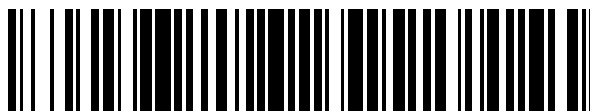


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 570**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2006 PCT/AT2006/000517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07068021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2006 E 06817490 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 1960760**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra así como uso de los mismos**

30 Prioridad:

**16.12.2005 AT 20142005**

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

**21.11.2018**

73 Titular/es:

**JOANNEUM RESEARCH  
FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH (100.0%)  
Leonhardstrasse 59  
8010 Graz, AT**

72 Inventor/es:

**BIZZARRI, ALESSANDRO;  
KONRAD, CHRISTIAN y  
RIBITSCH, VOLKER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 690 570 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra así como uso de los mismos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la fluorescencia de una muestra, irradiándose la muestra con una luz con una longitud de onda que es adecuada para la excitación de luz de fluorescencia en la muestra y recibándose la luz de fluorescencia emitida por la muestra en un receptor y transformándose en una señal de medición, suministrándose al receptor adicionalmente una luz de referencia en particular para la compensación de influencias del entorno y transformándose así mismo en una señal de medición  
10 de referencia. Además, la invención se refiere a un dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra, que comprende una fuente de luz para el envío de una luz con una longitud de onda que es adecuada para la excitación de luz de fluorescencia en la muestra y un receptor que recibe la luz de fluorescencia emitida por la muestra y transforma la misma en una señal de medición, pudiendo suministrarse al receptor adicionalmente una luz de referencia en particular para la compensación de influencias del entorno y pudiendo transformarse por el mismo  
15 en una señal de medición de referencia.

En el marco de la presente descripción se ha de entender por la expresión "una longitud de onda" también un intervalo de longitud de onda que se encuentra alrededor de una longitud de onda central y definida, en particular estrecho, tal como es el caso por ejemplo si se usa un diodo luminoso o LED.

20 Se pueden obtener tales procedimientos y dispositivos por ejemplo del documento DD-A 229 220, del documento US-A 5 196 709 o del documento DE-C 198 49 585.

Por el documento GB 1 596 522 así como por el documento US 4 099 872 A se ha dado a conocer en cada caso un procedimiento para la determinación de la fluorescencia de una muestra, irradiándose la muestra con una luz enviada por una fuente de luz con una longitud de onda que es adecuada para la excitación de luz de fluorescencia en la muestra y recibándose la luz de fluorescencia emitida por la muestra en un fotodetector, suministrándose al fotodetector adicionalmente una luz de referencia en particular para la compensación de influencias del entorno, separándose el recorrido óptico de la luz de excitación que entra en la muestra y la luz de fluorescencia que abandona la muestra del recorrido óptico de la luz de referencia entre la fuente de luz y el receptor por un divisor de haz o un sistema de espejos.

Se puede obtener del documento US 4 661 711 A un dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra, en el que la luz de referencia requerida para la determinación de la fluorescencia de la muestra se emite por un material fluorescente, que sirve de conductor de luz y como patrón de fluorescencia, y en el que la luz de excitación mediante un divisor de haz está separada en una luz de referencia y una luz de excitación.

La determinación de la fluorescencia de moléculas específicas se emplea cada vez más en aplicaciones de sensor para la determinación de diversos analitos. A este respecto, las moléculas mediante irradiación con luz con una longitud de onda específica se pasan a un estado excitado. La devolución de las moléculas al estado fundamental se produce mediante irradiación de luz, que presenta una mayor longitud de onda que la luz de excitación (desplazamiento de Stokes). Adicionalmente, esta división está desplazada en el tiempo. Se pueden obtener informaciones acerca de la muestra que se va a determinar mediante medición de la intensidad o el tiempo de extinción de la luz de fluorescencia. Las posibilidades de uso de este fenómeno radican en la analítica del entorno, en el diagnóstico médico, en la supervisión de numerosos procesos industriales y en un análisis en el laboratorio.

El método más sencillo para la determinación de las propiedades de analitos mediante mediciones de fluorescencia radica en la detección de la intensidad de la luz emitida por la molécula fluorescente. No obstante, para aplicaciones prácticas este método tiene algunas graves desventajas. Así, los lavados o un blanqueo del colorante fluorescente así como fluctuaciones de la fuente de luz y faltas de linealidad de los detectores ópticos tienen una influencia directa sobre el resultado de la medición. Mientras que los cambios que se refieren al colorante se pueden compensar solo mediante calibración con concentraciones definidas del analito específico, con respecto a la instrumentación se necesitan con frecuencia componentes ópticos o estabilizaciones de temperatura complejas para mantener tan pequeños como sea posible estos efectos.

Un método bastante más compacto lo proporciona la determinación del retardo en el tiempo con una constante temporal  $\tau$  dominante de la luz de fluorescencia irradiada, que se denomina también "tiempo de reducción", "*decay time*", o "*life time*". La determinación de la constante temporal se puede realizar mediante medición de la constante de extinción después de la excitación por impulsos (en el intervalo de tiempo) o mediante la medición del desplazamiento de fases con excitación sinusoidal (en el intervalo de frecuencias). Ya que la determinación de la constante temporal de extinción o del desplazamiento de fases en principio es independiente de la intensidad emitida y se limita prácticamente solo por la siguiente instrumentación, se pueden desprestigiar los efectos del colorante (por ejemplo, lavado, blanqueo). La determinación del desplazamiento de fases para la detección de cambios de colorantes selectivos se ha generalizado en implementaciones en la práctica a causa de la menor complejidad instrumental frente a una medición del tiempo de extinción.

En cualquier caso también con la determinación del desplazamiento de fases no por último a causa del empleo en los más diversos entornos es recomendable llevar a cabo una referenciación para compensar influencias de temperatura que afectan a los componentes ópticos activos así como a la electrónica de evaluación. La variante más sencilla para la realización de una referenciación que cumpla estos objetivos ha resultado ser una determinación de un desplazamiento de fases de circuito de medición sin el colorante selectivo. En este caso se conmuta periódicamente entre una fuente de luz de señal que determina el desplazamiento de fases causado por la muestra y una fuente de luz de referencia que determina el desplazamiento de fases de la instrumentación y se establece el desplazamiento de fases real mediante resta del desplazamiento de fases de referencia del desplazamiento de fases de señal.

Para aplicaciones en la técnica del proceso y en el diagnóstico médico la miniaturización, automatización y costes reducidos de tales sistemas de medición representan una condición para la aceptación por parte del usuario. Las disposiciones ópticas complejas, que están asociadas en particular a filtros ópticos caros, representan en este caso factores o desventajas esenciales.

Independientemente de los métodos de referenciación y las técnicas de estabilización, la relación de luz de fluorescencia a luz de excitación es pequeña y, por lo tanto, requiere diversos métodos ópticos (disposición óptica o filtros ópticos) para la separación de la luz de estas dos fuentes de luz.

La presente invención tiene como objetivo, partiendo de un procedimiento así como un dispositivo del tipo que se ha mencionado al principio, ofrecer disposiciones ópticas sencillas así como posibilidades para la referenciación y en particular, poniendo a disposición configuraciones constructivas, sencillas y por tanto económicas, posibilitar una evaluación precisa. Este objetivo se resuelve mediante el procedimiento según la reivindicación 1. Con el procedimiento de acuerdo con la invención se consigue por tanto una evaluación simplificada en particular en el sentido de que tanto para la luz de excitación como para la luz de referencia se puede usar una misma longitud de onda. En el caso de las influencias del entorno que se deben compensar se trata por ejemplo de cambios que se producen a causa de cambios de temperatura o por tolerancias de los respectivos componentes. De acuerdo con la invención, por tanto, se pueden usar fuentes de luz constructivamente iguales para la excitación y la referenciación, lo que posibilita una mejora de la referenciación, ya que además presentan ambas propiedades ópticas y eléctricas idénticas.

Para una separación constructivamente sencilla de los recorridos ópticos, de acuerdo con la invención se propone preferentemente que se efectúe la separación de los recorridos ópticos mediante un filtro óptico.

Para una separación particularmente fiable de los recorridos ópticos para la luz de excitación así como la luz de referencia se propone de acuerdo con otra forma de realización preferente que se suministre la luz de referencia a través de un guía-ondas de luz al receptor, por lo que se puede asegurar mediante el empleo de un guía-ondas de luz de este tipo que tampoco entre ningún tipo de luz de dispersión de la luz de referencia dado el caso en la muestra y por tanto influya en la misma.

Para un control particularmente fiable y para la simplificación de la posterior evaluación en particular en vista de un desplazamiento de fases se propone de acuerdo con otra forma de realización preferente que la fuente de luz de excitación y la fuente de luz de referencia sean accionadas por un modulador común.

Como ya se ha indicado anteriormente, la relación de luz de fluorescencia a luz de excitación es pequeña y para una evaluación correspondiente se requiere un procesamiento de amplificación y de señal en sí conocido que siga a la detección en el receptor, proponiéndose en este contexto de acuerdo con otra forma de realización preferente que, de forma en sí conocida, las señales de medición emitidas por el receptor se amplifiquen en un amplificador y a continuación se procesen en una unidad de procesamiento de señal y dado el caso se representen.

Para la solución de los objetivos que se han mencionado al principio se facilita además un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6. Para una separación sencilla y fiable se propone que para la separación de los recorridos ópticos se emplee un filtro óptico, tal como se corresponde con una forma de realización preferente del dispositivo de acuerdo con la invención.

Para un control fiable y sencillo de estas dos fuentes de luz idénticas para la facilitación de una longitud de onda en cada caso igual tanto para la luz de excitación como para la luz de fluorescencia además se propone preferentemente que esté previsto un modulador de frecuencia común para las dos fuentes de luz.

Para una separación en el espacio particularmente fiable de los recorridos ópticos de luz de referencia y luz de excitación se propone, de acuerdo con otra forma de realización preferente, que para el suministro de la luz de referencia al receptor esté previsto un conductor de luz, en particular un cable de fibra.

Para la consecución de señales correspondientemente intensas e informativas se propone además que, de forma en sí conocida, al receptor esté pospuesto un amplificador y una unidad de evaluación o de procesamiento así como

dado el caso una unidad de visualización, tal como se corresponde con otra forma de realización preferente del dispositivo de acuerdo con la invención.

5 Para la facilitación de fuentes de luz fiables, que también se pueden fabricar correspondientemente de forma económica y se pueden equiparar entre sí, se propone de acuerdo con otra forma de realización preferente que las fuentes de luz estén formadas por un LED.

10 Un uso del procedimiento de acuerdo con la invención y/o del dispositivo de acuerdo con la invención se realiza en este caso de acuerdo con la reivindicación 12 en un biorreactor, en la analítica química y/o bioquímica o en el diagnóstico médico.

La invención se explica a continuación mediante ejemplos de realización representados en el dibujo con mayor detalle. En el mismo muestran:

15 La figura 1, una representación esquemática de un dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra para la realización de un procedimiento correspondiente de acuerdo con el estado de la técnica;  
La figura 2, en una representación similar a la figura 1, una primera forma de realización de un dispositivo de acuerdo con la invención para la determinación de la fluorescencia de una muestra para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención;  
20 La figura 3, una estructura constructiva esquemática de un dispositivo de acuerdo con la invención mediante el uso de dos fuentes de luz independientes;  
La figura 4, una forma de realización modificada de un dispositivo de acuerdo con la invención mediante el uso de dos fuentes de luz independientes;  
La figura 5, otra forma de realización modificada de un dispositivo de acuerdo con la invención mediante el uso de dos fuentes de luz independientes;  
25 La figura 6, en una representación similar a la figura 2, una forma de realización modificada de un dispositivo que no está comprendido por la invención, mediante el uso de una fuente de luz común para la luz de excitación y la luz de referencia así como un conmutador; y  
La figura 7, una representación esquemática de forma similar a las figuras 4 y 5 de una forma de realización de un dispositivo que no está comprendido por la invención mediante el uso de una fuente de luz común y un conmutador.  
30

Una forma de realización de acuerdo con el estado de la técnica, haciéndose pasar tanto la luz de excitación como la luz de referencia a través de la muestra 40, está representada en la figura 1. Con un modulador de frecuencia 10 se genera una señal de modulación sinusoidal con la frecuencia  $f_0$  13, que alimenta una fuente de luz de excitación 21 o una fuente de luz de referencia 31. Las dos fuentes de luz 21, 31 están integradas en una celda óptica de tal modo que mediante filtros ópticos 22, 23 y una disposición geométrica adecuada se evita que la luz de excitación 25 llegue en gran medida al receptor 24 óptico, excitándose la muestra 40 de la mejor forma posible con la luz de excitación 26 filtrada. Además, el filtro 23 óptico está seleccionado de tal modo que la luz de fluorescencia 27 llega en la medida de lo posible sin obstáculos al detector. En el caso de una medición de referencia, la luz de referencia 32 llega a través del filtro 23 óptico al detector, teniéndose que tener en cuenta que esta no causa ninguna fluorescencia en la muestra 40. Por tanto, el filtro 23 óptico tiene la tarea de, por un lado, separar de la mejor forma posible la luz de fluorescencia 27 de la luz de excitación 26 y, por otro lado, dejar que la luz de referencia 32 que presenta una longitud de onda diferente en la medida de lo posible pase sin obstáculos. En cualquier caso, en el receptor 24 óptico se realiza la transformación de la luz incidente en una señal de medición 14 eléctrica, que se modifica en un amplificador 11 de tal modo que la señal de medición 15 eléctrica amplificada es adecuada para el procesamiento en un procesamiento de señal 12 electrónico y a partir de esto junto con la señal de referencia 16 eléctrica se pueden generar datos de fluorescencia 17.  
35  
40  
45

50 Un método de referenciación de este tipo se basa, por un lado, en la separación de la señal de excitación 26 óptica y la señal de fluorescencia 27 por el filtro 23 óptico del detector 24 y, en segundo lugar, en la mejor adaptación posible de la fuente de luz de referencia 31 a la fuente de luz de excitación 21 con respecto a propiedades eléctricas y comportamiento de temperatura, habiendo de darse una disposición geométrica adecuada de los componentes ópticos.  
55

En la figura 1, la zona parcial de la muestra en la que se realiza una excitación por la luz de excitación, de tal modo que a continuación sale la luz de fluorescencia 28, se indica por una zona 40' sombreada.

60 En esta forma de realización conocida de acuerdo con el estado de la técnica es desventajoso en particular el hecho de que la luz de excitación de la fuente de luz 21 al igual que la luz de referencia o de relación de la fuente de luz 31 presentan diferentes longitudes de onda, de tal modo que se requieren compensaciones adicionales para tener en cuenta influencias del entorno o ambientales, por ejemplo temperatura a las diferentes longitudes de onda de la luz de excitación 25 al igual que de la luz de referencia 32. En este caso se puede emplear por ejemplo un LED rojo y uno verde como fuente de luz 21 o 31. Ya que señal y referencia son diferentes LED 21 o 31 en el sentido de la emisión de luz, se dan físicamente también otras propiedades eléctricas, tales como por ejemplo capacitancia de unión (*junction*), comportamiento frente a temperatura, etc., por lo que se reduce la calidad de la referenciación.  
65

5 En la forma de realización de acuerdo con la invención de acuerdo con la figura 2 se han conservado las referencias para los mismos componentes de la forma de realización de acuerdo con la figura 1. En particular se puede ver que la luz de excitación 25 facilitada por la fuente de luz 21, después, como en la forma de realización de acuerdo con la figura 1, atraviesa el filtro 22 y la muestra 40 en la que se realiza una excitación, después de lo cual sale la luz de fluorescencia 27 y llega al filtro 23, después de lo cual se suministra a su vez como luz de fluorescencia 28 filtrada al detector o al receptor 24 óptico.

10 La separación entre la luz de excitación 25 o la luz de fluorescencia 27 o 28 resultante después del paso a través de la muestra de la luz de referencia 32 se realiza al estar configurado el filtro 23 para una separación en el espacio de los recorridos de luz 25, 27 y 28 o 32. En este caso está previsto que no se pueda producir ninguna reflexión de la luz de referencia 32 a la muestra 40, por lo que la misma a su vez se excitaría y emitiría luz de fluorescencia 27. El diseño del filtro 23 óptico debe evitar una transmisión de luz de referencia 32 a la muestra, evitar una transmisión de la luz de excitación 26 al receptor 24 óptico, sin embargo, permitir en alto grado una transmisión de la luz de fluorescencia 27 al receptor 24 óptico.

15 La evaluación de las señales recogidas en el receptor óptico o detector 24 se realiza como en la realización de acuerdo con el estado de la técnica en la figura 1 por el amplificador 11 pospuesto, la unidad de procesamiento de señal 12 electrónica así como una posible visualización de datos que está indicada a su vez con 17.

20 La ventaja de la forma de realización de acuerdo con la figura 2 mediante facilitación de la separación de los recorridos ópticos radica sobre todo en que se pueden usar dos fuentes de luz 21 y 31 idénticas, de tal modo que está facilitada una referenciación o evaluación o con respecto al estado de la técnica de acuerdo con la figura 1 se puede llevar a cabo de forma más exacta o precisa, ya que se pueden evitar influencias adicionales por el uso de dos fuentes de luz diferentes con diferente longitud de onda de acuerdo con el estado de la técnica y las compensaciones resultantes a partir de esto, dado el caso requeridas adicionalmente.

25 En la forma de realización representada en la figura 3, que se basa en el diagrama esquemático de la figura 2, se puede ver que la fuente de luz 21 formada por ejemplo por un LED desvía su luz a un prisma 41, estando pospuesta al prisma 41 una muestra no representada con mayor detalle.

30 Frente a esto se suministra luz por la fuente de luz 31 para la facilitación de la luz de referencia o de relación a través de un cable de fibra 42 a un elemento 43 formado por una placa de vidrio, que está intercalado por el prisma 41 con el filtro indicado a su vez con 23 para la separación de los recorridos ópticos entre la luz de señal y la luz de referencia, suministrándose la luz de referencia suministrada al cable de fibra 42 directamente al detector o al receptor 24 óptico, indicándose un amplificador previo, que está posconectado, a su vez con 11.

35 En una forma de realización modificada de acuerdo con la figura 4 se puede ver que la luz de excitación facilitada por la fuente de luz indicada a su vez con 21, que después del paso por una denominada lente Grin 44 atraviesa el filtro de excitación 22, atraviesa un filtro 45 dicróico y, después del paso a través de otra lente Grin 46, se suministra a una capa sensible indicada esquemáticamente con 47 o una muestra que se va a examinar. La luz de fluorescencia enviada por la muestra 47 se suministra a través del filtro 45 dicróico después del paso a través de un filtro de emisión indicado a su vez con 23 al fotodetector o al receptor 24 óptico.

40 A diferencia de esto se realiza el suministro de la luz de referencia facilitada por la fuente de luz 31 directamente al fotodetector 24, usándose para la separación de los recorridos ópticos a su vez el filtro 23.

45 En la figura 5 está indicada otra forma de realización modificada mediante el uso de dos fuentes de luz 21 y 31 idénticas, estando acoplada la fuente de luz 31 para la facilitación de la luz de referencia a través de un guía-ondas de luz 48 directamente al detector o receptor óptico indicado a su vez con 24.

50 Frente a esto, la luz facilitada por la fuente de luz de excitación 21 se suministra después de atravesar el filtro 22 así mismo a través de un guía-ondas de luz 49 y acoplamiento 50 indicados esquemáticamente a continuación a través de otro guía-ondas de luz 51 a la muestra 52 que se va a examinar, por ejemplo una capa sensible a O<sub>2</sub>. A través del guía-ondas de luz 51 así como 53 se realiza un suministro de la luz de fluorescencia después de atravesar el filtro de emisión 23 a su vez al detector o al receptor 24 óptico.

55 En la figura 6 está representada una forma de realización modificada, que no queda comprendida en la invención, usándose únicamente una única fuente de luz indicada a su vez con 21, desde la cual se suministra luz indicada con 25 a un equipo de conmutación o a un conmutador 33. En este conmutador se realiza una transmisión de la luz de excitación facilitada por la fuente de luz 21 al filtro 22 y posteriormente a la muestra 40, de la cual sale luz de fluorescencia 27, que después de atravesar el filtro 23 como luz de fluorescencia 28 se suministra al fotodetector o receptor óptico indicado a su vez con 24 para el procesamiento posterior.

Como se indica en la figura 6 mediante la flecha doble 55, en el equipo de conmutación 33 se realiza una conmutación entre el recorrido de luz de la luz de excitación 25 a través de la muestra 40 y un camino indicado a su vez con 32 de la luz de referencia, que se suministra directamente al receptor óptico o fotodetector 24.

5 El acoplamiento con un circuito de excitación no representado con mayor detalle o un modulador de frecuencia está indicado en la figura 6 a su vez con 13.

10 La ventaja de esta forma de realización radica, sobre todo, en que con únicamente una única fuente de luz 21 se puede conseguir la suficiencia, de tal manera que se requiere también solo un circuito de excitación. Por tanto, se obtiene una reducción de la complejidad mediante la omisión de la fuente de luz de referencia independiente, de tal manera que se puede conseguir una valoración más precisa o exacta en particular mediante una eliminación de diferencias de componentes dado el caso existentes de fuentes de luz idénticas, tal como están indicadas con 21 y 31 por ejemplo en la figura 2. Este aumento de la exactitud prevalece en la mayoría de los casos frente a la complejidad adicional debida a la provisión del equipo de conmutación o del conmutador 33.

15 En la representación de acuerdo con la figura 7, que no queda comprendida en la invención, se puede ver que después de atravesar un filtro de excitación 22, el haz de luz se pone a disposición al equipo de conmutación o al conmutador 33, suministrándose la luz en el camino 32 óptico de la luz de referencia a su vez directamente al detector o al receptor 24 óptico.

20 Frente a esto, después de un paso a través de un filtro dicróico indicado a su vez con 45, se produce un suministro de la luz de excitación a una capa sensible indicada a su vez con 47 de forma similar a la forma de realización de acuerdo con la figura 4. La luz de fluorescencia formada en su interior se suministra reiteradamente después de atravesar el filtro 45 dicróico y el filtro de emisión 23 así mismo al fotodetector o al receptor 24 óptico.

25 En este caso se puede ver que en particular mediante facilitación de únicamente una única fuente de luz 21 se puede reducir la complejidad constructiva con la consecución de una mayor exactitud de evaluación.

30 Una aplicación preferente de las formas de realización representadas en las figuras 2 a 5 se realiza por ejemplo en un biorreactor, en una analítica química y/o bioquímica o en el diagnóstico médico.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de la fluorescencia de una muestra, irradiándose la muestra (40, 47) con una luz de excitación (25) con una longitud de onda que es adecuada para la excitación de luz de fluorescencia (27, 28) en la muestra (40, 47) y recibándose la luz de fluorescencia (27, 28) emitida por la muestra (40, 47) en un receptor (24) y transformándose en una señal de medición, suministrándose al receptor (24) adicionalmente una luz de referencia (32) en particular para la compensación de influencias del entorno y transformándose así mismo en una señal de medición de referencia, caracterizado por que el recorrido óptico de la luz de excitación (25) que entra en la muestra (40, 47) y la luz de fluorescencia (27, 28) que abandona la muestra (40, 47) se separa del recorrido óptico de la luz de referencia que presenta la misma longitud de onda que la luz de excitación entre una fuente de luz de excitación (21) que envía la luz de excitación (25) o una fuente de luz de referencia (31) que envía la luz de referencia (32) y el receptor (24), siendo la fuente de luz de excitación (21) para la facilitación de la luz de excitación (25) idéntica a y estando separada de la fuente de luz de referencia (31) para la facilitación de la luz de referencia, siendo constructivamente iguales la fuente de luz de excitación (21) y la fuente de luz de referencia (31) y presentando propiedades ópticas y eléctricas idénticas.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la separación de los recorridos ópticos (25, 27, 28, 32) se efectúa a través de un filtro (32) óptico.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se suministra la luz de referencia (32) a través de un guía-ondas de luz al receptor (24).
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la fuente de luz de excitación (21) y la fuente de luz de referencia (31) son accionadas por un modulador común.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las señales de medición emitidas por el receptor (24) se amplifican en un amplificador (11) y a continuación se procesan en una unidad de procesamiento de señal (12) y dado el caso se representan.
6. Dispositivo para la determinación de la fluorescencia de una muestra, que comprende:  
una fuente de luz de excitación (21) para enviar luz de excitación (25) con una longitud de onda que es adecuada para la excitación de luz de fluorescencia (27, 28) en la muestra,  
una fuente de luz de referencia (31) para la facilitación de luz de referencia y  
un receptor (24) que recibe la luz de fluorescencia (28) emitida por la muestra y transforma la misma en una señal de medición, pudiendo suministrarse al receptor (24) adicionalmente la luz de referencia (32) en particular para la compensación de influencias del entorno y pudiendo transformarse por el mismo en una señal de medición de referencia, caracterizado por que el recorrido óptico de la luz de excitación (25) que entra en la muestra (40, 47) y la luz de fluorescencia (27, 28) que abandona la muestra está separado del recorrido óptico (32) de la luz de referencia que presenta la misma longitud de onda que la luz de excitación entre la fuente de luz de excitación (21) o la fuente de luz de referencia (31) y el receptor (24), siendo la fuente de luz de excitación (21) idéntica a y estando separada de la fuente de luz de referencia (31), siendo constructivamente iguales la fuente de luz de excitación (21) y la fuente de luz de referencia (31) y presentando propiedades ópticas y eléctricas idénticas.
7. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que para la separación de los recorridos ópticos (25, 27, 28, 32) se emplea un filtro (23) óptico.
8. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que está previsto un modulador de frecuencia (10) común para las dos fuentes de luz (21, 31).
9. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que para el suministro de la luz de referencia al receptor está previsto un conductor de luz (42, 48), en particular un cable de fibra.
10. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que al receptor (24) está pospuesto un amplificador (11) y una unidad de evaluación o procesamiento (12) así como dado el caso una unidad de visualización (17).
11. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que la fuente de luz de excitación (21) y la fuente de luz de referencia (31) están formadas en cada caso por un LED.
12. Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 y/o un dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 11 en un biorreactor, en la analítica química y/o bioquímica o en el diagnóstico médico.

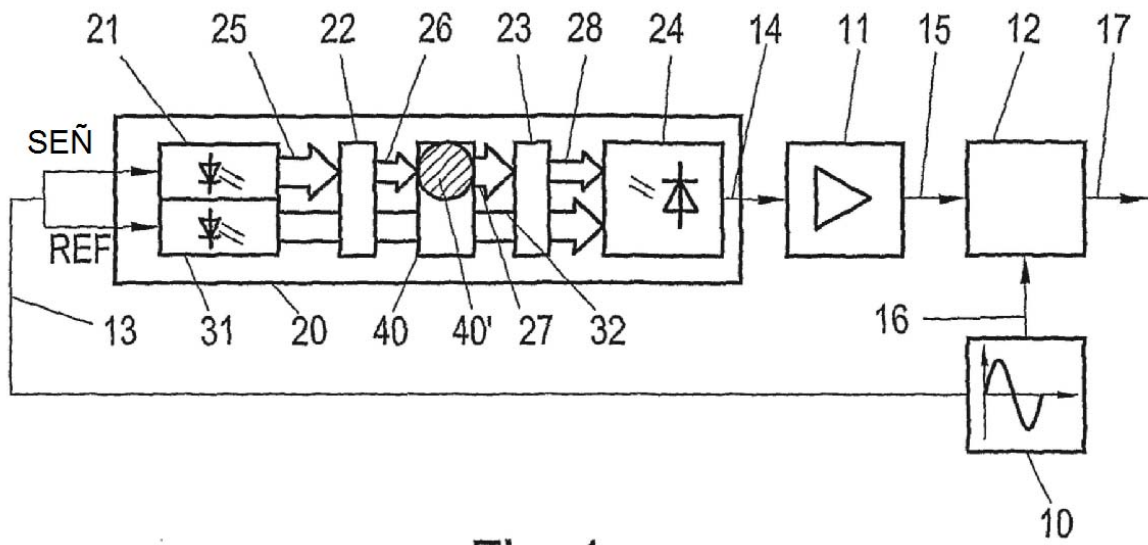


Fig. 1  
(ESTADO DE LA TÉCNICA)

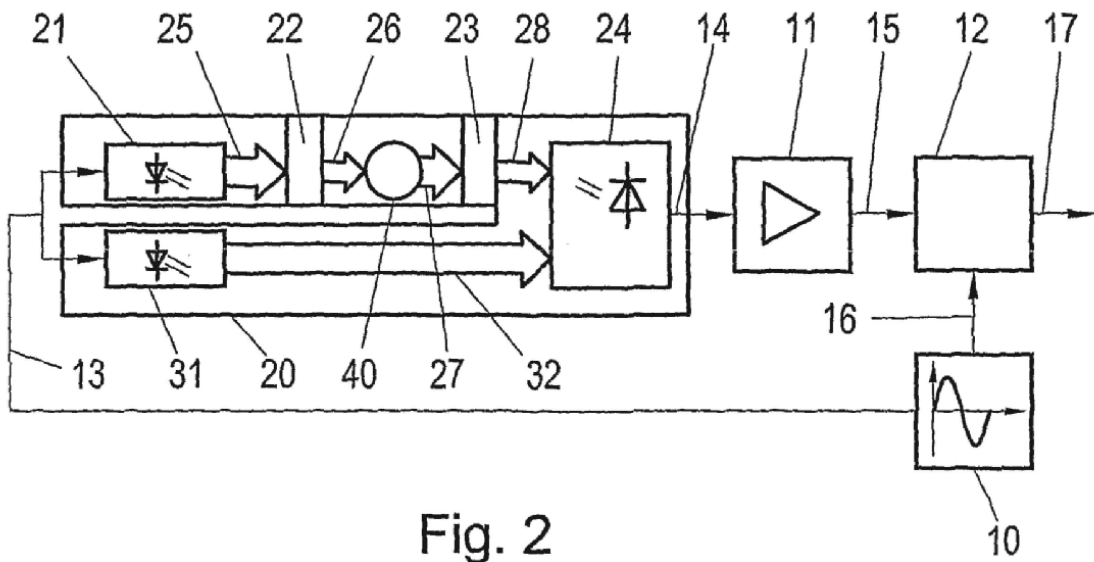


Fig. 2



Fig. 3

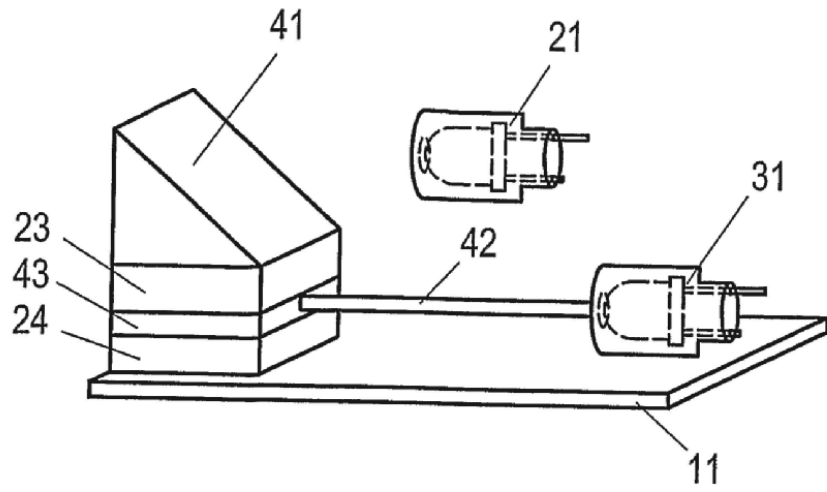


Fig. 4

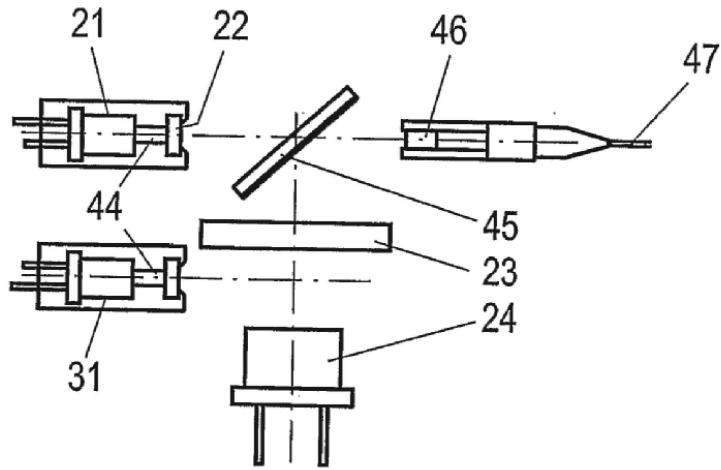
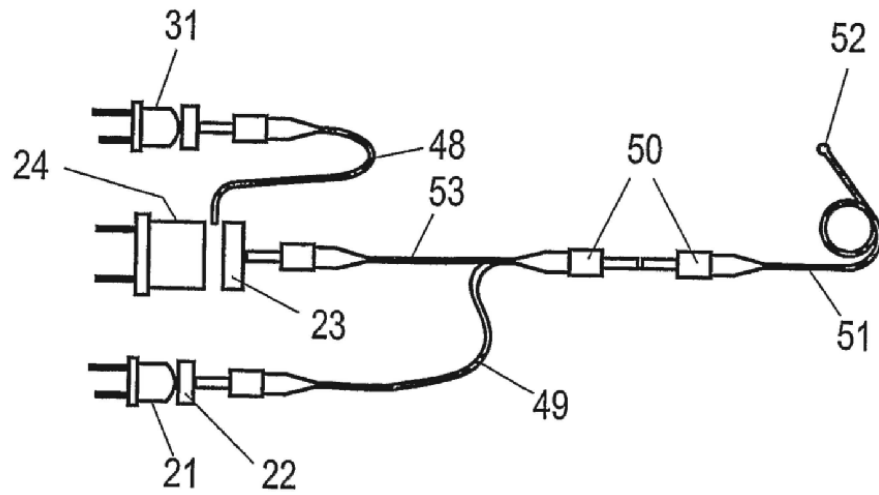


Fig. 5



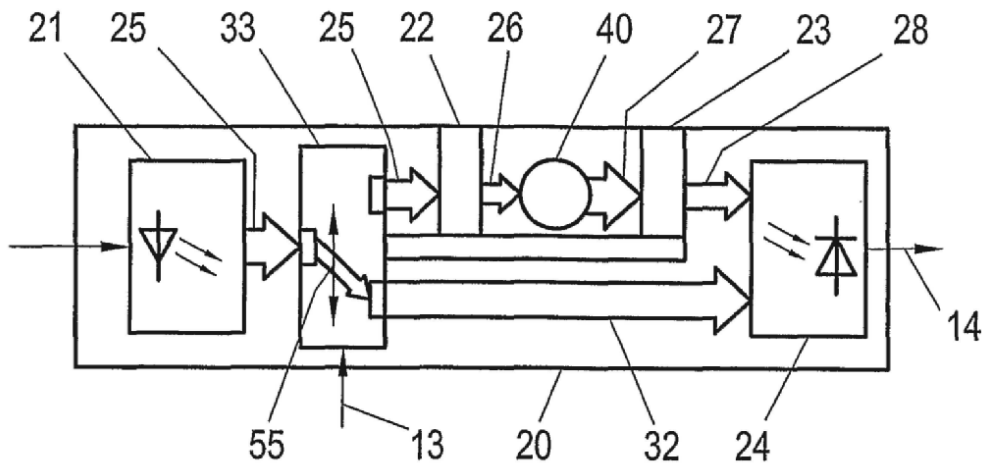


Fig. 6

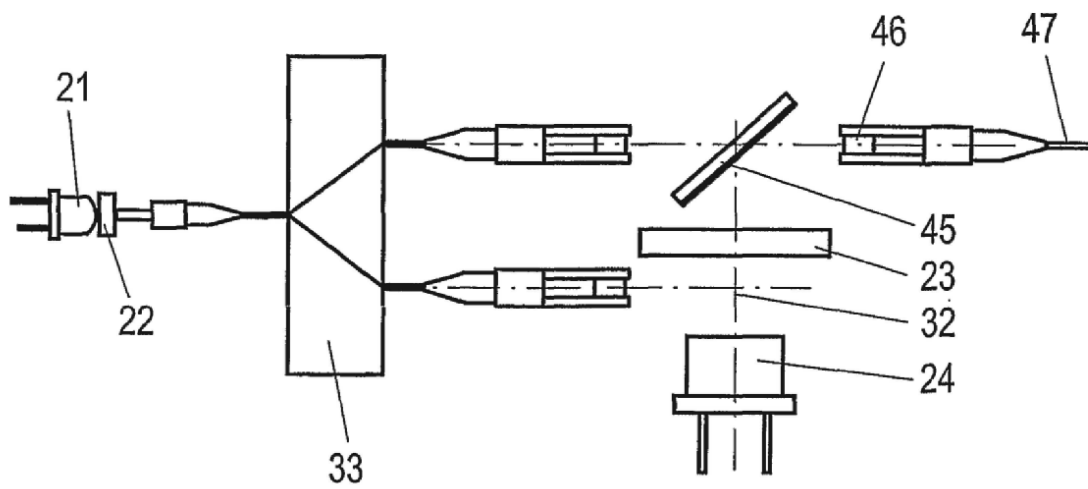


Fig. 7