

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 699**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/04** (2006.01)

**G01N 21/3577** (2014.01)

**G01N 21/05** (2006.01)

**G01N 21/35** (2014.01)

**G01N 21/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2010 PCT/EP2010/068816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10800902 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2646800**

54 Título: **Análisis espectral del infrarrojo medio de un material heterogéneo fluente**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2020**

73 Titular/es:  
**FOSS ANALYTICAL A/S (100.0%)**  
**Foss Allé 1**  
**3400 Hillerød, DK**

72 Inventor/es:  
**JUHL, HENRIK**

74 Agente/Representante:  
**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 761 699 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

Análisis espectral del infrarrojo medio de un material heterogéneo fluente

5 La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a un procedimiento para determinar cuantitativamente los componentes de un material heterogéneo fluente mediante un análisis espectral del infrarrojo medio (definido en la presente memoria como aquél que utiliza longitudes de onda dentro de la región espectral entre 2,5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ ), en particular para la determinación de parámetros de composición de un líquido en el que las partículas se encuentran suspendidas, más particularmente en leche que contiene grasa.

10 Es bien conocido el hecho de determinar los componentes de una muestra, por ejemplo, uno o más de grasa, lactosa, glucosa, proteínas, urea y/o adulterantes en muestras líquidas que contienen grasa, en particular muestras de sangre, leche, o productos lácteos o, por ejemplo, uno o más de proteína, humedad y/o almidón en granos de cereal, mediante técnicas de atenuación del infrarrojo medio. De acuerdo con dichas técnicas, la muestra se analiza mediante la transmisión a la muestra de radiación en el rango espectral del infrarrojo medio. Posteriormente, se mide la atenuación de la radiación del infrarrojo medio analizada generada por la muestra.

15 Los sistemas o instrumentos para la medición comprenden los medios de medición de la atenuación del infrarrojo medio para medir la atenuación infrarroja de la muestra en un número de bandas de onda, generalmente a lo largo de un rango espectral continuo y los medios de cálculo que se adaptan para calcular las concentraciones de componentes de interés en la muestra en base a los valores de atenuación del infrarrojo medio medidos de la muestra. El cálculo se realiza utilizando una calibración o un modelo predictivo mediante el cual se establece una relación entre el componente de interés y los valores medidos de atenuación del infrarrojo medio.

20 Un problema asociado con dicha medición del infrarrojo medio en, por ejemplo, muestras de leche, es que los resultados calculados (generalmente denominados resultados indirectos o previstos, porque los resultados directos del análisis son resultados obtenidos utilizando los procedimientos de referencia química estándar) varían con la partícula de variación, en este caso, el glóbulo graso, la distribución del tamaño en las muestras.

25 Esto se puede demostrar teóricamente a medida que se vaya describiendo. Suponiendo que hay una cubeta con un diámetro de 8 mm llena de leche sin pasteurizar que contiene un 4% de grasa. Un haz de luz habitual a través de la muestra es de 0,05 mm para la radiación del infrarrojo medio. El volumen útil (es decir, iluminado) de la cubeta se puede estimar en 2,5  $\text{mm}^3$ . El contenido graso es 4% en peso y la densidad de la leche es generalmente de 0,93 g/ml, lo que resulta en un volumen de grasa presente en la cubeta de alrededor de 0,12  $\text{mm}^3$ .

30 Los glóbulos grasos en leche heterogénea (no homogeneizada) se encuentran en el orden de 4  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  en diámetro. Suponiendo que la distribución de tamaño de estos sigue la distribución de Poisson, la repetitividad teórica de la determinación grasa en una cubeta se puede calcular tal como se muestra en la Tabla 1 en la que la última fila representa la repetitividad de grasa en una cubeta rellena con leche no homogeneizada, que ha sido calculada para tamaños diferentes de glóbulos grasos.

Tabla 1

Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	4	5	6	7	8	9	10
Volumen ( $\times 10^{-8} \text{ mm}^3$ )	3,35	6,54	11,3	18	26,8	38,2	52,4
Número ( $\times 10^6$ )	3,226	1,652	0,956	0,602	0,403	0,283	0,206
R(rel)	0,056	0,078	0,102	0,129	0,157	0,188	0,220
R(abs)	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,009

35 Como se espera razonablemente, la repetitividad empeora a medida que aumenta el diámetro del glóbulo graso. Sin embargo, estos son mucho mejores que los observados para la leche no homogeneizada en estado estable en una cubeta en la que usualmente se obtienen las repetitividades absolutas de hasta 0,1.

40 Para mitigar este problema, se adaptan instrumentos o sistemas conocidos utilizados para las mediciones con el objeto de medir, en sus compartimientos de medición, en muestras homogeneizadas y contienen homogeneizadores incorporados que supuestamente garantizan que las distintas muestras sometidas a medición han sido objeto de una homogeneización idéntica para que tengan una distribución del tamaño de partícula idéntica. Puede demostrarse fácilmente de manera experimental que las repetitividades observadas para la leche homogeneizada en estado estable en una cubeta se acercan a los valores teóricos presentados anteriormente. En la leche, por ejemplo, los homogeneizadores pretenden proporcionar tamaños de partícula entre 0,2  $\mu\text{m}$  y 2  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, los homogeneizadores de los sistemas de instrumentos se someten al desgaste mecánico, lo que significa que su eficiencia de homogeneización disminuye con el tiempo, resultando en variaciones en las

distribuciones del tamaño del glóbulo graso y por lo tanto en mediciones menos exactas.

Una solución para evitar la necesidad de homogeneizadores se proporciona en WO 92/17767. En dicha patente se divulga que las mediciones de atenuación del infrarrojo medio deberían realizarse en muestras de leche heterogéneas (no homogenizadas) en estado estable en una cubeta en la región espectral del infrarrojo medio entre  $1160\text{ cm}^{-1}$  ( $8,62\text{ }\mu\text{m}$ ) y  $1350\text{ cm}^{-1}$  ( $7,41\text{ }\mu\text{m}$ ). Esto representa la región en la que el enlace C-O absorbe energía y se descubrió que no se ve afectado por la dispersión de las partículas grasas.

El documento de patente WO 2008/146276 describe un sistema que se adapta para realizar mediciones de atenuación en leche heterogénea fluente en la región espectral del infrarrojo cercano y los datos de medición de recolección tanto del haz reflejado por a través de la leche fluente y transmitido a través de esta. Sin embargo, otros componentes, como por ejemplo el agua, cuentan con fuertes influencias en la atenuación en esta región del infrarrojo cercano.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para determinar componentes de una muestra heterogénea fluente, que comprende obtener una muestra de material; el flujo de la muestra a través de una región de medición, como podría proporcionarse mediante un flujo a través de una cubeta; la interacción posterior de la muestra de flujo en la región de medición con radiación del infrarrojo medio; la medición posterior de los valores de atenuación del infrarrojo medio en una o más bandas de onda generalmente desde un análisis espectrofotométrico de la radiación interactuada en al menos una región de longitud de onda en la que el componente de interés influye en la atenuación del infrarrojo medio y el cálculo en un medio de cálculo de una indicación del componente de interés en la muestra de los valores de atenuación del infrarrojo medio medido.

Al hacer las mediciones en una muestra fluente, se puede producir un promedio efectivo de la medición de manera conveniente y, por lo tanto, se puede obtener una exactitud mejorada. Las mediciones se repiten una pluralidad de veces a medida que la muestra fluye a través de la región de medición en un caudal seleccionado de forma tal que al menos una porción de la muestra en la región de medición se intercambia con una nueva muestra durante la pluralidad de mediciones, preferentemente con cada medición. Más preferentemente, el caudal se selecciona de forma tal que toda la muestra en la región de medición se intercambia con cada medición.

Un experto en la técnica acepta, genéricamente, que, a diferencia de las mediciones del infrarrojo cercano, las mediciones del infrarrojo medio en una muestra fluente se evitan dado que se espera una exactitud y repetitividad pobres, como se explicará a continuación.

Una partícula en una suspensión o una micela en una emulsión suele contener enlaces químicos diferentes al líquido que los rodea y cada resonancia vibratoria de estos enlaces da lugar a una atenuación específica que, por ejemplo, puede manifestarse como una frecuencia específica en un interferograma registrado por un medio de medición de atenuación del tipo interferómetro. Si la partícula o micela se encuentra en una posición fija en la cubeta durante el tiempo de medición, la frecuencia correspondiente y la amplitud serán constantes a lo largo del interferograma no procesado.

Generalmente, el interferograma se multiplica con una función de apodización en forma de campana para suavizar las discordancias al comienzo y al final del escaneado. Por lo tanto, si la partícula o micela se mueve a través de la cubeta durante el escaneado el interferograma resultante se verá afectado. Si la partícula transita al comienzo o al final del escaneado, la amplitud correspondiente en el interferograma se reducirá debido a la apodización. Por lo tanto, después de la transformada de Fourier del interferograma apodizado, una partícula que transita en el comienzo o final del escaneado tendrá un pico de absorción menor que la partícula que transita en el medio del escaneado.

Si la partícula o micela se mueve muy rápido a lo largo de la cubeta durante la medición, sólo se registrará un número limitado de oscilaciones y la frecuencia de atenuación del infrarrojo medio (número de onda) no se definirá bien. Esto deriva en un esparcimiento significativo del pico de absorción después de la transformada de Fourier que también limita la exactitud de la medición.

Naturalmente, con un gran número de partículas pequeñas o micelas en el líquido fluente, los interferogramas registrados representarán un promedio y se mantendrán relativamente intactos por el flujo. Sin embargo, con un número intermedio de partículas que son grandes en comparación con el volumen de la cubeta iluminada - como glóbulos grasos en leche no homogeneizada - los efectos del caudal descritos anteriormente afectarán el interferograma registrado y fijarán el límite de la repetitividad de las mediciones.

El efecto descrito en la presente memoria es más marcado en la parte del infrarrojo medio del espectro que utiliza la espectroscopia de transformada de Fourier, que en la parte del infrarrojo cercano del espectro (generalmente considerado longitudes de onda entre  $0,8\text{ }\mu\text{m}$  y  $2,5\text{ }\mu\text{m}$ ). En primer lugar, dado que la absorción

es más fuerte en el rango del infrarrojo medio que en el rango del infrarrojo cercano, se mide un volumen de la muestra mucho menor en el rango del infrarrojo medio que hace que las fluctuaciones estadísticas en el número de partículas o micelas sean relativamente mayores. En segundo lugar, dado que las mediciones del infrarrojo cercano de las muestras fluyentes suelen realizarse con espectrómetros de DDA (detector de conjunto de diodos) el DDA operará para promediar todos los componentes del espectro (longitudes de onda) de manera equivalente con el tiempo, eliminando el problema del caudal descrito anteriormente respecto del infrarrojo medio.

En una realización, cuando se emplea en la medición de una muestra líquida que contiene grasa, dicha leche o sangre, el procedimiento puede incluir adicionalmente una etapa de calentamiento de la muestra antes de la interrogación con la radiación del infrarrojo medio. Esto reduce la tendencia a la aglomeración de las partículas grasas suspendidas.

Del mismo modo, se proporciona un sistema de medición de atenuación del infrarrojo medio para la determinación cuantitativa de una indicación de un componente de interés en una muestra heterogénea que puede fluir, el sistema comprende un conducto de flujo para la inserción en una muestra del material heterogéneo que puede fluir; los medios de transporte acoplados al conducto de flujo para generar un flujo de la muestra; un medio de medición de atenuación del infrarrojo medio adaptado para proporcionar radiación del infrarrojo medio en la muestra a medida que se hace fluir y para generar un representante de señal de una variación de intensidad del infrarrojo medio de la radiación del infrarrojo medio proporcionada después de su paso a través de la muestra fluente y un medio de cálculo conectado para recibir la señal generada por el medio de medición y para calcular la indicación de uno o más componentes de interés dependiendo de la señal recibida y un modelo predictivo, como uno proporcionado por una calibración o una red neuronal artificial, a través de la cual se establece una relación matemática entre los valores de atenuación del infrarrojo medio del material heterogéneo fluente y el componente de interés.

Una realización ejemplar de la presente invención se describirá con referencia a los dibujos de las figuras acompañantes, en las que:

La Figura 1 ilustra un diagrama de bloque de un sistema ejemplar que opera para realizar un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Un sistema de medición de atenuación del infrarrojo medio 2 para la determinación cuantitativa de una indicación de un componente de interés en una muestra líquida heterogénea que se ilustra en la Figura 1. El sistema 2 comprende un conducto de flujo 4 que tiene un primer extremo 6 para insertar en una muestra líquida heterogénea en un soporte de muestra 8 y que tiene un segundo extremo 10 para sacar la muestra del sistema 2, en este caso conectado a desperdicios. El sistema 2 también incluye un medio de transporte 12, en el presente ejemplo en la forma de una bomba, que se acopla al conducto de flujo 8 y funciona para generar un flujo a través del conducto 4. Se proporciona un medio de medición de atenuación del infrarrojo medio 14 como una parte del sistema 2 para medir la atenuación de la radiación del infrarrojo medio que ha interactuado con la muestra a medida que fluye a través de la región de medición, delimitada en la presente por un flujo a través de una cubeta 16 que se proporciona en conexión fluida con la muestra que fluye a través del conducto 4.

Un medio de medición de atenuación del infrarrojo medio adecuado 14 es un interferómetro del tipo conocido, por ejemplo, un interferómetro de Michelson. Este medio de medición de interferómetro 14 se dispone de manera cooperativa con respecto a la región de medición 16, definida en la presente memoria por el flujo a través de la cubeta, para poder detectar la radiación del infrarrojo medio después de la transmisión a través de la muestra. En uso, el interferograma producido por el interferómetro se procesa utilizando la transformación de Fourier para generar una variación de intensidad dependiente de la longitud de onda que representa la atenuación de la radiación del infrarrojo medio por la muestra.

En general, la región de medición 16 puede ser cualquier región en la que, durante su uso, se pretende que la muestra fluente sea interrogada por la radiación del infrarrojo medio. De esta manera, al menos una porción de la muestra que se mide se intercambia durante cualquier período de medición. Esto proporciona, posteriormente, una medición promedio efectiva que mejora la exactitud y repetitividad de los resultados de la medición.

Un medio de cálculo 18, por ejemplo, que comprende un microprocesador integral o una computadora personal independiente o un sistema distribuido que tiene al menos un componente en una ubicación remota del sistema 2 y acoplado de manera operativa mediante una red de telecomunicaciones, se conecta para recibir un representante de señal de la atenuación del infrarrojo medio medido, como un interferograma o la transformación de Fourier de esta, y se configura para calcular de manera conocida, una indicación, como una concentración determinada, de un componente de interés en la muestra utilizando un calibre u otro modelo predictivo (redes neuronales artificiales, por ejemplo) mediante el cual se establece una relación matemática entre valores de atenuación del infrarrojo medio y el componente de interés.

Una unidad de calentador 20 puede incluirse en realizaciones específicas para aplicaciones de medición

particulares para calentar la muestra antes de que fluya a través de la cubeta de medición 16. La unidad de calentador puede, por ejemplo, comprender una bobina eléctricamente resistente alrededor del conducto 4.

5 En un sistema particular 2 para la medición de muestras de leche o productos lácteos heterogéneos (no homogenizados) se incluye un calentador para calentar la muestra de leche hasta aproximadamente 41 °C. Esto reduce la tendencia a la aglomeración de partículas grasas en la leche. El calentamiento también puede utilizarse de manera ventajosa cuando se miden otros líquidos que contienen grasa, como la sangre.

10 Los resultados de las determinaciones de los componentes de interés habituales, representados en la presente memoria como porcentajes de grasa, proteína, lactosa, sólidos totales (TS) y sólidos, no grasos (SNF) en las muestras de leche se proporcionan en la Tabla 2 junto con exactitudes absolutas A(abs) y relativas A(rel) así como también repetitividades absolutas R(abs) y relativas R(rel) de estas determinaciones.

15

**Tabla 2**

Componente	Bajo	Alto	Medio	A(abs)	R(abs)	A(rel)	R(rel)
Grasa	2,06	5,95	4,32	0,04	0,007	0,91	0,16
Proteína	2,93	4,62	3,59	0,019	0,004	0,52	0,12
Lactosa	4,33	5,48	4,67	0,032	0,005	0,69	0,11
TS	11,00	16,23	13,31	0,051	0,017	0,39	0,13
SNF	8,65	10,99	9,37	0,012	0,006	0,13	0,06

20

25 Estas determinaciones se realizaron de acuerdo con el procedimiento de la presente invención utilizando un sistema como se describe respecto de la Figura 1.

30 Se utilizaron quince muestras de leche y se realizaron mediciones en tres repeticiones para cada muestra con cada repetición en un promedio de cuarenta escaneos a lo largo de la misma región de longitud de onda. Para poder construir un modelo de calibración, algunas muestras tuvieron proteína, grasa o lactosa agregada intencionalmente en cantidades conocidas. La columna Bajo representa la menor cantidad del componente respectivo en una muestra, Alto representa la mayor cantidad y Medio, el promedio de todas las muestras. A modo ejemplificativo, sólo un modelo de calibración de cuadrados mínimos parciales (PLS) que utiliza un máximo de seis factores se construyó de manera conocida para su uso en predicciones posteriores.

35 Cada muestra fue interrogada por radiación del infrarrojo medio y los interferogramas de transmisión resultantes se procesaron por la Transformación de Fourier en un llamado espectro "de haz simple" (es decir, un espectro de longitud de onda dependiente de la intensidad (o frecuencia) sin correcciones para artefactos externos como aquellos inducidos por la fuente; cubeta o detector). La transmitancia se calculó en relación con agua para eliminar estos artefactos no asociados con interacciones con la muestra.

40

Las muestras se calentaron a 41 °C y se pasaron a través de la cubeta 16 a un caudal de 1 ml/minuto.

45 Como puede apreciarse, la exactitud absoluta A(abs) para todos los componentes es de aproximadamente 0,04 y la repetitividad absoluta R(abs) es de aproximadamente 0,01. Esto resulta sorprendente cuando se considera que teóricamente, como se discutió anteriormente, se espera que las mediciones del infrarrojo medio en una muestra fluente sean aún peores que aquellas realizadas en una muestra quieta en una cubeta.

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de determinación de componentes de una muestra de leche heterogénea fluente que comprende:

5

obtener una muestra de leche heterogénea;  
medir valores de atenuación del infrarrojo medio de la muestra y calcular, en una unidad de procesamiento de datos, una indicación del componente de interés en la muestra a partir de los valores de atenuación del infrarrojo medio medidos,

10

**caracterizado** el procedimiento **porque** además comprende:

hacer fluir la muestra de leche heterogénea;  
interactuar simultáneamente la radiación del infrarrojo medio con la muestra de leche heterogénea fluente en una región de medición y, posteriormente, medir los valores de atenuación del infrarrojo medio una pluralidad de veces para una misma o más bandas de ondas de la radiación interactuada transmitida a través de la muestra de leche heterogénea fluente a medida que la muestra de leche heterogénea se hace fluir con un caudal seleccionado, de tal manera que al menos una porción de la muestra de leche heterogénea en la región de medición se intercambia por cada una de la pluralidad de veces; y  
promediar los valores de atenuación medidos.

15

20

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el procedimiento comprende una etapa de calentar la muestra de leche heterogénea antes de realizar la medición.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

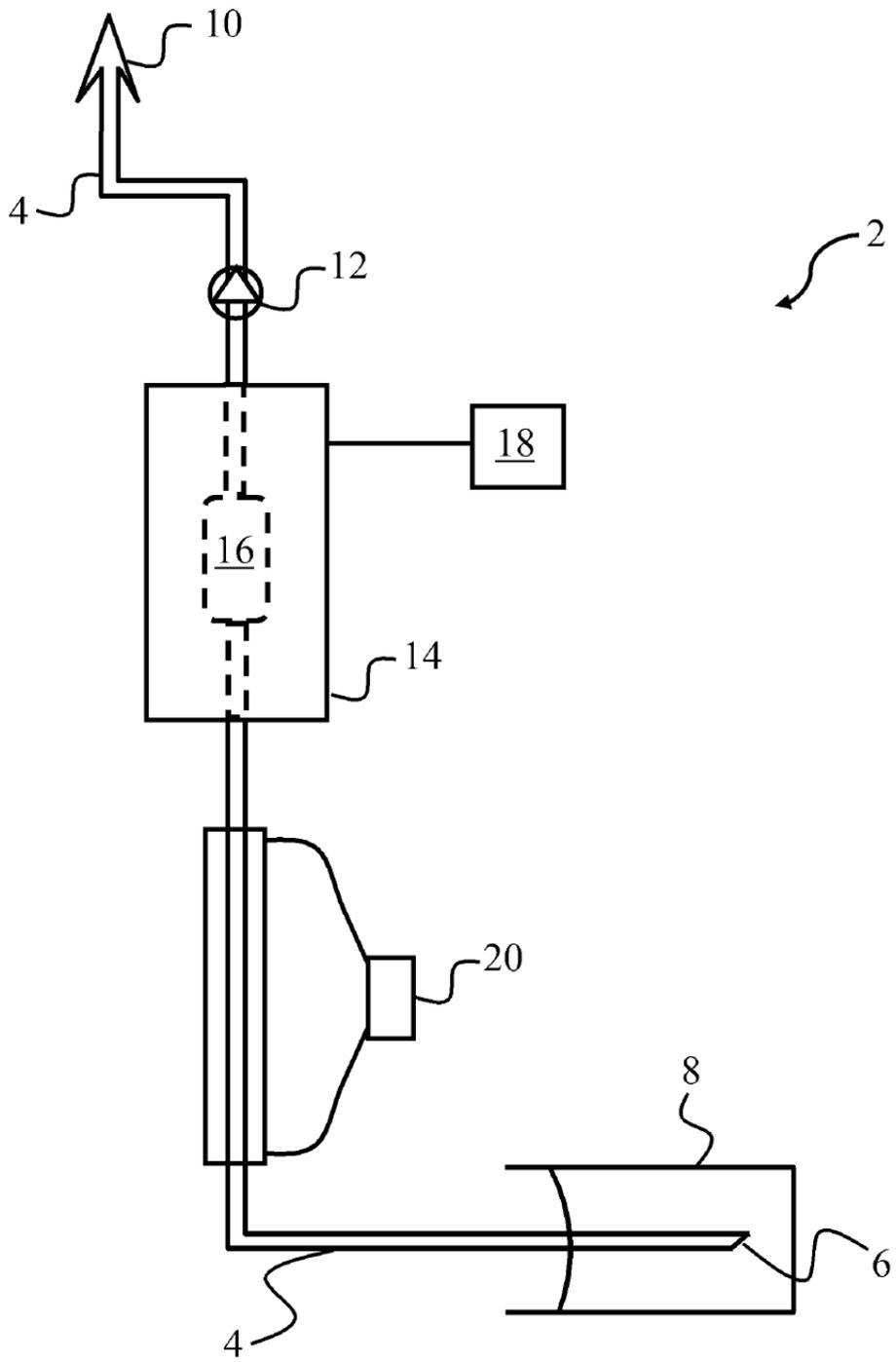


Fig. 1