



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para
el control de procesos y productos industriales:
Aplicación de la Espectroscopia NIR y la
Espectrometría de Movilidad Iónica (IMS)**

David Zamora Zamora

Director: Marcelo Blanco Romia

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2012

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor para **David Zamora Zamora**.

David Zamora Zamora

V^o B^o,

Prof. Marcelo Blanco Romia

Bellaterra, 2 de Mayo de 2012.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a las siguientes ayudas institucionales:

Ministerio de Ciencia e Innovación

Proyectos: “La Espectroscopia NIR: una herramienta para la Tecnología Analítica de Procesos (PAT)” (CTQ 2006- 12923). “Desarrollo de nuevas metodologías espectrales para el control analítico de productos y procesos” (CTQ2009-08312).

Universitat Autònoma de Barcelona

Concesión beca PIF

Grupo de Quimiometria Aplicada

Departamento de Química

Universidad Autònoma de Barcelona

Edificio Cn, 08193 Bellaterra

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a las siguientes ayudas privadas:

Croda Ibérica, S.A. (Mevisa Site)

C-35 - Km 72

08945 Fogars de la Selva, Barcelona.

La presente tesis se ha llevado a cabo en el Departamento de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la supervisión del Prof. Marcelo Blanco Romia. Le quiero agradecer la oportunidad de participar en este proyecto que ha dado como resultado esta tesis y la de abrirme las puertas del grupo de Quimiometría Aplicada. Muchas gracias por la confianza depositada en mí.

Quisiera agradecer a la Prof. Hortensia Iturriaga, todo el apoyo y las charlas que hemos mantenido durante estos años, y en especial aquel día de Septiembre de 2006, cuando después de una charla en su despacho, me animó a llamar a la puerta del Prof. Marcelo Blanco, por ello muchas gracias.

De igual modo quisiera hacer extensivo el agradecimiento a los miembros docentes del grupo Manel, Sergio, Jordi y Santi, por todos los momentos vividos año a año y tener siempre abierta la puerta de su despacho.

Desde el inicio de la tesis hasta este momento, por el grupo han pasado por el grupo mucha gente, ahora doctores y futuros doctores. A todos ellos les quiero agradecer el tiempo de este trayecto que hemos compartido. Os deseo que lo que os queda de trayecto sea lo más productivo posible.

Agradecer a Croda Ibérica y en especial a Rufí Mulero por la colaboración, amistad y su buen humor durante estos años. Dar las gracias a Rafael Beneyto y a Miquel Mir, por estos años de colaboración con Croda Ibérica. No quisiera olvidarme de los otros miembros de Croda con los que he ido compartiendo estos años, Manel Ortí, Cristina, Eli y Xesca, gracias a todos.

Agradecer a la Universitat Autònoma de Barcelona por la concesión de una beca PIF.

A mis amigos que siempre han estado ahí y se han interesado por “cómo va la Tesis”. Gracias a todos vosotros.

A mis padres, hermanos y demás familia, gracias o en otras palabras, esta tesis también es vuestra, por todo lo que vosotros sabéis!

Vam iniciar un procés que sabíem que era llarg i amb dificultats, però els resultats han arribat. Veure un somriure en algú t'alegra el dia, el teu m'alegra la vida.

Muchas gracias a todos!

David

A mis padres,

“... son molts anys plens d’afanys ...”

(Fragmento del himno del F.C. Barcelona)

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	
1 Introducción general	5
2 Espectroscopia NIR	11
2.1 Introducción	13
2.2 Fundamentos	14
2.3 Instrumentación	17
2.3.1 Fuente de radiación.....	18
2.3.2 Sistemas de detección de longitudes de onda.....	18
2.3.3 Compartimento de muestra.....	19
2.3.4 Detector.....	19
2.4 Aplicaciones de la espectroscopia NIR en la industria	20
3 Espectrometría de Movilidad Iónica.....	25
3.1 Introducción	27
3.2 Historia de IMS.....	28
3.3 Fundamento teórico.....	33
3.3.1 Movilidad iónica en fase gaseosa a presión atmosférica.....	34
3.3.2 Química iónica en fase gas en IMS.....	37
3.4 Instrumentación	40
3.4.1 Introducción de la muestra	41
3.4.2 Fuentes de ionización.....	44
3.4.3 Obturador de iones	49
3.4.4 Tubo de deriva.....	53
3.4.5 Rejilla de apertura	55
3.4.6 Detector y adquisición de señales.....	56
3.4.7 Miniaturización y tubos de deriva alternativos.....	58

3.5 Parámetros operacionales que afectan al rendimiento en IMS	60
3.5.1 Temperatura.....	60
3.5.2 Humedad	61
3.5.3 Presión.....	62
3.5.4 Campo eléctrico.....	62
3.5.5 Caudales de gas	63
3.5.6 Composición del gas de deriva	64
3.5.7 Densidad iónica	65
3.6 Límites de detección, intervalo lineal y % RSD	65
3.7 Limitaciones y futuros desarrollos en IMS	66
4. Quimiometría.....	67
4.1 Introducción	69
4.2 Etapas del proceso de modelado	70
4.2.1 Selección del conjunto de calibración.....	70
4.2.2 Métodos de referencia	70
4.2.3 Obtención de la señal analítica	71
4.2.4 Pretratamiento de los datos.....	71
4.2.5 Construcción del modelo.....	72
4.2.6 Validación del modelo	72
4.2.7 Predicción de nuevas muestras.....	72
4.3 Análisis cualitativo.....	73
4.3.1 Métodos no supervisados	73
4.3.2 Métodos supervisados	75
4.3.3 Bibliotecas de identificación de espectros.....	78
4.4 Análisis cuantitativo	78
4.5 Resolución Multivariable de Curvas (MCR).....	80
4.6 Diseño de experimentos	81

METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5. Metodología Experimental	87
5.1 Introducción	89
5.2 Procesos químicos y productos estudiados: Descripción y preparación de muestras	89
5.2.1 Reactor	89
5.2.2 Esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico	89
5.2.3 Mezclas adyuvantes para un herbicida	91
5.2.4 Mezclas lubricantes	91
5.2.5 Amidoaminas	93
5.2.6 Comprimidos de Microdiol	94
5.3 Instrumentación y métodos de análisis	94
5.3.1 Espectroscopia NIR	94
5.3.2 Espectrometría IMS	96
5.4 Métodos de referencia	99
5.4.1 Cromatografía de Permeación en Gel	100
5.4.2 Cromatografía HPLC	101
5.5 Programas para el tratamiento quimiométrico de datos	101
6. Resultados y discusión	103
6.1 Seguimiento in-line de un proceso de esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico	106
6.1.1 Determinación de glicerina, ácido esteárico, mono- y diglicéridos mediante PLS	109
6.1.2 Predicción de un proceso in-line	112
6.2 Determinación de componentes de una mezcla adyuvante en formulaciones herbicidas	113
6.2.1 Cuantificación de los componentes de la mezcla adyuvante	117

6.3 Control de calidad para lubricantes	122
6.3.1 Construcción de una biblioteca espectral para la identificación de los lubricantes	125
6.3.2 Construcción de los modelos de calibración PLS	129
6.4 Determinación de impurezas en compuestos cosméticos intermedios.....	133
6.4.1 Desarrollo del método de cuantificación	136
6.4.2 Análisis cuantitativo de muestras de producción	141
6.4.3 Caracterización de las amidoaminas	142
6.5 Mejora de la eficiencia de los análisis por IMS mediante el uso de técnicas multivariantes	146
6.5.1 Parámetros instrumentales que afectan la señal IMS	148
6.5.2 Resolución de señales solapadas. Resultados cualitativos	150
6.5.3 Resultados cuantitativos	151
6.5.4 Uniformidad de contenido	157

CONCLUSIONES	159
---------------------------	-----

ARTICULOS	165
------------------------	-----

I) Study of the lipase-catalyzed esterification of stearic acid by glycerol using in-line near-infrared spectroscopy.

II) Analytical control of adjuvants in herbicide formulations by NIR spectroscopy.

III) Determination of trace impurities in cosmetic intermediates by ion mobility spectrometry.

ANEXOS

I) An analytical method for lubricant quality control by NIR spectroscopy.

II) Improving the efficiency of ion mobility spectrometry analyses by using multivariate calibration.

OBJETIVOS

La mejora de la eficiencia de los procesos de producción es una de las demandas actuales de la industria química y farmacéutica, para asegurar la obtención de productos con una elevada calidad. Esta demanda precisa del desarrollo de metodologías analíticas simples, rápidas, fiables y de bajo coste, que puedan ser utilizadas en rutina. La espectroscopia NIR y la espectrometría de movilidad iónica (IMS) constituyen técnicas idóneas para el control de calidad en productos industriales.

El objetivo propuesto en la presente tesis es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos, para ser utilizados en rutina por la industria, mediante la espectroscopia NIR y la espectrometría de movilidad iónica (IMS). Los trabajos presentados en esta memoria se han agrupado según la técnica empleada, NIR o IMS.

La utilización de la Espectroscopia NIR ha sido ampliamente abordada en nuestro grupo de investigación, en proyectos para la industria, tanto farmacéutica, química, cosmética e inclusive para la industria del cemento. Una de las características más destacables de la técnica NIR es que permite el análisis de muestras con un nulo o mínimo pretratamiento de la misma, lo que simplifica y agiliza considerablemente el trabajo del analista y mejoran las propiedades analíticas de los resultados.

La Espectrometría IMS es una técnica complementaria a la Espectroscopia NIR. Esta realiza la separación de iones en fase gas cuando estos recorren un campo electrostático a contracorriente de un gas de deriva. Entre las características más destacables de la técnica se pueden citar ventajas tales como la alta sensibilidad, rápida respuesta, bajo coste, robustez y portabilidad; todo ello ha permitido su aplicación como herramienta analítica de rutina en una amplia variedad de aplicaciones.

El objetivo general anteriormente anunciado puede desglosarse en los siguientes objetivos más detallados:

- i) Mejorar el conocimiento de los procesos químicos estudiados, así como el desarrollo de métodos analíticos de referencia para la determinación de los parámetros o especies químicas de interés.
- ii) Desarrollo de modelos de calibración multivariables para la determinación de propiedades analíticas de interés. Los modelos desarrollados deben ser robustos y con adecuada capacidad predictiva para poder ser utilizados en el control de procesos industriales.
- iii) Diseño, construcción y validación de bibliotecas espectrales NIR para la identificación de productos espectralmente muy semejantes, para usarlas como alternativa a métodos cuantitativos.
- iv) Estudio y evaluación de la influencia de los factores externos en la respuesta IMS de las diferentes especies, para el posterior desarrollo de métodos analíticos así como la validación de los mismos.
- v) Aplicación de distintas herramientas quimiométricas a los datos IMS con el objeto de mejorar la resolución de la técnica IMS que posibilite la identificación y la determinación cuantitativa de compuestos traza presentes en muestras de diferente complejidad.

INTRODUCCIÓN



1. Introducción general

1. Introducción

Uno de los retos más importantes que, actualmente, tienen las industrias químicas es reducir costos de producción, sin que esto implique una reducción en la calidad final de los mismos. En este sentido, hay que tener en cuenta que los productos finales antes de salir al mercado deben cumplir una serie de especificaciones estrictas, establecidas tanto por el propio mercado como por organismos reguladores y en el caso de no superar estos controles, implicaría la destrucción de dichos productos o su reprocesado para conseguir las propiedades deseadas. Evidentemente, esto constituye un incremento de los costes de producción y un retraso en la llegada del producto final a los mercados.

Por tanto, resulta evidente la creciente necesidad de obtener información analítica no sólo del producto final, sino de todas las etapas anteriores del proceso de producción, incluyendo la recepción de materia prima, el proceso químico en sí mismo, los productos intermedios y por último el producto final. Con un control de calidad continuo en todas las etapas del proceso, la calidad es consecuencia inherente al proceso productivo, por lo que no se pueden producir sorpresas ni obtener productos que no cumplan los requisitos prefijados. Esta metodología de trabajo permite conocer los puntos críticos del proceso, mejorar su calidad y aumentar la productividad, eliminando rechazos y/o reprocesamientos, procurando un control y una mejora de la eficiencia de los procesos.

El tiempo en el análisis es un factor fundamental para el control de calidad, por lo que la industria ha incorporado técnicas analíticas modernas que son rápidas y fiables y de bajo coste, las cuales pueden ser utilizadas durante el proceso de producción. Las técnicas espectroscópicas han demostrado ser apropiadas para el control analítico en el proceso de producción, especialmente la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR).

Una de las características de esta técnica, es el análisis de muestras con un nulo o mínimo pretratamiento, lo que agiliza y simplifica considerablemente el trabajo del analista, lo cual permite ser utilizado en el control de calidad en las distintas etapas del proceso de producción. La gran cantidad de datos que aporta el espectro NIR, además

de que los espectros NIR son bandas anchas y solapadas, precisan del uso de herramientas quimiométricas multivariantes para extraer la información relevante de los espectros NIR. Estos métodos extraen eficazmente la información de los datos, aunque necesitan un adecuado estudio del problema abordado.

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una técnica analítica que se ha utilizado en el pasado para el análisis de explosivos, sustancias estupefacientes y agentes de guerra química. En la actualidad, las aplicaciones de esta técnica analítica se están ampliando considerablemente, incluyendo áreas tan dispares como el sector farmacéutico, análisis clínicos, agroalimentario y medioambiental, entre otros. Esta técnica es una técnica complementaria a la espectroscopia NIR, ofreciendo las ventajas de alta sensibilidad, rapidez, bajo coste y robustez, lo que permite utilizarla como técnica para el control de calidad en rutina.

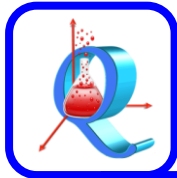
En este sentido, la presente tesis doctoral propone la aplicabilidad de estas técnicas para el control de calidad de muestras de distintos sectores industriales (cosméticos, fitosanitario, lubricantes o fármacos), en distintas etapas del proceso de producción.

Se ha aplicado la espectroscopia NIR para el control de calidad en la etapa de materia prima para la identificación de bases lubricantes mediante una biblioteca espectral NIR. La etapa del proceso de fabricación de ésteres a partir de glicerina y ácido esteárico en presencia de una lipasa de *Candida Antarctica* fue monitorizada con la inmersión de una sonda NIR en el reactor, permitiendo conocer en cada momento el estado de la reacción. La espectroscopia NIR también se ha utilizado en la etapa de control de calidad en productos intermedios y productos finales; se han desarrollado métodos NIR para la cuantificación de la composición de una mezcla para un herbicida, así como la determinación de composición y viscosidades de mezclas lubricantes, con una identificación previa de los lubricantes a partir de una biblioteca espectral NIR.

La técnica IMS se ha empleado para el control de calidad de productos intermedios y productos finales de productos que estaban a muy bajas concentraciones. Se han desarrollado métodos para la determinación de una amina en bajas concentraciones en amidoaminas sintéticas, a lo largo de todo el proceso de fabricación, y para la

identificación y cuantificación de dos principios activos en comprimidos anticonceptivos utilizando diversas herramientas quimiométricas.

En los apartados que siguen a continuación, se describen las características más relevantes de las técnicas analíticas empleadas en esta tesis, así como de las herramientas quimiométricas empleadas en los estudios que se han llevado a cabo.



2. Espectroscopia NIR

2. Espectroscopia NIR

2.1 Introducción

La radiación NIR (*Near-InfraRed*) está comprendida en el intervalo espectral de 780 a 2500 nm del espectro electromagnético, y está situada entre la radiación MIR (*Middle InfraRed*) y la UV-Vis (Figura 2.1).

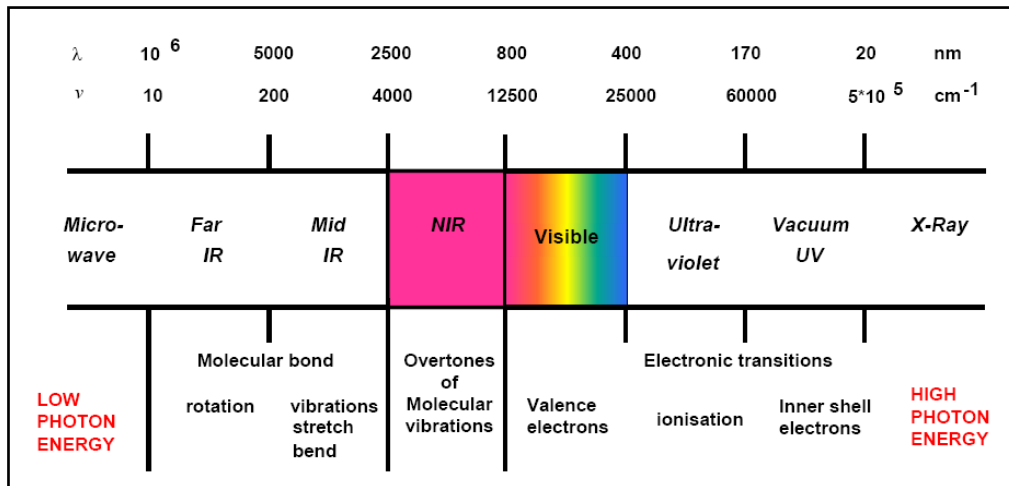


Figura 2.1. Espectro electromagnético

El descubrimiento de la región espectral de infrarrojo cercano se atribuye a Sir William Herschel [1], cuando en el año 1800 examinó la radiación infrarroja a través de la medida de temperatura de los colores creados por el paso de la luz solar a través de un prisma. Sin embargo, hasta casi un siglo más tarde no fue aplicada como técnica analítica cuando Abney y Festing registraron, a finales del siglo XIX, el espectro de líquidos orgánicos en la región espectral comprendida entre 700 y 1200 nm [2]. Los espectroscopistas de la primera mitad del siglo XX dejaron la técnica de lado convencidos del poco interés de esta región con fines analíticos, debido a las características del espectro: bandas anchas, solapadas y de poca intensidad, que dificultaban la asignación visual de bandas a estructuras o grupos funcionales.

¹ Herschel, W. Investigation of the powers of the prismatic colour to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers, *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 90 (1800), 255.

² Abney, W., Festing, E.R. On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 172 (1881), 887-918.

El primer impulso importante no fue hasta la década de los 60, cuando Karl Norris y su grupo de investigación utilizó la espectroscopia NIR para el estudio de muestras complejas de origen natural [3,4]. A partir de ese momento, el interés del NIR como técnica analítica ha ido en aumento.

Los avances tecnológicos y un mayor conocimiento de las herramientas matemáticas (quimiométricas) necesarias para el tratamiento de señales complejas, han hecho posible que en las últimas décadas se hayan desarrollado múltiples aplicaciones en los más diversos campos industriales: alimentario, bioquímico, farmacéutico, petroquímico, polímeros y textil, entre otros. Los motivos que hacen atractiva esta técnica son diversos: permite el registro de sólidos, líquidos y gases; no requiere pretratamiento de muestra; el registro espectral es rápido; es una técnica no destructiva y no invasiva; permite el análisis multicomponente; el análisis de rutina es rápido; la no necesidad de disolventes y por lo tanto la no generación de residuos; se obtiene tanto información química como física de la muestra; a partir de un único conjunto de espectros se pueden establecer calibraciones paralelas para realizar determinaciones multiparamétricas; es una técnica económica y además, permite el análisis en línea de producción.

Dado que el gran desarrollo del NIR se ha producido en los últimos 30 años, se podría esperar que, hoy por hoy, fuese una técnica madura próxima a una fase de estancamiento. Sin embargo, el desarrollo continuo de nuevas técnicas quimiométricas, la miniaturización de los componentes instrumentales, el desarrollo de la espectroscopia NIR de imagen, y la continua aplicación a nuevos campos, hacen que esta técnica esté en plena fase de expansión, siendo la dominadora de las técnicas espectroscópicas en el análisis a tiempo real y el análisis de proceso.

2.2 Fundamentos

La región del infrarrojo comprende el intervalo espectral de 780 – 10⁶ nm, y está dividida en tres subregiones: FIR (*Far InfraRed*) infrarrojo lejano, MIR (*Middle InfraRed*)

³ Norris, K.H. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 7 (1964), 240-242.

⁴ Ben-Gera, I., Norris, K.H. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *J. Food Scienc.* 7 (1968), 240

infrarrojo medio y NIR (*Near InfraRed*) infrarrojo cercano. La absorción en cada una de estas tres regiones es debida a interacciones de diferente naturaleza entre luz y materia (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Regiones del espectro electromagnético en la región del infrarrojo.

Región	Longitud de onda (nm)	Origen de la absorción
NIR	780 – 2500	Sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales
MIR	2500 – 40000	Vibraciones moleculares fundamentales
FIR	40000 - 10 ⁶	Rotaciones moleculares

El movimiento vibratorio de las moléculas puede describirse con el modelo de un oscilador armónico y la energía de los diferentes niveles, que están igualmente espaciados, puede ser calculada mediante la siguiente expresión:

$$E_{\text{vib}} = \left(n + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

donde n es el número cuántico vibracional, h la constante de Planck, k la constante de fuerza y μ la masa reducida de los átomos del enlace. Sólo son posibles las transiciones entre niveles energéticos consecutivos ($\Delta n = \pm 1$) que producen un cambio en el momento dipolar,

$$\Delta E_{\text{vib}} = h\nu$$

donde ν es la frecuencia de vibración fundamental del enlace que origina una banda de absorción en el IR medio.

Pero el modelo del oscilador armónico es incompleto para explicar el comportamiento de moléculas reales debido a que no tiene en cuenta la repulsión coulombica entre los átomos ni la disociación de los enlaces. Por ello, el comportamiento de las moléculas se aproxima más al de un oscilador anarmónico, lo que provoca que los niveles

energéticos no estén igualmente espaciados. De esta manera, la diferencia de energía entre niveles disminuye al aumentar n , y la diferencia de energía entre los estados energéticos es

$$\Delta E_{\text{vib}} = hv [1 - (2n + \Delta n + 1)\gamma]$$

Como consecuencia de la anarmonicidad, pueden darse cambios en los estados energéticos vibracionales en los que $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$. Estas transiciones entre estados vibracionales no contiguos dan lugar a bandas de absorción conocidas como sobretonos (primer y segundo sobretono respectivamente) aproximadamente a múltiplos de la frecuencia de vibración fundamental. Estas transiciones son mucho menos probables que las fundamentales, por lo que la intensidad de las bandas es mucho menor (la banda del primer sobretono es 10 o 100 veces de menor intensidad que la de la frecuencia fundamental, según enlace). Estas bandas aparecen entre 780 y 2000 nm (según el orden del sobretono y el tipo y fuerza del enlace).

Por otra parte, en moléculas poliatómicas pueden interaccionar dos o más modos de vibración que den lugar a cambios simultáneos de energía, originando bandas de absorción llamadas bandas de combinación, cuyas frecuencias son sumas de múltiplos de cada una de las frecuencias que interaccionan. Las bandas de combinación en la región NIR aparecen entre 1900 y 2500 nm.

La intensidad de las bandas NIR depende del cambio de momento dipolar y de la anarmonicidad del enlace. Debido a que el átomo de hidrógeno es el más ligero y, por tanto, el que provoca las vibraciones más amplias y mayores desviaciones del comportamiento armónico, las principales bandas observadas en la región NIR corresponden a enlaces que contienen este átomo y otros átomos ligeros (C-H, N-H, O-H, S-H), siendo las bandas de los enlaces C=O, C-C o C-Cl mucho más débiles o inexistentes. En la Figura 2.2 se muestran las regiones NIR donde absorben los diferentes enlaces.

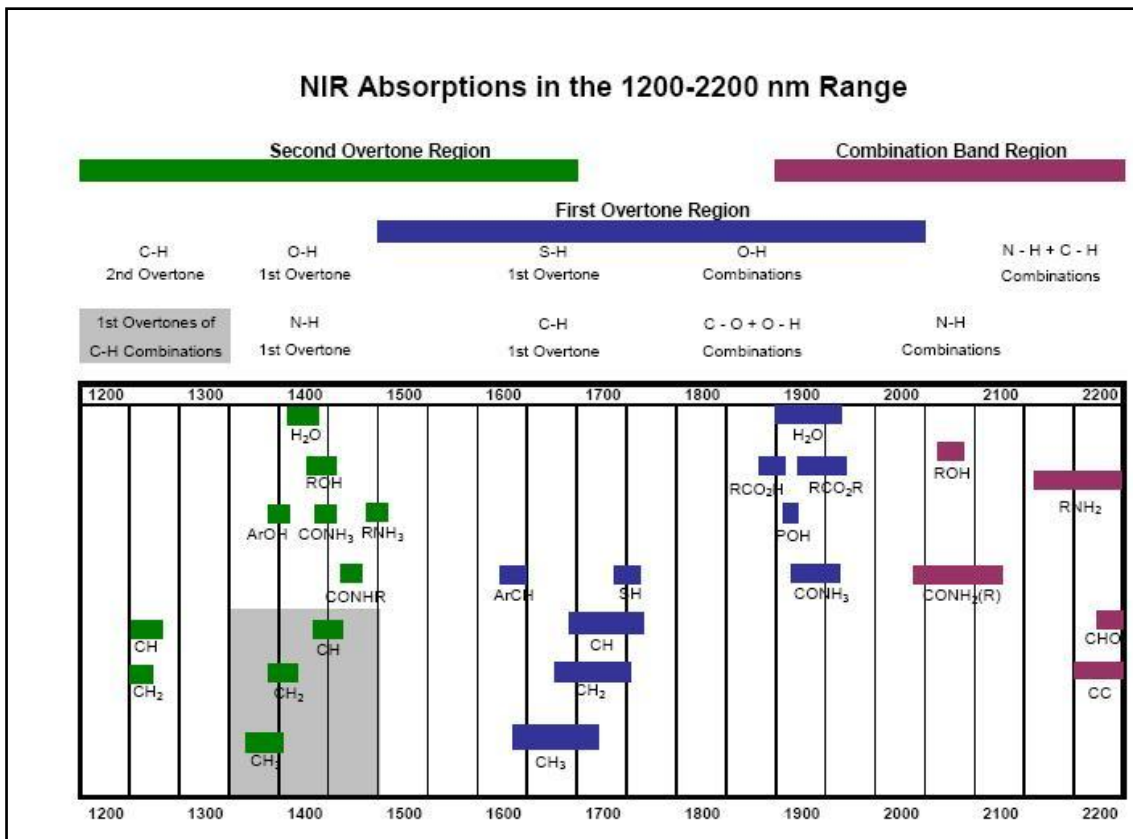


Figura 2.2 Asignación de las bandas de absorción en la región NIR.

Las interacciones entre átomos de diferentes moléculas (puentes de hidrógeno, interacciones dipolares, etc.) modifican los estados energéticos vibracionales, lo que produce desplazamientos en las bandas de absorción así como presencia de bandas debidas a la diferente estructura cristalina. Este efecto permite la diferenciación de formas cristalinas, determinación de propiedades físicas como densidad, viscosidad, tamaño de partícula en sólidos, etc. Es decir, el espectro NIR no sólo contiene información química que permite determinar la composición, sino también información física que permite determinar propiedades físicas de las muestras.

2.3 Instrumentación

El esquema básico de un espectrofotómetro NIR consiste en: una fuente de radiación, un sistema de selección de longitud de onda, un compartimento de muestra y un detector. A continuación se describen con más detalle cada una de las diferentes partes integrantes de un instrumento NIR.

2.3.1 Fuente de radiación

La lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo, continúa siendo la fuente de radiación más utilizada en espectroscopia NIR por su buen funcionamiento, robustez, coste y, proporcionando un espectro continuo en la región 320-2500 nm. Otras fuentes de radiación son los LED (*Light Emitting Diodes*), atractivos por su eficacia, pequeño tamaño y temperatura de operación, pero que solo pueden emitir hasta los 1600 nm. Las lámparas halógenas requieren de un sistema de selección de longitudes de onda, sin embargo los LEDs no.

2.3.2 Sistema de detección de longitudes de onda

Disponer de un sistema adecuado de selección de longitudes de onda es un factor importante para poder obtener un buen nivel de sensibilidad. Un buen sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de:

- Proporcionar una anchura de banda exacta con respecto la banda de absorción que se está midiendo.
- Proporcionar señales intensas a fin de conseguir una relación señal/ruido satisfactoria.

En función del dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, los instrumentos NIR pueden ser clasificados en sistemas dispersivos o no dispersivos.

Dentro de los equipos dispersivos, los sistemas de selección de longitud de onda más utilizados son los monocromadores, constituidos por un conjunto de colimadores de los haces de entrada y salida, junto con un elemento dispersante. Esta es la parte fundamental del sistema, ya que permite la descomposición del haz incidente por efecto de interacciones constructivas y destructivas. Los elementos dispersantes más utilizados son las redes de difracción.

El conjunto de sistemas no dispersivos es más amplio debido a su mayor utilización en la actualidad. Dispone de equipos con filtros adicionales, con filtros optoacústicos (AOTF) e instrumentos de transformada de Fourier (FT), ambos con características bastante diferentes entre sí. La selección de longitudes de onda mediante filtros se

realiza interponiendo materiales específicos entre la muestra y la fuente de radiación, permitiendo el paso de longitudes de onda selectivas.

2.3.3 Compartimento de muestra

El compartimento de muestra es la parte del espectrofotómetro que más depende de la aplicación. La espectroscopia NIR tiene una gran versatilidad y adaptabilidad para el análisis de muestras de diversa naturaleza, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, debido a la existencia de múltiples módulos de medida adaptados a cada tipo de muestra. Así, se pueden realizar medidas *at*, *on e in-line* para múltiples tipos de muestra, variando el camino óptico y el sistema de medida según la necesidad, ya sea con compartimentos adaptados o mediante sondas de fibra óptica, con instrumentación portátil o fija, etc.

Existen tres tipos de registro de espectros NIR: Transmitancia, Reflectancia y Transflectancia. En la Figura 2. se muestra un esquema de los tres tipos de diseño instrumental NIR. El haz de luz que emite la fuente de radiación atraviesa el correspondiente sistema de selección de longitudes de onda. En las medidas por Reflectancia (sólidos y semisólidos), el haz de luz es reflejado por la propia muestra y hasta llegar al detector. En modo Transmitancia (gases, líquidos, semilíquidos y sólidos), el haz de luz atraviesa la muestra desde la fuente de radiación hasta el detector. Finalmente, un caso intermedio lo ocupa las medidas por Transflectancia (líquidos y semilíquidos), donde el haz de luz atraviesa la muestra y se refleja en un reflector que está en contacto con la misma, hasta de nuevo llegar al detector.

2.3.4 Detector

Los detectores empleados en espectroscopia NIR son construidos con materiales semiconductores como InGaAs, InAs, InSb, PbS o Si. El material más utilizado en la región 1100-2500 nm es el PbS, mientras que en la región más próxima al visible (780 – 1100 nm) se emplea generalmente el de Si. Los detectores de InGaAs son buenas

alternativas a los detectores de PbS ya que ofrecen mayor respuesta, pero con el inconveniente de que la temperatura de trabajo óptima es de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5].

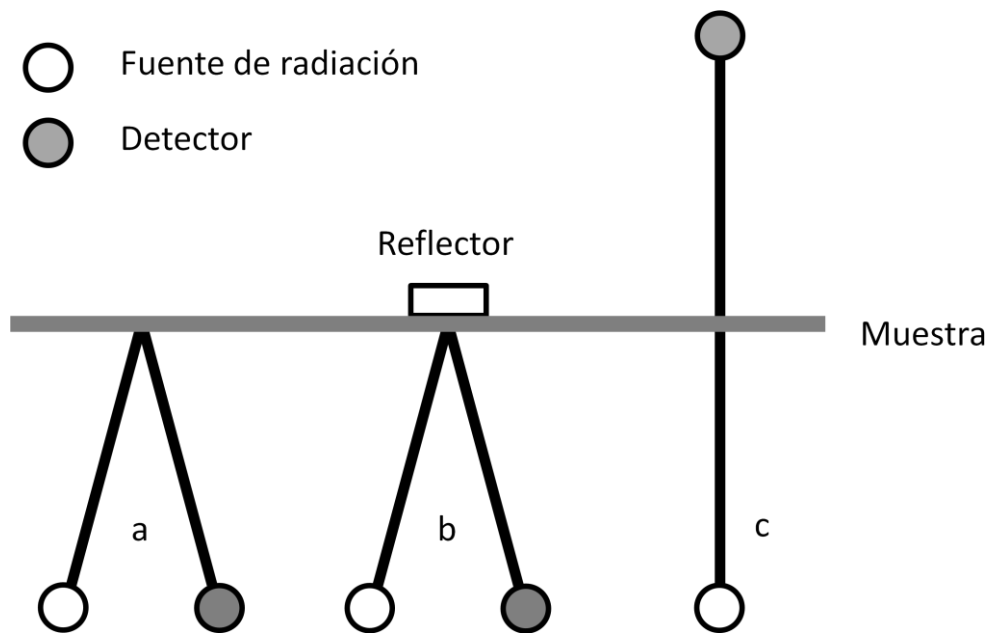


Figura 2.3 Esquema de los tres diseños de equipos NIR. a) Reflectancia, b) Transflectancia y c) Transmitancia.

2.4 Aplicaciones de la espectroscopia NIR en la industria

Las ventajas mencionadas anteriormente, logradas gracias al actual grado de desarrollo de la espectroscopia NIR unido a los avances en quimiometría, han provocado que muchos de los sectores industriales en los que interviene la química analítica se hayan fijado en esta técnica como técnica de análisis para el control de rutina, tanto de procesos, como en el control de calidad de producto acabado.

El espectro NIR contiene tanto información química como física de la muestra analizada. Así es posible desarrollar métodos para la discriminación de una muestra respecto otra mediante el análisis cualitativo. Esta aplicación, es especialmente útil en la identificación de materias primas. La posibilidad de dar una conformidad rápida en el mismo lugar de las materias primas, permite acelerar el inicio del proceso de producción de cualquier producto. Las bibliotecas espectrales permiten realizar

⁵Stark, E. Luchter, K. Diversity in NIR instrumentation. Proceedings of the 11th International Conference on Near-Infrared spectroscopy. *NIR Publications* (2004) 13.

identificaciones de muestras de muy distintos tipos, así como discriminar incluso entre distintos proveedores del mismo producto [6,7,8].

El campo agroalimentario fue el primer sector que adoptó en la década de los 60 la espectroscopia NIR como técnica de análisis [4,9]. En la actualidad continua utilizándose la espectroscopia NIR en el campo agroalimentario como técnica analítica para la determinación de multitud de parámetros [10,11,12,13,14,15].

Por otro lado, en el campo petroquímico es muy importante la reducción del tiempo de análisis para la determinación de la composición química y/o propiedades físicas de los productos. Actualmente existen numerosas publicaciones relativas al análisis de hidrocarburos combustibles, fracciones de petróleo, polímeros y otros derivados del petróleo en las que se evalúan con mayor rapidez los parámetros que caracterizan estos productos, obteniendo la total caracterización de la muestra en un corto intervalo de tiempo. Reboucas *et al.* y Balabin *et al.* utilizaron recientemente la espectroscopia NIR para la determinación de la composición y parámetros físicos en la

⁶ Blanco, M., Romero, M.A. Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: a solution for identity confirmation. *Analyst*, 126 (2001) 2212-2217.

⁷ Chong, X.M, Hu, C.Q., Feng, Y.C., Pang, H.H. Construction of a universal model for non-invasive identification of cephalosporins for injection using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 196-203.

⁸ Chu, X.L., Xu, Y.P., Tian, S.B., Wang, J., Lu, W.Z. Rapid identification and assay of crude oils based on moving-window correlation coefficient and near infrared spectral library. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 107 (2011) 44-49.

⁹ Birth, G.S, Norris, K.H. An instrument using light transmittance for non-destructive measurement of fruit maturity. *Food Technol.* 12 (1958), 592

¹⁰ Pizarro, C., Esteban-Díez, I., González-Sáiz, J.M., Forina, M. Use of near-infrared spectroscopy and feature selection techniques for predicting the caffeine content and roasting color in roasted coffees. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7477-7488

¹¹ Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. Quality control of agrochemical formulations by diffuse reflectance near infrared spectrometry. *J. Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 129-137.

¹² Sørensen, L.K. Application of reflectance near infrared spectroscopy for bread analyses. *Food Chem* 113 (4) (2009) 1318-1322.

¹³ Flores-Rojas, K., Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. Quantitative assessment of intact green asparagus quality by near infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. and Tech.* 52(3) (2009) 300-306.

¹⁴ Prevolnik, M., Škrlep, M., Janeš, L., Velikonja-Bolta, S., Škorjanc, D., Čandek-Potokar, M. Accuracy of near infrared spectroscopy for prediction of chemical composition, salt content and free amino acids in dry-cured ham. *Meat Sci.* 88(2) (2011) 299-304.

¹⁵ Plans, M., Simó, J., Casañas, F., Sabaté, J. Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Seed Coats of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A Potential Tool for Breeding and Quality Evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 60 (3) (2012) 706-712

síntesis de productos aromáticos y biodieseles [16,17]. Balabin *et al.* en otro estudio utilizó la espectroscopia NIR para la clasificación de diversos biodieseles según el aceite de partida, usando diversas herramientas quimiométricas de clasificación [18]. En el campo de los polímeros también se ha empleado la espectroscopia NIR para la monitorización de procesos [19,20].

Debido a su destino final, el control de los productos farmacéuticos es exhaustivo, y para ello se deben realizar un gran número de análisis que abarcan las diferentes etapas del proceso de fabricación. Este sector está muy regulado por organismos nacionales como internacionales, como son la *European Medicines Agency* (EMA) [21] y la *International Conference on Harmonisation* (ICH) [22]. Para controlar estas etapas, las industrias farmacéuticas han adoptado la espectroscopia NIR como técnica de análisis. Mediante accesorios adecuados disponibles comercialmente, los espectros de las materias primas pueden ser registrados en el mismo almacén donde se reciben, sin necesidad de transportar la muestra al laboratorio y, haciendo uso de bibliotecas, se puede realizar su análisis cualitativo [6]. Otro factor que permite agilizar el análisis de estos productos mediante espectroscopia NIR es la posibilidad de determinar su composición en las diferentes fases de producción intermedias, evitando producir productos fuera de especificaciones. En este sentido se han desarrollado metodologías

¹⁶ Reboucas, M.V., dos Santos, J.B., Domingos, D., Massa, A.R.C.G. Near-infrared spectroscopic prediction of chemical composition of a series of petrochemical process streams for aromatics production. *Vib. Spectrosc.* 52(1) (2010) 97-102.

¹⁷ Balabin, R.M., Lomakina, E.I., Safieva, R.Z. Neural network (ANN) approach to biodiesel analysis: Analysis of biodiesel density, kinematic viscosity, methanol and water contents using nearinfrared (NIR) spectroscopy. *Fuel*, 90 (5) (2011) 2007-2015.

¹⁸ Balabin, R.M., Safieva, R.Z. Biodiesel classification by base stock type (vegetable oil) using near infrared spectroscopy data. *Anal. Chim. Acta* 689(2) (2011) 190-197.

¹⁹ de Faria Jr., J.M., Machado, F., Lima, E.L., Pinto, J.C. In-line monitoring of vinyl chloride suspension polymerization with near infrared spectroscopy, 2- Design of an advanced control strategy. *Macromol. React. Eng.* 4(8) (2010) 486-498.

²⁰ Silva, W.K., Chicoma, D.L., Giudici, R. In-situ real-time monitoring of particle size, polymer, and monomer contents in emulsion polymerization of methyl methacrylate by near infrared spectroscopy. *Polym. Eng. Sci.* 51 (10) (2011) 2024-2034.

²¹ Guideline on the use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations. (Draft 2012). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/02/WC500122769.pdf

²² International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidelines. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2010, Section Q2(R1).

basadas en espectroscopia NIR capaces de controlar la composición de un preparado farmacéutico, en las que a pesar de que en las diferentes etapas de fabricación el producto se encuentra en una forma física distinta (granulado, comprimido y lacado), a partir de un único modelo de calibración se puede determinar el contenido de principio activo en cada una de ellas [23,24,25,26,27,28]. En 2010, Blanco *et al.* publicaron un trabajo sobre el desarrollo de una nueva metodología para la construcción de modelos de calibración sin la necesidad de utilizar ningún método de referencia para determinar la cantidad de principio activo, solamente añadiendo al espectro de las muestras en polvo el espectro proceso [29]. A pesar de no ser una técnica enantioselectiva, en muchas ocasiones los principios activos presentan distintas formas polimórficas, a partir de las cuales es posible su determinación o monitorización mediante la espectroscopia NIR [30,31,32].

La utilización de la espectroscopia NIR también ha demostrado ser efectiva en el campo clínico y biomédico, como en la determinación de niveles de diferentes

²³ Moes, J.J., Ruijken, M.M., Gout, E., Frijlink, H.W., Ugwoke, M.I. Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108-118.

²⁴ Sarraguça, M.C., Lopes, J.A. Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line. *Vibr. Spectrosc.* 49(2) (2009) 204-210.

²⁵ Blanco, M., Peguero, A. Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52(1) (2010) 59-65.

²⁶ Blanco, M., Cueva-Mestanza, R., Peguero, A. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51(4) 2010 797-804.

²⁷ De Beer, T., Burggraeve, A., Fonteyne, M., Searens, L., Remon, J.P., Vervaet, C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int. J. Pharm.* 417 (2010) 32-47.

²⁸ Vanarase, A.U., Alcalà, M., Jerez Roza, J.I., Muzzio, F., Romañach, R. J. Real-time monitoring of drug concentration in a continuous powder mixing process using NIR spectroscopy. *Chem. Eng. Sci.* 65 (2010) 5728-5733.

²⁹ Blanco, M., Peguero, A. Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29(10) (2010) 1127-1136.

³⁰ Hu, Y., Erxleben, A., Ryder, A.G., McArdle, P. Quantitative analysis of sulfathiazole polymorphs in ternary mixtures by attenuated total reflectance infrared, near-infrared and Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53(3) (2010) 412-420.

³¹ Ziémons, E., Bourich, H., Mantanus, J., Rozet, E., Lebrun, P., Essassi, E., Cherrah, Y., Bouklouze, A., Hubert, Ph. Determination of binary polymorphic mixtures of fluconazole using near infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction: A comparative study based on the pre-validation stage results. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55(5) (2011) 1208-1212.

³² Wang, I.Ch., Lee, M.J., Seo, D.Y., Lee, H.E., Choi, Y., Kim, W.S., Kim, Ch. S., Jeong, M.Y., Choi, G.J., Polymorph transformation in paracetamol monitored by in-line NIR spectroscopy during a cooling crystallization process. *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 764-770.

parámetros en sangre indicativos de determinadas patologías o en la monitorización del nivel de oxígeno en tejidos durante procesos quirúrgicos [33,34,35,36].

Un sector que ha tenido un auge importante es el sector medioambiental, sobre todo para la determinación de varios factores físicos, químicos y bioquímicos en suelos [37,38,39]. Otros sectores que han utilizado la espectroscopia NIR son la industria del curtido de pieles [40] y la industria del papel [41].

Como hemos visto, la aplicación de la espectroscopia NIR se aplica en el control de procesos industriales en varias etapas: control de calidad de materia prima, mediante bibliotecas de identificación, monitorización de procesos y control de calidad del producto intermedio o final (determinación de parámetros físicos y químicos).

En la presente tesis se ha empleado la espectroscopia NIR como técnica analítica en estas etapas de producción, desde la construcción de bibliotecas espectrales para la identificación de distintos productos, el seguimiento y monitorización de un proceso industrial, hasta el control de calidad de diversos productos en la determinación de parámetros físicos y químicos.

³³ Virtanen, J., Noponen, T., Meriläinen, P. Comparison of principal and independent component analysis in removing extracerebral interference from near-infrared spectroscopy signals. *J. Biomed. Opt.* 14(5) (2009) 1-10.

³⁴ Murkin, J.M., Arango, M. Near-infrared spectroscopy as an index of brain and tissue oxygenation. *Brit. J. Anaesth.* 103 (2009) i3-i13.

³⁵ Zweifel, C., Castellani, G., Czosnyka, M., Helmy, A., Manktelow, A., Carrera, E., Brady, K.M., Hutchinson, P.J.A., Menon, D.K., Pickard, J.D., Smielewski, P. Noninvasive monitoring of cerebrovascular reactivity with near infrared spectroscopy in head-injured patients. *J. Neurotrauma*, 27 (2010) 1951-1958.

³⁶ Takahashi, T., Takikawa, Y., Kawagoe, R., Shibuya, S., Iwano, T., Kitazawa, S. Influence of skin blood flow on near-infrared spectroscopy signals measured on the forehead during a verbal fluency task. *Neuroimage*. 57 (3) (2011) 991-1002.

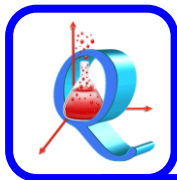
³⁷ Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K.M., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J. Near infrared spectroscopy for determination of various physical chemical and biochemical properties in Mediterranean soils. *Soil Biol. Biochem.* 40 (7) (2008) 1923-1930.

³⁸ Moros, J., Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., Garrigues, S., de la Guardia, M. Testing of the Region of Murcia soils by near infrared diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics, *Talanta*, 78 (2009) 388-398.

³⁹ Peltre, C., Thuriès, L., Barthès, B., Brunet, D., Morvan, T., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Houot, S. Near infrared reflectance spectroscopy: a tool to characterize the composition of different types of exogenous organic matter and their behavior in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43(1) (2011) 197-205.

⁴⁰ Cantero, R., Canals, T., Iturriaga, H. Near infrared reflectance spectroscopy as a tool for the control of sheep leather defatting. *Talanta*, 71(4) (2007) 1690-1695.

⁴¹ Riba, J.R., Canals, T., Cantero, R., Iturriaga, H. Potential of infrared spectroscopy in combination with extended canonical variate analysis for identifying different paper types. *Meas. Sci. Technol.* 22(2011) 025601.



3. Espectrometría de Movilidad Iónica

3. Espectrometría de Movilidad Iónica (IMS – Ion Mobility Spectrometry)

3.1 Introducción

La espectrometría de Movilidad Iónica (IMS, *Ion Mobility Spectrometry*), también conocida como *plasma chromatography*, es una técnica analítica de separación de iones en fase gas, en la cual la separación se lleva a cabo en la escala de milisegundos. La separación de los compuestos ionizados se fundamenta en el diferente tiempo utilizado por el ion, en recorrer un tubo de deriva bajo la acción de un campo eléctrico constante y en contracorriente de un gas inerte; este tiempo depende de la carga, masa, tamaño y la forma del mismo. Esta técnica es similar a la espectrometría de masas – tiempo de vuelo (TOF-MS, *Time Of Flight–Mass Spectrometry*), con la diferencia que la separación se produce a presión atmosférica, lo que simplifica notablemente la instrumentación y permite separar los compuestos por tamaño y forma. IMS ofrece las ventajas de alta sensibilidad, rápida respuesta, bajo coste, robustez y portabilidad; estas propiedades han permitido su uso como herramienta analítica de rutina para la detección de sustancias traza en una amplia variedad de aplicaciones, tales como en el campo militar y de seguridad [42,43], ciencia forense [44,45,46], alimentarias [47,48,49,50], farmacéuticas [51,52,53,54,55] o de monitorización de procesos [56,57].

⁴² Ewing, R.G., Atkinson, D.A., Eiceman, G.A., Ewing, G.J. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta*, 54(3) (2001) 515-529.

⁴³ Buxton, T.L., Harrington, P.B. Rapid multivariate curve resolution applied to identification of explosives by ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 434(2) (2001) 269-282.

⁴⁴ Keller, T., Schneider, A., Tutsch-Bauer, E., Jaspers, J., Aderjan, R., Skopp, G. Ion mobility spectrometry for the detection of drugs in cases of forensic and criminalistic relevance. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2(1) (1999) 22-34.

⁴⁵ Kanu, A.B., Hill Jr., H.H., Identity confirmation of drugs and explosives in ion mobility spectrometry using a secondary drift gas. *Talanta*, 73 (2007) 692-699.

⁴⁶ Dussy, F.E., Berchtold, C., Briellmann, T.a., Lang, C., Steiger, R., Bovens, M. Validation of an ion mobility spectrometry (IMS) method for the detection of heroin and cocaine on incriminated material. *Forensic, Sci. Int.* 177 (2008) 105-111.

⁴⁷ Jafari, M.T., Determination and identification of malathion, ethion and dichlorovos using ion mobility spectrometry. *Talanta*, 69 (2006) 1054-1058.

⁴⁸ Jafari, M.T., Khayamian, T., Shaer, V., Zarei, N. Determination of veterinary drug residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 581 (2007) 147-153.

⁴⁹ Alonso, R., Rodríguez-Estévez, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J., Arce, L., Valcárcel, M., Ion mobility spectrometry of volatile compounds from iberian pig fat for fast feeding regime authentication. *Talanta*, 76 (2008) 591-596.

⁵⁰ Vautz, W., Zimmermann, D., Hartmann, M., Baumbach, J.I., Nolte, J., Jung, J. Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 1064-1073.

3.2 Historia de IMS

El fenómeno de descargas eléctricas en aire y otros gases fue explorado en centros de investigación de Inglaterra y Alemania, desde mediados hasta finales del siglo XIX. Estas experiencias llevaron a la conclusión que los gases, que eran aislantes, se podían transformar a especies conductoras de la electricidad utilizando varios métodos. Los investigadores pioneros, entendieron que estos cambios en la conductividad del aire, eran debido a la formación de electrones e iones en estado gas. Este descubrimiento permitió cuestionarse aspectos como la estructura de la materia y la identidad de los iones; de esta manera los gases podían ser ionizados al ser expuestos por los rayos X. En este campo, a finales del siglo XIX, Ernest Rutherford consiguió medir la movilidad de los iones formados [58]. Entre 1890 y 1938 se realizaron estudios respecto a la movilidad de los iones en fase gas y la instrumentación, lo que condujo a un mejor entendimiento del significado obtenido en las movilidades de los iones. Estos descubrimientos se encuentran resumidos en un volumen monográfico elaborado por Rutherford y Thomson en 1928 [59]. Anteriormente, Lattey había descrito en sus estudios, la movilidad de los iones, la formación de clústeres o agrupaciones de moléculas, entre los iones y moléculas de gases neutros. En su trabajo quedaba

⁵¹ Stregge, M.A., Kozerski, J., Juarbe, N., Mahoney, P. At-line quantitative ion mobility spectrometry for direct analysis of swabs for pharmaceutical manufacturing equipment cleaning verification. *Anal. Chem.* 80 (2008) 3040–3044.

⁵² Qin, C., Granger, A., Papov, V., McCaffrey, J., Norwood, D.L. Quantitative determination of residual active pharmaceutical ingredients and intermediates on equipment surfaces by ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 107–113.

⁵³ Fernández-Maestre, R., Hill, H.H. Ion mobility spectrometry for the rapid analysis of over-the-counter drugs and beverages. *Int. J. Ion Mobility Spectrom.* 12 (2009) 91–102.

⁵⁴ Dwivedi, P., Wu, C., Matz, L.M., Clowers, B.M., Siems, W.F., Hill Jr., H.H. Gas-Phase chiral separations by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 78 (2006) 8200–8206.

⁵⁵ O'Donell, R.M., Sun, X., Harrington, P.B. Pharmaceutical applications of ion mobility spectrometry. *TrAC*, 27 (1) (2008) 44-53.

⁵⁶ Vautz, W., Mauntz, W., Engell, S., Baumbach, J.I., Monitor of emulsion polymerization processes using ion mobility spectrometry – a pilot study. *Macromol. React. Eng.* 3 (2009) 85–90.

⁵⁷ Harry, E.L., Bristow, A.W.T., Wilson, I.D., Creaser, C.S., Real-time reaction monitoring using ion mobility spectrometry. *Analyst*, 136 (2011) 1728–1732.

⁵⁸ Rutherford, E., The velocity and rate of recombination of the ions of gases exposed to Röntgen radiation. *Phil. Mag.* 44 (1897) 422-440.

⁵⁹ Thomson, J.J.; Rutherford, G.P., Conduction of electricity through gases, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1928.

reflejado que, en presencia de trazas de vapor de agua, las velocidades de los iones negativos dependían de los niveles de humedad [60,61].

A principios del siglo XX, tres desarrollos específicos fueron importantes para la contribución y los avances posteriores en las medidas de movilidad y los análisis IMS. En primer lugar, el tratamiento teórico de la movilidad iónica y los experimentos efectuados por Paul Langevin permitieron evidenciar la naturaleza de colisiones del proceso, así como poner de manifiesto la importancia de las fuerzas de atracción sobre el área efectiva de colisión y la relevancia de las interacciones ion-molécula en el proceso de movilidad [62,63]. Un segundo desarrollo fue la implementación de sistemas de introducción de iones de manera discontinua, mediante obturadores de iones, muy similares a los que se utilizan en la actualidad. Los obturadores de iones con conductores paralelos fueron descritos por Cravath y van de Graaff [64,65]. Bradbury, años después, desarrolló este método con un campo lineal y un diseño de dos obturadores [66]. Esta innovación fue empleada posteriormente a 1970 y actualmente se sigue utilizando en los equipos IMS. Finalmente, en tercer lugar, se profundizó en el conocimiento de los efectos que tienen los campos eléctricos y la presión de los gases en la movilidad iónica, lo que permitió la mejora de la técnica y el desarrollo de nuevos modos de IMS, como por ejemplo, la que actualmente emplea campos eléctricos de alto voltaje.

A pesar de los prometedores inicios de la técnica IMS, esta fue desplazada progresivamente por la Espectrometría de Masas (MS – Mass Spectrometry), una técnica de gran potencial, que al trabajar a vacío estaba libre de las interferencias debidas a reacciones químicas secundarias. Tras este periodo de desinterés, el

⁶⁰ Lattey, R.T., Tizard, H.T., The velocity of ions in dried gases. *Proceedings of the Royal Society of London (A)* 86 (1913) 349-357.

⁶¹ Lattey, R.T., Effect of small traces of water vapor on the velocities of the ions produced by Röntgen rays in air. *Proceedings of the Royal Society of London (A)* 84 (1911) 173-181.

⁶² Langevin, P., L'ionisation des Gaz. *Ann. de Chim. Phys.* 28 (1903) 289-384.

⁶³ Langevin, P., Une formule fondamentale de théorie cinétique. *Ann. de Chim. et de Phys.* 5 (1905) 245-288.

⁶⁴ Cravath, A.M., The rate of formation of negative ions by electron attachment. *Phys. Rev.* 33 (1929) 605-613.

⁶⁵ van de Graaff, R. J., Mobility of ions in gases. *Nature*, 124 (1929) 10-11.

⁶⁶ Bradbury, N.E.; Nielsen, R.A., Absolute values of the electron mobility in hydrogen. *Phys. Rev.* 49 (1936) 388-393.

desarrollo de un detector de sustancias orgánicas en la atmósfera por parte de Lovelock en 1948 [67], supuso un renovado impulso a la técnica IMS. Este detector, denominado anemómetro de vapor, estaba basado en la generación de iones a presión atmosférica mediante una fuente radiactiva y su posterior detección, siendo la base para el desarrollo del actual detector de captura electrónica (ECD – *Electron Capture Detection*) [68]. La importancia de los estudios de Lovelock en la polución del aire era la existencia de asociaciones entre la composición de las muestras de vapor, tal como impurezas traza en el aire ambiente, y los iones creados en la fuente de emisión beta.

A mediados de la década de los 60, Martin Cohen y colaboradores desarrollaron muchas patentes para IMS, trabajando para Franklin GNO (*gnostis*, conocimiento en griego) y fueron financiados por los servicios militares para la investigación en monitorización química [69]. Los desarrollos efectuados en esta compañía llevaron a una descripción de la técnica IMS, la llamada Cromatografía en Plasma (*Plasma Chromatography*TM). Esta técnica analítica resultante recibió el nombre de cromatografía en plasma debido a que se lleva a cabo una separación de iones (plasma), que se asemeja a la separación de compuestos que tienen lugar en un sistema cromatográfico. El primer equipo comercial estuvo disponible a principios de la década de los 70, el cual estaba compuesto básicamente por una zona de ionización comunicada con otra zona de movilidad a través de un orificio para el muestreo iónico, todo ello a presión atmosférica [70,71].

Durante los años siguientes y hasta principios de 1990, se fue ampliando el número de aplicaciones de esta técnica, fundamentalmente por el grupo de Karasek [71,72]. Se solventaron los problemas más importantes de los analizadores de IMS, que fundamentalmente se debían a la formación de agrupamientos iónicos y a la existencia de efecto memoria, originados sobre todo por el excesivo tiempo de residencia de los

⁶⁷ Lovelock, J.E., The electron-capture detector – a personal odyssey, in *Electron Capture*, Zlatkis, A.; Poole, C.F., Eds., Elsevier, New York, 1981, pp. 13-26.

⁶⁸ Lovelock, J.E., Wasilewska, E.M., An ionization anemometer. *J. Sci. Instr.* 26 (1949) 367-370.

⁶⁹ http://www.patentmaps.com/assignee/Franklin_GNO_1.html

⁷⁰ Cohen, M.J. Plasma chromatography – a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittsburgh, 1969.

⁷¹ Cohen, M.J., Karasek, F.W. Plasma chromatographyTM – a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 330-337.

⁷² Karasek, F.W. The plasma chromatography. *Res & Dev.* 21 (1970) 34-37.

iones dentro del analizador. Así, Baim y Hill, eliminaron estas limitaciones con el desarrollo de un tubo de deriva con flujo de arrastre unidireccional, para minimizar el tiempo de residencia de las especies neutras en la fuente de ionización; en este esquema, el gas de deriva se introduce en el tubo de deriva por la zona del detector, atraviesa el tubo de deriva y es expulsado al exterior; el volumen de la zona de ionización es rápidamente purgada del exceso o de la muestra no utilizada, mediante el flujo unidireccional del gas de deriva [73] (Figura 3.1). De este modo, el tiempo de residencia en la zona de ionización es fijo y limitado, y la zona de deriva es mantenida libre de muestra. Esta nueva metodología permitió prevenir las reacciones de agrupamientos iónicos, el efecto memoria y el tiempo de residencia de la muestra en la zona de ionización.

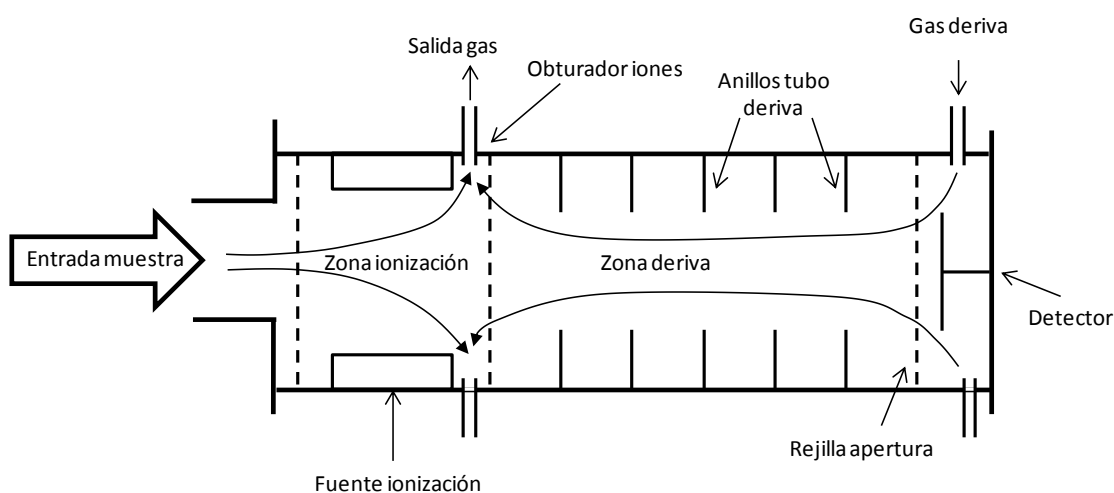


Figura 3.1 Esquema de un equipo IMS donde se muestran los flujos de gas de arrastre y de deriva.

El tamaño de los dispositivos IMS fue reduciéndose para ser utilizados de manera portátil, para la detección de explosivos y agentes de guerra química (*CWA – Chemical Warfare Agents*). Desafortunadamente, la investigación militar y el desarrollo tecnológico en IMS fueron, y sigue siendo confidencial, y por consiguiente poco de este trabajo está reportado en la bibliografía científica, aunque reactivaron el interés de la técnica IMS como una técnica analítica moderna.

El asentamiento definitivo y difusión de lo que se podría denominar IMS moderna se inicia en la década de 1990 y llega hasta el momento actual. En este período la técnica

⁷³ Baim, M.A., Hill, H.H., Jr., Tunable selective detection for capillary gas chromatography by ion mobility monitoring. *Anal. Chem.* 54(1) (1982), 38-43.

IMS es un campo muy activo, como lo demuestra la celebración de congresos anuales desde 1992 [74], la constitución en 1996 de la “International Society of Ion Mobility Spectrometry”, la publicación de un libro monográfico [75], así como la edición desde 2008 de la publicación dedicada exclusivamente a esta técnica, la “*International Journal for Ion Mobility Spectrometry*”.

El número creciente de investigadores interesados en la técnica IMS ha posibilitado importantes mejoras desde el punto de vista instrumental, tales como detectores más rápidos [76], analizadores más pequeños [77], y el uso de instrumentos con alto voltaje [78], reflejándose en numerosas y recientes revisiones de la técnica [79,80,81,82,83,84,85]. De igual forma, los campos de aplicación se han centrado en las áreas medioambiental e industrial, expandiéndose hasta los análisis de drogas y explosivos. El uso de analizadores IMS en la detección de explosivos en equipaje de pasajeros en la aviación comercial es el primer uso visible fuera del campo militar. Hoy en día, se pueden apreciar estos dispositivos instalados en puertas o arcos de seguridad en los aeropuertos. Los equipos comerciales pueden ser únicamente IMS (portátil o de laboratorio), o acoplada a la MS denominándose entonces espectrometría de masas de movilidad iónica (IMS-MS), así como GC-IMS (*Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry*), MCC-IMS (*Multi-Capillary Columns – Ion*

⁷⁴ <http://www.isims.info/history-isims.html>

⁷⁵ Eiceman, G.A., Karpas, Z, Ion mobility spectrometry, CRC Press, Boca Raton, 2005.

⁷⁶ Denson, S., Denton, B., Sperline, R., Rodacy, P., Gresham, C. Ion mobility spectrometry utilizing micro-faraday finger array detector technology. *Int. J. Ion Mobility Spectrom.* 5 (2002) 100-103.

⁷⁷ Spangler, G.E. Fundamental considerations for the application of miniature ion mobility spectrometry to field analytical applications. *Field Anal. Chem. Technol.* 4(5) (2000) 255-267.

⁷⁸ Buryakov, I.A., Krylov, E.V., Nazarov, E.G., Rasulev, U.Kh. A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 128 (1993) 143-148.

⁷⁹ Collins, D.C., Lee, M.L. Developments in ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 66-73.

⁸⁰ Creaser, C.S., Griffiths, J.R., Bramwell, C.J., Noreen, S., Hill, C.A., Thomas, C.L.P. Ion mobility spectrometry: a review. Part 1. Structural analysis by mobility measurement. *Analyst*, 129 (2004) 984 - 994.

⁸¹ Bordsdorf, H. Eiceman, G.A., Ion mobility spectrometry: Principles and applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* 41(4) (2006) 325-375.

⁸² Kolakowski, B.M., Mester, Z. Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS). *Analyst*, 132 (2007) 842-864.

⁸³ Kanu, A.B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., Hill Jr, H.H. *Mass Spectrom.*, 43 (2008) 1-22.

⁸⁴ Bordsdorf, H., Mayer, T., Zarejousheghani, M., Eiceman, G.A., Recent developments in ion mobility spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* 46(6) (2011) 472-521.

⁸⁵ Armenta, S, Alcalà, M., Blanco, M. A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS). *Anal. Chim. Acta*, 703 (2011) 114-123.

Mobility Spectrometry), LC-IMS (*Liquid Chromatography-Ion Mobility Spectrometry*) o IMS-Ion Trap-MS (*Ion Mobility Spectrometry-Ion Trap-Mass Spectrometry*).

3.3 Fundamento teórico

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una técnica analítica que es utilizada para la detección de sustancias basada en la diferente movilidad (tiempo de deriva o movilidad reducida) de los iones en un campo eléctrico [75,81,86,87].

La muestra se introduce en el analizador, se vaporiza y los vapores son transportados por un gas portador a la zona de ionización, donde las moléculas gaseosas son ionizadas. Los iones son introducidos en el tubo de deriva (o tubo de separación) a través de un obturador de iones (*ion shutter*) que actúa como una puerta de entrada mediante pulsos eléctricos.

En el tubo de deriva, la nube de iones viaja hacia el detector bajo la influencia de un campo eléctrico débil ($\sim 300 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) y en contracorriente del gas de deriva que colisiona con la nube de iones retrasando su movimiento. Los iones con masa más pequeña, menor área de colisión y con mayor carga llegarán al detector más rápido.

El registro de la llegada de los iones al detector, constituido por una placa de Faraday, da lugar a un espectro también llamado plasmagrama. Las colisiones de los iones sobre el detector producen una muy pequeña corriente que es amplificada por un amplificador de corriente externo. Esta señal es sincronizada con el pulso de la puerta de entrada originando el espectro de movilidad.

Un esquema de un IMS se muestra en la Figura 3.2.

⁸⁶ Louis, R.H.St., Hill Jr., H.H., Eiceman, G.A. Ion mobility spectrometry in analytical chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 21(5) (1990) 321-355.

⁸⁷ Hill, H.H.Jr., Siems, W.F. Siems, Louis, R.H.St., McMinn, D.G., Ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 62 (1990) 1209A-1209A.

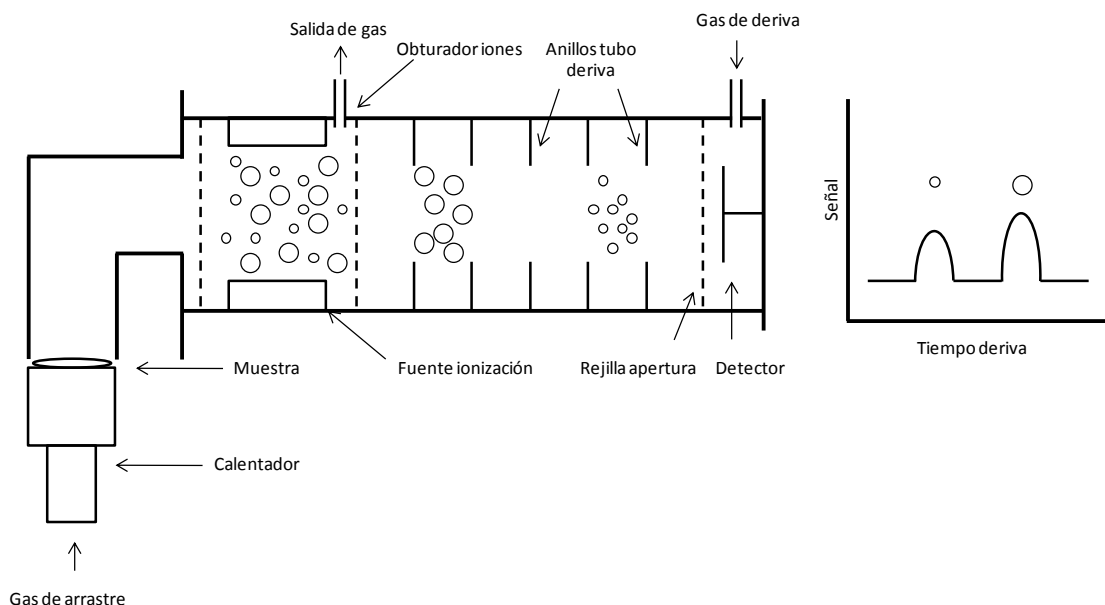


Figura 3.2 Esquema de un equipo de movilidad iónica mostrando el sistema de introducción de muestra por desorción térmica, la cámara de ionización, el tubo de deriva y el detector.

La velocidad media de desplazamiento de un ion, v_d , ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) es determinada por el campo eléctrico, E , ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$) y el coeficiente o la constante de movilidad, K ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), a través de la siguiente expresión:

$$v_d = K \cdot E$$

Cuando los parámetros instrumentales están controlados, la constante de movilidad, K , está definida por la relación tamaño-carga y la masa reducida del ion. La constante de movilidad puede ser expresada como la constante de movilidad reducida, K_0 ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), a condiciones estándares de presión y temperaturas:

$$K_0 = K \left[\frac{273}{T} \right] \left[\frac{P}{760} \right]$$

3.3.1 Movilidad iónica en fase gaseosa a presión atmosférica

La movilidad de los iones dentro del equipo IMS bajo la acción de un campo eléctrico débil y un gas neutro a presión atmosférica, es una combinación de: 1) la difusión del ion en fase gas, 2) el efecto del campo eléctrico, y 3) las interacciones electroestáticas entre los iones y las moléculas de gas.

1) La difusión de los iones (sin campos eléctricos o magnéticos, gradientes de temperatura o efectos de repulsión coulómicos) es muy parecida a la difusión de las moléculas gaseosas; los iones fluyen de una región de alta concentración a otra región de baja concentración, de acuerdo con la ley de Fick. La difusión continúa hasta que el gradiente de concentración llega a ser cero.

2) Cuando se aplica un campo eléctrico, el movimiento de los iones es afectado por este campo. El ión gana energía cinética del campo eléctrico y se acelera a lo largo de las líneas del campo eléctrico junto con el movimiento de difusión impuesto. Así pues, la velocidad del ion es dado por $v_d = K \cdot E$, donde K es el coeficiente de movilidad y E es la magnitud del campo eléctrico.

3) Adicionalmente a la fuerza de difusión y de la fuerza del campo eléctrico que el ion experimenta, hay interacciones electrostáticas entre los iones y las moléculas del gas de deriva. Es aquí, donde estas interacciones provocan la separación de las diversas especies iónicas dentro del tubo de deriva. Las interacciones electrostáticas se producen debido a que la nube electrónica de las moléculas de gas de deriva es polarizada por los iones cercanos, los cuales inducen un momento dipolar en las moléculas neutras. Las moléculas de gas que tienen momento dipolar o cuadrupolar también se sentirán atraídas por los iones. Existen varios modelos de movilidad iónica establecidos para explicar los efectos generales de estas tres fuerzas principales, la difusión, el campo eléctrico y la interacción electrostática. Estos modelos son: a) el modelo de esfera rígida, b) el modelo de polarización límite, y c) el modelo de *hard-core potential*.

a) En el modelo de la esfera rígida, la colisión entre los iones y la molécula de gas es tratada como esferas rígidas en el cual la dispersión del ión es igualmente de probable en cualquier dirección. La energía de los iones ($\frac{1}{2} \cdot mv^2$) se puede expresar como:

$$\frac{1}{2} \overline{mv} = \frac{1}{2} \overline{MV^2} + \frac{1}{2} \overline{mv_d^2} + \frac{1}{2} \overline{Mv_d^2}$$

donde, v y V son las velocidades de los iones y las moléculas neutras de gas portador, respectivamente, v_d , m y M son la velocidad de deriva del ion, la masa del ion y la masa de las moléculas neutras del gas, respectivamente. La barra horizontal de los términos,

representa la energía cinética promedio. El término $\frac{1}{2}\overline{MV^2}$ es igual a la energía térmica adquirida por el ion ($3\kappa T/2$), donde κ es la constante de Boltzmann ($1.381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) y T (K) es la temperatura. El término $\frac{1}{2}\overline{mv_d^2}$ es la energía ganada por el ion por la aplicación de un campo eléctrico externo, y el término $\frac{1}{2}\overline{Mv_d^2}$ corresponde al movimiento aleatorio de las moléculas neutras de gas ganado en el campo eléctrico. En los casos en el cual un ion pesado atraviesa un gas ligero (como es común en IMS) el último término puede ser despreciado; por tanto la energía adquirida por el ion puede ser por las contribuciones de la energía térmica adquirida por los iones y por el campo eléctrico. El modelo de esfera rígida está basado en la consideración de la conservación del momento lineal y de la energía de las colisiones al azar entre el ion contra las moléculas de gas (choque elástico). Este modelo proporciona una expresión del coeficiente de movilidad descrita en la siguiente ecuación, descrita previamente por Mason y Schamp [81,87,88]

$$\kappa = \left(\frac{3q}{16N} \right) \left(\sqrt{\frac{2\pi}{\kappa T}} \right) \left(\sqrt{\frac{m+M}{mM}} \right) \left(\frac{1+\alpha}{\Omega} \right)$$

donde q es la carga iónica ($1.603 \times 10^{-19} \text{ C}$), N es la densidad del gas de deriva, α el término de corrección dependiente de la masa y Ω la sección de colisión iónica.

b) El modelo de la polarización límite es un refinamiento del modelo de esfera rígida, el cual incluye la interacción en las colisiones de los dipolos inducidos por los iones. Esta interacción es una función de la polarización de la molécula neutra de gas y el coeficiente de movilidad iónica es dependiente de la polarizabilidad del gas. A medida que la temperatura se aproxima a $0 \text{ }^\circ\text{K}$, el modelo establece que todos los coeficientes de movilidad se acercan a un límite común, es decir el límite de polarización (K_{pol}). El modelo también sugiere que la movilidad es esencialmente independiente de la masa del ion, lo cual es incorrecto, y por lo tanto este modelo no ha sido utilizado por esta incorrección.

⁸⁸ Revercomb, H.E., Mason, E.A., Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis – a review. *Anal. Chem.*, 47(7) (1976) 970-983.

c) El modelo *hard-core potential* describe la interacción entre los iones y las moléculas como una combinación entre los potenciales de atracción y repulsión debido a la proximidad entre ellas. Las fuerzas de atracción aumentan las interacciones entre los iones y las especies neutras, lo cual incrementa la resistencia y lleva a una disminución de la movilidad iónica. Por el contrario, las fuerzas de repulsión tienen un efecto contrario haciendo aumentar la movilidad de los iones. Este modelo está de acuerdo con observaciones experimentales.

3.3.2 Química iónica en fase gas en IMS

La formación de iones a presión atmosférica ocurre principalmente en la zona de ionización de IMS. Los iones reactantes son convencionalmente formados por una fuente emisora β proveniente de una lámina de ^{63}Ni . Los electrones de alta energía emitidos se encuentran en el intervalo de 0 a 67 keV (17 keV de promedio) y colisionan con moléculas de N_2 o O_2 del aire creando una cascada de reacciones (Figura 3.3). Estos electrones creados van a través de una serie de reacciones para formar los principales iones reactantes positivos $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ y iones reactantes negativos $\text{O}_2^-(\text{H}_2\text{O})_n$, donde el intervalo de 'n' va entre 1 a 4 dependiendo del nivel de humedad. Los iones reactantes están en disposición para transferir su carga a moléculas neutras (M) para formar iones positivos y/o negativos.

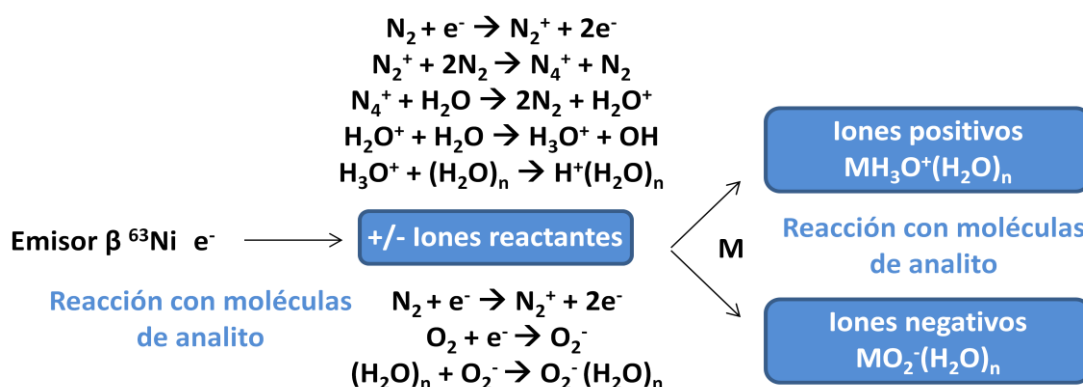


Figura 3.3 Formación de iones positivos y negativos mediante una fuente de ionización ^{63}Ni a presión atmosférica.

La formación de los clústeres iónicos depende de la afinidad de captar protones del analito, debido a que solo se ionizarán los analitos con mayor afinidad a captar el protón que el ion reactante. En modo negativo (o polaridad negativa), solo los analitos con mayor electronegatividad que el ion reactante formarán los iones negativos. La

química en la fuente de ionización puede ser alterada deliberadamente para mejorar la selectividad de la respuesta, introduciendo de manera controlada, pequeños niveles de sustancias dopadas [89]. La importancia de usar iones reactantes alternativos se debe a su interacción de manera diferente con el analito y las sustancias interferentes que respecto con los iones reactantes 'normales'. Tres importantes razones para usar agentes dopantes son:

- La posibilidad que los iones reactantes alternativos interaccionen con el analito pero no con las sustancias interferentes. Como resultado de esta situación, no se crean iones de las moléculas interferentes, por lo que no aparecen picos en el espectro o plasmagrama.
- Los tiempos de deriva para los iones observados en presencia de los gases dopantes son diferentes en comparación con los tiempos de deriva con el gas de deriva sin dopar. Este efecto puede ser usado para el desplazamiento de los picos y evitar el solapamiento de picos.
- Los iones creados con los iones alternativos pueden ser más estables. El espectro o plasmagrama contendrá mayor información analítica útil.

En el *review* de Puton *et. al* [89], aparecen una relación de dopantes utilizados en la bibliografía y sus aplicaciones.

En la Figura 3.4 y Figura 3.5 se muestran las escalas de electronegatividad y de la afinidad a captar un protón, para algunos grupos funcionales. Es importante aclarar que las escalas suministradas son una estimación de los compuestos químicos puros, los cuales pueden diferir en cierta medida cuando los compuestos existen en forma de clúster en IMS. No obstante, estas relaciones proporcionan una buena guía para la elección de un gas dopante.

⁸⁹ Puton, J, Nousiainen, M., Sillanpää, M. Ion mobility spectrometers with doped gases. *Talanta*, 76 (2008) 978-987.

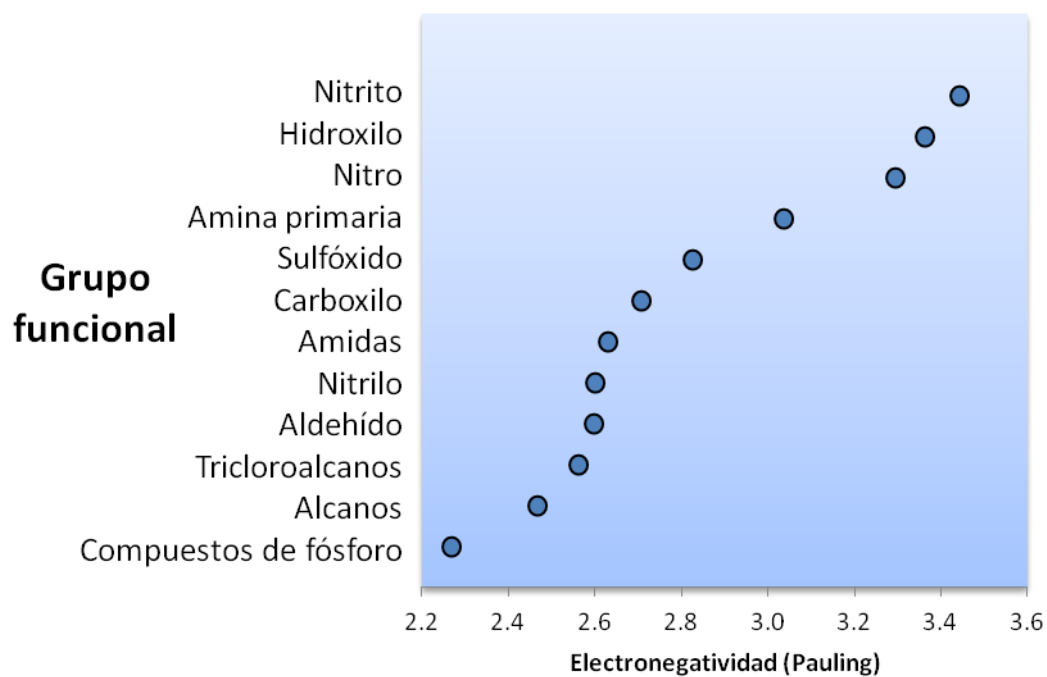


Figura 3.4 Electronegatividad de algunos grupos funcionales.

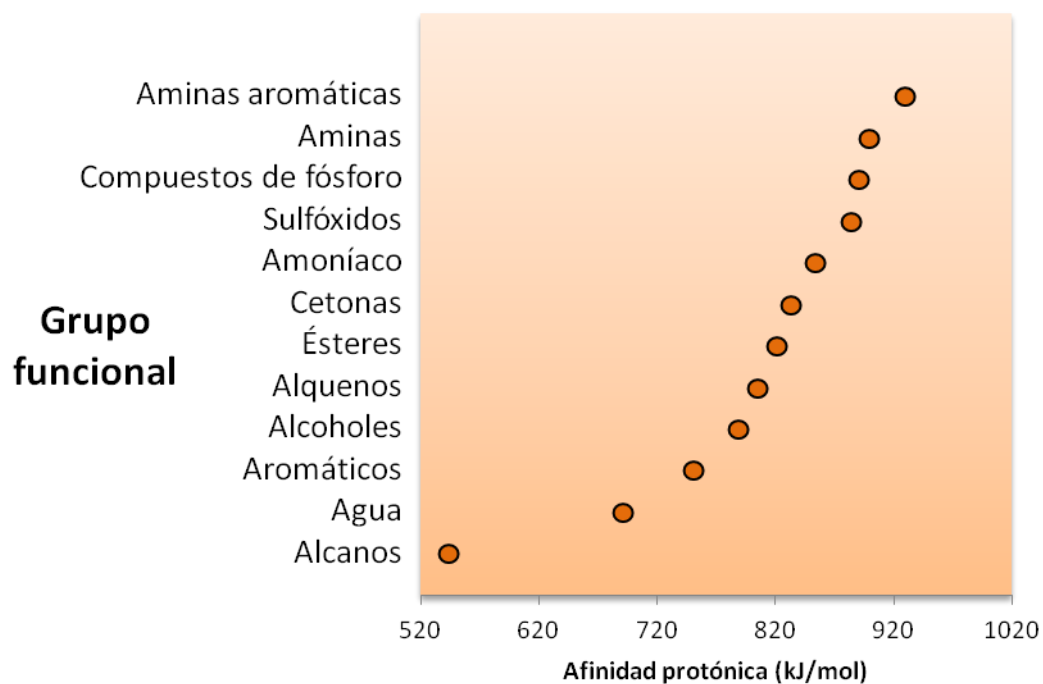


Figura 3.5 Afinidad protónica de algunos grupos funcionales.

En aire, bajo las condiciones de temperatura y humedad, muchos compuestos orgánicos pueden adquirir la carga negativa o positiva, ya que disponen de una mayor electronegatividad o afinidad protónica que los iones reactantes producidos en aire

con trazas de humedad, $O_2^-(H_2O)_n$ y $H^+(H_2O)_n$, respectivamente. Esta facilidad en la ionización en polaridad positiva permite una importante mejora en la selectividad IMS por la adición de diversas sustancias dopantes (con una mayor afinidad protónica), por lo que podrá ionizar solo aquellos compuestos con mayor afinidad protónica que el del gas dopante. En polaridad negativa, ocurre un caso similar, solo los compuestos con mayor electronegatividad se ionizarán. Debido al momento dipolar del ion O_2^- , no es probable la formación de clústeres entre las moléculas neutras y los iones negativos. A pesar de ello, la utilización de un gas dopante permite una mejora en la selectividad y la sensibilidad en modo negativo.

Una vez que los iones se han formado y han entrado dentro del tubo de deriva, o bien mantienen su identidad a través del tubo de deriva o bien reaccionan con moléculas neutras en la zona de deriva para formar clústeres iónicos antes de llegar al detector. Este último fenómeno se produce bajo presión atmosférica si la humedad no está controlada y minimizada en el interior del tubo de deriva o si los analitos neutros no son arrastrados correctamente y pueden volver a entrar en la zona de deriva para formar clústeres con los iones existentes mientras viajan dentro de la zona de deriva. Por lo tanto, el ion detectado ya no será el mismo que el que se ha creado inicialmente en la zona de ionización. Si este hecho ocurre, se evidencia en el espectro de movilidad tanto en el desplazamiento del tiempo de deriva del analito y a través de una inclinación de la línea base entre el pico de los iones reactantes y el pico del analito. Una inclinación de la línea base indica que algunos grupos de iones están experimentando asociaciones o disociaciones en el interior de la región de deriva [90].

3.4 Instrumentación

Un espectrómetro de movilidad iónica está compuesto principalmente por un componente central, el tubo de deriva, donde se produce la separación de las especies ionizadas, así como otra serie de componentes que lo complementan. Tal y como se ilustra en la Figura 3., un instrumento IMS está compuesto por seis componentes: i) introducción de muestra, ii) una fuente de ionización, iii) un obturador de iones o *ion shutter*, iv) tubo de deriva, v) rejilla de apertura y vi) detector. Cada uno de estos

⁹⁰ Eiceman, G.A. Ion mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition. *TrAC*, 21(4) (2002) 259-275.

componentes y las diversas tecnologías aplicadas están descritos en el apartado 3.4.1 hasta el 3.4.6, respectivamente.

3.4.1. Introducción de la muestra

La finalidad de los sistemas de introducción de muestra es transportar los analitos hasta la cámara de ionización, volatilizándolos en caso de que sea necesario. Su elección depende de la naturaleza de la muestra, de los requisitos del análisis y del tipo de ionización que se vaya a emplear. Estos métodos incluyen desde introducción por membrana y membranas semipermeables [91,92,93], spray o electrospray [94,95,96,97,98], microextracción en fase sólida (SPME, *Solid-Phase Micro-Extraction*) [99,100], vaporización por ablación láser [101,102,103] y vaporización o desorción térmica, la cual es la técnica más común en equipos comerciales IMS [52,104,105,106].

⁹¹ Spangler, G.E., Carrico, J.P., Membrane inlet for ion mobility spectrometry (plasma chromatography). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 52(2-3) (1983) 267-287.

⁹² Kotiaho, T., Lauritsen, F.R., Degn, H., Paakkanen, H., Membrane inlet ion mobility spectrometry for on-line measurement of ethanol in beer and in yeast fermentation. *Anal. Chim. Acta*, 309 (1995) 317-325.

⁹³ Du, Y.Z., Zhang, W., Whitten, W., Li, H.Y., Watson, D.B., and Xu, J. Membrane-extraction ion mobility spectrometry for in situ detection of chlorinated hydrocarbons in water. *Anal. Chem.* 82 (2010) 4089–4096.

⁹⁴ Kabarle, P., Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A-986A.

⁹⁵ Asbury, G.R., Klasmeier, J., Hill, H.H. Jr., Analysis of explosives using electrospray ionization: ion mobility spectrometry (ESI:IMS). *Talanta* 50 (2000) 1291-1298.

⁹⁶ Matz, L.M., Hill, H.H. Jr., Evaluation of Opiate Separation by High-Resolution Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1664 - 1669.

⁹⁷ Kapellios, E.A., Karamanou, S., Sardis, M.F., Aivaliotis, M., Economou, A., Pergantis, S.A. Using nanoelectrospray ion mobility spectrometry (GEMMA) to determine the size and relative molecular mass of proteins and protein assemblies: a comparison with MALLS and QELS. *Anal. Bioanal. Chem.* 299 (2011) 2421-2433.

⁹⁸ Jafari, M.T. Improved design for high resolution electrospray ionization ion mobility spectrometry. *Talanta*, 77 (2009) 1632–1639.

⁹⁹ Lai, H., Corbin, I., and Almirall, J.R. Headspace sampling and detection of cocaine, MDMA, and marijuana via volatile markers in the presence of potential interferences by solid phase microextraction-ion mobility spectrometry (SPME-IMS). *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 105–113.

¹⁰⁰ Wan, Y., Nacson, S., Pawliszyn, J. The coupling of solid-phase microextraction/surface enhanced laser desorption/ionization to ion mobility spectrometry for drug analysis. *Anal. Chim. Acta*, 582 (2007) 50-54.

¹⁰¹ Eiceman, G.A., Young, D., Schmidt, H., Rodriguez, J.E., Baumbach, J.I., Vautz, W., Lake, D.A., Johnston, M.V. Ion mobility spectrometry of gas-phase ions from laser ablation of solids in air at ambient pressure. *Appl. Spectrosc.* 61 (2007) 1076–1083.

¹⁰² Borsdorf, H., Roetering, S., Nazarov, E., Weickhardt, C. Rapid screening of pesticides from fruit surfaces: Preliminary examinations using a laser desorption–differential mobility spectrometry coupling. *Int. J. Ion. Mobil. Spectrom.* 12 (2009) 15–22.

¹⁰³ Oberhüttinger, C., Langmeier, A., Oberpriller, H., Kessler, M., Goebel, J., Müller, G., Hydrocarbon detection using laser ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion. Mobil. Spectrom.* 12 (2009) 23–32.

¹⁰⁴ Gryniowicz, C.M., Reepmeyer, J.C., Kauffman, J.F., Buhse, L.F., Detection of undeclared erectile dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 601-606.

Los instrumentos de investigación pueden ser equipados con alguno de estos sistemas de introducción dependiendo de las matrices de las muestras y de los analitos de interés. El sistema de introducción de muestra debe cumplir tres requisitos. Primero debe ser capaz de suministrar la muestra de modo que se pueda producir la ionización en fase gaseosa. En segundo lugar, debe interactuar bien con el analizador, por lo que la pérdida de muestra debe de ser mínima. Finalmente, no debe de distorsionar la información química de los analitos de la muestra.

Los sistemas de introducción de muestra basados en membranas y membranas semi-permeables son films poliméricos sintéticos finos a través de las cuales los analitos orgánicos pueden difundirse, mientras que la humedad y las partículas de polvo se mantienen fuera. Los instrumentos IMS que incorporan estos sistemas de introducción se utilizan en entornos de campo, con lo que la membrana aísla el ambiente interno del analizador del aire ambiente muestreado. Sin embargo, la desventaja de aumentar la robustez del instrumento es la disminución de la sensibilidad, debido a que la detección de los analitos se rige por la solubilidad del analito en la membrana. De este modo el rendimiento de esta membrana como sistema de introducción de muestra puede verse afectada por factores externos como la temperatura, la presión de vapor de la sustancia analizada y la polaridad entre las membranas y el analito.

Los sistemas de introducción de muestra basados en spray o electrospray pueden ser utilizados para la introducción de muestras líquidas dentro del analizador IMS. La muestra líquida podrá ser volatilizada y posteriormente ionizada. A pesar de que el spray líquido es un concepto fácil de implementar, el volumen de gas producido a partir de 1 mL de muestra líquida podría saturar el analizador, por lo que las entradas de líquido pulverizado no son una solución de entrada muy prometedora. Las entradas mediante electrospray, por el contrario, permiten introducir flujos más pequeños, $\sim 50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizando la muestra a través de una aguja de jeringa o una abertura de un capilar que se coloca a un alto voltaje y proporciona un flujo de gas inerte o aire en la

¹⁰⁵ Likar, M.D., Cheng, G. Mahajan, N. Zhang, Z, Rapid identification and absence of drug tests for AG-013736 in 1mg axitinib tablets by ion mobility spectrometry and DART mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 569-573.

¹⁰⁶ Armenta, S., Blanco, M., Ion mobility spectrometry as a high-throughput analytical tool in occupational pyrethroid exposure. *Anal. Bioanal. Chem.*, DOI 10.1007/s00216-011-5582-2.

punta de la aguja. Así, este sistema de introducción de muestra permite tanto introducir la muestra en el equipo y como sistema de ionización. Esta técnica es especialmente útil para los compuestos no volátiles y compuestos poco volátiles que no pueden ser fácilmente volatilizados por desorción térmica.

La microextracción en fase sólida, SPME, es una técnica de preconcentración de un analito a partir de una muestra líquida o a partir de un flujo de gas. La fase estacionaria es típicamente un polímero unido a un sustrato de sílice, similar a las columnas capilares en CG. La efectividad de la SPME depende de la matriz y de la compatibilidad en polaridad entre el analito y la fase estacionaria. Después de la extracción de la muestra con la fibra de SPME, los compuestos pueden ser volatilizados calentando el dispositivo SPME en una corriente de gas purificado. Los vapores desorbidos pueden pasar a través de un cromatógrafo de gases o directamente al analizador IMS. Las principales ventajas radican en la extracción sin solventes, eliminación de material de vidrio para la extracción y la facilidad de utilización. Algunas de las SPME se han fabricado para IMS e incluyen la detección de agentes de guerra química en agua [107] o suelos [108]. Sin embargo, este método de introducción tiene los inconvenientes de la técnica SPME, tales como el coste de las fibras, la contaminación cruzada con la reutilización de las fibras, el tiempo de acondicionamiento y la susceptibilidad de las interferencias por altas concentraciones.

La desorción por láser introduce los analitos de la muestra sólida en el analizador IMS, utilizando los fotones del laser para calentar y vaporizar la muestra sólida en gases moleculares con el beneficio adicional que los compuestos pueden ser ionizados con el mismo láser. Las muestras sólidas pueden ser introducidas directamente en el tubo de deriva e ionizadas con el láser, o bien pueden ser depositadas en una cámara separada para la muestra. Los vapores formados de la muestra por el láser, son arrastrados por un flujo de gas portador a la zona de ionización o tubo de deriva. La desorción por láser es útil para la ablación de grandes moléculas biológicas sensibles (técnica conocida

¹⁰⁷ Fallman, A., Rittfeldt, L., Detection of chemical warfare agents in water by high temperature solid phase microextraction-ion mobility spectrometry (HT-SPME-IMS). *Int. J. Ion Mobility Spectrom.* 4 (2001) 85-87.

¹⁰⁸ Rearden, P., Harrington, P. B., Rapid screening of precursors and degradation products of chemical warfare agents in soil by solid-phase microextraction ion mobility spectrometry (SPME-IMS). *Anal. Chim. Acta*, 545 (2005) 13-20.

como *MALDI*, *matrix-assisted laser desorption/ionization*), donde otros métodos de introducción de muestra no son adecuados. Sin embargo, los métodos por ablación láser causan la ampliación de las bandas debido a las reacciones que se producen en la nube de fase gas (analito y matriz) producida por los fotones de láser.

Aunque las medidas son realizadas en los instrumentos IMS con iones en fase gas, esto no es un impedimento para el análisis de muestras sólidas, si el analito en cuestión puede ser vaporizado e introducido en la zona de ionización. El calentador de desorción (o *desorber heater*) puede calentar la muestra depositada (partículas sólidas o muestra líquida) en un sustrato, a temperaturas elevadas (150 – 300 °C), para formar las moléculas en fase gas, que directamente pasan a la cámara de ionización, arrastradas por un flujo de gas inerte o portador. Los sistemas de introducción de muestras se adaptan a los dispositivos IMS comerciales, debido a que son simples, baratos de producir y portátiles. La vaporización o desorción térmica es el método más ampliamente utilizado para las aplicaciones de detección de explosivos y compuestos estupefacientes. Sin embargo, el principal problema que se encuentra en este método de introducción de muestra es para los compuestos de gran peso molecular y térmicamente inestables o que no sean fácilmente vaporizados sin riesgo de descomposición, por lo que se deben optar por otros tipos sistemas de introducción de muestra diferente al de la desorción térmica.

3.4.2. Fuentes de ionización

La formación de iones en fase gas precede el proceso de la separación y detección de los iones, sin embargo la ionización puede producirse en el mismo paso de la fase de introducción de la muestra, como se ha comentado en el apartado anterior. La ionización en IMS ocurre a presión atmosférica, así que comúnmente ocurren con los niveles de agua y oxígeno encontrados en el ambiente. La ionización de las moléculas gaseosas en la cámara o región de ionización en IMS puede ser llevada a cabo en una amplia variedad de caminos, incluyendo el bombardeo radiactivo [52,104,109],

¹⁰⁹ Tuovinen, K., Paakkanen, H., Hänninen, O., Detection of pesticides from liquid matrices by ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 7-17.

descarga en corona [110,111], fotoionización (UV, láser) [112,113,114,115,116], ionización en electrospray [95,96,117], ionización en superficie [118] e ionización en microplasma [119]. La efectividad de ionización determina la sensibilidad y rango lineal del sistema de detección. La Tabla 3.1 enumera las fuentes de ionización que se han demostrado para su uso con instrumentos IMS hasta el momento.

Tabla 3.1 Fuentes de ionización para analizadores IMS.

Fuente de ionización	Iones (RIP,+/-)	LOD/LDR	Compuestos	Ref
Radiactiva	RIP,+/-	20ppb / 2 ordenes	Explosivos y drogas	[52,104,109]
Descarga en corona	+/-	2ppb / 4 ordenes	TNT, PETN, RDX	[110,111]
Fotoionización:				
UV	+	3 ppb / 3 ordenes	Cetonas, alcoholes	[112,113]
Laser(μ)	M+ o MH+	100ppb / 1-3 ordenes	Naftaleno, tolueno,	[114,115]
SELDI(μ)	MH+	2ppm /NA	benzeno Verapamil	[116]
Electrospray	-	15-200 ppb / 2	Explosivos	[95]
	+	ordenes 15-70ppb / 2-3 ordenes	Amfetaminas, Opiáceos	[96,117]
Ionización en superficie	+	1 ppb / 4-5 ordenes	Estupefacientes: Compuestos nitrogenados	[118]
Microplasma	RIP,+/-	5 ppb / 2 ordenes	2-Et-1-Hexanol, 2-Nonanona	[119]

RIP Reactant Ion Peak; LOD: Limit of Detection; LDR: Limit Dinamic Range.

¹¹⁰ Khayamian, T., Tabrizchi, M., Jafari, M.T., Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene, pentaerythritol tetranitrate and cyclo-1,3,5-trimethylene-2,4,6-trinitramine using negative corona discharge ion mobility spectrometry. *Talanta*, 59 (2003) 327-333.

¹¹¹ Tabrizchi, M., Ilbeigi, V. Detection of explosives by positive corona discharge ion mobility spectrometry. *J. Hazard. Mater.* 176 (2010) 692-696.

¹¹² Sielemann, S., Baumbach, J.I., Schmidt, H., Pilzecker, P., Detection of alcohols using UV-ion mobility spectrometers. *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 293-301.

¹¹³ Xie, Z., Sielemann, S., Schmidt, H., Li, F., Baumbach, J.I., Determination of acetone, 2-butanone, diethyl ketone and BTX using HSCC-UV-IMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 606-610.

¹¹⁴ Eiceman, G.A., Vandiver, V.J., Leasure, C.S., Anderson, G.K., Tise, J.J., Danen, W.C. Effects of Laser Beam Parameters in Laser Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* 58 (1988) 1690-1695.

¹¹⁵ Lubman, D.M., Kronick, M.N., Plasma Chromatography with Laser-Produced Ions. *Anal. Chem.* 54(9) (1982) 1546-1551.

¹¹⁶ Wang, Y., Nacson, S., Pawliszyn, J. The coupling of solid-phase microextraction/surface enhanced laser desorption/ionization to ion mobility spectrometry for drug analysis. *Anal. Chim. Acta* 582(1) (2007) 50-54.

¹¹⁷ Matz, L.M., Hill, H.H. Jr., Evaluating the Separation of Amphetamines by Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry/MS and Charge Competition within the ESI Process. *Anal. Chem.* 74 (2002) 420-427.

¹¹⁸ Rasulev, U.Kh., Iskhakova, S.S., Khasanov, U., Mikhailin, A.V., Atmosphere Pressure Surface Ionization Indicator of Narcotics. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2 (2001) 121-125.

¹¹⁹ Vautz, W., Michels, A., Franzke, J., Micro-plasma: a novel ionization source for ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 391 (2008) 2609-2615.

Las fuentes radiactivas proporcionan un funcionamiento estable y fiable, siendo muy adecuadas para las aplicaciones actuales de IMS. La fuente radiactiva más utilizada es la de ^{63}Ni . Las fuentes radiactivas no precisan de una fuente de alimentación externa, i no tienen partes móviles ni requisitos de mantenimiento. Sin embargo hay un coste de mantenimiento equivalente asociado a los controles periódicos de fugas. La fuente de radiación se construye con materiales radiactivos de ^{63}Ni galvanizados en una hoja metálica de Au o Ni, con una actividad entre 10 a 15 mCi. Los electrones emitidos por la fuente radiactiva tienen una energía promedio de 17 keV. Casi toda esta energía se disipa en el aire a presión ambiente entre 10 a 15 mm de la superficie del metal, lo que permite establecer unas guías para determinar el diámetro óptimo del tubo de deriva, siendo la forma cilíndrica la geometría utilizada en los analizadores IMS. Los electrones emitidos (tanto primarios como secundarios), ionizan las moléculas de gas portador para formar los iones reactantes, los cuales ionizaran las moléculas gaseosas de la muestra para formar los iones de los productos (ver apartado 3.3.2). Es habitual dopar el gas portador con alguna sustancia que tenga una mayor afinidad a protonarse o una mayor electronegatividad que los iones reactantes producidos, para mejorar la selectividad en la formación de los iones de los productos a analizar. Aparte de las fuentes radiactivas de ^{63}Ni , también se han utilizado las correspondientes a tritio y ^{241}Am ; la fuente de tritio posee menos radiación peligrosa y se ha utilizado en estudios medioambientales de niveles de ppb de compuestos tóxicos en aire [120], mientras que la fuente de ^{241}Am es más energética que la de ^{63}Ni y tiene un intervalo efectivo corto en aire, por lo que la ionización es eficiente en instrumentos que utilicen poco volumen. Las fuentes radiactivas requieren de permisos especiales y licencias para fuentes emisoras alfa. Una vez instaladas estas fuentes, requieren revisiones periódicas por técnicos especialistas para verificar que no hay fugas radiactivas.

Las fuentes de ionización basadas en descarga en corona se pueden construir utilizando una fuente de corriente continua o de pulsos para crear una diferencia de potencial ($\sim 2000\text{ V}$) entre un electrodo en forma de punta o aguja y un electrodo plano, generando el plasma. Estos iones generados a partir de las moléculas de aire o

¹²⁰ Leonhardt, J.W., New detectors in environmental monitoring using tritium sources. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 206 (1996) 339-339. (2, International Conference on Isotopes, Proceedings, 1995, Pt.4)

de otro gas portador, son capaces de ionizar de forma secundaria los compuestos objeto de interés. El total de corriente de iones producida por esta fuente es 10 ó 100 veces mayor que la fuente de ^{63}Ni y por consiguiente, se consiguen límites de detección menores. Una ventaja de este tipo de ionización es que es universal, generando tanto iones positivos como negativos, aunque no simultáneamente y la corriente de iones es estable, además de que no es una fuente radiactiva. Sin embargo, las fuentes basadas en descarga en corona tienen los inconvenientes de tener una gran fuente de alimentación externa, un mantenimiento de las superficies donde se produce la descarga y la liberación de vapores corrosivos (NO_x) que afectan tanto a la propia superficie como a la química de la generación de iones.

La fuente de ionización basada en la fotoionización utiliza lámparas de foto-descargas que emiten fotones (a energías entre 8 a 12 eV), los cuales ionizan las moléculas neutras a presión atmosférica. Los iones positivos se forman por la pérdida de un electrón para convertirse en M^+ , mientras que los iones negativos se forman captando un electrón, o bien a través de reacciones en cascada a partir de la formación del ión O_2^- . La fotoionización UV es comúnmente usada para el análisis de compuestos aromáticos e insaturados. La principal ventaja de las fuentes por fotoionización es la cierta selectividad en la respuesta, que puede ser asegurada bien por la elección de una energía de ionización apropiada o bien por la selección de la longitud de onda. Las desventajas principales de este método de ionización son que precisan de una fuente de alimentación externa, el coste de las lámparas y la necesidad de reemplazarlos periódicamente debido a la vida útil de estas lámparas. La fotoionización también puede conseguirse mediante láser, donde las muestras son vaporizadas durante el proceso de desorción con láser, e inmediatamente seguida por la ionización. MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) y SELSI (*Surface enhanced laser desorption ionization*) también caen en esta categoría.

La ionización por electrospray ha sido previamente mencionada en los sistemas de introducción de muestra. La formación de los iones ocurre cuando la muestra líquida se dispensa en forma de aerosol por una aguja que tiene aplicado un alto potencial eléctrico. La ionización por electrospray es una técnica de ionización para el análisis de muestras mediambientales y muestras biológicas líquidas, así como ampliamente

utilizada para el análisis de explosivos y fármacos. Sin embargo, esta técnica de ionización tiene el inconveniente del tiempo que se precisa para enjuagar la aguja, con el propósito de eliminar la matriz de líquido y así evitar la saturación del detector, limitando así su idoneidad para aplicaciones IMS.

La ionización en IMS también puede realizarse a través de la ionización en superficie, donde la fuente consiste en un emisor hecho de un cristal de Mo dopado con Ir (u otro metal del grupo del Pt), el cual está calentado entre 300 y 500 °C. Ciertos tipos de moléculas, principalmente compuestos nitrogenados, son sometidos a la transferencia electrónica después de la colisión o contacto con la superficie calentada, produciéndose la formación de un ión positivo. Uno de los problemas con este tipo de fuente de ionización es que en exposición con determinados compuestos, la superficie se modifica y no permite la ionización. La superficie puede ser regenerada, pero solo bajo condiciones especiales, en una atmósfera controlada. Otro contratiempo de esta fuente de ionización es que la respuesta depende de la estructura del analito.

Finalmente, se encuentra la fuente de ionización en microplasma, o también llamada DBD – *Dielectric barrier discharge* [121,122]. La sonda de descarga está compuesta por un vaso capilar, que proporciona un flujo de gas He o N₂, y filamentos o cables de plata alrededor del capilar a una distancia de 12 mm, para formar los electrodos. Las microdescargas se inician entre los electrodos cuando un pulso periódico de tensión positiva (5,5 kV con una frecuencia de 33 kHz y un pulso de 60 de ancho de 2 microsegundos) se aplica a un electrodo mientras que el otro electrodo se mantiene aislado. Esta microdescarga forma un microplasma en la parte exterior del capilar, y los iones del plasma inician las reacciones de ionización como en las fuentes tradicionales de ⁶³Ni para la obtención de los iones reactantes. De igual modo que las fuentes de ionización anteriores, precisan de una fuente de alimentación externa.

La ionización también se puede producir por llama. Este método de ionización podría incrementar la sensibilidad de ciertos tipos de compuestos e incluir dentro de las

¹²¹ Kogelschatz, U., Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem. Plasma Process.* 23 (1) (2003) 1-46.

¹²² Chirokov, A.; Gutsol, A.; Fridman, A., Atmospheric pressure plasma of dielectric barrier discharges. *Pure Appl. Chem.* 77 (2) (2005) 487-495

aplicaciones IMS los compuestos químicos utilizados en la industria microelectrónica como son los hidruros y los fluoruros. Los hidruros no forman iones positivos estables en el tubo de deriva, pero podrían ser convertidos en los correspondientes óxidos que si que serían estables en forma negativa. Las ventajas de las fuentes de ionización de llama son la posibilidad de producir altas corrientes de iones, la capacidad para detectar otros tipos de compuestos y la eliminación de una fuente radiactiva o de fotoionización. Las principales desventajas son la adicción de mayor complejidad en el tubo de deriva para incorporar la llama y la pérdida de la especificidad del detector debido a que la identidad de los iones se pierde cuando se forman los óxidos. Aunque resulta prometedora esta fuente de ionización, hasta la fecha no se ha incorporado a un tubo de deriva IMS.

3.4.3. Obturador de iones

Un obturador de iones o *shutter grid* se utiliza para permitir el paso de los iones a través de un intervalo de tiempo fijo, al utilizarse una fuente de ionización continua en IMS. La activación de la apertura del obturador se sincroniza con el inicio del proceso de adquisición de datos y es la base para medir los tiempos de desplazamiento de las diferentes especies de iones, desde el obturador de iones hasta el detector. Todos los equipos comerciales IMS que contienen la fuente de ionización continua ^{63}Ni están equipados con la entrada convencional de Bradbury-Nielsen (BNG, *Bradbury-Nielsen gate*). El BNG consiste en dos sets de cables o filamentos conductores paralelos colocados próximos entre ellos de forma paralela y coplanar (Figura 3.6), aislados mecánica y eléctricamente entre ellos, sobre un soporte no conductor. Estos conductores presentan el mismo potencial V_{ref} cuando la entrada está abierta, y cambia a diferentes potenciales cuando la entrada está cerrada. Cuando la entrada está cerrada, se aplica un voltaje determinado (V_{offset}) a cada set de conductores de tal manera que el nuevo potencial para W_1 es $V_{\text{ref}} + V_{\text{offset}}$, y el nuevo potencial para W_2 es $V_{\text{ref}} - V_{\text{offset}}$. El valor de V_{ref} se mantiene fijo en relación con la ubicación de la puerta a lo largo del tubo de deriva, mientras que el V_{offset} se aplica a partir de una fuente de alimentación independiente. El valor de V_{offset} se elige para crear un campo de potencial entre cada uno de los conductores entre 2 a 3 veces más fuerte que el del tubo de deriva.

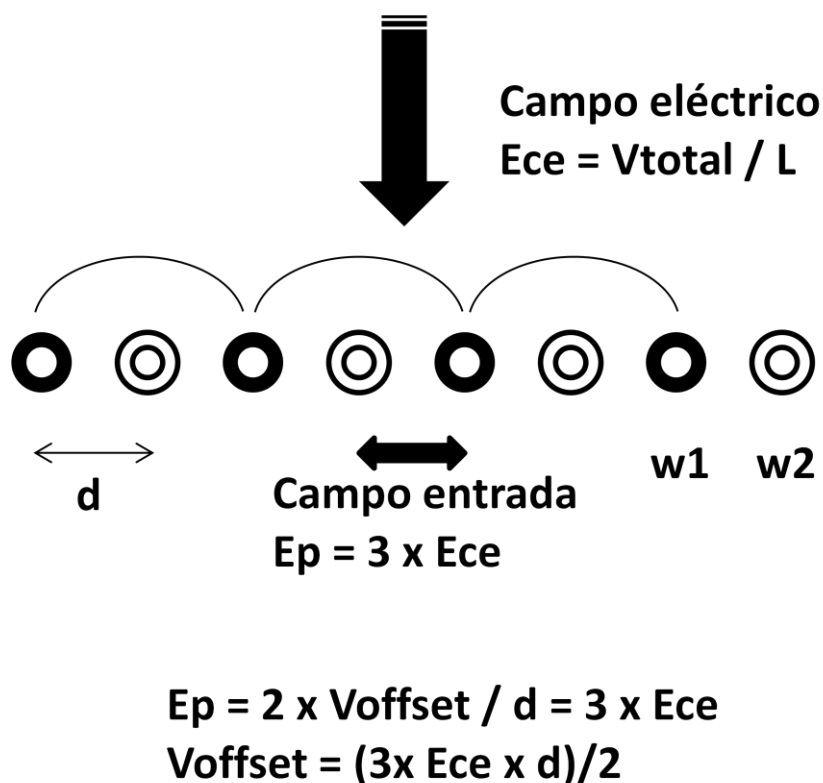


Figura 3.6 Campo eléctrico en la puerta de entrada Bradbury-Nielsen creado por el voltaje offset entre los dos conductores

Cuando V_{offset} está activo, el campo eléctrico aplicado impone un ángulo de desviación o deflexión en la trayectoria de los iones, de modo que el ion es o bien dirigido a los conductores de la entrada y neutralizados, o bien colisionan contra las paredes del tubo de deriva antes de llegar al detector, así pues los iones no entran cuando la entrada está cerrada. El ángulo de desviación puede ser calculado a partir de la ecuación que aparece en la Figura 3.7. Se obtiene un mejor tiempo de respuesta si se reduce el espaciado entre los conductores y por tanto la longitud de la región de desviación. Reducir el espaciado entre los conductores también hace disminuir el voltaje offset necesario para conseguir un campo eléctrico de entrada suficiente y un ángulo de desviación también suficiente [123].

¹²³ Yoon, O.K., Zuleta, I.A., Robbins, M.D., Barbula, G.K., Zare, R.N., Simple Template-Based Method to Produce Bradbury-Nielsen Gates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18(11) (2007) 1901-1908.

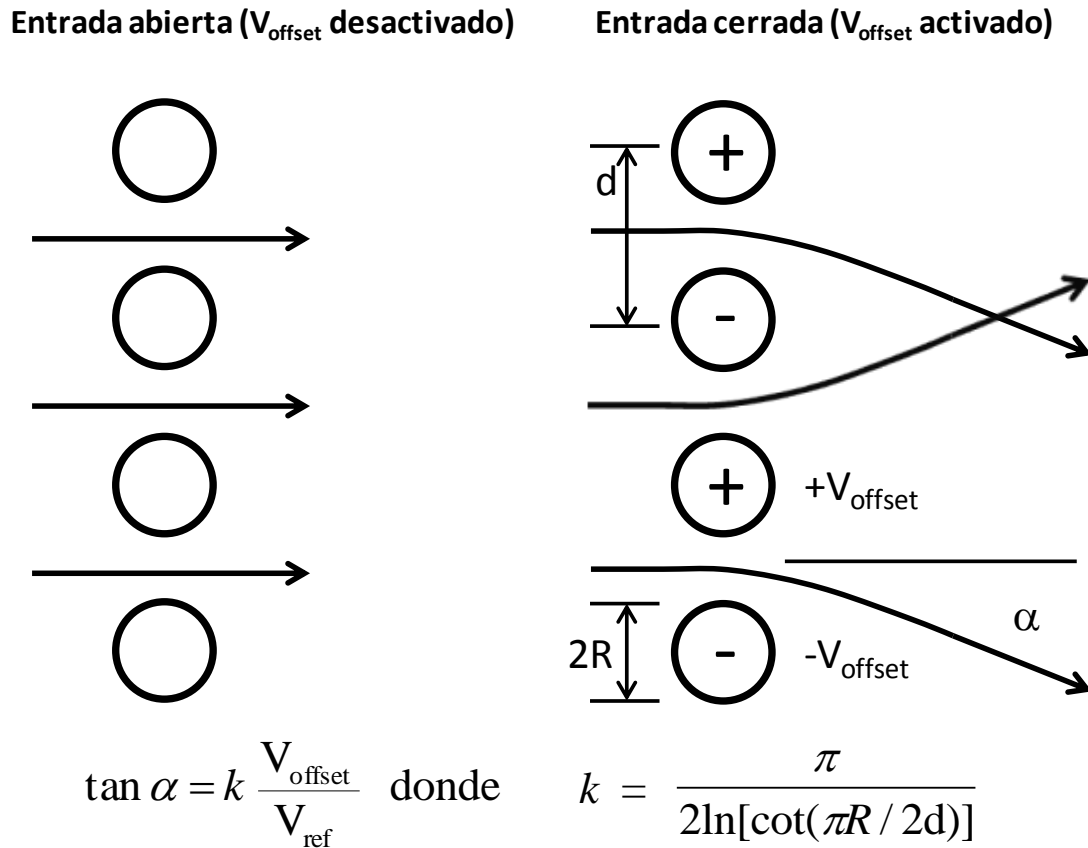


Figura 3.7 Ángulo de desviación de los iones en la proximidad de la entrada Bradbury-Nielsen.

La principal desventaja de reducir el espaciado entre los conductores en el BNG, es que aumenta la complejidad en la fabricación, así como una disminución del paso de los iones. Los principales desafíos en la reducción de la distancia son para colocar con precisión el conjunto de conductores, mantenerlos aislados eléctricamente y mantener la tensión en los conductores.

Hay varias maneras de fabricar una entrada BNG, con innovaciones en el método de cableado que reducen el tiempo de trabajo de días a horas. Algunos de los BNG se fabrican a partir de grabados en una lámina metálica delgada o a partir de un alambre de metal depositado en cerámica. El método más común es el de colocar dos conductores en orificios de un marco de aislamiento, con un espaciado entre ellos de 1 mm.

Las puertas de entrada Bradbury-Nielsen suelen abrirse para permitir el paso de los iones a través de él, por un tiempo de 200 μs cada 20 ms, un ciclo de solo el 1%. El

tiempo de abertura tan corto, limita la sensibilidad del IMS, pero si se aumenta este tiempo pueden ocurrir problemas de ensanchamiento de los picos, empeorando la resolución. La limitación de estos pequeños ciclos fomentó el desarrollo de otros diseños de obturadores de iones. Hay diseños de obturadores de iones desarrollados para mejorar el ciclo de trabajo, lo que llevó al desarrollo de la técnica FT-IMS, *Fourier transform-ion mobility spectrometry*. Un instrumento IMS que trabaja con el modo de FT necesita de las siguientes funciones: 1) Un generador de señal de activación periódica que produce un sistema binario (encendido, apagado) de onda cuadrada. 2) Una entrada y una salida (la cual se coloca al final de la zona de deriva y los iones llegan a ella después del tiempo necesario para cruzar esta zona), las cuales son impulsadas por la señal de activación periódica, de manera que la apertura y el cierre de las puertas se produce de forma simultánea. Ambas puertas están encendidas un 50% del tiempo y apagadas el otro 50%, por lo que el ciclo de trabajo real es solo del 25%. (3) Un ciclo de exploración parametrizado para que coincida con la frecuencia de onda cuadrada. (4) Un equipo que pueda registrar el interferograma del FT-IMS y llevará a cabo la transformada de Fourier de los datos de dominio del tiempo normal, la cual se representará como el tiempo de deriva en el espectro de la movilidad iónica. Uno de los primeros instrumentos FT-IMS construidos fue por el grupo de Hill, el cual mejoró el ciclo a un 25% en comparación con el 1% obtenido con el obturador de Bradbury-Nielsen [124]. Una década después, los laboratorios *Sandia National Laboratories*, mostraron que el equipo se puede introducir un segundo obturador de iones en el tubo de deriva, de manera simulada electrónicamente. Las ventajas de este segundo obturador externo es que retiene el 50% del ciclo y da como resultado un incremento de 7 veces en la sensibilidad [125]. Hasta la fecha, este diseño no ha sido comercializado, quizás porque FT-IMS requiere de un software completamente nuevo de adquisición de señales y mejoras en la electrónica.

El obturador de iones, o más bien el intervalo de ciclos de obturación, es una variable importante para establecer la forma del pico en el espectro de movilidad. Debido a

¹²⁴ Knor, F.J., Eatherton, R.L., Siems, W.F., Hill, H.H.Jr. Fourier transform ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 57(2) (1985) 402-406.

¹²⁵ Tarver, E.E. External second gate, Fourier transform ion mobility spectrometry: Parametric optimization for detection of weapons of mass destruction. *Sensors*, 4 (2004) 1-13.

que la anchura mínima del pico se establece por el tiempo necesario para que los iones se muevan a través de la estructura de los conductores a la región del tubo de deriva, la anchura del pico mínima es prácticamente entre 10 y 100 μs . Además, esta cifra es dinámica y depende de los campos eléctricos alrededor de los conductores del obturador. El movimiento de los iones cerca del obturador parece estar regulada por un equilibrio entre el campo eléctrico en los conductores y el campo eléctrico del tubo de deriva. Cuando el campo eléctrico del obturador es bajo, la penetración iónica a través de los conductores ocurre continuamente, mientras que si el campo eléctrico es alto, el paso de iones no se produce, presumiblemente porque los iones son capturados por el obturador.

En resumen, el obturador de iones tradicional de Bradbury-Nielsen proporciona una manera de introducir los iones en el tubo de deriva para la obtención del espectro de movilidad, tanto en equipos de laboratorio como portátiles. Sin embargo, sus limitaciones radican en los tiempos de ciclos de trabajo, ancho de pulso mínimo y la complejidad y el coste para ensamblarlo con el tubo de deriva.

3.4.4. Tubo de deriva

La zona de deriva del tubo de deriva es la sección que se encuentra entre el obturador de iones y el detector. En los tubos de deriva convencionales, esta región está compuesta por una serie de anillos conductores y anillos aislantes (el grosor varía entre los diferentes diseños), apilados juntos para formar el tubo de longitud deseada. Es dentro de esta región en el que las diferentes especies de iones se someten a un campo eléctrico débil, haciendo que se desplacen hacia el detector. Dentro de la región de deriva, un gas de deriva se introduce por la parte del detector y fluye en dirección contraria al desplazamiento de los iones. Las especies iónicas colisionan continuamente con las moléculas del gas de deriva, lo cual causa una reducción en la velocidad relativa de los iones, en función del tamaño y forma de los iones (área de la sección de colisión). Estos dos fenómenos son las bases de la separación de iones dentro del tubo de deriva IMS. Cuanto más largo sea la región o tubo de deriva, más tiempo es necesario para los diferentes iones llegar al detector, por lo que tienen más tiempo para separarse. Este hecho incrementa la resolución, pero causa una

disminución en la intensidad de señal. Las características de rendimiento de un instrumento IMS como son la resolución, relación señal/ruido y la durabilidad se ven afectadas por los materiales utilizados para la construcción del tubo de deriva y de la linealidad del campo eléctrico aplicado para la conducción de los iones hasta el detector.

Las primeras descripciones de tubos de deriva para usos analíticos aparecieron en 1970 con los artículos de Cohen y Karasek [71] y Karasek [72]. Los anillos de metal conductores que componían el tubo de deriva, estaban separados por bolas de zafiro y todo el conjunto de anillos unidos bajo una compresión suave. El tubo de deriva fue construido por elementos cilíndricos que mantienen un campo eléctrico de 200 a 300 V cm^{-1} a través del eje central del tubo de deriva. La ionización se produjo mediante una fuente radiactiva de ^{63}Ni insertada en el primer anillo de deriva. Este tubo de deriva contenía dos obturadores de iones del tipo Bradbury-Nielsen, creando un campo eléctrico en los obturadores de unos $600 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. La puerta de entrada estaba abierta durante 0.2msec cada 20 msec, así pues solo el 1% de los iones formados en la fuente se introducían en el tubo de deriva. En los primeros diseños de tubos de deriva, un segundo obturador de iones fue colocado cerca del detector al final del tubo de deriva, el cual permanecía en posición abierta con un desfase de tiempo respecto del cierre del primer obturador. Solo los iones con tiempos de deriva igual a este desfase podían pasar por el segundo obturador y generar una señal en el detector. El espectro de movilidad era obtenido registrando la intensidad de señal respecto el tiempo de deriva. Las longitudes típicas en los primeros diseños eran entre 6 y 8 cm.

El flujo de gas portador, típicamente fijado entre 50 y 200 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, entra en el tubo de deriva por la zona de ionización, mientras que el gas de deriva, fijado entre 300 y 700 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, entra en el tubo de deriva por la parte del detector. Estos flujos de gas opuestos, son expulsados del equipo a través de un conducto de salida situado justo enfrente de la rejilla del obturador de iones. El gas portador permite llevar la muestra vaporizada hasta la zona de ionización, donde se producen las reacciones en cascada. Sin embargo, si los iones continúan reaccionando en la zona de deriva, los tiempos de deriva serían una mezcla entre los iones originales y los iones que han reaccionado con moléculas neutras, formando clústers o agregados. Para inhibir las reacciones dentro

del tubo de deriva, el gas de deriva no debería contener ninguna molécula neutra con los que los iones podrían reaccionar o formarse agregados en la región de deriva, de ahí el énfasis en la utilización de gases portadores y de deriva lo más puros posibles. La cámara de metal que contiene el tubo de deriva debe soportar temperaturas sobre 200-300 °C para permitir una limpieza exhaustiva y reducción de efectos memoria. Los gases de deriva utilizados son Nitrogeno, Aire, Helio, Argón, Dióxido de Carbono o Hexafluoruro de Azufre.

Los anillos conductores del tubo de deriva pueden estar constituidos por metales, tales como acero inoxidable, aluminio, latón o cobre. Ni la diferencia en la conductividad entre los metales, ni sus costes, son limitaciones para la construcción de los tubos de deriva, por lo que la elección del metal se hace generalmente sobre las propiedades de inercia química, durabilidad y facilidad de mecanizado. El acero inoxidable es resistente, pero también es el metal más duro. El aluminio es ligero en peso y suave para la máquina, sin embargo, su alto coeficiente de expansión térmica lo hace inadecuado para los instrumentos IMS que operan a temperaturas elevadas. El latón y el cobre son ambos metales suaves, ideales para su mecanización, pero el latón se puede contaminar con el tiempo y el cobre es extremadamente reactivo con los compuestos orgánicos. Igual que los anillos conductores del tubo de deriva, la elección de un material aislante para los anillos aislantes también es importante. La material elegido debe ser químicamente inerte, de bajo coste y con facilidad de mecanizado, además de ser capaz de resistir 10^{16} Ohm·cm⁻¹ de resistividad. Algunos de estos materiales son el vidrio, cerámica, mica y Teflón. Plásticos y otros materiales que tienden a tener compuestos volátiles son rechazados. De los compuestos relacionados con el teflón, uno de los candidatos es el PTFE (*polytetrafluoroethylene*) el cual tiene unas excelentes propiedades eléctricas y altas temperaturas de trabajo, alrededor de 260 °C. Sin embargo, el PTFE tiene un elevado coeficiente de expansión térmica.

3.4.5. Rejilla de apertura

La rejilla de apertura (*aperture grid*) es un componente simple y necesario en los instrumentos IMS para prevenir distorsiones en el espectro de movilidad. Esta red de apertura protege al detector del flujo de corriente inducido por la nube de electrones

presentes en el tubo de deriva, hasta que los iones pasen a través de la rejilla de apertura. La función de la rejilla de apertura es interceptar el campo electrostático radiado por la nube iónica, por lo que no induce un flujo de corriente en el detector. Esta rejilla puede ser construida a partir de un conductor en forma de una delgada malla o bien de una red paralela que se coloca aproximadamente entre 0.5 a 2 mm del detector. La rejilla de apertura está basado en un voltaje de tal manera que el campo eléctrico entre la rejilla de apertura y el detector es de aproximadamente entre 2 y 3 veces mayor que el campo eléctrico del tubo de deriva. Este campo eléctrico mayor es necesario porque si el campo eléctrico aplicado entre la rejilla de apertura y el detector es menor que el del tubo de deriva, la nube de iones podría inducir en una corriente de flujo que resulta en un ensanchamiento y distorsión del pico. Los cálculos teóricos y datos experimentales mostraron que la anchura del pico a media altura y el tiempo de desplazamiento disminuye con la intensidad del campo eléctrico entre la rejilla de apertura y el detector [126]. Este campo eléctrico puede ser ajustado mediante la distancia entre la rejilla de apertura y el detector o bien aumentando o disminuyendo el V_{offset} .

3.4.6. Detector y adquisición de señales

El detector más simple y más utilizado como colector de iones para el espectrómetro de movilidad iónica es el plato Faraday. El plato Faraday, es un disco de metal circular que se coloca al final del tubo de deriva directamente frente a los iones entrantes. El disco se conecta a la entrada inversora de un amplificador de corriente. Cuando los iones son colectados y neutralizados en el plato Faraday, se produce una corriente entre 10^{-10} a 10^{-11} amperios, y amplificado a potenciales de 1 a 10 V por un amplificador de corriente. El potencial de salida es la medida de la intensidad de señal de los iones, y se considera que tiene unidades arbitrarias, ya que varía entre los diferentes instrumentos IMS.

Tal y como se había comentado en el apartado anterior, antes de que los iones lleguen al detector, tienen que pasar por la rejilla de apertura, que previene del flujo de corriente inducida por la aproximación de la nube de iones y que causaría una

¹²⁶ Spangler, G.E. Expanded theory for the resolving power of a linear ion mobility spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* 220 (2002) 399-418.

distorsión y ensanchamiento de los picos respecto los analitos. Es evidente que en el espacio existente entre la rejilla de apertura y el detector también se crea un flujo de corriente inducida por la nube de iones, pero esta distorsión es despreciable en la escala de tiempo del espectro de movilidad. El tamaño relativo de la rejilla de apertura y del colector entre ellos y respecto los anillos del tubo de deriva, afectan a la sensibilidad y a la resolución del instrumento. Por poner un ejemplo, si el tamaño del detector y de la rejilla de apertura es igual al diámetro de los anillos del tubo de deriva, la sensibilidad es máxima, pues todos los iones que atraviesan el tubo de deriva llegan al detector; por contrapartida, debido a la gran dispersión en tiempo que tardan todos los iones, los cuales siguen caminos distintos hasta llegar al detector, la señal podría ensancharse y reducirse la resolución. La resolución se puede mejorar si el detector y/o la rejilla de apertura tienen un diámetro menor que los anillos del tubo de deriva; esto reduciría la corriente de iones y la sensibilidad, pero permitiría solo a los iones que viajan cerca del centro de la trayectoria rectilínea del tubo de deriva golpeen el plato colector y provocando una disminución en la dispersión de los tiempos de llegada de los iones.

La salida del detector IMS es una señal analógica, que se digitaliza, se almacena como un archivo de texto y se representa en un gráfico XY como el espectro de movilidad. El tiempo de deriva de las especies iónicas es representado en el eje X, empezando a tiempo 0 (correspondiente al tiempo en que el obturador de iones se abre y permite el paso de los iones hacia el tubo de deriva), y la intensidad de señal en unidades arbitrarias o potencial representado en el eje Y. Los datos obtenidos por un solo espectro (*scan*) son generalmente muy ruidosos, incluso en instrumentos robustos, por lo tanto el espectro de movilidad iónica se obtiene promediando un número determinado de *scans*. Es común registrar entre 50 a 400 *scans* para el promedio de la señal, mientras que en otros equipos se realizan hasta 1000 *scans*. Este valor depende del hardware y software utilizado.

Otro modo de visualizar los datos es representando cada espectro de movilidad en función del tiempo de análisis (eje Z), creando un gráfico pseudo 3-D o plasmagrama. En la Figura 3.8 se muestra un plasmagrama de una solución que contiene dos principios activos (Etinilestradiol y Desogestrel). En la parte superior izquierda se

observa el plasmagrama pseudo 3-D, mientras que a su derecha se observa el gráfico de desorción de los analitos. En la parte inferior izquierda se encuentra la vista del tiempo de deriva y en la parte derecha la vista del plasmagrama por la parte superior.

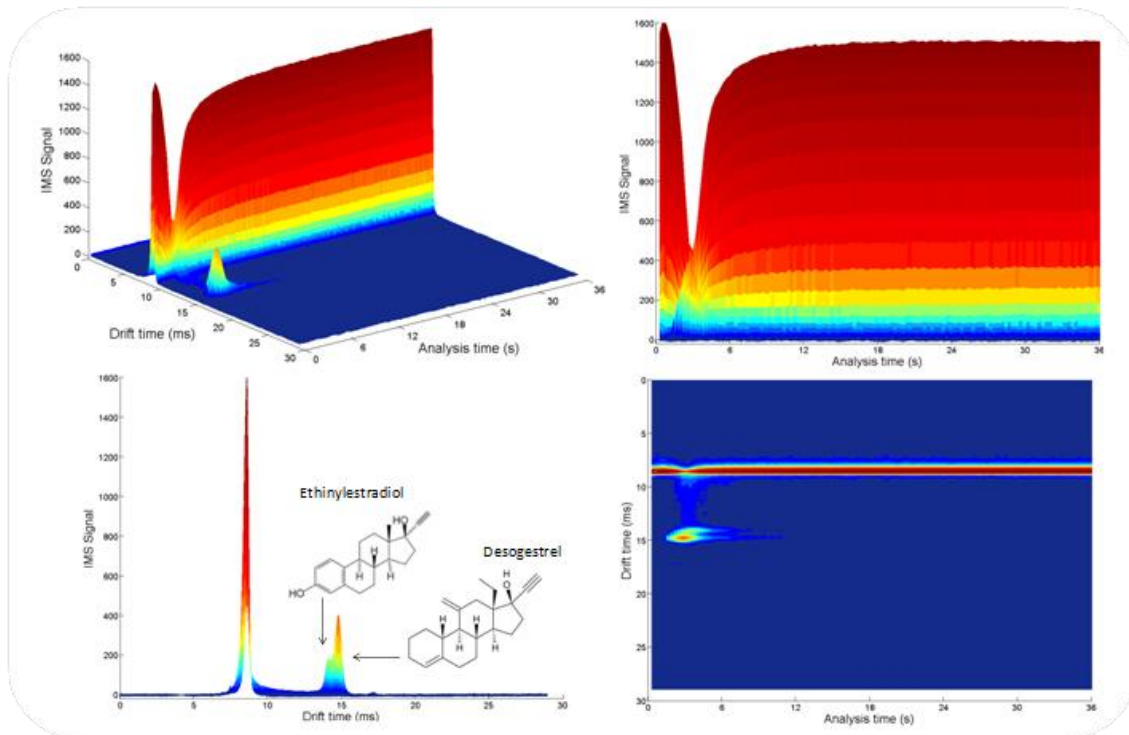


Figura 3.8 Plasmagrama de una mezcla que contiene 2 principios activos (Ethinylestradiol y Desogestrel)

3.4.7. Miniaturización y tubos de deriva alternativos

Varios grupos han realizado grandes avances en el diseño de tubos de deriva de instrumentos IMS en la última década, con nuevas configuraciones que permiten simplificar la construcción de tubos de deriva, posibilitando una producción en masa a bajo coste, así como mejoras sustanciales en la sensibilidad y resolución.

Una alternativa a los tubos de deriva de anillos apilados son los tubos de deriva basados en diseños de tubos de vidrio y tubos de deriva de resistencia. Los recientes intentos de miniaturización de equipos IMS para su uso en aplicaciones de campo, pone más limitaciones en el diseño del tubo de deriva, debido a que la disminución del tamaño del tubo de deriva por lo general causa un menor rendimiento en términos de sensibilidad y resolución. Los obturadores de iones, la rejilla de apertura y los anillos del tubo de deriva se mantienen como las barreras en la miniaturización de los equipos IMS.

La técnica de la espectrometría de movilidad iónica convencional, es a veces denominada como espectrometría de movilidad iónica de tiempo de deriva (DTIMS, *Drift Time Ion Mobility Spectrometry*), la cual trabaja a presión atmosférica, y por lo tanto sufre de una baja sensibilidad, motivada fundamentalmente por la mala transmisión iónica, y por el sistema de introducción de iones en discontinuo. Una variante de la DTIMS que permite la introducción de los iones en continuo es la denominada espectrometría de movilidad iónica por aspiración (AIMS). En este diseño, el caudal de gas portador que introduce los iones en el analizador fluye perpendicularmente en la dirección del campo eléctrico [127,128]. De esta manera los iones trazan trayectorias curvadas antes de impactar sobre los electrodos y ser detectados, midiéndose su movilidad en función de la distancia que recorren. Este tipo de analizador, además de permitir la introducción de iones en continuo, es capaz de detectar simultáneamente iones positivos y negativos, ya que recorren trayectorias opuestas e impactan de forma simultánea en los electrodos opuestos.

Además de los instrumentos IMS de campo eléctrico de bajo voltaje, existe otros tipos de instrumentos similares a los AIMS con la diferencia fundamental de que se aplican campos de alto voltaje. Por lo demás, el dispositivo es muy similar, ya que se disponen en paralelo dos electrodos planos a través de los que fluye el gas de deriva y los iones, moviéndose en dirección perpendicular a los electrodos y en sentidos opuestos y de forma alterna. Entre los electrodos se aplica un elevado potencial eléctrico alterno (voltaje de dispersión), de tal manera que en una de las direcciones perpendiculares a los electrodos el campo es dos veces más intenso que en la otra dirección, pero se aplica la mitad de tiempo. En consecuencia, la movilidad del ion es diferente en cada una de las direcciones, y es precisamente este efecto el que se usa para separar los iones, y por lo tanto la técnica se denomina espectrometría de movilidad iónica diferencial (DIMS). Sin embargo, este proceso produce el efecto negativo de dispersar los iones con igual índice de movilidad, y con el fin de minimizar el efecto se aplica a uno de los electrodos un voltaje adicional llamado de compensación. Haciendo un

¹²⁷ Adamov, A, Viidanoja, J., Kärpänoja, E, Paakkanen, H., Ketola, R.A., Kostiainen, R., Sysoev, A., Kotiaho, T. Interfacing an aspiration ion mobility spectrometer to a triple quadrupole mass spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007) 044101 1-5.

¹²⁸ Zimmermann, S., Abel, N., Baether, W., Barth, S. An ion-focusing aspiration condenser as an ion mobility spectrometer. *Sens. Actuator B-Chem.* 124 (2007) 428-434.

barrido de este voltaje se consigue ir enfocando sucesivamente en el detector los iones con la misma movilidad, y obtener el correspondiente espectro.

Con un diseño diferente, pero basado en el mismo principio que la DIMS, se encuentra la espectrometría de movilidad iónica de alto voltaje asimétrico (FAIMS, *Field Asymmetric waveform-Ion Mobility Spectrometry*). En este caso, los electrodos son dos cilindros concéntricos entre los que circulan el gas deriva y los iones, y a los que se les aplican los correspondientes potenciales. Tanto en FAIMS como en DIMS los analizadores trabajan en condiciones de presión atmosférica, y con entrada en continuo, por lo que su nivel de sensibilidad supera al conseguido con los analizadores convencionales de movilidad iónica.

Por último, ha aparecido recientemente la espectrometría de movilidad iónica de onda progresiva (TWIMS, *Traveling-Wave Ion Mobility Spectrometry*) cuyo analizador se sitúa por sus características a medio camino entre los de bajo y alto voltaje [129]. Este analizador consiste en una sucesión longitudinal de lentes, y durante su funcionamiento se aplica un alto voltaje en el segmento inicial de la celda, es decir en el punto por donde entran los iones. A continuación, este voltaje es desplazado secuencialmente en el sentido de migración de los iones, consiguiéndose así la separación de éstos en base a su diferente movilidad a lo largo de los pulsos de voltaje.

3.5 Parámetros operacionales que afectan al rendimiento en IMS

La química de los iones en fase gas bajo presión atmosférica se puede complicar en un ambiente incontrolado. Temperatura, humedad, presión, campo eléctrico, caudales de gas, composición del gas de deriva y la densidad iónica son factores esenciales en el tiempo de deriva, la intensidad de los picos y el poder de resolución. La reproducibilidad de las respuestas cualitativas y cuantitativas se consigue cuando estos parámetros se mantienen controlados. La optimización de estos parámetros es crítico para la detección de compuestos de interés.

3.5.1 Temperatura

¹²⁹ Pringle, S.D., Giles, K., Wildgoose, J.L., Williams, J.P., Slade, S.E., Thalassinou, K., Bateman, R.H., Bowers, M.T., Scrivens, J.H. *Int. J. Mass Spectrom.* 261 (2007) 1-12.

La temperatura tiene dos efectos sobre los iones a un nivel de humedad fijado. A elevadas temperaturas, dependiendo de los analitos, puede ocurrir la disociación de moléculas de agua del clúster iónico formado y la fragmentación de los iones a iones más pequeños con mayor movilidad. Así, los iones detectados a temperatura ambiente pueden no ser los mismos iones detectados a altas temperaturas para la misma muestra. Adicionalmente, los dímeros formados y los trímeros (formados bajo altas concentraciones de analito) de muchos compuestos se disocian para obtener los monómeros si la temperatura está por encima de 80 a 100°C y -20 a 0°C, respectivamente [90,130]. Por lo tanto la identificación de los analitos como tales se perderán al operar a temperaturas elevadas. Además si la temperatura en el tubo de deriva no se mantiene constante, un cambio en los iones puede producirse mientras estos viajan por el tubo de deriva. Así pues, para una comparación de los espectros de movilidad iónica entre laboratorios, es crítico que la temperatura utilizada en el tubo de deriva sea correctamente controlada.

3.5.2 Humedad

La humedad tiene un gran efecto en la identificación de los iones, ya que según el nivel de humedad en el interior del tubo de deriva, los iones pueden formar clústeres con una molécula más de agua o bien perderla cambiando su masa efectiva y cambiando su sección de colisión o tamaño. Consecuentemente, el tiempo de deriva de los iones cambiará. Si la humedad se reduce a límites por debajo de 10 ppm, los iones reactantes primarios podrían no ser los protones hidratados $H^+(H_2O)_n$, sino que se forman otros iones como H_2O^+ , N_4^+ y N_2^+ . Como resultado, la ionización de moléculas neutras puede ocurrir a través de mecanismos de transferencia de carga más que de transferencias de protón. Las consecuencias en reducir la humedad incluyen cambios en las sensibilidades de respuesta de los analitos y la formación de nuevos iones. Cuando el nivel de humedad dentro del tubo de deriva está por encima de 0.5ppm, la mayoría de los analitos se transformarán en fragmentos iónicos incluso a temperaturas bajas.

¹³⁰ Ewing, R.G., Eiceman, G.A., Harden, C.S., Stone, J.A. The kinetics of the decompositions of the proton bound dimers of 1,4-dimethylpyridine and dimethyl methylphosphonate from atmospheric pressure ion mobility spectra. *Int. J. Mass Spectrom.* 255-256 (2006) 76-85.

3.5.3 Presión

La presión ha mostrado tener un efecto en el poder de resolución de picos. Sin embargo, no hay efecto sobre los factores de separación debido a los desplazamientos de los picos linealmente con la presión. Tabrizchi *et al.* [131] demostraron que el poder de resolución y la resolución disminuye con la presión dentro del tubo de deriva. El poder de resolución en IMS es la relación entre el tiempo de deriva del analito y la anchura de pico a media altura en segundos; la resolución en IMS es una función tanto de la eficiencia y la selectividad de la separación, expresada como la relación entre la separación de los picos en tiempo de deriva y el promedio de la base de los dos picos en cuestión [132]. La disminución en el poder de resolución y la resolución es debida por el aumento de la densidad iónica a baja presión. Para poder contrarrestar este efecto, se puede disminuir la cantidad de iones que entran en el tubo de deriva modificando la puerta de entrada de la rejilla del obturador de iones.

3.5.4 Campo eléctrico

El campo eléctrico dentro del tubo de deriva es optimizado para conseguir el mejor transporte iónico hacia el detector para obtener una mejor intensidad de pico y mejor poder de resolución. Dentro del tubo de deriva hay 4 regiones que tienen diferentes campos eléctricos: 1) El campo eléctrico entre la fuente de ionización y el primer conjunto de conductores del obturador de iones (E_{f-o}), 2) el campo eléctrico entre los 2 conjuntos de conductores del obturador de iones (E_o), 3) el campo eléctrico entre el obturador de iones y la rejilla de apertura, la cual es el campo eléctrico de la zona de deriva (E_d), y 4) el campo eléctrico entre la rejilla de apertura y el detector (E_{a-d}). Los valores optimos para cada uno de estos campos eléctricos varían de un tubo de deriva a otro [133].

A medida que aumenta E_{f-o} , la nube de iones se dirige fuera de la zona de ionización y se observa una mejora en la intensidad de pico. La intensidad de pico alcanza el

¹³¹ Tabrizchi, M., Rouhollahnejad, F. Pressure effects on resolution in ion mobility spectrometry. *Talanta*, 69 (2006) 87-90.

¹³² Asbury, G.R., Hill Jr., H.H. Evaluation of ultrahigh resolution ion mobility spectrometry as an analytical separation device in chromatographic terms. *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 172-178.

¹³³ Eiceman, G.A., Nazarov, E.G., Rodríguez, J.E., Stone, J.A. Analysis of a drift tube at ambient pressure: Models and precise measurements in ion mobility spectrometry. *Rev. Sci. Instrum.* 72 (2001) 3610-3621.

máximo cuando se alcanza un valor del campo eléctrico de $400 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ (ó 2 veces el campo eléctrico del tubo de deriva). En los equipos tradicionales de IMS, el coeficiente de movilidad (K_0) es independiente del campo eléctrico del tubo de deriva aplicado, mientras este campo se mantenga bajo un cierto valor, comúnmente a $300 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$, debido a que en el campo eléctrico bajo, la energía adquirida por el ion a través del campo eléctrico es considerada negligible debido a las constantes colisiones iónicas con moléculas de gas. Un campo eléctrico mayor proporciona intensidades de pico mayores, menor anchura de pico a media altura (FWHM) y menor tiempo de deriva, pero como el campo eléctrico excede el valor anterior, K_0 , ya no será constante y en su lugar será dependiente del campo eléctrico. Se ha descrito que si bien el poder de resolución aumenta con la raíz cuadrada del potencial aplicado para el tubo de deriva, en realidad existe un potencial a partir del cual el poder de resolución disminuye.

Si el campo eléctrico del tubo de deriva aumenta y el potencial aplicado en el obturador de iones no se reajusta, los espectros de movilidad iónica sufrirán un aumento de la línea base debido a que los iones pueden atravesar el obturador, a pesar de que se encuentra cerrado. Esta fuga aumenta tal que el campo eléctrico del tubo de deriva va aumentando. Del mismo modo, si el potencial del obturador de iones no se ajusta a un nivel óptimo respecto al del tubo de deriva, los iones podrán penetrar en el tubo de deriva, causando un aumento de la línea base [133].

Finalmente, el campo eléctrico entre la rejilla de apertura y el detector (E_{a-d}) se ha mostrado ser óptimo con un valor de 2 a 3 veces mayor que el campo eléctrico del tubo de deriva. Si el campo eléctrico es menor que el intervalo óptimo, se observan distorsiones en los picos de los analitos, y los iones serán más propensos a chocar contra la rejilla de apertura en lugar del detector.

La homogeneidad y linealidad del campo eléctrico es deseable a través de la zona de deriva del tubo de deriva, para que los iones viajen a lo largo del eje central del tubo de deriva con la mínima pérdida de los iones que puedan chocar contra las paredes del tubo de deriva durante el proceso de separación.

3.5.5 Caudales del gas

El gas de arrastre se introduce en el tubo de deriva como gas portador para llevar los analitos a la fuente de ionización, así como proporcionar la atmósfera necesaria para que la ionización ocurra dentro de la fuente de ionización de ^{63}Ni . El gas de deriva se introduce para proporcionar el ambiente para el proceso de separación de los iones. Los caudales de flujo de gas y su orientación, deben ser cuidadosamente equilibrados y modelados para obtener la respuesta óptima de la señal de los iones. Los caudales del gas de deriva y del gas de arrastre son normalmente fijados a $300\text{-}500\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $50\text{-}200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Es muy importante que el gas utilizado no contenga moléculas neutras y que estas no entren en la zona de deriva, porque con su presencia se pueden formar clústeres con los iones presentes en la zona de deriva, cambiando su masa y por tanto el tiempo de deriva en que llegarán al detector.

Hay diversos métodos a través de los cuales se pueden introducir los gases de arrastre y de deriva en el tubo de deriva del IMS. El método más común es la introducción del gas de arrastre por el inlet y el gas de deriva por la parte posterior del tubo de deriva, donde se encuentra el detector. Estos dos gases se encuentran y salen por la misma salida, la cual está localizada entre la fuente de ionización y el obturador de iones. En otros diseños de instrumentos IMS, la salida de estos gases está situada en la parte delantera del tubo de deriva, y el gas de arrastre se introduce en un lado del tubo de deriva en un punto después de la fuente de ionización. También puede ser posible tener la salida del gas de arrastre en una posición diferente del gas de deriva, haciendo que los dos gases nunca se mezclen.

3.5.6 Composición del gas de deriva

Hasta ahora, los parámetros descritos anteriormente (temperatura, humedad, intensidad del campo eléctrico y el flujo de gas) afectan a todas las especies del mismo modo o de la misma manera. La composición del gas causa diferentes efectos para las distintas especies iónicas bajo idénticas condiciones. La interacción del gas de deriva con las especies iónicas de manera individual depende de la masa reducida del gas de deriva, de la polarizabilidad del gas de deriva y de la sección de colisiones gas-ion. Cuando se cambia el gas de deriva de aire a argón, la llegada de unas especies iónicas puede llegar antes mientras que otras especies pueden retrasarse. Los cambios de

gases de deriva pueden resolver el solapamiento que se puede producir en dos especies que no puede ser resuelta bajo las condiciones normales [134].

3.5.7 Densidad iónica

Conseguir la máxima respuesta o límites de detección bajos es siempre la meta de cualquier técnica analítica. Aumentar la producción de iones y la anchura de las puertas del obturador de iones, generalmente aumentan la sensibilidad. Sin embargo, cuando la densidad iónica dentro del equipo IMS exceden un cierto valor, aparece la dispersión espacial debido a repulsiones coulómbicas. Con una densidad iónica en exceso, las repulsiones coulómbicas causan un esparcimiento de los iones y hacen que los iones se pierdan a lo largo de la pared del tubo de deriva antes de que lleguen al detector. Este esparcimiento de los iones conlleva una disminución en la respuesta y un empeoramiento en la resolución. La restricción de la densidad iónica es un factor crítico para el diseño y operación en instrumentos IMS miniaturizados debido a los tubos de deriva pequeños limitan el volumen en el que el número óptimo de iones que llegan al detector proporcionen una buena respuesta.

3.6 Límites de detección, Intervalo lineal y % RSD

A pesar de los bajos ciclos de trabajos de los obturadores de iones convencionales utilizados (Bradbury-Nielsen-gate), los cuales solo permiten el 1% de los iones formados introducirse en el tubo de deriva, los límites de detección para muchos compuestos están en el intervalo de nanogramos y algunos de ellos en nivel de picogramos. La técnica IMS es conocida por tener unos intervalos lineales más pequeños comparados con otras técnicas analíticas. Dependiendo del analito en cuestión, existen varios tramos lineales a lo largo de la masa del mismo. El comportamiento de varios intervalos en IMS se explica en la bibliografía como que el resultado de velocidad de consumo de ion reactivo es más alta que la velocidad de formación de iones reactivos de la fuente de ^{63}Ni . Cuando un instrumento IMS trabaja en un entorno controlado de laboratorio, el porcentaje de desviación estándar relativo (RSD%) está en unos intervalos entre 2% a un 25% para muchos compuestos y

¹³⁴ Asbury, G.R., Hill, H.H. Using different drift gases to change separation factors (α) in ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 72(3) (2000) 580-584.

disminuye al aumentar la masa del mismo. Sin embargo, la señal RSD% puede aumentar al cambiar la ubicación y el entorno en que el análisis se lleva a cabo, por un cambio en la presión, humedad, etc.

3.7 Limitaciones y futuros desarrollos en IMS

A pesar de ser una técnica con más de un siglo de antigüedad, la técnica IMS se ha visto durante muchos años relegada a su aplicación como detector portátil de drogas y agentes de guerra química, y a los desarrollos realizados sólo por unos pocos grupos de investigación en todo el mundo. En la actualidad vive un renacer como técnica analítica versátil, robusta y fiable, gracias a los recientes avances tecnológicos y a sus posibles acoplamientos a otras técnicas analíticas.

Una inspección de la bibliografía muestra un amplio abanico de aplicaciones de esta técnica más allá del análisis de explosivos, sustancias estupefacientes y armas químicas. IMS se ha convertido en una técnica de uso común para el control de calidad de productos y la validación de limpieza en el sector farmacéutico, así como en otros campos tales como los análisis clínicos, alimentarios y medioambientales, entre otros.

Sin embargo, la técnica IMS tiene ciertas limitaciones como el riesgo de reacciones de ionización competitiva, que pueden suponer la pérdida de señal de algunos analitos. Otra limitación importante es el bajo poder de resolución que tiene esta técnica utilizando equipos comerciales, por lo que es necesario del uso de detectores selectivos y/o una separación previa de los compuestos.

Futuros desarrollos en la instrumentación y en los tubos de deriva, permitirán mejorar la resolución de IMS y disminuir los límites de detección. Asimismo, los avances en los estudios basados en los desarrollos de IMS en tándem, para conseguir espectros multidimensionales, instrumentos portátiles y de laboratorio GC-IMS, y sistemas de entradas y métodos de ionización combinados podrán aumentar su sensibilidad, poder de resolución y selectividad.



4. Quimiometría

4. Quimiometría

4.1 Introducción

Las técnicas instrumentales y especialmente las espectroscópicas, generan, en un corto periodo de tiempo, una gran cantidad de datos relacionados con las muestras analizadas. La conversión de estos datos en información útil requiere el uso de herramientas matemáticas y estadísticas, que han dado lugar a una disciplina denominada Quimiometría [135,136].

La Quimiometría fue definida en 1975 [137] como el conjunto de métodos utilizados para extraer información química útil de un conjunto de datos originales. Massart *et al.* [135] dieron una definición más completa y precisa de este término: “La Quimiometría es la parte de la química que se sirve de las matemáticas, estadística y lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente, adquirir conocimiento de los sistemas químicos”.

La complejidad de la señal NIR hace imprescindible la utilización de técnicas quimiométricas que nos permitan interpretar, entender y modelar grandes conjuntos de datos. La quimiometría posee una gran cantidad de aplicaciones y de naturaleza muy diversa. En esta memoria, aparecen recogidos una serie de trabajos donde se ha aplicado la quimiometría a la resolución de diversas problemáticas que aparecen en el desarrollo de métodos de análisis mediante espectroscopia NIR, así como también, la aplicación para problemas aparecidos en la espectrometría de movilidad iónica. Los más comunes son el filtrado de señales (pretratamientos aplicados a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal), métodos de reconocimiento de pautas (técnicas multivariantes que permiten establecer relaciones entre muestras para agruparlas según la similitud de sus espectros y métodos de clasificación de nuevas muestras) y métodos de calibración (técnicas multivariantes que permiten

¹³⁵ Massart, D.L., Vandegiste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers, J. *Handbook of chemometrics and qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam (1997).

¹³⁶ Beebe, K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B. *Chemometrics. A practical guide*, John Wiley & sons, New York (1998).

¹³⁷ Kowalski, B.R. Chemometrics: views and propositions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 15 (1975) 201-203.

relacionar cuantitativamente la señal analítica con la propiedad a determinar). En los apartados siguientes se describirán algunas de las técnicas quimiométricas utilizadas en esta memoria para el desarrollo de los métodos propuestos.

4.2 Etapas del proceso de modelado

El proceso de modelado de un conjunto de datos, ya sea para clasificación o bien para determinación cuantitativa de un parámetro determinado, tiene como finalidad obtener un modelo capaz de predecir propiedades de una muestra. Para la obtención de un modelo robusto se deben seguir las siguientes etapas: selección de un conjunto de calibración, determinación de la propiedad o identidad por métodos de referencia adecuados, obtención de la señal analítica, pretratamiento de los datos, construcción del modelo, validación del modelo, predicción de nuevas muestras. A continuación se explica más detalladamente cada una de las etapas implicadas en el modelado de los datos.

4.2.1 Selección del conjunto de calibración

El conjunto de calibración debe contemplar todas las fuentes de variabilidad del sistema, tanto físicas como químicas para obtener una buena capacidad predictiva. El conjunto de calibración deberá incorporar variabilidad de distinta naturaleza según la finalidad del modelo, para modelos de clasificación las muestras deberán incorporar toda la variabilidad que pueda darse para cada tipo de muestras (proveedor, tamaño de partícula, grados de pureza...), mientras que para calibración multivariable, las muestras seleccionadas deberán ser representativas de todo el intervalo del parámetro a determinar, además de las mencionadas anteriormente.

4.2.2 Métodos de referencia

A través de ellos se determinan las concentraciones o propiedades de las muestras mediante los métodos analíticos pertinentes, que deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ellos dependerá la exactitud del modelo multivariable obtenido.

4.2.3 Obtención de la señal analítica

Para la obtención de la señal analítica se debe someter a las muestras al procedimiento instrumental elegido. Una vez que el sistema instrumental proporciona los datos resultantes, éstos son almacenados y quedan disponibles para su posterior tratamiento.

4.2.4 Pretratamiento de los datos

En esta etapa se minimizan las contribuciones no deseadas, presentes en la señal analítica, que disminuyen la reproducibilidad y pueden provocar no linealidades u otros efectos que darían lugar a estimaciones menos sólidas. Además, estos pretratamientos pueden aumentar la señal correspondiente al analito de interés, aumentando la relación señal/ruido. Los pretratamientos más utilizados son:

- Promedio de espectros: el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce el ruido espectral, ya que éste es considerado aleatorio.
- Suavizado (*Smoothing*): existen filtros que permiten minimizar el ruido espectral mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) [138] o por Transformada de Fourier [139].
- Derivación: es uno de los pretratamientos más utilizados en la espectroscopia NIR por su capacidad de solventar problemas característicos de esta técnica, como son las bandas anchas y solapadas del espectro. La utilización de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada corrige además las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Generalmente no se utilizan derivadas de orden superior, puesto que la primera y segunda derivada suelen ser suficientes. Los dos métodos más utilizados son el

¹³⁸ Savitzky, A., Golay, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627-1639.

¹³⁹ Horlick, G. Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. *Anal. Chem.* 44 (1972) 943-947.

método de ventana móvil (*Moving Averaged Segment Convolution*) propuesto por Norris y Williams [140] y el propuesto por Savitzky y Golay [138].

- Variable normal estándar (SNV, *Standard Normal Variate*): se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (*scattering*), siendo útil para muestras sólidas o líquidas con turbidez. El pretratamiento centra y autoescala cada espectro, restando el valor medio de la absorbancia del espectro a los valores de absorbancia de cada longitud de onda y dividiendo por la desviación estándar [141].

4.2.5 Construcción del modelo

El modelo se construye a través de la herramienta quimiométrica escogida (cualitativa o cuantitativa), pero buscando seleccionar siempre un modelo que establezca la relación más simple posible entre la propiedad a determinar y la señal analítica. En la construcción del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo, tales como el intervalo espectral, el pretratamiento espectral, muestras anómalas, número de componentes o factores, errores de calibración, entre otros.

4.2.6 Validación del modelo

La validación consiste en el análisis de un grupo de muestras independientes al utilizado en calibración (en modelos cualitativos se conoce su identidad y para cuantitativos se conoce el valor de la propiedad a determinar). De esta manera se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del conjunto de datos experimentales. Si los resultados no son satisfactorios el modelo se tiene que volver a recalcular.

4.2.7 Predicción de nuevas muestras

Una vez construido y validado el modelo, éste puede ser aplicado en la predicción de nuevas muestras desconocidas.

¹⁴⁰ Norris, K.H., Williams, P.C. Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. *Cereal Chem.* 61(2) (1984) 158-165.

¹⁴¹ Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J., Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43(5) 772-777.

4.3 Análisis cualitativo

Las técnicas quimiométricas han sido ampliamente aplicadas a la resolución de distintos problemas de clasificación de sustancias mediante una serie de características o magnitudes físicas de las muestras medidas o determinadas previamente. Estas técnicas quimiométricas utilizadas en problemas en análisis cualitativo, se conocen de forma general con el nombre de Métodos de Reconocimientos de Pautas (PRM, *Pattern Recognition Methods*).

Los métodos de reconocimientos de pautas son un conjunto de herramientas quimiométricas que permiten establecer agrupaciones de muestras en función de características comunes o relaciones que existan entre ellas o bien definir métodos de clasificación para muestras desconocidas. La mayoría de métodos de reconocimientos de pautas se basan en la similitud, parámetro que indica en qué medida un objeto es igual a otro. La manera más común de expresar similitud es a través de medidas de correlación o distancias.

Los PRM pueden clasificarse según se conozca a priori o no, la pertenencia de los objetos a clases determinadas siendo denominados métodos supervisados y métodos no supervisados, respectivamente.

4.3.1 Métodos no supervisados

Estos métodos se basan en descubrir agrupaciones de pautas en el espacio de N-dimensiones sin saber a priori a qué clase pertenece cada muestra. Los más comunes son análisis de clústers [142,143,144], *minimal spanning tree (MST)* [145], redes neuronales no supervisadas (Kohonen) [146].

¹⁴² Bratchell, N. Cluster Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 6 (1987) 105-125.

¹⁴³ Ortiz, M.C., Sarabia, L. Análisis de agrupaciones. En *Temas avanzados de quimiometría*. Eds. M. Blanco, y V. Cerdà (2007). Universitat de les illes Balears. Palma. 389-420.

¹⁴⁴ Xu, D. Redman-Furey, N. Statistical cluster analysis of pharmaceutical solvents. *Int. J. Pharm.* 339 (2007) 175-188.

¹⁴⁵ Strouf, O. *Chemical Pattern Recognition*, Research Studies Press. LTD, Letchworth, Hertfordshire, England, 1986.

¹⁴⁶ Bianchi, D., Calogero, R., Tirozzi, B. Kohonen neural networks and genetic classification. *Math. Computer Mod.* 45 (2007) 34-60

Existen discrepancias en considerar el PCA como un método de clasificación, ya que no establece límites entre las diferentes clases ni aplica ningún criterio estadístico que permita distinguir entre las clases, pero si es una técnica de reducción de variables que permite visualizar que similares o diferentes son un grupo de muestras en un espacio de 2 ó 3 dimensiones.

El PCA ha constituido el pilar central a partir del cual se han desarrollado multitud de métodos quimiométricos. Conceptualmente, PCA recoge la idea de condensar una gran cantidad de datos de partida en unos pocos parámetros representativos (denominados componentes principales, factores latentes o variables latentes). El objetivo del PCA es encontrar las direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras, utilizándolas como nuevos ejes de coordenadas, siendo los componentes principales (PC). Los *loadings* son los cosenos de los ángulos que forman los nuevos ejes con los originales y los *scores* son las coordenadas de las muestras con los nuevos ejes.

Considerando la matriz de datos espectroscópicos X , donde cada una de las m filas corresponde al espectro de una muestra, y cada columna es la absorbancia a la longitud de onda k , se puede descomponer en el producto de dos matrices, una de *scores* T y otra de *loadings* P , quedando una matriz de residuales E , con la información no recogida por T y P .

$$X = TP^T + E$$

Cada componente principal, que es ortogonal respecto a los demás componentes principales, contiene información de diferente relevancia. Así, los primeros PC describen la fuente de variación más importante de los datos.

A partir de la representación de los *scores* de las muestras de un componente frente los otros componentes se puede realizar una clasificación subjetiva; en los gráficos de

scores, si hay relación entre las muestras aparecerán agrupados, mientras si no se parecen, los puntos aparecerán dispersos entre si [147].

4.3.2 Métodos supervisados

Estos métodos de clasificación se basan en un aprendizaje previo del sistema, con conjuntos de calibración de objetos que definirán cada una de las clases. Los objetos pertenecerán a una de las clases. La calidad de los resultados de clasificación vendrá influenciada por la calidad de los conjuntos de calibración seleccionados. Los métodos supervisados se pueden dividir en dos categorías:

i) Métodos discriminantes:

Estos métodos están basados en la división del espacio en tantas regiones como clases haya en el conjunto de calibración, creando límites compartidos por los espacios; por ello, toda muestra desconocida, siempre podrá ser clasificada como perteneciente a una de las clases.

- Análisis discriminante (DA): está basado en el concepto de una función discriminante que divide el espacio en regiones características para cada una de las clases, creando fronteras entre cada una de ellas. Los dos métodos más conocidos son Análisis Discriminante Lineal (LDA) y Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) [148].
- KNN (*k-nearest neighbour*): este método clasifica un objeto como perteneciente a la clase en la cual la mayoría de objetos pertenecientes a ella son más cercanos al objeto test. Generalmente se utiliza la distancia euclídea como medida de distancia [149,150].

¹⁴⁷ Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S.P., Lewi, J., Smeyers-Verbeke, S. Principal Components. In: Vandeginste, B.G.M. and Rutan, S.C. (ed), Handbook of chemometrics and qualimetrics: part B, Elsevier (1998) 207-241.

¹⁴⁸ Lachenbruch, P.A., Goldstein, M. Discriminant Analysis. *Biometrics* 35 (1979) 69-85.

¹⁴⁹ Coomans, D., Massart, D. L. Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 1: K-nearest neighbour classification by using alternative voting rules. *Anal. Chim. Acta* 136 (1982) 15-27

¹⁵⁰ Coomans, D., Massart, D. L. Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 2. Probabilistic classification on the basis of the kNN method modified for direct density estimation. *Anal. Chim. Acta* 138 (1982) 153-165.

- Funciones potenciales: estos métodos pueden considerarse como generalizaciones del método KNN. Cada objeto del conjunto de calibración se considerado como un punto rodeado por un campo potencial. La clasificación de un objeto dentro de una de las clases es determinada mediante el potencial acumulado de la clase en la posición del objeto desconocido. El potencial acumulado se obtiene sumando los potenciales individuales de los objetos de la clase en la posición del objeto desconocido. El objeto se clasifica dentro de la clase que da el mayor potencial acumulado [151].

ii) Métodos de modelado:

El objetivo de los métodos de modelado es el de determinar (modelar) el espacio que ocupa cada clase, de tal manera que cada clase será descrita por un modelo matemático, creando límites distintos para cada una de las clases. Los objetos desconocidos se asignan a una u otra clase en función de la distancia (o probabilidad de pertinencia) calculada según cada uno de estos modelos, o a ninguna de ellas. La complejidad matemática de estos algoritmos de clasificación es mayor que la de los métodos discriminantes, pero tienen la ventaja de permitir la detección de *outliers*, es decir objetos que no pertenecen a ninguna de las clases.

- Correlación: La identificación de la muestra se realiza mediante el cálculo del coeficiente de correlación entre su espectro y el espectro promedio de la clase definida previamente. Cuanto más cercano a 1 sea el coeficiente de correlación, mayor similitud hay entre la muestra y la clase. Habitualmente se fija un valor umbral o límite (*threshold*) de correlación, por encima del cual se determina cuando una muestra desconocida puede ser identificada como perteneciente a dicha clase.

- Distancia: Estas medidas se basan en el cálculo de una distancia que representa cuanto diferente es una muestra de otra o bien de un punto en el espacio que represente el modelo de una clase. La distancia Euclídea se basa en cálculos realizados en el espacio de longitudes de onda. Cada clase se define

¹⁵¹ Coomans, D., Broeckkaert, I. Potential pattern recognition in chemical and medical decision making, Ed by Coomans, D. and Broeckkaert, I. Research Studies Press Ltd. (1986).

como una hiperesfera, con un radio determinado. Una muestra desconocida se identificará como perteneciente a dicha clase cuando se encuentre dentro del radio de la hiperesfera. La distancia de Mahalanobis se basa en cálculos sobre el espacio de componentes principales. De un modo análogo, cada clase se define como una elipse obtenida a partir de un PCA. La identificación de la muestra se realiza a través de la diferencia entre el centroide de la clase con la muestra desconocida [152].

- Métodos de varianza residual: estos métodos se basan en PCA de cada uno de los conjuntos de calibración, creando un modelo para cada uno de ellos. Con los diferentes modelos PCA creados para cada clase se reconstruye el espectro y se calcula la probabilidad de que la muestra desconocida pertenezca o no a alguna de las clases con los residuales obtenidos. El procedimiento más conocido y más utilizado de los métodos de varianza residual es el SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) [153,154].

- Redes neuronales supervisadas: Estos métodos muestran un gran potencial en el campo de la clasificación de sustancias, debido a su gran capacidad de modelado, hecho que las hace especialmente adecuadas para la resolución de una amplia variedad de problemas. Existen diferentes tipos de redes neuronales artificiales según sea su proceso de entrenamiento. Una de las redes más utilizadas son las *Multi-Layer Perceptron* (MLP) [155,156].

¹⁵² Mark, H. Qualitative discriminant analysis. In Burns, D. Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York (2001) 351-362.

¹⁵³ Gemperline, P.J., Webber, L.D., Raw materials testing using soft independent modeling of class analogy analysis of near infrared reflectance spectra. *Anal. Chem.* 61 (1989), 138-144.

¹⁵⁴ Candolfi, A., De Maesschalck, R., Massart, D. L., Hailey, P. A., Harrington, A. C. E. Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 923-935.

¹⁵⁵ Bertran, E., Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., Montoliu, I. Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins. *J. Near Infrared Spectrosc.* 8 (2000) 45-52.

¹⁵⁶ Agatonovic-Kustrin, S., Beresford, R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 717-727.

4.3.3 Bibliotecas de identificación de espectros

Una de las aplicaciones de los métodos de reconocimientos de pautas es la construcción de bibliotecas espectrales que permiten identificar muestras desconocidas con respecto las clases de la biblioteca definidas o bien de ninguna de las clases. En espectroscopia IR y NIR son de gran utilidad, ya que permiten llevar a cabo la identificación de un producto desconocido, de una manera rápida, objetiva y fiable, a través de su espectro, sin tener que depender de otro tipo de observaciones.

De entre los métodos de reconocimientos de pautas existentes, los más adecuados para la construcción de la biblioteca espectral son los métodos supervisados de modelado, ya que permiten crear clases a partir de muestras de identidad conocida, creando un modelo que represente cada clase. La identificación de cada producto se realiza por comparación de su espectro con cada uno de los modelos para cada clase, siendo identificado con la clase con la que tenga una mayor similitud (siempre que los resultados obtenidos se encuentren dentro de los límites establecidos como aceptables en la construcción de la biblioteca). Los criterios utilizados para la construcción de la biblioteca son: Correlación, Distancia Euclídea, Distancia de Mahalanobis y Varianza Residual.

La función principal de las bibliotecas espectrales desarrolladas en esta memoria es la de identificar diferentes formulaciones lubricantes, las cuales poseen espectros muy similares, siendo este un paso previo a la determinación cuantitativa de composición y viscosidad.

4.4 Análisis Cuantitativo

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad del analito a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas. Las técnicas espectroscópicas proporcionan un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que no pueden ser asignadas a simple vista a un solo analito. Este hecho ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como métodos de calibración multivariable.

Estos métodos son: Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión en Componentes Principales (PCR), Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS), Redes Neuronales Artificiales (ANN). En esta memoria se ha utilizado únicamente el PLS como método de calibración multivariable para la cuantificación de los parámetros de interés, por lo que solo se describe sus características.

El método PLS fue desarrollado por H. Wold en 1975 [157,158]. La matriz X de datos espectrales tiene un número de filas (espectros) y columnas (longitudes de onda) determinados. La matriz Y es una matriz que contiene los valores de la propiedad analítica que se quiere estudiar. Para la descomposición, el algoritmo PLS utiliza tanto la información que contiene la matriz de datos espectroscópicas (matriz X) como la matriz de la propiedad a determinar (matriz Y) obteniendo unas variables auxiliares llamadas variables latentes, *scores*, factores o componentes. La descomposición de la matriz no se realiza independientemente sino que se realiza simultáneamente, implicando que se pierda la ortogonalidad entre las variables reducidas pero se mejora en capacidad predictiva en los modelos de calibración.

Las matrices X e Y se descomponen según:

$$X = TP^T + E$$

$$Y = UQ^T + F$$

Donde T i U son las matrices de *scores*, P i Q las de *loadings* y E y F las de residuales. Las nuevas matrices se utilizarán para determinar la propiedad de interés a partir del espectro de la muestra desconocida.

Un parámetro crítico de los modelos, es el número de factores (componentes principales) con el que se construye el modelo de calibración. Este parámetro se ha evaluado por validación externa, es decir, analizando muestras no incluidas en la calibración (test-set).

¹⁵⁷ Wold, H. *Soft Modelling by Latent Variables; the Non-Linear Iterative partial Least-Squares Approach, en Perspectives in Probability and Statistics, Paper in Honour of M. S. Bartlett*, ed Gani, J. Academic Press London, 1975.

¹⁵⁸ Wold, H. *Soft modelling. The basic design and some extensions. In systems under indirect observation*. Eds. Jöreskog, K.G. and Wold, H. Amsterdam (1982).

Así pues, la elección de un modelo u otro se realizará en función del error obtenido respecto a los valores de referencia, siendo el Error Estándar Relativo (RSE, *Relative Estandar Error*) y el Error Cuadrático Medio (RMSE, *Root Mean Square Error*), los cuales se pueden calcular según la fórmula:

$$RSE(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (NIR_i - Ref_i)^2}{\sum_{i=1}^n Ref_i^2}} \times 100$$
$$RMSE(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (NIR_i - Ref_i)^2}{n}} \times 100$$

donde n es el número de muestras, NIR es el valor predicho y Ref es el valor de referencia. Se denomina RSEC (%) y RMSEC para calibración y RSEP (%) y RMSEP para validación o predicción. El número de factores óptimo será aquel que minimice estos dos parámetros.

4.5 Resolución Multivariable de Curvas (MCR)

El PCA es uno de los métodos de reducción de variables más ampliamente utilizado. La matriz espectral se descompone en dos matrices, en *scores* y *loadings*, para cada uno de los componentes principales. Otro método de descomposición de matrices espectrales es la Resolución Multivariable de Curvas (MCR). MCR descompone una señal instrumental compleja en las contribuciones debidas a los componentes que forman el sistema, asumiendo que los datos siguen un modelo lineal ajustado a la ley de Beer, y que se puede expresar de forma matricial de la siguiente manera:

$$X = CS^T + E$$

donde X (MxN) son los espectros, C y S son las concentraciones y los espectros de los analitos puros que constituyen la mezcla. E es la matriz de residuales no explicados por las matrices C y S^T.

La matriz de datos X se descompone mediante la metodología de Mínimos Cuadrados Alternados (ALS, *Alternating Least Squares*). La solución obtenida no es única, sino que

se pueden obtener un gran número de matrices C y S que multiplicadas entre sí, se obtenga la matriz X. Por ello se pueden aplicar una serie de restricciones rotacionales y de intensidad para corregir estas ambigüedades [159].

La descomposición MCR-ALS puede ser utilizada para la creación de modelos cuantitativos [160], sin embargo, en esta memoria se ha utilizado esta metodología como herramienta para el análisis cualitativo, para la separación de picos solapados en análisis IMS [161].

4.6 Diseño de experimentos

El objetivo principal del diseño de experimentos (DOE, *Design of Experiments*) es la obtención de modelos estadísticos para evaluar si determinados factores influyen en la variable de interés. El DOE se suele utilizar para la optimización de factores que influyen en la respuesta analítica, así como para la preparación de un conjunto de muestras de una formulación. En esta memoria se han utilizado DOE para la preparación de muestras para la construcción posterior de modelos de calibración para la determinación cuantitativa de un adyuvante para un herbicida, así como para evaluar la influencia de ciertos factores en la señal IMS. Este conjunto de muestras preparadas deberá cubrir el intervalo de concentraciones, así como evitar la colinealidad entre los diferentes analitos y tener toda la variabilidad posible para cada uno de ellos. En la bibliografía se encuentran reportados varios estudios que utilizan DOE para estos propósitos [162,163,164,165,166].

¹⁵⁹ Larrechi, M.S., Rius, F.X. Spectra and concentration profiles throughout the reaction of curing epoxy resins from near-infrared spectroscopy and multivariate curve resolution methods. *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 47-53.

¹⁶⁰ Blanco, M., Castillo, M., Beneyto, R. Study of reaction processes by in-line near-infrared spectroscopy in combination with multivariate curve resolution. Esterification with multivariate curve resolution. *Talanta* 72 (2007) 519-525.

¹⁶¹ Zamora, D., Blanco, M. Improving the efficiency of ion mobility spectrometry analyses by using multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta.* 726 (2012) 50-56.

¹⁶² De Beer, T.R.M., Baeyens, W.R.G., Ouyang, J., Vervaet, C., Remon, J.P., Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. *Analyst* 131 (2006) 1137-1144.

¹⁶³ El-Hagrasy, A., D'Amico, F., Drennen III, J.K. A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part I: D-Optimal design for characterization of powder mixing and preliminary spectral data evaluation issue. *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 392-406.

Antes de proseguir con la explicación de los distintos diseños experimentales definiremos los términos factores y niveles, utilizados en el diseño de experimentos. Los factores son las condiciones experimentales o fuentes de variación que influyen en el resultado obtenido en un experimento o causar variabilidad en el conjunto de calibración. Los niveles de un factor son los diferentes valores que toma cada uno de los factores.

A continuación se comentarán los aspectos más importantes de algunos diseños experimentales:

- Diseños factoriales completos: Es un diseño de experimentos para la exploración de variables. En este diseño cada nivel se combina con todos y cada uno de los valores que presentan las otras variables. Los más utilizados son los que se presentan a dos niveles, siendo de la forma 2^k , donde k es el número de factores a evaluar. Estos diseños son la base para otros diseños experimentales. Al crecer el número de factores a evaluar crece enormemente la cantidad de experimentos o muestras a preparar.

- Diseños centrados compuestos: son diseños factoriales que se les ha añadido puntos centrales y axiales.

- Diseños factoriales fraccionados: En este diseño, se realiza una selección de las experiencias propuestas en un diseño factorial completo, sin variar los factores y los niveles. La nomenclatura que reciben estos diseños factoriales fraccionados es 2^{k-p} , donde 2 es el número de niveles, k el de factores y p el grado de fraccionamiento. Al efectuar este diseño no se tienen en cuenta las interacciones de orden 3 y superiores.

- Diseño de Plackett-Burman [167]: Son un caso particular de los diseños factoriales fraccionados en los que se estudian $k = N - 1$ variables, donde k es el número de factores y N el número de experimentos y múltiplo de 4. La ventaja que presenta este

¹⁶⁴ Wu, H., Khan, M.A. Quality-by-design (QbD): An integrated approach for evaluation of powder blending process kinetics and determination of powder blending end-point. *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2784-2798.

¹⁶⁵ Rosas, J.G., Blanco, M., González, J.M., Alcalà, M. Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part I: Determination of the design space. *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4432 - 4441.

¹⁶⁶ Baldinger, A., Clerdent, L., Rantanen, J., Yang, M., Grohgan, H. Quality by design approach in the optimization of the spray-drying process, *Pharm. Devel. Technol.* (2011) 1–9

¹⁶⁷ Plackett, R.L., Burman, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33 (1946) 305-325.

diseño de *screening* es su condición de completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores.

- Diseño D-óptimo: Este diseño puede ser utilizado para la exploración de variables como para el modelado de superficies de respuesta. El más conocido de los diseños óptimos es el que sigue el criterio *D-optimality* (aparte están el *A-optimality*, *V-optimality* o *G-optimality*) el cual busca encontrar la combinación de puntos de un diseño que maximice el determinante $|X'X|$, consiguiendo que el diseño sea lo más cercano a la idealidad posible, es decir a la ortogonalidad y a la rotabilidad. Este diseño nos permite crear un conjunto de calibración con un número elevado de factores y de niveles, posibilitando que los diferentes factores tengan un número diferente de niveles.

- Diseño de Dohrlert [168]: Este diseño es un diseño de experimentos para el modelado de superficies de respuesta. Es un diseño equirradial o geométrico que consisten en puntos igualmente espaciados sobre una esfera o circunferencia. Permiten el uso de varios niveles en función de la influencia de cada factor.

¹⁶⁸ Doehlert, D.H. Uniform shell designs. *Appl. Stat.* 19 (1970) 231-239.

METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS



5. Metodología Experimental

5. Metodología Experimental

5.1 Introducción

En este capítulo se describen las características más relevantes de las metodologías empleadas en el desarrollo de los nuevos métodos propuestos: los distintos tipos de muestras analizadas y las formas de preparación en el laboratorio, el registro de los espectros NIR, los análisis IMS, la obtención de la propiedad analítica de interés mediante los métodos de referencia y el procesamiento de datos.

5.2 Procesos químicos y productos estudiados: Descripción y preparación de muestras

5.2.1. Reactor

El reactor de laboratorio utilizado, Figura 5.1, es un LabMax (Mettler Toledo Inc.), controlado mediante el software Camile Tg 3.06 (Sagian Inc.). Este instrumento permite el control de temperaturas de reacción y de camisa, de la velocidad de agitación, así como el control de la adición de reactivos utilizando medidas de volumen (bomba peristáltica) o peso (balanza), si fuera preciso.

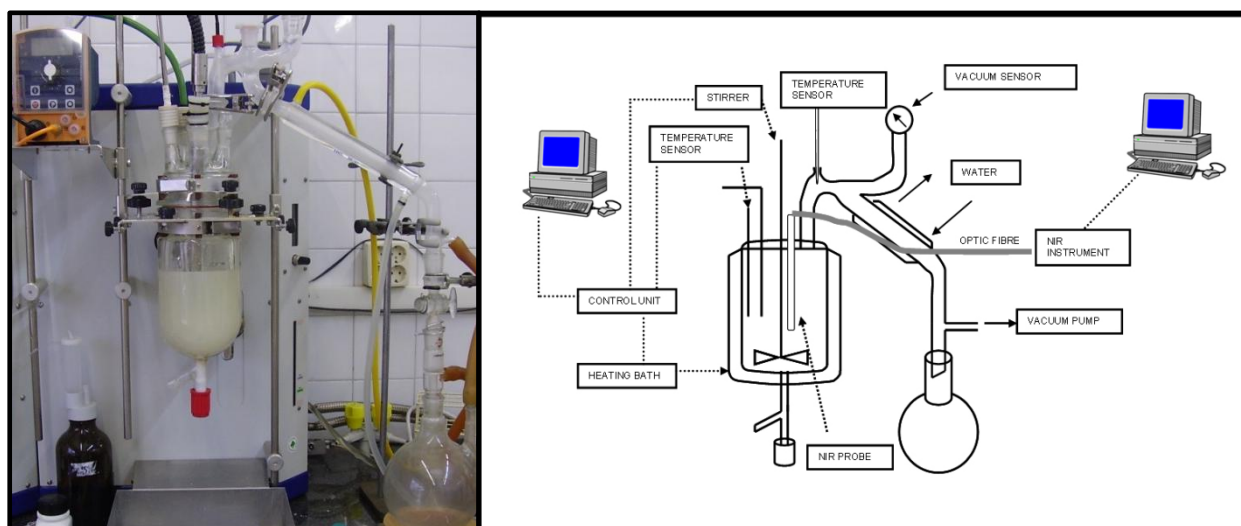


Figura 5.1 Reactor de laboratorio, fotografía (izq.), esquema (der)

5.2.2 Esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico

Esta reacción consiste en la esterificación enzimática entre el ácido esteárico y glicerina para la obtención de los glicéridos correspondientes. En este proceso se

cargan unos 500 g de ácido esteárico (ácido octadecanóico, CRODA Ibérica S.A., pureza 94%) y se aumenta la temperatura del reactor para alcanzar 70-75°C dependiendo del proceso. Una vez que el ácido esteárico se ha fundido, se añade la cantidad necesaria de glicerina (proporciones equimolares o ligeramente por exceso o defecto, respecto a la cantidad de ácido esteárico) y se aumenta la velocidad de agitación a 400 rpm. Una vez mezclados los dos componentes se añade el catalizador enzimático, una lipasa de *Candida Antarctica* (Novozyme 435, 10.000 LU/g, Novozymes A/S, Denmark) la cual está inmovilizada en una resina macroporosa de tipo Lewattit, con un tamaño de partícula de 500 µm.

La glicerina posee tres grupos hidroxilo por molécula, por lo que puede formar mono-, di- y triglicéridos. Además de obtenerse estos productos, la proporción entre ellos varía en función de la proporción inicial entre glicerina y ácidos, pudiéndose obtener distintos productos con diferentes aplicaciones y características físicas. En nuestro estudio se han realizado procesos en condiciones equimolares y con ligeros excesos de cada uno de ellos. En la Tabla 5.1 se puede apreciar las condiciones de reacción empleadas en los 6 procesos efectuados.

Tabla 5.1 Información de los procesos de esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico realizados en el reactor LabMax. El tiempo expresado en la tabla muestra el tiempo en que la reacción se ha parado.

Proceso	Temperatura (°C)	Relación Molar (Glicerina/Acido)	Tiempo (min)
1	75	1.00	330
2	75	0.67	315
3	75	2.00	486
4	75	1.00	480
5	70	1.00	471
6	70	1.00	510

En nuestro estudio es necesario eliminar el agua generada (o la que tuviera alguno de los reactivos), por lo que se ha eliminado aplicando una destilación a baja presión (~40-

60 mm Hg). Durante los procesos, se fueron extrayendo muestras cada 15 minutos para el seguimiento del mismo, mediante el análisis del valor de ácido (apartado 5.4.1).

5.2.3 Mezclas adyuvantes para un herbicida

La mezcla adyuvante que se analizó en este estudio, está constituida por una mezcla de varios componentes, incluyendo solventes, diluyentes y surfactantes. Este adyuvante permite al herbicida dispersarse de manera uniforme por la superficie de las hojas de las plantas y poder llegar a la cutícula de la misma. La mezcla adyuvante está constituida por un aceite mineral parafínico (61% p/p), un éster graso de sorbitol etoxilado (23 % p/p), un alcohol etoxilado (12% p/p), agua (< 3% p/p) y propilenglicol (1-2 %). La mezcla resultante debe ser un líquido transparente y límpido y con el mayor contenido posible de agua pero que no dé lugar a turbidez.

Las muestras que se han preparado en el laboratorio consisten en una mezcla de los cinco componentes en diferentes proporciones, en un intervalo de concentraciones de $\pm 5\%$ p/p alrededor de sus valores nominales para el aceite, el éster de sorbitol etoxilado y el alcohol etoxilado, mientras que para el propilenglicol y el agua fueron $\pm 1\%$ p/p y $\pm 3\%$ p/p, respectivamente. Se ha aplicado un diseño experimental de mezclas llamado *Modified Distance Based Design*, empleando el software Design-Expert v 6.0.6 (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, USA), para la preparación de las muestras, con el objetivo de obtener la menor correlación en concentración entre los cinco componentes. El coeficiente de correlación obtenido entre las concentraciones de los cinco componentes era inferior a 0.52. En total se prepararon un total de 36 muestras, por pesada en balanza analítica, y seguidamente se procedió a la mezcla adecuada de los componentes hasta obtener una solución límpida.

5.2.4 Mezclas lubricantes

Los lubricantes basados en esteres de poliol comercialmente disponibles, se obtienen por esterificación de uno o dos alcoholes polifuncionales con una mezcla de ácidos en presencia de un catalizador (complejo de estaño o titanio o bien un ácido fuerte como el ácido *p*-toluensulfónico), a una temperatura elevada ($\sim 200 - 250^{\circ}\text{C}$). Las características obtenidas del producto final dependen en gran manera del poliol

utilizado, así como el ácido o la mezcla de ácidos con diferente longitud de cadena (normalmente entre 4 y 10 átomos de carbono), de manera lineal o ramificada. Los polioles que se suelen utilizar para la fabricación de esteres de poliol destinados a la industria de la refrigeración, suelen ser pentaeritritol, dipentaeritritol y neopentilglicol (Figura 5.2). Así pues, se pueden obtener una gran variedad de estos compuestos. A modo de ejemplo si empleásemos pentaeritritol como poliol de partida y lo hiciésemos reaccionar con una mezcla de dos ácidos monocarboxílicos, obtendríamos 5 productos distintos, excluyendo los isómeros de posición y los productos resultantes de una esterificación incompleta del poliol. Aparte de las posibles combinaciones que pueden surgir, los lubricantes finales, son mezclas binarias de dos ésteres de poliol en proporciones adecuadas, a los cuales se les añaden en un paso final, una serie de aditivos y antioxidantes tales como BHT (*butylhidroxytoluene*) o TCP (*tricresylphosphate*), entre otros.

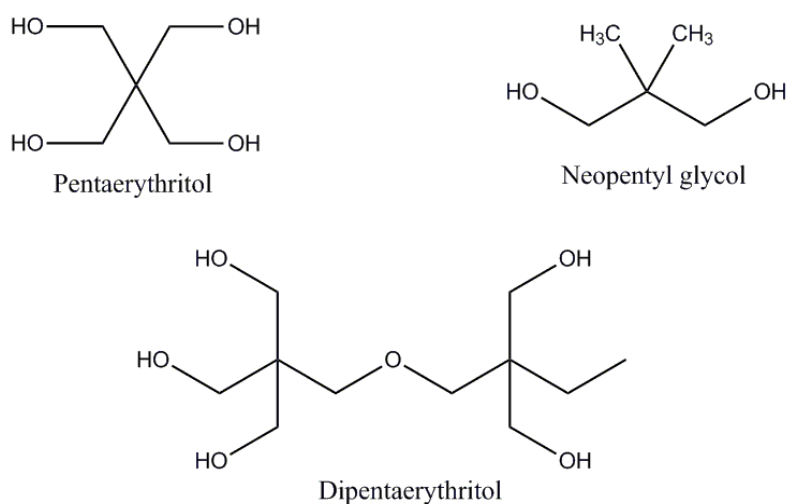


Figura 5.2 Estructuras químicas de las moléculas de Pentaeritritol, Dipentaeritritol y Neopentilglicol.

Las formulaciones lubricantes estudiadas contienen dos bases lubricantes (ésteres de poliol) en proporciones adecuadas, además de una serie de aditivos. Cada uno de estas bases lubricantes están compuestas por un poliol, pentaeritritol, dipentaeritritol o neopentilglicol, con una mezcla de ácidos carboxílicos entre 5 y 10 átomos de carbono en proporciones variables. Se han estudiado 9 bases lubricantes diferentes, que aparecen en la Tabla 5.2, con los alcoholes utilizados y las diferentes proporciones de ácidos empleados.

Tabla 5.2 Polialcoholes y ácidos carboxílicos utilizados en la síntesis de las bases lubricantes.

Base	Polialcohol utilizado	Ácido carboxílico utilizado				
		C5	C7	C8	C8/C10	C9
1	Pentaeritritol	X				
2	Pentaeritritol	X	X			
3 (*)	Pentaeritritol	X	X			X
4 (*)	Pentaeritritol	X	X			X
5	Pentaeritritol-Dipentaeritritol	X	X			X
6	Dipentaeritritol		X		X	X
7	Dipentaeritritol	X				X
8	Neopentilglicol		X			
9	Neopentilglicol			X		

* Diferente proporción en los ácidos utilizados

En total hay 23 formulaciones lubricantes, a partir de la mezcla de una o dos bases lubricantes. En ambos casos se les añaden los aditivos necesarios según la formulación.

5.2.5 Amidoaminas

Las amidoaminas estudiadas fueron obtenidas industrialmente por la amidación a 180-190 °C entre Dimetilaminopropilamina (DMAPA) y los ácidos grasos, o por transamidación de los aceites correspondientes. La mezcla de reacción se somete a vacío y alta temperatura para conseguir la destilación de DMAPA que no ha reaccionado y posteriormente se filtra en caliente. Los productos finales pueden contener trazas de DMAPA que son necesarias controlar.

Las amidoaminas obtenidas son las amidas resultantes de las reacciones de amidación entre la DMAPA y el ácido esteárico, para dar la estearamidopropildimetilamida (SAPDA), la DMAPA y el ácido mirístico, para obtener el miristamidopropildimetilamida

(MAPDA) y la DMAPA con el aceite de coco (compuesto principalmente por ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico) para obtener el cocoamidopropildimetilamida (CAPDA). No se disponen de los estándares de estas amidas.

5.2.6 Comprimidos de Microdiol

Los comprimidos anticonceptivos utilizados en este estudio son comprimidos de Microdiol (Schering-Plough, Madrid – N.V. Organon, Oss, Holanda). Los comprimidos son biconvexos, redondos y de 6 mm de diámetro. El contenido de principio activo de cada comprimido son 30 µg de Etinilestradiol y 150 µg de Desogestrel.

La preparación de la disolución de los comprimidos para su análisis por HPLC e IMS se procedió introduciendo el comprimido (pesado previamente) en un matraz aforado de 10 mL que contiene 5 mL de isopropanol. La suspensión se sonicó durante 20 minutos y finalmente se enrasó a 10 mL con isopropanol. Una alícuota de la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm y una fracción del sobrenadante se introdujo en un vial para el posterior análisis. Para los análisis HPLC, la solución final se filtró a través de un filtro de membrana de nylon 0.45 µm.

5.3 Instrumentación y métodos de análisis

A continuación se describen los instrumentos utilizados a lo largo de esta tesis y los diferentes métodos de análisis.

5.3.1 Espectroscopia NIR.

Los espectros NIR se han obtenido mediante dos metodologías: *in-line*, mediante una sonda en el medio de reacción, o *off-line*, después de obtener las muestras determinadas (mezclas) y analizarlas en un laboratorio anexo.

5.3.1.1 Seguimiento *in-line* de procesos químicos

Para el seguimiento *in-line* de la esterificación entre ácido esteárico y glicerina se utilizó un espectrofotómetro FOSS 5000 equipado con una sonda de fibra óptica que permite realizar medidas por transflectancia, con un camino óptico de 0.5 mm (2 x 0.25mm), ver Figura 5.3. El registro espectral se realiza a intervalos de 3 minutos,

siendo cada espectro el promedio de 32 *scans*, registrado en el intervalo de 1100-2498 nm con una resolución espectral de 2 nm.



Figura 5.3 Espectrofotómetro NIR con sonda de registro por transflectancia (izq), reactor LabMax con la sonda de registro (der.). Ampliación del camino óptico (sup. izq.).

5.3.1.2 Registro off-line

Para el registro off-line se han empleado dos equipos NIR de FOSSNIRSystems. El primer equipo utilizado en el estudio de la mezcla adyuvante para un herbicida, se ha empleado un equipo FOSS XDS Optiprobe Analyzer, equipado con un módulo VHM (*Vial Heater Module*), para el control termostatzado de la temperatura de registro de los espectros NIR. El registro espectral se realiza en el modo de transmisión, utilizando viales cilíndricos de diámetro interno de 6.5 mm. Cada espectro es el promedio de 32 *scans*, registrado en el intervalo espectral de 400-2498 nm, con una resolución espectral de 0.5 nm.

El segundo equipo utilizado en el estudio de las formulaciones lubricantes, se ha empleado un equipo FOSS 5000 con un módulo VHM (*Vial Heater Module*), mostrado en la Figura 5.4. El registro espectral se realiza a 75 °C, por transmisión, utilizando

viales cilíndricos de diámetro interno de 6.5 mm. Cada espectro es el promedio de 32 *scans*, registrado en el intervalo espectral 1100-2498 nm, con una resolución de 2 nm.



Figura 5.4 Equipo FOSS 5000 con el módulo Vial Heater Module (VHM).

5.3.2 Espectrometría IMS

El equipo utilizado para los análisis IMS fue un IONSCAN-LS 400B (Smiths Detection, Morristown, NJ, USA), equipado con una fuente de ionización radiactiva de ^{63}Ni y un automuestreador. En la Figura 5.5 se muestra el equipo de movilidad iónica utilizado en esta memoria. En la Figura 5.6 se muestra un esquema general con la introducción de muestra por desorción térmica, la zona de ionización, el tubo de deriva y el detector.



Figura 5.5 Equipo de movilidad iónica (IMS - IONSCAN-LS 400B)

El equipo dispone de dos sistemas de introducción para las muestras. La primera se produce por desorción térmica, depositando unos pocos μL de disolución del analito sobre una membrana de teflón, la cual es introducida en el equipo y se calienta para vaporizar los analitos. Los vapores son transferidos a la cámara de ionización y los iones formados posteriormente se separan en el tubo de deriva. La segunda entrada para las muestras es mediante un sistema denominado HPI, *High Performance Injector*, donde la muestra se deposita en un *liner* de vidrio y se aplica un programa de temperaturas similares a los utilizados en cromatografía de gases, pero aplicando rampas de temperatura de $^{\circ}/\text{s}$. Por el *liner*, pasa un flujo de gas, que arrastra los compuestos que se hayan volatilizado hacia el *transfer line*, que los transfiere hacia el tubo de deriva por la zona de ionización. En los análisis presentados en esta memoria se han ensayado los dos tipos de entradas, pero los métodos obtenidos utilizan la desorción térmica como sistema de introducción de la muestra.

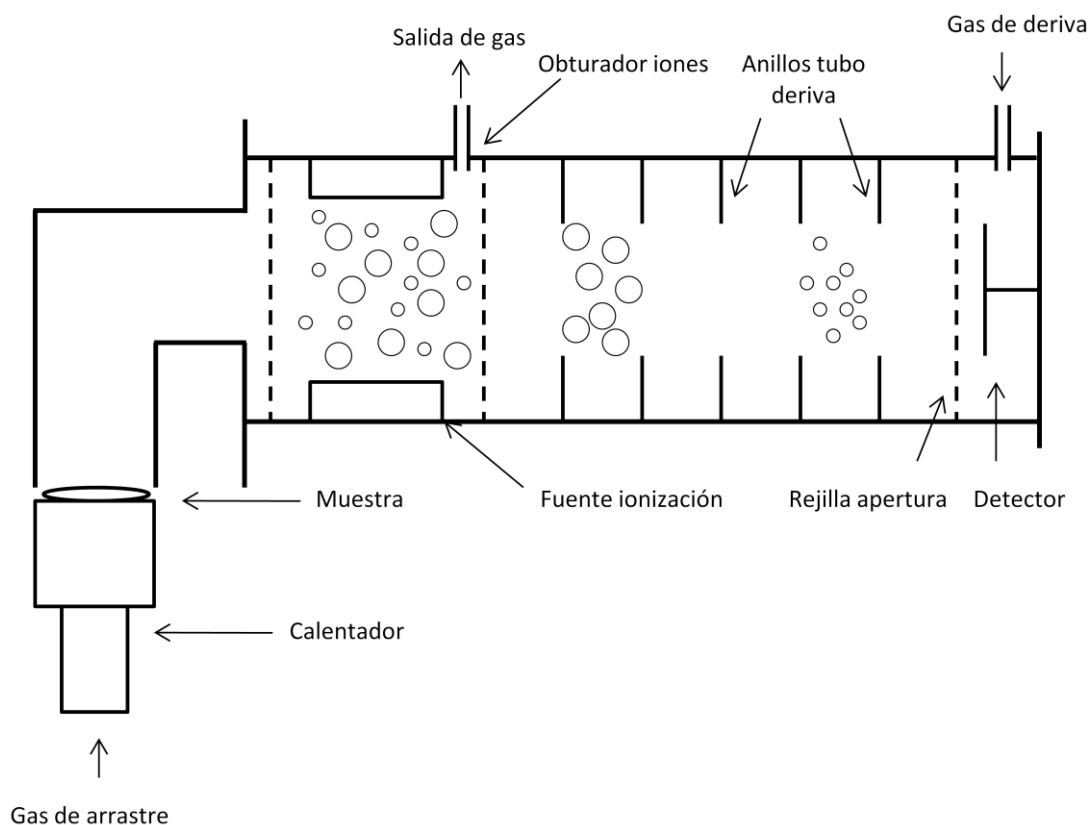


Figura 5.6 Esquema de un espectrómetro de movilidad iónica mostrando la entrada de muestra, la zona de ionización, el tubo de deriva y el detector.

El equipo IMS permite trabajar en modo positivo y en modo negativo, para la detección de dichos iones. En modo positivo, el calibrante utilizado es Nicotinamida ($K_o = 1.86 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), el cual actúa como calibrante y como ion reactante. En modo negativo, el equipo dispone de 4-nitrobenzonitrilo como calibrante y hexacloroetano como ion reactante. Los métodos de análisis presentados, se han obtenido trabajando en modo positivo.

Las condiciones de análisis más relevantes son las siguientes: Los plasmagramas fueron adquiridos hasta 30 ms de tiempo de deriva, utilizando un intervalo de ciclo del obturador de iones de 0.2 ms. El flujo del gas de deriva está fijado a $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El campo eléctrico aplicado para el tubo de deriva de 7 cm con un potencial de deriva de 1763V fue $252 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$. El tiempo de análisis depende del método desarrollado. Para el método para la detección de DMAPA en amidoaminas fue de 12 s, mientras que en el método para Etinilestradiol y Desogestrel fue 36 s. La temperatura del tubo de deriva se fijó a $232 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que la temperatura del inlet fue $280 \text{ }^\circ\text{C}$ para el método para

la detección de DMAPA en amidoaminas y 200 °C para el método para Etinilestradiol y Desogestrel. La temperatura del desorber en ambos estudios fue evaluada, para finalmente escoger una temperatura de 180 °C para el método para la detección de DMAPA en amidoaminas y 140 °C para el método para Etinilestradiol y Desogestrel.

La adquisición de los plasmagramas se realizó con el software IMStation 5.3.8 (Smiths Detection, Warren, NJ, USA). Este programa informático permite modificar los diferentes parámetros en el equipo IMS.

5.4 Métodos de referencia

A continuación se describen las características más relevantes de las distintas técnicas instrumentales utilizadas como referencia.

5.4.1 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

La determinación de glicéridos mediante el método de referencia se realizó con un cromatógrafo Agilent serie 1100, equipado con una columna PLGel 300mm (longitud) x 7.5 mm (diámetro interno), tamaño de partícula de 5µm, diámetro de poro 50 Å, MW<1000 (Agilent Technologies), termostatizada a 25 °C, utilizando el detector de índice de refracción. En el análisis de estas muestras, se utiliza THF como fase móvil con un caudal de 1 mL·min⁻¹, el cual también se utiliza como solvente para la disolución de las muestras. Las muestras se disolvieron en tetrahidrofurano (1% p/v) en un matraz de 5 mL y se agitó hasta disolución completa. 10 µL del sobrenadante se inyectaron en el cromatógrafo y detectado por un detector de índice de refracción. La cuantificación de los analitos se realiza por interpolación de las áreas bajo los picos en las curvas de calibración obtenidas de los estándares puros de glicerina, ácido esteárico, mono-, di- y triestearato de glicerina.

5.4.2 Cromatografía HPLC

La determinación de los principios activos Etinilestradiol y Desogestrel mediante el método de referencia, se realizó con un cromatógrafo Agilent serie 1100 equipado con una columna Symmetry Shield™ RP18 250 mm (longitud) x 4.6 mm (diámetro interno), tamaño de partícula 5.0 µm, diámetro de poro 100 Å, termostatizada a 25°C,

utilizando el detector DAD-UV (202 nm). Las condiciones de análisis adecuadas se obtuvieron con una fase móvil metanol:agua (90:10% v/v), caudal de 1 mL·min⁻¹ y un volumen inyectado de 10 µL. El área de pico de cada analito se interpoló en una recta de calibración obtenida a partir de una disolución estándar preparada de los estándares puros de Etinilestradiol y de Desogestrel.

5.5 Programas para el tratamiento quimiométrico de datos

El tratamiento de los espectros NIR, plasmagramas IMS y los datos de referencia se ha realizado mediante los siguientes programas informáticos:

- Vision 2.51 (Foss, SilverSpring, USA). Programa que permite el control del instrumento NIR y el diseño de rutinas de análisis. Ha sido utilizado para el registro de espectros NIR y para la aplicación de los modelos de calibración PLS en el análisis de rutina para el control de calidad de los productos estudiados.
- The Unscrambler 9.2-9.8 (Camo, Noruega). Programa para el tratamiento multivariable de datos. Incorpora los pretratamientos espectrales habituales (SNV, derivadas de Savitzky-Golay o Norris, suavizados, correcciones de línea base) y herramientas quimiométricas habituales como PCA (*Principal Components Analysis*) y para el desarrollo de modelos de calibración PLS.
- Matlab 7.0-7.9.0.529 (R2009b) (The Mathworks, MA, USA). Programa base para el desarrollo de códigos o *scripts* que permiten el tratamiento de datos. En nuestro caso se ha utilizado para la implementación de códigos y/o software que utilizan Matlab como base.
- Guipro (P.J. Gemperline, East Carolina University) [169,170]. Conjunto de códigos Matlab, con una interfaz gráfica, para el análisis de datos espectroscópicos mediante la resolución multivariantes de curvas (MCR).

¹⁶⁹ Gemperline, P.J., Cash, E. Advantages of Soft versus Hard Constraints in Self-Modeling Curve Resolution Problems. Alternating Least Squares with Penalty Functions. *Anal. Chem.* 75 (2003) 4236–4243.

¹⁷⁰ http://personal.ecu.edu/gemperlinep/Research/gemper_software.html, P. J. Gemperline, East Carolina University.

➤ Modde v8.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Se ha utilizado para desarrollar diseños de experimentos adecuados para la preparación de distintos experimentos. El programa incorpora diseños como factoriales completos o fraccionados, Plackett-Burman, D-Optimal, diseños de mezclas...

➤ Design-Expert v.6.0.6 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN). Se ha utilizado para desarrollar diseños de experimentos adecuados para la preparación de muestras de laboratorio.

En esta memoria se han desarrollado bibliotecas espectrales para la identificación de muestras lubricantes. El programa de adquisición de espectros, Vision 2.51, fue el utilizado para este propósito. Estas bibliotecas están compuestas por carpetas de espectros que definen las distintas clases de productos a identificar. La identificación de una muestra desconocida se realiza mediante la comparación de su espectro con los de la clase establecida. Se ensayaron diferentes bibliotecas mediante diferentes métodos, como coeficientes de correlación, distancia máxima, distancia de Mahalanobis y varianza residual. La validación de la biblioteca construida se realizó utilizando espectros de los productos a identificar. La biblioteca debe de ser capaz de identificar correctamente muestras correspondientes a la clase definida y a la vez discriminar las muestras que no pertenezcan a esa clase.

Los métodos de análisis cuantitativos NIR que han sido desarrollados tenían como objetivo la determinación de propiedades analíticas de interés en procesos químicos o muestras diversas. Estas propiedades fueron determinación de los compuestos de las mezclas presentes en la reacción, compuestos de las mezclas del adyuvante y de los lubricantes, así como parámetros físicos como es la viscosidad en los lubricantes. Los métodos NIR desarrollados se basan en la utilización de modelos de calibración por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS1). Los modelos PLS1 fueron construidos por *cross-validation* mediante el método *leave-one-out*. Se ensayaron diferentes pretratamientos espectrales tales como SNV (*Standard Normal Variate*) y derivadas de Savitzky-Golay, así como diferentes intervalos de longitudes de onda. En los casos que se utilizaron las derivadas, éstas se ajustaron a un polinomio de segundo grado con una ventana móvil de 11 puntos.

La selección del número de factores para los modelos PLS se estableció basándose en el estadístico RMSE o RSE, siendo el número de factor óptimo aquel que tenga un valor menor de RMSE o RSE para el conjunto de predicción.



6. Resultados y discusión

6. Resultados y discusión

El control de calidad en cualquier tipo de industria requiere y exige la determinación de numerosos parámetros químicos y físicos. Así se quiere asegurar que el producto que se pone a la venta cumpla todos los requisitos que exige el consumidor final. A medida que crece la tecnología este control es más estricto, lo que hace que se aumenten la cantidad y variedad de parámetros a determinar. Para asegurar estos niveles de calidad, son precisas técnicas instrumentales complejas y la aplicación de metodologías distintas, que pueden suponer desde el punto de vista de la productividad, importantes limitaciones en tiempo, coste y exigencias de personal cualificado. Entre las limitaciones más destacables de estas técnicas podemos destacar los siguientes puntos:

- Elevados tiempos de análisis.
- Importante consumo de reactivos, principalmente disolventes.
- Pretratamientos laboriosos y largos de muestra, obteniendo resultados que pueden depender de la habilidad y experiencia del analista.

Como ya habíamos comentado anteriormente, el objetivo principal de la presente tesis es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos en rutina por la industria, mediante técnicas instrumentales ya existentes, como son la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) y otra de más reciente implantación como es la espectrometría de movilidad iónica, (IMS). Sus características las hacen especialmente adecuadas para llevar a cabo el control de calidad a la vez que superan algunas limitaciones de los métodos actuales.

Con estas dos técnicas se ha pretendido no solo desarrollar metodologías de análisis para el control de calidad en la industria, puesto que esto ha sido ya realizado en numerosas ocasiones por este mismo grupo de investigación en el caso de la espectroscopia NIR, sino también abordar problemas conceptuales que aparecen durante la etapa de implantación de estos métodos, y que debido a la reciente introducción de estas técnicas instrumentales no han sido completamente establecidos.

Este capítulo presenta los aspectos más relevantes de los estudios realizados durante el transcurso de la tesis doctoral y que se han agrupado en diferentes secciones para facilitar su comprensión. En la sección 6.1 se describe el desarrollo de modelos de calibración PLS para la monitorización del proceso de la reacción de esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico y para el control de calidad del producto final. En la sección 6.2 se expone el desarrollo de modelos de calibración PLS para la determinación de los componentes de una mezcla adyuvante compleja utilizada en la preparación para un herbicida. En el apartado 6.3 se describe la construcción de bibliotecas espectrales para la identificación de bases lubricantes y formulaciones lubricantes, así como el desarrollo de modelos de calibración PLS para la determinación de la composición y viscosidad de unas formulaciones lubricantes. Todos estos trabajos corresponden a la aplicación de la espectroscopia NIR para la resolución de problemas industriales químicos.

La aplicación de IMS ha dado lugar al desarrollo de nuevos métodos para la determinación de una amina en bajas concentraciones, la 3-dimetilaminopropilamina (DMAPA) en amidoaminas sintéticas y a lo largo de todo el proceso de fabricación de productos para la industria cosmética, en la sección 6.4. En la sección 6.5 se describe la utilización de varias técnicas quimiométricas como el algoritmo de la segunda derivada (TN2D) o la resolución multivariable de curvas (MCR) para la separación de las señales solapadas en el análisis de anticonceptivos por IMS, así como el desarrollo de modelos de calibración PLS1 para la cuantificación de los principios activos en los comprimidos.

6.1 Seguimiento in-line de un proceso de esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico

La visualización, análisis y estudio de los espectros NIR registrados es una fase importante y útil del proceso de construcción de modelos multivariados, ya que permite caracterizar y asociar determinadas regiones espectrales con las variaciones en concentración de los analitos estudiados. La Figura 6.1 muestra el conjunto de espectros correspondientes a la reacción de la glicerina y ácido esteárico en presencia de un enzima.

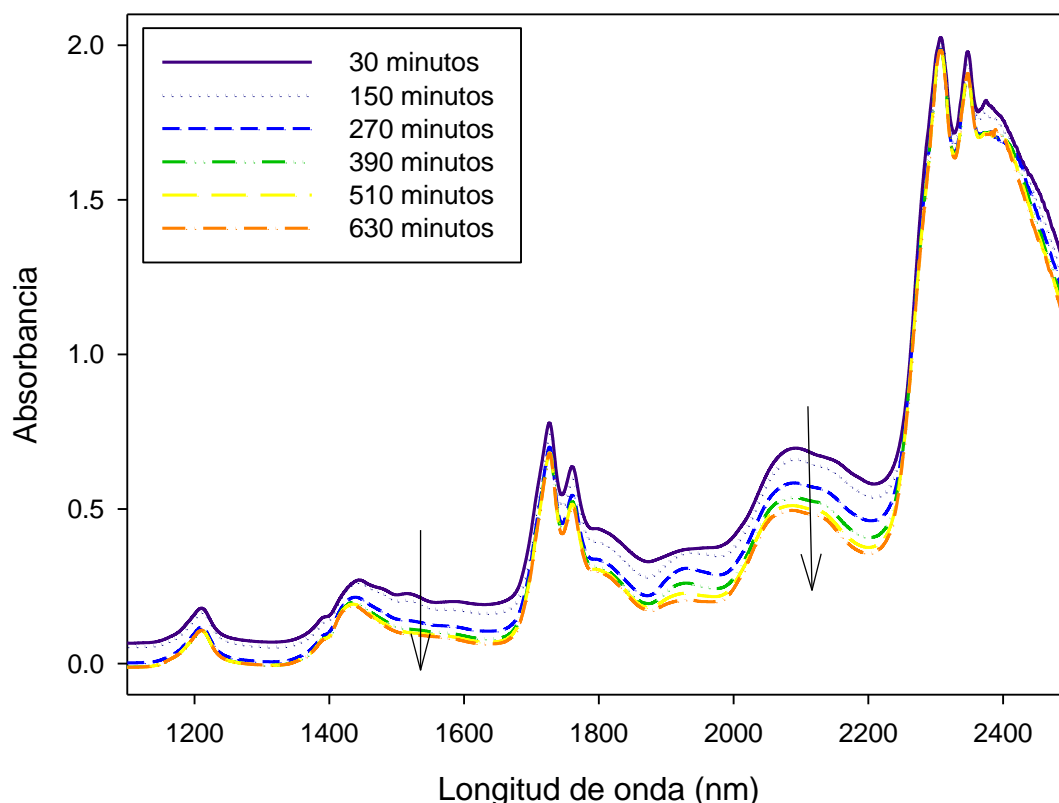


Figura 6.1 Espectros correspondientes a un proceso de esterificación enzimática entre glicerina y ácido esteárico.

Los procesos de esterificación enzimática se han llevado a cabo en un reactor de un litro y monitorizados con una sonda NIR de fibra óptica sumergida en la mezcla de reacción. Inicialmente la mezcla de reacción consiste en dos fases no miscibles, siendo la superior la constituida por ácido esteárico y la inferior constituida por glicerina. A medida que la reacción va teniendo lugar se forma una sola fase turbia y finalmente queda una sola fase homogénea. Al inicio del proceso, la mezcla de reacción es turbia, con espectros poco reproducibles, y por lo tanto no aptas para la construcción de modelos de calibración con una adecuada capacidad predictiva. Una vez que se forma una sola fase homogénea y desaparece la turbidez, los espectros adquiridos si son reproducibles.

La Figura 6.1 muestra la variación espectral en absorbancia durante el progreso de la reacción, indicado por las flechas la evolución con el tiempo de los espectros. Las variaciones espectrales más importante se encuentran en las regiones entre 1400-1650 nm y entre 2000-2200 nm, debida a la desaparición de grupos -O-H de la

glicerina, correspondientes al primer armónico y a la banda de combinación de tonos, respectivamente de la glicerina. No se observan cambios significativos en la región de 1650 a 1800 nm, debido al primer armónico de los grupos C-H, propios del ácido esteárico y de los ésteres. El pequeño desplazamiento de los espectros a longitudes de onda más cortas, es debido al *scattering* producido por las pequeñas gotas de glicerinas dispersadas en el seno de la masa fundida de ácido esteárico, que desaparece cuando la mezcla pierde la turbidez. No observamos una variación apreciable de la absorbancia causada por la presencia del agua, ya que su concentración es siempre baja (el agua destila a causa de la baja presión ejercida dentro del reactor de laboratorio) y su absorción queda solapada por las bandas de hidroxilo de la glicerina.

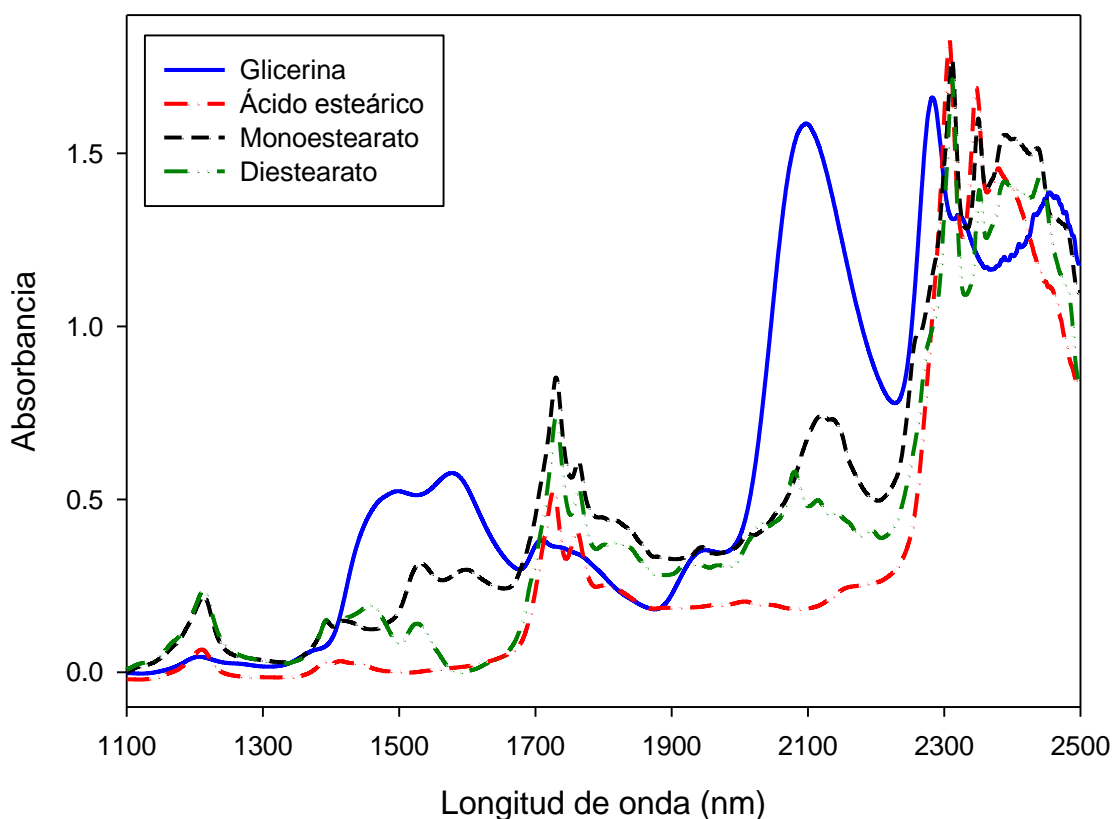


Figura 6.2 Espectros de los reactivos y productos de la esterificación.

En la Figura 6.2 se recogen los espectros correspondientes a los productos que intervienen en esta reacción: glicerina, ácido esteárico, monoestearato y diestearato de glicerina.

Las bandas de absorción más importantes de estos productos aparecen en las regiones de 1400-1600 nm y de 2000 a 2200 nm, correspondientes al primer armónico y a la banda de combinación de tonos respectivamente, para la glicerina. Estas bandas también aparecen en los dos esteres, pero de menor intensidad. Otras bandas significativas a remarcar son las que aparecen entre 1650 a 1800 nm, correspondientes al primer armónico del enlace C-H y entre 2300 a 2400 nm que corresponde a la banda de combinación de tonos del enlace C-H.

6.1.1 Determinación de glicerina, ácido esteárico, mono- y diglicéridos mediante PLS

Muchos procesos industriales de esterificación son controlados mediante la determinación de diversos índices, tales como el índice de ácido (IA) o el índice de hidroxilo; sin embargo, estos dos parámetros no siempre proporcionan la información necesaria para conocer el estado de la reacción. El mejor procedimiento para realizar el seguimiento de un proceso de esterificación enzimática es la determinación de la composición de la mezcla de reacción, mediante la aplicación de los métodos analíticos adecuados; sin embargo este método es frecuentemente lento y cuando se obtienen los resultados el proceso está ya en un estadio de desarrollo muy diferente al momento en que se tomaron las muestras. El desarrollo de un método NIR que permita la monitorización del proceso es el objetivo de este estudio y para ello se desarrollan modelos de calibración NIR para cada uno de los analitos de interés.

En este estudio se han efectuado una serie de procesos modificando ligeramente las condiciones de los mismos. La temperatura ha sido uno de los parámetros que se ha variado, efectuando 4 procesos a 75 °C y 2 procesos a 70 °C. La relación molar entre los reactivos también se ha modificado; 4 procesos se han efectuado en condiciones equimolares, mientras que los otros dos se ha añadido un exceso de ácido esteárico en el primero, y un exceso de glicerina en el segundo. En la Tabla 6.1 se muestra la composición final obtenida a través del método de referencia, en cada uno de los procesos efectuados, con las condiciones experimentales de los mismos.

Tabla 6.1 Composición de la mezcla final resultante de cada proceso, obtenida por el método de referencia.

Proceso	Temperatura (° C)	Relación molar (Glicerina/Ácido)	Composición (%)			
			Glicerina	Ácido	Monoestearato	Diestearato
1	75	1.00	8.52	3.14	35.09	54.04
2	75	0.67	1.55	2.08	28.82	67.56
3	75	2.00	24.45	1.60	28.73	45.22
4	75	1.00	9.08	2.80	29.14	54.08
5	70	1.00	8.51	1.48	35.37	53.60
6	70	1.00	9.99	3.19	32.89	53.92

Se han construido modelos PLS a partir de la concentración obtenida por cromatografía de permeación en gel (GPC) y de los espectros registrados en el momento de la extracción de la muestra. Para el desarrollo de los modelos de calibración, las muestras se dividieron en dos grupos o sets, el set de calibración para la construcción de los modelos de calibración, y un segundo set denominado de validación, que contiene muestras que no se han utilizado en la construcción del modelo, sino que son usadas para asegurar la capacidad predictiva de los modelos desarrollados.

Para el desarrollo de los modelos de calibración, se han ensayado diferentes pretratamientos espectrales, tales como la primera y segunda derivada de Savitzky-Golay, así como suavizados de ventana móvil. Los modelos PLS1 que proporcionaron mejores figuras de mérito para la regresión lineal de los valores NIR respecto los valores de referencia, así como los RSEC/P (%), se muestran en la Tabla 6.2 para glicerina, ácido esteárico, monoestearato y diestearato de glicerina.

Tabla 6.2 Parámetros de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación de glicerina, ácido, monoestearato y diestearato de glicerina. Se han utilizado 4 factores PLS para cada analito.

Parámetro	Glicerina	Ácido	Monoestearato	Diestearato
Pretratamiento	2 ^a derivada	2 ^a derivada	1 ^a derivada	1 ^a derivada
Intervalo espectral (nm)	1100-2498	1100 - 2200	1100-2200	1100-2200
Varianza explicada (%)	99.29	99.92	99.13	98.81
Calibración				
Intervalo de concentración (%)	1.5 - 27.1	1.7 - 56.1	7.9 - 36.8	24.9 - 67.6
nº de muestras	17	17	18	16
Pendiente	0.99 ± 0.05	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.05	0.99 ± 0.06
Ordenada al origen	0.1 ± 0.7	0.0 ± 0.3	0 ± 1	0 ± 3
Coef. Correlación (r)	0.996	0.999	0.995	0.994
RSEC (%)	5.4	2.1	2.3	2.6
RMSEC	0.84	0.41	0.69	1.42
Predicción				
Intervalo de concentración (%)	1.7 - 27.0	2.0 - 13.5	24.7 - 36.5	33.0 - 66.5
nº de muestras	7	7	7	7
Pendiente	0.99 ± 0.07	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1
Ordenada al origen	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 8	2 ± 8
Coef. Correlación (r)	0.997	0.985	0.976	0.991
RSEP%	4.4	6.7	3.3	3.2
RMSEP	0.7	0.49	1.06	1.71

Los modelos construidos para cada uno de los componentes de la mezcla se han obtenido con 4 factores PLS en todos los modelos. Las pendientes y ordenadas de

origen de los gráficos de valores predichos frente a los valores de referencia para cada modelo, tanto en calibración como en predicción, son próximos a 1 y 0 respectivamente, lo que indica que los modelos están exentos de errores sistemáticos.

6.1.2 Predicción de un proceso in-line

Los modelos que hemos construido, se han aplicado al seguimiento del resto de los procesos, realizando la predicción de cada uno de los espectros registrados durante el mismo. En la Figura 6.3, se muestran los valores de la determinación de los cuatro componentes de los espectros registrados cada tres minutos (línea continua) y superpuestos, los valores de concentración de los compuestos obtenidos por el método de referencia, para uno de los procesos de esterificación.

Predicción Proceso in-line

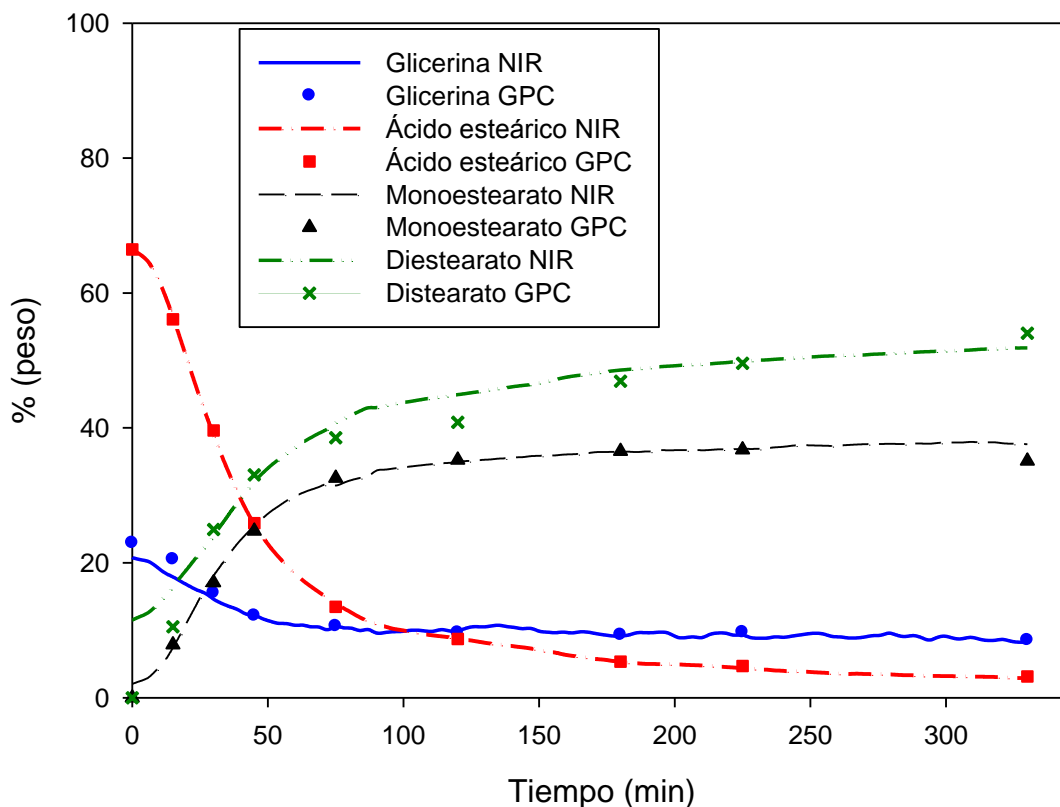


Figura 6.3 Perfiles de concentración de una predicción in-line de un proceso.

Al principio del proceso, los valores de predicción de monoestearato y diestearato de glicerina muestran discrepancias notables con los valores obtenidos por cromatografía; este hecho puede ser explicado porque al principio de la reacción la mezcla presenta

dos fases y por tanto el espectro tomado o bien la muestra tomada no son representativos. A partir de 50 minutos, observamos como las predicciones realizadas concuerdan mejor con los valores obtenidos por cromatografía, y nos dan una idea de la evolución de cada una de las especies.

El gráfico muestra que la evolución de las diferentes especies se hace más lenta con el tiempo y no se consigue la completa desaparición de los reactivos. Probablemente aplicando un mayor vacío al reactor se conseguiría una más completa eliminación del agua y por tanto una mayor extensión de la reacción de esterificación.

Estos resultados demuestran que se puede realizar la monitorización, in-line de un proceso de esterificación con catálisis enzimática, mediante la espectroscopia NIR provista de una sonda de fibra óptica de inmersión.

La reacción de esterificación en presencia de una lipasa como catalizador enzimático conduce a un producto de reacción en que domina la formación del diestearato de glicerina, independientemente de las concentraciones iniciales de los reactivos y del efecto de la temperatura.

El catalizador enzimático Novozyme 435 tiene una capacidad catalítica mayor que otros catalizadores encontrados en la bibliografía [171,172,173], obteniéndose un rendimiento mayor y a temperatura menores.

6.2 Determinación de componentes de una mezcla adyuvante en formulaciones herbicidas.

En el estudio se ha empleado la espectroscopia NIR para la determinación rápida de la composición de una mezcla destinada a la formulación de un adyuvante para un herbicida. Este adyuvante permite una dispersión del herbicida sobre las hojas de vegetación de una manera rápida y uniforme. Estos concentrados emulsionables

¹⁷¹ Machado, M.S., Pérez-Pariente, J., Sastre, E., Cardoso, D., de Guereño, A.M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. *Appl. Catal., A*, 203 (2000) 321-328.

¹⁷² Pouilloux, Y., Abro, S., Vanhove, C., Barrault, J. Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins. Preparation of monoglycerides. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 149 (1999) 243-254.

¹⁷³ Pouilloux, Y., Métayer, S., Barrault, J. Synthesis of glycerol mono-octadecanoate from octadecanoic acid and glycerol. Influence of solvent on the catalytic properties of basic oxides. *C. R. Chim.* 3 (2000) 589-594.

permiten una mejor penetración del herbicida a través de la cutícula de la hoja debido a la naturaleza lipofílica de la superficie cuticular.

La emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, en nuestro caso un aceite mineral parafínico y agua, que además debe contener una tercera especie, llamada emulsionante. Esta se trata de una sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión, que disminuye la tensión superficial existente entre las dos fases y aporta una estabilidad temporal a la emulsión; estos emulsionantes son frecuentemente surfactantes. Frecuentemente se usan mezclas de diversos surfactantes para obtener un balance hidrofílico/lipofílico apropiado para los líquidos que deben miscibilizarse y al tipo de micelas que deben formarse. Además, su concentración debe regularse adecuadamente para obtener dispersiones lo más estables posibles.

La formulación adyuvante estudiada está constituida por aceite mineral parafínico (61% p/p), agua (< 3% p/p), propilenglicol (1-2% p/p) y dos surfactantes: un éster de sorbitol etoxilado (23 % p/p) y un alcohol etoxilado (12% p/p). La complejidad de tres de los componentes individuales de la formulación, constituidos por una mezcla de oligómero y/o isómeros, hace difícil el análisis individual de cada uno de los componentes en la mezcla o formulación final. No existen métodos de referencia para realizar estas determinaciones y este estudio propone la aplicación de la espectroscopia NIR para la determinación de todos los componentes de la mezcla que constituyen el adyuvante.

Se ha aplicado un diseño experimental para la preparación del conjunto de muestras que se utilizarán en la construcción del modelo de calibración; el diseño utilizado ha sido el basado en *Modified Distance Based*. Este diseño tiene por objeto asegurar la robustez del modelo de calibración y evitar el error que el modelo podría producir por tener espectros tan semejantes tres de los componentes (aceite parafínico y los dos surfactantes) (ver Figura 6.4). Este diseño minimiza la correlación entre las concentraciones de todos los componentes de la muestra que presentan una elevada correlación espectral, para obtener un conjunto de calibración que proporcione un

modelo robusto y con una buena capacidad predictiva. El diseño aplicado proporciona 36 muestras con un coeficiente de correlación menor a 0.51 (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Coeficientes de correlación entre las concentraciones de los componentes de la mezcla adyuvante.

	Aceite	Propilenglicol	Alcohol etoxilado	Éster de sobitol etoxilado	Agua
Aceite	1.00				
Propilenglicol	-0.08	1.00			
Alcohol etoxilado	-0.49	-0.16	1.00		
Éster de sorbitol etoxilado	-0.51	-0.08	-0.28	1.00	
Agua	-0.34	0.05	-0.11	-0.11	1.00

Tanto el agua como el propilenglicol presentan un espectro NIR bastante diferente a los otros tres productos, tal y como se observa en la Figura 6.4. Los coeficientes de correlación espectral entre el aceite y los dos surfactantes son superiores a 0.98. Los elevados valores de los coeficientes de correlación entre los espectros del aceite parafínico y los dos surfactantes son claros indicativos de la dificultad para obtener modelos con buena capacidad predictiva para estos tres componentes.

Las bandas de absorción del agua y del propilenglicol son mucho más intensas que en los otros compuestos, por lo que sus espectros fueron registrados con un paso de luz de 1mm, para poder compararlos con los otros componentes de la mezcla. El agua exhibe dos bandas intensas en los rangos de 1400 – 1600 y 1850 – 2200 nm, correspondientes al primer armónico y a la banda de combinación de tonos del enlace O-H. El propilenglicol exhibe también dos bandas importantes en la región 1400 – 1600 y 2000 – 2200 nm, correspondientes igualmente al primer armónico y a la banda de combinación de tonos del enlace O-H; estas bandas tienen una intensidad menor que las del agua.

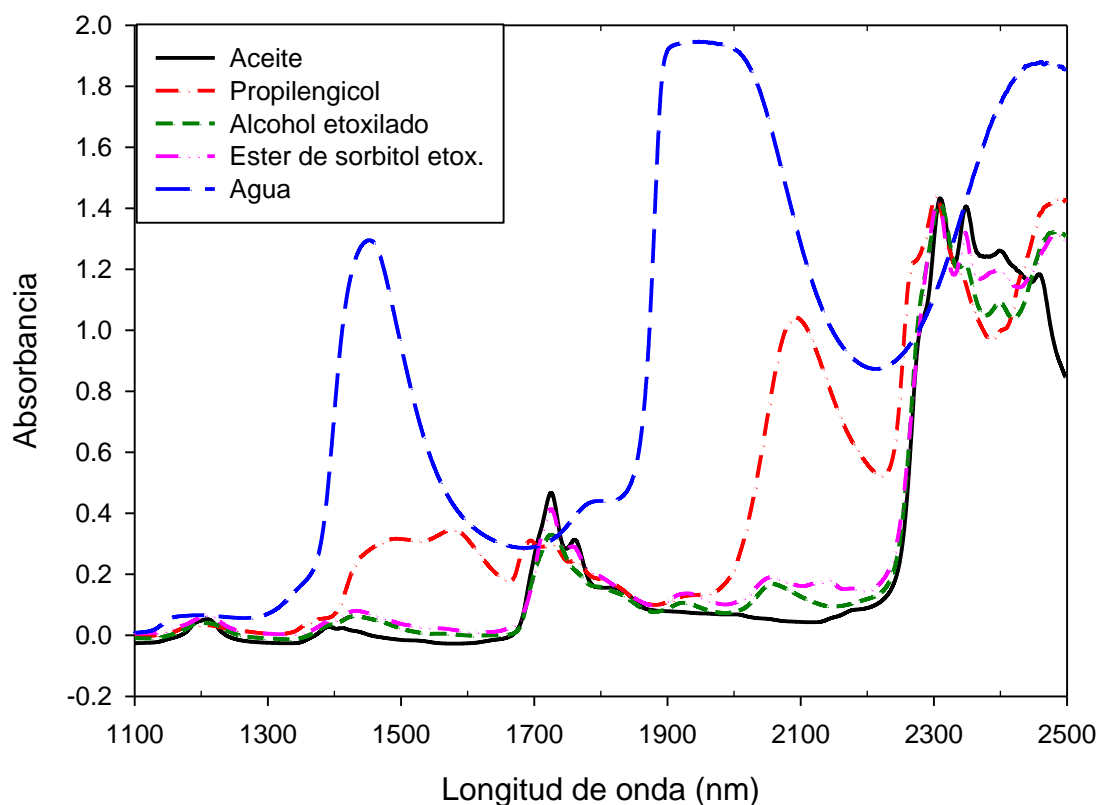


Figura 6.4 Espectro NIR de los componentes de la mezcla adyuvante.

Los espectros NIR de los otros tres productos son similares, exhibiendo dos bandas en la región 1700-1800 nm (primer armónico del enlace C-H) y 2300-2500 nm (banda de combinación de tonos para el enlace C-H). La principal diferencia que se observa entre los analitos en la región 2100 nm (banda de combinación de tonos del enlace O-H) donde el aceite no presenta absorción, mientras que si la presentan los dos surfactantes, el éster de sorbitol etoxilado y el alcohol etoxilado.

En la Figura 6.5 se muestra los espectros registrados de las muestras preparadas en el laboratorio. Los espectros se han registrado en modo de transmisión, utilizando viales cilíndricos de diámetro interno de 6.5 mm en el intervalo espectral de 400-2500 nm. Tal y como se puede apreciar, la mayor variabilidad espectral se encuentra en la región 1400-1600 y 1900-2200 nm, debidas principalmente al primer armónico y a la banda de combinación de tonos del enlace O-H en los grupos hidroxilo y especialmente del agua. En el intervalo de longitudes de onda 400-1100 nm no hay una señal de

absorbancia representativa y el elevado camino óptico no permite obtener medidas apropiadas encima de 2200 nm.

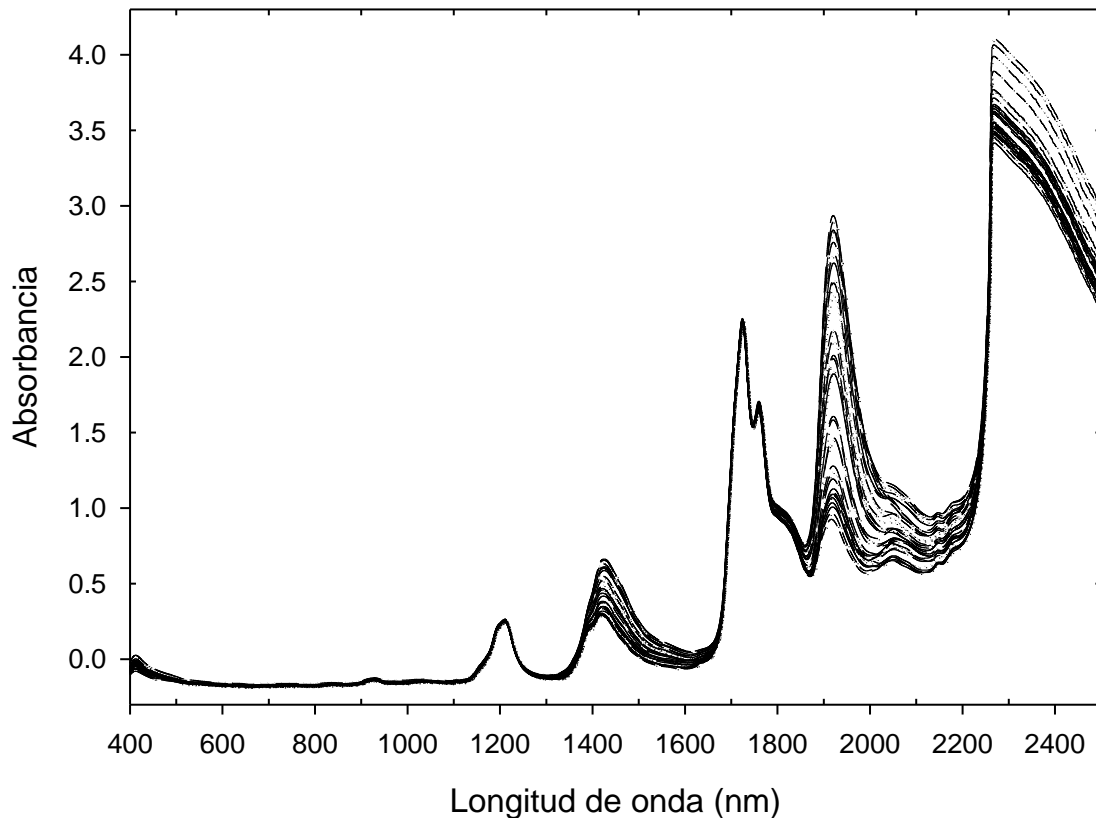


Figura 6.5 Espectros NIR de las 36 muestras preparadas.

6.2.1. Cuantificación de los componentes en la mezcla adyuvante

Se han desarrollado 5 modelos PLS, uno para cada uno de los componentes. Los datos espectrales NIR junto con los valores obtenidos por pesada, se modelaron usando el algoritmo PLS. Para construir cada uno de los modelos se dividió el total de muestras preparadas en dos conjuntos, uno para construir el modelo de calibración (entre 18-21 muestras dependiendo del componente) y un segundo (entre 14-17 muestras dependiendo del componente) para evaluar su capacidad predictiva. Las muestras constituyentes del conjunto de calibración para cada uno de los componentes se seleccionaron teniendo en cuenta que cubriesen el rango de concentraciones de una manera homogénea para cada uno de ellos, y mediante el gráfico de PCA, de forma que las muestras cubriesen la máxima variabilidad espectral. Las muestras utilizadas

para la construcción de los modelos para cada uno de los componentes fueron distintas.

Los modelos de calibración construidos para cada analito se ensayaron utilizando los espectros en absorbancia, así como sujetos a diversos pretratamientos espectrales, incluyendo SNV (*Standard Normal Variate*), o bien derivadas de Savitzky-Golay, concretamente la primera y segunda derivada, así como suavizados de diferente ventana móvil. Así mismo, también se ensayaron modelos con el intervalo espectral entero, así como diversos intervalos o rangos espectrales que presentaban máxima absorción para los analitos y eliminando las zonas donde no había absorción para reducir el efecto del ruido. La Tabla 6.4 muestra los mejores modelos de calibración para los analitos aceite mineral parafínico, alcohol etoxilado y éster de sorbitol etoxilado. Por otro lado la Tabla 6.5 muestra los mejores modelos de calibración para propilenglicol y agua, así como los parámetros de mérito para la regresión lineal de los valores NIR respecto los valores de referencia, así como los RSEC/P (%) y RMSEC/P correspondientes.

El modelo PLS para el agua utiliza un solo factor PLS en segunda derivada, mientras que los otros 4 modelos PLS se han construido utilizando primera derivada como pretratamiento espectral y utilizando 3 factores PLS. Los intervalos 400-1300 y 2200-2498 nm fueron excluidos por no aportar señal espectral significativa y conducían a peores modelos de calibración. Las pendientes y ordenadas al origen de los gráficos de valores predichos frente a los de referencia para cada modelo, tanto en calibración como en predicción, fueron próximos a 1 y 0, lo que indica que los modelos están exentos de error sistemático.

Tabla 6.4 Parámetros de merito para los modelos de calibración PLS1 para Aceite, Alcohol etoxilado y Éster de sorbitol etoxilado.

Parámetro	Aceite	Alcohol etoxilado	Éster de sorbitol etoxilado
Pretratamiento	1ª derivada	1ª derivada	1ª derivada
Intervalo espectral (nm)	1300-2200	1300-2200	1650-2200
Varianza explicada (%)	99.04	99.12	98.84
Factores PLS	3	3	3
Calibración			
Intervalo de concentración (%)	54.23-67.24	17.13-30.44	6.34-16.76
nº de muestras	21	20	20
Pendiente	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04
Ordenada al origen	0 ± 3	0.0 ± 0.7	0 ± 1
Coef. Correlación (r)	0.99	0.988	0.991
RSEC (%)	0.7	1.5	3.5
RMSEC	0.45	0.34	0.44
Predicción			
Intervalo de concentración (%)	54.72-67.23	17.77-28.00	6.40-16.55
nº de muestras	14	15	15
Pendiente	0.98 ± 0.09	0.97 ± 0.06	1.01 ± 0.09
Ordenada al origen	1 ± 5	0.5 ± 0.8	0 ± 2
Coef. Correlación (r)	0.98	0.988	0.978
RSEP (%)	0.9	2.3	3.7
RMSEP	0.57	0.54	0.45

Tabla 6.5 Parámetros de merito para los modelos de calibración PLS1 para Propilenglicol y Agua.

Parámetro	Propilenglicol	Agua
Pretratamiento	1ª derivada	2ª derivada
Intervalo espectral (nm)	1300-1800, 2000-2200	1300-2200
Varianza explicada (%)	99.23	99.56
Factores PLS	3	1
Calibración		
Intervalo de concentración (%)	0.48-3.47	0.88 - 6.42
nº de muestras	18	19
Pendiente	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
Ordenada al origen	0.00 ± 0.09	0.0 ± 0.2
Coef. Correl (r)	0.996	0.996
RSEC (%)	4.3	3.3
RMSEC	0.09	0.13
Predicción		
Intervalo de concentración (%)	0.50-3.30	0.92 - 6.14
nº de muestras	17	16
Pendiente	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.05
Ordenada al origen	-0.1 ± 0.2	-0.1 ± 0.2
Coef. Correl (r)	0.986	0.993
RSEP (%)	6.4	4.5
RMSEP	0.13	0.18

Como el cálculo de la pendiente y de la ordenada al origen no es independiente, se ha realizado una evaluación del intervalo de confianza conjunto de los valores de pendiente y ordenada al origen para los cinco componentes, como se muestra en la Figura 6.6. Los puntos representados por los valores reales, para el conjunto de validación, se encuentran dentro de la elipse de confianza (a un nivel de significación del 95%), lo que demuestra que no hay ninguna diferencia significativa entre los valores teóricos y los reales.

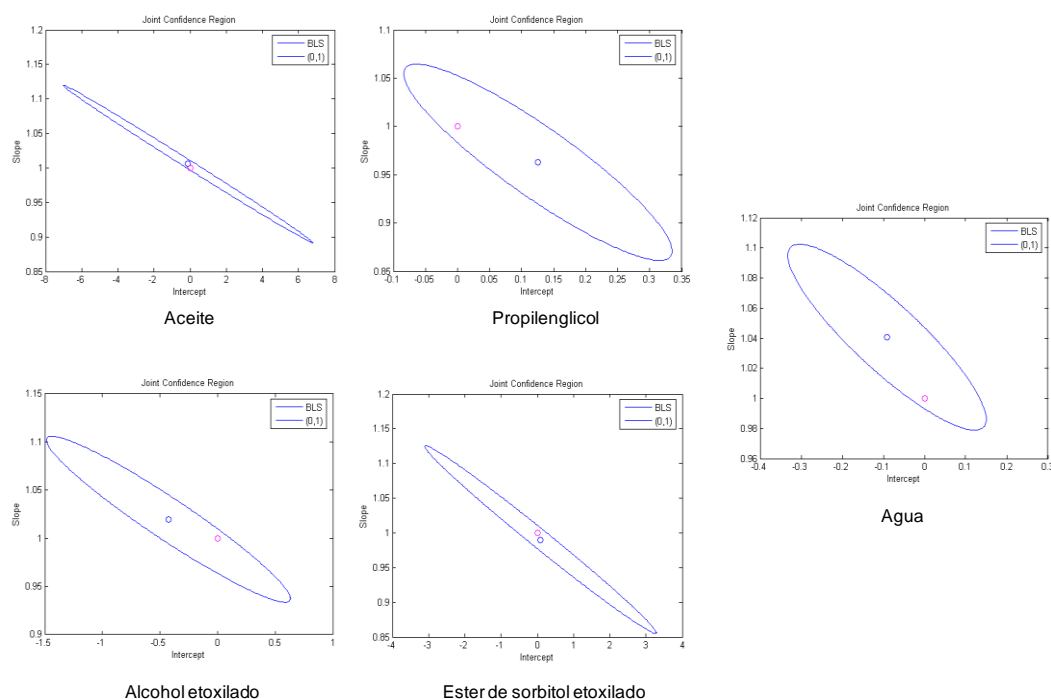


Figura 6.6 Intervalo de confianza conjunto para la pendiente y la ordenada al origen para los cinco componentes del adyuvante.

Finalmente, con objeto de comprobar la aplicabilidad de los modelos de calibración en la industria, se analizaron diversos lotes de muestras de producción. En la Tabla 6.6 se muestran los resultados obtenidos en la predicción de las muestras de producción. Los valores obtenidos por NIR de los lotes de producción no difieren significativamente de los valores teóricos de la dosificación. Estos datos confirman la buena capacidad predictiva de los modelos construidos y su utilidad para controlar la composición de este tipo de mezclas.

Tabla 6.6 Composición de cada uno de los componentes de la mezcla adyuvante para diversos lotes de producción.

Número Lote	Aceite (61.5 %)	Propilenglicol (1.2 %)	Alcohol Etoxilado (11.6 %)	Éster de sorbitol etoxilado (23.1 %)	Agua (2.7 %)	Suma total (100 %)
1	60.0	1.2	12.8	23.5	2.9	100.3
2	62.3	1.2	11.5	21.7	3.8	100.5
3	60.1	1.2	11.8	22.5	4.5	100.1
4	60.6	1.9	9.8	24.2	4.4	100.8
5	61.3	1.8	11.1	24.4	2.0	100.6
6	59.8	1.9	10.1	24.6	4.2	100.5
7	57.7	1.7	10.7	25.5	4.8	100.3
8	60.4	1.7	9.9	23.7	4.5	100.2
9	60.8	1.9	9.6	24.4	3.8	100.5
10	60.4	1.9	9.0	25.0	4.2	100.5
11	61.9	1.8	10.6	24.2	2.0	100.4

6.3 Control de calidad para lubricantes

En el estudio que se presenta a continuación, se ha empleado la espectroscopia NIR para el análisis de mezclas o formulaciones lubricantes, para conocer su composición, así como la viscosidad de las mismas. Los dispositivos mecánicos requieren de agentes lubricantes para prevenir calentamientos y desgaste en las superficies sólidas en contacto. El lubricante es un componente líquido añadido entre las partes móviles, cuyas funciones incluyen la lubricidad, protección contra el desgaste y el sellado. Un lubricante es generalmente una mezcla de diferentes componentes y de aditivos que mejoran ciertos aspectos específicos de su rendimiento. Los aceites lubricantes a base de aceite mineral han sido ampliamente utilizados como agentes lubricantes. Los nuevos refrigerantes tienden a sustituir a los clorofluorocarbonos (CFCs), que fueron utilizados en el pasado, y actualmente se utilizan otros medioambientalmente

compatibles como CO₂ o hidrofluorocarbonos (HFCs). Estos refrigerantes precisan de lubricantes que sean compatibles y miscibles entre si, por lo que la industria ha sintetizado una serie de lubricantes tales como polialfaolefinas (PAO), esteres de polioli (POE) y polialquilenglicoles (PAG). En este estudio los lubricantes que se estudiaron fueron los basados en ésteres de polioli.

Los ésteres de polioli se obtienen habitualmente por la esterificación de uno o dos polialcoholes de partida con una mezcla de ácidos. El análisis de estos productos se puede realizar a través de cromatografía de gases o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. No obstante la determinación individual de los componentes no tiene interés práctico industrial, porque además de ser una determinación compleja, no nos ofrece una información respecto al comportamiento global del producto ni sus características. Los métodos que se utilizan en estos casos son laboriosos, costosos y poco selectivos, por lo que resulta frecuente la aplicación de más de un método para identificar y/o caracterizar completamente un producto. Es habitual caracterizar este tipo de productos con índices globales como la viscosidad o el índice de ácido, entre otros. Una de las técnicas que permiten la identificación y determinación, tanto de materias primas como de producto acabado es la espectroscopia NIR, registrando únicamente el espectro de la muestra desconocida y comparándola con una biblioteca de identificación previamente construida. En este apartado se comentarán los aspectos más importantes para la construcción de las bibliotecas de identificación de los lubricantes y la construcción de modelos de calibración multivariable PLS para la determinación de la composición de estas formulaciones lubricantes y su viscosidad.

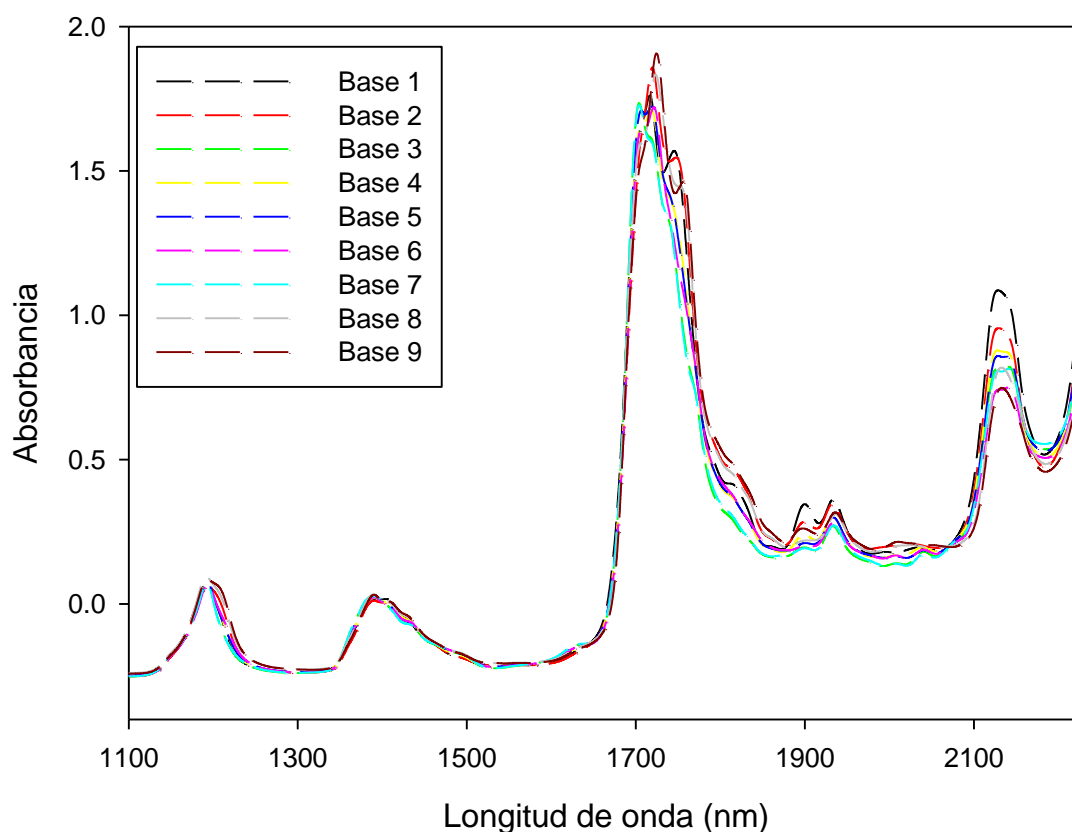


Figura 6.7 Espectros NIR de las 9 bases lubricantes.

Los espectros NIR que presentan los lubricantes estudiados son muy similares y no presentan diferencias significativas entre las bandas de absorción, tal y como se puede ver en la Figura 6.7. Los espectros muestran dos bandas intensas en la región 1700-1800 nm, correspondiente al primer armónico del enlace C-H, además de dos bandas menos intensas a 1200 y 1400 nm, correspondientes al segundo armónico del enlace C-H y al primer armónico de la banda de combinación del enlace C-H, respectivamente. Otra banda intensa está presente en la región 2100-2200 nm debido a las bandas de combinación de los enlaces C-H y C=O. La señal se satura sobre 2200 nm debido al elevado paso de luz utilizado para las medidas. La gran similitud en los espectros viene refrendada por el elevado coeficiente de correlación entre los espectros, los cuales exceden de 0.99, lo que es indicativo de la dificultad tanto de construir modelos cualitativos para diferenciar las bases y modelos que permitan su determinación en formulaciones lubricantes.

A partir de las 9 bases lubricantes se han definido 23 mezclas lubricantes finales en función de las características físicas finales deseadas. Evidentemente los espectros que se obtienen de las distintas formulaciones lubricantes finales son muy similares, como lo atestigua su elevado coeficiente de correlación, siendo mayor de 0.9913.

6.3.1 Construcción de una biblioteca espectral para la identificación de los lubricantes

La alta similitud entre los espectros NIR de las bases lubricantes y formulaciones lubricantes, precisan del uso de métodos de reconocimientos de pautas con una gran capacidad discriminante. Habitualmente las bibliotecas espectrales utilizan estos métodos ya que permiten crear clases a partir de muestras de identidad conocida, creando un modelo que represente cada una de ellas. La identificación de un producto desconocido se realiza por comparación de su espectro con cada uno de los modelos, siendo identificado como la clase con la que posea una mayor similitud, siempre que el resultado se encuentre dentro de los límites establecidos como aceptables en la construcción de la biblioteca.

Una biblioteca de identificación debería contener todos los productos que se quieran identificar, lo que permitiría realizar la identificación de cada uno de ellos con un mismo método. Sin embargo, no resulta sencillo conseguir la total discriminación de todos ellos en una sola biblioteca y por ello en este trabajo se ha presentado una estrategia de construcción de bibliotecas en cascada, en la que una biblioteca general identifica la gran mayoría de los productos, mientras que las sub-bibliotecas de clasificación distinguen los productos con espectros parecidos que no pueden diferenciarse en la biblioteca general. Esta misma estrategia se ha utilizado para la diferenciación de las formulaciones lubricantes que contienen o no los aditivos correspondientes (antioxidantes, estabilizantes, etc.) con los que se aditivan usualmente.

El método de reconocimiento de pautas seleccionado para la construcción de la biblioteca de identificación fue el método de varianza residual. Este método se basa en la realización de un análisis en componentes principales (PCA) con las muestras que definen la clase (producto); con estos mismos factores se reconstruye el espectro de la muestra a identificar y se calcula su residual. Si el residual del espectro reconstruido de

la nueva muestra no supera el valor límite o umbral definido para el modelo, se considera la muestra identificada para esa clase.

Uno de los factores cruciales para asegurar la adecuada selectividad en la construcción de la biblioteca espectral es la elección de un valor umbral (*threshold*) apropiado; este *threshold* es el valor máximo (en varianza residual) que permite asignar de forma inequívoca un espectro a una clase definida. Todos los espectros que presenten una varianza residual menor que el *threshold* se consideran pertenecientes a la clase. Un *threshold* excesivamente bajo no permite la identificación de esa muestra para un producto, mientras que uno elevado no permite una distinción del espectro con respecto a dos o más clases (debido a que los valores son inferiores al *threshold* fijado).

Este problema se puede resolver identificando los compuestos en dos etapas, una primera de identificación utilizando una biblioteca con todos los productos y una segunda sub-biblioteca con solo aquellos que se confunden en la primera, con una capacidad de discriminación mayor que la biblioteca general. Esta metodología se denominada identificación en cascada, ya que implica la identificación de la muestra desconocida usando la biblioteca general, y si el resultado no es concluyente se utiliza una sub-biblioteca para la cualificación. Esta metodología de trabajo se ha empleado para la biblioteca construida para la identificación de los lubricantes finales que contienen o no los aditivos, con el objetivo de prevenir cualquier posible error al aplicar un modelo de cuantificación que no corresponda con la formulación real; de este modo primero se identifica correctamente con la formulación lubricante y posteriormente se realiza la determinación con el modelo pertinente.

La construcción de las bibliotecas espectrales consta de los siguientes pasos:

- Registro de los espectros NIR utilizando sets de muestras de identidades conocidas.
- Elección los espectros para cada clase o producto, seleccionando muestras de diferentes lotes.
- Construcción de la biblioteca eligiendo el método de reconocimiento de pautas a aplicar (varianza residual en nuestro caso). Los parámetros que uno debe seleccionar

son el pretratamiento espectral, el intervalo de longitudes de onda, la varianza explicada y el valor de *threshold* a utilizar. El siguiente paso implica una validación interna, para verificar la existencia de espectros no identificados, mal identificados o ambiguamente identificados. Basados en estos resultados, se vuelven a cambiar estos parámetros iterativamente hasta asegurar la correcta identificación de los productos.

- Construcción de las sub-bibliotecas en cascada. Las muestras de aquellas clases cuyo resultado se obtiene una identificación ambigua en la biblioteca general se dividen en sub-clases y se aplica el mismo procedimiento seguido en la construcción de la biblioteca general.
- Validación de la biblioteca general y las sub-bibliotecas, comprobando espectros que no se han utilizado para la construcción de la biblioteca son identificados correctamente (sin ambigüedades).

Con estas premisas, hemos construido dos bibliotecas: la primera de ellas permite la identificación de las bases lubricantes y la segunda biblioteca permite la identificación de las formulaciones lubricantes y también permite la identificación si una mezcla contiene o no los aditivos en su formulación. Estas bibliotecas consiguen identificar casi la totalidad de estas materias tan sólo registrando su espectro NIR y realizando el cálculo de la identificación, lo cual no lleva más de 1 minuto por cada muestra. Esto supone un avance significativo en métodos rápidos de análisis cualitativo.

La biblioteca de identificación de las bases lubricantes se ha construido a partir de 168 espectros en segunda derivada para 9 clases de bases lubricantes, utilizando el intervalo de longitudes de onda de 1100-2200 nm, un *threshold* de 0.95 y una varianza explicada del 96%. La biblioteca se ha validado externamente, mostrando una correcta identificación de todos los lubricantes y la ausencia de ambigüedades en el proceso de identificación.

La segunda de las bibliotecas construidas, contiene 1034 espectros en segunda derivada para 23 formulaciones lubricantes, utilizando el intervalo de longitudes de onda de 1100-2200 nm, un *threshold* de 0.952 y una varianza explicada del 98%. Algunos de estos compuestos mostraron valores de identificación por debajo del

threshold para más de una clase y por lo tanto fueron identificados ambiguamente. Una identificación más precisa de estos productos precisaba del desarrollo de bibliotecas en cascada. La biblioteca construida para la identificación de las formulaciones lubricantes fue validada tanto interna como externamente, mostrando una correcta identificación y cualificadas sin ambigüedades.

Para ilustrar el procedimiento de identificación en cascada se han construido dos sub-bibliotecas.

La primera de ellas permite resolver la ambigüedad creada en la biblioteca general para la identificación de dos formulaciones lubricantes (formulación lubricante 1 y formulación lubricantes 2). Estas se diferenciaban en las proporciones de las bases lubricantes usadas en las dos preparaciones (neopentilglicol y ácido C8 – base lubricante 9- y pentaeritritol con mezcla de ácidos C5-C7 – base lubricante 2). Ambas formulaciones contienen un 0.05% de BHT como aditivo, y además la formulación 2 contiene otro aditivo llamado *Silicone Fluid* (0.012% p/p). El coeficiente de correlación entre ambas formulaciones excede de 0.999. La sub-biblioteca construida para identificar correctamente cada formulación utilizó un *threshold* de 0.86 y una varianza explicada del 99%. En la Tabla 6.7 se recogen los resultados que proporciona esta sub-biblioteca.

La segunda sub-biblioteca que se presenta es capaz de identificar correctamente si una de las formulaciones contiene o no aditivos. Los espectros NIR de la formulación con o sin aditivos son muy similares (coeficiente de correlación > 0.999), por lo que la biblioteca general no es capaz de diferenciar si contiene o no aditivos. La sub-biblioteca construida utilizó un *threshold* de 0.777 y una varianza explicada del 99%. En la Tabla 6.7 se recogen los resultados que muestran la diferenciación de sí la formulación lubricante contiene o no aditivos.

La biblioteca y sub-bibliotecas son ejemplos claros del gran potencial para análisis cualitativo de la espectroscopia NIR. Además la metodología de bibliotecas en cascada permite llegar a resolver diferentes problemas que se presentan en la identificación. Mediante este procedimiento se pueden llegar a tener una única biblioteca de identificación, capaz de identificar productos distintos y resolviendo las confusiones

que se den en la biblioteca general mediante sub-bibliotecas de clasificación adecuadas para cada caso.

Tabla 6.7 Tabla de identificaciones cruzadas de las sub-bibliotecas construidas.

Sub-biblioteca	Muestra	Identificada como:	Resultado	Discriminante
Sub-biblioteca 1 Formulación Lubricante 1 Formulación Lubricante 2 Varianza Residual 99% Identificación positiva: <i>Threshold <0.86</i>	1	Formulación Lubricante 1	Positivo	0.676
		Formulación Lubricante 2	Negativo	0.968
	2	Formulación Lubricante 1	Positivo	0.413
		Formulación Lubricante 2	Negativo	0.954
	3	Formulación Lubricante 1	Positivo	0.326
		Formulación Lubricante 2	Negativo	0.951
	4	Formulación Lubricante 2	Positivo	0.530
		Formulación Lubricante 1	Negativo	0.963
	5	Formulación Lubricante 2	Positivo	0.641
		Formulación Lubricante 1	Negativo	0.915
Sub-biblioteca 2 Lubricante con y sin aditivo Varianza residual 99% Identificación positiva: <i>Threshold < 0.777</i>	6	Lubricante con aditivo	Positivo	0.279
		Lubricante sin aditivo	Negativo	0.996
	7	Lubricante con aditivo	Positivo	0.561
		Lubricante sin aditivo	Negativo	0.868
	8	Lubricante sin aditivo	Positivo	0.394
		Lubricante con aditivo	Negativo	0.893
9	Lubricante sin aditivo	Positivo	0.655	
	Lubricante con aditivo	Negativo	0.882	

Las muestras 1,2 y 3 pertenecen a la formulación lubricante 1; las muestras 4 y 5 pertenecen a la formulación lubricante 2; las muestras 6 y 7 pertenecen a un lubricante con aditivos; las muestras 8 y 9 pertenecen a un lubricante sin aditivos.

6.3.2 Construcción de los modelos de calibración PLS

Una vez que la identificación de la formulación lubricante se ha realizado, el programa selecciona el modelo de calibración adecuado para determinar la composición de la misma y/o la viscosidad del lubricante. De las 23 formulaciones lubricantes, se ha seleccionado una como ejemplo para mostrar los modelos construidos para la

determinación simultánea de la composición de las bases, la composición de los aditivos y la viscosidad a 40 y 100 °C. La mezcla lubricante seleccionada está compuesta por la base lubricante 2 en un 50.6% (pentaeritritol esterificado con una mezcla de ácido C5 y C7) y la base lubricante 8 en un 48.65% (neopentilglicol esterificado con ácido C7). Los espectros NIR de las dos bases lubricantes son muy similares, con un coeficiente de correlación de 0.997. La similitud espectral entre las dos bases dificulta la obtención de un modelo de calibración capaz de predecir correctamente las muestras procedentes del proceso industrial.

Un total de 21 muestras fueron preparadas mezclando los lubricantes que cubren un rango de concentraciones comprendido entre el valor nominal $\pm 5\%$ p/p. Las muestras fueron divididas en un set de calibración, que fue utilizado para la construcción del modelo para cada variable (composición y viscosidad) y un set de validación en muestras no incluidas en el set anterior que fue utilizado para evaluar la capacidad predictiva de los modelos construidos. Para la selección de muestras del set de calibración para cada base lubricante y para la viscosidad, se utilizaron muestras que comprendiesen el intervalo de concentraciones o viscosidad apropiado, según el caso. Del mismo modo que en modelos anteriores, se evaluaron distintos pretratamientos espectrales, así como diferentes intervalos de longitudes de onda. En la Tabla 6.8 se muestran los mejores modelos de calibración para la composición de las bases lubricantes y de la viscosidad a 40 y 100 °C. Tal y como se puede ver, los modelos construidos son muy simples, con solo 2 factores PLS y utilizando segunda derivada como pretratamiento espectral. Además, en esta tabla se muestran los parámetros de mérito de los modelos construidos.

Tabla 6.8 Parámetros de mérito para los modelos de calibración PLS1 para la composición de las dos bases lubricantes y viscosidad a 40 y 100 °C.

Parámetro	Base Lubrificante 2	Base Lubrificante 8	Viscosity 40°C	Viscosity 100°C
Varianza explicada (%)	99.8	99.8	99.7	99.6
Intervalo	48.47 - 53.51 %	46.49 - 51.53 %	9.44 - 10.00 mm ² /s	2.68 - 2.78 mm ² /s
Calibración				
nº de muestras	14	14	14	14
Pendiente	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
Ordenada al origen	0 ± 1	0 ± 1	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.1
Coef. Correlación (r)	0.999	0.999	0.998	0.998
RSEC (%)	0.143	0.149	0.106	0.072
RMSEC	0.07	0.07	0.01	0.002
Predicción				
nº de muestras	7	7	6	7
Pendiente	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.96 ± 0.09
Ordenada al origen	1 ± 2	1 ± 2	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.2
Coef. Correlación (r)	0.999	0.999	0.995	0.997
RSEP%	0.107	0.111	0.069	0.078
RMSEP	0.05	0.05	0.01	0.002

Intervalo de longitudes de onda 1100-1850, 2000-2200 nm, con 2 factores PLS y segunda derivada como pretratamiento.

Para complementar este estudio se han preparado más muestras, que además de los lubricantes, incluyen los aditivos (TCP y BHT) que se añaden a final del proceso para realizar una cuantificación de los mismos. Se prepararon 26 nuevas muestras mezclando los lubricantes, cubriendo el intervalo de concentraciones entre el ±5% p/p del valor nominal de los lubricantes y de los aditivos. En el ejemplo que se muestra, los aditivos tienen una concentración nominal del 0.7 % y del 0.5%, respectivamente,

cubriendo el intervalo entre el 0 y el 1.5% y 0 y 0.08% para el primero y segundo, respectivamente. El proceso para la construcción de los modelos fue análogo al anterior caso. La Tabla 6.9 muestra los mejores modelos de calibración para composición de lubricantes y aditivos.

Tabla 6.9 Parámetros de mérito para los modelos de calibración PLS1 para la composición de las dos bases lubricantes y los dos aditivos.

Parámetro	Base Lubricante 2	Base Lubricante 8	TCP	BHT
Factores PLS	4	4	3	7
Varianza explicada (%)	98.8	98.5	99.6	99.6
Intervalo	48.60 - 53.00 %	46.96 - 50.66 %	0.0 - 1.5 %	0.00 - 0.08
Calibración				
nº de muestras	14	14	15	14
Pendiente	0.99 ± 0.07	0.98 ± 0.08	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
Ordenada al origen	0 ± 3	0 ± 1	0.00 ± 0.07	0.000 ± 0.002
Coef. Correlación (r)	0.994	0.993	0.998	0.998
RSEC (%)	0.31	0.341	2.745	3.113
RMSEC	0.16	0.17	0.03	0.001
Predicción				
nº de muestras	8	9	7	5
Pendiente	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Ordenada al origen	3 ± 9	1 ± 2	0.0 ± 0.1	0.03 ± 0.05
Coef. Correlación (r)	0.982	0.972	0.994	0.979
RSEP%	0.572	0.618	4.546	26.39
RMSEP	0.29	0.29	0.04	0.011

Intervalo de longitudes de onda 1100-1850, 2000-2200 nm y segunda derivada como pretratamiento.

Los modelos construidos son simples (aunque de mayor complejidad que cuando se determinaba la composición de las bases solamente) con 4 factores PLS para los lubricantes y 3 y 7 factores PLS para los aditivos, utilizando segunda derivada como pretratamiento espectral y un intervalo espectral de 1100-1850 y 2000-2200 nm. Además también se muestran los parámetros de mérito de los modelos construidos, los cuales reflejan la alta capacidad predictiva de los mismos.

Se analizaron diversos lotes de producción y los resultados obtenidos aplicando los modelos de calibración PLS no fueron significativamente diferentes a las especificaciones, demostrando la buena capacidad predictiva de los modelos construidos.

6.4 Determinación de impurezas en compuestos cosméticos intermedios

La industria cosmética demanda métodos analíticos rápidos, eficientes y de bajo coste, tanto para el control de proceso de producción como para el aseguramiento de calidad del producto final. La presencia de restos de reactivos de síntesis o de impurezas formadas en la síntesis que puedan tener efectos indeseables en la calidad de los productos, exige la aplicación de métodos de análisis para la detección y determinación de los compuestos tóxicos que pueden tener efectos potencialmente peligrosos en la salud del consumidor.

Esta industria utiliza una amplia variedad de productos procedentes de síntesis química. Entre estos productos están los constituidos por derivados de amidoaminas, que se han obtenido por reacción de ácidos grasos o triglicéridos con la 3-dimetilaminopropilamina (DMAPA). Esta amina es un producto irritante para la piel, los ojos y las mucosas. Las amidoaminas se emplean en productos para el cuidado personal, champús, mejorar la textura de la piel y también como tensioactivos (betaínas). Las amidoaminas se utilizan también como productos básicos para la obtención de un importante grupo de derivados como son los fosfolípidos y los liposomas. El control de esta amina residual que pueda quedar en los productos de síntesis, constituye una determinación importante (a causa de su potencial toxicidad), por lo que existe una necesidad de disponer de una técnica que permita evaluar niveles bajos de concentración de amina en los diferentes productos de una manera

rápida y fiable. Las características de la espectrometría de movilidad iónica (IMS), tales como la rapidez de análisis, la simplicidad y la sensibilidad, la convierten en una técnica ideal para la determinación rápida de trazas de una amplia variedad de productos.

El trabajo que se presenta a continuación presentará los factores más importantes a estudiar, para desarrollar el método de análisis por IMS para la determinación de DMAPA en amidoaminas y la caracterización de estas.

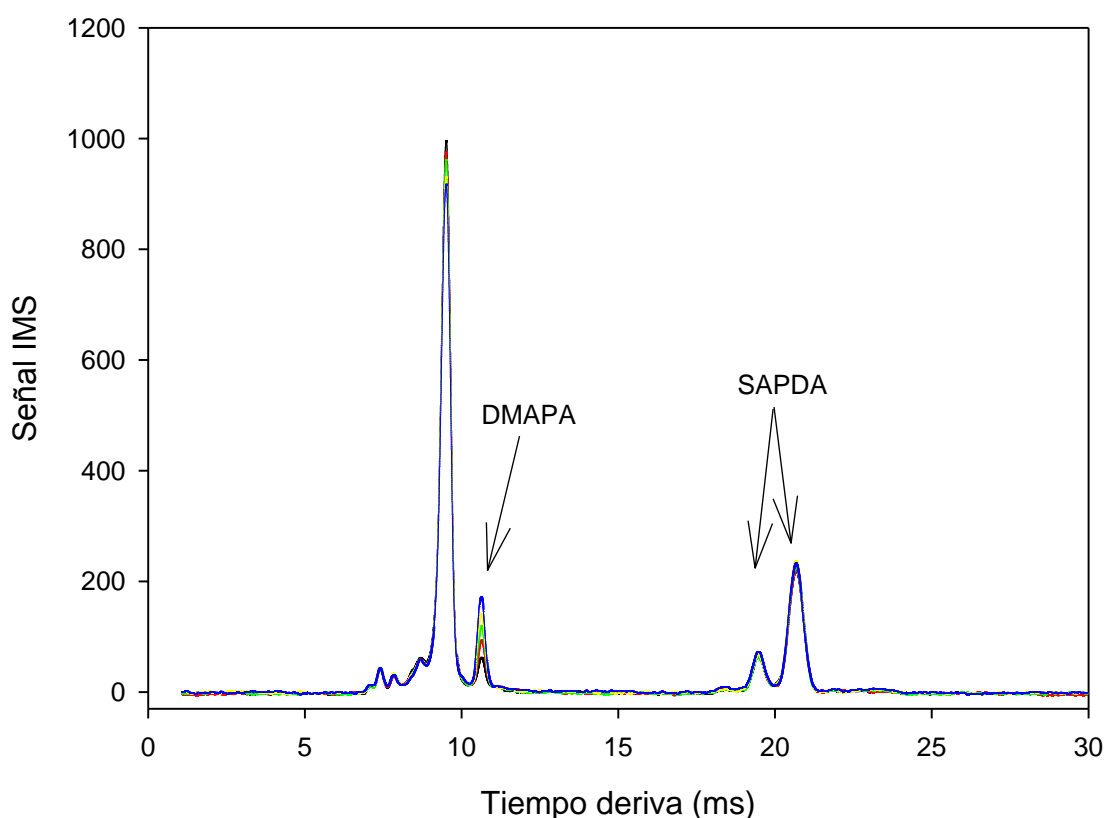


Figura 6.8 Plasmagramas solapados de diversas inyecciones de SAPDA $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con pequeños dopajes de DMAPA. Los plasmagramas se han obtenido promediando los plasmagramas de movilidad iónica entre 0.60 y 3.00 segundos de tiempo de análisis.

La DMAPA se ioniza en modo positivo por transferencia de un protón a partir del calibrante interno, nicotinamida, que actúa también como reactivo ionizante. La Figura 6.8 muestra los plasmagramas superpuestos de diversas inyecciones de $1 \mu\text{L}$ de una solución de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la estearamidopropildimetilamina (SAPDA) con adiciones de pequeñas cantidades (entre 0.030 y $0.150 \mu\text{g mL}^{-1}$) de DMAPA. Puede observarse la elevada señal que produce la DMAPA con un tiempo de deriva de 10.6 ms , que corresponde a una constante de movilidad reducida, K_0 de $1.67 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}\text{s}^{-1}$. La

amidoamina produce un doble pico a 19.5 ms y 20.7 ms, además de otro más pequeño a 21.9 ms, cuyas constantes de movilidad iónicas son 0.907 , 0.854 y $0.808 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. El pico a 20.7 se atribuye a la amidoamina del ácido esteárico, debido a su intensidad, mientras que los otros dos con una señal más débil se asignan a las amidoaminas del ácido palmítico y del ácido araquídico, los cuales están presentes en el ácido esteárico industrial. Además, los picos de los compuestos de la muestra están bien resueltos, por lo que la amidoamina no constituirá una interferencia en la determinación de la DMAPA. Un aspecto importante es la baja respuesta de la SAPDA respecto la señal de DMAPA. La señal de DMAPA se confirma inyectando una muestra de DMAPA de $1 \mu\text{g mL}$ de producto puro. La inyección de volúmenes de diferente concentración de SAPDA con la misma concentración de DMAPA produce señales de esta última de la misma intensidad, independientemente de la concentración y de la temperatura de desorción aplicada; este aspecto confirma que la DMAPA registrada está presente en el producto y no proviene de la posible descomposición térmica de la amidoamina.

Las otras amidoaminas ofrecen plasmagramas muy semejantes, tal y como se pueden ver solapados en la Figura 6.9. La amidoamina del ácido mirístico, MAPDA, muestra dos picos a 17.2 ms y 18.4 ms, atribuidas a la amidoamina del ácido mirístico por su mayor intensidad y a la del ácido láurico, respectivamente. El plasmagrama correspondiente a la amidoamina del aceite de coco, CAPDA, es más complejo que los anteriores a causa de las diferentes amidoaminas presentes, que provienen de la amidación de los diferentes ácidos grasos del aceite de coco; los picos se presentan a 13.0, 14.4, 15.7, 17.2, 18.4, 19.5, 20.2 y 20.7 ms.

El pico de DMAPA, situado a 10.6 ms, aparece en los tres plasmagramas, lo que indica que esta amina está presente en todos los productos. Otro aspecto a remarcar es que el plasmagrama de CAPDA muestra picos a 17.2 ms y 18.4 ms que coinciden con los de la MAPDA y picos a 19.5 ms y 20.7 ms que coinciden con los de la SAPDA.

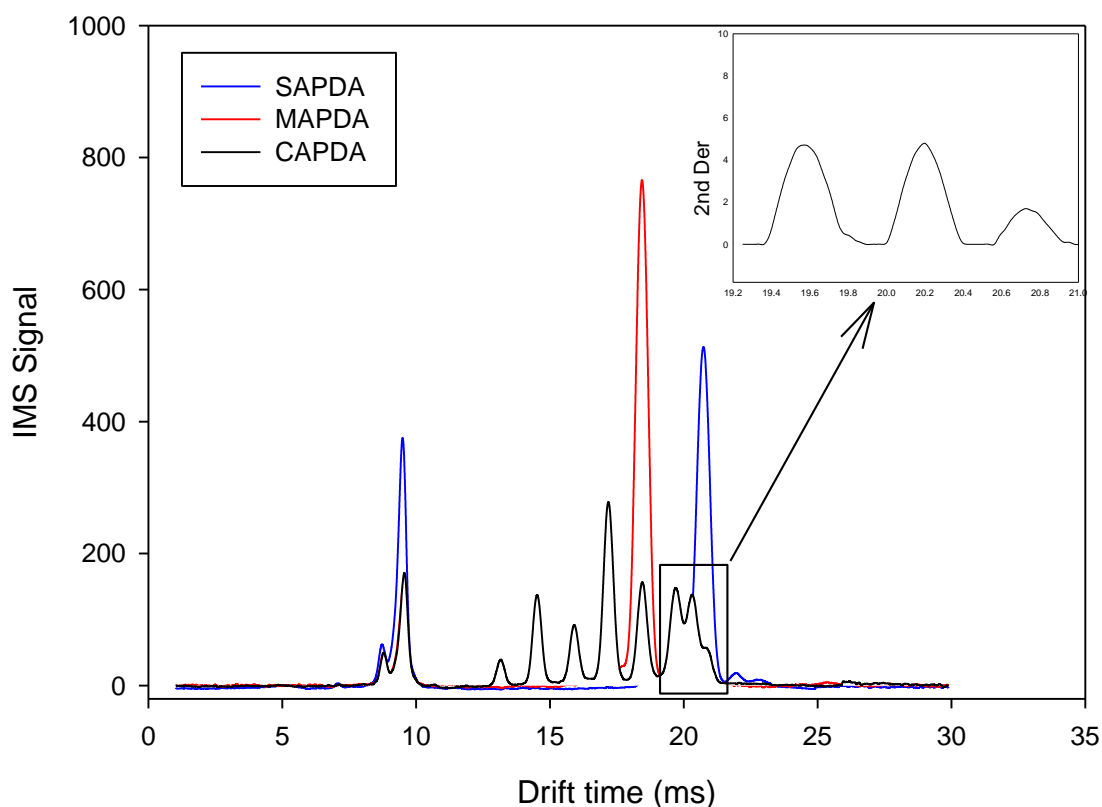


Figura 6.9 Plasmagramas superpuestos de soluciones de SAPDA, MAPDA y CAPDA. En el área ampliada se muestra el espectro en segunda derivada negativa truncada (TN2D) para el CAPDA. Los plasmagramas se han obtenido promediando los plasmagramas entre 1.20 y 4.20 segundos de tiempo de análisis.

6.4.1 Desarrollo del método de cuantificación

Con el objeto de establecer un método analítico que sea lo suficientemente sensible para la determinación de DMAPA en estos productos se ha estudiado la influencia de diferentes factores externos en la respuesta de esta amina. Los parámetros seleccionados por su influencia en la señal han sido la naturaleza del disolvente, el tiempo de secado, el volumen de inyección y la temperatura de desorber con el objeto de obtener las mejores condiciones de análisis de DMAPA en amidoaminas. El disolvente tiene un efecto importante en la sensibilidad y se han seleccionado dos solventes, acetona e isopropanol, por su capacidad solubilizante de la muestra y su bajo efecto sobre la volatilización e ionización del analito. El tiempo de secado o *post dispense delay*, el cual es el tiempo que transcurre una vez depositada la solución sobre el teflón hasta introducirse en el desorber donde se producirá la vaporización de la muestra, también afecta a la sensibilidad. Otro factor que afecta a la sensibilidad es

el volumen de inyección, con el objeto de no saturar al detector y a la vez obtener un bajo límite de detección. Por último se ha estudiado la temperatura del desorber, para la vaporización de la muestra depositada en la membrana de teflón, que permita una volatilización completa y reproducible del analito y tener menor fragmentación. Las temperaturas del tubo de deriva (232 °C) y del inlet (280 °C) se mantuvieron constantes. El modo de ionización positivo se ha utilizado en todas las medidas.

Se ha utilizado un diseño experimental de Plackett-Burman, de los cuatro factores seleccionados a dos niveles, lo que conduce a realizar 8 experimentos. Los niveles de los parámetros estudiados fueron -1 para acetona y +1 para isopropanol; -1 para 1s y +1 para 20 segundos de tiempo de secado; -1 para 1 µL y +1 para 8 µL para el volumen inyectado; y -1 para 145 °C y +1 para 180 °C para la temperatura del desorber. Para cada uno de los 8 experimentos se construyó una curva de calibrado con 5 patrones de DMAPA de concentraciones de 0.25 a 4 µg·mL⁻¹. Cada uno de los patrones se inyectó por triplicado y entre los patrones se realizó tres inyecciones de solvente. Un aumento de la sensibilidad se produce cuando se produce un aumento del volumen de inyección, respuesta esperable de este parámetro, el uso de acetona como solvente y un tiempo de secado corto. El parámetro de la temperatura del desorber es irrelevante.

Con objeto de refinar las condiciones de trabajo que proporcionan mayor sensibilidad, reevaluamos los factores de tiempo de secado y del volumen de inyección, utilizando acetona como disolvente. En este caso, se ha utilizado un diseño experimental factorial completo (2³) con dos factores (tiempo de secado y volumen de inyección) y tres niveles, y los resultados obtenidos son equivalentes a los anteriores, confirmando los efectos que producen el tiempo de secado y el volumen de inyección sobre la pendiente (sensibilidad) de la determinación.

Uno de los problemas que podríamos encontrar en la determinación de DMAPA en amidoaminas, es la presencia de una gran cantidad de amidoamina en la muestra que podría tener un efecto de limitar o retrasar la volatilización de la DMAPA. Esto llevaría a un error asociado en la determinación final, lo que se conoce como efecto matriz. Para evaluar este problema se comparan las pendientes de las rectas de calibración

construidas a partir de disoluciones/patrones de DMAPA y con disolución de SAPDA adicionando cantidades variables de DMAPA, adición estándar. En la Tabla 6.10 se presentan las rectas de calibrado y de adición estándar. A un nivel de significación del 95%, las dos pendientes de las curvas de calibración no difieren significativamente ($t_{exp}=0.87$, $t_{crit}=2.06$).

Tabla 6.10 Parámetros de mérito de las curvas de calibración para estándares externos y adición estándar.

	Cum A = a + b [DMAPA]	
	Estándares externos	Adición estándar
Coef. correlación (r)	0.997	0.9923
Ordenada origen (a)	49 ± 51	177 ± 16
Pendiente (b)	5389 ± 210	5192 ± 274

Tabla 6.11 Efecto de la temperatura del desorber en la señal de DMAPA y SAPDA (nueve inyecciones para cada temperatura).

Desorber temperature	145 °C		180 °C	
	DMAPA	Amida	DMAPA	Amida
Señal promedio	259	22164	449	19178
RSD (%)	13	1	3	2

También se ha estudiado la repetitividad de los valores de intensidad obtenidos en presencia de SAPDA a dos temperaturas de desorber diferentes, 145 y 180 °C. En la Tabla 6.11 se muestran los resultados de nueve inyecciones consecutivas de una solución de SAPDA en las dos temperaturas. Un aspecto importante es que la

desviación estándar relativa (RSD) es muy elevada a 145 °C, mientras que a 180 °C se obtiene un RSD < 5%, además de un mayor valor de la señal de DMAPA. De estos resultados se confirma de nuevo que no hay descomposición térmica de SAPDA y la DMAPA que se determina es el remanente procedente de la propia síntesis.

El método para la determinación cuantitativa en análisis de rutina de DMAPA en SAPDA mediante IMS fue validado según las guías de la *International Conference on Harmonisation (ICH)* [174] para productos farmacéuticos. Los parámetros de la validación del método IMS considerados son la especificidad, linealidad (incluyendo LOD (*Limit of Detection*) y LOQ (*Limit of Quantitation*)), exactitud, repetitividad y precisión, tal y como se muestran en la Tabla 6.12.

La especificidad se ha expresado como la constancia del tiempo de deriva de la DMAPA, y calculando la desviación estándar de los tiempos de deriva para 40 inyecciones en presencia y ausencia de SAPDA.

La linealidad ha sido evaluada por el análisis de estándares de DMAPA a 10 concentraciones entre 0.015 y 0.800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La curva de calibración se construyó utilizando los valores de la amplitud acumulada (CumA) respecto la concentración de cada uno de los patrones. El comportamiento lineal se obtiene en el intervalo 0.030 y 0.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.997. A concentraciones menores de 0.030 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y mayores de 0.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se observa una pérdida de linealidad de la curva de calibrado. A partir de la curva de calibrado se han calculado los valores del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ). El LOD y el LOQ se ha calculado como 3.3 y 10 veces la desviación estándar de la ordenada al origen dividida por la pendiente, respectivamente, obteniéndose 0.028 y 0.094 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

La exactitud ha sido evaluada como el porcentaje de recuperación obtenido, dopando una muestra de SAPDA con pequeñas cantidades de DMAPA. Se han preparado 5 disoluciones con concentraciones añadidas comprendidas entre 0.030 y 0.150 $\mu\text{g/ml}$

¹⁷⁴ International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidelines. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2010, Section Q2(R1).

de DMAPA y se han inyectado por triplicado cada una de ellas. El test *t* de datos apareados, indica que la recuperación de DMAPA no es significativamente diferente de 100% para un nivel de significación del 95%.

Tabla 6.12 Resultados de la validación del método IMS para la determinación de DMAPA en amidoaminas.

Parámetro	Componente	Resultado
Especificidad	Número medidas	40
	Promedio td (ms)	10.597
	S.D.	0.009
	td promedio con SAPDA (ms)	10.593
	S.D. con SAPDA	0.008
Linealidad	n	24
	Intervalo concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.030-0.500
	Ordenada origen	49 ± 51
	Pendiente	5389 ± 210
	R^2	0.997
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0.028
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0.094
Exactitud	n	5
	% promedio recuperación	103.7
	RSD %	2
	t_{exp}	2.41
	t_{crit}	2.77
Repetitividad	Replicados	6
	RSD %	2.57
Precisión intermedia	RSD %	4.8

La repetitividad ha sido determinada mediante el análisis de 6 replicados de una muestra de SAPDA. La precisión intermedia ha sido evaluada a partir de la disolución de una muestra de SAPDA y analizándola por triplicado por 2 analistas en 3 días diferentes. Mediante un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo se denota que no existen diferencias significativas en las precisiones obtenidas por los analistas o por el día.

6.4.2 Análisis cuantitativo de muestras de producción.

Para la determinación cuantitativa de DMAPA en muestras de SAPDA, MAPDA y CAPDA se utilizó la recta de calibrado construida con patrones externos de DMAPA. Se prepararon soluciones de aproximadamente $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de diferentes muestras de cada una de las amidoaminas y se inyectaron volúmenes entre 1-4 μL con la finalidad de interpolar el valor de área obtenido en las cercanías del centroide de la curva de calibración de la DMAPA. Se realizaron inyecciones por triplicado de cada uno de las soluciones preparadas.

Se obtuvieron unos valores comprendidos entre 27 y $86 \mu\text{g g}^{-1}$ para SAPDA, entre 4 y $14 \mu\text{g g}^{-1}$ para MAPDA y entre 12 y $30 \mu\text{g g}^{-1}$ para CODMAPA. Las concentraciones encontradas de DMAPA en todas las muestras son inferiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de DMAPA en el producto final que es el valor aceptado como límite por los fabricantes. Se ha aplicado también el método de la adición estándar y los resultados obtenidos no difieren significativamente (test t para datos apareados) de los obtenidos con el método de los patrones externos.

Las amidoaminas analizadas por el método IMS son productos de partida o intermedios para la obtención de fosfolípidos o aminas cuaternarias, ambos compuestos para la industria cosmética. Las aminas cuaternarias se obtienen por reacción de las amidoaminas con monoclorhidrina, las cuales se utilizan en la industria cosmética como ayudantes de lavado, antisépticos, agentes humectantes y/o emulsionantes. Los fosfolípidos son componentes esenciales en el cuerpo humano y un ingrediente natural para distintos productos de cuidado personal, que son totalmente compatibles con los lípidos naturales de las capas epidérmicas de la piel y cuyas características son como acondicionadores, agentes de limpieza suave, emulsionantes

y propiedades antimicrobiales. Los fosfolípidos también pueden ser usados para la fabricación de liposomas, que se suelen utilizar para transportar principios activos o productos cosméticos al interior de la célula. En muestras de productos de las diferentes etapas de producción de fosfolípidos no se ha detectado DMAPA. Para corroborar este hecho, se han añadido pequeñas trazas de DMAPA ($0.03-0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a soluciones de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada producto. Los porcentajes de recuperación, 96-104% son próximos al valor del 100%, hecho que confirma la idoneidad del método desarrollado.

6.4.3 Caracterización de las amidoaminas

Tal y como se puede observar en la Figura 6.9 la amidoamina del aceite de coco presenta diversas señales correspondientes a los diferentes ácidos grasos que lo contiene; de hecho el aceite de coco es un triglicérido que contiene ácidos grasos de cadenas C6 hasta C18, siendo el componente mayoritario el ácido láurico, C12. Los picos situados 19.6, 20.2 y 20.7 ms se encuentran parcialmente solapados, lo que indica una gran proximidad de las masas correspondientes a estas señales. Para ver mejor la existencia de estos tres picos, se ha ampliado en la Figura 6.9 la zona de los picos y aplicando la segunda derivada (TN2D), que está disponible en el software del instrumento, se pueden ver sin solapamiento, por lo que se consigue una mejor estimación de los tiempos de deriva y de la constante de movilidad iónica estándar.

Confirmar y establecer el origen de los diferentes picos correspondientes al aceite de coco, no se antoja fácil, por lo que se realizó un estudio que permitiese identificar las amidas de los diferentes ácidos grasos y establecer su composición aproximada. Los datos recopilados se han obtenido a partir del promedio de los plasmagramas obtenidos durante un tiempo de análisis de 50 segundos, debido a que los diferentes productos (amidoaminas) tienen un diferente tiempo de análisis a causa de su distinta volatilidad. El tiempo seleccionado es el suficiente para la desorción completa de todos los componentes de la muestra.

Para la asignación e identificación de los picos del plasmagrama sería necesario disponer de una base de datos o librería, de las sustancias de referencia o alguna herramienta que permita su identificación. En la bibliografía está reportado unas

descripciones de ecuación de linealización de las movilidades de compuestos orgánicos polares [175,176]. En estos artículos se han descrito ecuaciones empíricas lineales que relacionaban la inversa de la constante de movilidad estándar respecto al número de carbonos para series homologas de compuestos. Hariharan *et al.* propusieron dividir la ecuación de Mason-Schamp (ver apartado IMS-3.2.1) en dos partes, siendo la primera parte en la que se sitúa la carga, la cual es independiente de la masa o tamaño del compuesto y otra que corresponde a la cola del ión, la cual la longitud depende de la masa. La Figura 6.10 muestra las dos partes diferenciadas de una amidoamina, en la cual la parte de la masa dependiente será más larga o más corta en función de la longitud de cadena del ácido graso empleado.

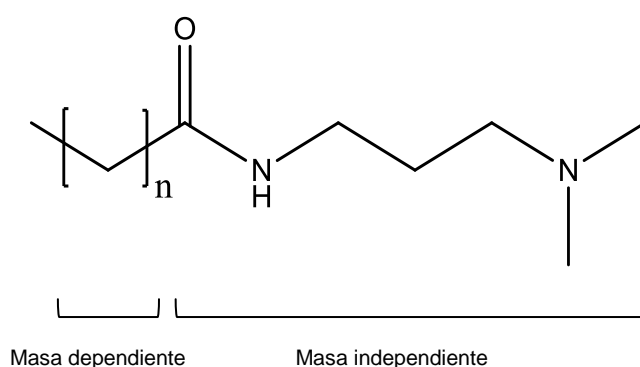


Figura 6.10 Fórmula general de una amidoamina.

Esta hipótesis formulada, explica la plausibilidad de la ecuación empírica:

$$\frac{1}{K_0} = \varepsilon N_C + \delta$$

Esta se corresponde con la ecuación experimental encontrada por nosotros, representando la inversa de la constante de movilidad reducida ($1/K_0$), respecto al número de grupos CH_2 presentes en la parte de la amidoamina de la masa dependiente (la que corresponde a la parte del ácido graso) (N_C), tal y como se puede ver en la Figura 6.11.

¹⁷⁵ Hariharan, C., Baumbach, J.I., Vautz, W. Empirical prediction of reduced ion mobilities of secondary alcohols. *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 12 (2009) 59-63.

¹⁷⁶ Hariharan, C.B., Baumbach, J.I., Vautz, W. Linearized equations for the reduced ion mobilities of polar aliphatic organic compounds. *Anal. Chem.* 82 (2010) 427-431.

$$\frac{1}{K_o} = 0.03623N_c + 0.598446 \quad (R^2=0.9992)$$

El número de átomo de carbono se ha asignado tomando como referencia los picos de los plasmagramas de las amidoaminas del ácido esteárico y del mirístico. Con esta asignación se puede establecer la identificación de cada uno de los picos correspondientes a cada ácido graso del aceite de coco.

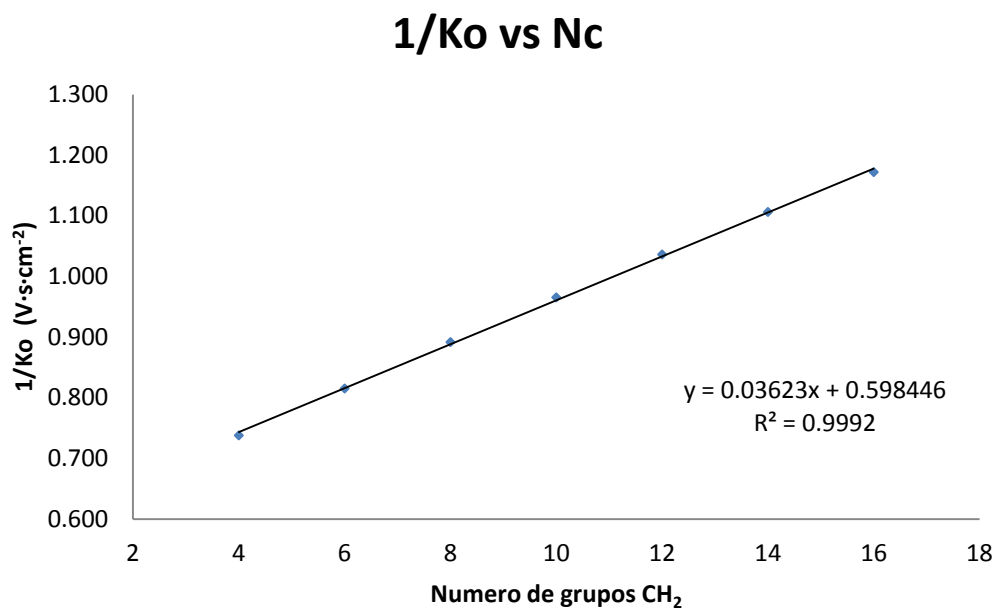


Figura 6.11 Inversa de la movilidad reducida frente el número de grupos CH₂ para los diferentes picos de los plasmagramas para las amidoaminas en el aceite de coco.

La ecuación experimental anteriormente encontrada, se ha utilizado para asignar exactamente los picos de cada ácido graso en cada amidoamina. En la Tabla 6.13 se muestran los resultados de la predicción del número de grupos CH₂ correspondientes a cada ácido graso perteneciente a las amidoaminas, así como la asignación a que ácido graso pertenece cada uno de los picos obtenido en los plasmagramas. Planteando la suposición que la respuesta del detector es debida solamente al número de iones que recibe (la cual es proporcional a la concentración del compuesto) e independiente de su masa, a partir de los valores de las amplitudes promedio de cada pico, se ha calculado la contribución de cada pico en el plasmagrama y por tanto el contenido aproximado de cada ácido graso en la composición del producto. Como se puede observar en la Tabla 6.13, las composiciones obtenidas son similares a los marcados en las especificaciones de los ácidos grasos o aceite de coco de partida.

Tabla 6.13 Caracterización de los componentes de los ácidos grasos en amidoaminas. Valores de $1/Ko$ frente al número de grupos CH_2 .

	Tiempo deriva (ms)	Ko ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	Número de CH_2, Nc	Inversa movilidad iónica		Número CH_2 predicho	Asignación ácido graso	Conc. Calculada %	Composición ^b (%)
				reducida (1/Ko) ($V s cm^{-2}$)	Predicho ^a				
MAPDA	17.134	1.032	10	0.969	0.961	10.2	C12	4.2	
	18.346	0.964	12	1.037	1.033	12.1	C14	95.8	> 92%
SAPDA	19.517	0.907	14	1.103	1.106	13.9	C16	3.6	
	20.717	0.854	16	1.171	1.178	15.8	C18	93.7	> 92%
	21.908	0.808	18	1.238	1.251	17.6	C20	2.7	
	13.050	1.355	4	0.738	0.743	3.9	C6	2.2	0.2 - 0.8
14.417	1.227	6	0.815	0.816	6.0	C8	12.7	4.6 - 10.0	
15.772	1.121	8	0.892	0.888	8.1	C10	7.3	5.0 - 10.0	
17.075	1.036	10	0.966	0.961	10.1	C12	37.5	44.0 - 53.2	
18.327	0.965	12	1.036	1.033	12.1	C14	16.2	16.0 - 21.0	
19.567	0.904	14	1.106	1.106	14.0	C16	10.5	7.5 - 11.0	
20.193	0.876		1.142		15.0	C18 insat.	10.0	6.0 - 14.0 (insat.)	
20.729	0.853	16	1.172	1.178	15.8	C18	3.6	2.0 - 4.0	

^a La ecuación experimental obtenida, $1/Ko = 0.03623Nc + 0.598446$ se ha utilizado para asignar exactamente los picos para cada ácido graso en las amidoaminas.

^b Distribución en productos industriales.

6.5 Mejora de la eficiencia de los análisis por IMS mediante el uso de técnicas multivariantes

Una de las más importantes limitaciones de la técnica IMS, la constituye la reducida resolución de la técnica que impide la identificación y/o determinación de sustancias de pesos moleculares similares, que generan picos con tiempos de deriva muy próximos, con la posibilidad de que estos picos estén solapados o parcialmente solapados. Es pues necesario mejorar la eficiencia de la técnica, en este tipo de situaciones, y por ello frecuentemente se suele acudir a diferentes herramientas quimiométricas, para poder resolver el solapamiento existente en el caso de sustancias con pesos moleculares muy próximos entre sí. Este problema se puede incrementar si además los analitos poseen potenciales de ionización semejantes, produciéndose interferencias mutuas en su determinación, puesto que la ionización de cada uno de ellos es afectada por la presencia del otro analito.

En este estudio se han trabajado con dos anticonceptivos, el Etinilestradiol (17 α -19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol, ETE) y el Desogestrel (13-ethyl-17-ethynyl-11-methylidene-1,2,3,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol, DES). Estos actúan como estrógeno y progestágeno, respectivamente en la formulación anticonceptiva, los cuales se presentan en baja concentración. El ETE es un estrógeno derivado del estradiol que es activo por vía oral y que se utiliza combinado con el DES como progestágeno, que reemplaza el levonorgestrel en los anticonceptivos orales. Las cantidades nominales de estos principios activos en la formulación de Microdiol son 30 μ g para el ETE y 150 μ g para el DES, por comprimido.

El trabajo que se presenta a continuación presentará los factores más importantes a desarrollar en la respuesta IMS de estos compuestos, para desarrollar un método adecuado para su aplicación en rutina en la determinación de estos anticonceptivos en comprimidos.

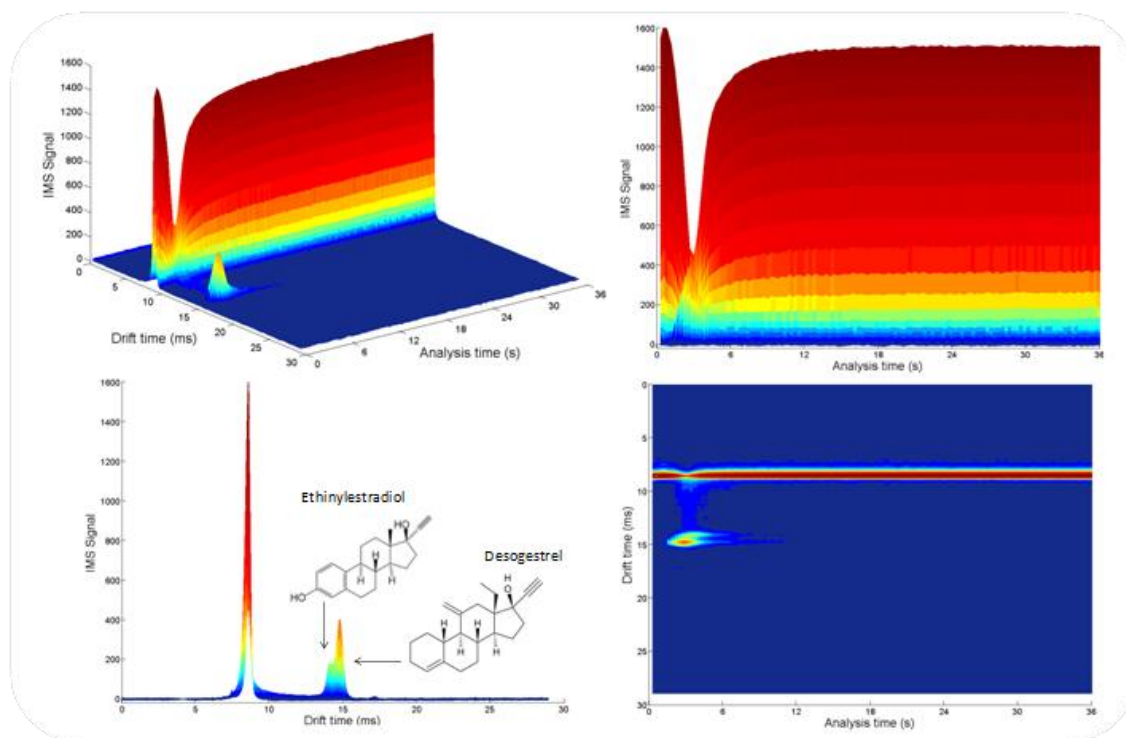


Figura 6.12 Plasmagrama IMS de una mezcla de ETE y DES en 3D en la parte superior izquierda. En la parte inferior izquierda se muestra la visualización de la señal IMS respecto el tiempo de deriva (ms). En la parte superior derecha se observa el mismo plasmagrama, representando la señal IMS frente el tiempo de análisis. En la parte inferior derecha se muestra la vista 2D del tiempo de deriva respecto el tiempo de análisis.

El plasmagrama de una solución que contiene los dos anticonceptivos, ETE y DES, se muestra en la Figura 6.12. El pico más intenso en el plasmagrama corresponde al calibrante interno, la nicotinamida ($K_o = 1.8600 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En la figura se puede apreciar la disminución de la señal que se experimenta al ionizarse los dos analitos. El ETE presenta una señal a un tiempo de deriva de 14.89 ms con una constante de movilidad reducida de $1.1862 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que el DES presente señal a un tiempo de deriva de 15.65 ms con una constante de movilidad reducida de $1.1291 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta distribución de los picos de los dos anticonceptivos está conforme con los pesos moleculares de los dos compuestos (296.4 y 310.5 g mol^{-1} , para ETE y DES respectivamente). Además se observa como ambos compuestos presentan picos que se encuentran parcialmente solapados, además de que cuando uno de los compuestos está en elevada concentración, respecto al otro, se observa un único pico. No se observan picos a tiempos de deriva menores en las condiciones de temperatura de desorber, inlet y tubo de deriva, lo que nos indica que no hay fragmentación de los mismos en el proceso de análisis.

6.5.1 Parámetros instrumentales que afectan la señal IMS

Desarrollar un método adecuado para la aplicación en rutina en la determinación de anticonceptivos en comprimidos mediante la espectrometría IMS, requiere del examen cuidadoso de la influencia de los factores externos en la respuesta IMS de estos compuestos. Los factores que se han seleccionado y hemos estudiado han sido la naturaleza del solvente, la temperatura del desorber y el volumen de inyección. La respuesta analítica utilizada para la evaluación de estos factores es la amplitud máxima, siendo esta la altura máxima de pico de todos los segmentos del plasmagrama donde el analito en cuestión es detectado.

Los resultados para patrones de ETE y DES en isopropanol y acetona mostraron que las sensibilidades no estaban afectadas por la naturaleza del solvente, por lo que se escogió el isopropanol como solvente debido a su menor volatilidad.

El estudio de la temperatura del desorber se llevó a cabo en el intervalo de 100 a 200 °C, con las temperaturas del inlet y del tubo de deriva fijadas a 220 y 232 °C. En la Figura 6.13 se muestran los resultados de las señales obtenidas para soluciones de los dos principios activos a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno, e inyectando $2 \mu\text{L}$ de solución en la membrana. La señal de ETE tiene el valor máximo a una temperatura de 160 °C, mientras que el DES a 120 °C. Para unificar una temperatura de trabajo, se seleccionó una temperatura intermedia a 140 °C.

El último efecto estudiado ha sido el del volumen de inyección. Para este propósito, este factor se ha examinado inyectando la misma cantidad absoluta de un analito ($2 \mu\text{L}$ de una solución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en diferentes volúmenes de solvente ($0 - 4 \mu\text{L}$), depositando un total de 2 ng de principio activo sobre la membrana de teflón. En la Figura 6.14 se observa como la señal de la amplitud máxima disminuye a medida que el volumen total depositado sobre la membrana de teflón (volumen solución + volumen disolvente) va aumentando. El efecto es similar en concentraciones mayores ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$, total principio activo depositado 8 ng). No hemos encontrado referenciado en la bibliografía este efecto para poder dar una explicación a este hecho experimental.

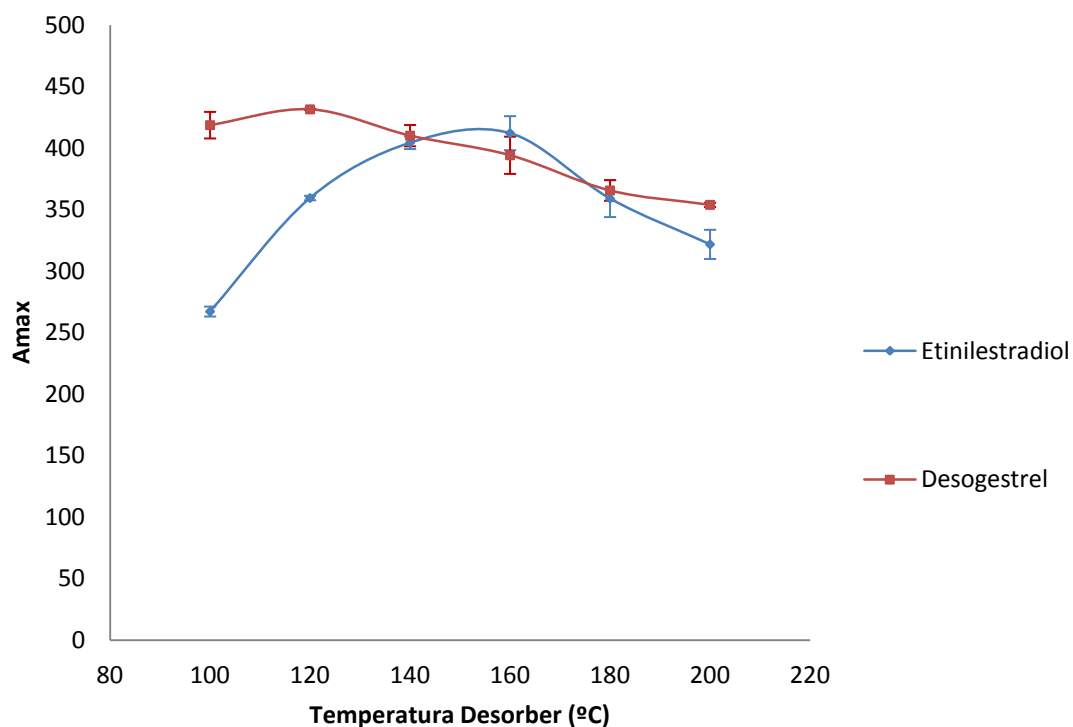


Figura 6.13 Efecto de la temperatura del desorber en la señal IMS de la amplitud máxima.

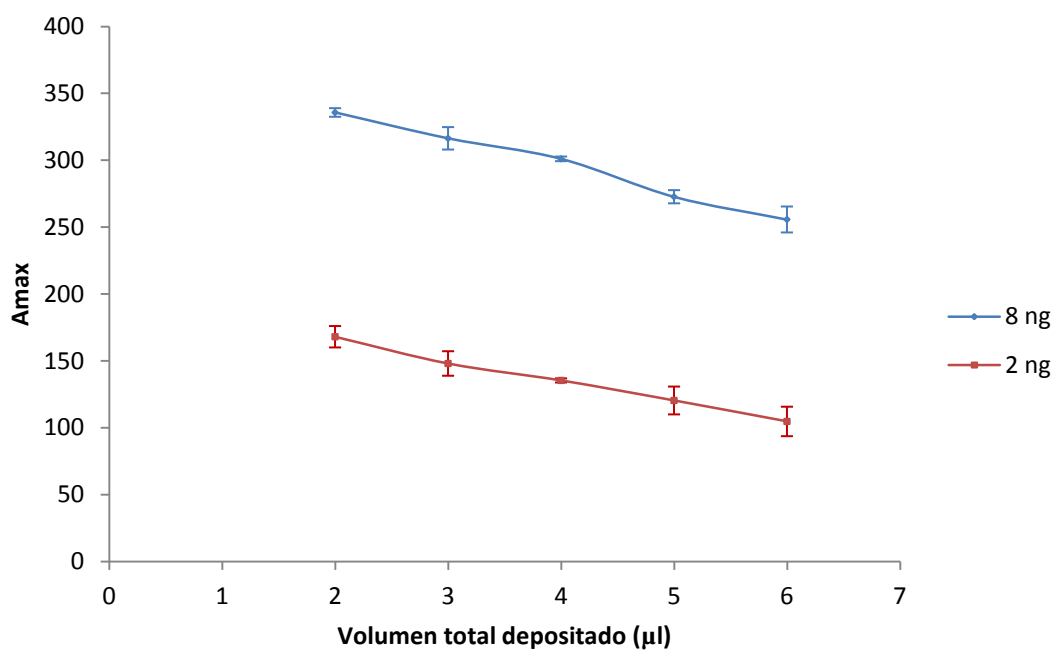


Figura 6.14 Efecto del volumen depositado en la señal IMS de la amplitud máxima.

En resumen, las condiciones adecuadas para el análisis por IMS fueron las siguientes: el solvente seleccionado fue el isopropanol, la temperatura del desorber heater se fijó en

140 °C y el volumen de inyección en 2 µL, con un tiempo de secado de 15 segundos, previo a la introducción de la membrana de teflón en el equipo.

6.5.2 Resolución de señales solapadas. Resultados cualitativos.

Tal y como se observaba en la Figura 6.12 las señales de ETE y DES aparecían parcialmente solapadas debido a la semejanza de los valores de sus masas moleculares (296.4 y 310.5 g mol⁻¹, respectivamente). Se han aplicado diversas estrategias mediante algoritmos matemáticos para intentar resolver este solapamiento.

En primera instancia, se ha utilizado el algoritmo de segunda derivada que dispone el software del equipo IMS. Mediante la aplicación de este algoritmo, se observa la diferenciación de los principios activos. La Figura 6.15 muestra la resolución de los picos utilizando el tratamiento TN2D y como se puede apreciar, se obtiene una separación de los dos picos.

Otro método que se ha empleado para la separación de picos, ha sido la deconvolución de la señal aplicando *Multivariate Curve Resolution* (MCR). El tratamiento MCR se aplicó a los datos de cada plasmagrama en los intervalos de 14 a 16.5 ms en el tiempo de deriva y de 0 a 36 segundos en el tiempo de desorción. El resultado del cálculo MCR da lugar a dos vectores, uno correspondiente a los perfiles espectrales y el otro correspondiente al perfil de desorción de las especies involucradas. Los tiempos de deriva de los perfiles espectrales obtenidos por MCR coinciden perfectamente con los plasmagramas individuales de los dos componentes de la mezcla, tal y como se puede apreciar en la Figura 6.15.

De este modo, se ha mostrado como el uso de estas dos herramientas permiten la resolución de los picos solapados y por consiguiente la identificación de cada uno de los componentes.

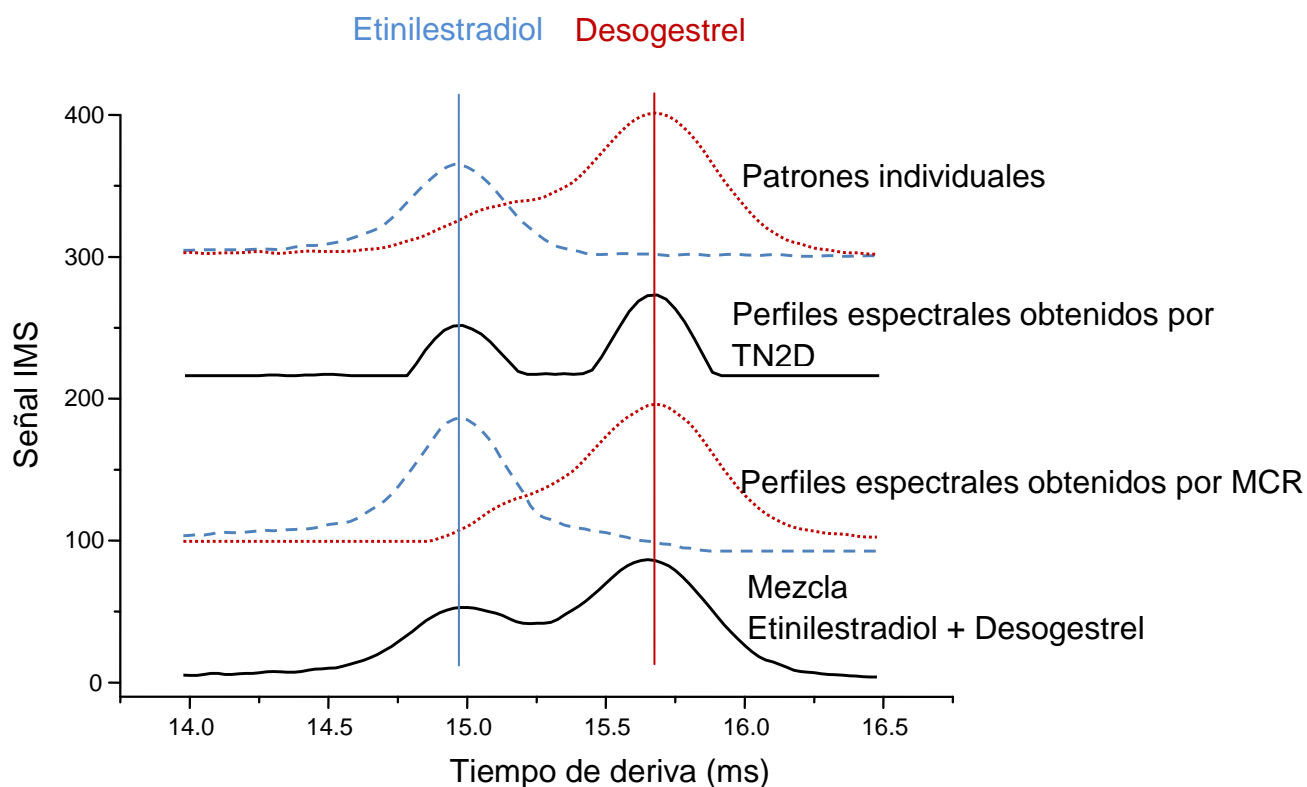


Figura 6.15 Plasmagrama promedio de una mezcla de ETE y DES, los perfiles espectrales obtenidos mediante la aplicación de TN2D y MCR y los perfiles espectrales de los patrones individuales.

6.5.3 Resultados cuantitativos

Tal y como se ha visto en el apartado anterior, se ha tenido que recurrir a tratamientos quimiométricos para resolver el solapamiento entre los picos de los principios activos, por lo que la cuantificación de estos productos no se antoja nada fácil. En una primera aproximación se prepararon rectas de calibrado para cada uno de los principios activos por separado, de concentraciones entre 1 hasta $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, inyectando $2 \mu\text{L}$. A cada uno de los plasmagramas obtenidos se le aplicó el algoritmo TN2D, construyendo la recta de calibrado con los valores de amplitud máxima (A_{max}), e interpolando los valores de A_{max} de los dos anticonceptivos en una mezcla binaria se obtuvieron valores por debajo de los esperados (entorno al 80% del valor de cada principio activo).

Del mismo modo, a las matrices 2D de los plasmagramas se les aplicó el algoritmo MCR con el mismo procedimiento que en el apartado anterior. Los valores de A_{max} obtenidos de los patrones individuales fueron utilizados para la construcción de las

rectas de calibrados. La interpolación de los valores de Amax de disoluciones de las pastillas, obtenidos posteriormente de la aplicación del algoritmo MCR, en las rectas de calibrado construidas también dieron valores de cuantificación de los principios activos por defecto. Este hecho sugirió la posibilidad de que las especies provocaban una disminución en la señal de la otra, y viceversa, obteniéndose una cuantificación errónea.

Para corroborar esta hipótesis, se prepararon patrones individuales de un anticonceptivo, conteniendo una cantidad en aumento del otro anticonceptivo: los patrones de ETE ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) contenían 0, 12, 15 y $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DES, y los patrones de DES ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) contenían 0, 1.5, 2, y $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ETE. La Figura 6.16 muestra los valores de Amax de ETE obtenido en ausencia de DES y con tres concentraciones distintas de DES. Los valores de Amax para ETE son mayores en ausencia del otro principio activo, y esta disminuye a medida que la concentración de DES aumenta. Este efecto también se observa en la Figura 6.17, la cual muestra los valores de Amax de DES obtenido en ausencia de ETE y con tres concentraciones distintas de ETE. La señal obtenida para cada analito depende de su concentración, y de la concentración en la que esté presente el otro analito. Una explicación plausible a este hecho puede ser debido al proceso de ionización en modo positivo, el cual está basado en la transferencia de un protón mediante un reactivo ionizante, la nicotinamida. En el proceso de ionización, hay un equilibrio competitivo en la transferencia de carga entre la nicotinamida y los analitos, el ETE y el DES; ambas especies compiten para ionizarse, por lo que dependiendo de la concentración en los cuales estos se presenten, la señal obtenida variará [177,178]. Por este motivo, no es viable la cuantificación de los principios activos a través de las curvas de calibrado univariante obtenida a partir de las señales de amplitud máxima de patrones individuales de cada principio activo.

¹⁷⁷ Eiceman, G.A., Garcia-Gonzalez, L., Wang, Y.F., Pittman, B. Ion Mobility Spectrometry as flow-injection detector and continuous flow monitor for aniline in hexane and water. *Talanta* 39(5) (1992) 459-467.

¹⁷⁸ Kunz, R.R., Dinatale, W.F., Becotte-Haigh, P. Comparison of detection selectivity in ion mobility spectrometry: proton-attachment versus electron exchange ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* 226 (2003) 279-395.

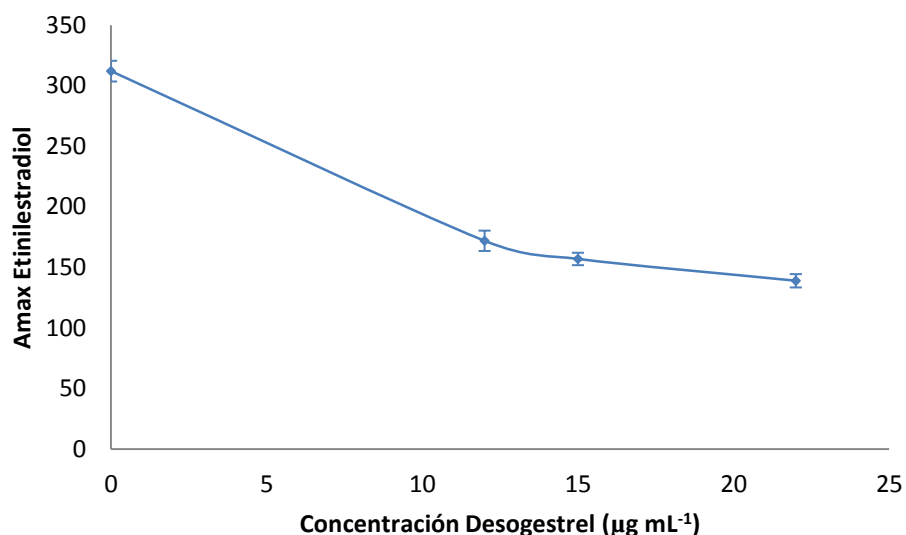


Figura 6.16 Señal de Etinilestradiol respecto la concentración de Desogestrel.

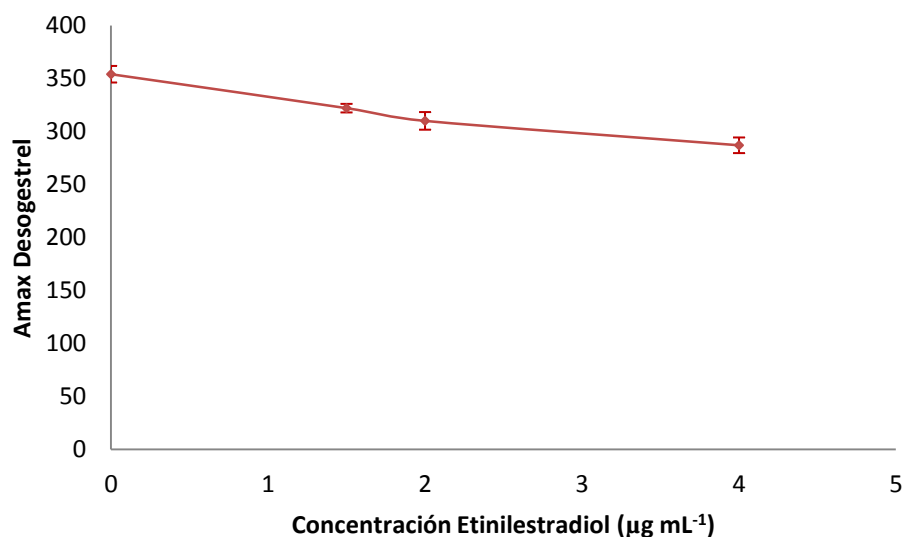


Figura 6.17 Señal de Desogestrel respecto la concentración de Etinilestradiol.

Para solucionar el problema de la competencia en la ionización de los analitos, se propuso la aplicación del algoritmo PLS para la construcción de modelos de calibración multivariados, utilizando disoluciones o mezclas de los dos principios activos, las cuales deben presentar una baja correlación entre concentraciones para la obtención de modelos más robustos. Se han preparado 21 muestras que contienen los dos principios activos en el intervalo de 1.5 - 4.5 µg mL⁻¹ para ETE y 8 - 22 µg mL⁻¹ para el DES, con un coeficiente de correlación entre las concentraciones de los principios

activos de 0.022. Las muestras fueron divididas en dos sets, el de calibración y el de validación, del mismo modo que se ha explicado en apartados anteriores.

El plasmagrama promedio para cada muestra se ha obtenido promediando el plasmagrama entre 1.50 y 11.10 segundos en el tiempo de desorción y escogiendo el intervalo de tiempo de deriva entre 14 y 16.5 ms. Los modelos de calibración PLS1 son muy simples, como se puede ver en la Tabla 6.13, con un solo factor PLS para cada anticonceptivo y sin pretratamiento espectral. Además, también se incluyen los parámetros de mérito de los modelos de calibración PLS, mostrando la capacidad predictiva de los modelos construidos.

El método IMS propuesto fue validado para la determinación de dos principios activos en comprimidos de Microdiol, de acuerdo con las guías ICH [174] para productos farmacéuticos, del mismo modo que se efectuó en el apartado 6.4.1. Los parámetros de validación utilizados fueron la especificidad, linealidad (incluyendo el límite de detección y cuantificación), exactitud y precisión, expresada como repetitividad. Los resultados se muestran en la Tabla 6.14.

La exactitud fue evaluada comparando los resultados del método IMS con el método de referencia HPLC del análisis de 10 comprimidos. Un test *t* de diferencias constató la ausencia de diferencias significativas entre los métodos con un nivel de significación del 95%.

Los parámetros evaluados cumplen exitosamente los requisitos establecidos, confirmando la calidad del método para el propósito determinado.

Tabla 6.13 Parámetros de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación de Etinilestradiol y Desogestrel.

Parámetro	Etinilestradiol	Desogestrel
Intervalo concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.5 – 4.5	8.0 – 22.0
Calibracion		
Nº de muestras	11	12
Varianza explicada (%)	98.41	98.82
RSEC (%)	4.23	3.06
RMSEC	0.13	0.46
Coef. Correl. (r)	0.992	0.994
Ordenada al origen	0.0 ± 0.3	0 ± 1
Pendiente	0.98 ± 0.09	0.99 ± 0.07
Validacion		
Nº de muestras	6	5
RSEP (%)	11.63	4.20
RMSEP	0.34	0.63
Coef. Correl. (r)	0.954	0.988
Ordenada al origen	0 ± 1	1 ± 2
Pendiente	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.3

Tabla 6.14 Resultados de la validación del método IMS para la determinación de ETE y DES en comprimidos.

Parámetro	Componente	Resultado	
		Etinilestradiol	Desogestrel
	Número de medidas	30	30
Especificidad	Promedio td (ms)	14.89	15.65
	S.D.	0.015	0.011
	n	11	12
	Intervalo concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.5 - 4.5	8.0 - 22.0
Linealidad	Ordenada al origen	0.0 ± 0.3	0 ± 1
	Pendiente	0.98 ± 0.09	0.98 ± 0.07
	R^2	0.982	0.987
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0.38	1.7
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		1.11	5.15
	n	10	10
	Diferencia promedio (μg)	0.46	0.70
Exactitud	S.D.	1.17	3.95
	t_{exp}	1.24	0.56
	t_{crit}	2.26	2.26
Repetitividad	Replicados	6	6
	RSD %	1.32	0.56

6.5.4 Uniformidad de contenido

El método IMS propuesto ha permitido la determinación de la concentración de los dos principios activos (μg por comprimido) simultáneamente en comprimidos individuales. Dos lotes de producción con contenido nominal de 30 y 150 μg , de ETE y DES, respectivamente fueron seleccionados. De cada uno de los lotes se seleccionaron 10 comprimidos y fueron analizados por los dos métodos, el método IMS propuesto y el método de referencia HPLC. Un test t de residuales de la concentración de los dos principios activos confirmó que las concentraciones obtenidas por los dos métodos no son significativamente diferentes a un nivel de significación del 95% ($n=10$, $t_{\text{exp}}=1.24$, $t_{\text{crit}}=2.26$ para ETE; $n=10$, $t_{\text{exp}}=0.56$, $t_{\text{crit}}=2.26$ para DES).

El cumplimiento del test de uniformidad de contenido se debe establecer calculando el valor de aceptación (*Acceptance Value, AV*), tal y como aparece en la *European Pharmacopoeia* [179]:

$$AV = |M - \bar{X}| + ks$$

donde M es el valor de referencia que depende del valor de \bar{X} :

M es 98.5% si $\bar{X} < 98.5\%$

M es \bar{X} si \bar{X} está entre 98.5% y 101.5%

M es 101.5% si $\bar{X} > 101.5\%$

Los otros términos de la ecuación son: \bar{X} el cual es el promedio de los contenidos individuales; k es la constante de aceptabilidad (un factor de tolerancia de 2.4 con $n = 10$ y 2.0 con $n = 30$); n es el número de muestras; y s es la desviación estándar. El límite para el valor de AV debería ser inferior a un valor de 15. La Tabla 6.15 muestra el contenido promedio en los comprimidos analizados por IMS, obteniéndose unos valores de AV menores que el límite indicado por la *European Pharmacopoeia* para los dos lotes analizados.

¹⁷⁹ Uniformity of Content, General Chapter 2.9.6. Ph. Eur., seventh ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2011.

Tabla 6.15 Uniformidad de contenido en comprimidos de Microdiol analizados mediante el método IMS.

Lote	Compuesto	Contenido API nominal por comprimido (μg por comprimido)	Contenido API promedio para 10 comprimidos^a	R.S.D. (%)	AV
A	Etinilestradiol	30	29.08	2.3	2.50
	Desogestrel	150	155.47	2.2	13.70
B	Etinilestradiol	30	30.25	4.5	4.21
	Desogestrel	150	156.63	2.4	14.44

^a Contenido API por IMS (μg por comprimido)

Estos resultados confirman que el método propuesto es una alternativa al método existente de referencia HPLC para la determinación del contenido de los dos principios activos en el producto comercial Microdiol. La principal ventaja del método IMS es la rapidez de análisis, ya que el análisis de un comprimido toma un tiempo de 40 segundos frente a los 15 minutos del método HPLC, utilizando el mismo tiempo para la preparación de la muestra. Asimismo, el método evita el uso de cantidades de solvente y por tanto generación de residuos.

CONCLUSIONES

Se han desarrollado nuevas estrategias para el desarrollo de métodos de análisis en la industria a través de la aplicación de la Espectroscopia NIR, Espectrometría IMS y de herramientas quimiométricas multivariadas. Las principales conclusiones derivadas del trabajo de investigación presentado en esta memoria se resumen a continuación:

i) La espectroscopia NIR ha demostrado ser una técnica muy apropiada para la determinación de diferentes especies y aplicable tanto durante el proceso de fabricación del producto como sobre el producto acabado. La información espectral se puede utilizar para la determinación de todas las especies implicadas utilizando un único espectro (determinación multiparamétrica) utilizando modelos de regresión multivariable por mínimos cuadrados (PLS):

- Se ha utilizado la espectroscopia NIR en la monitorización *in-line* de un proceso de esterificación enzimática en presencia de una lipasa de *Candida Antartica* como catalizador. La reacción enzimática lleva a la obtención de diestearato y monoestearato de glicerina mayoritariamente sin la formación del triestearato. El rendimiento global y la selectividad son mayores que otros catalizadores propuestos en la bibliografía. Las ventajas más significativas son: obtención rápida de información multiparamétrica, reducción de tiempos muertos de producción, eliminación de personal especializado para realizar el análisis, eliminación de la etapa de preparación de muestras, lo que implica un ahorro importante en costes de personal, de reactivos y mejora medioambiental al eliminar el uso de reactivos tóxicos y/o disolventes. Basados en los resultados, la espectroscopia NIR con una sonda de inmersión de fibra óptica proporciona un método efectivo para la monitorización *in-line* de la reacción de esterificación enzimática.

- Se ha establecido un nuevo método para la determinación simultáneamente de la composición de una mezcla adyuvante para un herbicida para el que no había un método analítico disponible. La aplicación de un diseño experimental para la preparación de muestras, que permite disminuir las correlaciones de

concentraciones entre los componentes, conduce a modelos con mejor capacidad predictiva.

- Se ha establecido un nuevo método para la determinación de parámetros físicos como la viscosidad y la composición de mezclas lubricantes. Se ha demostrado la capacidad de la espectroscopia NIR en la determinación de analitos minoritarios (aprox. 0.05 – 0.7%) que se añaden a las formulaciones lubricantes y que previamente se ha identificado su presencia o ausencia.

ii) La construcción de bibliotecas espectrales NIR permite la identificación de formulaciones lubricantes con un espectro muy similar:

- El método propuesto de la construcción de bibliotecas en cascada o sub-bibliotecas, permite la especificidad necesaria para la discriminación entre productos que la biblioteca general identifica ambiguamente, utilizando una discriminación más elevada.

- La construcción de estas sub-bibliotecas, permite la identificación de la presencia o ausencia de los aditivos añadidos a las formulaciones lubricantes y que están presentes en un porcentaje relativamente pequeño (aprox. 0.05-0.7%).

iii) En la presente tesis, se ha empezado a desarrollar métodos analíticos utilizando la espectrometría de movilidad iónica IMS, una técnica analítica nueva y que está en pleno auge, la cual hasta el momento, está poco explorada en la industria química y farmacéutica. Estos aspectos y las características tales como la alta sensibilidad, rapidez, bajo coste, robustez y portabilidad, la hacen interesante para continuar la línea de investigación iniciada en esta tesis en busca de nuevos proyectos.

iv) La espectrometría de movilidad iónica (IMS) permite la determinación de diversos analitos, posibilitando el poder ser utilizado para la monitorización de diferentes procesos así como el control de calidad de producto acabado:

- La simplicidad y facilidad con la que los análisis pueden ser realizados, permiten a la técnica IMS ser una opción adecuada para su implantación como

técnica de análisis de rutina, con la ventaja de la poca cantidad utilizada de solvente y la poca generación de residuos.

- Se han estudiado la influencia de factores externos en la respuesta del IMS para diversos analitos, a través de un diseño experimental, lo que permite una optimización del método de cuantificación. Los factores optimizados son el solvente utilizado, el volumen de inyección, el tiempo de secado y la temperatura del desorber.

- Se han desarrollado y validado dos métodos analíticos basados en la técnica IMS para: 1) determinación de amina residual en procesos de fabricación de amidoaminas y fosfolípidos. 2) determinación de dos principios activos en un preparado farmacéutico.

- Se ha conseguido una caracterización rápida de cada amidoamina y del origen del aceite o ácido graso utilizado en la síntesis de estos intermedios cosméticos, a través de la representación empírica de la inversa de la movilidad iónica reducida, $1/K_o$, frente al número de carbonos de la cadena carbonada de cada amidoamina. Además, se ha calculado la proporción aproximada de cada una de las amidoaminas en cada producto, las cuales no difieren de las especificaciones de los ácidos grasos y aceites utilizados en la síntesis.

- En el estudio de la determinación simultánea de dos principios activos, hemos resuelto el solapamiento existente entre los dos analitos, mediante la utilización de diversos métodos quimiométricos. Estos tratamientos permiten mejorar la eficiencia en la identificación y determinación simultánea de los dos anticonceptivos. Cualitativamente, estas dos señales solapadas han podido ser separadas y correctamente identificadas mediante la aplicación de los algoritmos *Truncated Negative Second Derivative* (TN2D) y la resolución multivariante de curvas (MCR).

- Se han superado los problemas de interferencia mutua por ionización entre los dos analitos para su correcta cuantificación. La aplicación de modelos de

regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) permite la correcta cuantificación de ambos principios activos simultáneamente.

Las metodologías desarrolladas en esta memoria han aportado soluciones rápidas y simples a situaciones reales de la industria química y se utilizan satisfactoriamente como herramienta para el control de calidad rutinario y control de procesos.

ARTÍCULOS

Este capítulo recoge los artículos publicados aceptados por la *Comissió d'Estudis de Postgrau* para la presentación de la tesis como compendio de publicaciones:

I) Study of the lipase-catalyzed esterification of stearic acid by glycerol using in-line near-infrared spectroscopy.

II) Analytical control of adjuvants in herbicide formulations by NIR spectroscopy.

III) Determination of trace impurities in cosmetic intermediates by ion mobility spectrometry.

Study of the lipase-catalyzed
esterification of stearic acid by
glycerol using in-line near-infrared
spectroscopy.

Industrial and Engineering Chemistry
Research

48 (2009) 6957-6960.

Study of the Lipase-Catalyzed Esterification of Stearic Acid by Glycerol Using In-Line Near-Infrared Spectroscopy

Marcelo Blanco* and David Zamora

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Miquel Mir and Ruffi Mulero

Development and Quality Assurance Department, CRODA S.A. (Mevisa Site), Ctra Hostalric and Tossa km 1.8, 08495 Fogars de la Selva, Barcelona, Spain

The potential of near-infrared (NIR) spectroscopy for monitoring the esterification of stearic acid by glycerol in a laboratory reactor was assessed. The reaction was conducted in the presence of a heterogeneous catalyst that consisted of lipase from *Candida antarctica* immobilized on a macroporous resin (Novozyme 435). The reaction leads to a mixture of monostearate and especially distearate; no formation of tristearate occurs. The process was monitored using a fiber-optic probe to record NIR spectra for the reaction mixture at variable times. The spectra thus obtained were used to construct and validate PLS calibration models for predicting the glycerin, stearic acid, and glycerol monostearate and distearate concentrations. The ensuing method allows concentration changes in the four compounds to be monitored in real time.

1. Introduction

The production of esters from long-chain organic acids by reaction with glycerin is industrially important, because of the emulsifying properties of the esters, which are widely used as raw materials by the pharmaceutical, cosmetics, and food industries. For example, monoglycerides are typically used as emulsifiers and stabilizers (E471). Esterification products usually consist of mixtures of monoglycerides, diglycerides, and triglycerides, and they are industrially obtained via the transesterification of triglycerides or the direct esterification of fatty acids with glycerol.

The direct esterification of stearic acid by glycerin requires the presence of sulfuric acid or the widely used *p*-toluene sulfonic acid as catalyst and a temperature of 230–240 °C. The process is also catalyzed by heterogeneous catalyzers as zeolites,¹ ion-exchange resins,² and acid and basic oxides.³ Rather than a specific product, these catalysts provide a mixture of monostearates, distearates, and tristearates in variable proportions, depending on those of the reactants (usually, a large excess of glycerin or stearic acid is used, depending on the particular target product). Obtaining pure esters is difficult, so the product mixture must be separated into its components, using appropriate molecular distillers, which makes the production process slow and expensive. This had led to the widespread use of mixtures of the three esters in variable proportions.

Glycerol stearates, which are pharmaceutically important, are, in fact, mixtures of glycerides in definite proportions. Thus, European Pharmacopoeia 5.0 uses the term “Glycerol monostearate 40–55” to designate a mixture containing 40.0%–55.0% monostearates, 30.0%–45.0% distearates, and 5.0%–15.0% tristearates; and it uses the term “Glycerol distearate” for a mixture of 8.0%–22.0% monostearates, 40.0%–60.0% distearates, and 25.0%–35.0% tristearates.⁴

One effective nonclassical method for obtaining esters involves the use of hydrolytic enzymes such as lipases.^{5–7} These

catalysts are more specific toward some products, afford milder reaction conditions (e.g., lower temperatures), hinder some side reactions, and can be easily recovered by filtering. Lipases (acylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) are hydrolase enzymes acting on carboxylic ester bonds. Some afford the synthesis of esters in organic solvents.^{8,9}

In this work, we studied the esterification of stearic acid by glycerin in the presence of lipase from *Candida antarctica* as a catalyst. The process was monitored by inserting a near-infrared (NIR) probe in the reaction mixture with a view to developing accurate models for other processes.^{10–13} The reactions were conducted with variable proportions of glycerin and stearic acid ranging from equimolar ratios to a slight excess in either reactant. The ultimate objective was to apply the models for monitoring industrial processes via changes in the reaction components and stopping them at the precise time needed to obtain a given product or yield.

2. Experimental Section

2.1. Enzymatic Esterification Reaction. We studied the esterification of stearic acid (Croda, 94% pure) with glycerin (Croda, 99.9% pure) in the presence of an enzyme catalyst that consisted of lipase from *Candida antarctica* (viz. Novozyme 435, 10 000 LU/g) immobilized on Lewattit macroporous resin with a particle size of 500 μm. Lipase is a thermally stable acylglycerol hydrolase (EC 3.1.1.3) that exhibits no stereoselectivity in the esterification reaction.

The reaction was conducted at 70 or 75 °C, using equimolar proportions of the reactants or a slight excess of either. Water formed during the reaction, and any that was contained in the reactants was removed by distillation at a low pressure; the pressure inside the reactor was maintained at 40–60 mm Hg. Aliquots of the reaction mixture were withdrawn for chromatographic analysis at intervals of 15 or 30 min to construct the calibration models.

2.2. Hardware. Esterification runs were conducted in a LabMax laboratory reactor from Mettler–Toledo (see Figure

* To whom correspondence should be addressed. Tel & Fax: 0034 935811367. E-mail: Marcel.Blanco@uab.es.

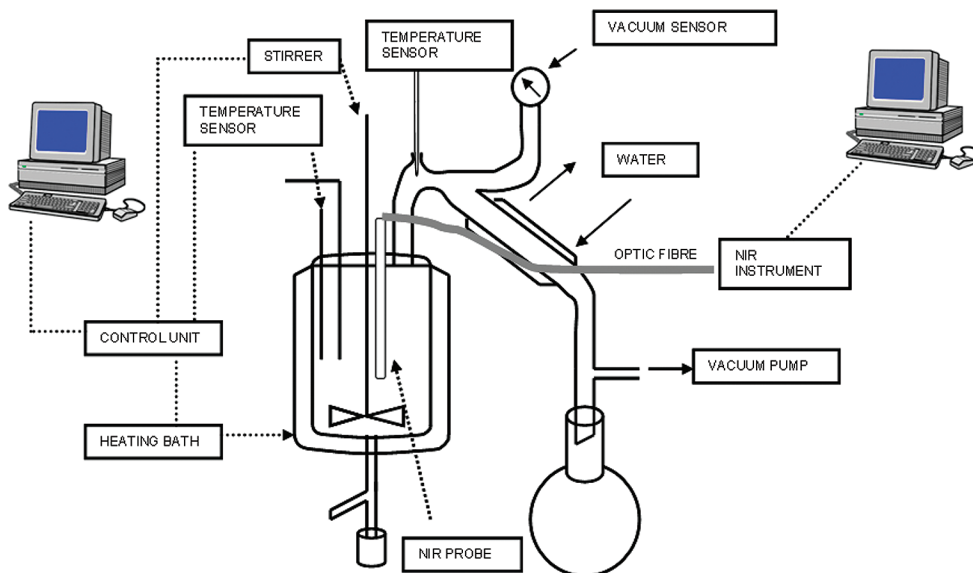


Figure 1. Schematic drawing of the LabMax laboratory-scale reactor.

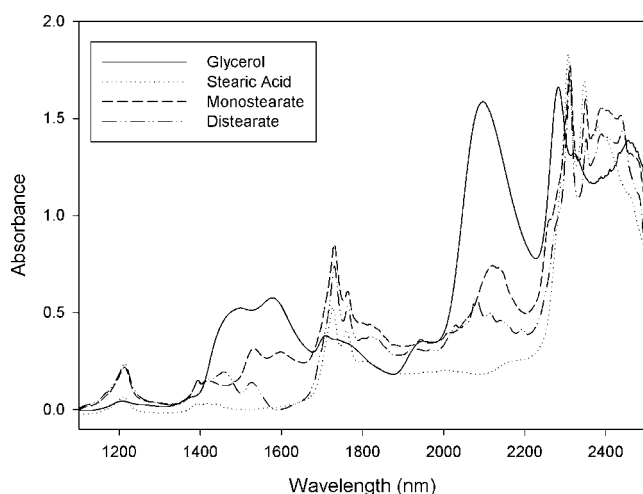


Figure 2. NIR spectra for reagents and reaction products.

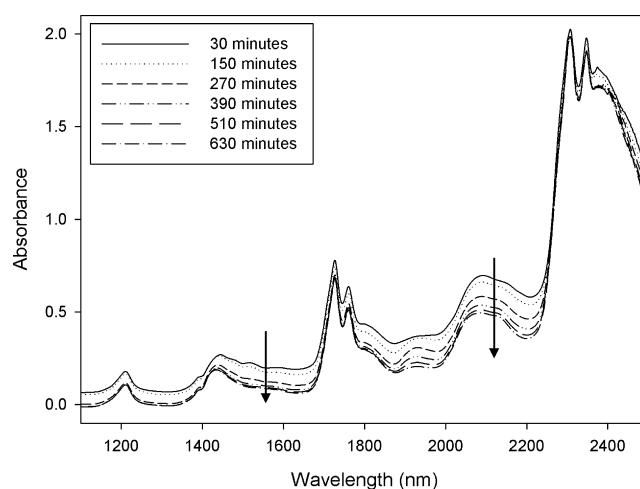


Figure 3. NIR reaction spectra. The arrowheads indicate the temporal evolution of the spectra.

1), which was controlled using Camile TG 3.0e software (Sagian, Inc.). The reactor had a capacity/volume of 1 L and was furnished with a temperature probe, an inert gas (nitrogen) inlet, and a peristaltic pump that was intended to facilitate the delivery of reactants if needed. The software controlled the temperature of the reactor and its jacket, the stirring speed, and the reactant addition rate. A fiber-optic NIR probe was also used to record NIR spectra for the reaction mixture.

2.3. Recording of NIR Spectra. NIR spectra were recorded with a FOSS NIRSystems 5000 instrument that was equipped with a fiber-optic probe (Optiprobe Analyzer) for transmittance measurements of the reaction mixture. The spectrometer was governed via the software Vision v. 2.51. During the reaction, a spectrum was recorded every 3 min at intervals of 2 nm over a wavelength range of 1100–2498 nm, using a path length of ca. 2 mm.

2.4. Determination of Reference Concentrations. The fatty acid content of the product mixture was determined by acid–base titration with 0.1 M KOH in ethanol. Samples were withdrawn from the reaction mixture, dissolved in a 1:1 isopropanol/xylene mixture, and titrated with the alkali in the presence of phenolphthalein as an end-point indicator.

All other components were determined by gel chromatography on an Agilent Series 1100 liquid chromatograph that was equipped with an Agilent Series 1100 refractive index detector and a PLGel column with dimensions of 300 mm (length) \times 7.5 mm (inner diameter (id)) (particle size = 5 μ m, pore diameter = 50 \AA , MW < 1000) from Agilent Technologies.

Samples were dissolved in tetrahydrofuran (ca. 1% w/v) and injected into a mobile phase of the same solvent flowing at 1 mL/min. The column was thermostatted at 25 $^{\circ}$ C. The analytes were quantified by interpolating the areas under their peaks in calibration curves obtained from pure standards of glycerin, stearic acid, and glycerol monostearate, distearate, and tristearate.

2.5. Processing of Spectral Data. Spectral treatments were applied and calibration models were constructed using the software Unscrambler 9.2 (Camo Process, Trondheim, Norway). The treatments included the first and second derivative (which were obtained by applying the Savitzky–Golay algorithm, adjusting a second-order polynomial and a 11-point moving window), and spectral smoothing with a five-point window.

Calibration models were developed using the PLS algorithm included in Unscrambler software. All models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The best

among them were identified from their relative standard error (RSE):

$$\text{RSE}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{NIR}_i - \text{Ref}_i)^2}{\sum_{i=1}^n \text{Ref}_i^2}} \times 100$$

where the terms “NIR” and “Ref” denote the predicted value and reference value, respectively. The relative standard error is designated as RSEC (%) for calibration and RSEP (%) for prediction.

The model that was finally adopted was that which led to the smallest possible RSE value for a set of samples not previously used to construct it (viz, the validation set).

3. Results and Discussion

Initially, the reaction mixture consists of two immiscible phases, namely, a top layer of stearic acid and a bottom layer of glycerin. As the reaction develops, a single, turbid phase forms that eventually becomes homogeneous. Therefore, the initial samples withdrawn for analyses are turbid and their spectra are poorly reproducible and, hence, unsuitable for constructing accurate calibration models. After the turbidity disappears and a homogeneous phase forms, the spectra are reproducible enough for this purpose.

Figure 2 shows the NIR spectra for glycerin, stearic acid, glycerol monostearate, and glycerol distearate. Their main absorption bands are in the regions of 1400–1600 nm and 2000–2200 nm, and they correspond to the first overtone and combination bands, respectively, for glycerin. These bands are also present, but weaker, in the spectra for the two esters. Other major bands are also observed in the 1650–1800 nm range (the first overtone of the C–H bond) and 2300–2400 nm region (combination bands for the C–H bond).

Figure 3 shows selected NIR spectra obtained during the course of one reaction. The arrows indicate temporal changes in the spectra. The most substantial changes occur in the regions of 1400–1650 nm and 2000–2200 nm, and these are due to the disappearance of OH groups from glycerin. However, no significant change in the 1650–1800 nm range that is attributable to the effect of changes in C–H bonds in stearic acid or its esters is observed. The slight shifts in the bands (particularly at the shorter wavelengths) is due to scattering by small disperse glycerin drops in the bulk of the molten mass of stearic acid, which disappear as the mixture loses turbidity.

No change in the water absorption bands is observed because water is always present in low proportions, as an effect of it being distilled at the low reactor pressure used; also, water absorption is overlapped with OH absorption in glycerin.

Table 1 shows the operating conditions used in several esterification runs involving variable reactant proportions and

temperatures (all below 75 °C, however, because, according to the enzyme usage instructions, a higher temperature may cause its denaturalization). Samples were withdrawn for analysis at 15-min intervals.

Moreover, Table 1 shows the results, obtained by gel permeation chromatography, of the samples analyzed at the end of each process,

In a comparative study between the results obtained with catalyst Novozyme 435 and other heterogeneous catalysts found in the bibliography as zeolites, ion-exchange resins, and acid and basic oxides, we can conclude the following:

(1) The enzymatic catalyst Novozyme 435 is more effective than the indicated catalyst, because of a high conversion in the reaction: more yield is obtained with Novozyme 435, and it works at lower temperature and in stoichiometric proportions of the reactants.

(2) The selectivity of Novozyme 435 is higher than the catalysts cited previously, because the formation of the distearate prevailed over the monostearate (independent of the molar ratio of reactants and the temperature) and no glycerol tristearate was formed in any run. However, the enzyme is not selective to any particular ester.

The reusability of Novozyme 435 has not been studied in this work, because the objective of this study was to obtain a global knowledge of the reaction.

3.1. PLS Calibration Models. To facilitate the in-line monitoring of the process and changes in all species involved other than water, we constructed PLS models from the concentration data obtained by gel permeation chromatographic analysis of the withdrawn samples and the NIR spectra recorded at their time of withdrawal. The samples used to this end were obtained from processes 1, 2, 3, and 5. The models were developed by splitting the samples from these four processes into two different sets, namely, (i) a calibration set that was used to construct the model and (ii) a validation set that contained samples that were not present in it but were used to assess predictive ability.

Calibration models for each reaction component were obtained using various spectral treatments that included the first and second spectral derivatives and smoothing. Table 2 shows the characteristics of the best performing models and their associated RSEC and RSEP values. All models were constructed from four PLS factors.

3.2. Prediction of a Process. The best model for each process was used to monitor changes in the other models via their spectra. Figure 4 shows the quantification results for the four components, as measured at 3-min intervals (solid line), together with their respective concentrations, as determined with the reference method.

Initially, the predicted concentrations of glycerol monostearate and distearate departed markedly from the values obtained by gel chromatography. This can be ascribed to the reaction mixture initially consisting of two phases and either the withdrawn

Table 1. Experimental Data for the Process Conducted in the LabMax Reactor with Sample Composition at the Final Sample

process	temperature (° C)	molar ratio (glycerin/acid)	time ^a (min)	Composition (%)			
				glycerol	acid	monostearate	distearate
1	75	1.00	330	8.52	3.14	35.09	54.04
2	75	0.67	315	1.55	2.08	28.82	67.56
3	75	2.00	486	24.45	1.60	28.73	45.22
4	75	1.00	480	9.08	2.80	29.14	54.08
5	70	1.00	471	8.51	1.48	35.37	53.60
6	70	1.00	510	9.99	3.19	32.89	53.92

^a The time expressed in the table shows the time that the reaction is stopped.

Table 2. PLS1 Models for Glycerin, Stearic Acid, Glycerol, Monostearate, and Distearate

analyte	spectral treatment	explained variance of four factors (%)	wavelength range (nm)	Sample		Relative Standard Error	
				calculated	predicted	calibration, RSEC	validation, RSEP
glycerol	2nd derivative	99.29	1100–2500	17	7	5.4	4.4
acid	2nd derivative	99.92	1100–2200	17	7	2.1	6.7
monostearate	1st derivative	99.13	1100–2200	18	7	2.3	3.3
distearate	1st derivative	98.81	1100–2200	16	7	2.6	3.2

^a Four PLS factors are used in the model for every analyte.

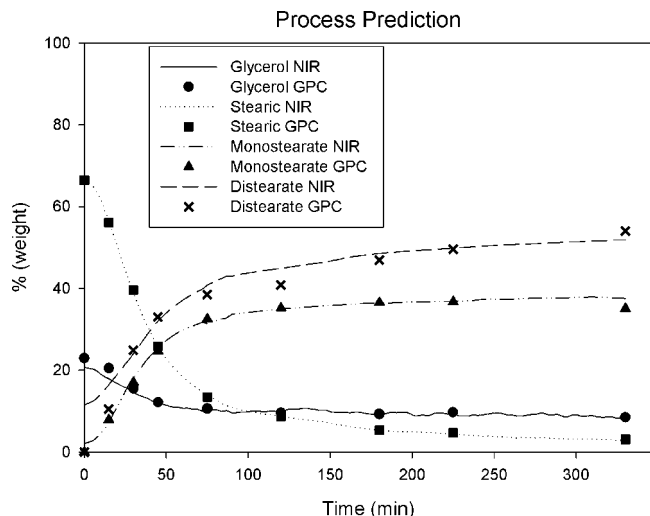


Figure 4. In-line prediction concentrations profiles.

sample or its spectrum being unrepresentative as a result. After 50 min, however, the predictions essentially coincided with the reference values and provided an accurate description of the trend in each species.

As can be seen from Figure 4, the variation of the concentration of each species decreased with time and the reactants never disappeared completely. Using a lower reactor pressure would probably have led to a more-efficient removal of water and an increased extent of esterification as a result.

4. Conclusions

The esterification of glycerin with stearic acid in the presence of a heterogeneous lipase catalyst leads to the formation of a mixture that contains monostearate and distearate; however, glycerol distearate always is the major product, irrespective of the reactant proportions used. This fact indicates that the enzyme is not specific toward the esterification reaction, but it does present a certain selectivity as is demonstrated by the absence of tristerate in the final product; this selectivity is also temperature-independent. The reaction yield and its selectivity are better than those of other heterogeneous catalysts proposed for this reaction.

Based on the results, near-infrared (NIR) spectroscopy with a fiber-optic immersion probe provides an effective method for the in-line monitoring of the four components of the esterification reaction in a rapid, accurate manner. The models that have been built allow one to follow the evolution of the four components, and it allows changes in all four to be accurately

measured virtually throughout, as a result; initially, however, mixing is nonuniform and spurious results may be obtained.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Technology (Project CTQ2006-12923). D.Z. also wishes to acknowledge additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in form of a scholarship.

Literature Cited

- (1) Machado, M. S.; Pérez-Pariente, J.; Sastre, E.; Cardoso, D.; de Guereñu, A. M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. *Appl. Catal., A* **2000**, *203*, 321–328.
- (2) Pouilloux, Y.; Abro, S.; Vanhove, C.; Barrault, J. Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins. Preparation of monoglycerides. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1999**, *149*, 243–254.
- (3) Pouilloux, Y.; Métayer, S.; Barrault, J. Synthesis of glycerol monoctadecanoate from octadecanoic acid and glycerol. Influence of solvent on the catalytic properties of basic oxides. *C. R. Chim.* **2000**, *3*, 589–594.
- (4) European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Glycerol Monostearate 40-55 and Glycerol Distearate. In *European Pharmacopoeia*, 5th Edition; Strasbourg, 2005.
- (5) Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *118*, 155–170.
- (6) Gandhi, N. N. Applications of Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 621–634.
- (7) Hills, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 601–607.
- (8) Pastor, E.; Otero, C.; Ballesteros, A. Enzymatic Preparation of Mono- and Di-Stearin by Glycerolysis of Ethyl Stearate and Direct Esterification of Glycerol in the Presence of a Lipase from *Candida Antarctica* (Novozyme 435). *Biocatal. Biotransform.* **1995**, *12*, 47–157.
- (9) Monteiro, J. B.; Nascimento, M. G.; Ninow, J. L. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 641–644.
- (10) Blanco, M.; Castillo, M.; Beneyto, R. Study of reaction processes by in-line near-infrared spectroscopy in combination with multivariate curve resolution. Esterification of myristic acid with isopropanol. *Talanta* **2007**, *72*, 519–525.
- (11) Blanco, M.; Peinado, A. C.; Mas, J. Elucidating the composition profiles of alcoholic fermentations by use of ALS methodology. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *544*, 199–205.
- (12) Páscoa, R. N. M.; Lopes, J. A.; Lima, J. L. F. C. In situ near infrared monitoring of activated dairy sludge wastewater treatment processes. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2008**, *16*, 409–419.
- (13) González-Sáiz, J. M.; Esteban-Díez, I.; Rodríguez-Tecedor, S.; Pizarro, C. Valorization of Onion Waste and By-Products: MCR-ALS Applied to Reveal the Compositional Profiles of Alcoholic Fermentations of Onion Juice Monitored by Near-Infrared Spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 776–787.

Received for review March 12, 2009
 Revised manuscript received June 3, 2009
 Accepted June 14, 2009

IE900406X

Analytical control of adjuvants in
herbicide formulations by NIR
spectroscopy.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

395 (2009) 839-844.

Analytical control of adjuvants in herbicide formulations by NIR spectroscopy

Marcelo Blanco · David Zamora · Joaquim Planells · Rufi Mulero

Received: 2 June 2009 / Revised: 16 July 2009 / Accepted: 29 July 2009 / Published online: 19 August 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Herbicide preparations, which typically consist of an active compound and an adjuvant, are formulated in such a way as to facilitate rapid dispersion of the pesticide and its transfer across the fat cuticle of plant leaves. The adjuvant usually comprises various substances including an oil, water, and one or more emulsifiers for increased stability. The difficulty of analyzing these mixtures has severely restricted the ability to control herbicide preparations, which must usually be characterized in terms of global, non-specific parameters such as the acid, saponification, and hydroxyl values. Near-infrared spectroscopy is an expeditious analytical technique requiring no sample preparation and affording multi-determinations in complex mixtures. In this work, we used laboratory-made samples to construct PLS multivariate models for determining the components of the adjuvant mixture in a herbicide preparation. The best ensuing model was validated and used to analyze industrial preparations with good results.

Keywords Emulsions · Surfactants · Near-infrared spectroscopy · Multivariate calibration

Introduction

Herbicide preparations usually contain an active pesticide and an adjuvant (a mixture of various components including solvents, diluents, and/or surfactants) [1, 2]. Herbicide formulations are designed to disperse in a rapid, uniform manner in order to facilitate uniform treatment of large plant surface areas with as small as possible an amount of product. Specially favored among adjuvant formulations are emulsifying concentrates, the lipophilicity of which facilitates passage through leaf cuticles [3, 4].

An emulsion is essentially a thermodynamically unstable dispersion of two immiscible liquids one of which (the disperse phase) forms small drops while the other (the external phase) is a continuum. Emulsions must contain a third component: the emulsifier, which is an amphiphilic substance intended to facilitate emulsification by reducing the surface tension between the disperse and external phase, and increasing the stability of the resulting emulsion over time [5]. Emulsifiers span a wide range of substances including surfactants, polar lipids, glycolipids, proteins, lipoproteins, and block (synthetic) copolymers.

Emulsions can be classified according to the nature of their two phases. One especially well-known type of emulsion is that of oil-in-water (O/W), where the disperse phase consists of small drops of an oily liquid and the continuous phase is an aqueous medium. Milk, mayonnaise, cream, fertilizers, phytosanitary products, and emulsified herbicides are typical O/W emulsions. There are also water-in-oil (W/O) in emulsions, where the disperse phase is aqueous and the continuous phase oily. Examples of W/O emulsions include butter, margarine, and sunscreens.

Emulsions are used not only in adjuvant formulations for agricultural purposes, but also in food, cosmetic, pharmaceutical, detergent, paint, polymer, and oil-refining prod-

M. Blanco (✉) · D. Zamora · J. Planells
Department of Chemistry, Faculty of Sciences,
Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
e-mail: Marcel.Blanco@uab.es

R. Mulero
Development and Quality Assurance Department, CRODA S.A.
(Mevisa site), Ctra Holstalic a Tossa km 1.8,
Fogars de la Selva,
08495 Barcelona, Spain

ucts, among others. The specific emulsion studied here is typically used in combination with a herbicide in the form of a twin-pack; the herbicide and the adjuvant are stored in separate containers and mixed at the time of application.

Herbicide adjuvants are usually supplied with one or more surfactants intended to facilitate emulsification and hence mixing of the oil and water, and diffusion of the herbicide across plant leaves; the last effect is a result of the surfactants reducing the surface tension of water, thereby expanding drop contact areas and increasing the efficiency of the herbicide. Adjuvants usually contain surfactants of various types intended to ensure an appropriate hydrophilic/lipophilic balance for the liquids to be mixed and micelles to be formed. This requires careful adjustment of their concentrations in order to ensure adequate stability in the resulting dispersion.

The paraffin mineral oil in the studied formulation was a mixture of aliphatic and naphthenic hydrocarbons with a low content in aromatics (less than 4% *w/w*), about 30% *w/w* naphthenes and 66% *w/w* paraffins and its acid value less than 0.03 mg KOH/g. The mixture contained two surfactants, namely: an ethoxylated sorbitol fatty ester and an ethoxylated isotridecyl alcohol, both of which are non-ionic and act as emulsifying, dispersing, and wetting agents [3, 6]. The formulation additionally contains propylene glycol, the wetting and solubilizing properties of which are used to ensure that a limpid solution will be obtained after all components are mixed [1]. In fact, the final mixture was completely transparent.

The chemical complexity of a herbicide formulation, which usually includes oligomers and/or isomers, makes determining its individual components difficult and analyzing its mixtures even more so. For this reason, formulations are usually characterized in terms of global indices. The analytical methods currently favored for the quality control of herbicide formulations rely on measurements of color, pH, moisture (as determined with the Karl Fischer method), and acid value (or saponification value), as well as on stability measurements intended to confirm whether the emulsion will remain stable for at least 2 days after preparation. These measurements are all slow and cumbersome, and should desirably be replaced with other, more expeditious and informative measurements.

Near-infrared spectroscopy (NIRS) can be especially useful for the rapid analysis of mixtures from a single spectrum with the need for no reagent or sample treatment [7–11].

In this work, we examined the potential of the NIRS technique for determining each individual component of a mixture of paraffin mineral oil, water, propylene glycol, and two surfactants used in an adjuvant herbicide formulation. Each component was determined from the NIR spectrum for the sample, which was processed by using a previously

constructed partial least squares (PLS) calibration model for each analyte.

Experimental

Mixture composition

The adjuvant mixture consisted of paraffin mineral oil (ca. 61% *w/w*), ethoxylated sorbitol fatty ester (ca. 23% *w/w*), ethoxylated alcohol (ca. 12% *w/w*), water (less than 3% *w/w*), and propylene glycol (ca. 1–2% *w/w*). The mixture must be a transparent liquid and contain the largest amount of water resulting in no turbidity.

Samples

Laboratory samples were prepared by mixing the five components of the formulation in variable proportions within $\pm 5\%$ *w/w* around the nominal values for the paraffin oil, ethoxylated sorbitol fatty ester and ethoxylated alcohol; $\pm 1\%$ *w/w* for propylene glycol; and $\pm 3\%$ *w/w* for water. The mixture composition was established by using the modified-distance-based design as implemented in the software Design-Expert v. 6.0.6 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) in order to minimize correlation between the concentrations of the five components.

Apparatus

Near-infrared spectra were recorded on a FOSS XDS Optiprobe Analyzer equipped with a vial heater module. The temperature of the vial heater was set at 75 °C. Spectra were recorded at 0.5 nm intervals over the wavelength range 400–2,500 nm and the spectrophotometer was governed via the software Vision v. 2.51.

NIR spectra were recorded in the transmittance mode, using cylindrical vials of 6.5 mm inner diameter. Each spectrum was obtained in triplicate, using three different aliquots per sample. Calibration models were constructed and validated from the average of each triplicate recording.

Data processing

Spectral treatments were applied and calibration models constructed with the software Unscrambler 9.2, from Camo Process (Trondheim, Norway). The spectral treatments used included first and second derivatives (using the Savitzky–Golay algorithm with a second-order polynomial and an 11-point moving window), and standard normal variate (SNV).

Calibration models were constructed with the PLS algorithm and cross-validated with the leave-one-out method. The quality of each model was assessed in terms

of its relative standard error (RSE) and root mean square error (RMSE):

$$\text{RSE}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^m (y_i)^2}} \times 100$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

where \hat{y}_i is the predicted value, y_i the reference value. n is the number of calibration samples if we are calculating RMSEC or is the number of validation samples if we are calculating RMSEP. The letters “C” and “V” were added at the end of the acronym of each type of error for calibration and validation samples, respectively.

Results and discussion

As can be seen from Fig. 1, the NIR spectra for water and propylene glycol differed markedly from those for the other three products in the formulation. The correlation coefficients between the spectra of oil and the two surfactants exceeds of 0.98. The high coefficients between the spectra for paraffin oil and the surfactants testify to the difficulty of constructing models with an adequate predictive ability for the three components.

Thus, the absorption bands for the former two (water and propylene glycol) were much stronger and their spectra recorded with a light path of 1 mm in order to facilitate

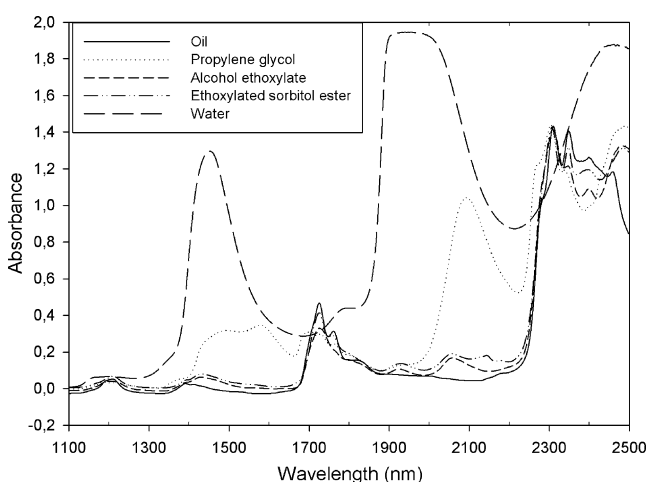


Fig. 1 Near-Infrared (NIR) spectra from the pure components of the mixture. Oil (61% w/w), propylene glycol (1–2% w/w), alcohol ethoxylate (12% w/w), ethoxylated sorbitan ester (23% w/w), water (<3% w/w)

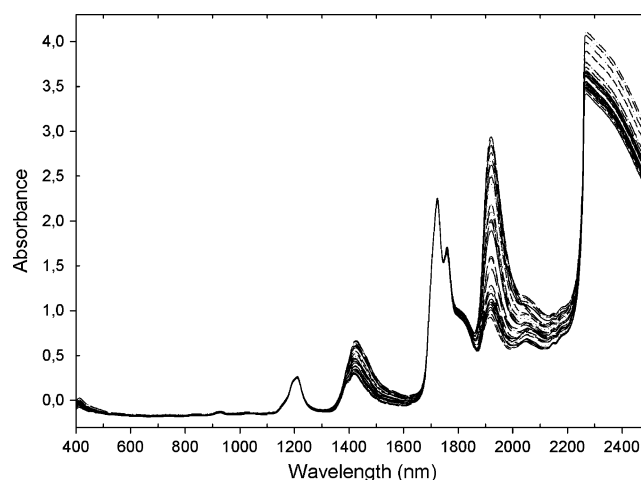


Fig. 2 Near-Infrared (NIR) spectra of the 36 samples

comparison with the other three analytes. Water typically exhibits two strong NIR bands over the wavelength ranges 1,400–1,600 and 1,850–2,200 nm that can be assigned to the first harmonic and combination bands of the O–H bond. Propylene glycol also exhibits two other major bands at 1,400–1,600 and 2,000–2,200 nm corresponding to the first harmonic and combination of the O–H bond; both are smaller than those for water, however.

The NIR spectra for the other three products were similar, with two bands in the regions 1,700–1,800 nm (first harmonic of the C–H bond) and 2,300–2,500 nm (combination band of the O–H bond); unlike the two surfactants (ethoxylated sorbitol ester and ethoxylated alcohol), the oil exhibited no absorption in these regions.

Figure 2 shows the spectra for the laboratory-made samples. As can be seen, the greatest spectral variability occurred in the regions 1,400–1,600 and 1,900–2,200 nm, and, judging by their increased strength, was largely due to the first harmonic and combination bands, respectively, of O–H bonds in hydroxyl groups and, especially, water. No characteristic band was observed over the wavelength range 400–1,100 nm and no measurable signal was detected

Table 1 Correlation coefficients between the concentrations of the components in the mixtures

	Oil	Propylene glycol	Alcohol ethoxylate	Ethoxylated sorbitol ester	Water
Oil	1.00				
Propylene glycol	−0.08	1.00			
Alcohol ethoxylate	−0.49	−0.16	1.00		
Ethoxylated sorbitol ester	−0.51	−0.08	−0.28	1.00	
Water	−0.34	0.05	−0.11	−0.11	1.00

Table 2 PLS models for oil, propylene glycol alcohol ethoxylate, ethoxylated sorbitol ester and water

Analyte	Spectra pretreatment	Wavelength range (nm)	PLS factors	Calibration			Validation		
				Number of samples	RSEC (%)	RMSEC	Number of samples	RSEP (%)	RMSEP
Oil	First derivative	1,300–2,200	3	21	0.7	0.45	14	0.9	0.57
Propylene glycol	First derivative	1,300–1,800, 2,000–2,200	3	18	4.3	0.09	17	6.4	0.13
Alcohol ethoxylate	First derivative	1,300–2,200	3	20	1.5	0.34	15	2.3	0.54
Ethoxylated sorbitol ester	First derivative	1,650–2,200	3	20	3.5	0.44	15	3.7	0.45
Water	Second derivative	1,300–2,200	1	19	3.3	0.13	16	4.5	0.18

above 2,200 nm with the transmission cells used. Spectra were all recorded at 75 °C in order to avoid light scattering through turbid solutions.

A total of 36 laboratory samples were prepared with paired concentration correlations less than 0.52 (Table 1). The use of this experimental design for mixture composition was intended to avoid correlation in the model matrix due to the high similarity between the spectra for paraffin oil and the two surfactants, and hence to ensure improved robustness and predictive ability in the models.

The samples were split into a calibration set that was used to construct the model for each component and a validation set consisting of samples not included in the previous one that were used to assess predictive ability. The choice of samples for the calibration set for each analyte was dictated by the target concentration range and the spectral variability in the samples as established from a PCA scores plot (results not shown); all other samples were included in the validation set.

Calibration models for each analyte were constructed by using absorbance spectra and subjected to various treatments including the standard normal variate (SNV), and first and second derivatives with Savitzky–Golay smoothing. Both the entire spectral range and various regions of maximal absorbance for the analytes were tested, and those exhibiting no absorption bands excluded in order to reduce

the effect of noise. Table 2 shows the best calibration model for each analyte.

All selected models were quite simple—they used a small number of factors—and based on first-derivative data; by exception, the model for water was based on second-derivative data and used a single PLS factor. The regions 400–1,300 and 2,200–2,500 nm were excluded as they contributed no useful spectral information and led to poor calibration results.

Table 3 shows the parameter values used to assess the predictive ability of the five PLS models. The plots of NIR concentration against reference concentration were all straight lines of slope and intercept not significantly different from 1 and 0, respectively, at the 95% significance level.

As the computation of slope and intercept are not independent, an evaluation of joint confidence interval of the values of slope and intercept, for the five components, are showed in Fig. 3. The points represented by the actual values, for the validations set, are inside in the confidence ellipse, this fact demonstrates no significance difference between the theoretical and actual values.

The NIR models finally adopted were used for the analytical control of 11 industrial sample batches. Table 4 shows the predicted values for the components in each batch. As can be seen, the results testify to the high

Table 3 Figures of merit for regression line of predicted NIR values versus references values of each analyte

			Oil	Propylene glycol	Alcohol ethoxylate	Ethoxylated sorbitol ester	Water
Calibration	[NIR] = A+B [Ref] (%)	Correlation <i>r</i>	0.990	0.996	0.988	0.991	0.996
		Intersection (A)	0±3	0.00±0.09	0.0±0.7	0±1	0.0±0.2
		Slope (B)	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.03
Validation	[NIR] = A+B [Ref] (%)	Correlation <i>r</i>	0.980	0.986	0.988	0.978	0.993
		Intersection (A)	1±5	−0.1±0.2	0.5±0.8	0±2	−0.1±0.2
		Slope (B)	0.98±0.09	1.05±0.07	0.97±0.06	1.01±0.09	1.03±0.05

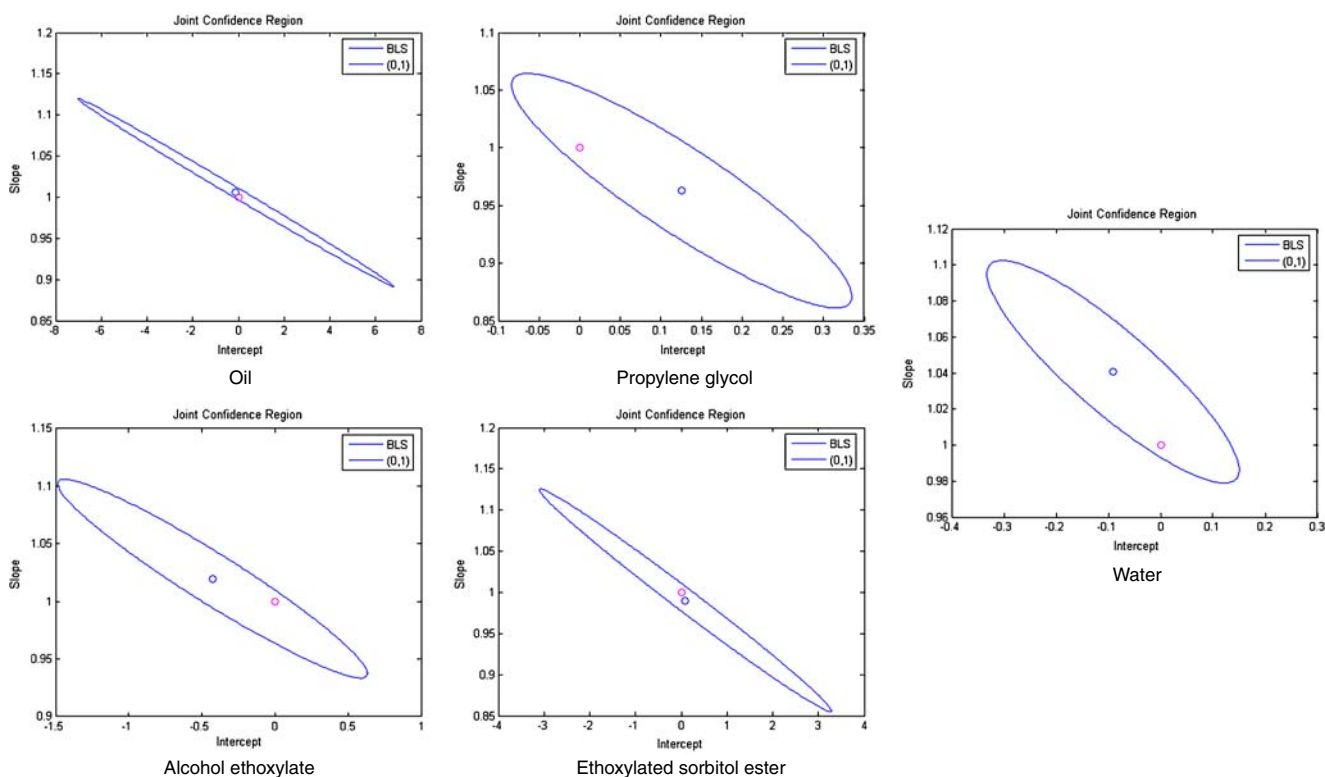


Fig. 3 Intercept and slope joint confidence interval for the five components

predictive ability of the proposed models and their usefulness for controlling mixture composition.

Conclusions

The use of NIR spectroscopy in combination with multivariate calibration models allows the simultaneous deter-

mination of the five components of a mixture used as a herbicide adjuvant for which no reliable analytical control method was previously available. The method affords the determination of each component at concentrations over a wide range.

The proposed method requires no sample pretreatment. Also, it allows all mixture components to be simultaneously determined with a high accuracy in a short time (less than 1 min).

Table 4 Concentrations predicted in different production batches

Batch number	Oil (61.5%)	Propylene glycol (1.2%)	Alcohol ethoxylate (11.6%)	Ethoxylated sorbitol ester (23.1%)	Water (2.7%)	Sum of concentration (100%)
1	60.0	1.2	12.8	23.5	2.9	100.3
2	62.3	1.2	11.5	21.7	3.8	100.5
3	60.1	1.2	11.8	22.5	4.5	100.1
4	60.6	1.9	9.8	24.2	4.4	100.8
5	61.3	1.8	11.1	24.4	2.0	100.6
6	59.8	1.9	10.1	24.6	4.2	100.5
7	57.7	1.7	10.7	25.5	4.8	100.3
8	60.4	1.7	9.9	23.7	4.5	100.2
9	60.8	1.9	9.6	24.4	3.8	100.5
10	60.4	1.9	9.0	25.0	4.2	100.5
11	61.9	1.8	10.6	24.2	2.0	100.4

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Technology (Project CTQ2006-12923). David Zamora also wishes to acknowledge additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

References

1. Adjuvants HJL (2000) Terminology, classification and chemistry. *Weed Technol* 14:773–784
2. Stock D, Briggs G (2000) Physicochemical properties of adjuvants: values and applications. *Weed Technol* 14:798–806
3. Muñoz J, Alfaro MC, Zapata I (2007) Avances en la formulación de emulsiones Grasas y Aceites 58(1):64–73
4. Baur P, Grayson BT, Schönherr J (1997) Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 1. Effects of ethoxy chain length and the size of the penetrants. *Pestic Sci* 51:131–152
5. Baur P (1999) Surfactant effects on cuticular penetration of neutral polar compounds; dependence on humidity and temperature. *J Agric Food Chem* 47:753–761
6. Bombos D, Andrei M, Mihailescu M, Tamas I, Teodorescu C (2005) Nonionic emulsifiers based on stabilized polyoxyethylene-sorbitans. *Analele Universitatii din Bucuresti—Chimie, Anul XIV, vol I–II*, 95–101
7. Blanco M, Alcalá M, Planells J, Mulero R (2007) Quality control of cosmetic mixtures by NIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 389:1577–1583
8. Blanco M, Beneyto R, Castillo M, Porcel M (2004) Analytical control of an esterification batch reaction between glycerine and fatty acids by near-infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta* 521:143–148
9. Blanco M, Alcalá M (2006) Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. *Eur J Pharm Sci* 27:280–286
10. Afseth NK, Segtnan VH, Marquardt BJ, Wold JP (2005) Raman and near-Infrared spectroscopy for quantification of fat composition in a complex food model system. *Appl Spectrosc* 59(11): 1324–1332
11. Baptista P, Felizardo P, Menezes JC, Neiva Correia MJ (2008) Monitoring the quality of oils for biodiesel production using multivariate near infrared spectroscopy models. *J Near Infrared Spectrosc* 16:445–454

Determination of trace impurities in
cosmetic intermediates by ion
mobility spectrometry.

Analytica Chimica Acta

708 (2011) 69-74.



Determination of trace impurities in cosmetic intermediates by ion mobility spectrometry

David Zamora, Manel Alcalà, Marcelo Blanco*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2011
Received in revised form
18 September 2011
Accepted 29 September 2011
Available online 6 October 2011

Keywords:

Ion mobility spectrometry
3-Dimethylaminopropylamine
Amidoamine
Cosmetics

ABSTRACT

The cosmetic and pharmaceutical industries are continuously demanding fast, efficient, cost-effective analytical methods to monitor production processes and assure end-product quality. The presence of residual reagents or impurities formed during a synthetic process can have an adverse impact on product quality, assurance of which requires using increasingly sensitive analytical methods to facilitate the detection and/or determination of toxic compounds with potentially hazardous effects on consumer's health. In this work, we assessed the potential of ion mobility spectrometry (IMS) for the detection and quantitation of dimethylaminopropylamine (DMAPA) residues in stearamidopropyl dimethylamine (SAPDA) production samples. The influence of instrumental variables including solvent, solution drying time, injected volume and volatilization temperature was examined. The ensuing analytical method takes less than 1 min per analysis and uses only a few microlitres of sample. The calibration curve was linear over the DMAPA concentration range 0.030–0.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The proposed method was validated for use in control processes. The complex plasmagram for amidoamines allows the origin of cosmetic oils to be easily, expeditiously identified. Based on the results, IMS holds great promise for the qualitative and quantitative determination of the studied amide and various others in cosmetic products.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The chemical industry requires fast, efficient, cost-effective analytical tools to monitor processes and assure quality in its end-products. A number of methods are currently in use for this purpose most of which rely the preferred choice for the analysis of complex products: HPLC. Unfortunately, HPLC methods are slow, use large amounts of solvents and reagents, and, frequently, are poorly sensitive.

The cosmetic industry uses a variety of synthetic chemicals including amidoamines obtained by reacting fatty acids or triglycerides with 3-dimethylaminopropylamine (DMAPA). This substance is a skin, eye and mucosal irritant. Amidoamines are used in personal care products, shampoos – to reduce static electricity, and increase hair combability and shine – to improve skin texture and, in some cases (e.g. betaines), as surfactants. In addition, amidoamines are used to obtain a number of derivatives such as phospholipids and liposomes. DMAPA is present in many of these products.

The reaction between an amidoamine and monochlorhydrin produces quaternary ammonium salts that are used in hair cleansers, washing aids, antiseptics, moisturizers and emulsifiers.

Amidoamines are also used to obtain phospholipids, which are essential for the human body, ingredients of various personal care products and fully compatible with naturally occurring lipids in epidermal layers. Phospholipids have conditioning, soft cleaning, emulsifying and antimicrobial properties, and are thus highly suitable for use on baby and sensitive skins. These phospholipids can also be used to obtain liposomes, which are useful to transfer various types of substances including active principles and cosmetic products into cells.

Quantifying the amount of residual DMAPA present in a synthetic product is important. For example, the presence of DMAPA in cocamidopropyl betaine (CAPB), an ingredient of some shampoos, has been found to cause contact dermatitis [1–3]. A need therefore exists for effective methods to determine low concentrations of the amine in an accurate, expeditious manner. The determination of DMAPA in cosmetic products has so far relied on LC–MS [2,4], which provides a detection limit of 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ but uses large amounts of solvents and takes a long time.

The simplicity, expeditiousness and sensitivity of ion mobility spectrometry (IMS) make it especially suitable for the determination of traces of a wide variety of products. Interested readers can find a detailed description of this technique in a number of books [5] and papers [6–8]. IMS relies on differences in speed between ions under the action of a constant electrical field; therefore, it can be deemed an electrophoretic technique performed on gases at atmospheric pressure. This technique is similar to time-of-flight mass

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.
E-mail address: Marcel.Blanco@uab.es (M. Blanco).

spectrometry (TOF-MS) except that separation in IMS is done at atmospheric pressure and can use simpler equipment as a result. The sample is evaporated and the resulting vapour introduced in an ionization chamber for separation according to the speed acquired in a drift tube subjected to a constant electrical field. Ionization is accomplished by using a radioactive, photoionization or corona-discharge source to avoid or minimize molecular fragmentation. The ionization region is isolated from the drift tube by a shutter grid which is open for a short time to allow ions to reach the drift tube. The tube is typically 5–10 cm in length and used to circulate a counterflow of drift gas to prevent neutral molecules from entering the tube and delay ion motion. Ions travel along the tube by effect of the applied electrical field and are driven to a detector which is usually a Faraday cup. Once there, they are separated according to mobility, which is a function of their mass, size, shape and charge.

The mobility of an ion can be expressed as

$$K = \frac{d}{t_d \times E} \quad (1)$$

where d is the length of the drift tube, E the applied electrical field and t_d the drift time. Usually, a reduced mobility constant K_0 ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) is used to normalize mobility for standard conditions. Such a constant can be calculated as

$$K_0 = K \left(\frac{273}{T} \right) \left(\frac{p}{101} \right) \quad (2)$$

where T (K) and p (kPa) are the pressure and temperature, respectively, in the drift region.

The mobility of a specific ion can be expressed in molecular terms by using the Mason–Schamp equation [6,8,9]

$$K = \left(\frac{3q}{16N} \right) \left(\sqrt{\frac{2\pi}{\kappa T}} \right) \left(\sqrt{\frac{m+M}{mM}} \right) \left(\frac{1+\alpha}{\Omega} \right) \quad (3)$$

where q is the ionic charge ($1.602 \times 10^{-19} \text{C}$), N the number of density of the drift gas, κ is the Boltzmann constant ($1.381 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$), T (K) the temperature, m the ion mass, M the mass of the neutral drift gas, α a mass-dependent correction term and Ω the ion collision cross-section. The mobility of ions of identical charge under also identical conditions is governed by their mass and collisions with the counterflow of drift gas or, in other words, by their size and shape.

The favourable properties of IMS, which include analytical expeditiousness, high sensitivity, ease of use and portability, have enabled its use as a routine analytical tool for detecting trace substances in a wide variety of military and safety applications [10,11], crime and drug detection [12,13], food [14–17] and pharmaceutical [18–23] analysis, and process monitoring [24,25].

The primary aim of this work was to assess the potential of IMS for the determination of residual DMAPA in synthetic amidoamines and its monitoring during the industrial production of cosmetic products.

2. Experimental

2.1. Ion mobility spectrometry procedure

The equipment used was an IONSCAN-LS 400B instrument from Smiths Detection (Morristown, NJ, USA) fitted with a ^{63}Ni radioactive ionization source. Plasmagrams were acquired in the positive ion mode, using nicotinamide ($K_0 = 1.86 \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) as internal standard and carrier gas dopant [26]. The experimental conditions are summarized in Table 1. The shutter grid width was 0.2 ms and each plasmagram was acquired for 30 ms. A counterflow of dry nitrogen flowing at $300 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ was introduced as drift gas at the end of the drift region. The electric field strength in the drift

Table 1
IMS operating conditions.

Ion mode	Parameter	Setting
Positive	Drift tube temperature ($^{\circ}\text{C}$)	232
	Inlet temperature ($^{\circ}\text{C}$)	280
	Desorber temperature ($^{\circ}\text{C}$)	145–180
	Calibrant temperature ($^{\circ}\text{C}$)	70
	Drift flow ($\text{cc} \cdot \text{min}^{-1}$)	300
	Analysis time (s)	12
	Pulse width (ms)	0.2
	Scan period (ms)	30
	Scan number per segment	10
	Segment number per analysis	40
	Calibrant ion	Nicotinamide

region with a total drift voltage of 1763 V and a drift tube length of 7 cm was $252 \text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Each sample was analysed by placing a small volume of analyte solution in a volatile solvent on a Teflon membrane that was introduced in a desorption chamber to have deposited components volatilize. The resulting vapour was introduced in the chamber for ionization and subsequent separation of its components in the drift tube. Fig. 1 shows a general outline of an instrument of IMS with the sample introduction system used.

2.2. Reagents and solvents

3-Dimethylaminopropylamine (DMAPA) in 99.8% minimum purity was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). Stearamidopropyldimethylamine (SAPDA), myristamidopropyldimethylamine (MAPDA) and cocamidopropyldimethylamine (CAPDA) were the reaction products of DMAPA with stearic and myristic acids, and coconut oil, respectively. No standard for these products was available. Acetone and isopropanol in 99.9% and 99.5% purity, respectively, were supplied by Acros Organics (Geel, Belgium). Whatman $2 \mu\text{m}$ PTFE filters 46.2 mm in diameter (Teflon substrate) were purchased from Vidafroc (Barcelona, Spain).

The drift gas used was nitrogen (5.0) supplied by Abelló Linde (Barcelona, Spain).

2.3. Software

Plasmagrams were acquired and processed with the software IMSation 5.3.8 from Smiths Detection (Warren, NJ, USA), which calculated the maximum amplitude (MaxA), in digital units (du),

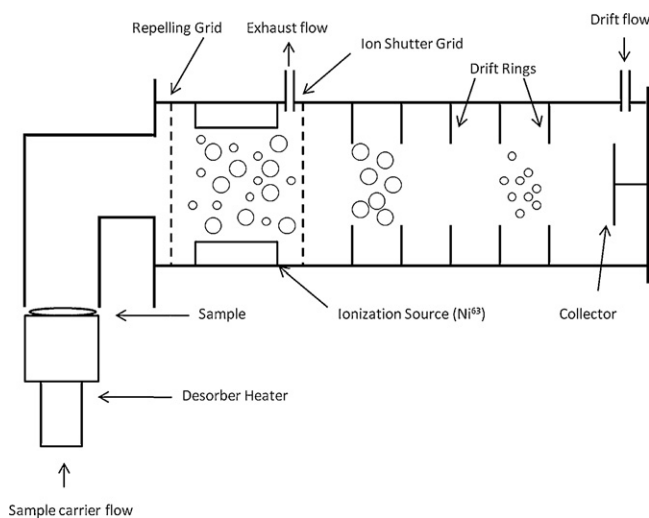


Fig. 1. Scheme of ion mobility spectrometer showing the sample inlet, ionization chamber, drift tube and detector.

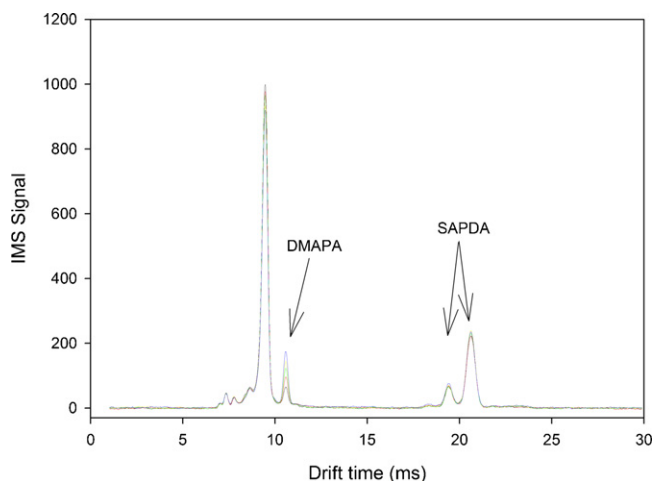


Fig. 2. Overlapped averaged plasmagrams of several injections of $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ of SAPDA with spiked DMAPA. Note: The plasmagram were obtained as an average of the ion mobility segments between 0.60 and 3.00 s analysis time.

corresponding to the maximum peak height, as well as the cumulative amplitude (CumA) as the combination of all maximum amplitudes or peak heights measured during the desorption process. The calibration curve was run from CumA as it proved more sensitive than MaxA.

The experimental design was constructed by using the software MODDE 8.0.0.0 from Umetrics AB (Umea, Sweden).

3. Results and discussion

The amidoamines studied were obtained by amidation at $180\text{--}190^\circ\text{C}$ between DMAPA and fatty acids or by transamidation of oils. The reaction yielded the amidoamine of each fatty acid. The reaction mixture was subjected to a high temperature under vacuum in order to facilitate distillation of unreacted DMAPA, which was subsequently hot-filtered. The end-product may contain DMAPA traces which should be controlled.

DMAPA was ionized in the positive mode by capturing a proton from the internal standard (nicotinamide, which additionally acted as the ionizing reagent). Fig. 2 shows the plasmagrams obtained from several injections of $1 \mu\text{L}$ of a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution of SAPDA containing a small amount ($0.030\text{--}0.150 \mu\text{g mL}^{-1}$) of DMAPA. As can be seen, DMAPA gave a signal at a drift time of 10.6 ms corresponding to a reduced mobility constant $K_0 = 1.67 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The amidoamine gave a double peak at 19.5 ms and 20.7 ms, in addition to a smaller one at 21.9 ms, the reduced mobility constants for which were 0.907, 0.854 and $0.808 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. Based on strength, the peak at 20.7 ms was assigned to the amidoamine of stearic acid and the other, weaker two were assigned to the amidoamines of palmitic and arachidic acids, both of which are present in industrial stearic acid. As can be seen, the peaks for the sample components were well-resolved; therefore, the amidoamine can be expected not to interfere with the determination of DMAPA. Also, SAPDA gave a weak signal relative to DMAPA. The assignment of the DMAPA signal was confirmed by injecting $1 \mu\text{L}$ of a solution containing a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration of the pure product. Injecting variable amounts of SAPDA with a constant concentration of DMAPA was found not to alter the signal for the latter irrespective of the concentration added and desorption temperature used. Therefore, DMAPA was present in the product rather than forming by thermal decomposition of the amidoamine.

The other amidoamines gave similar plasmagrams. Thus, MAPDA exhibited two peaks at 17.2 and 18.4 ms that were assigned to the amidoamine of lauric acid and one for myristic acid, on the

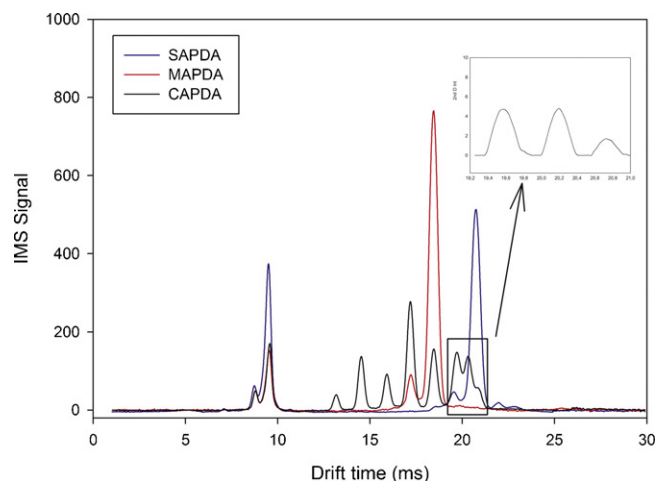


Fig. 3. Overlapped average ion mobility spectra of a solution of SAPDA, MAPDA and CAPDA. Enlarged area in second derivative mode for CAPDA. Note: The plasmagram were obtained as an average of the ion mobility segments between 1.20 and 4.20 s analysis time.

grounds of its increased intensity, respectively. The plasmagram for CAPDA was more complex owing to the presence of amidoamines formed by amidation of the different fatty acids in coconut oil; thus, it contained peaks at 13.0, 14.4, 15.7, 17.2, 18.4, 19.5, 20.2 and 20.7 ms. Fig. 3 shows the overlapped plasmagrams of SAPDA, MAPDA and CAPDA.

A comparison of the plasmagrams revealed that the peak at 10.6 ms was present in all, which indicates that DMAPA was an impurity in all products. Also, the last plasmagram for CAPDA contained two peaks at 17.2 and 18.4 ms coinciding with those for MAPDA, and another two at 19.5 and 20.7 ms coinciding with those for SAPDA.

3.1. Development of the IMS quantitation method

Developing a sensitive enough method for determining residual DMAPA required careful examination of the influence of external factors on the IMS response of this amine. The variables studied with a view to optimizing the determination of this compound in amidoamines included the nature of the solvent, drying time, injected volume and desorption temperature. The solvent is known to have a marked effect on sensitivity. In this work, we chose acetone and isopropanol among the most suitable for this purpose on the grounds of their high solvent power and little effect on analyte volatilization and ionization. The drying time, also known as “post-despense delay”, which is the time elapsed between deposition of the analyte solution on the Teflon membrane and introduction in the desorber for vaporization, is one other influential factor, and so is the injected volume, which should be carefully adjusted to obtain a low enough detection limit while avoiding saturation of the detector. Finally, the desorber temperature used to vaporize the solution deposited on the Teflon membrane was adjusted in such a way as to facilitate thorough, reproducible volatilization of the analyte with as little fragmentation as possible.

The selected temperatures for the drift tube (232°C) and inlet (280°C) were kept constant throughout and the positive ionization mode was used for all measurements. Table 1 shows the operating conditions of the IMS instrument.

The experimental design used was of the Plackett Burman type [27] and consisted of the previous four factors at two different levels each, so it involved a total of 8 experiments. The parameter levels used were -1 for acetone and $+1$ for isopropanol; -1 for 1 s and $+1$ for 20 s of drying time; -1 for $1 \mu\text{L}$ and $+1$ for $8 \mu\text{L}$ of

Table 2
Figures of merit for DMAPA calibration line: external standards and standard addition.

	Cum A = a + b [DMAPA]	
	External standards	Standard addition
Correlation <i>r</i>	0.997	0.9923
Intercept (<i>a</i>)	49 ± 51	177 ± 16
Slope (<i>b</i>)	5389 ± 210	5192 ± 274

injected volume; and –1 for 145 °C and +1 for 180 °C in the desorber. The results of each experiment were used to construct a calibration curve with 5 standards containing DMAPA concentrations from 0.25 to 4 µg mL⁻¹. Each standard was injected in triplicate, with an intervening solvent injection between standards. As expected for acetone as solvent and a short drying time, the sensitivity increased with increasing injected volume. On the other hand, the desorber temperature had no effect on the results.

In order to refine the operating conditions for maximum sensitivity, we reassessed the variables drying time and injected volume, using acetone as solvent. A full factorial design (2³) with these two variables as factors and three levels for each provided similar results that confirmed the effects of drying time and injected volume on the sensitivity (slope) of the determination.

Because the presence of a large amount of amidoamine in the sample could delay or hinder volatilization of DMAPA and lead to error (matrix effect), we compared the slopes of the calibration curves for a solution of DMAPA and another of SAPDA containing variable amounts of DMAPA incorporated in a standard addition series. Table 2 shows the equations for the calibration and standard addition curves; the slopes of the two curves were not significantly different at the 95% significance level.

The repeatability of the intensity values obtained in the presence of SAPDA at the two desorber temperatures (145 and 180 °C) was also studied. The results obtained at 145 °C exhibited a very high relative standard deviation (RSD) relative to 180 °C (RSD < 5% and an increased intensity for DMAPA) (Table 3). These results exclude thermal decomposition of SAPDA and confirm that all quantified DMAPA originated in the synthetic process.

3.2. Validation of the IMS quantitation method

The proposed IMS method was validated for the routine determination of DMAPA in SAPDA samples in accordance with the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH) [28] for pharmaceuticals. The validation parameters used were specificity, linearity (LOD and LOQ), accuracy and precision (Table 4).

Specificity was measured as constancy in the drift time for DMAPA and calculated as the standard deviation of the drift time for 40 injections of solutions containing and excluding SAPDA.

Linearity was assessed by analysing DMAPA standards at 10 different concentrations from 0.015 to 0.800 µg mL⁻¹. The calibration curve was constructed by plotting the cumulative amplitude (CumA) as a function of the concentration of each standard. CumA was found to vary linearly (*R* = 0.997) with the DMAPA

Table 3
Desorber temperature effect on signal for DMAPA and stearamidopropyl dimethylamine (nine injections for each temperature).

Desorber temperature	145 °C		180 °C	
	DMAPA	Amide	DMAPA	Amide
Signal average	259	22 164	449	19 178
RSD (%)	13	1	3	2

Table 4
Validation parameters for the DMAPA quantitation with the proposed IMS method.

Parameter	Criteria	Result
Specificity	Measurements number	40
	<i>t</i> _d mean (ms)	10.597
	S.D.	0.009
	<i>t</i> _d mean with SPADA (ms)	10.593
Linearity	S.D. with SPADA	0.008
	<i>n</i>	24
	Concentration range (µg mL ⁻¹)	0.030–0.500
	Intercept	49 ± 51
	Slope	5389 ± 210
	<i>R</i> ²	0.997
LOD (µg mL ⁻¹)		0.028
LOQ (µg mL ⁻¹)		0.094
Accuracy	<i>n</i>	5
	% recovery mean	103.7
	RSD %	2.0
	<i>t</i> _{exp}	2.41
	<i>t</i> _{crit}	2.77
Repeatability	Replicates	6
	RSD %	2.57
Intermediate precision	RSD %	4.8

concentration over the range 0.030–0.500 µg mL⁻¹. Concentrations falling outside these limits provided a non-linear response.

The calibration curve was used to calculate the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for DMAPA, which were taken to be 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the intercept divided by the slope, and found to be 0.03 and 0.09 µg mL⁻¹, respectively.

Accuracy was assessed as the percent recovery obtained by spiking five SAPDA solutions with DMAPA concentrations from 0.03 to 0.15 µg mL⁻¹. The results of their triplicate analysis are shown in Table 4. Based on a paired data *t*-test, DMAPA recovery was not significantly different from 100% at a significance level of 95%.

Repeatability was determined by analysing six replicates of an SAPDA sample. Intermediate precision was assessed by having two different operators analyse an SAPDA sample on three different days. A two-factor ANOVA of a single sample per group revealed the absence of significant differences in precision between analysts or days.

3.3. Quantitative analysis of production samples

The quantitation of DMAPA in SAPDA, MAPDA and CAPDA samples was accomplished by using the calibration curve constructed from DMAPA external standards. To this end, solutions containing an approximate concentration of 100 µg mL⁻¹ of each amidoamine were injected in volumes of 1–4 µL into the IMS instrument and the CumA thus obtained interpolated near the centroid of the calibration curve for DMAPA. Each solution was injected in triplicate. The concentrations thus obtained varied over the range 27–76 µg g⁻¹ for SAPDA, 4–14 µg g⁻¹ for MAPDA and 12–30 µg g⁻¹ for CODMAPA. The DMAPA concentration in the end-product never exceeded 100 µg g⁻¹, which is the accepted manufacturing limit. As revealed by a paired data *t*-test the results obtained with the standard addition method were not significantly different from those provided by external standards.

No DMAPA was detected during the phospholipid production process. Its absence from the products was confirmed by adding trace amounts of DMAPA (0.03–0.15 µg mL⁻¹) to solutions containing a 1000 µg mL⁻¹ concentration of each product. The DMAPA recoveries thus obtained, 96–104%, were close to 100%, which confirm the suitability of the proposed method for its intended purpose.

Table 5Characterization of the fatty acids components in amidoamines. $1/K_0$ values against number of CH_2 groups.

	Drift time (ms)	K_0 ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Number of CH_2 , N_c	Inverse reduced ion mobility ($1/K_0$) (V s cm^{-2})		Number CH_2 predicted	Fatty acid assignment	Calculated conc. %	Composition ^b (%)
				Measured	Predicted ^a				
				MAPDA	17.134				
SAPDA	18.346	0.964	12	1.037	1.033	12.1	C_{14}	95.8	>
	19.517	0.907	14	1.103	1.106	13.9	C_{16}	3.6	
	20.717	0.854	16	1.171	1.178	15.8	C_{18}	93.7	
	21.908	0.808	18	1.238	1.251	17.6	C_{20}	2.7	
CAPDA	13.050	1.355	4	0.738	0.743	3.9	C_6	2.2	0.2–0.8
	14.417	1.227	6	0.815	0.816	6.0	C_8	12.7	4.6–10.0
	15.772	1.121	8	0.892	0.888	8.1	C_{10}	7.3	5.0–10.0
	17.075	1.036	10	0.966	0.961	10.1	C_{12}	37.5	44.0–53.2
	18.327	0.965	12	1.036	1.033	12.1	C_{14}	16.2	16.0–21.0
	19.567	0.904	14	1.106	1.106	14.0	C_{16}	10.5	7.5–11.0
	20.193	0.876	14	1.142	1.142	15.0	C_{18} unsat.	10.0	6.0–14.0 (unsat.)
	20.729	0.853	16	1.172	1.178	15.8	C_{18}	3.6	2.0–4.0

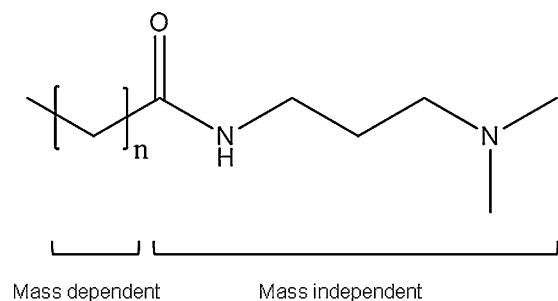
^a The experimental equation obtained, $1/K_0 = 0.03623N_c + 0.598446$, is used to assign accurately the peaks for each fatty acid in amidoamines.^b Distribution in industrial products.

3.4. Characterization of amidoamines

As noted earlier, the plasmagram for CAPDA exhibited several signals that were assigned to the amidoamines of various fatty acids present in coconut oil. This oil consists of a triglyceride containing C_6 to C_{18} fatty acids and lauric acid (C_{12}) as the dominant component. The peaks at 19.6, 20.2 and 20.7 ms were partially overlapped, which is consistent with the high similarity of the masses for the two signals. As can be seen from Fig. 3, application of a second-derivative algorithm included in the software to the plasmagram resulted in improved estimation of the drift times for these peaks (Table 5).

The origin of the different peaks was identified and the originating product confirmed to be coconut oil by identifying the amides from the different fatty acids and estimating their composition. This involved using the average plasmagram for the analysis period: 50 s – each component required a different analysis time owing to the differences in volatility, so our choosing 50 s was dictated by it sufficing to ensure complete desorption of all sample components.

Accurately assigning plasmagram peaks required using an appropriate database of reference substances or some method affording their identification. Some authors have reported linearization equations for the mobility of polar organic compounds [29,30] including a linear empirical plot of $1/K_0$ vs N_c (number of carbon atoms) for homologue series of compounds similar to the above-described Mason–Schamp equation. Hariharan et al. [30] split Eq. (3) into a term for the portion bearing charge (ion head), which is mass- and size-independent, and another corresponding to the ion tail, which is mass-dependent. Fig. 4 depicts the two portions.

**Fig. 4.** General formula for an amidoamine.

This hypothesis accounts for the plausibility of the empirical equation

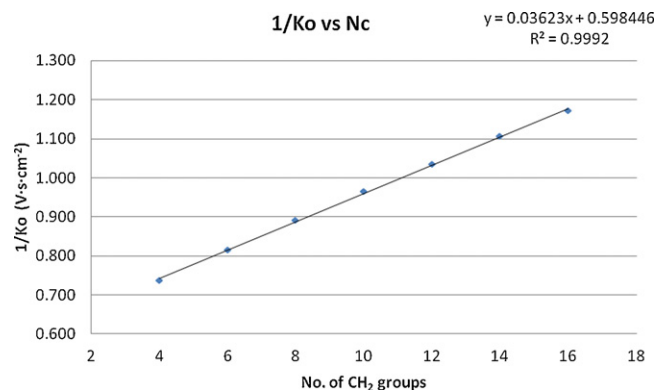
$$\frac{1}{K_0} = \varepsilon N_c + \delta$$

which is consistent with our experimental equation (Fig. 5):

$$\frac{1}{K_0} = 0.03623N_c + 0.598446 (R^2 = 0.9992)$$

where N_c is the number of CH_2 groups for the different plasmagram peaks for the amidoamines in coconut oil. The number of carbon atoms was assigned with reference to the plasmagram peaks for the amidoamines of stearic and myristic acids. This allowed the peaks for each fatty acid in coconut oil to be accurately assigned. Table 5 shows the figures of merit of the plasmagrams and the peak assignments to each compound.

Under the assumption that the detector response was exclusively due to the number of ions it received – which should be proportional to the concentration of the compound concerned – and independent of mass, we calculated the contribution of each plasmagram peak and hence the approximate proportion of each fatty acid in the product, from the average amplitude for each peak. As can be seen from the results (Table 5), the calculated composition is typical of coconut oil.

**Fig. 5.** Inverse reduced mobilities against the number of CH_2 groups for the different plasmagram peaks for the amidoamines in coconut oil.

4. Conclusions

The proposed method is simple, inexpensive and highly expeditious – it delivers results within minutes. Therefore, it affords the determination of amines in minimally prepared samples. The results obtained testify to its good precision and confirm the suitability of ion mobility spectrometry for quality and safety controls of cosmetic products. This method is superior in sensitivity to LC–MS method used so far. The empirical prediction obtained by plotting the reciprocal reduced ion mobility, $1/K_0$, against the number of carbon atoms allows one to identify each amidoamine and the origin of the oil used to manufacture cosmetic intermediates.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Technology (Project CTQ200-08312). David Zamora wishes to acknowledge additional support in the form of a scholarship from Universitat Autònoma de Barcelona. The authors are also grateful to Croda (Fogars de la Selva, Spain) for kindly supplying the samples.

References

- [1] G. Angelini, C. Foti, L. Rigano, G.A. Veña, *Contact Dermatitis* 32 (1995) 96–99.
- [2] C. Foti, D. Bonamonte, G. Mascolo, A. Corcelli, S. Lobasso, L. Rigano, G. Angelini, *Contact Dermatitis* 48 (2003) 194–198.
- [3] M. Hervella, J.I. Yanguas, M.E. Iglesias, Z.M. Larrea, C. Ros, M. Gallego, *Actas Dermosifliogr.* 97 (3) (2006) 189–195.
- [4] M.C. Prieto-Blanco, P. Lopez-Mahia, D. Prada Rodriguez, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 265–269.
- [5] G.A. Eiceman, Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*, second ed., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 2005.
- [6] H. Bordsdorf, G.A. Eiceman, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (4) (2006) 325–375.
- [7] R.H. St. Louis, H.H. Hill Jr., *Anal. Chem.* 21 (5) (1990) 321–355.
- [8] H.H. Hill Jr., W.F. Siems, R.H. St. Louis, D.G. McMinn, *Anal. Chem.* 62 (23) (1990) 1201A–1209A.
- [9] H.E. Revercomb, E.A. Mason, *Anal. Chem.* 47 (1975) 970–983.
- [10] T.L. Buxton, P.B. Harrington, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 269–282.
- [11] R.G. Ewing, D.A. Atkinson, G.A. Eiceman, G.J. Ewing, *Talanta* 54 (3) (2001) 515–529.
- [12] F.E. Dussy, C. Berchtold, T.A. Briellmann, C. Lang, R. Steiger, M. Bovens, *Forensic Sci. Int.* 177 (2008) 105–111.
- [13] T. Keller, A. Schneider, E. Tutsch-Bauer, J. Jaspers, R. Aderjan, G. Skopp, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2 (1) (1999) 22–34.
- [14] M.T. Jafari, T. Khayamian, V. Shaer, N. Zarei, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 147–153.
- [15] M.T. Jafari, *Talanta* 69 (2006) 1054–1058.
- [16] R. Alonso, V. Rodríguez-Estévez, A. Domínguez-Vidal, M.J. Ayora-Cañada, L. Arce, M. Valcárcel, *Talanta* 76 (2008) 591–596.
- [17] M. Menéndez, R. Garrido-Delgado, L. Arce, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1215 (2008) 8–14.
- [18] R. Debono, S. Stefanou, M. Davis, G. Walia, *Pharm. Technol.* (2002).
- [19] C. Qin, A. Granger, V. Papov, J. McCaffrey, D.L. Norwood, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 107–113.
- [20] M.A. Strege, J. Kozerski, N. Juarbe, P. Mahoney, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3040–3044.
- [21] R.M. O'Donnell, X. Sun, P.B. Harrington, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 44–53.
- [22] E. Champarnaud, A.M.-F. Laures, P.J. Borman, M.J. Chatfield, J.T. Kapron, M. Harrison, J.-C. Wolff, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 181–193.
- [23] R. Garrido-Delgado, L. Arce, C.C. Pérez-Marín, M. Valcárcel, *Talanta* 78 (2009) 863–868.
- [24] J.I. Baumbach, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1059–1070.
- [25] W. Vautz, W. Mauntz, S. Engell, J.I. Baumbach, *Macromol. React. Eng.* 3 (2009) 85–90.
- [26] J. Puton, M. Nousiainen, M. Sillanpää, *Talanta* 76 (2008) 978.
- [27] R.L. Plackett, J.P. Burman, *Biometrika* 33 (1946) 305–325.
- [28] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidelines. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2010, Section Q2(R1).
- [29] C. Hariharan, J.I. Baumbach, W. Vautz, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 12 (2009) 59–63.
- [30] C.B. Hariharan, J.I. Baumbach, W. Vautz, *Anal. Chem.* 82 (2010) 427–431.

ANEXOS

En el anexo se recogen los artículos publicados con fecha posterior a la aceptación por parte de la *Comissió d'Estudis de Postgrau* para la presentación de la tesis como compendio de publicaciones:

- I) An analytical method for lubricant quality control by NIR spectroscopy.
- II) Improving the efficiency of ion mobility spectrometry analyses by using multivariate calibration.

An analytical method for lubricant
quality control by NIR spectroscopy.

Talanta

89 (2012) 478-483.



An analytical method for lubricant quality control by NIR spectroscopy

David Zamora^a, Marcelo Blanco^{a,*}, Manel Bautista^b, Rufi Mulero^b, Miquel Mir^b

^a Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Development and Quality Assurance Department, CRODA S.A. (Mevisa Site), C-35 Km 72, 08945 Fogars de la Selva, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 October 2011

Received in revised form

20 December 2011

Accepted 23 December 2011

Available online 2 January 2012

Keywords:

Lubricants

Viscosity

NIR spectroscopy

POEs

Cascading libraries identification

PLS models

ABSTRACT

The excellent compatibility of polyol esters (POEs) with general fluids coolants such as CO₂ and non-chlorinated coolants (e.g. hydrofluorocarbons, HFCs) in terms of solubility, miscibility and chemical stability has fostered their use as lubricants by the refrigeration industry. The most widely used POEs bases consist of esters of polyalcohols – such as pentaerythritol, dipentaerythritol and neopentylglycol – with mixtures of carboxylic acids of 4–10 carbon atoms. Their thermophysical properties (viscosity mainly) are crucial with a view to producing efficient lubricants for specific applications. Usually, POE formulations, which usually contain several bases, are characterized in terms of global indices.

In this work, we developed a methodology based on NIR spectroscopy for the characterization and analysis of lubricant formulations. The products, including lubricant bases and lubricant formulations, are characterized by reference to two spectral libraries that are used to identify as the starting lubricant bases as well as the lubricant formulations. It has been proposed to build libraries in cascade for the differentiation of lubricant formulations without and with low content in additives. Once the identification of the formulation is applied PLS multivariate models are used to determine the components of a lubricant formulation and its viscosity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mechanical devices require the use of lubricants to prevent overheating and wear of solid surfaces in contact. In fact, friction during the motion of two solid surfaces in contact produces heat and wear. The lubricant is a liquid product applied to moving parts in order to lubricate them and prevent their wear and sealing. Lubricant formulations are usually mixtures of various components that are supplied with additives intended to improve specific performance-related properties such as thermal and/or chemical stability and the response to viscosity and/or surface tension changes [1]. Although lubricants consisting of mineral oils are widely used for a variety of purposes, they are scarcely biodegradable and, frequently, toxic. Therefore, they can have a strong impact on living beings if they reach the environment [2,3].

There has been much progress in the development of new lubricants to meet the requirements of a number of industrial applications (refrigeration, air conditioning, hydraulic fluids) with improved specifications and minimal environmental impact in recent years.

For 50 years, chlorofluorocarbons (CFCs) were used as cooling fluids in refrigeration systems; however, their adverse effect on the

ozone layer posed the need to replace them with environmentally compatible alternatives such as CO₂ or hydrofluorocarbons (HFCs). The new refrigerators require also new, compatible synthetic lubricants with a minimal environmental impact. Such new lubricant formulations are usually mixtures of various chemical bases including polyalpha olefins (PAOs), polyol esters (POEs) and polyalkylene glycols (PAGs). Based on some studies, these lubricant formulations can be deemed “green” as they improve energy efficiency, reduce part wear and are biodegradable [1,4,5].

Cooling fluids such as CO₂ and HFCs are widely used with polyol esters (POEs) on account of their good lubricity and miscibility. In addition, POEs possess a low volatility and an excellent viscosity–temperature relationship in addition to biodegradability. However, they are easily hydrolysed to acids that can be aggressive to the metal surfaces to be lubricated.

Commercially available POE-based lubricants are usually obtained by esterifying one or two polyfunctional alcohols with a mixture of acids in the presence of a catalyst (a tin or titanium complex) or a strong acid (e.g. *p*-toluenesulphonic acid) at 200–250 °C. The characteristics of the resulting product depends on the starting polyol (pentaerythritol, dipentaerythritol, neopentylglycol, trimethylolpropane) and the acid or a mixture of acids of variable chain length (usually 4–10 carbon atoms), whether linear or branched, used in the synthesis. The product can be identified by gas chromatography–mass spectrometry [6]. However, the most common lubricant formulations are complex mixtures, and their characterization and analysis is difficult. By way of example,

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.
E-mail address: Marcel.Blanco@uab.es (M. Blanco).

reacting pentaerythritol, which possesses four hydroxyl groups, with a mixture of two monocarboxylic acids gives up to five esters – position isomers and products of incomplete esterification excluded. Also, the determination of individual components lacks practical interest at the industrial level since the proportion of each component depends on the acid proportions used in the synthetic procedure. Industries use a wide variety of POE for reaction with mixtures of polyols with mixtures of acids in variable proportions. This adds to the complexity of the resulting lubricant formulation. The information potentially provided by the GC–MS technique in this situation is rather complex and of little use since it allows neither the overall performance of the product nor its characteristics to be determined. Moreover, lubricant formulations typically contain additives including antioxidants, anticorrosion agents, copper deactivators or acid catchers, which make analyses even more complicated.

For the previous reasons, lubricant formulations are usually characterized in terms of global indices such as viscosity or acid value. The most important parameter in this context is viscosity as it governs performance and fatigue resistance in bearing and gearing mechanisms, as well as its changes over the range of working temperatures. The ideal lubricant formulation is one whose viscosity is scarcely affected by temperature changes within the operating interval [7–10]. Viscosity determinations are slow and cumbersome, so it would be interesting to be able to characterize lubricant formulations in a simpler, more expeditious manner (e.g. by determining their bases and composition).

Near infrared spectroscopy (NIRS) has proved especially useful for the analysis of mixtures with no reagent or sample pretreatment [11–13]. In this work, we assessed its potential for determining the lubricant's bases of a lubricant formulation and its kinematic viscosity at variable temperatures. To this end, we constructed PLS multivariate calibration models to determine the components of the mixture and its viscosity. Also, we constructed spectral libraries to identify the lubricant bases and lubricant formulation compositions.

2. Experimental

2.1. Lubricant formulations

The lubricant formulation studied contained two POEs (lubricant base) in appropriate proportions plus additives and/or antioxidants including butylhydroxytoluene (BHT), tricresyl phosphate (TCP) and Silicone Fluid. Each lubricant base consisted of the esters of a single polyol (pentaerythritol, dipentaerythritol or neopentylglycol) (Fig. 1) with a mixture of monocarboxylic acids of 5–10 carbon atoms in variable proportions. A total of 9 lubricant bases were studied. Table 1 shows the polyol and acid mixture used for each lubricant base.

2.2. Samples

The lubricant formulation chosen as example for quantitation was a mixture of two lubricant bases consisting of pentaerythritol esterified with a mixture of pentanoic acid (C5) and heptanoic acid (C7), lubricant base 2 (50.60%), and another obtained by esterifying neopentylglycol with heptanoic acid (C7), lubricant base 8 (48.65%). Laboratory samples were prepared by mixing the two lubricant bases in variable proportions spanning a range of $\pm 5\%$ (w/w) around the nominal content of each in the lubricant formulation. In addition, the lubricant formulation is supplied with two additives at the end of the production process, namely: TCP (0.7%) and BHT (0.05%).

2.3. Instrumental

Near infrared spectra were acquired in the transmittance mode, using cylindrical vials of 6.5 mm inner diameter, on a FOSS NIRSystems 5000 spectrophotometer equipped with a Vial Heater Module/Pair Fiber s/n 9372. The temperature of the vial heater was set at 75 °C. Spectra were recorded at 2 nm intervals over the wavelength range of 1100–2500 nm and the instrument was controlled via the software Vision v. 2.51.

Viscosity measurements were made with a Stabinger SVM 3000 viscometer from Anton-Paar GmbH (Graz, Austria). This is a cylindrical rotational viscometer consisting of a fast rotating outer tube and a slower rotating inner measuring rotor. Dynamic viscosity values are calculated from the rotor speed at which the propelling shear forces acting on the sample equilibrate with the braking effect of the current induced by the rotating magnet inside the viscometer.

2.4. Construction of spectral identification libraries

The high similarity of the NIR spectra for the lubricating bases and lubricant formulation, reflected in their correlation coefficients, required the use of highly discriminating pattern recognition methods. We chose to use the residual variance model to identify the products. This method relies on a principal component analysis (PCA) of the samples defining a class. The ensuing factors were used to reconstruct the spectrum for each sample and calculate its residual. If the residual of the reconstructed spectrum for a new sample was below the preset limit for the model, then the sample was assumed to be identified by the class concerned.

One crucial choice towards ensuring adequate selectivity in a spectral library is the choice of an appropriate threshold; in our case, the threshold was taken to be the maximum residual variance allowing a spectrum to be unequivocally assigned to a given class. All spectra exhibiting a residual variance below the threshold for a class were assumed to belong to such a class. Too high threshold can lead to ambiguity (does not allow the distinction between two or more classes because more than a product of the library have lower values) and not allow the correct identification, while a very low threshold will not recognize the classes of the library.

The great similarity between the spectra of the lubricant formulations with and without additives prevents correct differentiation and to solve this problem have been proposed the application of cascading libraries [14]; to build it, the sample spectra (with and without additives) which have ambiguities are split in two different classes (sub-library) and the correct identification is done in the same way, but defining a new threshold. This methodology (cascading library identification) as it involves identifying the lubricant formulation against the general library and, if the result is inconclusive, using a sub-library for qualification.

This methodology is suggested as a step prior to quantification to prevent the possible mistake of applying a model of quantification which is not applicable to the formulation to determine; firstly the sample is identified as a particular formulation with or without additives and secondly it is determined with the right model.

The procedure to be followed in constructing the library involves of 5 steps (omitting step 4 for the lubricant bases library):

1. Recording the NIR spectra using sets of samples of known identity.
2. Choosing the spectra for each class (product), selecting samples from different batches.
3. Construction of the library by choosing the pattern recognition method to be applied (residual variance in our case). One must choose the spectral pre-treatment, wavelength range, variance

Table 1
Polyalcohol and carboxylic acids used in lubricant base synthesis.

Lubricant base	Polyalcohol employed	Carboxylic acid employed				
		C5	C7	C8	C8/C10	C9
1	Pentaerythritol	×				
2	Pentaerythritol	×	×			
3 ^a	Pentaerythritol	×	×			×
4 ^a	Pentaerythritol	×	×			×
5	Pentaerythritol–dipentaerythritol	×	×			×
6	Dipentaerythritol		×		×	×
7	Dipentaerythritol	×				×
8	Neopentylglycol		×			
9	Neopentylglycol			×		

^a Different ratio in acids employed.

explained and threshold value to be used. The following step involves an internal validation, in order to check for the possible existence of miss-identified, unidentified or ambiguously spectra. Based on validation results, whether some change in the threshold, spectral range, pre-treatment, etc., must be introduced is decided upon iteratively until assure the correct identification of the products.

- Constructing sub-cascading libraries. The samples of those classes that result in an ambiguous identification in the general library are divided into sub-classes that apply a similar construction procedure followed in the construction of the general library.
- External validation.* The general library and sub-libraries must be validated by checking that external spectra (validation set) not used in the construction of the library, are correctly, unambiguously identified.

2.5. Data processing

Data were processed with the chemometric software Unscrambler v. 9.8 from Camo Process (Trondheim, Norway). First- and second-derivative spectra were obtained by using the Savitzky–Golay algorithm with 11-point moving window and a second-order polynomial. Partial least-squares (PLS1) models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The quality of the results was assessed in terms of the relative

standard error of calibration (RSEC) or validation (RSEP), and the root mean square error (RMSE):

$$\text{RSE (\%)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i^{\text{pred}} - y_i^{\text{ref}})^2}{\sum_{i=1}^m (y_i^{\text{ref}})^2}} \times 100$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i^{\text{pred}} - y_i^{\text{ref}})^2}{n}}$$

where y^{pred} is the predicted value, y^{ref} the reference value and n is the number of calibration samples for RMSEC or validation samples for RMSEP.

The model selected in each case was that leading to the lowest RSE and RMSE for a test set consisting of samples not used to construct it.

3. Results and discussion

The lubricant bases studied were polyol esters with very similar NIR spectra and no significant differences between their absorption bands (Fig. 2). The spectra exhibited two strong bands in the region of 1700–1800 nm (combination band of C–H bonds) in addition to two smaller bands at 1200 nm corresponding to the second overtone of C–H bonds and at 1400 nm corresponding to the first

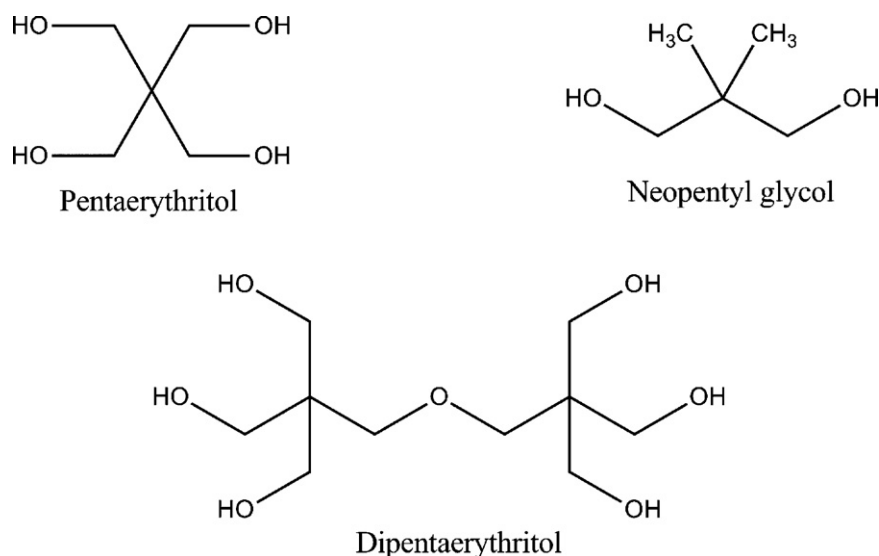


Fig. 1. Chemical structure of pentaerythritol, dipentaerythritol and neopentylglycol.

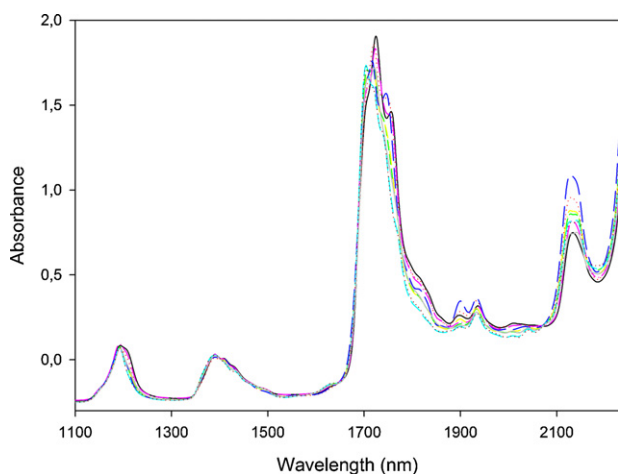


Fig. 2. Near-infrared (NIR) spectra of the 9 lubricant bases.

overtone for such bonds. One other major band was observed at 2100–2200 nm due to combination band for C–H and C=O bonds. The signal saturated above 2200 nm owing to the large path length of the transmission cell used. The high similarity between spectra reflected in their correlation coefficients, all of which exceeded 0.9921 and exposed the difficulty of constructing qualitative models affording the distinction of individual bases and quantitative models allowing their determination in the mixtures.

The 9 starting bases were used to establish 23 lubricant mixtures in terms of the desired final properties. The spectra for the end products were also highly correlated, with a coefficient of at least 0.9913.

The primary aims were to identify and discriminate each lubricant base and preparation from spectral libraries, and to confirm whether the mixtures contained any of the additives typically added to the formulations. In addition, we used PLS models to determine the components of each formulation and the viscosity of the final lubricants at 40 and 100 °C.

3.1. Discriminating lubricant bases and preparations

In this study, we have constructed two libraries: The first one has been built for the identification of the lubricant bases. The second library has been constructed for the identification of the final lubricant formulations and also capable of identifying whether a mixture containing additives that are added to the formulation.

The lubricant bases identification library (or first spectral library) was constructed from 168 second-derivative spectra for various production batches of samples of the 9 lubricant bases, using the wavelength region of 1100–2200 nm, a threshold of 0.950 and an explained variance of 96%. These conditions allowed the accurate identification of the lubricant bases included in the library, which was validated both internally to avoid confusion between spectra for the lubricant bases and externally with 38 lubricant bases spectra not included in the library. It has been shown the correct identification of all lubricant bases and the absence of ambiguities in the identification process.

The identification of lubricant formulations without and with antioxidant additives added, was accomplished by using a second spectral library with the cascading method. This second spectral library, general library, contained 1034 second-derivative spectra spanning the wavelength range of 1100–2200 nm (threshold, 0.952; explained variance, 98%) for 23 different lubricant formulations with and without additives. Some compounds exhibited identification values below the threshold for more than one class and were thus identified ambiguously – more accurate

identification is required using sub-libraries. The spectral library used to identify the lubricant formulations was validated both internally to avoid confusion between spectra for the formulations and externally with 186 lubricant formulation spectra not included in the library. All formulations were thus identified and qualified unambiguously – lubricants containing no additives included.

An example that illustrates the ability of cascading libraries differentiation is the resolution of one ambiguity arisen between two lubricant formulations (lubricant formulation 1 and lubricant formulation 2) differing only slightly in their proportions of neopentylglycol and C8 acid (lubricant base 9) on the one hand, and pentaerythritol and C5–C7 acids (lubricant base 2). Both contained 0.05% BHT, but only lubricant formulation 2 included Silicone Fluid (0.012%). The correlation coefficient between the spectra for these lubricant formulations was >0.999. Their sub-library was constructed at a threshold of 0.86 and an explained variance of 99%. Table 2 shows the identification results obtained with the general library and the sub-library. The identification results in the general library show the ambiguity between the two lubricant formulations; it is necessary to employ the sub-library to identify each lubricant formulation correctly. As can be seen, the identification values in the sub-library were both lower than the threshold and correctly identified (positive identification), and the products were not identified correctly when they exceeded it (negative identification).

3.2. Construction of the calibration models

Once the identification of the lubricant formulation are been made, the system selects the appropriate calibration model for determining the composition and/or viscosity. Among 23 lubricant formulations, one has been chosen as an example to show the calibrations models built, for the determination of lubricant bases composition, additives composition and viscosity at 40 °C and 100 °C.

Lubricant formulation viscosity and composition were assessed in the selected sample consisting of a pentaerythritol base esterified with a mixture of pentanoic (C5) and heptanoic acid (C7), lubricant base 2 (50.6%), and other consisting of neopentylglycol esterified with heptanoic acid (C7), lubricant base 8 (48.65%). The NIR spectra for the two lubricant bases were very similar, with correlation coefficients above 0.997. The high spectral similarity between the two precluded the construction of a calibration model for accurately predicting samples from the industrial process.

A total of 21 samples were prepared by mixing the lubricant bases in proportions spanning a range of $\pm 5\%$ (w/w) around the nominal value for each. The samples were split into a calibration set that was used to construct the individual model for each variable (composition and viscosity) and a validation set consisting of samples not included in the previous one that were used to assess the predictive ability of the ensuing models. The samples included in the calibration set for viscosity and each lubricant formulation spanned the studied range in the corresponding variable.

The calibration models for each variable were constructed from both absorbance spectra and processed spectra (SNV, first and second derivative with Savitzky–Golay smoothing). Also, models spanned the whole spectral region (1100–2200 nm) and various ranges excluding non-absorbing zones in order to reduce spectral noise. Table 3 shows the best calibration models for lubricant formulation composition and viscosity at 40 and 100 °C. All models were very simple; thus, 2 PLS factors sufficed with second-derivative spectra spanning the wavelength ranges of 1100–1850 and 2000–2200 nm. The table also shows the figures of merit of the PLS calibration models, which testify to the predictive ability of the four models. A regression plot of NIR concentration values against reference values was linear, and had a slope and

Table 2
Identification values of lubricant formulation 1 and lubricant formulation 2 samples identified ambiguous in the general library (threshold 0.952). In the sub-library the threshold is fixed at 0.86. Positive identifications (ID value < 0.86) are in bold face.

Sample ^a	General library (threshold 0.952)			Sub-library (threshold 0.86)		
	Identification value as lubricant formulation 1	Identification value as lubricant formulation 2	Identified as	Identification value as lubricant formulation 1	Identification value as lubricant formulation 2	Identified as
1	0.572	0.880	Ambiguously	0.676	0.968	Lubricant formulation 1
2	0.380	0.942	Ambiguously	0.413	0.954	Lubricant formulation 1
3	0.473	0.863	Ambiguously	0.326	0.951	Lubricant formulation 1
4	0.915	0.600	Ambiguously	0.963	0.530	Lubricant formulation 2
5	0.885	0.517	Ambiguously	0.915	0.641	Lubricant formulation 2

^a Samples 1, 2 and 3 belong to lubricant formulation 1; samples 4 and 5 belong to lubricant formulation 2.

Table 3
Figures of merit for the four partial least squares (PLS) calibration models (two lubricant bases composition and viscosity at 40 and 100 °C) corresponding to a lubricant formulation.

Factor	Lubricant base 2	Lubricant base 8	Viscosity at 40 °C	Viscosity at 100 °C
Range	48.47–53.51%	46.49–51.53%	9.44–10.00 mm ² /s	2.68–2.78 mm ² /s
Calibration				
Number of samples	14	14	14	14
Y-explained variance (%)	99.8	99.8	99.7	99.6
RSEC (%)	0.143	0.149	0.106	0.072
RMSEC	0.07	0.07	0.01	0.002
[NIR value] = A + B[Ref value]				
Correlation (<i>r</i>)	0.999	0.999	0.998	0.998
Intersection (<i>A</i>)	0 ± 1	0 ± 1	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.1
Slope (<i>B</i>)	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
Validation				
Number of samples	7	7	6	7
RSEP (%)	0.107	0.111	0.069	0.078
RMSEP	0.05	0.05	0.01	0.002
[NIR value] = A + B[Ref value]				
Correlation (<i>r</i>)	0.999	0.999	0.995	0.997
Intersection (<i>A</i>)	1 ± 2	1 ± 2	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.2
Slope (<i>B</i>)	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.96 ± 0.09

Wavelength range of 1100–1850, 2000–2200 nm, with 2 PLS factors and second derivative spectral pretreatment.

Table 4
Figures of merit for the four partial least squares (PLS) calibration models (two lubricant bases and two additives) corresponding to a lubricant formulation.

Factor	Lubricant base 2	Lubricant base 8	TCP	BHT
Range	48.60–53.00%	46.96–50.66%	0.0–1.5%	0.0–0.075%
Calibration				
PLS factors	4	4	3	7
Number of samples	14	14	15	14
Y-explained variance (%)	98.8	98.5	99.6	99.6
RSEC (%)	0.31	0.341	2.745	3.113
RMSEC	0.16	0.17	0.03	0.001
[NIR value] = A + B[Ref value]				
Correlation (<i>r</i>)	0.994	0.993	0.998	0.998
Intersection (<i>A</i>)	0 ± 3	0 ± 1	0.00 ± 0.07	0.000 ± 0.002
Slope (<i>B</i>)	0.99 ± 0.07	0.98 ± 0.08	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
Validation				
Number of samples	8	9	7	5
RSEP (%)	0.572	0.618	4.546	26.39
RMSEP	0.29	0.29	0.04	0.0109
[NIR value] = A + B[Ref value]				
Correlation (<i>r</i>)	0.982	0.972	0.994	0.979
Intersection (<i>A</i>)	3 ± 9	1 ± 2	0.0 ± 0.1	0.03 ± 0.05
Slope (<i>B</i>)	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2

Wavelength range of 1100–1850, 2000–2200 nm, second derivative as spectral pretreatment.

intercept not significantly different from 1 and 0, respectively, at the 95% confidence level.

The predicted values for the composition of the lubricant formulation and viscosity of 16 production batches were not significantly different from the specifications, testifying again to the high predictive ability of the proposed models.

The experimental work was supplemented with tests involving the determination of the additives typically added at the end of the lubricant formulation production process. A total of 26 samples were prepared by mixing lubricant's bases spanning a concentration range around $\pm 5\%$ (w/w) of their nominal value and two additives having a nominal concentration of 0.7 and 0.05%, respectively, that were used at concentrations from 0 to 1.5% and 0 to 0.08%, respectively. As before, the samples were split into a calibration set and a validation set to construct calibration models for the composition of the two lubricant's bases and antioxidants. Table 4 shows the ensuing calibration models. All were simple – albeit more complicated than those for lubricant base composition alone – and included 3 PLS factors for the lubricant's bases and 7 for the additives (second-derivative spectra, wavelength ranges of 1100–1850 and 2000–2200 nm). Table 4 additionally shows the figures of merit of the PLS calibration models, which reflect the good predictive ability of the four PLS models. A regression plot of NIR concentration values against reference values was linear and had a slope and intercept not significantly different from 1 and 0, respectively, at a 95% confidence level.

The predicted values of the composition of lubricant bases and additives of 16 production batches were not significantly different from the specifications, testifying again to the high predictive ability of the proposed models.

4. Conclusions

As shown in this work, NIR spectroscopy in combination with multivariate calibration models affords analytical control of composition and physical properties. The proposed method allows both the identification of components of lubricant formulations with very similar spectra, the detection of antioxidants present in the

formulations and the simultaneous determination of components and additives in a lubricant formulation for which no analytical control method had previously been reported. The construction of cascading libraries allows the identification of the presence of low contents of additives in formulations. The proposed method, which affords the accurate simultaneous determination of all sample components in a short time (1 min), requires no sample pretreatment; also, it uses no reagents and produces no waste.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Technology (Project CTQ2009-08312). David Zamora also wishes to acknowledge additional support in the form of a scholarship from Universitat Autònoma de Barcelona. The authors are also indebted to the firm Croda (Fogars de la Selva, Spain) for kindly supplying the samples.

References

- [1] G.E. Totten, S.R., Westbroock, R.J. Shah, *Fuels and Lubricants Handbook: Technology, Properties, Performance, and Testing*, ASTM Manual Series: MNL37WCD, West Conshohocken, PA, USA, 2003.
- [2] F. Haus, J. German, G.A. Junter, *Chemosphere* 45 (2001) 982–990.
- [3] A. Willing, *Chemosphere* 43 (2001) 89–98.
- [4] K.N. Marsh, M.E. Kandil, *Fluid Phase Equilib.* 199 (2002) 319–334.
- [5] T. Wakabayashi, S. Suda, *J. Jpn. Pet. Inst.* 51 (2008) 134–142.
- [6] A. Lucia, Q. Luo, *Adv. Environ. Res.* 6 (2002) 123–134.
- [7] A.S. Pensado, M.J.P. Comuñas, L. Lugo, J. Fernández, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 2394–2404.
- [8] A.S. Pensado, M.J.P. Comuñas, J. Fernández, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 9171–9183.
- [9] O. Fandiño, M.J.P. Comuñas, L. Lugo, E.R. López, J. Fernández, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 1429–1436.
- [10] A.S. Pensado, A.A.H. Pádua, M.J.P. Comuñas, J. Fernández, *J. Supercrit. Fluids* 44 (2008) 172–185.
- [11] P. Baptista, P. Felizardo, J.C. Menezes, M.J. Neiva Correia, *Talanta* 77 (2008) 144–151.
- [12] M. Blanco, S. Maspocho, I. Villarroja, X. Peralta, J.M. González, J. Torres, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 133–141.
- [13] M. Blanco, D. Zamora, J. Planells, R. Mulero, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 839–844.
- [14] M. Blanco, M.A. Romero, *Analyst* 126 (2001) 2212–2217.

Improving the efficiency of ion mobility spectrometry analyses by using multivariate calibration.

Analytica Chimica Acta

726 (2012)50-56.



Improving the efficiency of ion mobility spectrometry analyses by using multivariate calibration

David Zamora, Marcelo Blanco*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2012

Received in revised form 7 March 2012

Accepted 14 March 2012

Available online 23 March 2012

Keywords:

Ion mobility spectrometry

Contraceptives

Ethinylestradiol

Desogestrel

Multivariate calibration

Chemometrics

ABSTRACT

The simplicity, sensitivity and expeditiousness of ion mobility spectrometry (IMS) make it especially useful for the determination of active principal ingredients (APIs) present at low concentrations in pharmaceuticals. However, the poor resolution of this technique precludes the identification and/or determination of substances with similar molecular weights, which exhibit also similar drift times and give overlapped peaks as a result. Oral contraceptives are pharmaceutical formulations containing two APIs of similar molecular weights at very low concentrations which therefore give strongly overlapped peaks hindering their determination by IMS. In this work, we assessed the potential of IMS for detecting and quantifying the contraceptives ethinylestradiol (ETE) and desogestrel (DES) in commercial tablets. To this end, we used various chemometric techniques including a second-derivative (TN2D) algorithm and the more powerful choice Multivariate Curve Resolution (MCR) to improve the resolution of IMS and enable the determination of both APIs. Quantitation was based on PLS1 models for each API. The models constructed involve a single PLS factor with a *Y*-explained variance above 98.4%, obtaining a RMSEP of 0.34 and 0.63 for ETE and DES, respectively. The ensuing method, which was validated for use in routine analyses, is quite expeditious (analyses take less than 1 min) and uses very small amounts of sample (a few microliters). Based on the results, IMS has a great potential for the qualitative and quantitative determination of APIs in low doses.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

By virtue of its simplicity, sensitivity and expeditiousness, ion mobility spectrometry (IMS) is a highly suitable technique for determining trace amounts of a wide variety of products [1–4]; however, IMS is preferentially used as a screening technique for characterizing both natural and synthetic products.

In IMS, the ions formed in a gaseous phase under atmospheric pressure are separated according to their velocity under the action of a constant electrical field. On these grounds, IMS can be considered a gas-phase electrophoretic technique. Differences in ion mobility in a counterflow under an electrical field arise from differences in molecular weight, charge and geometry between compounds. IMS analyses involve volatilizing the sample, transferring the resulting vapor to an ionization chamber and subsequently applying an electrical field to cause ions to migrate through a drift tube for separation and eventual detection. Then a small volume of sample solution is placed onto a membrane that is abruptly heated to completely or partially volatilize the target species. Such species

are then ionized by using a radioactive, photoionization or corona discharge source to avoid molecular fragmentation as far as possible. The ionization zone is isolated from the drift tube by a shutter grid that is opened for a short time to allow the ions to enter the drift tube. The tube is typically 5–10 cm long and used to circulate a drift gas upstream in order to expel neutral molecules and delay the travel of the ions through the drift tube. The applied electrical field leads the ions to a detector usually consisting of a Faraday plate. Ionic species are separated according to their mobility (*K*), which depends on their mass, size and shape:

$$K = \frac{d}{t_d \times E} \quad (1)$$

d being the length of the drift tube, *E* the applied electrical field and *t_d* the drift time. Mobility values are usually normalized to the standard pressure and temperature in order to obtain a reduced mobility constant *K₀* (cm² V⁻¹ s⁻¹) which allows the time a given ion takes to reach the detector (*i.e.* the drift time, *t_d*) to be easily calculated. The constant can be calculated from

$$K_0 = K \left(\frac{273}{T} \right) \left(\frac{p}{101} \right) \quad (2)$$

where *T* (K) and *p* (kPa) are the temperature and pressure in the drift zone.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.
E-mail address: Marcel.Blanco@uab.es (M. Blanco).

The features of IMS have enabled its use as a routine tool for detecting trace amounts of substances in a variety of military and security applications [5,6], crime and drug detection [7,8], food analyses [9–11], drug analyses [12–16] and process monitoring [17,18]. However, its poor resolution precludes the identification and/or determination of substances with similar molecular weights, which have very similar drift times and give strongly overlapped peaks as a result.

Oral contraceptives are pharmaceutical formulations containing an estrogen and a progestagen. Ethinylestradiol (ETE) is the most widely used estrogen, followed by mestranol. A progestagen is a derivative of 19-nortestosterone [e.g. levonorgestrel, desogestrel (DES), gestodene], one of 17 α -hydroxyprogesterone (e.g. cyproterone acetate, medroxyprogesterone acetate) or a spironolactone (e.g. drospirenone). Some analytical methods for the quantitation of contraceptives (particularly colorimetric [19,20], UV spectrometric [21–23] and fluorimetric methods [24–26]) are subject to many interferences. High performance liquid chromatography (HPLC), which is the usual choice for this purpose [27–31], is slow, uses large amounts of solvents and reagents, and frequently provides inadequate sensitivity. Ion mobility spectrometry is an effective choice for analyzing oral contraceptives; however, the usual similarity in molecular weight of the target analytes leads to overlapped peaks in the plasmagram and can hinder their accurate determination owing to the poor resolution achieved.

The purpose of this work was to test various multivariate techniques with a view to selecting the best choice for correcting peak overlap in IMS analyses. The problem is worsened if the analytes additionally have similar ionization potentials, which can lead to mutual interferences in their determination. The IMS technique was previously used in combination with classification chemometric tools [32,33] and quantitation chemometric tools [34–38] in several studies.

2. Experimental

2.1. Reagents and solvents

17 α -Ethinylestradiol and desogestrel were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Isopropanol 99.5% pure was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium) and methanol from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Water for the chromatographic mobile phase was purified by passage through a Milli-Q- system from Millipore (Madrid, Spain).

Whatman 2 mm PTFE filters 46.2 mm in diameter (Teflon substrate) were purchased from Vidafroc (Barcelona, Spain). The drift gas used was nitrogen (5.0) supplied by Abelló Linde (Barcelona, Spain).

The oral contraceptive studied was Microdiol, from Schering-Plough (Madrid) – N.V. Organon, Oss (The Netherlands), available as biconvex, round tablets 6 mm in diameter. Each tablet contained 30 μ g of ETE and 150 μ g of DES.

Sample solutions were prepared by placing a pre-weighed tablet in a 10 mL volumetric flask containing 5 mL of isopropanol, sonicating for 20 min and making to volume with 10 mL of isopropanol. An aliquot of the resulting suspension was centrifuged at 5000 rpm for 5 min and a fraction of the supernatant transferred to a vial for subsequent analysis by HPLC following passage through a nylon membrane filter of 0.45 μ m pore size.

2.2. IMS procedure

We used an IONSCAN-LS 400B instrument from Smiths Detection (Morristown, NJ, USA) equipped with a ⁶⁵Ni radioactive ionization source and an autosampler. Plasmagrams were acquired

in the positive mode, using nicotinamide ($K_0 = 1.86 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) as internal standard. The shutter grid width was 0.2 ms and each plasmagram was acquired for a drift time of 30 ms. The number of segments per analysis was 120 and each plasmagram comprised 579 data points. A counterflow of dry nitrogen flowing at a rate of 300 mL min⁻¹ was introduced at the end of the drift region. With a total drift voltage of 1763 V and a drift tube length of 7 cm, the electric field strength in such a region was 252 V cm⁻¹.

Samples were introduced into the ionization region by thermal desorption. A volume of a few microliters of sample solution in a volatile solvent was placed on a Teflon membrane that was heated to vaporize the analytes and transfer them to the ionization chamber for subsequent separation in the drift tube. Fig. 1 depicts the experimental set-up and sample introduction system. The desorption, inlet and drift tube temperatures were set after an optimization process to the values: 140, 200 and 232 °C, respectively.

2.3. HPLC procedure

A model 1100 chromatographic system from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a vacuum degasser, binary pump, autosampler, column thermostat and diode array detector was used. UV–vis spectra were automatically acquired in 2 nm steps over the wavelength range 190–400 nm for all peaks. The column used was a Symmetry ShieldTM RP18 model 250 mm in length and 4.6 mm in i.d. (particle size 5.0 μ m, pore diameter 100 Å) from Waters Corporation (Milford, MA, USA).

The chromatographic conditions used were as follows: 90:10 methanol/water at a flow-rate of 1 mL min⁻¹ as mobile phase, 25 °C as column temperature, 10 μ L as injected volume and 202 nm as detection wavelength. Under these conditions, the retention times of ETE and DES were 4.1 and 9.8 min, respectively.

2.4. Software

Plasmagrams were acquired and processed with the software IMStation 5.3.8 from Smiths Detection (Warren, NJ, USA). The spectrometer's bundled software calculated the maximum amplitude (MaxA), in digital units (du), which corresponded to the greatest peak height, and also the cumulative amplitude (CumA), which was the combination of all maximum amplitudes or peak heights throughout the desorption process (analysis time). The TN2D (truncated N2 derivative) choice included in IMStation improves the discrimination of close peaks by isolating the signal corresponding to each component; this involves calculating the second derivatives of the signals and suppressing the negative portions.

Calibration models were constructed with the software Unscrambler 9.8 from CAMO Software AS (Oslo, Norway) and Partial Least-Squares (PLS1) models by cross-validation, using the leave-one-out method. The quality of the models was assessed in terms of the relative standard error of calibration (RSEC) or validation (RSEP), and of the root mean square error (RMSEC for calibration and RMSEP for prediction).

The Multivariate Curve Resolution-Alternate Least-Squares (MCR-ALS) algorithm was applied by using the software GUIPRO [39,40] as implemented in Matlab R2009b [41]. The initial estimate prior to deconvolution was obtained by using the “needle search” method following selection of the number of components to be used with GUIPRO.

3. Results and discussion

The contraceptives studied were 17 α -19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol] (ethinylestradiol, ETE) and 13

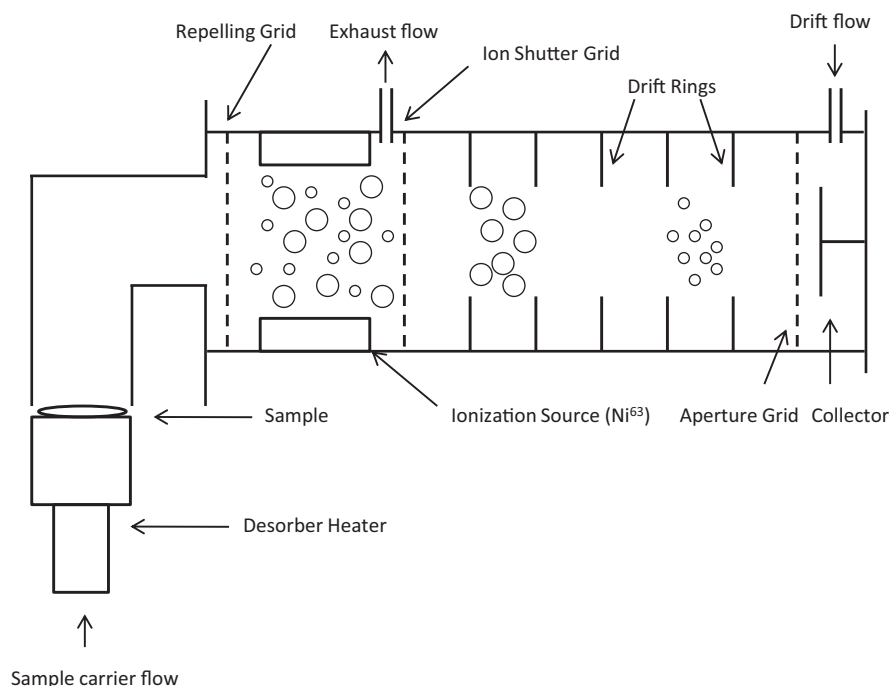


Fig. 1. Scheme of ion mobility spectrometer showing the sample inlet, ionization chamber, drift tube and detector.

-ethyl-16-ethinyl-11-methylidene-1,2,3,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-ol (desogestrel, DES). ETE is an orally active estradiol derivative typically used in combination with DES as progestagen. The nominal contents of the APIs in each Microdiol tablet were 30 μg of ETE and 150 μg of DES.

Fig. 2 shows the plasmagram for a solution containing both APIs. The strongest peak corresponded to the internal standard ($K_0 = 1.8600 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), which additionally acted as ionizing reagent. As can be seen, the signal was decreased by effect of ionizing the analytes. ETE exhibited a signal at $t_d = 14.89 \text{ ms}$ with a reduced mobility constant $K_0 = 1.1862 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and DES one at $t_d = 15.65 \text{ ms}$ with $K_0 = 1.1291 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. No peaks at shorter drift times were observed at the desorber, inlet and drift tube temperatures used, so no fragmentation of the analytes occurred.

The peaks for the two compounds were overlapped in part and only one was observed when either compound was present at a high concentration relative to the other.

3.1. Instrumental variables affecting the IMS signal

Developing an effective method for the routine determination of contraceptives in tablet formulations requires careful examination of the influence of external factors on the IMS response of the analytes. In this work, we examined the influence of the solvent nature, desorber temperature and injected sample volume, which was assessed *via* the maximum amplitude of the IMS peaks for ETE and DES. The equipment's bundled software automatically calculated the maximum amplitude (*viz.* the maximum peak height of all plasmagram segments where each analyte was detected). The software additionally provided the cumulative amplitude, but this parameter was of no use for quantitation owing to the strong overlap between the peaks.

The results for ETE and DES standards in isopropanol and acetone revealed that their signals were unaffected by the nature of the solvent. We thus chose to use isopropanol on the grounds of its lower volatility.

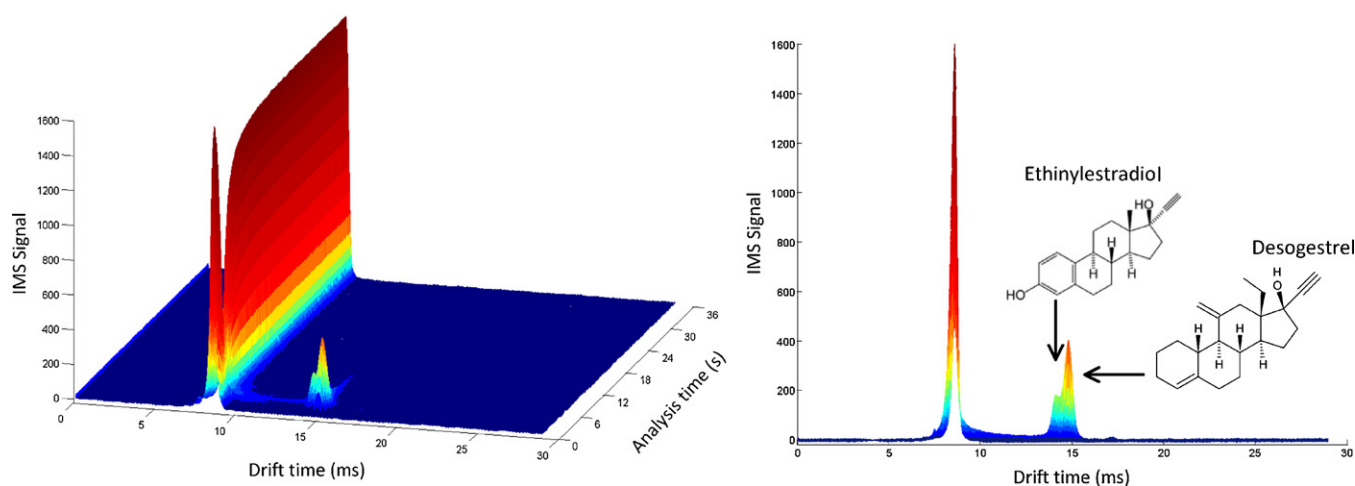


Fig. 2. Plasmagram of ethinylestradiol and desogestrel sample in 3D and a frontal view representing the IMS signal vs drift time (ms).

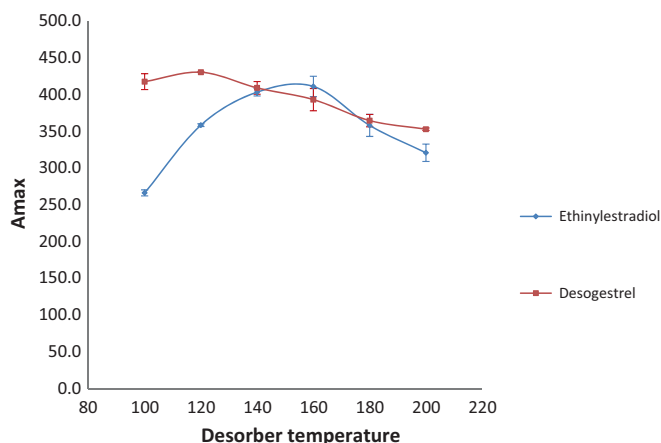


Fig. 3. Effect of desorber temperature on the maximum amplitude of the ethinylestradiol and desogestrel signal ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$; sample volume $2 \mu\text{L}$; inlet and drift tube temperature adjusted to 220 and 232°C , respectively). Each point is obtained by averaging the result from three injections of the same standard. The errors bars of each point are the standard deviation of the three injections.

The effect of the desorber temperature on the ETE and DES signals was assessed over the range 100 – 200°C , using an inlet and drift tube temperature of 220 and 232°C , respectively. Fig. 3 shows the signals for a mixture containing an ETE and DES concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ each in an aliquot of $2 \mu\text{L}$ which was placed on the membrane and allowed to dry for 15 s prior to introduction into the desorber, averaging the result of three injections of the same standard. The errors bars of each point are the standard deviation of the three injections. As can be seen, both analytes exhibited similar signal amplitude; however, the ETE signal peaked at 160°C and the DES signal at 120°C . We thus adopted an intermediate temperature (140°C) for further testing.

The influence of the injected sample volume was examined by injecting an identical absolute amount of each analyte in different volumes of solvent. To this end, a volume of $2 \mu\text{L}$ of a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution of analyte was added to variable volumes of solvent from 0 to $4 \mu\text{L}$ on the Teflon membrane while keeping the total amount of analyte deposited onto the membrane constant at 2 ng. As can be seen from Fig. 4, the analyte signal decreased with increasing total volume (solution + solvent) deposited onto the membrane. Fig. 4 has been constructed with the average of three replicates of the same standard, and the standard deviation of the replicates is showed as errors bars of each point. An identical effect was observed at higher concentrations (e.g. with injections of a

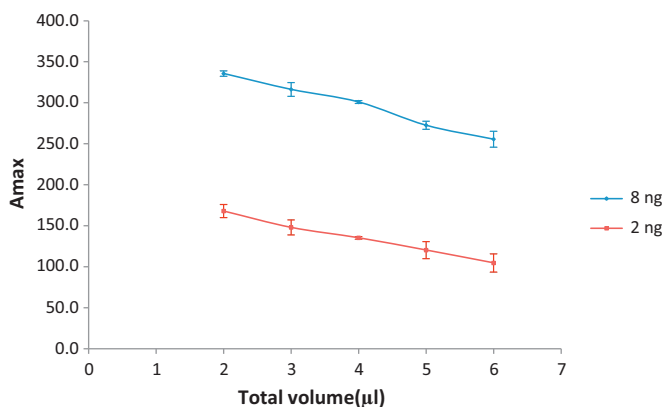


Fig. 4. Effect of sample volume on the maximum amplitude of the ethinylestradiol signal ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$; desorber, inlet and drift tube temperature adjusted to 140 , 220 and 232°C , respectively). Errors bars represent the standard deviation of the triplicate measured of each point.

$4 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution, which placed an amount of 8 ng of analyte on the membrane). We found no explanation for this phenomenon in the literature, so we chose to use an identical volume of $2 \mu\text{L}$ in all subsequent tests.

The operating conditions used were thus as follows: isopropanol as solvent, a desorber temperature of 140°C , an injected volume of $2 \mu\text{L}$ and a drying time of 15 s.

3.2. Qualitative results: resolution of overlapped signals

Injecting a solution containing both analytes provided a single IMS peak owing to the similarity of their molecular masses (296 and 310 g mol^{-1} , respectively); this precluded their simultaneous detection and quantitation. The mixture was resolved by using various chemometric algorithms including TN2D and MCR. Using the second-derivative algorithm included in the IMS instrument's software afforded discrimination of the analytes. Fig. 5 shows the resolved peaks thus obtained.

One other resolution method used involved deconvoluting the signals by using the Multivariate Curve Resolution (MCR) algorithm. To this end, the 2D matrix for the dataset containing the A_{max} values obtained at drift times of 14 – 16.5 ms and desorption times of 0 – 36 s in each plasmagram was subjected to MCR processing. This provided two vectors containing the corresponding spectral profiles and desorption profiles, respectively, for the target species. The drift times of the MCR spectral profiles were quite consistent with those of the individual plasmagrams for the two mixture components (see Fig. 5).

The two algorithms used afforded accurate resolution of overlapped peaks and thus enabled identification of the two analytes.

3.3. Quantitative results

Quantifying both analytes from a single plasmagram was impossible owing to the strong overlap of their peaks and required using calibration curves constructed from the maximum amplitudes as calculated with the TN2D and MCR algorithms.

A set of calibration curves for each API was obtained by using the TN2D algorithm over the concentration range 1 – $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. The ensuing equations, based on the A_{max} values obtained after pre-processing, were

$$A_{\text{max}} = 0.54 \text{ ng ETE} - 0.74 \quad (R^2 = 0.997) \text{ for ETE} \quad (3)$$

and

$$A_{\text{max}} = 0.28 \text{ ng DES} + 0.45 \quad (R^2 = 0.989) \text{ for DES} \quad (4)$$

Interpolating the A_{max} values for binary mixtures of the two analytes into the previous calibration curves gave underestimated analyte concentrations (about 80% smaller amounts).

We then used the MCR algorithm to resolve the plasmagrams. To this end, the 2D matrices of the plasmagrams for mixtures of known composition were retrieved and subjected to MCR over the ranges 14 – 16.5 ms (drift time) and 0 – 36 s (desorption time). The maximum amplitude values thus obtained were used to construct A_{max} versus concentration curves. The equations provided by the MCR algorithm were as follows:

$$A_{\text{max}} = 11.278 \text{ ng ETE} + 16.85 \quad (R^2 = 0.994) \text{ for ETE} \quad (5)$$

and

$$A_{\text{max}} = 10.928 \text{ ng DES} + 7.6394 \quad (R^2 = 0.985) \text{ for DES} \quad (6)$$

An identical treatment was applied to mixtures of known composition of the two analytes. As with TN2D, the results were underestimated relative to the reference concentrations. This suggested that each species decreased the signal of the other (i.e. that

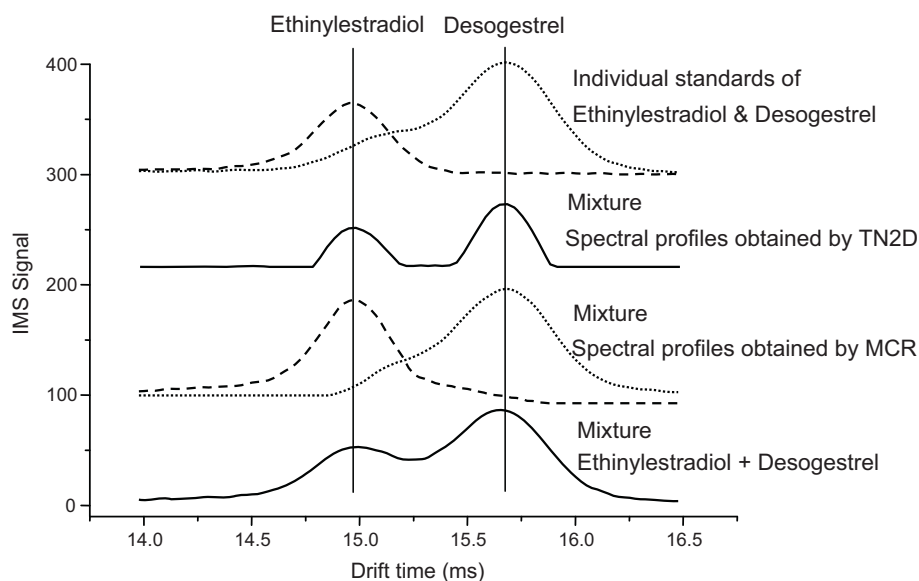


Fig. 5. IMS plasmagram average of a mixture of ethinylestradiol and desogestrel and the spectral profiles obtained by the application of TN2D and MCR.

each analyte interfered with the determination of the other). This hypothesis was tested by injecting solutions of a pure analyte containing increasing amounts of the other: $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ETE standards containing 0, 12, 15 or $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ DES and $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ DES standards containing 0, 1.5, 2 or $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ETE. Fig. 6 shows the A_{max} values obtained for each API in the presence of increasing concentrations of the other. Each point is the average of three injections, and the standard deviation is shown by the errors bars. As can be seen, the signal for each analyte was a function of the concentration of the other. This result can be ascribed to a competitive equilibrium in the ionization process involving the transfer of a proton between the ionizing reagent (nicotinamide) and the analytes (ETE and DES). Both species competed for the proton, so the proportion of protonated species formed was dependent on the concentration of both APIs [42,43]. This precluded quantifying both from the univariate calibration curves obtained from maximum amplitude signals for individual standards of each API, even if overlapped peaks were resolved.

One way of addressing the determination of species competing for ionization is by using the PLS algorithm to construct multivariate calibration models from mixtures of the two APIs exhibiting a low correlation between their concentrations in order to ensure adequate robustness. In this work, we used 21 solutions containing ETE and DES at concentrations over the ranges 1.5–4.5 and 8–22 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, both of which fell within the instrument's linear response range, and a correlation coefficient of 0.22 for the API concentrations. The samples were distributed between a calibration set that was used to construct the individual models for the two APIs and a validation used to assess their predictive ability.

The maximum desorption times in the different plasmagrams were all shorter than 12 s. The average plasmagram for desorption times of 1.50–11.10 s was used to select the signal obtained at drift times from 14 to 16.5 ms – no signals appeared outside this range. These untreated, truncated plasmagrams for the calibration set were used to construct PLS models for each API. Table 1 shows the best calibration models for the two. As can be seen, all were very simple: they involved a single PC and no spectral treatment. Table 1 additionally shows the figures of merit of the PLS calibration models, validation of which revealed an adequate predictive ability.

The models were used to determine the two analytes in individual Microdiol tablets and simultaneously assess their content

uniformity. To this end, two 10 tablets sets from two different production batches with a nominal ETE and DES content of 30 and 150 μg per tablet, respectively, were used. Each tablet was analyzed with the proposed IMS method and the HPLC reference method. The analyses done for each tablet sets were performed on different

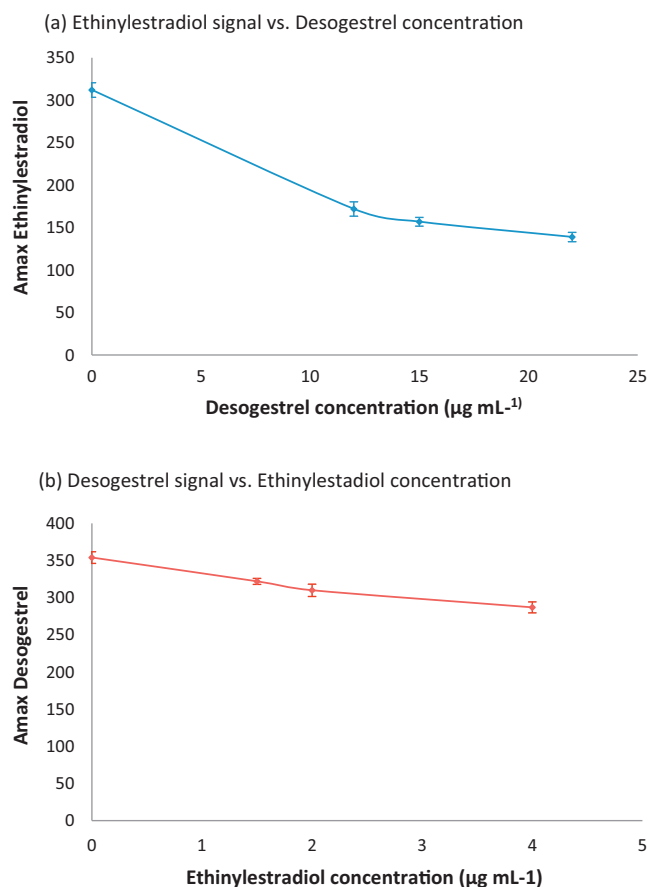


Fig. 6. IMS signal of API's individual and with the presence of the other API. (a) Ethinylestradiol signal vs concentration of desogestrel. (b) Desogestrel signal vs concentration of ethinylestradiol. Errors bars show the standard deviation from the three replicates of each point.

Table 1
Figures of merit for the two partial least squares (PLS) calibration models.

Factor	Ethinylestradiol	Desogestrel
Calibration:		
Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.5–4.5	8.0–22.0
Number of samples	11	12
Y-explained variance (%)	98.41	98.82
RSEC (%)	4.23	3.06
RMSEC	0.13	0.46
[IMS value]=A+B [Ref value]		
Correlation (<i>r</i>)	0.992	0.994
Intercept (A)	0.0 ± 0.3	0 ± 1
Slope (B)	0.98 ± 0.09	0.99 ± 0.07
Validation:		
Number of samples	6	5
RSEP (%)	11.63	4.20
RMSEP	0.34	0.63
[IMS value]=A+B [Ref value]		
Correlation (<i>r</i>)	0.954	0.988
Intercept (A)	0 ± 1	1 ± 2
Slope (B)	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.3

Drift time range 14.0–16.5 ms, analysis time range 1.50–11.10 s, with 1 PLS factor and without spectral pretreatment.

days and the results has been obtained applying the same calibration model. A *t*-test on the residuals for the two APIs revealed that the concentrations provided by the two methods were not significantly different at $p=0.05$ ($n=10$, $t_{\text{exp}}=1.24$, $t_{\text{crit}}=2.26$ for ETE; and $n=10$, $t_{\text{exp}}=0.56$, $t_{\text{crit}}=2.26$ for DES).

The proposed IMS method was validated for the determination of the two APIs in Microdiol tablets in accordance with the guidelines of the Internal Conference of Harmonization (ICH) for pharmaceuticals [44]. The specific validation parameters used included specificity, linearity (LOD and LOQ), accuracy and precision. The results are shown in Table 2.

Specificity was assessed as constancy in the drift times by calculating the standard deviation in the drift time for 30 injections of solutions containing both APIs.

Linearity was assessed by analyzing various mixtures containing ETE and DES at concentrations over the ranges 1.5–4.5 and 8–22 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Linearity was established by linear regression of the reference values against the IMS determined values. The equation for the linear regression was

$$[\text{IMS value}] = A + B[\text{Ref value}] \quad (7)$$

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the *y*-intercepts of the regression lines divided by the slope of the calibration curve.

Accuracy was estimated by comparing the IMS results with those of the reference method as applied to 10 tables. A paired *t*-test revealed the absence of significant differences at $p=0.05$ between the two methods.

Finally, repeatability was assessed by analyzing 6 replicates of a Microdiol sample.

Table 3
Uniformity of content test for microdiol tablets.

Batch	Compound	API nominal content per tablet (μg per tablet)	API content average for 10 tablets ^a	R.S.D. (%)	AV
A	Ethinylestradiol	30	29.08	2.3	2.50
	Desogestrel	150	155.47	2.2	13.70
B	Ethinylestradiol	30	30.25	4.5	4.21
	Desogestrel	150	156.63	2.4	14.44

^a IMS content of API (μg per tablet).

Table 2
Validation parameters for the ethinylestradiol and desogestrel quantitation with the proposed IMS method.

Parameter	Measurements	Result	
		Ethinylestradiol	Desogestrel
Specificity	Number of injections	30	30
	td average (ms)	14.89	15.65
	S.D.	0.015	0.011
Linearity	<i>n</i>	11	12
	Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.5–4.5	8.0–22.0
	Intercept	0.0 ± 0.3	0 ± 1
	Slope	0.98 ± 0.09	0.99 ± 0.07
	<i>R</i> ²	0.982	0.987
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0.38	1.7
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		1.11	5.15
Accuracy	<i>n</i>	10	10
	Average difference (μg)	0.46	0.70
	S.D.	1.17	3.95
	t_{exp}	1.24	0.56
	t_{crit}	2.26	2.26
Repeatability	Replicates	6	6
	RSD %	1.32	0.56

3.4. Content uniformity testing

In a recent update, the European Pharmacopoeia established that compliance with Content Uniformity Testing should be established by calculating the Acceptance Value [45]:

$$AV = |M - \bar{X}| + ks \quad (8)$$

where *M* is the reference value depending on the value of \bar{X} :

M is 98.5% if $\bar{X} < 98.5\%$.

M is \bar{X} if \bar{X} is between 98.5% and 101.5%.

M is 101.5% if $\bar{X} > 101.5\%$.

The others terms from Eq. (8) are: \bar{X} is the mean of individual contents; *n* is the number of samples; *k* is the acceptability constant (a tolerance factor equal to 2.4 with $n=10$ and 2.0 with $n=30$); and *s* is the standard deviation for the sample. AV for the determination of the API content in 10 tablets should be less than 15. Table 3 shows the results of the content uniformity test as applied to two different tablet batches. As can be seen, the specification was fulfilled.

The proposed IMS method is especially fast. Thus, determining the APIs in a tablet took 40 s versus 15 min with the HPLC method, even though both use the same sample preparation procedure. The previous results confirm that the IMS method is an effective alternative to the HPLC determination of the APIs in the commercial pharmaceutical formulation Microdiol.

4. Conclusions

The joint use of the IMS technique and various chemometric methods allows the simultaneous identification and determination of APIs exhibiting strong spectral overlap by effect of their similarity in molecular weight in commercial tablets. Overlapped peaks for the APIs can be resolved by using second-derivative (TN2D) and MCR algorithms, which enable discrimination of the APIs and their accurate identification. Also, using IMS in combination with PLS calibration allows both APIs to be determined in commercial tablets and overcomes their mutual interference. The proposed method was validated in accordance with the ICH guidelines and thus provides an effective alternative to the existing HPLC method.

The analytical simplicity of IMS and its expeditiousness make this technique a useful choice for routine analyses with the added advantage that it uses small amounts of solvents and hence produces little waste.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge funding of this work by Spain's Ministry of Science and Technology (Project CTQ2009-08312). David Zamora wishes to acknowledge additional support in the form of a scholarship for Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- [1] G.A. Eiceman, Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*, second ed., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 2005.
- [2] H. Bordsdorf, G.A. Eiceman, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (4) (2006) 325–375.
- [3] R.H. St Louis, H.H. Hill Jr., *Anal. Chem.* 21 (5) (1990) 321–355.
- [4] H.H. Hill, W.F. Siems Jr., R.H. St Louis, D.G. McMinn, *Anal. Chem.* 62 (23) (1990) 1201A–1209A.
- [5] T.L. Buxton, P.B. Harrington, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 269–282.
- [6] R.G. Ewing, D.A. Atkinson, G.A. Eiceman, G.J. Ewing, *Talanta* 54 (3) (2001) 515–529.
- [7] F.E. Dussy, C. Berchtold, T.A. Briellmann, C. Lang, R. Steiger, M. Bovens, *Forensic Sci. Int.* 177 (2008) 105–111.
- [8] T. Keller, A. Schneider, E. Tutsch-Bauer, J. Jaspers, R. Aderjan, G. Skopp, *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 2 (1) (1999) 22–34.
- [9] W. Vautz, D. Zimmermann, M. Hartmann, J.I. Baumbach, J. Nolte, J. Jung, *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 1064–1073.
- [10] W. Vautz, J.I. Baumbach, J. Jung, *J. Inst. Brew.* 112 (2006) 157–164.
- [11] Z. Karpas, B. Tilman, R. Gdalevsky, A. Lorber, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 155–163.
- [12] M.A. Strege, J. Kozerski, N. Juarbe, P. Mahoney, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3040–3044.
- [13] C. Qin, A. Granger, V. Papov, J. McCaffrey, D.L. Norwood, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 107–113.
- [14] M.A. Strege, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4576–4580.
- [15] R. Fernández-Maestre, H.H. Hill, *Int. J. Ion Mobility Spectrom.* 12 (2009) 91–102.
- [16] P. Dwivedi, C. Wu, L.M. Matz, B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill Jr., *Anal. Chem.* 78 (2006) 8200–8206.
- [17] W. Vautz, W. Mauntz, S. Engell, J.I. Baumbach, *Macromol. React. Eng.* 3 (2009) 85–90.
- [18] E.L. Harry, A.W.T. Bristow, I.D. Wilson, C.S. Creaser, *Analyst* 136 (2011) 1728–1732.
- [19] *Basic Tests for Pharmaceutical Substances*, World Health Organization, Geneva, 1986, pp. 75–76.
- [20] R. Pasini, G. Gavazzi, *J. Pharm. Sci.* 58 (1969) 872–874.
- [21] R.E. Graham, P.A. Williams, C.T. Kenner, *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 1152–1156.
- [22] J.J.B. Nevado, J.R. Flores, G.C. Peñalvo, *Anal. Lett.* 30 (1997) 1029–1032.
- [23] J.J.B. Nevado, J.R. Flores, G.C. Peñalvo, *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 257–265.
- [24] T.J. James, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 1306–1308.
- [25] R.J. Templeton, W.A. Arnet, M.J. Jacouljevic, *J. Pharm. Sci.* 57 (1972) 1168–1172.
- [26] S. Hirai, A. Hussain, S. Babhir, *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 857–869.
- [27] M.I.R.M. Santoro, N.M. Kassab, M. Hasegawa, E.R.M. Kedor-Hackmann, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (6) (2002) 741–747.
- [28] A. Laban, S. Markovic, M. Stankov, P. Djurdjevic, *Anal. Lett.* 37 (2) (2004) 273–282.
- [29] D. Matějček, V. Kubáň, *Anal. Chim. Acta* 508 (2007) 304–315.
- [30] T.A. Denisova, V.V. Chistyakov, N.P. Sadchikova, *Pharm. Chem. J.* 42 (5) (2008) 291–293.
- [31] L. Sun, W. Yong, X. Chu, J.M. Lin, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 5416–5423.
- [32] R. Alonso, V. Rodríguez-Estévez, A. Domínguez-Vidal, M.J. Ayora-Cañada, L. Arce, M. Valcárcel, *Talanta* 76 (2008) 591–596.
- [33] R. Garrido-Delgado, L. Arce, A.V. Guamán, A. Pardo, S. Marco, M. Valcárcel, *Talanta* 84 (2011) 471–479.
- [34] P.B. Harrington, P.J. Rauch, C. Cal, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3247–3256.
- [35] G. Chen, P.B. Harrington, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 75–91.
- [36] G.M. Bota, P.B. Harrington, *Talanta* 68 (2006) 629–635.
- [37] C.G. Fraga, D.R. Kerr, D.A. Atkinson, *Analyst* 134 (2009) 2329–2337.
- [38] V. Pomareda, D. Calvo, A. Pardo, S. Marco, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 104 (2010) 318–332.
- [39] P.J. Gemperline, E. Cash, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4236–4243.
- [40] P.J. Gemperline, East Carolina University, http://personal.ecu.edu/gemperlinep/Research/gemper_software.html.
- [41] Matlab, version R2009b, The Mathworks, 2009.
- [42] G.A. Eiceman, L. Garcia-Gonzalez, Y.F. Wang, B. Pittman, *Talanta* 39 (5) (1992) 459–467.
- [43] R.R. Kunz, W.F. Dinatale, P. Becotte-Haigh, *Int. J. Mass Spectrom.* 226 (2003) 379–395.
- [44] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidelines. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2010, Section Q2(R1).
- [45] Uniformity of Content, General Chapter 2.9.6. Ph. Eur., seventh ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2011.