_i(\lambda)$ espectro de fluorescencia espectralmente corregido (certificado) del patrón de fluorescencia i
- $J_i(\lambda)$ espectro de fluorescencia medido, corregido con respecto al valor en blanco
- $F_i(\lambda)$ función correctora parcial del patrón de fluorescencia i
- $F(A)$ función correctora total
- 30 $\lambda_{i/i+1}$ longitudes de onda de solapamiento de espectros sucesivos del patrón i -ésimo y $(i+1)$ -ésimo
- α_i factor de enlace de funciones correctoras parciales adyacentes
- β_i factor de conexión
- $\lambda_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{OL}$ región de solapamiento espectral alrededor de las longitudes de onda de solapamiento
- $A_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{LK}$ región de enlace espectral alrededor de las longitudes de onda de solapamiento

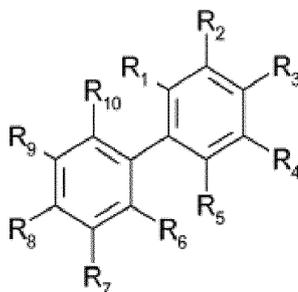
35

REIVINDICACIONES

1. Kit para la calibración trazable de un sistema de medición de fotoluminiscencia, que comprende:

a) al menos en cada caso uno de los siguientes patrones de fluorescencia (i)

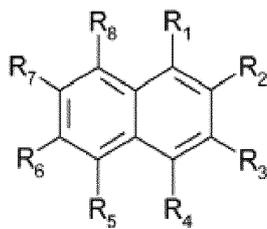
- un derivado de bifenilo según la fórmula general (1)



(1),

en la que R₁ y R₆ en cada caso significan un resto alcoxi y los demás restos independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o alquilo, en la que los restos alcoxi y alquilo independientemente entre sí son cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados;

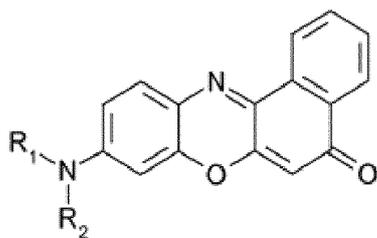
- un derivado de naftaleno según la fórmula general (2)



(2),

en la que los restos R₁ a R₈ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o alcoxi o parcialmente en combinación entre sí, un anillo condensado, saturado, hetero- o homonuclear;

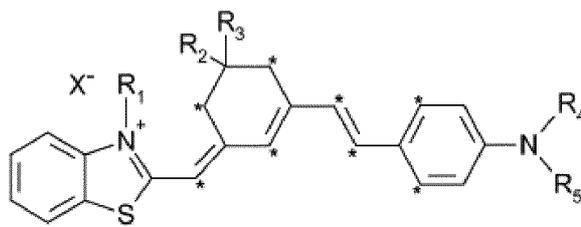
- un derivado de 3H-fenoxazin-5-ona según la fórmula general (5)



(5),

en la que los restos R₁ y R₂ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido;

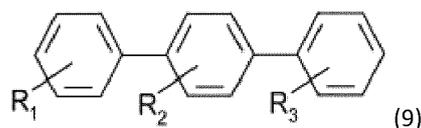
- un derivado de hemicianina según la fórmula general (8)



(8),

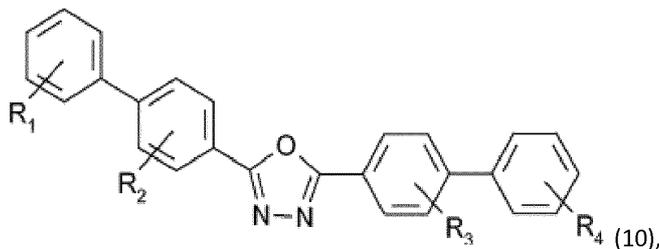
en la que los restos R₁ a R₅ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido y X⁻ significa un anión discrecional y los átomos de C caracterizados con una estrella independientemente entre sí, pueden estar puenteados entre sí a través de un puente C2 o C3 saturado;

- un p-terfenilo según la fórmula general (9)



en la que R_1 a R_3 independientemente entre sí significan hidrógeno o un resto alquilo o alcoxi, en particular, hidrógeno;

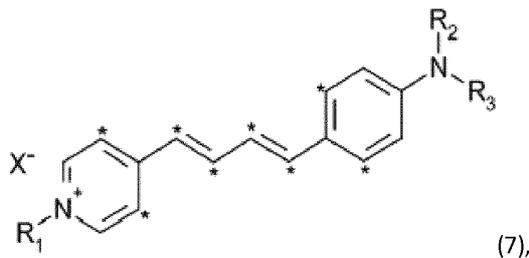
- un derivado de 1,3,4-oxadiazol según la fórmula general (10)



5

en la que R_1 a R_4 independientemente entre sí significan hidrógeno o un resto alquilo o alcoxi, en particular, hidrógeno; y

- un derivado de hemicianina según la fórmula general (7)



10

en la que R_1 a R_3 independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o sustituido, X^- significa un anión discrecional y los átomos de C caracterizados con una estrella independientemente entre sí pueden estar puenteados entre sí a través de un puente C2 o C3 saturado; y

15

(b) espectros de fluorescencia corregidos ($I_i(\lambda)$) de los patrones de fluorescencia (i) en forma legible por ordenador y/o una indicación de una página de internet, en la que están disponibles los espectros de fluorescencia corregidos ($I_i(\lambda)$),

20

en el que los patrones de fluorescencia (i) se seleccionan de manera que sus espectros de fluorescencia corregidos espectralmente ($I_i(\lambda)$) cubren juntos una región espectral predeterminada, de manera que en la región espectral UV/vis con bandas de fluorescencia de $\lambda \leq 700$ nm de los espectros de fluorescencia ($I_i(\lambda)$) corregidos, en cada caso sucesivos espectralmente, presentan en sus longitudes de onda de solapamiento ($\lambda_{i/(i+1)}$) una intensidad mínima predeterminada al menos del 20 % de la respectiva intensidad de banda máxima, sus bandas de fluorescencia presentan en cada caso una semianchura (FWHM) al menos de 1400 cm^{-1} así como un desarrollo de banda no estructurado, libre de hombro con, en cada caso, sólo un máximo en la región espectral relevante con una resolución espectral de 1 nm.

25

2. Kit según la reivindicación 1,

en el que en la fórmula general (1) R_1 y R_6 en cada caso significan un resto metoxi y los demás restos en cada caso significan un resto hidrógeno.

30

3. Kit según una de las reivindicaciones anteriores,

en el que en la fórmula general (2) al menos uno de los dos anillos de naftaleno está sustituido con dos restos alcoxi en una posición de simetría especular y los demás restos, en cada caso, son hidrógeno, en el que los restos alcoxi son acíclicos, ramificados o no ramificados y no presentan restos hidrógeno en posición β con respecto al átomo de oxígeno de éter.

35

4. Kit según una de las reivindicaciones anteriores,

en el que en la fórmula general (2) R_1 y R_4 independientemente entre sí son un resto metoxi o neopentiloxi y los demás restos en cada caso son restos hidrógeno.

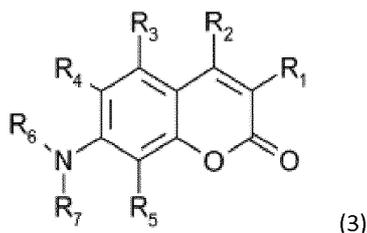
5. Kit según una de las reivindicaciones anteriores,

en el que en la fórmula general (5) R_1 y R_2 en cada caso significan un resto alquilo no sustituido, no ramificado, en particular, en cada caso un resto etilo.

6. Kit según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en la fórmula general (7) R₁ es un resto etilo, R₂ y R₃ en cada caso, son un resto metilo y X⁻ es un anión perclorato y no está presente ningún puente C2 o C3.

5 7. Kit según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en la fórmula general (8) R₁ a R₅ en cada caso son un grupo metilo, X⁻ es un anión perclorato y no está presente ningún puente C2 o C3.

8. Kit según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene además como un patrón de fluorescencia (i) un derivado de cumarina según la fórmula general (3)



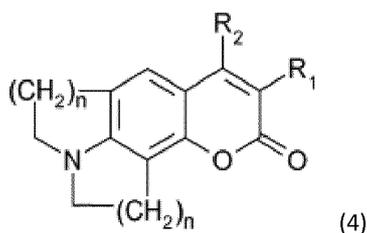
10 en la que los restos R₁ a R₇ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o parcialmente en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, homonuclear.

9. Kit según la reivindicación 8, en el que en la fórmula general (3) R₁ y R₂ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o un anillo condensado, saturado, homonuclear, R₃ a R₅ en cada caso significan un resto hidrógeno y R₆ y R₇ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o alquilo.

15

10. Kit según la reivindicación 8 o 9, en el que en la fórmula general (3) R₁ a R₅ en cada caso son un resto hidrógeno y R₆ y R₇ en cada caso son un grupo etilo.

20 11. Kit según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene, además, como un patrón de fluorescencia (i) un derivado de cumarina según la fórmula general (4)

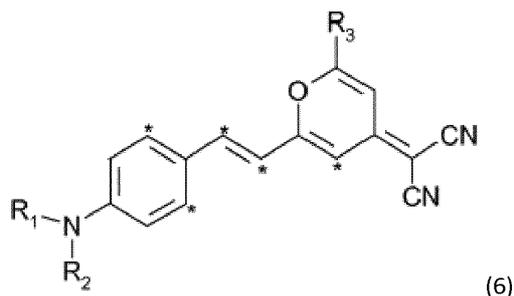


en la que los restos R₁ y R₂ independientemente entre sí significan un resto hidrógeno o un resto alquilo no sustituido o sustituido o en combinación entre sí un anillo condensado, saturado, homonuclear y n es igual a 1 o 2.

25 12. Kit según la reivindicación 11, en el que en la fórmula general (4) R₁ significa un resto hidrógeno y R₂ significa un resto alquilo no sustituido o sustituido y n es en cada caso igual a 1 o 2.

13. Kit según la reivindicación 11 o 12, en el que en la fórmula general (4) R₁ es un resto hidrógeno y R₂ es un resto trifluorometilo y n es en cada caso igual a 2.

30 14. Kit según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene además como un patrón de fluorescencia (i) un derivado de estililo según la fórmula general (6)



en la que R_1 , R_2 y R_3 independientemente entre sí, significan un resto hidrógeno o un resto n- o iso-alquilo no sustituido o o sustituido y los átomos de C caracterizados con una estrella independientemente entre sí pueden estar puenteados entre sí a través de un puente C2 o C3 saturado.

- 5 15. Kit según la reivindicación 14, en el que en la fórmula general (6) R_1 a R_3 en cada caso es un resto metilo y no está presente ningún puente C2 o C3.
16. Kit según una de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el kit comprende al menos en cada caso un patrón de emisión de fluorescencia (i) según las fórmulas generales (1) a (5).
- 10 17. Kit según una de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el kit comprende en cada caso un patrón de emisión de fluorescencia (i) según las fórmulas generales (1) a (5), así como al menos otro patrón de emisión de fluorescencia (i) seleccionado de las fórmulas generales (6), (7) y (8).
- 15 18. Kit según una de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el kit comprende al menos en cada caso un patrón de excitación de fluorescencia (i) según las fórmulas generales (3), (4), (5), (9) y (10).
19. Uso de un kit según una de las reivindicaciones anteriores para la calibración de un sistema de medición de luminiscencia, en particular, de un sistema de medición de fluorescencia, realizándose al menos una de las siguientes funciones:
- 20 (a) calibración espectral del sistema de medición de luminiscencia,
 (b) determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia relativos en la zona espectral UV/vis/NIR y
 (c) determinación de la zona de linealidad de un sistema de detección del sistema de medición de luminiscencia.
20. Procedimiento para la calibración trazable de un sistema de medición de fotoluminiscencia, que comprende:
- (A) facilitar un kit según una de las reivindicaciones 1 a 18;
- 25 (B) medir espectros de fluorescencia ($J_i(\lambda)$) de una multiplicidad de patrones de fluorescencia (i) del kit con el sistema de medición de fotoluminiscencia que va a calibrarse;
- (C) calcular factores de enlace (α_i) mediante promediación estadística de funciones correctoras parciales solapantes, sucesivas ($F_i(\lambda)$), que se forman por la formación de cociente de los espectros de fluorescencia medidos ($J_i(\lambda)$) y los correspondientes espectros de fluorescencia corregidos ($I_i(\lambda)$) de los patrones de fluorescencia (i), realizándose la promediación estadística a través de una región de solapamiento predeterminada, limitada ($\lambda_{i/i+1} \pm \Delta\lambda_{OL}$) alrededor de la longitud de onda de solapamiento recíproca ($\lambda_{i/i+1}$); y
- 30 (D) determinar una función de corrección total $F(\lambda)$ para la región espectral predeterminada mediante enlace estadístico de las funciones correctoras parciales ($F_i(\lambda)$) ponderadas dependiendo de los factores de enlace (α_i).

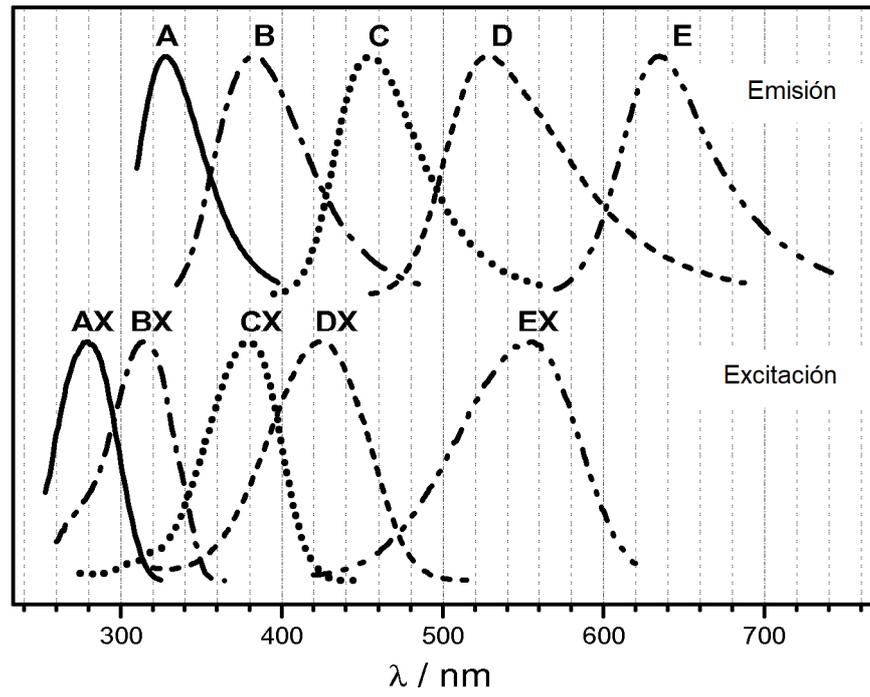


Fig. 1

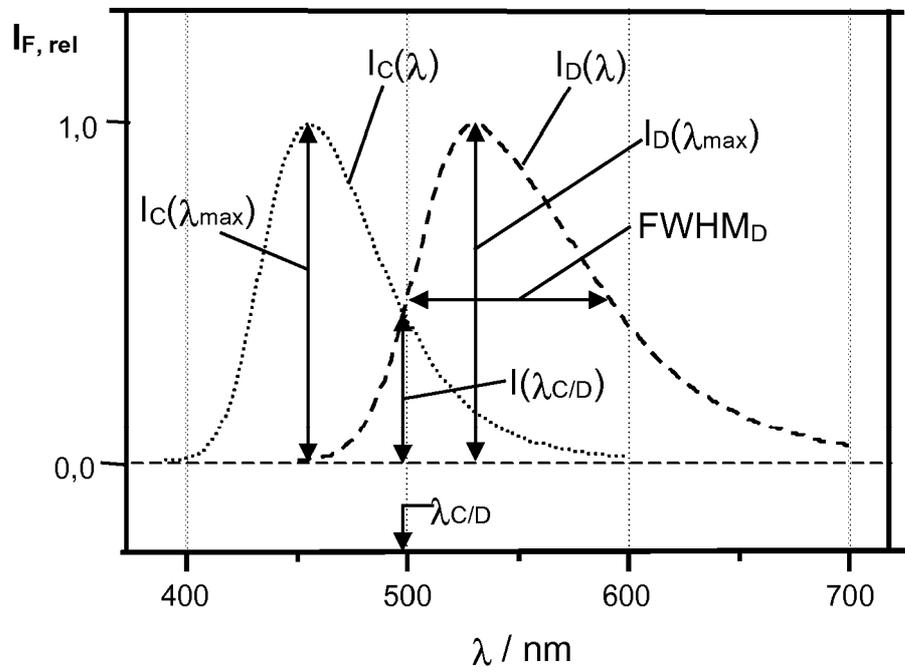


Fig. 2

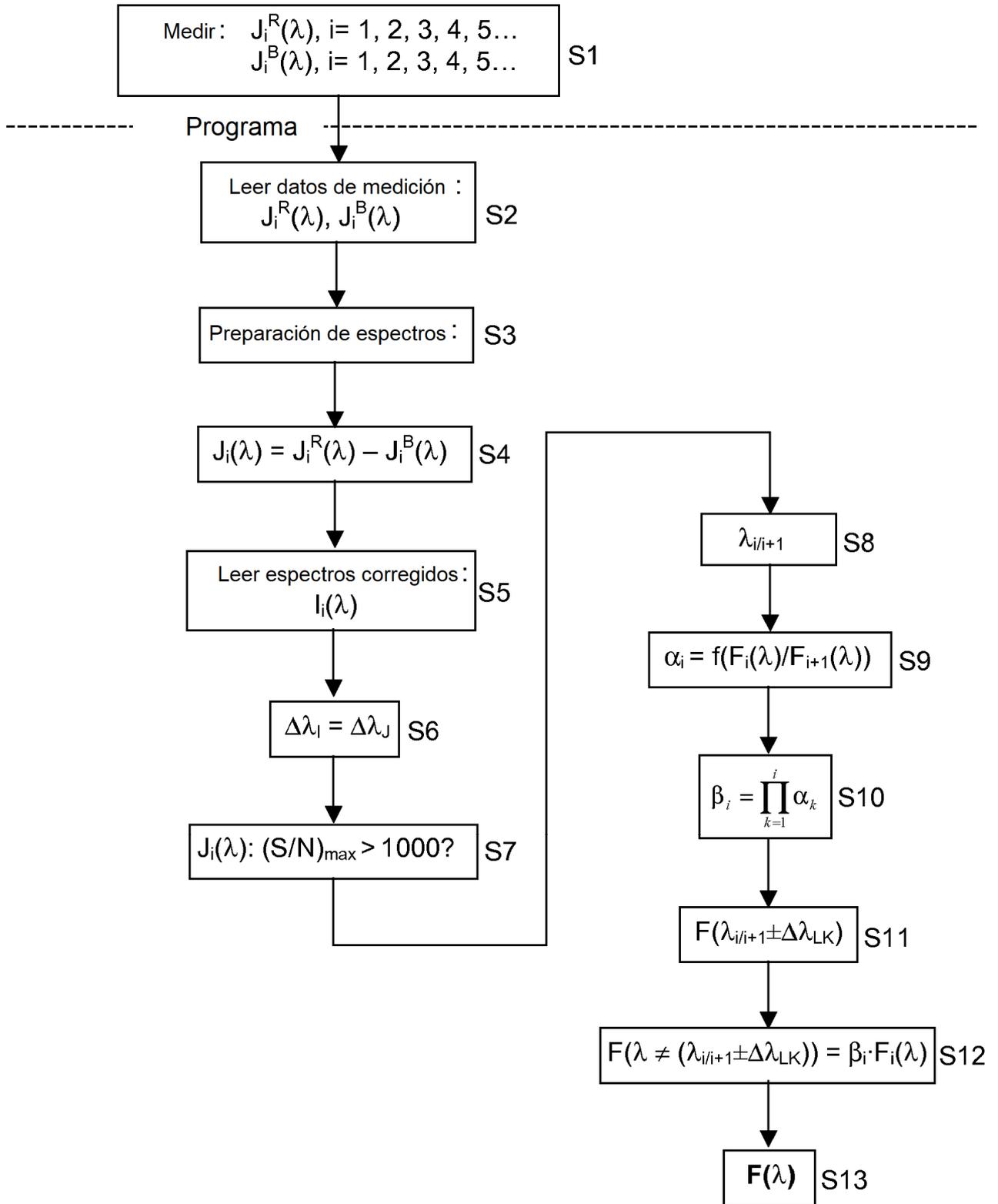


Fig. 3

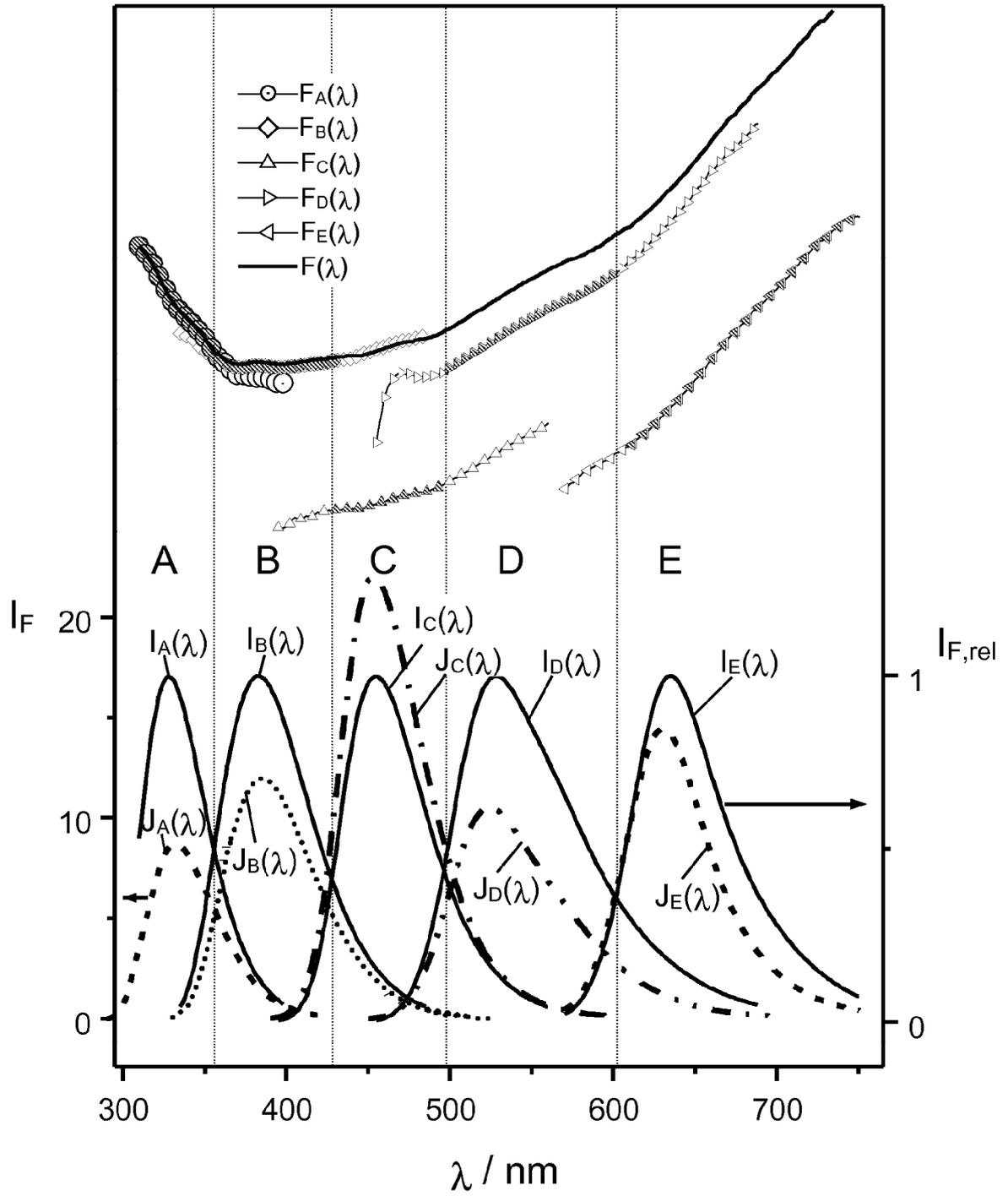


Fig. 4

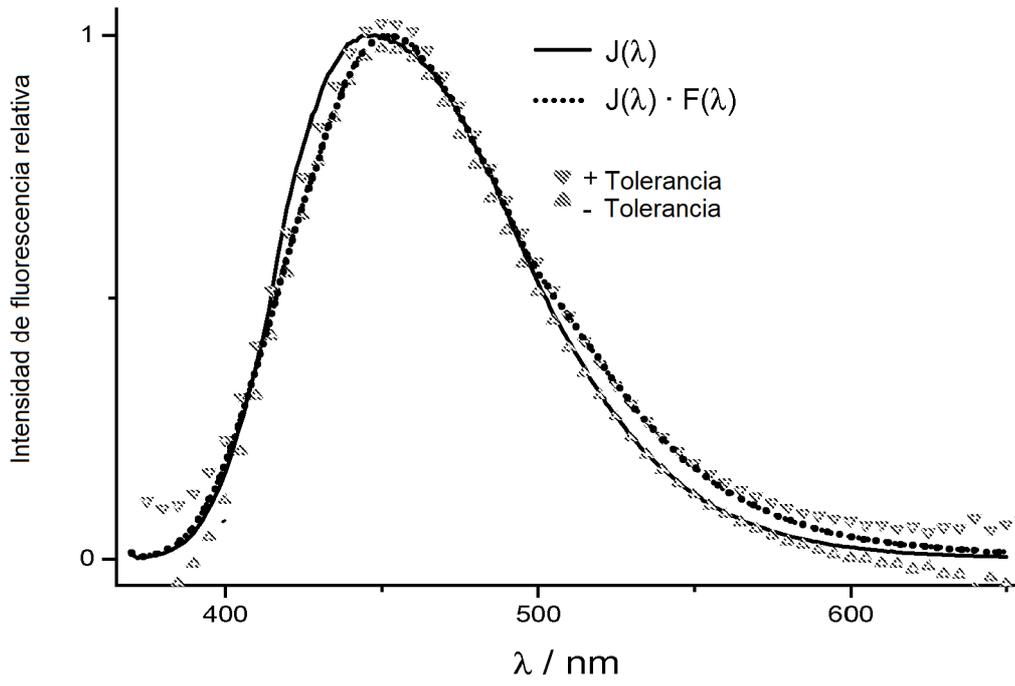


Fig. 5

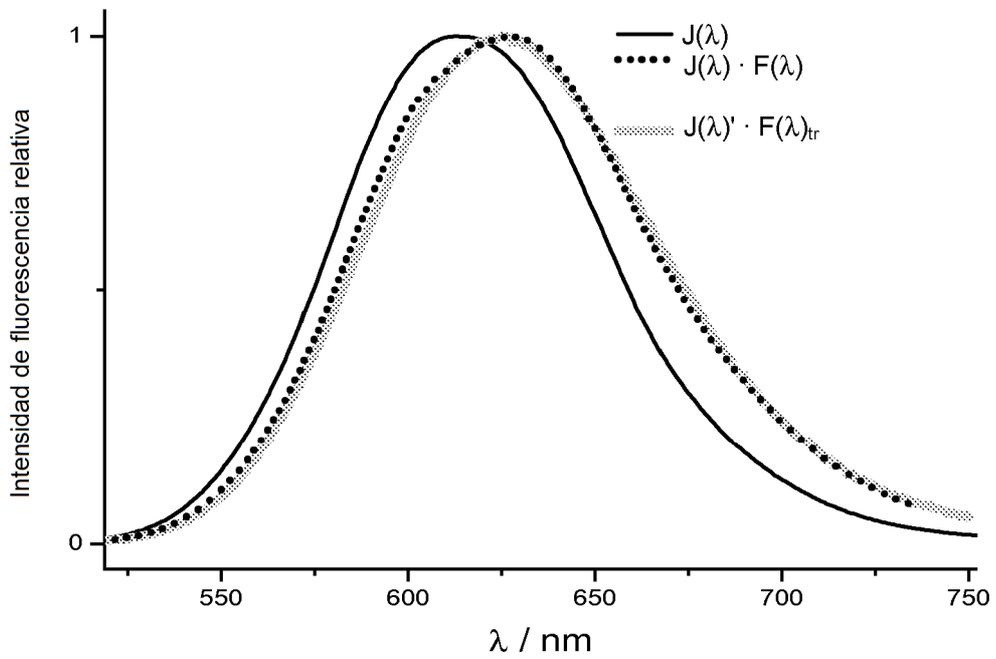


Fig. 6