

3. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS MEDIANTE PROCEDIMIENTOS CINÉTICOS Y CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE

3.1 INTRODUCCIÓN.

Los métodos cinéticos han sido utilizados desde hace tiempo para la resolución de mezclas y, durante la última década, han sido publicadas varias revisiones de las principales aplicaciones [Cullen, 1997; Pérez-Bendito, 1996 y 1990; Quencer, 1993; Crouch, 1993; Otto, 1990; Love, 1994 a y b]. Como se ha mencionado anteriormente, estos métodos involucran especies similares que reaccionan con un mismo reactivo, aprovechando las diferencias entre los productos de reacción, el proceso cinético, o ambos, para la resolución de la mezcla sin que haya separación física.

Las principales limitaciones de los métodos de cálculo clásicos para el procesado de datos cinéticos son que requieren del conocimiento del modelo cinético, es decir, de las constantes de velocidad y los órdenes de reacción. Sin embargo, algunas técnicas de calibración multivariable como el PCR, PLS, ANN y las técnicas multidimensionales, no necesitan del conocimiento del modelo cinético y, por tanto, son muy útiles en sistemas cinéticos complejos.

En la última revisión que aparece en la bibliografía, Cullen y Crouch [Cullen, 1997] utilizan la clasificación de la calibración en función de la dimensión de los datos analíticos propuesta en [Booksh, 1994] y hacen referencia a las simulaciones como una herramienta para el estudio del comportamiento de los diferentes métodos de calibración frente a los parámetros

y características más importantes que afectan a un sistema cinético (ruido instrumental, fluctuaciones de las constantes de velocidad, solapamiento espectral y cinético, etc.). Por último, para cada tipo de calibración exponen las aplicaciones existentes para la resolución de mezclas.

Siguiendo con la línea de esta última publicación, en este apartado se va a realizar una revisión de las principales aplicaciones aparecidas desde 1997, mencionando los aspectos más relevantes de cada una de ellas. Sólo se considerarán las aplicaciones de la calibración multivariable a la resolución de mezclas, aunque también hayan aparecido en la bibliografía aplicaciones referidas al análisis de un único componente [Blanco, 1999].

En este apartado no se describen las aplicaciones objeto de esta tesis, las cuales serán comentadas con más detalle en el capítulo de resultados y discusión.

3.2 VISIÓN GLOBAL.

De todas las referencias encontradas en la bibliografía, se puede hacer una diferenciación entre aplicaciones a especies orgánicas e inorgánicas. Las tablas 2a y 2b muestran todas las aplicaciones, ordenadas por antigüedad, haciendo referencia a la técnica de calibración utilizada, el tipo de muestra, el reactivo y la referencia bibliográfica.

Tabla 2a. Aplicaciones recientes de los métodos cinéticos a la resolución de mezclas de especies orgánicas mediante calibración multivariable.

Mezcla	Reactivo	Técnica(s) Quimiométrica(s)	Muestras	Referencia
Vitamina C, citrato y oxalato	H ₂ SO ₄ / Ce (IV)	Filtro de Kalman Adaptado	Sintéticas	[Sultan, 1997]
Butilhidroxianisol y propilo galato	3-metilbenzotiazolin-2-ona, (MBTH) / Ce (IV)	MLR	Sintéticas y alimentos	[Aguilar-Caballo, 1997]
Clorpromazina, perfenazina y acetopromazina	3-metilbenzotiazolin-2-ona, (MBTH)/ Fe (III)	MLR	Sintéticas y serum humano	[Carreto, 1997]

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

Mezcla	Reactivo	Técnica(s) Quimiométrica(s)	Muestras	Referencia
Cisteína y cistina	Inducción de la reacción $I^{3-}CPC_{micelas}/N^{3-}$.	MLR	Sintéticas y fármacos	[Lunar, 1997]
Fenilalanina y prolina	1,2-naftoquinona-4- sulfonato, (NQS)	ALS y TLD	Sintéticas	[Saurina, 1997]
Piridoxal y piridoxal-5- fosfato	Oxidación aeróbica Catalizador: cianuro Micelas: CTAB	MLR	Sintéticas	[Morales, 1997]
Trimeprazina y metotrimprazina	Bis(2,4,6- triclorofenil)oxalato / H_2O_2	ANN	Sintéticas	[Hervas, 1998]
Cisteína, tirosina y triptófano	$Mn(CN)_6^{3-}$	PLS	Sintéticas y alimentos	[Kappes, 1998]
<i>l</i> -Cisteína, <i>N</i> -acetil- <i>l</i> - cisteína, <i>dl</i> -homocisteína	Complejo Cu(II)-Neocuproína	ANN	Sintéticas	[Jiménez-Prieto, 1999]
Etanol y metanol	Alcohol oxidasa H_2O_2 / <i>p</i> -fenilendiamina	PLS, PCR y ANN	Sintéticas	Anexo 1
Espironolactona y canrenona	H_2SO_4 / 48.5 °C	PLS	Sintéticas y orina	[Martín, 1999]
butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno y propilo galato	Fe (III) / 2,2'-dipiridil	ANN, CLS, PCR y PLS	Sintéticas y alimentos	[Ni, 1999]
Canrenona y espirolactona	H_2SO_4 / 55 °C	PLS	Sintéticas y orina	[Hernandez, 2000]
Levodopa y benserazida	KIO_4	PLS y nPLS	Sintéticas y fármacos	[Coello, 2000]
<i>p</i> -aminofenol y <i>p</i> - fenilendiamina	$Mo(CN)_8^{3-}$	PCR, PLS y ANN	Sintéticas	[López-Cueto, 2000]
Acetaminofeno y fenobarbital	3-metilbenzotiazolin-2- ona / Fe (III)	PLS y ANN	Simulaciones, sintéticas y fármacos	[Ni, 2000]
Enantiómeros de la 1- feniletilamina	(-)-citronellal	PLS, PCR y ANN	Sintéticas	Anexo 2
Difilina y proxifilina	1) NaOH / 2) ion diazo del ácido sulfanílico	PLS	Simulaciones y sintéticas	Anexo 4

Mezcla	Reactivo	Técnica(s) Quimiométrica(s)	Muestras	Referencia
Difilina, proxifilina y teofilina	1) NaOH / 2) ion diazo del ácido sulfanílico	PLS	Sintéticas	Anexo 5

Tabla 2b. Aplicaciones recientes de los métodos cinéticos a la resolución de mezclas de especies inorgánicas mediante calibración multivariable.

Mezcla	Reactivo	Técnica(s) quimiométrica(s)	Muestras	Referencia
Ca (II) y Mg (II)	Azul de metiltimol	PLS	Sintéticas y agua mineral	[Blasco, 1997]
Ortofosfato y arsenato	Molibdato y ácido ascórbico	PLS y nPLS	Agua de lago, de nieve y potable	[Petterson, 1997]
Nb (V) y Ta (V)	4-(2-piridilazo)resorcinol	PLS y ANN	Sintéticas	[Izquierdo, 1998]
Fe (III), Ag (I) y Mn (II)	Rodamina B / KIO ₄ Activ.: 1,10-fenantrolina	Filtro de Kalman	Sintéticas y aleaciones	[Ye, 1998]
Mezclas binarias y ternarias de Zn (II), Ni (II), Pb (II), Co (II) y Cd (II).	4-(2-piridilazo)resorcinol y EDTA	PARAFAC	Sintéticas	[Esteves da Silva, 1999]
Cu (II), Zn (II) y Mn	4-(2-piridilazo)resorcinol	PLS, nPLS	Sintéticas y agua de río	[Azubel, 1999]
Cu (II) y Ag (I)	o-metoxifenol / 2,2'-bipiridina	ANN	Residuos de menas Pb-Zn	[Huang, 2000]
Ni (II) y Ga (III)	4-(2-piridilazo)resorcinol	MLR, PCR, PLS y CR	Simuladas y Sintéticas	[Cullen, 2000]
Co (II), Ni (II) y Ga (III)	4-(2-piridilazo)resorcinol	MLR, PCR, PLS, CR, PARAFAC y nPLS	Simuladas y Sintéticas	Anexo 3
Mezclas binarias de S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ y SO ₃ ²⁻	1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno Micelas: CPC	MLR	Sintéticas	[Gerakis, 2000]

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

Mezcla	Reactivo	Técnica(s) quimiométrica(s)	Muestras	Referencia
Co (II), Ni (II) y Fe (III)	Naranja de Xilenol	MLR	Sintéticas y aleaciones	[Karayannis, 2000]
Cu (II), Zn (II), Co (II), Ni (II) y Fe (III)	Nitrilotriacético / 4-(2-piridilazo)resorcinol	PLS, nPLS, PCR y PARAFAC	Sintéticas	[Fernández, 2001]
V (IV) y Fe (II)	Bromato / Naranja de metilo	ANN	Sintéticas, agua mineral y de grifo	[Safavi, 2001]

Las filas que aparecen en las tablas con fondo gris corresponden a reacciones catalíticas en las que los analitos a determinar actúan como catalizadores. Como se observa, estas aplicaciones son pocas, ya que utilizar catalizadores no implica la variación del espectro de los productos de reacción, sino tan solo un incremento de la velocidad de reacción. La aplicación de la calibración de primer orden a estas situaciones podría ser suficiente, en algunos casos, para la resolución de mezclas.

La mayoría de las reacciones utilizadas en las aplicaciones a especies orgánicas son de acoplamiento oxidativo. Se han cuantificado tanto muestras preparadas en el laboratorio como reales, entre las que destacan fármacos, fluidos biológicos y antioxidantes en alimentos. Las aplicaciones inorgánicas aparecen en menor número que las orgánicas. Las reacciones más utilizadas para la cuantificación de metales son las de complejación directa o por sustitución. El agente complejante 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), a pesar de su alta absorptividad, es el más utilizado, ya que forma complejos con la mayoría de los metales, proporcionando espectros y velocidades suficientemente diferenciadoras. Este aspecto hace que el sistema PAR-metal sea propicio para la determinación simultánea de muchos metales como el cobre, zinc, níquel, cobalto, galio, hierro, etc. El único inconveniente que presentan estas reacciones de complejación es que sus velocidades son muy rápidas. Esto puede ser solventado con los sistemas de mezcla rápida y los sistemas en flujo, capaces de mantener unas condiciones experimentales controladas y reproducibles. Entre otras especies inorgánicas cuantificadas se encuentran las mezclas de ortofosfato y arsenato, y las mezclas binarias de tioaniones. Los métodos desarrollados para las especies inorgánicas se aplican tanto a muestras sintéticas como reales, entre las que destacan el agua mineral embotellada, y

aguas naturales. También aparecen aplicaciones que determinan metales en aleaciones. Debido a la simplicidad de los mecanismos de complejación de metales (normalmente estudiados en condiciones de pseudo-primer orden), estos sistemas se prestan a ser estudiados por diferentes técnicas de calibración, permitiendo su comparación.

3.3 TRANSPORTE Y MEZCLA DE REACTIVOS.

Como se ha mencionado en el apartado 2 de la introducción, uno de los requisitos para una utilización efectiva de los métodos cinéticos es el estricto control de las condiciones experimentales entre experimentos. Todas las etapas capaces de ser automatizadas mejorarán la repetibilidad y reproducibilidad de los métodos cinéticos y los harán más competitivos frente a los de equilibrio.

Muchas de las aplicaciones se basan en la utilización de sistemas de inyección en flujo (*FIA*, *flow injection analysis*), [Blasco, 1997; Azubel, 1999; Fernández, 2001]. Blasco y col. [Blasco, 1997] comparan los resultados obtenidos mediante este método dinámico y los datos obtenidos en el equilibrio para la determinación de calcio y magnesio en agua. El sistema químico se basa en la reacción de estos iones con azul de metiltimol a pH 11, utilizando como técnica de calibración la regresión PLS. En el trabajo se realiza una selección de las variables espectrales en el modo estático utilizando los coeficientes **B** obtenidos en la regresión *vs.* las longitudes de onda originales y también utilizando algoritmos genéticos. La mejora en la información espectral y cinética que les proporciona el sistema FIA, sugiere que su adecuada combinación puede mejorar los resultados de cuantificación, incluso en presencia de no linealidades como muestra el estudio de los *scores* del sistema. Los resultados obtenidos sobre muestras reales son mejores con el sistema FIA que con el sistema estático.

En la determinación de arsenato y ortofosfato, Petterson y col. [Petterson, 1997] utilizan un sistema de flujo con una celda de termostatazada para la mezcla de reactivos. Durante el registro, todos los flujos son detenidos. Las aplicaciones que utilizan un sistema de flujo interrumpido (*stopped-flow*) en reacciones rápidas son muy variadas [Tauler, 1997; Aguilar-Caballo, 1997; Ye, 1998; Karayannis, 2000; Cullen, 2000, anexo 3]. Ye y col. [Ye, 1998] utilizan un sistema FIA acoplado al sistema de flujo interrumpido para la determinación

simultánea de hierro, plata y manganeso.

A pesar de los avances en la automatización y la disponibilidad de aparatos comerciales de sistemas FIA y de flujo interrumpido, todavía se encuentran muchas aplicaciones que utilizan la mezcla manual de los reactivos en la misma celda de medida [Izquierdo, 1998; Esteves da Silva, 1999; Martín, 1999; Ni, 1999 y 2000; Coello, 2000; López-Cueto, 2000; Gerakis, 2000; Safavi, 2001, anexos 1, 2, 4 y 5], normalmente termostatazada y agitada, o fuera de ella [Carreto, 1997; Lunar, 1997; Sultan, 1997; Morales, 1997; Hernández, 2000], lo que indica que este sistema, además de ser el más simple, sigue siendo efectivo.

La técnica de adición continua de reactivo (*CAR, continuous addition of reagent*) [Hervas, 1998; Jiménez-Prieto, 1999] es menos utilizada. Jiménez-Prieto y col. [Jiménez-Prieto, 1999] comparan los resultados obtenidos en la determinación simultánea de aminoácidos utilizando esta técnica de mezcla y la mezcla habitual en recipiente. Los resultados obtenidos con CAR son más precisos y dependen del perfil cinético obtenido para cada especie, característico de la manera en que son mezclados muestra y reactivos.

3.4 SISTEMAS DE DETECCIÓN.

La mayoría de aplicaciones se basan en la espectroscopia UV-Vis utilizando como detector un *diode-array*, aunque aparece una aplicación de los detectores *CCD* para la determinación simultánea de cobalto, níquel y hierro [Karayannis, 2000].

En las aplicaciones que utilizan fluorescencia tan solo se tiene en cuenta la emisión de fluorescencia a una longitud de onda para una de excitación. Así, Morales y col. determinan piridoxal y fosfato-5'-piridoxal utilizando el perfil cinético en términos de intensidad relativa de fluorescencia a $\lambda_{exc}/\lambda_{em}=340/435$ nm [Morales, 1997]. A pesar de poseer suficiente información cinética, utiliza tan solo la velocidad inicial y el incremento total de señal para aplicar una regresión lineal múltiple. Hernández y col. utilizan todo el perfil cinético a $\lambda_{exc}/\lambda_{em}=475/526$ nm, juntamente con la técnica PLS, para la cuantificación de canrenona y espirolactona en orina en base a la reacción con ácido sulfúrico [Hernández, 2000].

También se ha encontrado una aplicación basada en quimioluminiscencia donde trimeprazina y metotrimeprazina son determinadas por la técnica de adición continua de reactivo [Hervas, 1998].

Gerakis y col. [Gerakis, 2000] proponen la determinación de mezclas binarias de tioaniones

(sulfuro, sulfito y tiosulfato) utilizando una reacción de catálisis micelar (cloruro de cetiltrimetilpiridina, CPC) con el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno. Como sistema de detección proponen un electrodo selectivo a iones fluoruro y MLR como técnica de calibración para solucionar el problema de las interacciones entre analitos.

3.5 TRATAMIENTO NUMÉRICO DE LOS DATOS.

3.5.1 Tratamiento multivariable de los métodos diferenciales clásicos.

La regresión lineal múltiple (MLR), descrita en el apartado de calibración multivariable, es un método de calibración que se puede aplicar a los datos cinéticos. Aunque en la calibración se podría utilizar todo el perfil cinético a una longitud de onda, siendo así una calibración de primer orden, no es el caso más corriente y, por tanto, este tipo de aplicaciones pueden ser englobadas en los métodos diferenciales clásicos.

Carreto y col. [Carreto, 1997] proponen un método cinético simple para la resolución de mezclas ternarias de clorpromazina, perfenazina y acetopromazina, que muestran un alto grado de solapamiento espectral (máximos entre 685 y 700) y cinético (constantes de velocidad 1:1.06:1.36) a partir de su reacción con la hidrazona 3-metilbenzotiazolin-2-ona, MBTH. El método se basa en la utilización de la diferencia de velocidades iniciales entre pares de longitudes de onda de mezclas de concentración conocida y junto con la técnica MLR, se determina la matriz de coeficientes que relacionarán las velocidades iniciales y las concentraciones de muestras desconocidas. El método se puede utilizar ya que no hay efectos sinérgicos. La desviación estándar relativa obtenida para las tres especies es inferior al 3 %.

Cuando las especies a determinar presentan velocidades muy diferentes, se puede utilizar la absorbancia a dos tiempos lo suficientemente separados y relacionarlos mediante MLR con la concentración inicial de los analitos en mezclas. Este método es el que han aplicado Lunar y col. [Lunar, 1997] para la determinación de cisteína y cistina mediante su inducción en la reacción de triioduro y azida en medio micelar. El medio micelar permite la determinación simultánea con relaciones cisteína:cistina entre 1:50 y 1:300 obteniéndose RSD (%) del 1.2 y 2.3, respectivamente.

La técnica MLR también ha sido utilizada cuando se dispone de la velocidad inicial a varias

longitudes de onda. Así, Aguilar-Caballos y col. [Aguilar-Caballos, 1997] determinan simultáneamente los antioxidantes butilhidroxianisol y galato de propilo, mediante la formación de complejos coloreados con MBTH en medio ácido y en presencia de Ce (IV) a 486 y 442 nm, respectivamente. Utilizan tan solo velocidades iniciales, calculadas a partir de los 5 primeros segundos, ya que, a partir de este instante, aparece una reacción secundaria entre el Ce (III) y los productos de reacción. En estas condiciones no aparecen efectos sinérgicos, por lo que los autores determinan simultáneamente ambas especies en alimentos con un sistema de mezcla *stopped-flow* y la técnica de calibración MLR.

Como se ha mencionado anteriormente, Morales y col. [Morales, 1997] determinan simultáneamente piridoxal (PAL) y fosfato-5'-piridoxal (PALP) utilizando la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{exc}/\lambda_{em}= 340/435$ nm. A pesar de poseer suficiente información cinética, tan solo utilizan la velocidad inicial y el incremento total de la señal para aplicar una MLR. La longitud de onda de excitación es escogida de forma que proporcione un incremento total máximo de la señal y de la velocidad inicial para PAL y PALP, respectivamente. Este método se ha aplicado en medio micelar (bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB) el cual permite diferenciar la reactividad y sensibilidad de las especies a analizar.

3.5.2 Calibración con datos de primer orden.

A pesar de que los instrumentos disponibles hoy en día permiten hacer un registro del perfil cinético a múltiples longitudes de onda, existen numerosas aplicaciones que utilizan tan solo una longitud de onda y no necesariamente todos los tiempos de registro. También, en el caso de la utilización de un electrodo selectivo, sólo se tendrá una respuesta de potencial en función del tiempo.

Utilizar la variación con el tiempo de una sola respuesta también puede ser debido a la propia limitación del instrumento que se disponga o a que no haya diferencias espectrales entre los productos de reacción. Esto sucede principalmente en las reacciones catalizadas, donde se aprovecha la propiedad catalizadora de los analitos de interés, siendo el producto de reacción el mismo para todos. La utilización del perfil cinético a una única longitud de onda será suficiente siempre y cuando las velocidades de reacción sean lo suficientemente diferentes.

En todas estas situaciones pueden ser aplicadas las técnicas MLR, PLS, PCR y ANN. Por los

aspectos mencionados anteriormente, no es muy corriente la utilización de las reacciones catalíticas para la determinación simultánea de especies utilizando la calibración multivariable. Sin embargo, se pueden encontrar algunas aplicaciones, como la propuesta por Safavi y col. [Safavi, 2001], que determinan V(IV) y Fe (II) en agua aprovechando su propiedad catalítica en la reacción de oxidación del naranja de metilo mediante bromato en medio ácido. Como método de calibración utilizan directamente las ANN afirmando que el sistema presenta un comportamiento no lineal.

Entre otras aplicaciones no catalíticas, cabe destacar el método propuesto por Ni y col. [Ni, 1999] para determinar tres antioxidantes: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y galato de propilo (PG), los cuales reducen el Fe (III) a Fe (II), formando este último un complejo coloreado con el reactivo cromogénico 2,2'-dipiridil, con máximo de absorción a 510 nm. A pesar de que BHA y PG muestran constantes de velocidad muy parecidas y de la presencia de efectos sinérgicos, las técnicas de calibración PLS, PCR y ANN permiten la cuantificación de las mezclas ternarias, siendo las ANN las que proporciona mejores resultados para el componente más lento, BHT, que presenta, además, una no linealidad más acusada. Los modelos construidos para cada analito con ANN, es decir, con un único nodo o neurona en la capa de salida, proporcionan mejores resultados que cuando se pretende cuantificar los tres analitos con el mismo modelo. El método propuesto ha sido aplicado a la determinación de estos antioxidantes en alimentos, proporcionando las tres técnicas de calibración resultados similares para BHA y PG. Con las ANN se obtienen mejores resultados para el componente que reacciona más lento y con más problemas de no linealidades, el BHT.

Como se ha mencionado en la sección anterior, Jiménez-Prieto y col. [Jiménez-Prieto, 1999] comparan dos sistemas de mezcla: CAR y la habitual en recipiente. La señal obtenida con respecto al tiempo a 455 nm para el sistema con grupo S-Cu(II)-neocuprine es utilizada como entrada en las redes neuronales artificiales (*counterpropagation computational neural networks*, CP-CNNs). A pesar de que la reacción, en presencia de un exceso de reactivo, es de pseudo-primer orden, la técnica de mezcla CAR proporciona una dependencia de segundo orden y una mayor diferenciación cinética entre aminoácidos. En el trabajo se realiza un estudio exhaustivo de las variables utilizadas como entrada en las redes neuronales, es decir,

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

se utilizan varios dominios de tiempo de la curva respuesta para seleccionar las mejores variables de entrada. Los mejores resultados se obtienen utilizando puntos uniformemente distribuidos a lo largo de todo el tiempo de registro y, especialmente para la técnica CAR, permiten la cuantificación simultánea de los tres aminoácidos.

La fluorescencia es una técnica espectroscópica con muchas posibilidades en métodos cinéticos. Proporciona la posibilidad de obtener, para un rango de longitudes de excitación, un espectro de emisión y además a varios tiempos de registro. Sin embargo, este potencial no ha sido aún desarrollado y la utilización de la fluorescencia en métodos cinéticos se limita tan solo a la utilización de la evolución de la señal de emisión a una única longitud de onda para una longitud de onda de excitación. Así Hernández y col. [Hernández, 2000] determinan simultáneamente canrenona y espirolactona en orina, utilizando ácido sulfúrico como reactivo y una calibración con PLS. El producto de reacción es el mismo para ambas especies (trienona) con una emisión a $\lambda_{em}=526$ nm ($\lambda_{ex}=475$ nm).

Sultan y col. [Sultan, 1997] establecen un método cinético utilizando el filtro de Kalman para la determinación de vitamina C, citrato y oxalato. Este método ha sido utilizado tanto para ajustar datos cinéticos lineales como no lineales (*extended Kalman filter*). El filtro de Kalman lineal requiere un modelo lineal, y se caracteriza por su simplicidad y velocidad. Necesita unos valores iniciales de los parámetros, sólo sirve para reacciones de pseudo primer orden, y requiere que las constantes de velocidad no varíen entre experimentos. Esto último sucede principalmente con los cambios de temperatura cuando ésta no está controlada. Esta última limitación puede ser evitada por el uso del filtro de Kalman extendido, especialmente apropiado para la corrección de errores asociados a variaciones entre experimentos. Sin embargo, éste depende fuertemente de los parámetros iniciales escogidos y del número de iteraciones realizadas. Ha sido también utilizado en reacciones de segundo orden y para la determinación de multicomponentes con sistemas de detección a múltiples longitudes de onda. El sistema químico propuesto en el trabajo se basa en el poder oxidante del Ce (IV), monitorizando la disminución en la absorbancia de éste a 410 nm. Se utiliza el filtro de Kalman extendido tanto para estudiar el sistema (determinación de las constantes de velocidad) como para la cuantificación simultánea, y encuentran que es especialmente apropiado para relaciones de constantes de velocidad inferiores a 1.5. El método propuesto es

preciso incluso en presencia de interferencias (calcio y magnesio).

Ye y col. [Ye, 1998] utilizan un método catalítico para la determinación simultánea de hierro, plata y manganeso en aleaciones, empleando también el filtro de Kalman. La reacción a catalizar es la oxidación de la Rhodamina B con peryodato de potasio en medio ácido, siendo el activador de la reacción la 1,10-fenantrolina. Se sigue la disminución de la señal a 555 nm. El sistema propuesto no presenta interacción entre analitos (efecto catalítico aditivo) y el efecto catalítico de los metales es suficientemente diferenciador para permitir la cuantificación de las mezclas.

3.5.3 Calibración con datos de segundo orden.

En muchos casos, no se utiliza tan solo la información cinética, sino que se realiza un estudio exhaustivo de toda la información cinética-espectral obtenida, comparando los resultados obtenidos al usar varios subconjuntos de variables y diferentes técnicas de calibración. En general, la utilización conjunta de la información cinética-espectral mejora los resultados de cuantificación.

Las técnicas más utilizadas son PCR, PLS y ANN, siendo la PLS la más extendida, sea por su alto grado de desarrollo o por su simplicidad. El problema, cuando se trata de aplicar una de estas técnicas, reside en cómo ordenar la gran cantidad de datos disponibles. Como se ha explicado en la introducción, lo más habitual es hacer un desdoblamiento de los datos (*unfolded*), así que, inicialmente, se hablará de *unfolded*-PLS y *unfolded*-PCR.

Estas técnicas raramente aparecen desligadas y siempre son contrastadas en sistemas complejos con presencia de no linealidades (reacciones complejas, efectos sinérgicos, interferencias etc.). Izquierdo y col. [Izquierdo, 1998] determinan simultáneamente Nb y Ta con el reactivo complejante PAR, comparando las técnicas de calibración PLS y ANN. La determinación se lleva a cabo en el equilibrio (información espectral) y mediante el método cinético. El sistema es acusadamente no lineal, ya que no se utiliza un exceso de PAR por su alta absorptividad, por tanto, la cinética es de segundo orden para cada uno de los metales. A pesar de que en el equilibrio los límites de detección son inferiores, se prefiere el método cinético ya que presenta mayor precisión y tiempo de análisis más corto. Ambas técnicas, PLS y ANN, juntamente con el método cinético, permiten la cuantificación de los dos

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

metales, obteniendo siempre mejores resultados para el Nb. Con las ANN mejoran los resultados del Ta, respecto los modelos basados en el equilibrio. Aunque las ANN proporcionen mejores resultados que el PLS destacan el tiempo que se necesita para optimizar los parámetros de la red.

Kappes y col. [Kappes, 1998] utilizan mezclas ternarias de cisteína, tirosina y triptófano para mostrar cómo los métodos cinéticos, juntamente con la calibración PLS, pueden superar los problemas de interferencias en la determinación de multicomponentes. Contrastan dos métodos: usando el espectro UV de los aminoácidos en medio ácido (información espectral); y el cinético, que corresponde a su oxidación con $\text{Mn}(\text{CN})_6^{2-}$ (información cinética-espectral). En medio ácido, la cisteína se oxida al dímero cistina, introduciendo no linealidades en el primer método, perfectamente ajustables con la técnica de calibración. Mediante el método cinético no se utiliza un exceso de reactivo por su alta absortividad, lo que introduce en el sistema una fuente de no linealidad (las reacciones de algunos aminoácidos no son completas), más importante que la existente en el método basado en el equilibrio. Esto provoca que los modelos PLS introduzcan más componentes o factores. El método cinético propuesto se aplica a la determinación simultánea de tirosina y triptófano sin separación previa en extractos dopados de animales, ya que, el contenido real de aminoácidos está por debajo de los límites de detección. Este procedimiento es usual para ver cómo se comporta el método frente a muestras reales. El número de factores, en este caso, es superior debido tanto a las interferencias como a las no linealidades. Aunque el método basado en el equilibrio es más fácil de establecer, sólo puede ser aplicado cuando absorben únicamente los analitos. La selectividad mejora con el método cinético porque sólo reaccionan algunos aminoácidos y los perfiles cinéticos son característicos de cada especie.

Otra aplicación que utiliza exclusivamente PLS es la determinación de canrenona y espironolactona por Martín y col. [Martín, 1999] en orina y agua basada en la misma reacción mencionada anteriormente [Hernández, 2000]. A pesar de que para cada analito se obtiene el mismo producto de reacción (trienona), se utiliza toda la información cinética-espectral. Los autores emplean un diseño experimental para optimizar la concentración de ácido y la temperatura, siendo la función a minimizar el RSEP. Un estudio contrastado de los *scores* de calibración en agua y orina sintética muestran que la calibración con PLS no depende del

medio usado para preparar las muestras y que ambos modelos de calibración son válidos para cuantificar muestras de orina con % RSEP < 1.5 %.

Un contraste claro de PLS, PCR y ANN aparece en el trabajo efectuado por López-Cueto y col. [López-Cueto, 2000], donde se determinan simultáneamente p-aminofenol y p-fenilendiamina mediante una reacción de acoplamiento oxidativo en presencia de $\text{Mo}(\text{CN})_8^{3-}$. El sistema presenta dos características muy importantes que definen el método propuesto: reactivo en defecto y reacciones cruzadas; esto hace que el sistema presente no linealidades muy acusadas que, de nuevo, serán resueltas por los métodos de calibración multivariable citados. Se justifican las no linealidades por la deformación del gráfico de los *scores* de los dos primeros componentes principales del PCR respecto a la representación de la matriz de concentraciones de calibración. Las diferencias cinéticas y espectrales son suficientes para que el sistema se resuelva bien por cualquiera de las técnicas de calibración (aunque los resultados son un poco mejores para las ANN), obteniéndose errores de predicción entre el 2 y el 5 %. Incluso en presencia de grandes no linealidades, una selección adecuada de algunos perfiles cinéticos (señal analítica alta: absorbancia y velocidad de reacción) como datos de entrada en las ANN puede hacer que el resto de información no sea necesaria.

En el trabajo de Ni y col. [Ni, 2000], de nuevo se comparan las técnicas de calibración multivariable PLS y ANN en la determinación de acetaminofeno y fenobarbital en fármacos y muestras sintéticas. El método propuesto se basa en la diferente velocidad de reacción de acoplamiento oxidativo de los analitos con una hidrazona (MBTH) en medio HCl y utilizando como oxidante el Fe (III). Los autores efectúan una serie de simulaciones para ver el comportamiento de las redes neuronales cuando se utilizan datos originales o los *scores* de los PCs. Sus resultados concluyen lo que muchos autores defienden, que la reducción previa en componentes principales simplifica los entrenamientos de la red (menor número de nodos en la capa oculta, menor número de iteraciones, etc.), y se elimina el ruido y contribuciones extrañas, las cuales generalmente están contempladas en los componentes principales superiores. Aunque todos los métodos de calibración propuestos (PLS, ANN y PC-ANN) proporcionan resultados similares, los obtenidos con PC-ANN son los más eficaces (RPEs menores). El método propuesto es aplicado satisfactoriamente a fármacos comerciales.

Aunque con datos cinético-espectrales no es usual encontrar aplicaciones de MLR, existen

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

algunas aplicaciones correspondientes a este periodo que vale la pena comentar por sus buenos resultados. Karayannis y col. [Karayannis, 2000], proponen un método de análisis de rutina para la determinación de Co (II), Ni (II) y Fe (II) en un amplio rango de concentraciones, tanto en muestras sintéticas como en aleaciones, que se basa en la reacción de complejación de estos metales con el naranja de xilenol. Se utiliza un sistema *stopped-flow* acoplado a un detector CCD, como se mencionó en el apartado 3.4, y la técnica de calibración MLR. Como en la mayoría de las aplicaciones descritas en este subapartado, los autores reducen la gran cantidad de información acumulada; para ello proponen dos métodos: utilizar información cinético-espectral desdoblada en una matriz bidimensional y utilizar las velocidades iniciales. En ambos casos se emplea una regresión *stepwise* para hacer una selección de variables, buscando las longitudes de onda que mejor contribuyen a la señal de cada analito. El método cinético-espectral proporciona los mejores resultados y se aplica a la resolución de varias muestras procedentes de aleaciones.

A pesar de que las simulaciones durante este periodo no son muy abundantes se han encontrado algunas aplicaciones. Una de ellas [Cullen, 2000], introduce el ángulo cinético y espectral para ver el comportamiento de las técnicas de calibración multivariable lineales (PLS, PCR, MLR y CR) frente a diferentes grados de solapamiento espectral y cinético entre dos analitos. Se muestra que las técnicas PLS, PCR y CR proporcionan resultados similares y que la técnica MLR proporciona inferiores predicciones. También se muestra que el error de predicción es función del ángulo cinético y espectral. Cuando ambos ángulos son superiores a 10° , se tiene suficiente información espectral y cinética para la determinación (% RSEP < 10%). Además, si uno de los dos está por debajo de 10° , la determinación es posible siempre y cuando el otro sea lo suficientemente elevado. Para verificar los resultados obtenidos mediante las simulaciones, los autores estudian la reacción de complejación del Ni (II) y Ga (III) con el PAR mediante un sistema de *stopped-flow* acoplado a un detector *diode-array*. Los resultados obtenidos mediante el método cinético-espectrofotométrico son comparados con los del sistema en equilibrio y utilizando tan solo información cinética a una longitud de onda. Debido a que el ángulo espectral entre ambos complejos Me-PAR es de 6.3° (< 10°) la determinación simultánea de ambos metales por el método del equilibrio no es posible, proporcionando errores superiores al 20 % para el Ga (III), que es el que presenta menor

absortividad. Utilizando la información cinética-espectral los resultados mejoran considerablemente, sobretodo para el galio. A pesar de introducir la información cinética, la técnica MLR sigue proporcionando malos resultados.

Entre los métodos de resolución de curvas para datos cinético-espectrofotométricos, se ha encontrado una comparación de la técnica de descomposición trilineal (TLD) con la técnica de mínimos cuadrados alternos (ALS) [Saurina, 1997]. El sistema propuesto se basa en la reacción entre aminoácidos y la 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, NQS. La condición de trilinealidad no es completa (el reactivo NQS no está suficientemente en exceso) por tanto, la técnica ALS es una alternativa respecto a la TLD que asume una estricta condición de trilinealidad en los datos. La diferencia cinética reside en que la reacción es más rápida para aminoácidos secundarios que para los primarios. Esta diferencia cinética, junto a la diferencia espectral, permite la cuantificación simultánea de fenilalanina y prolina. También se realiza un estudio de los datos registrados para estimar los perfiles cinéticos y espectrales de los componentes puros.

Todas las aplicaciones mencionadas hasta ahora que utilizan la información cinética-espectral, requieren el desdoblamiento de los datos con estructura tridimensional en matrices, pero existen otros artículos en los que el tratamiento de los datos mantiene la estructura tridimensional de los mismos, comparando los resultados con los obtenidos con los métodos *unfolded*. A pesar de que los métodos multidimensionales, tales como el PARAFAC, principalmente para análisis cualitativo, y el nPLS para análisis cuantitativo, parecen muy prometedores, estos métodos no mejoran los resultados de cuantificación y en ocasiones los empeoran.

Petterson y col. [Petterson, 1997] proponen diferentes modelos de calibración para la determinación simultánea de fosfato y arsenato en agua de lago, de nieve y potable mediante la reacción con molibdato y ácido ascórbico. Aparecen tanto diferencias espectrales debido a la formación de complejos azules, como cinéticas. Los modelos PLS construidos tan solo con la información espectral al tiempo final de reacción funcionan bien para las muestras sintéticas de calibración, pero no para las reales de predicción que presentan interferencias. Lo mismo sucede cuando se utiliza el modelo con datos cinéticos a única longitud de onda (820 nm). Los mejores resultados se obtiene cuando se utiliza toda la información cinética y

3. Resolución de mezclas mediante procedimientos cinéticos y calibración multivariable

espectral, siendo parecidos los obtenidos utilizando PLS (*unfolded*) y nPLS.

Las mismas conclusiones se obtienen en la determinación simultánea de levodopa y benserazida mediante la reacción de oxidación con KIO_4 en medio ácido [Coello, 2000]. A pesar de que el sistema es muy complejo (el derivado de la benserazida en exceso de peryodato da productos coloreados y existen reacciones cruzadas entre los analitos), nPLS y PLS proporcionan los mismos resultados. La técnica nPLS permite la interpretación cualitativa del sistema al realizar un estudio de los *loadings* de los dos modos de registro: espectral y cinético.

Azubel y col. [Azubel, 1999] determinan trazas de Cu, Zn y Mn, en presencia de otros iones, en muestras reales (aguas naturales dopadas, ya que los niveles normales están por debajo del límite de detección) y sintéticas. Utilizan un sistema FIA, por lo que el estudio es muy complejo, ya que a la cinética de la reacción se le superpone la dinámica de la dispersión propia del sistema FIA. Los autores comparan los resultados obtenidos a partir de los datos del máximo del pico FIA, con una calibración de primer orden, y de toda la señal del pico, mediante los métodos *unfolded*-PLS y nPLS. Los mejores resultados se obtienen utilizando PLS con los datos del máximo del pico FIA, con malos resultados al usar nPLS.

La utilización de algoritmos genéticos para la selección de las longitudes de onda mejora el RMSECV y el RMSEC y disminuye el número de factores necesarios para el Zn, simplificando los modelos obtenidos. Los algoritmos genéticos mejoran también los límites de detección pero tienen poco efecto en la repetitividad del método.

En [Fernández, 2001] también se utiliza un sistema FIA para la determinación simultánea de trazas de Cu, Zn, Co, Ni y Fe mediante una reacción de sustitución de ligando (Me-nitrilotriacético) con PAR. Se estudia la influencia del pretratamiento de los datos (centrado, corrección del blanco, primera y segunda derivada) en los resultados de cuantificación utilizando diferentes modelos, PLS (calibración de primer orden en modo espectral), *unfolded*-PLS y nPLS. Los métodos PLS y *unfolded*-PLS proporcionan aproximadamente los mismos valores de RMSEP siendo, en general, mejores que los obtenidos con nPLS. El mejor preprocesado es el centrado de la segunda derivada de los datos corregidos por el blanco. De un estudio de los parámetros característicos calculados a partir de la señal neta del analito (NAS), se observa que la selectividad, la sensibilidad, límites de detección y relación

señal/ruido mejoran con la utilización de la información cinética (*unfolded*-PLS).

Aunque la técnica PARAFAC ha sido utilizada para la cuantificación, al igual que el PCR cuando se trata de estructuras bidimensionales de datos, su mayor aplicación se basa en obtener los perfiles espectrales y temporales de las especies que reaccionan. Aunque esto parece sencillo, las condiciones para poder ser aplicados son muy estrictas, siendo la principal condición para unos buenos resultados la trilinealidad de los datos. Esteves da Silva y col. [Esteves da Silva, 1999] estudian y determinan mezclas binarias (Zn-Ni, Pb-Cd y Zn-Pb) y ternarias (Zn, Pb y Co) de metales por el sistema de sustitución de ligando (Me-EDTA) siguiendo un mecanismo de pseudo primer orden. Consiguen una completa descomposición de la matriz de datos en perfiles espectrales, de concentraciones y temporales. Esto implica que el método puede ser utilizado para la cuantificación simultánea de mezclas.

Como resumen de las técnicas empleadas en la cuantificación de datos cinéticos para sistemas multivariados, durante el periodo estudiado, se puede destacar que PLS sigue siendo la técnica más utilizada, tanto en sistemas de calibración de primer orden como en sistemas de segundo orden (aplicando *unfolded*-PLS). Las técnicas trilineales, como PARAFAC y n-PLS proporcionan, en el mejor de los casos, resultados cuantitativos similares a los obtenidos con *unfolded*-PLS, o incluso con PLS en una calibración de primer orden, pero no mejores; aunque, en los casos en que es posible aplicarlos, proporcionan importante información cualitativa del proceso cinético. La causa de su aparente fracaso es su incorrecta aplicación, ya que es necesario que se cumpla la condición de trilinealidad. En sistemas cinéticos, esta condición matemática se traduce en comportamientos lineales de los analitos, espectros poco solapados, cinéticas bien diferenciadas y sobretodo en que los mecanismos de reacción sean simples, lo que es difícil de cumplir en muchos casos. Las redes neuronales se aplican a casos con no linealidades claras, mejorando los resultados, pero tienen el inconveniente del elevado número de muestras que es necesario utilizar para tener una calibración robusta. La compresión de los datos mediante un PCA sigue siendo la alternativa más utilizada.

4. REFERENCIAS

- Aguilar-Caballos, M. P.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D.; *Anal. Chim. Acta*, **354**, 173, **1997**.
- Azubel, M.; Fernández, F. M.; Tudino, M. B.; Troccoli, O. E.; *Anal. Chim. Acta*, **398**, 93, **1999**.
- Barnard, E.; *IEEE Transactions on neural networks*, **3**, 232, **1992**.
- Beckwith, P. M.; Crouch, S. R.; *Anal. Chem.*, **44**, 221, **1972**.
- Blanco, M.; Boqué, R.; Cela, R.; Coello, J.; Maspocho, S.; Ortiz, M. C.; Riba, J.; Rius, X.; Ruiz, A.; Sarabia, L. A.; Tomás, X.; *Avances en Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, **1994**.
- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspocho, S.; Villegas, N.; *Analyst*, **124**, 911, **1999**.
- Blasco, F.; Medina-Hernández, M. J.; Sagrado, S.; Fernández, F. M.; *Analyst*, **122**, 639, **1997**.
- Booksh, K. S.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.*, **66**, 782A, **1994**.
- Bos, M.; Bos, A.; Van del Linden, W. E.; *Analyst*, **118**, 323, **1993**.
- Bro, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*; **38**, 149, **1997**.
- Bro, R.; *J. Chemometrics*, **10**, 47, **1996**.
- Bro, R.; “The N-way on-line course on PARAFAC and PLS”, <http://www.models.kvl.dk/courses/>; **1998**.
- Burdick, D. S.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **28**, 229, **1995**.
- Burdick, D. S.; Tu, X. M.; McGown, L. B.; Millican, D. W.; *J. Chemometrics*, **4**, 15, **1990**.
- CAMO AS, *The Unscrambler, User's Guide*, **1996**.
- Carreto, M. L.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D.; *Anal. Chim. Acta*, **349**, 33, **1997**.

- Carroll, J. D.; Chang, J.; *Psychometrika*, **35**, 283, **1970**.
- Coello, J.; Maspoch, S.; Villegas, N.; *Talanta*, **53**, 627, **2000**.
- Crouch, S. R.; *Anal. Chim. Acta*, **283**, 453, **1993**.
- Crouch, S. R.; *Chemom. Intell. Lab. Systems*, **8**, 259, **1990**.
- Cullen, T. F.; *Chemometric data processing techniques for kinetic-spectrophotometric determinations*, PhD, Michigan State University, **1999**.
- Cullen, T. F.; Crouch, S. R.; *Anal. Chim. Acta*, **407**, 135, **2000**.
- Cullen, T. F.; Crouch, S. R.; *Mikrochim. Acta*, **126**, 1, **1997**.
- De Jong, S.; *J. Chemometrics*, **12**, 77, **1998**.
- Despagne, F.; Massart D. L.; *Analyst*, **123**, 157R, **1998**.
- Draper, N.; Smith, H.; *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York, **1981**.
- Durell, S. R.; Lee, C.; Ross, R. T.; Gross, E. L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 148, **1990**.
- Esteves da Silva, J. C. G.; Oliveira, C. J. S.; *Talanta*, **49**, 889, **1999**.
- Fernández, F. M.; Tudino, M. B.; Troccoli, O. E.; *Anal. Chim. Acta*, **433**, 119, **2001**.
- Finnoff, W.; *Neural Computation*, **6**, 285, **1994**.
- Geladi, P.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **7**, 11, **1989**.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta*, **185**, 1, **1985a**.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta*, **185**, 19, **1985b**.
- Gerakis, A. M.; Koupparis, M. A.; Hadjiioannou, T. P.; *Talanta*, **52**, 739, **2000**.
- Haaland, D. M.; Easterling, R. G.; *Appl. Spectrosc.*, **34**, 539, **1980**.
- Haaland, D. M.; Thomas, E. V.; *Anal. Chem.*, **60**, 1193, **1988**.
- Harshman, R. A.; Lundy, M. E.; *Comp. Stat. Data Anal.*, **18**, 39, **1994**.
- Harshman, R. A.; Lundy, M. E.; *Data preprocessing and the extended PARAFAC model*, en: Law, H. G.; Snyder, C. W.; Hattie, J. A.; McDonald R. P.; Eds., *Research methods for multimode data analysis*, Praeger, New York, **1984b**.
- Harshman, R. A.; Lundy, M. E.; *The PARAFAC model for three-way factor analysis and multidimensional scaling*, en: Law, H. G.; Snyder, C. W.; Hattie, J. A.; McDonald R. P.; Eds., *Research methods for multimode data analysis*, Praeger, New York, **1984a**.
- Harshman, R. A.; *UCLA Working Papers in Phonetics*, **16**, 1, **1970**.
- Harshman, R. A.; *UCLA Working Papers in Phonetics*, **22**, 30, **1972**.

4. Referencias

- Hernández, O.; Martín, E.; Jiménez, F.; Jiménez, A. I.; Arias, J. J.; *Analyst*, **125**, 1159, **2000**.
- Hervas, C.; Ventura, S.; Silva, M.; Pérez-Bendito, D.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**, 1119, **1998**.
- Honigs, D. E.; Hieftje, G. M.; Hirschfeld, T. B.; *Appl. Spectrosc.* **38**, 317, **1983**.
- Horlick, G.; *Anal. Chem.*, **44**, 943, **1972**.
- Huang, X. Y.; Zhang, C. F.; Ji, C. T.; Ji, M. D.; *Fenxi Huaxue*, **28**, 529, **2000**.
- Izquierdo, A.; López-Cueto, G.; Medina, J. F. R.; Ubide, C.; *Quím. Anal.*, **17**, 67, **1998**.
- Jackson, J. E.; *User's Guide to Principal Components*, Wiley, New York, **1991**.
- Jimenez-Prieto, R.; Silva, M.; *Anal. Chim. Acta*, **389**, 131, **1999**.
- Joliffe, I. T.; *Appl. Stat.*, **31**, 300, **1982**.
- Kappes, T.; López-Cueto, G.; Rodríguez-Medina, J. F.; Ubide, C.; *Analyst*, **123**, 2071, **1998**.
- Karayannis, M. I.; Pettas, I. A.; *Anal. Chim. Acta*, **423**, 277, **2000**.
- Kiers, H. A. L.; *Comp. Stat. Data Anal.*, **16**, 103, **1993**.
- Kiers, H. A. L.; Krijnen, W. P.; *Psychometrika*, **56**, 147, **1991b**.
- Kiers, H. A. L.; *Psychometrika*, **56**, 449, **1991a**.
- Krijnen, W. P.; Ten Berge, J. M. F.; *Applied Psychological Measurement*, **16**, 295, **1992**.
- Kruskal, J. B.; Harshman, R. A.; Lundy, M. E., *Multiway data analysis*, in R. Coppi, S. Bolasco (Eds.), Elsevier Science Pub.; North-Holland, **1989**.
- Kruskal, J. B.; *Multilinear methods*, in: H. G. Law, C. W. Snyder, J. A. Hattie, R. P. McDonald (Eds.), *Research methods for multimode data analysis*, Praeger, New York, **1984**.
- Kruskal, J. B.; *Proc. Symp. Appl. Math.*, **28**, 75, **1983**.
- Li, S.; Gemperline, P. J.; *J. Chemometrics*, **7**, 77, **1993**.
- Long, J. R.; Gregoriou, V. G.; Gemperline, P. J.; *Anal. Chem.*, **62**, 1791, **1990**.
- López-Cueto, G.; Ostra, M.; Ubide, C.; *Anal. Chim. Acta*, **405**, 285, **2000**.
- López-Fandiño, V. M.; *Análisis de componentes no lineales mediante redes neuronales artificiales de propagación hacia atrás: aplicaciones del modelo de Kramer*. Tesis docotoral, Universidad Ramon Llull, Barcelona, **1997**.
- Lorber, A.; Wangen, L. E.; Kowalski, B. R.; *J. Chemometrics*, **1**, 19, **1987**.
- Louwerse, D. J.; Smilde, A. K.; Kiers, H. A. L.; *J. Chemometrics*, **13**, 491, **1999**.
- Love, M. D.; Pardue, H. L.; *Anal. Chim. Acta*, **299**, 195, **1994a**.

- Love, M. D.; Pardue, H. L.; *Anal. Chim. Acta*, **299**, 209, **1994b**.
- Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D.; Carreto, M. L.; McLeod, C. W.; *Anal. Chim. Acta*, **337**, 341, **1997**.
- Malinowsky, E. R.; *Factor Analysis in Chemistry*, 2nd ed., Wiley, New York, **1991**.
- Mark, H. B.; Rechnitz, G. A.; *Kinetics in Analytical Chemistry*, Interscience Publishers, New York, **1968**.
- Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, **1989**.
- Martín, E.; Jiménez, A. I.; Hernández, O.; Jiménez, F.; Arias, J. J.; *Talanta*, **49**, 143, **1999**.
- McCarrick, C. W.; Ohmer, D. T.; Gilliland, L. A.; Edwards, P. A.; Mayfield, H. T.; *Anal. Chem.*, **63**, 1256, **1991**.
- Mitchell, B. C.; Burdick, D. S.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **20**, 149, **1993**.
- Mitchell, B. C.; Burdick, D. S.; *J. Chemometrics*, **8**, 155, **1994**.
- Morales, F.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D.; *Anal. Chim. Acta*, **345**, 87, **1997**.
- Mottola, H. A.; *Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, Ed. John Wiley & Sons, New York, **1988**.
- Ni, Y.; Liu, Ch.; *Anal. Chim. Acta*, **396**, 221, **1999**.
- Ni, Y.; Liu, Ch.; Kokot, S.; *Anal. Chim. Acta*, **419**, 185, **2000**.
- Osten, D. W.; *J. Chemometrics*, **2**, 39, **1988**.
- Otto, M.; *Analyst*, **115**, 685, **1990**.
- Pardue, H. L.; *Anal. Chim. Acta*, **216**, 67, **1989**.
- Pérez-Bendito, D.; *Analyst*, **115**, 689, **1990**.
- Pérez-Bendito, D.; Silva, M.; *Trends in Anal. Chem.*, **15**, 232, **1996**.
- Pérez-Bendito, M. D.; Valcarcel, M.; Eds., “*Metodos Cinéticos de Análisis*”, Publicaciones del Monte Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Córdoba, **1984**.
- Pettersson, Å.; Karlberg, B.; *Anal. Chim. Acta*, **354**, 241, **1997**.
- Quencer, B. M.; Crouch, S. R.; *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 243, **1993**.
- Ross, R. T.; Leurgans, S.; *Methods Enzymol.*, **246**, 679, **1995**.
- Safavi, A.; Absalan, G.; Maesum, S.; *Anal. Chim. Acta*, **432**, 229, **2001**.
- Sánchez, E.; Kowalski, B. R.; *J. Chemometrics*, **4**, 29, **1990**.
- Sands, R.; Young, F. W.; *Psychometrika*, **45**, 39, **1980**.

4. Referencias

- Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Tauler, R.; *Anal. Chem.*, **69**, 2329, **1997**.
- Savitzky, A.; Golay, M. J. E.; *Anal. Chem.*, **36**, 1627, **1964**.
- Sekulink, S.; Seasholtz, M. B.; Wang, Z.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.*, **65**, 835A, **1993**.
- Silva, M.; *Analyst*, **118**, 681, **1993**.
- Smilde, A. K.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **15**, 143, **1992**.
- Smilde, A. K.; *J. Chemometrics*, **11**, 367, **1997**.
- Sternberg, J. C.; Stills, H. S.; Schwendeman, R. H.; *Anal. Chem.*, **32**, 84, **1960**.
- Stone, M.; Brooks, R. J.; *J. R. Stat. Soc. B*, **52**, 237, **1990**.
- Stone, M.; Jonathan, P.; *J. Chemometrics*, **8**, 1, **1994**.
- Sultan, M. S.; Walmsley, A. D.; *Analyst*, **122**, 1601, **1997**.
- Sutter, J. M.; Kalivas, J. H.; Lang, P. M., *J. Chemometrics*, **6**, 217, **1992**.
- Ten Berge, J. M. F.; *Convergence of PARAFAC preprocessing procedures and the Deming-Stephan method of iterative proportional fitting*, en: Coppi, R.; Bolasco, S.; Eds., Elsevier Science Pub., North-Holland, **1989**.
- Thomas, E. V.; Haaland, D. M.; *Anal. Chem.*, **62**, 1091, **1990**.
- Tu, X. M.; Burdick, D. S.; *Stat. Sinica*, **2**, 557, **1992**.
- Wold, H.; *Multivariate Analysis*, Ed. Krishnaiah, P. R., Academic Press, New York, **1966**.
- Wold, H.; *Soft Modeling by Latent Variables; the Non-linear Iterative Partial Least Squares Approach*, en *Perspectives in Probability and Statistics*, Papers in Honour of M. S. Bartlett, ed. J. Gani, Academic Press, London, **1975**.
- Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*; **2**, 37, **1987**.
- Wold, S.; *Technometrics*, **20**, 397, **1978**.
- Wythoff, B. J.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **18**, 115, **1993**.
- Ye, Y.-Z.; Mao, H.-Y.; Chen, Y.-H.; *Talanta*, **45**, 1123, **1998**.
- Zupan, J.; Gasteiger, J.; *Anal. Chim. Acta*, **248**, 1, **1991**.
- Zupan, J.; Gasteiger, J.; *Neural Networks for Chemists: An Introduction*, VCH, Weinheim, Germany, **1993**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN.
2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE METANOL Y ETANOL.
3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA 1-FENILETILAMINA.
4. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE, BI Y TRIDIMENSIONALES, EN ANÁLISIS CINÉTICO DIFERENCIAL.
5. SELECCIÓN DE LOS INTERVALOS DE LONGITUDES DE ONDA Y TIEMPOS PARA EL CALIBRADO DE UN SISTEMA CINÉTICO DE DOS COMPONENTES.
6. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE METILXANTINAS EN UN FÁRMACO.

1. INTRODUCCIÓN

En esta parte de la memoria se describen los trabajos que se incluyen en los anexos, destacando los aspectos más relevantes, y se realiza una discusión de los resultados de los mismos. Los detalles más concretos aparecen en los propios trabajos.

Aunque cada sistema cinético estudiado tiene unas características propias que lo definen, algunas se repiten en todos los estudios realizados en esta memoria:

- Gran similitud de las especies analizadas simultáneamente. Esta similitud puede ser estructural, cinética-espectral o ambas. En algunos casos, los analitos son estructuralmente parecidos pero presentan velocidades de reacción o espectros de sus productos diferentes, por lo que para su cuantificación se puede utilizar tanto la información aportada por la diferenciación cinética como la aportada por la diferenciación espectral (anexos 2, 3 y 5). En otros casos, aunque los analitos sean diferentes, sus productos de reacción pueden presentar espectros muy solapados, o incluso ser la misma especie, por lo que para su cuantificación se dispondrá únicamente de la información suministrada por las diferencias cinéticas (anexos 1 y 4).
- Gran cantidad de información cinética-espectral disponible. En todos los trabajos se aprovecha la instrumentación para registrar la máxima información posible. Sin embargo, no siempre es necesaria toda la información, por lo que se realiza un estudio para seleccionar la que proporciona mejores resultados.

- Utilización de similar metodología en todos los trabajos. Cuando se plantea un método cinético-espectrofotométrico para la resolución de mezclas, primero se optimizan las condiciones experimentales para poder efectuar el seguimiento de la reacción de manera óptima para todas las especies involucradas. Esta optimización incluye la selección de disolventes, tampón, concentraciones de reactivos y analitos, selección de intervalos de longitud de onda, tiempo total de reacción, etc. Seguidamente, se diseña la matriz de calibrado y predicción, teniendo en cuenta la complejidad del sistema estudiado. Una vez realizada la monitorización de la reacción, se efectúa el tratamiento numérico adecuado sobre los datos espectrofotométricos obtenidos y, seguidamente, se aplica la o las técnicas de calibración multivariable más adecuadas. En el caso de tratar muestras reales, se analizan previamente por un método de referencia para contrastar los resultados obtenidos con el método cinético. Cuando se pretende generalizar sobre una tendencia o comportamiento de diferentes técnicas de calibración se efectúan inicialmente simulaciones que, posteriormente, son contrastadas con los resultados obtenidos experimentalmente (anexos 3 y 4).
- Utilización de diferentes técnicas de calibración multivariable. Principalmente PLS, aplicado a sistemas lineales, e incluso a sistemas ligeramente no lineales para ver la posibilidad de ajuste de pequeñas no linealidades. Para sistemas estrictamente no lineales se han utilizado redes neuronales. También se ha estudiado el comportamiento de métodos tridimensionales, comparándolos con los métodos bidimensionales habituales.
- Cuando se han utilizado métodos de calibración bidimensionales para el tratamiento de los datos tridimensionales, se ha realizado el *unfolding* de los mismos, de manera que se han obtenido tablas de datos que tienen colocados en una misma fila, uno a continuación de otro, los distintos espectros registrados a diferentes tiempos ($\lambda_1 t_1, \lambda_2 t_1, \dots, \lambda_i t_j, \dots, \lambda_1 t_m, \lambda_2 t_m, \dots, \lambda_n t_m$).

2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE METANOL Y ETANOL

2.1 INTRODUCCIÓN.

En este trabajo se han cuantificado mezclas de metanol y etanol utilizando un método cinético basado en dos reacciones catalíticas acopladas. Esto implica que el sistema sea muy complejo y que se deban tener en cuenta muchos factores que pueden afectar a ambas reacciones. Aunque en el trabajo se destaca más el aspecto quimiométrico, puesto que la utilización de redes neuronales en sistemas cinéticos no estaba aún muy extendida, es importante hacer referencia a la optimización del sistema químico que es el que, en último término, condiciona la correcta resolución de las mezclas.

2.2 SISTEMA QUÍMICO.

La primera reacción (figura 13) se basa en la oxidación de los alcoholes a aldehídos utilizando un material biológico, la enzima *alcohol oxidasa* (AO). Existen muchas enzimas que catalizan la oxidación de alcoholes, pero ésta tiene la propiedad de poder actuar sobre el metanol, a diferencia de otras enzimas de uso más habitual, como por ejemplo la *alcohol deshidrogenasa* (ADH). La bibliografía muestra que la AO oxida más rápidamente a alcoholes de cadena corta que larga y aquí reside la diferenciación cinética del método propuesto. Aunque sería lógico pensar que un único grupo $-CH_2-$ en la cadena no afectaría demasiado, los estudios existentes muestran que existe una gran diferencia entre el metanol y etanol. Como segundo producto de la primera reacción se obtiene el agua oxigenada que también interviene en la segunda.

En la segunda reacción (figura 13), el aldehído que proviene de la primera cataliza la reacción de acoplamiento oxidativa de la *p*-fenilendiamina para obtener, en presencia de agua oxigenada, un producto principal de condensación: la base de Bandrowski (la imina de la bis(2',5'-diaminofenilbenzoquinona), de color rojo-violeta a pH ligeramente ácidos, con un máximo de absorción a 532 nm. Además, se puede formar la *p*-quinona, de color amarillento, con un máximo de absorción a 418 nm, que se puede considerar el producto final de la oxidación, aunque la mayor o menor extensión de la formación de este producto depende

mucho de las condiciones de reacción. La base de Bandrowski producida es la que se utiliza para monitorizar el sistema, aunque se ha de tener en cuenta que el producto final obtenido y, por tanto, el espectro registrado, es el mismo para los dos alcoholes, por lo que la única información para su discriminación será la obtenida a partir de las diferencias en la velocidad de reacción.

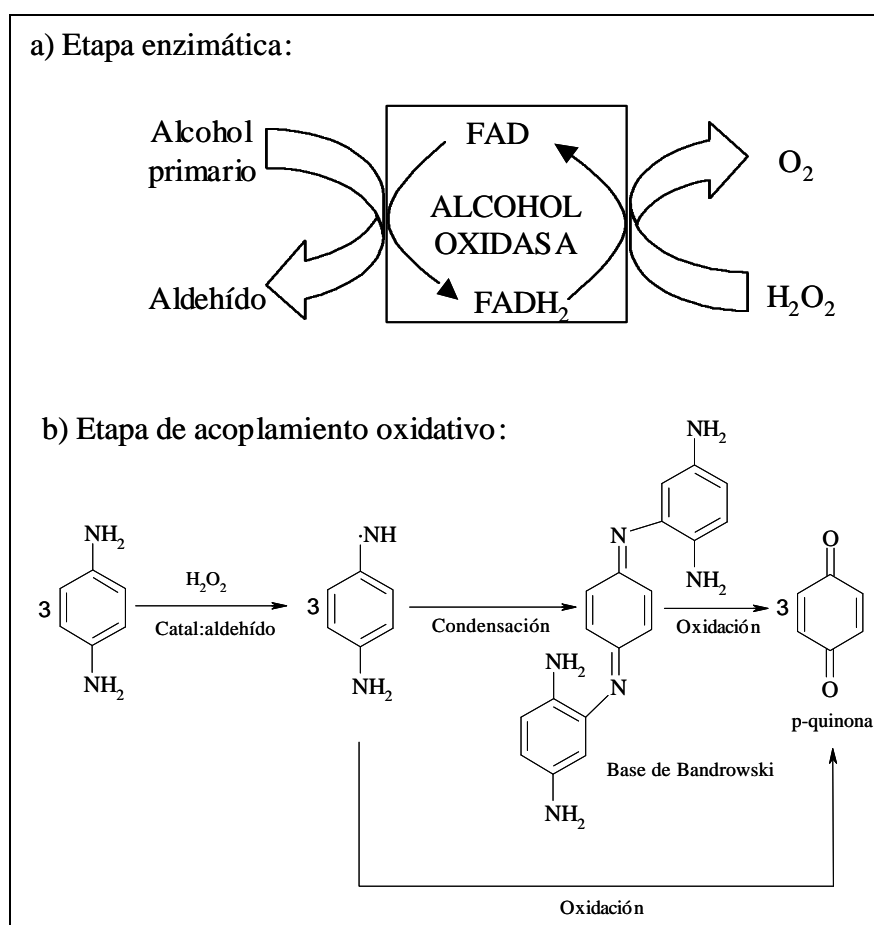


Figura 133. Esquema de la reacción del etanol y metanol.

Como se observa, el proceso global está influenciado por muchos factores tales como el pH, temperatura, concentración de reactivos y actividad enzimática, por tanto, todos estos parámetros tienen que ser optimizados. Uno de los parámetros clave es la actividad enzimática, la cual está altamente relacionada con el pH y la temperatura. En concreto, la actividad de la enzima *alcohol oxidasa* se controla mediante un *test*, ya que puede variar

mucho de una disolución a otra en distintos lotes. El pH más adecuado es aproximadamente 7, por lo que se ha utilizado un tampón fosfato. Su máxima actividad se sitúa en una temperatura de 25°C, por tanto, se ha trabajado a esta temperatura, cercana a la ambiental. Puesto que el producto es muy sensible a las condiciones externas, la enzima tiene que ser conservada en refrigerador.

Como se ha mencionado anteriormente, en la primera etapa del sistema químico estudiado se obtiene agua oxigenada, que es uno de los reactivos de la segunda, por lo que ésta se adiciona en exceso para que el proceso no dependa de su concentración, lo que dificultaría aún más la resolución del sistema. En la segunda reacción, el espectro del producto de la reacción también depende del pH, por lo que éste debe ser cuidadosamente controlado.

2.3 CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE METANOL Y ETANOL.

El producto de la reacción indicadora es el mismo para ambos analitos, ya que éstos se han transformado en aldehídos que únicamente actúan como catalizadores. Esto supone una limitación en la cuantificación simultánea, ya que tan solo se obtiene diferenciación cinética. Afortunadamente, la utilización de la AO hace que las cinéticas de ambos alcoholes sean muy diferenciadas y que se puedan cuantificar mezclas con relaciones de concentración etanol: metanol de 20 a 400. Esto es de gran interés, porque en muchas situaciones reales el metanol se presenta como una impureza asociada al etanol.

El sistema estudiado es altamente complejo: dos reacciones catalíticas acopladas. Un estudio individual y conjunto de los perfiles cinéticos en uno de los máximos de absorción (532 nm) refleja la presencia de un posible efecto inhibitor del etanol sobre el metanol (figura 2, anexo 1), la velocidad real es inferior a la teórica, especialmente en los primeros momentos de la reacción. Esto complica mucho más el sistema, ya que la existencia de una interacción entre los analitos implica la existencia de no linealidades. Todo ello, junto con el desconocimiento de los parámetros cinéticos, tales como las constantes de velocidad, hace necesario la utilización de la calibración multivariable.

Del seguimiento cinético-espectrofotométrico, utilizando un *diode array* como detector, se obtiene una gran cantidad de información que debe ser estudiada para ver si es necesaria en la

cuantificación. En este trabajo se ha realizado un estudio exhaustivo de la información, aunque sólo se presenten los resultados más relevantes. Además de los datos de absorbancia, se ha tratado su derivada respecto al tiempo, que no es más que la variación de la velocidad de reacción con el tiempo, obteniéndose así los mejores resultados, sobretodo para el metanol, que es el componente minoritario.

En modo absorbancia, se ha utilizado una matriz \mathbf{X} con 6893 variables (113 longitudes de onda \times 61 tiempos) y, en el caso de la derivada respecto al tiempo, se ha utilizado una matriz con 5763 variables (113 longitudes de onda \times 51 tiempos). El número de muestras en el conjunto de calibración ha sido de 45. Como método lineal de calibración se ha empleado PCR. El número de componentes principales óptimo, en ambos casos, ha sido 7, un valor elevado considerando que sólo tenemos dos analitos, pero que se justifica por la complejidad del sistema y aparición de no linealidades.

Cuando se describió el uso de las ANN ya se comentó que, para alimentar las neuronas de la capa de entrada, se podía utilizar tanto los datos originales como datos que contuvieran la información original comprimida, como es el caso de la utilización de los PCs obtenidos en una reducción previa de los datos. En este último caso, indirectamente se está utilizando toda la información registrada a la que se ha eliminado la contribución del ruido, que queda asociado a los últimos componentes principales. En este trabajo se han utilizado las dos estrategias. Se han construido redes en las que se han utilizado los *scores* del PCA como valores de entrada; de esta forma la arquitectura de la red tenía 7 neuronas en la capa de entrada. También se han utilizado los datos originales, aunque se han reducido a una sola longitud de onda (532 nm, máximo de absorción del producto formado, el mismo para metanol y para etanol) ya que no existe discriminación espectral. Puesto que el número de muestras es limitado, se han escogido solamente 32 tiempos del perfil cinético y 31 tiempos del perfil cinético derivado, ambos casos a 532 nm. No todos los tiempos tienen la misma importancia; la principal fuente de información discriminante se encuentra en los tiempos iniciales donde la velocidad es más rápida, por tanto, es posible eliminar datos de los tiempos finales de registro. Siempre se han utilizado dos neuronas en la capa de salida (concentración de metanol y etanol, respectivamente).

El proceso de construcción de un modelo con redes neuronales no es fácil y no se limita a la optimización de las neuronas presentes en cada capa (i, h, o). En este trabajo se ha estudiado la influencia en el resultado de los valores y distribución (gaussiana o uniforme) de los pesos iniciales y del tipo de función de transferencia utilizada (lineal, sigmoideal o tangencial). Los mejores valores se han obtenido con una función de transferencia sigmoideal y una distribución inicial de pesos gaussiana con un intervalo de ± 0.1 unidades. El número de neuronas de la capa oculta ha sido de 2 excepto en el caso de la utilización de las velocidades de reacción, que ha utilizado una arquitectura (31-3-2).

Los valores de %RSEP para el conjunto de validación externa hallados con el modelo óptimo ANN (31-3-2) utilizando la variación de la velocidad con el tiempo, son de aproximadamente un 5% para el metanol y un 6 % para el etanol. La utilización de las ANN proporciona mejoras de un 9%, en términos de error, en la cuantificación del componente minoritario (metanol).

3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA 1-FENILETILAMINA

3.1 INTRODUCCIÓN.

Los enantiómeros de un compuesto poseen las mismas propiedades químicas y físicas en un entorno simétrico, pero pueden diferir en un entorno asimétrico. Su cuantificación se presenta como uno de los retos en química analítica, sobretodo cuando uno de los enantiómeros está en gran exceso respecto al otro, el cual se considera como una impureza no deseada. Una de sus características es que presentan un comportamiento diferente respecto a la luz polarizada plana y que, además, pueden reaccionar con otros compuestos quirales a diferentes velocidades.

Aunque existen distintos métodos de identificación y cuantificación de enantiómeros, en este trabajo se utiliza como alternativa un método cinético-espectrofotométrico en que los enantiómeros reaccionan con un reactivo quiral para formar una par de diastereoisómeros,

que presentan espectros UV prácticamente idénticos y espectros de dicroísmo circular muy diferentes. Las diferencias cinéticas y espectrales permiten la cuantificación simultánea de los enantiómeros utilizando como detector un espectrofotómetro de dicroísmo circular (DC) y como técnicas de calibración PLS, PCR y ANN.

3.2 SISTEMA QUÍMICO.

La sustancia quiral estudiada es la 1-feniletilamina y como reactivo quiral el aldehído (-)-citronellal (figura 14). La cinética entre una amina y un aldehído (carbonilo) está bien definida en la bibliografía y, en presencia de un exceso de carbonilo y a pH constante, se puede considerar de pseudo-primer orden respecto a la amina.

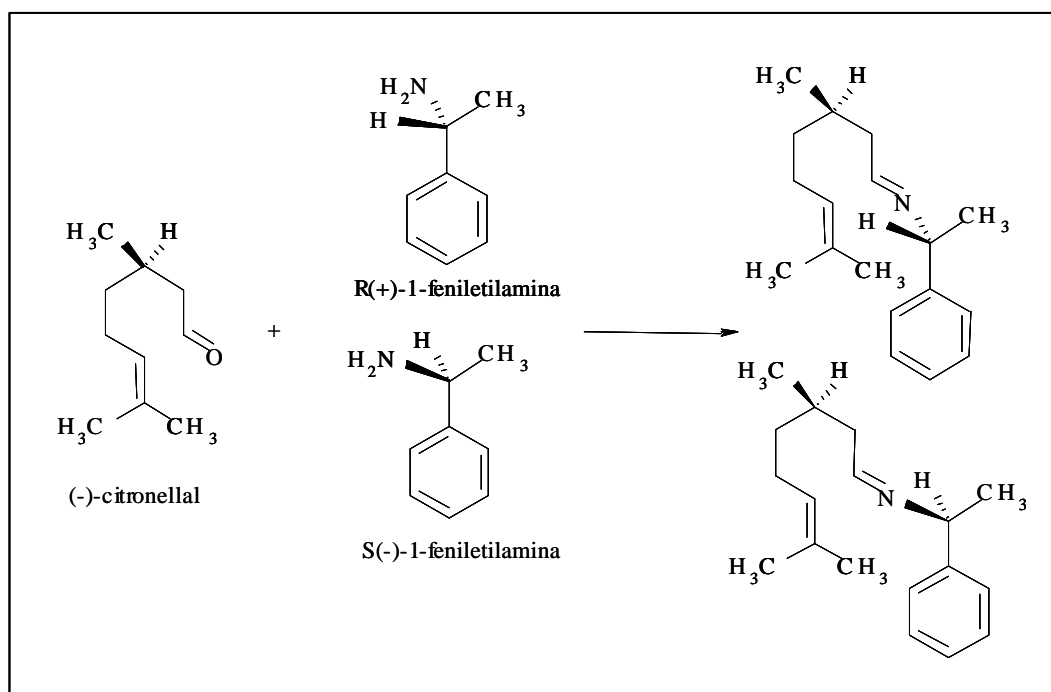


Figura 14. Esquema de la reacción para los enantiómeros de la 1-feniletilamina.

El primer problema que se presentó en la selección de las condiciones experimentales fue la baja solubilidad del aldehído en agua. Para solucionarlo se escogió una mezcla isopropanol-agua al 50% que aseguraba su solubilidad en los niveles de concentración deseados. La

utilización de mezclas de disolventes es común en métodos cinéticos, pero esto lleva asociado una serie de riesgos: problemas de homogenización en la celda de medida, problemas de dispersión, problemas de solubilidad de los tampones utilizados, limitaciones en la utilización de temperaturas elevadas, posibilidad de reacciones secundarias donde intervenga alguno de los disolventes, etc. El isopropanol fue escogido por reunir ciertas características que superaban algunos de estos inconvenientes: no presentaba reacciones secundarias por tener el grupo alcohol impedido y, al estar mezclado con agua, la mezcla en la celda de medida era relativamente rápida utilizando un sistema de homogenización continuo. La utilización de esta mezcla de disolventes condicionó la utilización del tampón, ya que la mayoría de sales habitualmente utilizadas son poco solubles en alcoholes.

Utilizando la técnica espectrofotométrica de absorción en el UV-visible, se realizó un estudio de ciertas variables experimentales, como el pH y temperatura, para observar su influencia en las velocidades de reacción y ver el comportamiento individual de los enantiómeros. El estudio de las cinéticas individuales en función del pH (figura 3, anexo 2) muestra que, además de aumentar la velocidad de reacción con la disminución del pH, también aumenta la diferenciación cinética entre los dos enantiómeros. Esta observación abría el camino para obtener unas condiciones en las que las cinéticas de los dos enantiómeros fueran más distintas y permitieran una mejor cuantificación de la mezcla, ya que, cuando se trata de estudiar la reacción entre los enantiómeros de un mismo compuesto con un reactivo quiral, cabe esperar que éstos tengan velocidades de reacción parecidas y que las diferencias cinéticas no sean suficientes para una correcta cuantificación.

El estudio de la influencia de la temperatura muestra la tendencia esperada y, aunque a bajas temperaturas parece haber un poco más de discriminación cinética, se escogió trabajar a la temperatura más cercana a la ambiental, 25 °C.

3.3 RESOLUCIÓN DE MEZCLAS DE ENANTIÓMEROS.

(a) Diseño de la matriz del calibrado.

Un aspecto importante a remarcar es el tipo de diseño utilizado para las muestras de calibrado y de predicción. No se ha realizado un diseño convencional en el que cada uno de los analitos

está, independientemente, a distintos niveles de concentración, sino que se ha tenido en cuenta que, en situaciones reales, cuando hay mezcla de enantiómeros no se considera la concentración de uno independientemente a la del otro, sino que se hace mención a la concentración total de amina, o bien al exceso enantiomérico. Debido a ello se han empleado cinco niveles de concentración total de amina (cinco diagonales en la figura 2 del trabajo).

(b) Espectrofotometría UV-Vis.

Con el espectrofotómetro UV de *diode array* se ha realizado la cuantificación de las mezclas donde la concentración de reactivo es mucho mayor que la suma de concentraciones de analitos, por lo que la cinética seguida es de pseudo-primer orden con respecto a los analitos. La diferencia espectral entre los productos de reacción es mínima (no se percibe visualmente) y se observa que la diferencia cinética, al pH de trabajo, proporciona relaciones de constantes de velocidad de aproximadamente 1.2. En estas condiciones difíciles, se ha utilizado la regresión PLS para la cuantificación, construyendo los modelos de calibración con las variables autoescaladas. En situaciones normales, esto supone un riesgo, ya que se potencian más las contribuciones de pequeñas señales, como las propias del ruido, pero en este trabajo interesa, precisamente, exaltar las pequeñas diferencias en los espectros para poder introducir más información en la matriz del calibrado y ayudar a la cuantificación de las mezclas. El estudio de la influencia sobre la cuantificación del intervalo de longitudes de onda seleccionado, muestra que los mejores resultados se obtienen utilizando prácticamente todo el intervalo de longitudes de onda (eliminando únicamente la cola de la banda del aldehído). Esto sugiere que, aunque pequeña, la información espectral es lo suficientemente importante para tenerla en cuenta en la calibración. La utilización del modo espectral de 1ª derivada mejora los resultados, seguramente porque se han eliminado problemas de dispersión producidos por la utilización de disolventes mixtos. Los valores de %RSEEP hallados utilizando esta técnica están alrededor de un 7% para ambos analitos.

(c) Dicroísmo circular.

La limitación que presenta la técnica viene de la instrumentación disponible. Al ser un espectrofotómetro de barrido, la velocidad de reacción no puede ser muy elevada si se quiere

abarcar un amplio rango de longitudes de onda, por lo que se ha disminuido la velocidad de la reacción de formación de la imina. Para ello se ha disminuido la concentración de reactivo de forma que ya no está en gran exceso, lo que implica que la reacción ya no sigue una cinética de pseudo-primer orden.

A pesar de esta dificultad, la técnica es muy interesante, puesto que se obtiene una gran diferenciación espectral entre los enantiómeros. Cada enantiómero presenta una señal de signo opuesto al otro, tal como se muestra en la figura 7 del trabajo. En esta misma figura se observa claramente que la reacción de la mezcla racémica tiene el mismo signo que la (S)(-)-1-feniletilamina.

Se han aplicado diversos pretratamientos a los datos, siendo la 1ª derivada la que proporcionaba mejores resultados.

Al utilizar CD se tiene mayor diferenciación espectral y, por ello, mucha más información para resolver el sistema, por lo que al utilizar PLS o PCR los valores de %RSEEP son mucho menores que en el estudio realizado con UV-visible. Sin embargo, al no tener ahora un sistema de pseudo-primer orden, existe un cierto comportamiento no lineal, el cual no es ajustado con un simple PLS. Por ello, se han utilizado ANNs para la cuantificación de cada uno de los analitos. Para reducir las variables se ha realizado un PCA y los *scores* obtenidos se han empleado como datos de entrada. Después de optimizar los parámetros de la red, se ha llegado a la arquitectura óptima (2-2-1). De esta manera, el %RSEEP ha disminuido hasta valores inferiores al 3.5% para ambos analitos.

4. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE, BI Y TRIDIMENSIONALES, EN ANÁLISIS CINÉTICO DIFERENCIAL.

4.1 INTRODUCCIÓN.

Este trabajo tiene como objetivo la comparación del comportamiento de diferentes métodos de calibración multivariable, tanto bidimensionales como multidimensionales, para un sistema de tres componentes. También se desea estudiar la eficacia del método de la

regresión continua, muy poco utilizada para análisis cuantitativo utilizando métodos cinéticos.

En una primera etapa, se ha realizado la cuantificación utilizando datos simulados, en los que se ha controlado el solapamiento espectral, las relaciones de constantes de velocidad y el ruido en el sistema, tanto instrumental como en la cinética de la reacción, y se ha estudiado cada una de las situaciones con cada una de las técnicas de calibrado. Las simulaciones tienen la ventaja de poder generalizar los resultados, pero la situación experimental siempre es distinta a la simulada, por lo que, posteriormente, se ha estudiado el comportamiento de los métodos de calibración en la cuantificación de un sistema químico basado en la reacción de complejación del 4-(2-piridialazo)resorcinol (PAR) con Co, Ni y Ga, estudiando mezclas binarias y ternarias.

4.2 SIMULACIONES.

En la bibliografía aparecen muchos trabajos que presentan simulaciones de sistemas cinéticos de mezclas binarias, pero no se ha encontrado ninguna referencia para sistemas con más de dos componentes. Las simulaciones de datos cinético-espectrofotométricos para sistemas de dos componentes son fácilmente interpretables, ya que es posible representar gráficamente la evolución del error de la concentración de los analitos frente a las relaciones de constantes de velocidad k_i/k_j , o frente a las diferencias entre los máximos de los picos $\Delta\lambda_{\max}$ y ver cuál es la tendencia. Cuando se trata de hacer simulaciones de tres componentes, en las que se varía tanto las tres constantes de velocidad como la posición de las bandas de los analitos, la visualización de los resultados se complica, ya que no tiene sentido representar pares de componentes, puesto que el tercer componente también varía simultáneamente. Es necesario utilizar un parámetro que tenga en cuenta todos los cambios y que pueda generalizarse tanto a sistemas de dos componentes como de múltiples componentes. Para ello, en este trabajo se define el índice de discriminación (I.D.), que proporciona una visión global de la similitud de las especies involucradas en un sistema cinético-espectral, ya que tiene en cuenta la correlación que existe entre los perfiles cinéticos y espectrales entre pares de analitos x, y .

$$\text{I.D.} = \left[\prod_{x=1, y=2}^{x=m-1, y=m} (1 - r_{xy}^{\text{espectral}} \cdot r_{xy}^{\text{cinetico}}) \right]^{1/n}; x < y$$

donde m es el número de componentes o especies analizadas. El índice de discriminación varía entre 0 y 1. Para valores grandes cabe esperar una buena resolución de los analitos, ya que se trata de especies muy diferentes, tanto en los espectros como en la cinética de la reacción. Valores próximos a 0 indican que las especies tienen espectros y cinéticas muy similares, por lo que es de esperar una mala cuantificación.

En todo el conjunto de simulaciones, los valores relativos al ruido, ya sea ruido instrumental (fluctuaciones en la señal registrada) o ruido en el sistema cinético (fluctuaciones en las constantes de velocidad), se han mantenido constantes.

Para los métodos bidimensionales de calibración multivariable, se ha obtenido una tendencia del error global que era la esperada (índice de discriminación alto \Rightarrow menor error), tal como se observa en la figura 2 del trabajo. En general, PCR, PLS y CR proporcionan resultados similares, aunque esta última parece una técnica que permite tratar sistemas con especies más parecidas, ya que índices de discriminación ligeramente menores permiten obtener el mismo valor de %RSEEP (en el trabajo aparece como $\text{RSEP}(\%)_m$) que las otras técnicas bidimensionales. Aunque MLR presenta la misma tendencia, los errores son mucho más elevados y, por tanto, no es adecuada para los diferentes grados de solapamiento espectral y cinéticos considerados en las simulaciones.

Las técnicas de calibración multidimensionales proporcionan resultados muy distintos. En el caso del PARAFAC, el error en la cuantificación es muy elevado, sin que siga ninguna tendencia con el índice de discriminación, por lo que su utilización en sistemas cinéticos con especies muy parecidas no parece una buena opción. El método nPLS proporciona errores del mismo orden que los métodos bidimensionales, aunque la tendencia con el índice de discriminación no queda clara.

El índice de discriminación da una visión global de la influencia de la similitud espectral y cinética, pero no permite ver la influencia de cada una de ellas por separado. Los algoritmos nPLS y PARAFAC necesitan que ambos coeficientes de correlación, cinéticos y espectrales, sean pequeños (poca similitud entre los analitos) para conseguir una cuantificación óptima.

4.3 SISTEMA QUÍMICO.

Para comprobar los resultados obtenidos en las simulaciones, se ha utilizado un sistema químico simple, basado en la reacción de complejación del PAR con distintos metales. Estas reacciones de formación de complejos con PAR son muy rápidas y han sido estudiadas, desde el punto de vista cinético, utilizando el método de sustitución de ligando, que tiene lugar a velocidades más lentas. En este trabajo se ha estudiado la reacción directa de formación de complejos que, a pesar de ser una reacción muy rápida, no ha supuesto ningún problema ya que se disponía de un sistema de mezcla rápida de reactivos y un sistema de detección capaz de utilizar tiempos de integración muy pequeños. El sistema de flujo interrumpido (*stopped flow*) utilizado ha sido descrito previamente en la introducción.

Los espectros de los productos de la reacción y la velocidad de reacción de los tres metales analizados dependen del pH utilizado, por tanto, esta variable ha sido perfectamente controlada y tanto la disolución del reactivo como las mezclas de los metales han sido preparadas en tampón borato a pH 7.

Utilizando condiciones de pseudo-primer orden respecto a los analitos, los estudios individuales efectuados muestran que los tres metales presentan diferencias cinéticas y espectrales tal como se indica en la tabla 2 del trabajo. Los metales más parecidos entre sí son Ni y Ga, pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las simulaciones y trabajos previos hallados en la bibliografía cabe esperar una buena resolución.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE MEZCLAS DE Co-Ni Y DE Co-Ni-Ga.

Un aspecto importante a destacar es la cinética del Co. La velocidad de reacción del Co es muy rápida, y hay que tener en cuenta que, cuando se pone en marcha el sistema de registro, hay un tiempo de espera de 75 ms (característico del instrumento utilizado). Debido a esto, en el primer tiempo registrado la reacción del Co ha evolucionado casi por completo, como se observa en la figura 4 del trabajo. A pesar de ello, el Co presenta un índice de discriminación alto respecto a los otros analitos, lo que presupone una correcta cuantificación.

Debido a que se ha utilizado una velocidad de registro grande y un tiempo de integración muy pequeño, el ruido instrumental ha sido muy importante. Para compensar este ruido aleatorio, cada cinética se ha registrado por duplicado y, posteriormente, se han promediado los replicados. Los estudios realizados muestran que la utilización de derivadas no mejora los resultados, por lo que sólo se van a comentar los resultados en modo absorbancia.

La región espectral inferior a 520 nm no es útil debido a la gran absorptividad del reactivo, mientras que por encima de 560 nm los complejos metal-PAR tienen una absorbancia muy baja. Se han probado diferentes tiempos de registro, y los mejores resultados se han obtenido con un tiempo total de registro de 6 y 8 s para los sistemas de dos y tres componentes, respectivamente.

Antes del estudio del sistema con tres componentes se realizó un calibrado del sistema Co-Ni, ya que no existía ningún precedente en la bibliografía que cuantificara mezclas de ambos metales por reacción de complejación directa. Como se muestra en la tabla 2 del trabajo, el índice de discriminación entre el Co y el Ni es lo suficientemente grande para que no haya ningún problema en la cuantificación. Como muestran los resultados de la tabla 3 del trabajo, la cuantificación de estas mezclas binarias ha sido satisfactoria con todas las técnicas, excepto con el MLR y el PARAFAC. Al igual que con las simulaciones, CR ha sido ligeramente superior a las otras técnicas.

El calibrado efectuado con el sistema de tres componentes muestra la misma pauta. De nuevo, CR ha proporcionado resultados ligeramente mejores que los obtenidos por PCR, PLS y nPLS, al igual que sucedía en las simulaciones. PARAFAC y MLR no pueden ser utilizados en la resolución de sistemas con grandes similitudes espectrales y/o cinéticas.

El % de error obtenido en el sistema químico es significativamente mayor que el obtenido en las simulaciones. Ello es debido a que las simulaciones se han realizado asumiendo un 1 % de fluctuación en las constantes de velocidad y un 1% de error instrumental. Utilizando las constantes de velocidad halladas experimentalmente en el sistema químico estudiado y los espectros de los productos de la reacción química, se realizó una nueva serie de simulaciones variando ambos errores entre el 0 y el 10 %. Como se observa en la figura 5 del trabajo, el ruido instrumental ha influido en el error de la cuantificación de los analitos mucho más que las fluctuaciones de las constantes cinéticas; excepto en el caso de la técnica nPLS, capaz de

realizar la descomposición en factores y la cuantificación con una influencia mínima del ruido.

5. SELECCIÓN DE LOS INTERVALOS DE LONGITUDES DE ONDA Y TIEMPOS PARA EL CALIBRADO DE UN SISTEMA CINÉTICO DE DOS COMPONENTES

5.1 INTRODUCCIÓN.

Actualmente, con los detectores de diodos en línea es posible el registro completo de espectros UV-visible en décimas de segundo. Si se sigue una reacción con el tiempo a múltiples longitudes de onda, podemos disponer de una gran cantidad de información para ser analizada, aunque mucha de esta información es redundante, por lo que se suele proceder a una selección de la misma, habitualmente de forma empírica y en función de las características del sistema estudiado.

En este trabajo se propone un método sencillo para la selección de los intervalos de longitudes de onda y de tiempo a utilizar en la cuantificación de un sistema de dos componentes. En primer lugar, se realiza el estudio sobre datos simulados y, posteriormente, se comprueba su validez con los datos cinético-espectrales obtenidos en la reacción de azocopulación de la difilina y proxifilina con el ion diazo del ácido sulfanílico (en condiciones de pseudo-primer orden).

5.2 SIMULACIONES.

En la etapa de simulaciones se han generado datos para un sistema cinético-espectrofotométrico con dos analitos que forman dos productos de reacción, considerando que también se puede producir una interferencia que absorbe en la misma zona. Esta especie interferente puede ser un producto secundario de reacción o incluso una banda de otra especie intermediaria absorbente que se puede ver alterada en el transcurso de la reacción. En este

caso en concreto, el interferente simulado sigue una cinética mucho más lenta que la de los analitos y con una absorptividad menor.

Se consideró que los dos productos de reacción presentaban un grado de solapamiento espectral alto y constante, mientras que la especie interferente variaba el grado de solapamiento espectral con los analitos de interés sin variar su constante de velocidad (ver figura 2, anexo 4). También se modificó la relación de constantes de velocidad entre los analitos. El ruido instrumental y las fluctuaciones en los valores de las constantes de velocidad (lo que equivale a variaciones en la cinética de la reacción) se mantuvieron constantes con valores obtenidos en estudios anteriores realizados por este grupo. Las concentraciones fueron seleccionadas de manera que la reacción fuera de pseudo-primer orden respecto a los analitos.

El objetivo de las simulaciones fue observar hasta qué punto se puede recortar el espectro de los productos de la reacción sin que los modelos de calibración se vean afectados, es decir, cuánta información puede ser eliminada, del espectro de la especie interferente e incluso de analitos, para obtener unos resultados de cuantificación satisfactorios. Para ello se utilizaron distintos intervalos de longitudes de onda en la cuantificación; para cada uno de ellos, se realizó un conjunto de simulaciones variando la relación de constantes de velocidad entre los analitos de interés y el solapamiento con la especie interferente.

Cada uno de los solapamientos proporciona un grado distinto de correlación entre los espectros y cada relación de constantes de velocidad ensayada produce una correlación distinta entre las cinéticas de los analitos (ver figura 3, anexo 4). El producto de los coeficientes de correlación cinético y espectral proporciona una medida sencilla de la similitud cinético-espectrofotométrica entre los analitos. En la figura 4 del trabajo se representa el PRESS obtenido en la cuantificación de las muestras frente al producto de los coeficientes de correlación. Como se puede observar, a partir de un cierto valor del producto (alrededor de 0.98), el PRESS aumenta considerablemente.

5.3 SISTEMA QUÍMICO.

La difilina y proxifilina son metilxantinas capaces de reaccionar con muchos agentes azocopulantes. Sin embargo, la reacción no se efectúa directamente y es necesario romper el núcleo pirimidínico utilizando medio básico (figura 15).

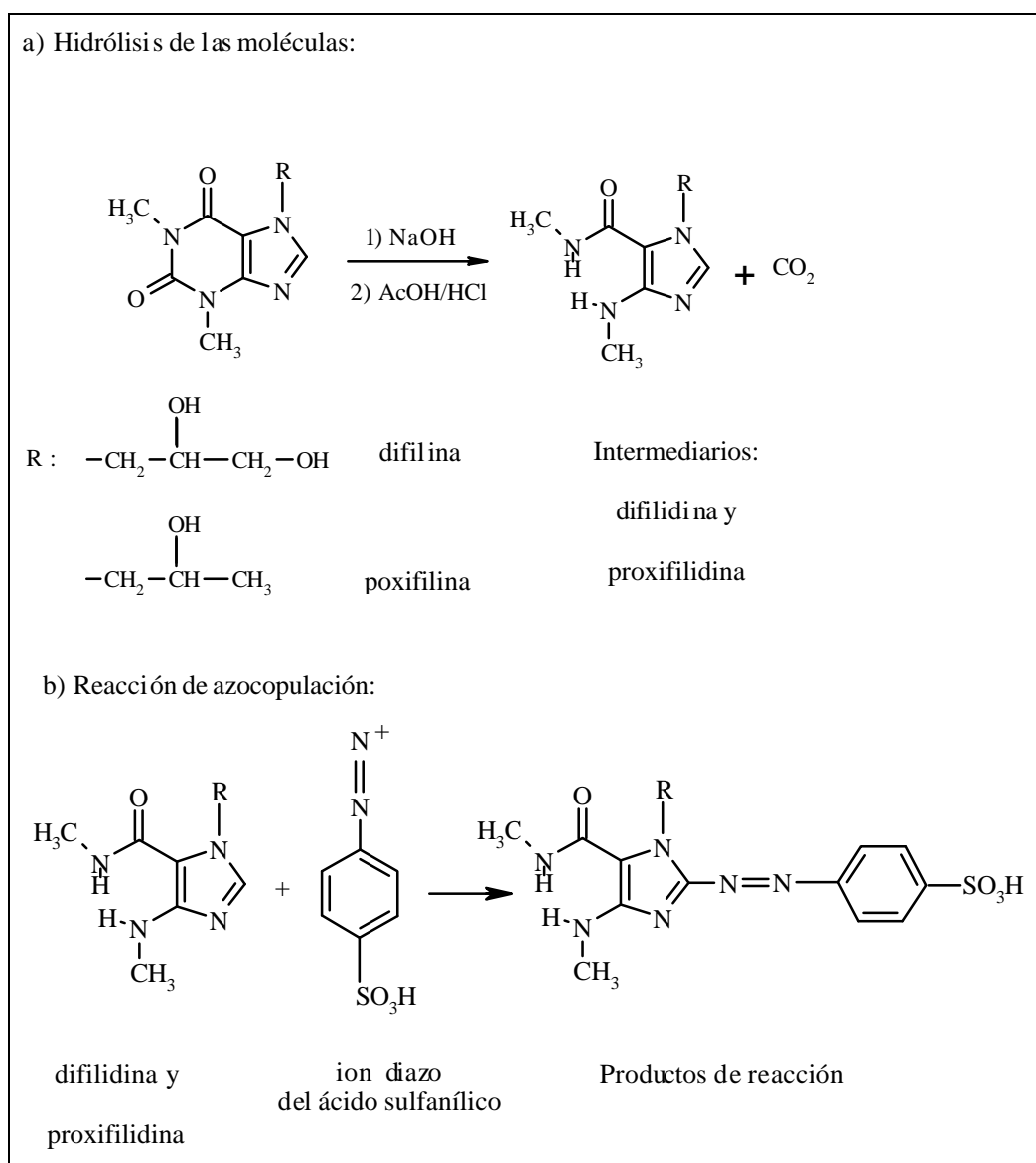


Figura 15. Esquema de las etapas de reacción para la difilina y proxifilina.

En primer lugar, fue necesario optimizar la etapa de hidrólisis para que la cinética de la segunda etapa (la reacción indicadora) no dependiera de ninguna de las variables de la reacción de hidrólisis. Aunque estuviera descrito en la bibliografía para una de las especies, era necesario determinar la cantidad de NaOH necesaria cuando se trataba la mezcla de los dos analitos, así como el tiempo y la temperatura de reacción. Después de un proceso de neutralización, se optimizó la segunda etapa, que presentaba una gran dependencia del pH. Debido al tratamiento de hidrólisis de las mezclas, el medio de reacción tenía una fuerza iónica muy elevada, por lo que se tuvieron que ensayar diversas disoluciones tampón en la celda de medida. El tampón más adecuado para las condiciones de trabajo fue la mezcla de ácido cítrico / NaOH.

La cinética de azocoplación de estas especies en medio básico es muy rápida y no varía excesivamente en pequeños intervalos de pH. Se escogió trabajar a un pH ácido, adecuado para conseguir un tiempo de registro corto pero que pudiera seguirse con la instrumentación disponible.

La posible presencia de metales puede desestabilizar los azocompuestos formados; además, se pueden formar complejos con los iones diazo, que son agentes quelantes, por lo que se añadió una cierta cantidad de EDTA con la finalidad de enmascarar la posible presencia de metales.

Se ha utilizado un exceso de sal diazo para mantener unas condiciones de reacción de pseudo-primer orden con respecto a los analitos.

Si prestamos atención al espectro de los productos de reacción (figura 6, anexo 4), para cada analito se obtienen dos bandas: una de ellas ligeramente diferente para cada uno y otra, centrada a 450 nm, igual para ambos. Esta segunda banda puede corresponder a un subproducto de reacción ya que no podemos perder de vista el tratamiento de hidrólisis alcalina que sufren las mezclas en la primera etapa. Esta banda está parcialmente solapada con la banda característica de cada especie, por lo que el estudio del intervalo de longitudes de onda óptimo permitirá decidir si contiene información útil para la resolución del sistema o puede ser eliminada.

5.4 CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE DIFILINA Y PROXIFILINA.

Aunque no se muestra ningún resultado, se ha probado la cuantificación utilizando diferentes modos espectrales y ha sido la primera derivada la que proporcionaba menores coeficientes de correlación y mejores resultados de cuantificación.

En la cuantificación de mezclas utilizando la calibración PLS, se ha obtenido la misma tendencia que en las simulaciones, sin observarse ninguna desviación de la linealidad. Una prueba de ello es que, a pesar de la gran similitud espectral y cinética, el número de factores óptimos calculados en el modelo PLS ha sido de 3. Como se observa en la tabla 1 del trabajo, a medida que disminuye el intervalo de longitudes de onda seleccionado, disminuye el producto de los coeficientes de correlación cinética y espectral, así como los errores asociados. Para el intervalo de longitudes de onda seleccionado (350-410 nm) y el intervalo de tiempo que proporciona la mínima correlación cinética, el producto de correlaciones proporciona un valor de 0.985 muy en el límite de los valores observados en las simulaciones (figura 3, anexo 4).

En este trabajo se ha estudiado la precisión de los modelos estudiando el error estándar de predicción (SEP) y la desviación estándar entre replicados (SDBR). Este último parámetro se calcula a partir de replicados de la misma composición, por lo que es una medida de la reproducibilidad experimental (fórmula 4, anexo 4); mientras que el SEP se calcula a partir de las diferencias entre los valores calculados y los de referencia, teniendo en cuenta el sesgo (*bias* de la fórmula 2, anexo 4). Si el modelo de calibración no es correcto, las diferencias entre las muestras serán mayores que las debidas únicamente a la reproducibilidad experimental, por lo que se puede realizar una prueba F para comprobar si SEP y SDBR son significativamente iguales. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre ambos valores, lo que indica que PLS cuantifica correctamente ambos analitos.

6. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE METILXANTINAS EN UN FÁRMACO

6.1 INTRODUCCIÓN.

Todos los trabajos comentados hasta ahora han sido aplicados a muestras preparadas en el laboratorio. En este trabajo, se pone a punto un método para la cuantificación de mezclas de teofilina, difilina y proxifilina en un preparado farmacéutico comercial, utilizando el mismo sistema químico que en el trabajo 4. Los resultados obtenidos han sido contrastados con los proporcionados por HPLC, que se ha utilizado como método de referencia.

6.2 SISTEMA QUÍMICO.

Para diseñar el método se han tenido en cuenta los mismos aspectos que en el trabajo anterior, en el que se estudiaba el sistema con difilina y proxifilina, pero considerando, además, el comportamiento de la teofilina. Esta última especie, a pesar de ser de la misma familia que la difilina y proxifilina, presenta una reactividad muy diferente al no tener sustituyentes en la posición 7 (figura 16). Tiene muy baja solubilidad en agua y es capaz de azocopular sin necesidad de ser hidrolizada, lo que ha sido aprovechado para su cuantificación en otros sistemas.

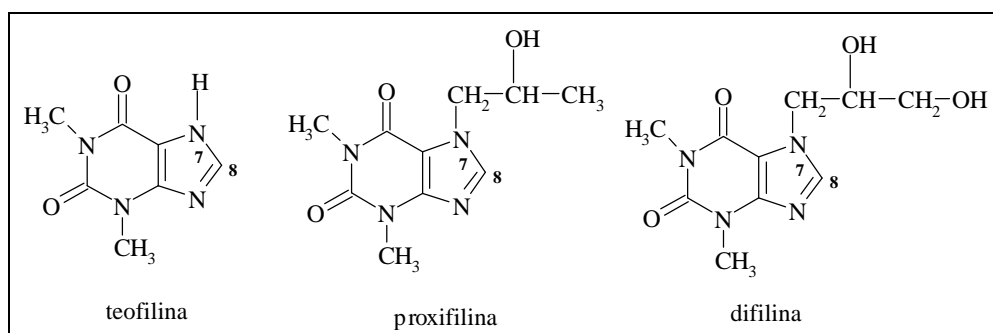


Figura 16. Estructura de las tres metilxantinas.

Así como la difilina y la proxifilina tienen velocidades de reacción muy similares a cualquier pH, la velocidad de reacción de la teofilina está altamente influenciada por el pH, tal como se observa en la figura 2 del trabajo; además, el pH también influye en el espectro del producto de la reacción, desplazándose el máximo de absorción a longitudes de onda mayores al aumentar el pH. Por todo ello, esta variable debe estar perfectamente controlada. De nuevo se ha escogido un pH ácido para poder realizar el seguimiento de la reacción espectrofotométricamente, ya que la teofilina reacciona muy rápidamente a pH básicos. Las concentraciones utilizadas en el sistema aseguran que las condiciones de la reacción sean de pseudo-primer orden respecto a los analitos.

En las condiciones de trabajo seleccionadas, el espectro de la teofilina es muy diferente al de la difilina y proxifilina, tal como se muestra en la figura 4 del trabajo, y, además, su absorptividad molar es más elevada. Todo ello facilita su cuantificación.

6.3 CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE TEOFILINA, DIFILINA Y PROXIFILINA.

Para el método cinético-espectrofotométrico, se han registrado los espectros durante el tiempo necesario para que se completara la reacción más lenta; se ha calculado la primera derivada y se ha utilizado PLS para el calibrado. Puesto que se trabaja en condiciones de pseudo-primer orden y, por los resultados del artículo anterior en que el sistema de dos componentes era claramente lineal, las concentraciones escogidas para efectuar el calibrado han seguido un diseño sencillo 3^3 y han sido escogidas de manera que el punto central proporcionara concentraciones similares a las existentes en el fármaco.

En la primera parte del trabajo se ha buscado el intervalo óptimo de longitudes de onda y de tiempos de reacción utilizando muestras preparadas en el laboratorio (tabla 1, anexo 5). La teofilina presenta un espectro suficientemente diferente para que pueda cuantificarse individualmente, con un único componente PLS, en la zona donde únicamente absorbe (470-550 nm). Sin embargo, para la cuantificación de difilina y proxifilina, si se utiliza la misma banda del espectro que en el artículo anterior (350-410 nm), se necesita doble número de componentes PLS. Si el modelo se construye utilizando ambas bandas, se mantiene el

elevado número de componentes pero el error en la determinación de la difilina disminuye apreciablemente. Al igual que en el trabajo anterior, la banda situada entre 410-470 nm no aporta información útil. El que sea necesario considerar la banda propia de la teofilina en la cuantificación de la difilina puede ser debido a que exista algún tipo de interacción entre ellos. El elevado número de factores PLS se explicaría por la corrección de la no linealidad en el comportamiento de la difilina.

Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo, el método se ha aplicado a la cuantificación de los principios activos de un preparado farmacéutico comercial. Primero, se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación de los analitos, realizando la cuantificación por interpolación en la recta obtenida al representar el área del pico frente a la concentración inyectada. De esta forma, se ha utilizado un método de referencia para la comparación de los resultados del método cinético-espectrofotométrico. En la tabla 2 del trabajo se comparan los resultados obtenidos con ambos métodos. Los valores son similares, aunque en el caso de la difilina el intervalo de confianza aumenta con el método cinético, lo que puede ser debido a la menor absorptividad de esta especie frente a la de la teofilina y proxifilina.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de los trabajos presentados en esta memoria, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- ✓ Las técnicas de calibración multivariable pueden ser utilizadas conjuntamente con los métodos cinético-espectrofotométricos para la cuantificación simultánea de especies, tanto en muestras preparadas en el laboratorio como en reales, aunque el sistema cinético estudiado sea muy complejo y no se conozca el mecanismo involucrado.
- ✓ La utilización de enzimas de grupo, junto con los métodos de calibración multivariable, permiten la resolución de especies muy similares a diferentes niveles de concentración. Incluso si el producto de reacción es el mismo para todos los analitos a analizar simultáneamente y, por tanto, se obtiene el mismo espectro para todos ellos, el uso de la variación de la señal con el tiempo es el elemento diferenciador y permite la cuantificación simultánea de especies.
- ✓ Los métodos cinético-espectrofotométricos, junto a la calibración multivariable, pueden ser utilizados para la resolución de especies muy similares como es el caso de los enantiómeros. Si además de poseer diferente velocidad de reacción con un reactivo quiral, el sistema de detección permite obtener una señal muy diferenciada para cada uno, la cuantificación se llevará a cabo satisfactoriamente.
- ✓ Las simulaciones constituyen una herramienta muy importante para poder generalizar el comportamiento de técnicas de calibración o métodos de selección de variables. Los parámetros a modificar en las simulaciones han de ser lo más parecidos posible a las situaciones reales. A pesar de la ayuda que suponen las simulaciones, la prueba definitiva será siempre la aplicación a un sistema químico real.

- ✓ El índice de discriminación, que engloba los coeficientes de correlación cinético y espectral, es un buen parámetro para observar de forma global el grado de solapamiento espectral y cinético entre todos los analitos que se quieren cuantificar simultáneamente. La tendencia de las técnicas de calibración multivariable bidimensionales es la esperada: a medida que aumenta el índice de discriminación disminuye el error de predicción.
- ✓ La instrumentación disponible permite obtener gran cantidad de información cinética-espectral para cada mezcla analizada. De toda esta información es necesario seleccionar la más adecuada y eliminar aquella innecesaria y redundante. La selección de los mejores intervalos de longitudes de onda y tiempo podrá ser efectuada midiendo los coeficientes de correlación cinético y espectral entre las especies involucradas. Coeficientes de correlación cinéticos y espectrales pequeños proporcionarán buenos resultados en la cuantificación.
- ✓ El seguimiento de reacciones rápidas tan solo puede ser efectuado utilizando un sistema de mezcla rápido como puede ser el sistema de flujo interrumpido (*stopped-flow*).
- ✓ El sistema de detección condiciona las reacciones cinéticas que pueden ser estudiadas. La utilización de un sistema rápido de registro, como un detector de diodos en línea (*diode array detector*) permite el seguimiento en pocos segundos de la reacción a múltiples longitudes de onda. Si el sistema de detección es lento, puede ser necesario modificar las condiciones experimentales para disminuir la velocidad de la reacción, lo que puede generar una mayor complejidad del sistema cinético estudiado.
- ✓ Muchas veces es necesario realizar un pretratamiento de la información cinética-espectral que define el sistema. El promediado de varios replicados es una buena solución para eliminar ruido de la señal. La derivada es un buen método para eliminar las posibles alteraciones de la línea de base. Puede ser efectuada en uno de los dos modos, el espectral o el cinético. La primera derivada en el modo espectral se presenta como el pretratamiento más efectivo cuando se utiliza la información espectral como la predominante. Para sistemas en que sólo se tiene en cuenta la información cinética, la derivada en el modo temporal, a la longitud de onda seleccionada, corresponde a la

velocidad de reacción en cada tiempo de registro.

- ✓ Para sistemas no lineales, las redes neuronales proporcionan los mejores resultados de cuantificación, aunque PLS puede tratar sistemas ligeramente no lineales a costa de aumentar el número de factores del modelo. Para sistemas lineales, PLS proporciona muy buenos resultados y su utilización es relativamente sencilla, debido a que es una técnica muy desarrollada y ampliamente establecida en los programas comerciales. La técnica de regresión continua también se muestra muy prometedora en el tratamiento para los métodos cinético-espectrofotométricos. La técnica MLR proporciona malos resultados cuando se presentan mezclas de especies con elevados solapamientos espectrales y cinéticos.
- ✓ Las técnicas de calibración tridimensionales (nPLS y PARAFAC) requieren que la discriminación cinética y espectral entre analitos sea suficientemente clara para evitar que haya una degradación en el rango de la matriz y para que sean correctamente aplicadas.
- ✓ Se pueden utilizar dos tipos distintos de datos de entrada para las ANN: las variables originales registradas o el resultado de aplicar un sistema de reducción de variables, como los scores de un PCA. La utilización de unos u otros dependerá de cada aplicación en concreto y, por tanto, se deben realizar diferentes pruebas cuando nos encontramos delante de un sistema no lineal. Cuando se utilicen variables originales, se debe tener en cuenta que su número no puede ser muy elevado para evitar un sobreajuste de los pesos de las conexiones entre las neuronas de la red. La construcción incorrecta de las ANN implica la obtención de modelos inestables y poco robustos.
- ✓ La construcción de las ANN no es un proceso fácil. Tienen que ser optimizados muchos parámetros: los pesos iniciales de las conexiones y su distribución, el tipo de función de transferencia, el número de entradas, el número de neuronas de la capa oculta y el mecanismo de corrección de los pesos. Para evitar sobreajustes de la red, se requiere un número elevado de muestras para el calibrado divididas en tres conjuntos: entrenamiento, validación y predicción externa.

ANEXOS

ANEXO 1

“Simultaneous enzymatic spectrophotometric determination of ethanol and methanol by use of artificial neural networks for calibration.”

Marcelo Blanco, Jordi Coello, Hortensia Iturriaga, Santiago Maspoch, Marta Porcel

Analytica Chimica Acta, **398**, 83-92, **1999**

Simultaneous enzymatic spectrophotometric determination of ethanol and methanol by use of artificial neural networks for calibration

Marcelo Blanco, Jordi Coello, Hortensia Iturriaga, Santiago MasPOCH*, Marta Porcel

Departamento de Química, Unidad de Química Analítica, Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Accepted 27 April 1999

Abstract

Binary mixtures of ethanol–methanol were resolved by use of an enzymatic spectrophotometric method using artificial neural network (ANN) methodology for multivariate calibration. The chemical system involves two coupled reactions, viz. the oxidation of the primary alcohols to the corresponding aldehydes in the presence of alcohol oxidase and the oxidation of *p*-phenylenediamine to Bandrowski's base by hydrogen peroxide, catalysed by the previously formed aldehydes. The high complexity of the system studied entails the use of this non-linear calibration methodology, which provides significantly improved results relative to a multi-variate bilinear calibration, principal component regression (PCR), which was used for comparison. The optimized ANN allows the quantitation of both mixture components in ethanol to methanol mole ratios from 20 : 1 to 400 : 1, with relative standard errors of prediction in the region of 5% for both analytes. ©1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Enzymatic methods; Artificial neural networks; Kinetic analysis; Spectrophotometry; Simultaneous determination

1. Introduction

Kinetic methods for resolving analyte mixtures usually involve similar species that react with the same reagent or are subjected to the same process. Differences in the kinetic process undergone by such species are used to distinguish mixture components without a prior physical separation, as are very often, spectral differences between their reaction products.

Although the absolute specificity of enzymes has been used for the kinetic determination of a unique species, the use of enzyme showing group specificity becomes an analytical choice for the kinetic resolu-

tion of very similar compounds having the same functional group if we dispose of an appropriate calibration system.

The most severe shortcoming of classical computational techniques based on kinetic data is that they require a prior knowledge of the system studied (viz. of the order and rate constant for each reaction involved). In recent years, chemometric methods have increasingly been applied to kinetic data with a view to resolving mixtures with the aid of multivariate calibration techniques such as principal component regression (PCR) [1,2], partial least-squares regression (PLSR) [3–5], artificial neural networks (ANNs) [6–9] and trilinear computational methods [10,11]. These mathematical methods can be used in various situations without a prior knowledge of the system and are

* Corresponding author.

E-mail address: iqan7@blues.uab.es (S. MasPOCH)

thus highly suited to kinetic systems, which not always behave in the ideal or expected manner [12]. Currently available diode array detectors and charge coupled devices (CCDs) allow the simultaneous acquisition of kinetic information at several wavelengths, information that can be used for the kinetic resolution of analyte mixtures. The greater the difference between the spectra for the analytes or their rate constant ratio is, the better will be the results [3,8].

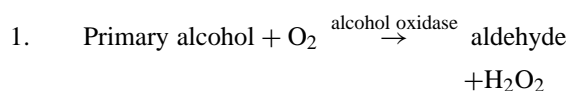
Although these computational methods usually rely on both kinetic and spectral differences, the latter are not essential, but only desirable. If the reaction products differ in their absorption spectra, then the differences can be used to quantify the analytes in mixtures [8]. On the other hand, when all the analytes yield the same end product, the situation is rather more complicated since the mixture components only differ in their rates of reaction; in this case, absorbance values measured at a single wavelength will usually suffice for quantitation purposes.

The growing interest of analytical chemists in artificial neural networks (ANNs) has been aroused, among others, by their high efficiency as predictors for non-linear systems; in fact, many kinetic problems (e.g. interactions between analytes, the presence of one or more analytes involved in a multi-step process, second-order kinetics) are intrinsically non-linear [8]. With proper training, ANNs can accurately model the presence of synergistic effects and avoid the potential loss of kinetic data for mixtures resulting from too short induction periods, outliers, small differences in the rate constants, etc. Ventura et al. [7] used an ANN to predict the absorbance at infinite time of first-order reactions for a single analyte. In previous work, Blanco et al. [8,9] assessed a procedure based on PCR scores as input data with a view to resolving mixtures under various kinetic situations. Compared to other multivariate calibration methods, ANNs provide better results when the analytes to be resolved yield the same reaction product or their rate constant ratio is near-unity [6,8].

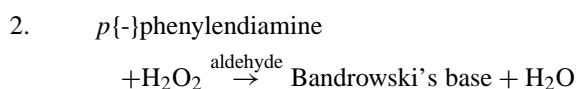
The resolution of ethanol/methanol mixtures has been addressed by using a variety of analytical techniques. Existing chromatographic methods for this purpose [13] are poorly sensitive to methanol. Also, while some spectrophotometric methods are highly sensitive to both analytes [14–17], all have been applied to solve mixtures with similar concentrations

of the two. It would thus be of interest to be able to quantify one of the analytes (methanol) in a large excess of the other (ethanol) [18]. In recent years, the enzyme alcohol oxidase has been used to quantify low proportions of methanol in ethanol [19,20].

This paper reports a kinetic method for the simultaneous quantitation of both alcohols in widely different concentration ratios. The method uses alcohol oxidase for this purpose because the enzyme, unlike others such as alcohol dehydrogenase (ADH), is active for methanol, and because the oxidation of primary alcohols with it is irreversible and thus affords decreased limits of detection. The chemical system used involves two steps:



and



where Bandrowski's base is the imine of bis(2*N*,5*N*-daminophenyl)benzoquinone i.e. *p*-quinone.

In the first reaction the enzyme does not show the same activity with all primary alcohols [21]. In fact, as the aliphatic chain of the alcohol grows, activity decreases; consequently, the time the enzyme will take to convert methanol and ethanol to their corresponding aldehydes will be different.

The aldehyde obtained subsequently acts as a catalyst for the indicator reaction, where *p*-phenylenediamine is the chemical derivatization reagent. As can be seen, under given experimental conditions, both alcohols give the same reaction product, which imposes a severe restriction on classical computational methods. This second reaction has been widely used for the determination of aldehydes and is well documented [22–25].

The overall process (i.e. the two coupled reactions) is influenced by factors such as pH and the buffer, hydrogen peroxide and *p*-phenylenediamine concentrations, which affect the absorbance spectrum for the mixture and its temporal changes. The operating conditions must thus be optimized prior to calibration. One additional difficulty faced in this work arose from the wide range of ethanol-to-methanol concen-

tration ratios to be spanned (20:1 to 400:1, with concentrations of $20\text{--}40 \times 10^{-3}$ M for ethanol and $0.1\text{--}1.0 \times 10^{-3}$ M for methanol).

This paper compares the results obtained by using PCR and ANN using error backpropagation (EBP) method in different spectral modes for the simultaneous determination of methanol and ethanol. Prior to use, the network was optimized as regards its basic parameters.

2. Theoretical background

The theory of PCR is widely documented in the literature [26], so any extensive description here would be redundant. Also, the principles and chemical applications of ANNs have been discussed by Zupan and Gasteiger [27,28]. The ANN used in this work was a perceptron multilayer network with error back-propagation as training scheme and the generalized delta rule for weighting. The topology of this network type affords the use of a variable number of layers. Each layer can contain one or more neurons or nodes, which can act with a linear or non-linear transfer function. The input layer contains as many neurons as variables are to be handled; the output layer, as many as parameters are to be determined. In between the input and output layer, a variable number of hidden layers can be inserted containing an also variable number of neurons. Neural networks fit data in an iterative, non-linear manner. The nodes in the input layer transfer input data to those in the hidden layer or layers. These nodes compute a weighted sum of the input data that is then subjected to the non-linear transformation:

$$O_j = f \left(\sum_{i=1}^{nv} x_i w_{ij} + \theta_j \right) \quad (1)$$

where x_i denotes the input to node i in the input layer, nv the number of nodes in the input layer, w_{ij} (weights) the connections between each node i in the input layer and each node j in the hidden layer, θ_j the bias associated to neuron j — which represents a non-zero constant and is handled as an additional weight, o_j the output of node j in the hidden layer and f a (usually) non-linear function. The network output is a weighted sum of the output data of the hidden layer and provides

the calculated concentration. During training (calibration) of the network, weights are iteratively calculated in order to minimize the sum of the squared differences between known and calculated concentrations. Overfitting is avoided by using two sample sets; thus, weights are calculated from a training set while the concentration of another sample set (the test set) is being simultaneously predicted. In addition, the number of data values used for training must exceed that of weights determined in the network; this entails using a large number of samples for calibration if the number of input variables is also large. This is a frequent problem with data recorded at several wavelengths that is usually addressed by subjecting spectra to principal component analysis (PCA), computing the scores for the principal components (PCs) that describe the body of spectra and using the scores as ANN input.

Those conditions resulting in the lowest errors of prediction are adopted as optimal. Results are validated by using a third sample set (the external prediction set or validation set), consisting of samples employed in none of the calibration steps.

3. Experimental

3.1. Reagents

Phosphate buffers of pH 7 and 6 were prepared, at a 0.1 M concentration, from stock solutions of dipotassium hydrogen phosphate (Merck, p.a.) and potassium dihydrogen phosphate (Fluka, BioChemika MicroSelect for molecular biology) in bidistilled water. A 6.5×10^{-3} M stock *p*-phenylenediamine solution was made by weighing an appropriate amount of crystalline dihydrochloride of the product (Sigma) and dissolving it in phosphate buffer of pH 6. This solution was unstable, so it had to be prepared fresh on a daily basis. A 0.42 M stock solution of hydrogen peroxide was prepared by diluting an appropriate volume of the liquid chemical (Panreac, p.a.) in phosphate buffer of pH 7. The solution was stored refrigerated in the dark. Methanol (Promochem for HPLC) and absolute ethanol (Merck, p.a.) were used to prepare stock solutions of both alcohols. Finally, solutions of the enzyme alcohol oxidase [EC 1.1.3.13] from *Hansenula* sp. (Sigma) containing 0.2 units, and ethanol/methanol

mixtures in variable concentration ratios, in phosphate buffer of pH 7, were made. Provided they were stored refrigerated at 4°C in the dark, the enzyme solutions preserved their activity for 3 days.

3.2. Apparatus and software

Spectral measurements were made by using an HP 8452A diode array spectrophotometer connected to a PC computer via a HP-IB interface. The spectrophotometer's bundled software (HP 89530 MS-DOS UV-Vis) includes various operating modules for instrumental control and recording of UV-Vis spectra. Spectrophotometric cells of 1.00 cm path length, thermostated at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, were used throughout. The room temperature was kept constant at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. For PCR calibration, recorded spectra were imported from the instrument into the program Unscrambler v. 6.1, from CAMO A/S (Trondheim, Norway). The program Neural-Connection v. 2.0, from SPSS, Inc. (Chicago, Illinois) was used to construct the ANN models.

4. Procedure

Volumes of 1.5 ml of buffer at pH 7, 0.5 ml of the H_2O_2 stock solution and 0.2 ml of alcohol mixture were placed, with the aid of micropipettes, directly into the measuring cell. Although hydrogen peroxide was one of the products of the first reaction, it must be present in excess so that the subsequent *p*-phenylenediamine oxidation would be independent of its concentration. After the mixture was homogenized and thermostated at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ a blank was run. For the reaction to take place, 0.2 ml of enzyme solution and 0.25 ml of the *p*-phenylenediamine solution were added to the previous mixture. The system was kept at a constant temperature, under stirring, throughout the reaction.

Methanol and ethanol concentrations in the mixtures were comprised in the ranges 0.1–1.0 and $20\text{--}40 \times 10^{-3}\text{ M}$, respectively for the 77 mixtures prepared. UV-Vis spectra for the reaction were recorded at 2 nm intervals over the wavelength range 376–600 nm every 15 s for 15 min. Although Bandrowski's base was not completely formed within such a period, based on previously reported results [19], the time used was

long enough to ensure thorough oxidation of both alcohols. The derivative of the absorbance with respect to time at each wavelength was obtained by applying the Savitzky-Golay algorithm, using a window size of 11 points and a third-order polynomial.

4.1. Data processing

The UV-Vis spectrum for each sample was recorded at different times (t_1, \dots, t_n) to construct a 3-way data table that was rearranged to obtain a classical two-dimensional data matrix in such a way that each matrix row contained all the spectra recorded for each sample, in the sequence from t_1 to t_n . Each column therefore contained the absorbance measured at a specific wavelength and time for each sample. The data matrix and the concentration matrix were both centred and autoscaled to unity variance prior to processing.

Because the number of wavelengths used was too large for the concentration to be regressed or for direct use as input layer in an ANN, variables were compressed by principal component analysis (PCA) in order to identify the principal components (PCs) best describing the data matrix; the scores of such PCs were used in the principal component regression, and also as input variables for the ANN.

PCR and ANN models were constructed and that leading to the lowest error of prediction for the test set was adopted as optimal [26]. Such a model was tested on an external prediction set (validation set) composed of samples belonging to neither the calibration nor the test set.

The neural network tested was defined by its architecture (i, h_1, h_2, o), where i is the number of nodes or neurons in the input layer; h_1 and h_2 are the numbers of neurons in the two hidden layers; and o is the number of neurons in the output layer. For the chemical system studied, the output layer contained the concentrations of methanol and ethanol sought. The number of neurons in the input layer and, especially, the hidden layer, must be carefully optimized in addition to other variables such as the activation function (linear or non-linear) used by each neuron, the initial range and the distribution (Gaussian or uniform) of the weights for the connections between neurons from different layers [29].

Two types of non-linear functions (sigmoidal and tangential), and a linear function, were tested. With a Gaussian distribution of initial weights, these were randomly selected with a variance identical with the selected range. With a uniform distribution, the initial weights were also randomly selected but none lay outside the selected range.

The network training procedure was based on the conjugate gradient algorithm, which measures the gradient of the error surface after each sample is passed through the network. It then alters the weights of the node inputs, using a compromise between the direction of the steepest gradient and the previous direction of change. Every sample in the calibration set was used in each of the four training steps.

Selecting the optimum parameter values for constructing a network is no easy task; in fact, the parameters are mutually related, so a compromise must usually be adopted. The PCR and ANN models that provided the lowest root mean square error (RMSEP) for the test set were chosen. RMSEP was defined as:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{nm} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (\hat{c}_{ij} - c_{ij})^2} \quad (2)$$

where c_{ij} is the reference concentration of component j in sample i , \hat{c}_i the calculated concentration, m the number of samples in the test set and n the number of analytes. On the other hand, the root mean square error of prediction for the external prediction set is designated, RMSEEP, and for the calibration set, RMSEC. For easier comparison of the prediction results between analytes, the relative standard error of prediction, defined as

$$\text{RSEEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^m c_{ij}^2}} \quad (3)$$

for the external prediction set, was also used. The symbols in this equation have the same meaning as above.

5. Results and discussion

Under the selected experimental conditions, the kinetics reflected in the absorbance spectral changes shown in Fig. 1 were obtained. As can be seen, the spectrum included an absorption band at

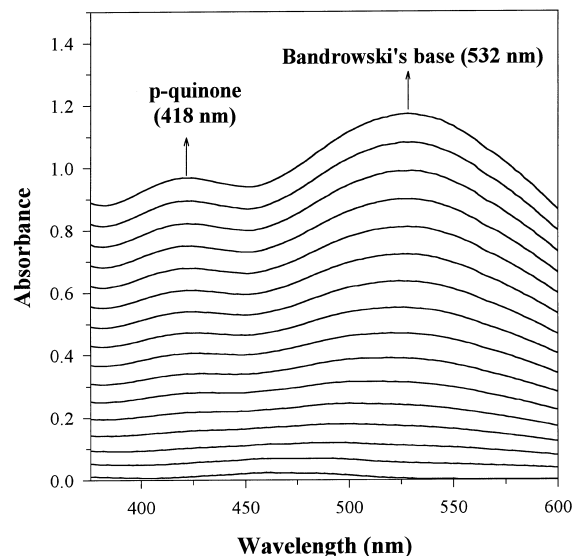


Fig. 1. Kinetic spectra of a mixture containing 0.5×10^{-3} M of methanol and 30×10^{-3} M of ethanol. From the 61 spectra recorded (every 15 s for a total time of 15 min) only those registered every minute are shown.

532 nm corresponding to the main reaction product (Bandrowski's base) and another at 418 nm due to the final oxidation product (the *p*-quinone). Based on the above-described reaction steps, both analytes (and their mixture) yielded the same reaction products, albeit at a different rate.

p-Phenylenediamine was also oxidized by the hydrogen peroxide in the absence of aldehyde, so it contributed to the final absorbance. Fig. 2 shows the temporal variation of the absorbance at 532 nm (kinetic profile) for both the uncatalysed reaction and the catalysed reaction of each alcohol at the concentration levels to be quantified. As can be seen, the reaction rate was different for each analyte. It compares the actual kinetic profile for a mixture with the calculated profile obtained from the individual profiles and that for the uncatalysed reaction. The difference between the calculated and experimental curve, particularly at short times, suggests the presence of interactions and hence a non-linear behaviour in the system.

The samples studied were split into a training or calibration set, a test set and an external prediction set (validation set) composed of 45, 14 and 18 objects, respectively, and were the same for all the models

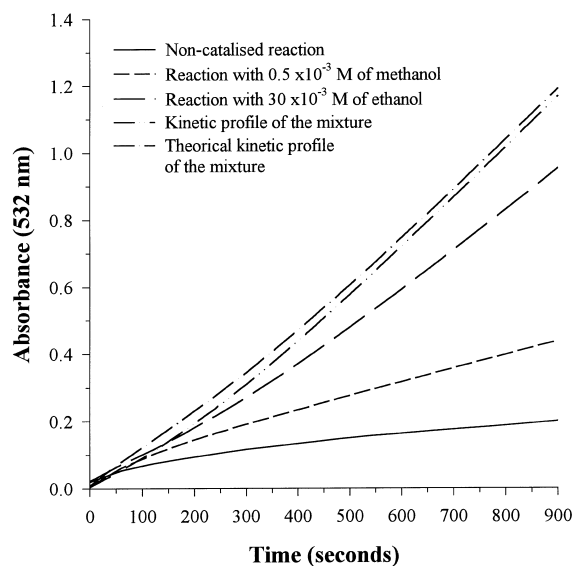


Fig. 2. Contribution of the non-catalysed reaction. Comparison of the real and theoretical kinetic profiles.

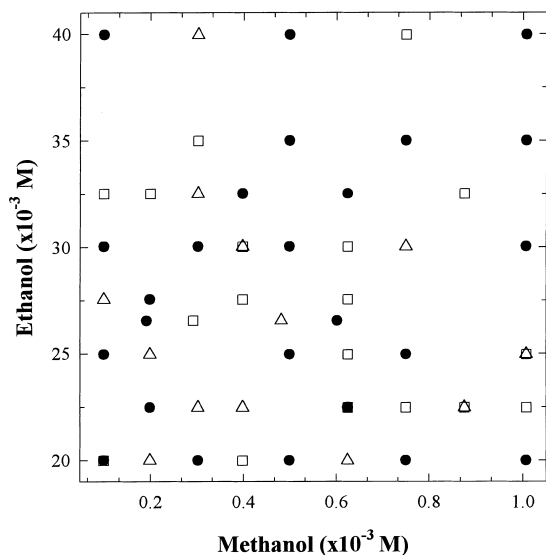


Fig. 3. Representation of the mixture composition. Mixtures of the calibration set (●), mixtures of the test set (Δ) and mixtures of the external prediction set (validation set) (□). The mixture at the central point is the one for which the profiles in Fig. 1 are shown

assayed. Fig. 3 shows the sample distribution in terms of analyte concentration.

The resolution of the alcohol mixture was approached in two different ways. One involved using

the absorbance values obtained at each time and the other the reaction rate; the latter was expressed as the derivative of the analytical signal with respect to time at each wavelength, $(\partial A/\partial t)_\lambda$ — because the analytical reactions were of the catalysed type, the rate of *p*-phenylenediamine oxidation varied with the particular analyte mixture.

Multivariate analyses of kinetic data usually employ information acquired at many different wavelengths to resolve mixtures of reacting analytes that exhibit differential spectral features or yield different reaction products. The analytes studied in this work both gave the same reaction product, so using every single available wavelength would have been redundant. In order to ascertain whether a single wavelength would be enough, the effect of processing the information contained in all wavelengths or just one (viz. that of maximum absorption for the reaction product) on the quantitation results was examined.

6. PCR results

A model designated PCR_A was constructed from the absorbance spectra recorded at 2 nm intervals over the wavelength range 376–600 nm every 15 s for 15 min. An overall 6893X variables (113 wavelengths \times 61 times) and 45 objects were thus processed in the calibration set. The smallest number of PCs required to minimize the error of prediction under these conditions was 7.

A second PCR model, PCR_D , was constructed from the reaction rate at each wavelength. Derivatives were obtained by using a 11 point window (i.e. acquiring the rate at every wavelength entailed losing the first five and last five times). The X matrix consisted of 45 objects and 5763 variables (113 wavelengths \times 51 times) and, as before, the optimum number of PCs was 7.

As can be seen from Table 1, the errors of prediction for methanol were much greater than those for ethanol with both models. Using derivatives resulted in slightly decreased errors for methanol but increased errors for ethanol in the external set samples.

7. ANN results

The neural network models were constructed from four different types of input, namely:

Table 1

Relative standard error [RSEP(%)] calculated by Eq. (3) for all sets and calibration models. In PCR models the optimum number of principals components is reported. For neural network calculations, a Gaussian distribution of the weights with an initial range of ± 0.1 was used. The architecture is shown

SETS	PCR _A ^a PCs:7		PC _A -ANN ^b (7-2-2)		PCR _D ^c PCs: 7		PC _D -ANN ^d (7-2-2)		KP-ANN ^e (32-2-2)		DKP-ANN ^f (31-3-2)	
	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
Calibration	8.58	4.54	7.55	4.54	7.79	4.32	7.25	3.77	4.95	3.36	5.28	3.67
Test	12.67	6.37	13.15	4.78	9.79	5.22	9.6	6.43	10.12	5.4	5.21	5.52
Validation	16.08	4.5	12.71	4.95	9.82	5.99	10.05	7.92	11.39	3.87	4.98	6.04

^a PCR_A, model constructed from the original variables as recorded in the absorbance mode.

^c PCR_D, model constructed from the original variables as recorded in the absorbance mode.

^b PC_A-ANN, neural network constructed by using PCR_A scores as input.

^d PC_D-ANN, neural network constructed by using PCR_D scores as input.

^e KP-ANN, neural network constructed from values of the original absorbance at 532 nm.

^f DKP-ANN, neural network constructed from reaction rate values obtained at 532 nm.

1. The kinetic profile at 532 nm, which coincided with the absorption maximum for Bandrowski's base (KP-ANN models).
2. The variation of the reaction rate with time at 532 nm (DKP-ANN models).
3. The scores of PCR_A (PC_A-ANN models).
4. The scores of PCR_D (PC_D-ANN models).

Fig. 4a and b show the absorption and reaction rate data for a specific alcohol mixture. As can be seen, the reaction rate initially increased abruptly with time and then levelled off. As there were few objects on the calibration set, not all of the 61 absorbances recorded for the wavelength of the maximum of the absorption band were used as input data of the KP-ANN models. From the first part of the kinetic profile, where the variation of the absorbance with time is more important, 18 points were selected (from 15 to 270 s every 15 s); 7 more points were selected from the middle (from 270 to 480 s every 30 s) and 7 more from the end (from 480 to 900 s every 60 s). In this way we finally had 32 neurons in the input layer of the ANN. For the same reason, when data from the variation of the reaction rate with time were used as input of the DKP-ANN models 31 values were selected following similar criterion as before. Fig. 4a and b show the points selected.

For the optimisation of the network, in all cases RMSEC, RMSEEP and RMSEP (Eq. (2)) were calculated and used as response function. Uniform and Gaussian initial distribution of weights were assayed, as well as the three transfer functions described above.

Using as input data the variation of the reaction rate with time at 532 nm (DKP-ANN models), the number of nodes of the first hidden layer was increased in sequence (from 2 to 5), modifying for each case the initial weight range from 0.1 to 0.5 in 0.1 units steps. Neither more nodes in the hidden layer nor other values of the weight range were assayed, as no improvement in the answer was obtained. Next, a second hidden layer was tested, but it resulted in no significantly improved results, so it was omitted in subsequent optimizations and in the identification of the architecture.

Both non-linear activation functions provided exactly the same results; as expected, the linear activation function led to poorer results as it could not handle non-linearity. A sigmoidal non-linear function — the most usual choice for neural computations — was thus adopted.

Fig. 5a and b show the RMSE values obtained for the calibration, test and external sets in terms of the number of nodes and initial weight range, using both types of distribution with the DKP-ANN models. As can be seen, the errors for the uniform distribution were greater than those for the Gaussian distribution, which suggests overfitting by the former. The Gaussian distribution of weights was thus selected.

As can also be seen from Fig. 5a and b, the optimum architecture for the DKP-ANN models was (31, 3, 2), with a Gaussian weight distribution and an initial weight range of ± 0.1 units.

The same procedure was followed for the optimization of the KP-ANN models, obtaining the same trend

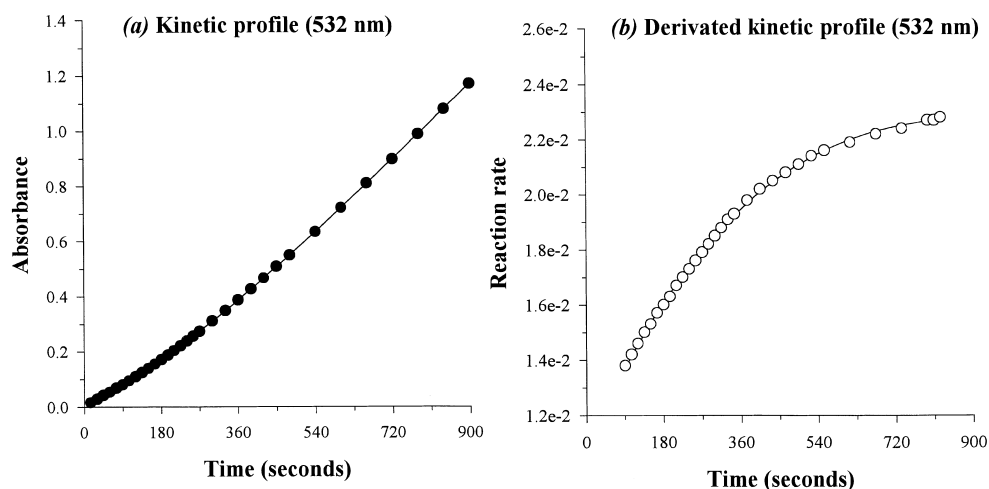


Fig. 4. For ANN calculation: (a) 32 X-variables were drawn from the kinetic profile (shown as ●) and (b) 31 X-variables from the derived kinetic profile at 532 nm (shown as ○). Both figures correspond to a mixture containing 0.5×10^{-3} M of methanol and 30×10^{-3} M of ethanol.

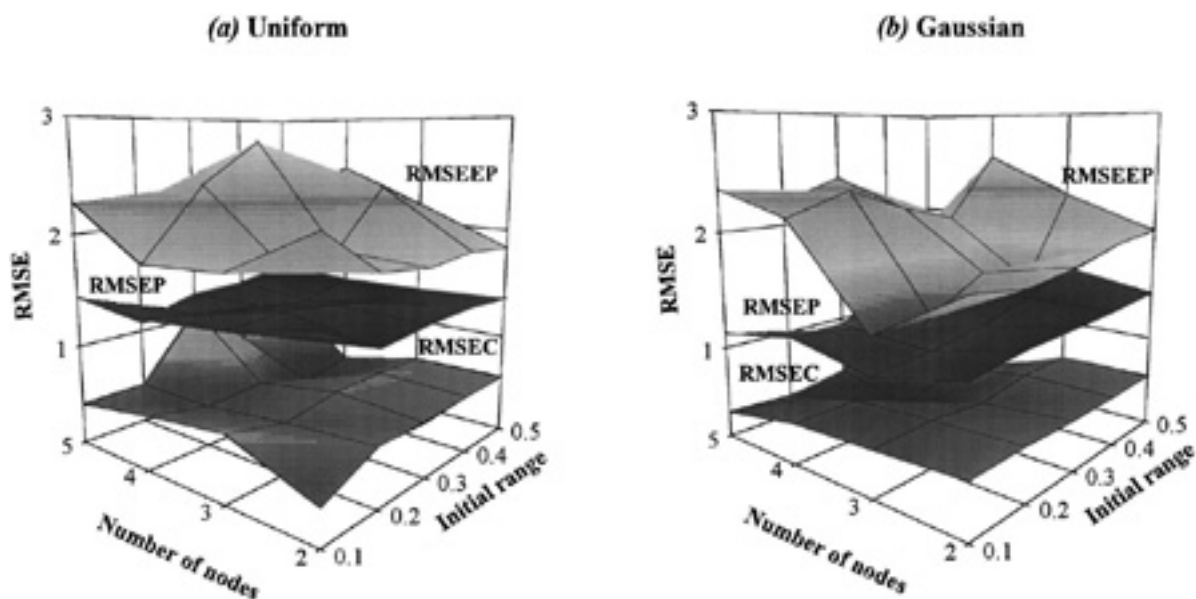


Fig. 5. Root mean square errors of prediction for the three sample sets as a function of the number of nodes and initial weight range. (a) Uniform initial weight distribution. (b) Gaussian initial weight distribution.

as before when comparing the results of uniform and Gaussian distributions of weights. In this case, the architecture of the best ANN was (31, 2, 2).

When scores were used as input data in the ANN, (PC_A -ANN and PC_D -ANN models), only the neurons of the input and hidden layers were optimized, with

a Gaussian distribution of initial weights in the range ± 0.1 and a sigmoidal activation function. The optimal number of PCs describing the data was 7 on both cases, so the number of neurons of the input layer was sequentially varied from 8 to 4 and, for each one of these situations, the neurons of the hidden layer were

Table 2

Results obtained by DKP-ANN model in the resolution of external prediction set mixtures of methanol and ethanol. The ANN architecture was (31, 3, 2)

Mixture	Added (10^{-3} M)		Absolute errors (10^{-3} M)	
	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
1	0.10	19.99	0.02	0.10
2	0.40	19.99	-0.05	0.91
3	0.63	22.47	0.05	1.88
4	0.75	22.47	0.04	-1.67
5	0.88	22.47	-0.02	2.22
6	1.01	22.47	0.03	-2.01
7	0.63	24.96	-0.03	-0.83
8	1.01	24.96	0.00	-0.17
9	0.29	26.54	0.03	-0.19
10	0.40	27.54	0.01	3.42
11	0.63	27.54	0.04	1.60
12	0.40	30.03	0.03	1.51
13	0.63	30.03	0.03	-0.48
14	0.10	32.51	0.01	-0.75
15	0.20	32.51	-0.02	0.97
16	0.88	32.51	-0.04	-1.55
17	0.30	35.00	-0.05	-2.44
18	0.75	39.97	0.00	-2.81
	RSEEP(%)		4.98	6.04

increased from 1 to 4. PCR_D-ANN resulted in slightly though not significantly improved quantitation than PCR_D-ANN.

Because the two analytes exhibited no spectral differences, using the whole analytical information available with a view to resolving their mixtures was unnecessary, so no improvement in the quantitation of the alcohols was found when scores were used as input data to the ANN compared with those found when data of a single wavelength were used. The use of the temporal variation of the signal at single wavelength provided improved results relative to PCR and PC-ANN. The best overall results were obtained by using the variation of the reaction rate with time at 532 nm (i.e. the DKP-ANN model) as input. However, all computations based on the temporal variation of the reaction rate, calculated at either a single or all wavelengths over the range 376–600 nm, leads to significantly improved quantitation of methanol but also to poorer results for ethanol.

Table 1 gives the results provided, and the architecture and initial weight range used, by each ANN. Table 2 gives the added concentrations of both

analytes in the samples included in the external prediction set and the absolute errors provided by the DKP-ANN model.

8. Conclusions

As shown in this work, the use of original variables as input to artificial neural networks (ANNs) provides an effective calibration method for the kinetic enzymatic determination of methanol/ethanol mixtures by using a doubly catalysed chemical system and spectrophotometric detection. This method allows both analytes to be simultaneously quantified using a group specific enzyme with acceptable errors at the concentration levels studied.

Although both alcohols yield the same reaction product and hence lack spectral discrimination, differences in their rates of reaction afford their quantitation with an ANN. For the same reason, one need not use the whole analytical information acquired (absorbance–time–wavelength) but only data recorded at the maximum absorbance. In fact, using redundant information leads to poorer results.

None of these calibration methods requires the reaction to develop to completion. Nor is a prior knowledge of the kinetic model to which the analytical reactions involved conform or of the rate constants required.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Direction General de Investigación Científica y Técnica (DG-ICYT) for financial support awarded for the realization of this research in the framework of projects PB94-0693 and PB96-1180.

References

- [1] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, M. Redon, *Appl. Spectrosc.* 48 (1994) 37.
- [2] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, J. Riba, E. Rovira, *Talanta* 40 (1993) 261.
- [3] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, M. Redon, *Anal. Chim. Acta* 303 (1995) 303.
- [4] G. López-Cueto, J.F. Rodríguez-Medina, C. Ubide, *Analyst* 122 (1997) 519.

- [5] M. De la Guardia, K.D. Khalaf, B.A. Hasan, A. Morales-Rubio, J.J. Arias, J.M. García-Fraga, A.I. Jiménez, F. Jiménez, *Analyst* 121 (1996) 1321.
- [6] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Redon, N. Villegas, *Analyst* 121 (1996) 395.
- [7] S. Ventura, M. Silva, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1521.
- [8] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Redon, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4477.
- [9] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Redon, J.F. Rodríguez, *Química Analítica* 15 (1996) 266.
- [10] A.K. Pettersson, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 354 (1997) 241.
- [11] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, R. Tauler, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2329.
- [12] T.F. Cullen, R.S. Crouch, *Mikrochim. Acta* 126 (1997) 1.
- [13] J.P. Camelbeeck, D.M. Comberbach, J. Goossens, P. Roelants, *Biotechnol. Tech.* 2 (1988) 183.
- [14] M. Ignaczak, J. Dziegiec, *Chem. Anal. (Warsaw)* 26 (1981) 81.
- [15] A. Maquieira, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Microchem. J.* 36 (1987) 309.
- [16] E. Förster, M. Silva, M. Otto, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 40 (1993) 855.
- [17] E. Förster, M. Silva, M. Otto, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 109.
- [18] A. Pérez-Ponce, F.J. Rambla, J.M. Garrigues, M. De la Guardia, *Analyst* 123 (1998) 1253.
- [19] U.M. Mizgunova, G.A. Zolotova, I.F. Dolmanova, *Analyst* 121 (1996) 431.
- [20] T.N. Shekhovtsova, S.V. Muginova, U.M. Mizgunova, I.F. Dolmanova, *Química Analítica* 15 (1996) 312.
- [21] D. Schomburg, M. Salzmänn, D. Stephen, *Enzyme Handbook*, Springer, Berlin, vol. 6, 1995.
- [22] J.C. Thompsen, H.A. Mottola, *Anal. Chem.* 56 (1984) 2834.
- [23] D.O. Shapilov, *Zh. Anal. Khim.* 35 (1980) 2199.
- [24] I.D. Streltsova, T.A. Gorshkova, Y. Ba, M.A. Volodina, I.F. Dolmanova, *Zh. Anal. Khim.* 39 (1984) 1886.
- [25] N.P. Evmiridis, M.I. Karayannis, *Analyst* 112 (1987) 831.
- [26] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, Wiley, New York, 1989.
- [27] J. Zupan, J. Gasteiger, *Anal. Chim. Acta* 248 (1991) 1.
- [28] J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks for Chemists: An Introduction*, VCH Publishers, New York, 1993.
- [29] *Neural Connection 2.0 User's guide*, SPSS Inc./Recognition Systems Inc., Chicago, 1997.