

IV.4.2.3.2. Construcció de models ANN

Tal i com s'acaba de comprovar, la calibració per PLS permet una correcta quantificació dels tres analits.

Malgrat això, es va estudiar si una xarxa neuronal artificial podria millorar la capacitat predictiva dels models PLS. Amb aquest objectiu, s'assaja una xarxa amb tres nodes a la capa de sortida, la qual permet la quantificació simultània dels tres analits. Donat que el glutaraldehid és el que pitjor es quantifica per PLS, tot el procés d'optimització de l'estructura d'aquesta xarxa, es realitza únicament en base a la seva predicció.

Però abans de començar a construir els models, i donat que el número de nodes d'entrada a la xarxa ha d'ésser força petit, es redueix el nombre de variables experimentals per a poder realitzar els càlculs correctament. Aquesta reducció es fa de dues maneres; en la primera es realitza un anàlisi en components principals (PCA) de les dades utilitzades en els models PLS1 anteriors, i s'agafen els scores com a dades d'entrada de la xarxa; en la segona es fa una selecció de les variables originals. Els dos tipus de models ANN calculats els anomenem PC-ANN i ANN-dades originals, respectivament.

Aleshores, es construeixen diferents models ANN, i s'estudien alguns dels seus paràmetres. La comparació dels resultats obtinguts en cada un dels models assajats es fa mitjançant l'error quadràtic mig de predicció (RMSEP) obtingut per a cada un dels conjunts de mostres preparades al laboratori.

IV.4.2.3.2.1. PC-ANN

La primera etapa en la construcció dels models PC-ANN, consisteix en la selecció del número de nodes en la capa oculta, el qual es varia de forma seqüencial en diferents models que es construeixen, mantenint constant els altres paràmetres de la xarxa. Així, els scores significatius en la construcció del model PCA, en aquest cas 16, són escollits com a nodes en la capa d'entrada, s'utilitza la funció d'activació sigmoïdal, i la distribució gaussiana dels pesos inicials en el rang de +/- 0,1.

Malauradament, els millors resultats s'assoleixen amb un número diferent de nodes pels tres aldehids, i aleshores es prefereix escollir el número òptim pel glutaraldehid que és de 4. A la figura 4.14 es mostren els valors RMSEP dels models PC-ANN en funció del número de nodes de la capa oculta pel glutaraldehid en els diferents conjunts de mostres.

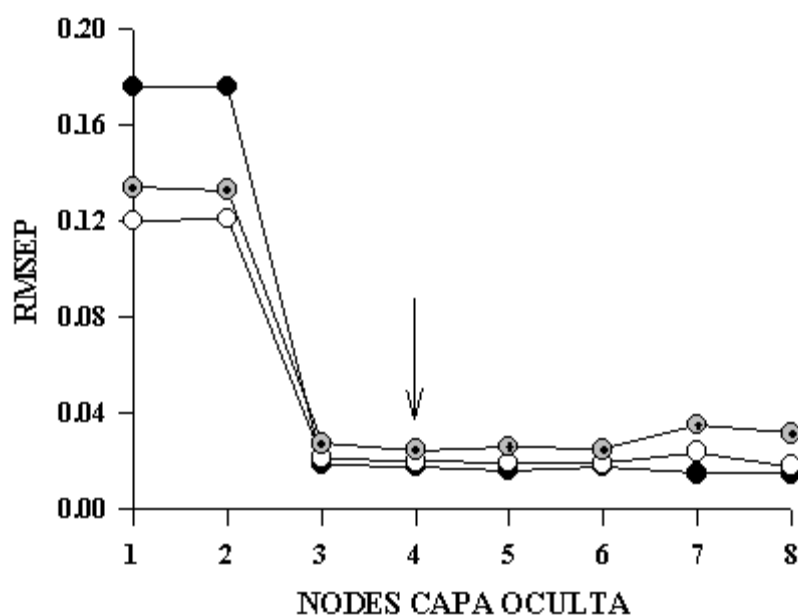


Figura 4.14. RMSE pel glutaraldehid calculats amb el model ANN-PCR (16, h_i ,3) vers el número de nodes h_i de la capa oculta. Conjunt de calibració (●), test set (○) i predicció externa (◐).

Un cop fixat el número de nodes en la capa oculta, es creu necessari realitzar també una selecció del número de scores òptim a incloure en la capa d'entrada de la xarxa. Així es comença per assajar el número de PCs significatius 16. A la figura 4.15 A-C es mostren els valors RMSEP dels models PC-ANN en funció del número de scores o nodes de la capa d'entrada, pels diferents aldehids i els diferents conjunts de mostres. En aquests models el número de nodes de la capa oculta es manté constant a un valor de 4, i també s'utilitza la funció d'activació sigmoïdal i la distribució gaussiana dels pesos inicials en el rang de $\pm 0,1$. Tal i com s'observa a les figures, pel formaldehid i glutaraldehid es produeix una millora considerable en els resultats quan s'arriba al número òptim del model PCA, i a partir d'aquí la millora continua mica en mica al augmentar el número de PCs, però ja no és tan notable. El comportament del glioxal és força diferent, ja que

els millors resultats s'obtenen amb un número de PCs força inferior, però després els resultats ja no milloren, i a més es produeix un sobreajust en els resultats. Després d'estudiar les diferents possibilitats, es decideix utilitzar tots 25 scores com a dades d'entrada a les xarxes, ja que les prediccions pel glutaraldehyd són les millors; el RSEP% en les mostres de predicció externa passa d'un 5,02 a un 3,88 quan es canvia el número de PCs de 20 a 25.

A la taula 4.3 es mostren els resultats calculats amb el model ANN-PCR (25,4,3) pels tres aldehids. Es pot veure que els resultats són molt iguals als obtinguts per PLS1.

En el procés d'optimització del número de nodes en la capa d'entrada i la capa oculta, a la vegada s'estudien altres paràmetres de les xarxes. Així es pot comprovar que les dues funcions de transferència no-lineals, sigmoide i tangencial, donen pràcticament els mateixos resultats, i que l'interval inicial i la distribució dels pesos, uniforme o gaussiana, tampoc influeix en els resultats de forma apreciable. També es fan algunes proves normalitzant els scores d'entrada a la xarxa, però els resultats obtinguts són pitjors als anteriors pel glutaraldehyd, ja que els errors són més grans i alhora hi ha un sobre ajust important.

IV.4.2.3.2.1. ANN-Dades originals

En la segona estratègia, per tal de reduir el número de variables d'entrada en les xarxes, es seleccionen només 30 variables dels 13741 valors d'absorbància de cada registre. Les variables escollides són els valors d'absorbància als màxims dels tres productes de condensació (310, 404, 306 nm), espaiats cada 100 segons de registre durant els 15 minuts de reacció.

Com en el cas anterior, s'estudien diferents paràmetres de les xarxes, per tal de trobar les condicions òptimes. Ara els millors resultats en la determinació del glutaraldehyd s'obtenen també amb 4 nodes en la capa oculta, però al contrari d'abans, utilitzant la funció de transferència tangencial i normalitzant les variables d'entrada abans dels càlculs.

A la taula 4.4 es mostren els resultats obtinguts amb el model ANN-dades originals (30,4,3) pels tres aldehids, on es pot veure com els resultats pel formaldehyd i glioxal són pràcticament iguals als obtinguts per PC-ANN i PLS1, mentre que pel glutaraldehyd són una mica pitjors.

Aquests resultats tan similars, són força sorprenents, tenint en compte que els models ANN-dades originals són construïts amb només 30 variables de les 3731 utilitzades pels altres models.

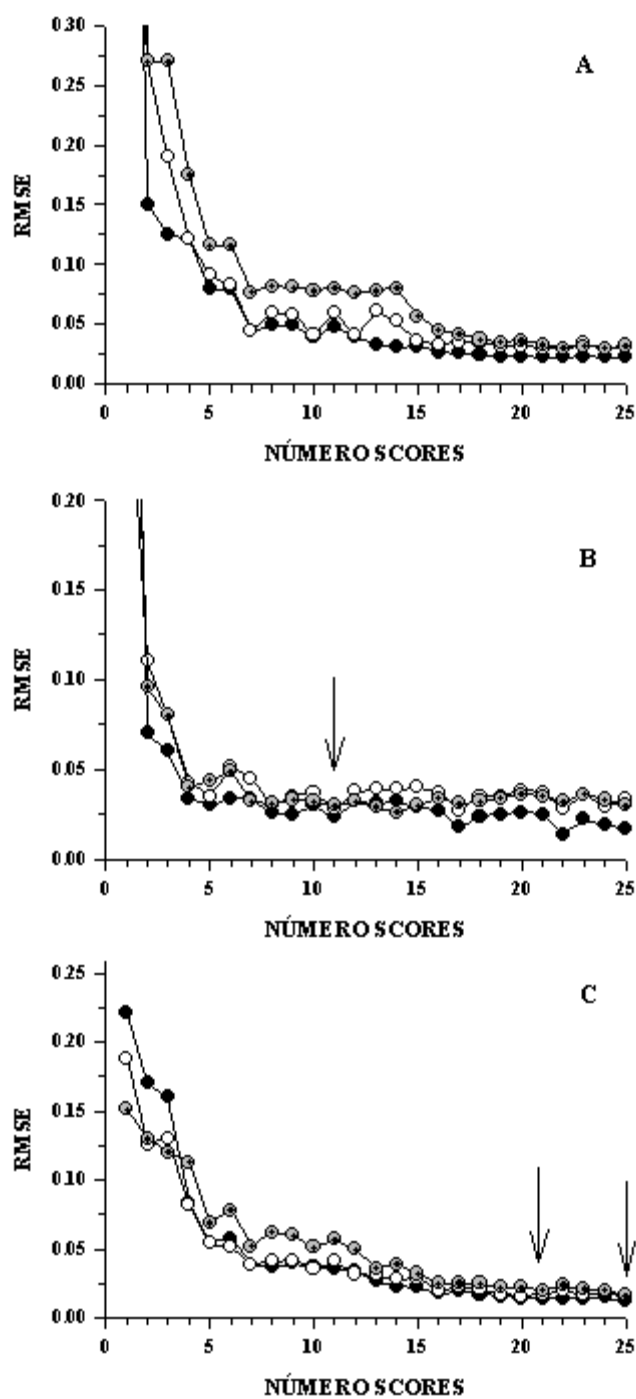


Figura 4.15 A-C. Valors RMSE pel formaldehid (A), glioxal (B) i glutaraldehid calculats model ANN-PCR (i,4,3) vers el n° de nodes capa d'entrada i. Conjunt de calibració (●), test set (○) i predicció ext. ().

Taula 4.3. RSEP%, R i ARSD% calculats amb el model ANN-PCR, pel formaldehid, glioxal i glutaraldehid en els tres conjunts de mostres. Arquitectura de la red (25,4,3).

	Formaldehid			Glioxal			Glutaraldehid		
	RSEP%	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%
Calibració	1,07	$6 \times 10^{-7}M$	1,29	0,77	$5 \times 10^{-7}M$	0,86	2,80	$3 \times 10^{-7}M$	2,60
Test set	224	$8 \times 10^{-7}M$	2,37	1,70	$6 \times 10^{-7}M$	1,14	3,53	$4 \times 10^{-7}M$	3,49
Predicció ext.	1,33	$8 \times 10^{-7}M$	1,15	1,39	$9 \times 10^{-7}M$	1,56	3,88	$5 \times 10^{-7}M$	4,07

Taula 4.4. RSEP%, R i ARSD% calculats amb el model ANN, pel formaldehid, glioxal i glutaraldehid en els tres conjunts de mostres. Arquitectura de la red (30,4,3).

	Formaldehid			Glioxal			Glutaraldehid		
	RSEP%	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%	RSEP%	R(M)	ARSD%
Calibració	1,28	$7 \times 10^{-7}M$	1,43	0,92	$5 \times 10^{-7}M$	0,97	4,35	$4 \times 10^{-7}M$	3,68
Test set	2,70	$7 \times 10^{-7}M$	2,03	1,41	$7 \times 10^{-7}M$	1,27	4,57	$5 \times 10^{-7}M$	3,74
Predicció ext.	1,53	$9 \times 10^{-7}M$	1,27	1,05	$5 \times 10^{-7}M$	0,85	5,89	$7 \times 10^{-7}M$	6,65

IV.4.2.3.3. Comparació dels mètodes de calibració emprats

En aquest treball s'ha comprovat que tant el PLS com el ANN, poden modelar perfectament les no-linealitats originades per un mecanisme de reacció de segon ordre. El PLS, malgrat sigui un mètode de calibració lineal, ajusta molt bé el comportament del sistema mitjançant la utilització d'un número addicional de factors, superior a les espècies químiques que contribueixen al senyal.

Els resultats que s'obtenen en ambdós mètodes de calibració són molt bons i pràcticament iguals, amb RSEP inferiors al 2 % pel formaldehid i glioxal, i inferiors al 5 % pel glutaraldehyd. En aquesta situació, es prefereix el PLS1 degut a la seva major simplicitat vers al ANN.

A part de la complexitat inherent del ANN, es necessita molt de temps per aconseguir un bon model, en contrast amb el PLS, i alhora hi ha una major tendència al sobre ajust de les dades. Una altra limitació important del ANN és el fet que el número de variables d'entrada ha d'ésser molt reduït quan el nombre de mostres no es massa gran, i això fa necessària una selecció prèvia de les variables experimentals.

Però inclús amb tots aquest inconvenients, el ANN ha demostrat ser una tècnica molt potent pel tractament de sistemes cinètics complexos, ja que únicament amb una selecció adequada d'unes poques longituds d'ona mesurades a temps molt espaiats, s'arriba a resultats molt similars als obtinguts per PLS1 utilitzant pràcticament totes les variables registrades.

A més, segurament es podrien haver obtingut millors resultats si s'haguessin assajat models ANN individuals per cada analit. Això no s'ha fet perquè tant pel formaldehid com pel glioxal els resultats ja són prou bons, i interessava més veure si es podia millorar pel glutaraldehyd invertint el mínim temps possible en els càlculs. Però com es sospitava, la millora no és produeix i el PLS arriba ja a les millors prediccions possibles pel glutaraldehyd, tenint en compte la magnitud de l'error experimental existent en les dades cinètiques. Aquest error produït per petits canvis en les condicions de reacció, afecta molt més al glutaraldehyd que als altres aldehids, ja que la seva contribució al senyal és molt més petita, i per tant, tampoc és sorprenent que els pitjors resultats s'obtinguin amb ANN-dades originals ja que hi ha moltes menys variables per a suavitzar-l'ho.

Taula 4.5. Contingut mig de formaldehid, glioxal i glutaraldehid (g/100g mostra) i el seu corresponent interval a $\alpha = 0,05$, obtingut mitjançant HPLC i els models PLS1 (n=9) pel mètode cinètic desenvolupat.

	PLS1			HPLC		
	Formaldehid	Glioxal	Glutaraldehid	Formaldehid	Glioxal	Glutaraldehid
DIESIN® NORMAL (0,7/1,8/0,4/100g)	0,69 ± 0,03	1,65 ± 0,11	0,39 ± 0,02	0,73 ± 0,03	1,74 ± 0,11	0,40 ± 0,03
DIESIN® RAPID (8/8/4,5/100g)	7,5 ± 0,2	7,2 ± 0,1	3,3 ± 0,3	7,8 ± 0,2	7,6 ± 0,2	3,3 ± 0,2

IV.4.2.4. ANÀLISI DELS DETERGENTS COMERCIALS

Després de comprovar que el mètode proposat per la determinació simultània de formaldehid, glioxal i glutaraldehid proporciona molt bons resultats quan s'aplica a mostres preparades al laboratori, s'aplica a l'anàlisi dels dos detergents desinfectants comercials.

A la taula 4.5 es mostra el contingut mig (en mg per 100 g de mostra), amb el seu interval de confiança per un nivell de significació del 95 % per l'aplicació dels models PLS 1, així com els obtinguts per HPLC. Els resultats són pràcticament idèntics per aplicació dels models ANN, i per això no es mostren.

Es comparen els valors mitjos obtinguts i la seva precisió mitjançant el *the Student's t-test* i *F-test*, i es veu que per un nivell de significació del 95 % no hi ha diferència significativa entre els resultats obtinguts pel mètode cinètic i els obtinguts pel mètode cromatogràfic.

IV.4.3. CONCLUSIONS

S'ha posat a punt un mètode d'anàlisi cinètic-espectrofotomètric per a la quantificació simultània de formaldehid, glioxal i glutaraldehid, per reacció amb MBTH seguint un mecanisme cinètic de segon ordre. S'utilitzen les tècniques de calibració multivariables PLS1 i ANN pel processament de les dades registrades, les quals contenen gran informació espectral i cinètica discriminant pels diferents analits, i es comprova que ambdues són tècniques de calibració molt adequades en aquests tipus de sistemes cinètics. El mètode desenvolupat és selectiu i sensible als aldehids, i permet quantificar-los en detergents desinfectants comercials de composició molt diferent i complexa, obtenint resultats que no difereixen dels trobats pel mètode cromatogràfic.

IV.5. MÈTODE CINÈTIC PER MOSTRES CONCENTRADES

IV.5.1. INTRODUCCIÓ

En aquest segon treball es posa a punt un procediment alternatiu per a la determinació simultània cinètico-espectrofotomètrica de formaldehid (I), glioxal (II) i glutaraldehid (III), a partir de la mateixa reacció de condensació amb MBTH. L'objectiu es analitzar directament les mostres de detergent sense cap etapa prèvia de dilució.

Aquest objectiu s'aconsegueix en unes determinades condicions experimentals en les que la concentració de reactiu és molt inferior a la concentració dels aldehids en les mescles, situació que dona lloc a un sistema cinètic de pseudoprimer ordre respecte al reactiu.

Si es considera un sistema de dos analíts (A, B) que reaccionen amb un reactiu comú R per a donar lloc als productes P₁, P₂, en condicions de pseudo primer ordre respecte al reactiu, tenim

$$\frac{d[P_1]}{dt} + \frac{d[P_2]}{dt} = - \frac{d[R]}{dt} = (k'_A + k'_B)[R] \quad (3)$$

que la velocitat de reacció pot expressar-se com:

on $k'_A = k_A \times [A]_0$; $k'_B = k_B \times [B]_0$ són les pseudo constants de velocitat de A, i B, respectivament.

Si s'assumeix que les concentracions inicials dels productes P₁ i P₂ són zero, el sistema d'equacions diferencials anterior té la següent solució analítica:

$$[P_1]_t = R_0 \left\{ 1 - \frac{[k'_B/k'_A + e^{-(k'_A + k'_B)t}]}{(k'_B/k'_A + 1)} \right\} \quad (4)$$

$$[P_2]_t = R_0 \frac{(k'_B/k'_A)}{(k'_B/k'_A + 1)} [1 - e^{-(k'_A + k'_B)t}]$$

on $[P_1]_t$ i $[P_2]_t$ són les concentracions de P₁ i P₂ a un temps t i R₀ es la concentració inicial de reactiu.

A una longitud d'ona donada , i temps t, l'absorbància de la mescla es pot expressar com:

$$A_{\lambda,t} = \varepsilon_{1,\lambda} l [P_1]_t + \varepsilon_{2,\lambda} l [P_2]_t \quad (5)$$

on ε_1 i ε_2 són els coeficients d'absortivitat de P_1 i P_2 , i l és el camí òptic.

De les equacions anteriors hi ha dos aspectes importants ha destacar; el primer és que el que realment determina la velocitat global de reacció és la suma de les pseudo constants $k'_A + k'_B$ essent la contribució de cada analit al senyal global funció del producte de la seva constant de velocitat per la seva concentració, i el segon que siguin quines siguin aquestes concentracions, la quantitat total de producte que es forma al final de la reacció sempre és la mateixa i ve determinada per la concentració de partida de reactiu, R_0 . Quan el que es segueix és l'absorbància dels productes derivats de la reacció, ambdues característiques fan que sigui del tot indispensable per la resolució d'aquests sistemes cinètics que els productes presentin espectres diferents, i que s'utilitzi la diferent informació que proporcionen múltiples longituds d'ona. Si en canvi els espectres són idèntics, tenim la mateixa velocitat de reacció per mescles diferents que presenten els mateixos valors de $k'_A + k'_B$, i alhora l'absorbància registrada a qualsevol temps és també exactament igual, no essent possible discriminar la contribució de cada espècie.

En un treball previ [Blanco, 1996b] es va estudiar per una mescla binària l'efecte sobre la capacitat predictiva de la superposició espectral, relació de les pseudo constants de velocitat i procediment de calibració multivariable.

En el present treball, a la major complexitat inherent a la naturalesa de les reaccions, se li afegeix el fet que les condicions experimental són poc favorables per la determinació del component minoritari en les mescles, el glutaraldehid, el qual presenta una pseudo constant k' molt desfavorable al troba-se en gran de fecte a la mescla, i al ser també el component amb una menor velocitat de reacció. En aquests tipus de sistemes és molt important que compost lent pugui competir amb els altres analits pel reactiu, ja que en el moment que s'ha consumit tot el reactiu del medi, aquest no pot contribuir més al senyal mesurat encara que s'utilitzi un temps de registre gran. Un altre efecte no desitjat s'origina en afegir les mostres de detergents directament a la cubeta de mesura, ja que la presència d'altres compostos a elevades concentracions poden interferir en la reacció dels aldehids i complicar l'anàlisi.

El seguiment de la reacció es fa comen el treball anterior, registrant l'evolució del espectre combinat dels productes de reacció. El conjunt de dades obtingudes es processen també per mitjà de PLS i ANN, però es creu que l'aplicació de les xarxes pot proporcionar millors resultats al tractar-se d'un sistema que es desvia tant d'un comportament lineal, tal i com ja està descrit en la bibliografia [Blanco, 1996b].

IV.5.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.5.2.1. REACCIÓ DELS ALDEHIDS AMB MBTH

La reacció de condensació que s'utilitza en aquest treball és la mateixa que en l'anterior, només que ara l'ordre cinètic de la reacció és de pseudoprimer ordre respecte al reactiu, com a resultat de la modificació de les condicions experimentals.

L'etapa inicial consisteix en buscar el pH més adient que, com ja s'ha vist abans, és el paràmetre que més influeix en la velocitat de reacció. A un pH de 5, la velocitat de reacció és molt ràpida, ja que es consumeix de forma pràcticament instantània la totalitat del reactiu present. Per tal de disminuir aquesta velocitat de reacció a uns límits considerats adequats per les nostres condicions experimentals de mesura, s'estudien medis de reacció més àcids. Com a solució de compromís s'escull un pH de 2, mantenint la concentració de MBTH a $1 \times 10^{-4} \text{M}$. Malgrat que a pHs inferiors la reacció de condensació transcorre de forma encara més lenta per tots els compostos, aquests no es consideren una opció ja que per poder obtenir una contribució significativa per part dels tres analïts, especialment pel glutaraldehid, s'ha d'augmentar molt el temps d'anàlisi o bé la concentració de MBTH. Ambdues possibilitats es rebutgen d'entrada, i es prefeix treballar com abans amb una concentració de MBTH $1 \times 10^{-4} \text{M}$, ja que a valors superiors l'absorbància dels productes formats arriben a agafar valors d'absorbància molt superiors a l'unitat.

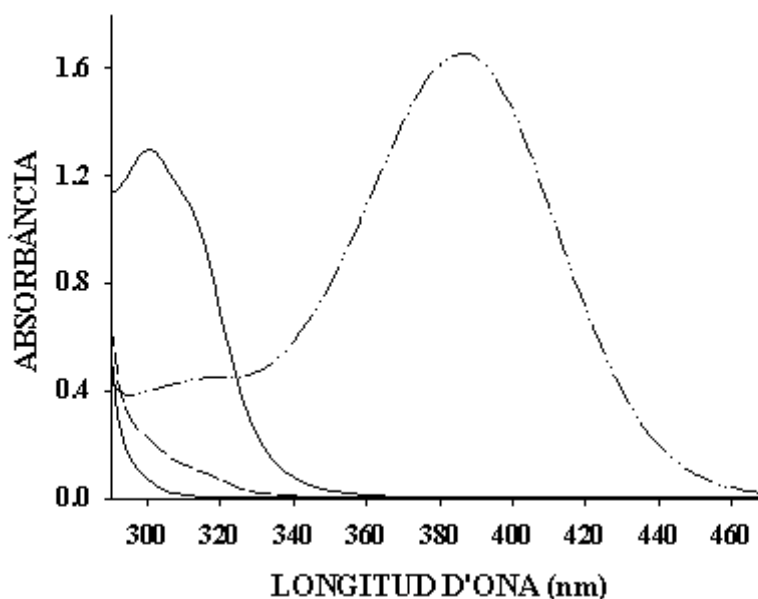


Figura 4.16. Espectre del MBTH (—), i dels derivats del formaldehid (—), glicoxal (- -) i glutaraldehid (---) als 10 minuts de reacció.

A la figura 4.16 es mostren els espectres d'absorbància dels productes de reacció als 10 minuts, dels diferents aldehids purs a les concentracions corresponents al nivell central del disseny de calibració. Es pot veure que les aldazines derivades presenten espectres molt similars als anteriors, però amb un lleuger desplaçament hipsocròmic, i com abans el glicoxal també absorbeix en solitari al voltant de 400 nm ($\lambda_{\max}=384$ nm). A la regió centrada a 300 nm tenim una gran superposició espectral per part dels derivats dels tres aldehids, amb màxims poc definits però força propers. També es pot veure que el glutaraldehid quasi no reacciona, i per aquests motius en les condicions de treball no assolix el seu màxim d'absorbància. Donat que en una mescla la seva contribució serà encara menor, es planteja el dubte sobre si el glutaraldehid contribueix realment o no al senyal d'una mescla. Un estudi detallat de la variació espectral en la zona de 300-310 nm, per mescles contenint la mateixa concentració de formaldehid i glicoxal, i concentracions variables de glutaraldehid posa de manifest la presència de petites variacions espectrals sistemàtiques, pel que es continua amb l'estudi de la seva quantificació.

Per tal d'expressar la similitud espectral, s'utilitza en aquest cas el coeficient de correlació entre els espectres, essent de 0,800 entre el derivat del formaldehid i del glutaraldehid, de 0,320 entre el derivat del formaldehid i del glioxal, i l'últim de 0,260 entre el derivat del glioxal i del glutaraldehid. Segons això, malgrat que els diferents compostos absorbeixen en la mateixa zona, les bandes són prou diferenciades entre elles. A part, la intensitat de les bandes també és força diferent, essent els valors d'absortivitat molar aparents calculats a 300 nm de 12500, 9600 i 8000 $\text{l}\times\text{cm}^{-1}\times\text{mol}^{-1}$ pel formaldehid, glioxal i glutaraldehid, respectivament.

La velocitat de reacció es segueix mitjançant el registre de l'espectre complet de les bandes dels productes de condensació durant un temps total de 10 minuts. No s'agafen temps més llargs de registre, ja que en el temps considerat el reactiu es consumeix totalment i aleshores la contribució a l'absorbància per part dels analits no es veu modificada en absolut. A la figura 4.17 A-B es mostren els perfils cinètics a 300 i 384 nm de la mescla corresponent al nivell central del disseny de calibració i de les dissolucions pures dels tres aldehids a les mateixes concentracions. Es pot veure com a 300 nm la major contribució a l'absorbància de la mescla es deu al derivat del formaldehid el qual presenta una major velocitat de reacció ($k_{\text{I}} = 0,25 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{II}} = 0,15 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ i $k_{\text{III}} = 0,12 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i una absortivitat molar aparent més elevada. En canvi la contribució del glutaraldehid és molt petita ja que al fet de ser el compost que reacciona amb una menor velocitat i que presenta la menor absortivitat molar, també se li suma el fet que la seva concentració és molt menor a la concentració dels altres aldehids en les mescles. Això fa que les actuals condicions de treball, no siguin gens favorables a la quantificació d'aquest aldehid. Per acabar esmentar que al igual que abans, a la regió centrada a 400 nm només hi ha la contribució per part del derivat del glioxal, i que també el perfil de dissolucions pures no es correspon al perfil en les mescles el qual és funció de les concentracions de la resta dels aldehids.

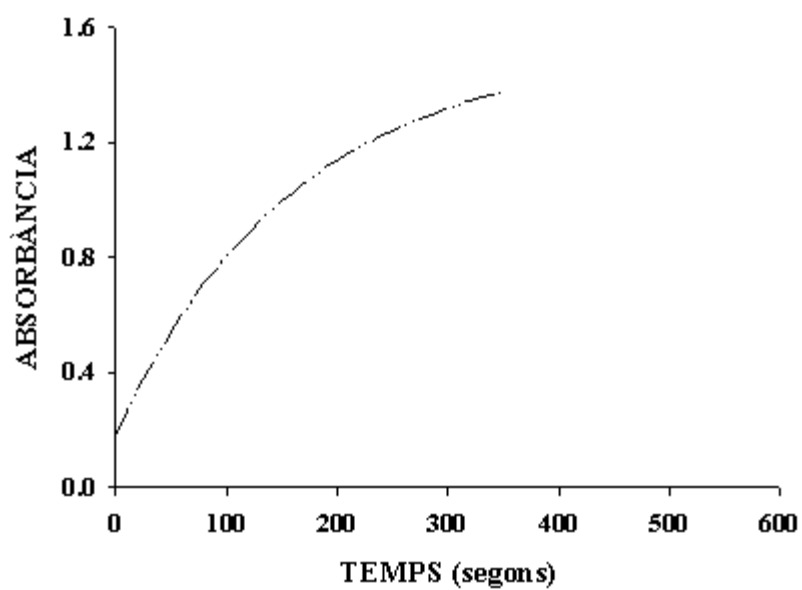


Figura 4.17. Perfils cinètics a 300 (A) i 384 nm (B) dels derivats del formaldehid (- -), glioxal(...), i glutaraldehid (---), i el d'una mescla (—).

IV.5.2.2. ANÀLISI DE MESCLES TERNÀRIES D'ALDEHIDS

Un cop estudiat el sistema experimental, es passa a la quantificació del formaldehid, glioxal i glutaraldehid en mescles preparades al laboratori. Aquí també s'utilitza la matriu de dades X per la construcció dels diferents models de calibració, la qual conté 5551 valors d'absorbància (61 espectres) per a cada mostra. Ara més que abans, la utilització de la informació cinètica a múltiples longituds d'ona constitueix un punt clau en la resolució d'aquest sistema cinètic tan complex plantejat.

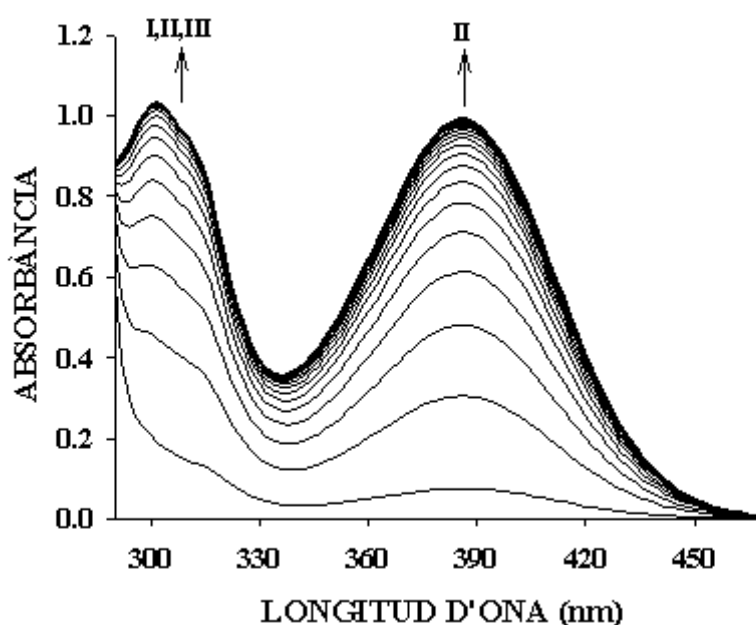


Figura 4.18. Evolució espectral dels productes de reacció d'una mescla. Dels 61 espectres registrats (cada 10 s durant un temps total de 10 min), només es mostren els registrats cada 30s.

A la figura 4.18 es mostra l'evolució espectral amb el temps dels productes derivats de la reacció de condensació dels tres aldehids amb MBTH, per la mescla central del disseny de calibració sota les condicions experimentals escollides. Tenim que la banda centrada sobre 300 nm conté la contribució majoritària per part de les aldazines del formaldehid i glioxal, i de forma minoritària de l'aldazine del glutaraldehid, i que la banda centrada sobre 400 nm només conté la de l'aldazine del glioxal. En ambdues regions de l'espectre de la mescla, l'absorbància creix de

forma desigual a mesura que els diferents productes es van formant, i la velocitat en cada una d'aquestes regions és funció de la suma de les pseudo constants dels components que hi absorbeixen. Així tenim que mescles que contenen diferents concentracions de formaldehid i concentracions constants dels altres aldehids, la velocitat de reacció a 300 nm és cada cop és més elevada, tal i com es pot veure a la figura 4.19 A. Un altre aspecte que destaca a la figura és el fet que encara que s'augmenti força la concentració de formaldehid, l'absorbància no augmenta de la mateixa manera, sinó que aquesta es modifica en funció de la nova composició de la mescla, la qual conté un percentatge cada cop més alt del derivat del formaldehid respecte als derivats dels altres aldehids. Aquest percentatge està determinat per la nova relació de pseudo constants de velocitat entre els analits, la qual es troba afavorida pel formaldehid en augmentar la seva concentració.

A la figura 4.19 B es pot veure que per un conjunt de mostres que contenen la mateixa concentració de glioxal i glutaraldehid, i concentració creixent en formaldehid, on s'observa com la contribució de l'aldazide derivada del glioxal, la qual absorbeix en solitari a la longitud d'ona representada, és cada cop més petita a mesura que la concentració de formaldehid augmenta.

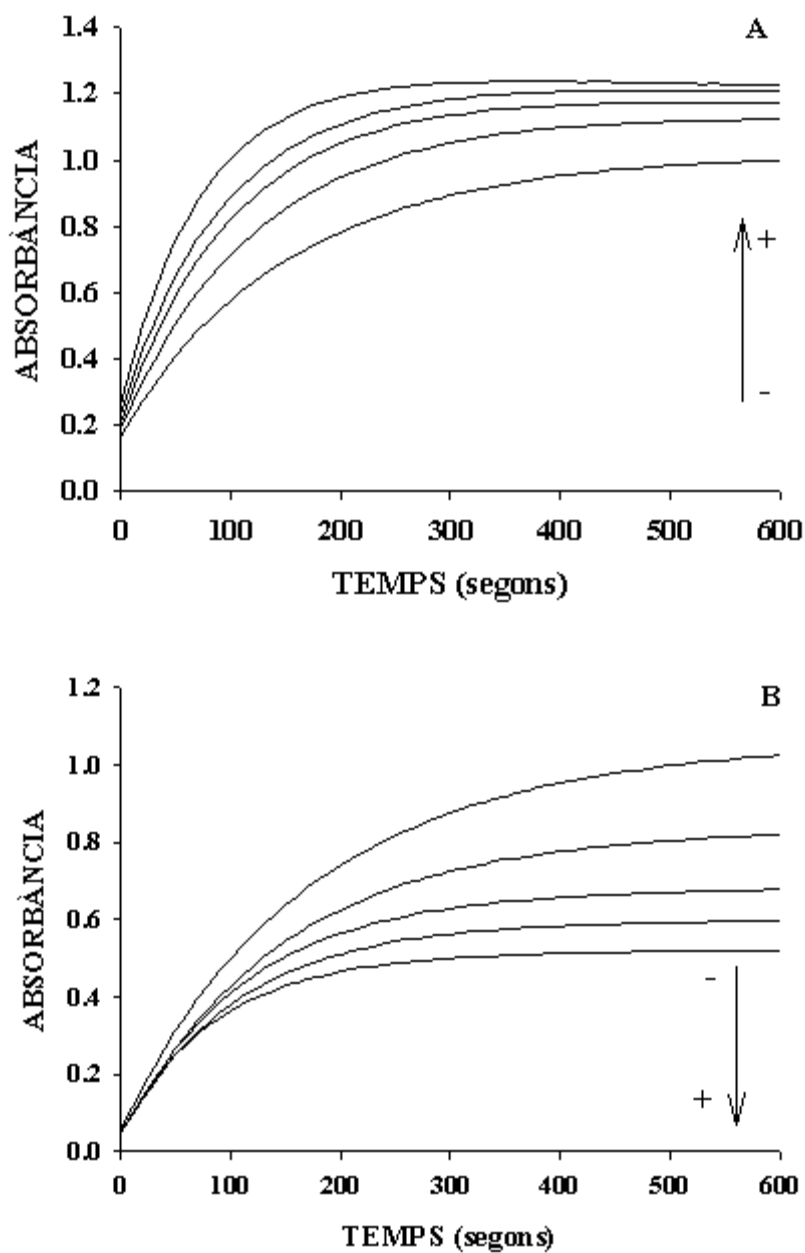


Figura 4.19 A-B. Perfils cinètics a 300 (A) i 384 nm (B) d'un conjunt de mostres amb concentracions creixents de formaldehid, seguint la fletxa..

Com s'ha esmentat abans, es realitza un petit estudi per veure si la banda centrada sobre 300 nm realment conté informació del glutaraldehid o si l'extensió de la seva reacció amb MBTH és inapreciable a les condicions de treball. A la figura 4.20 es mostra la variació de la 1a derivada

amb el temps per la mescla central del disseny de calibració, on es pot observar la presència d'un punt pseudoisobèstic a 304 nm similar al punt *isobèstic* que apareix a 302 nm per la 1a derivada d'una solució pura que conté únicament formaldehid. Això reflexa la gran similitud espectral entre els diferents productes de reacció en aquesta regió espectral, i a la vegada, que aquest lleuger desplaçament del punt isobèstic pot ser en part degut al derivat del glutaraldehyd. Per a poder afirmar això, es representen els valors de la derivada a 302 nm al final del registre cinètic d'un conjunt de mescles que contenen els 5 nivells diferents de concentració del glutaraldehyd utilitzats en la calibració, i la mateixa concentració en els altres aldehids. Com es pot veure a la figura 4.21, existeix realment una certa dependència amb la concentració del glutaraldehyd que ens permet concloure que encara que molt petita, sí que existeix una contribució d'aquest analít al senyal registrat de la variació espectral en la zona de 300-310 nm.

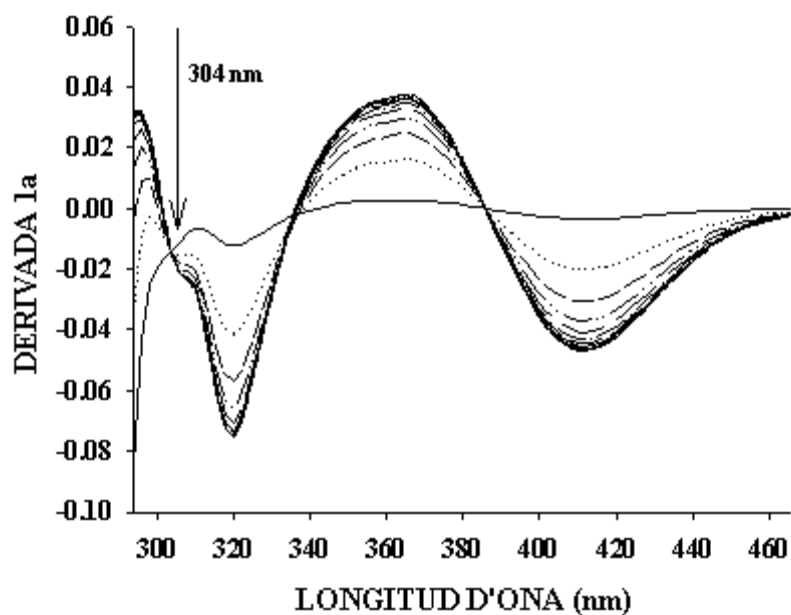


Figura 4.20. Espectre de la 1a derivada dels productes de reacció. Dels 61 espectres registrats només es mostren els registrats cada 50s.

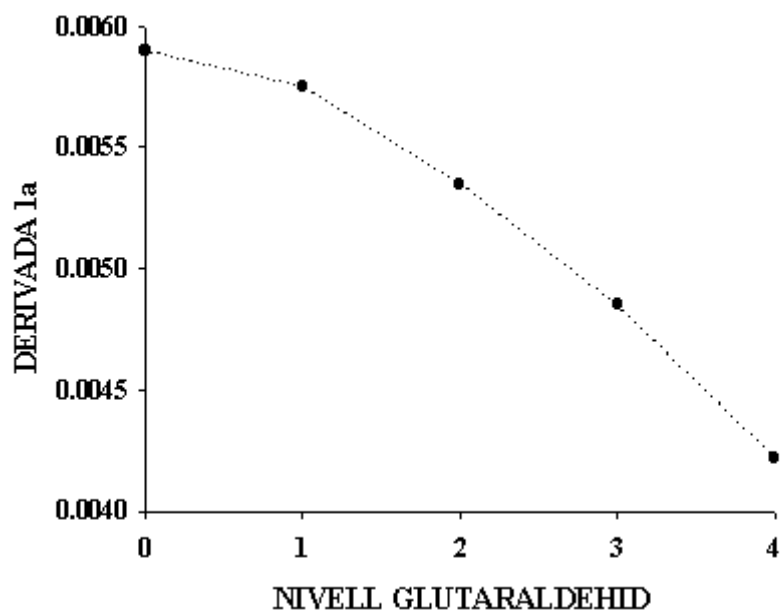


Figura 4.21. Valor de la 1a derivada a 302 nm als 10 minuts de reacció, per mescles de concentració creixent en glutaraldehid.

Un cop s'havia vist tot això, es procedeix a la construcció dels models de calibració. S'assaja primer la regressió parcial per mínims quadrats PLS, i a continuació les xarxes neuronals artificials, les quals, a diferència dels anteriors, presenten una elevada eficiència per a resoldre sistemes amb un fort caràcter no-lineal.

IV.5.2.2.1. Construcció de models PLS1

Com en el procediment anterior, abans de construir els diferents models PLS1, es redueix la quantitat de variables contingudes en la matriu de dades cinètico-espectrofotomètrica, per tal d'evitar al màxim un excés de variables molt correlacionades i poder reduir el temps de càlcul. Així s'agafen els valors cada 6 nm enlloc de cada 2 nm en la regió espectral de 360-468 nm on només hi havia la banda ampla del derivat del glioxal. La reducció del número d'espectres també es considera, ja que la reacció és pràcticament completa per moltes mostres abans de finalitzar el temps de registre considerat. Però això era un pas crític perquè la importància de la informació

continguda a temps llargs és diferent per cada aldehyd, i es prefereix fer la selecció de forma individual d'aquesta variable a partir de l'estudi dels models PLS1.

La selecció de les variables espectrals es fa de forma empírica assajant varis intervals espectrals i de temps, en funció dels espectres dels productes de reacció i de l'extensió en què té lloc la reacció per cada analit, respectivament. Tant el formaldehyd com el glutaraldehyd es quantifiquen millor agafant únicament la banda d'absorbància centrada a 300 nm (290-360 nm). En canvi, el glioxal es quantifica millor agafant tot l'espectre complert (290-468 nm), ja que la banda centrada a 400 nm conté informació privilegiada per aquesta espècie, malgrat que en solitari no sigui suficient deguda a la complicada dependència del comportament cinètic del glioxal amb les concentracions dels altres aldehids en el medi.

En referència al temps de reacció, s'observa que tant el formaldehyd com el glioxal es quantifiquen molt bé per a temps curts de mesura (els primers 5 minuts), sense que l'augmentar l'interval de registre millorin els resultats. El cas del glutaraldehyd és bastant diferent, ja que els temps alts aporten informació útil per la seva resolució, i en canvi no ho fan els temps inferiors a 2 minuts. L'interval considerat per aquest aldehyd és de 2-10 minuts.

A part, també s'assagen models amb els espectres de la primera derivada respecte a la longitud d'ona a cada temps, a partir de l'aplicació de l'algoritme de Savitzky-Golay amb un polinomi de segon ordre i un dimensió de finestra variable. Els resultats no milloren, segurament per la pèrdua de informació a longituds properes a 300 nm i de sensibilitat. Finalment, es proven models PLS1 pel glutaraldehyd amb les variables espectrals escalades, el qual curiosament tampoc es veu afavorit amb aquest tractament.

Malgrat s'obtinguin bons models, amb una bona capacitat predictiva per les mostres del laboratori, al predir les mostres de detergents s'obtenen resultats molt dolents. A la figura 4.22 A es mostra l'error relatiu en la predicció del glioxal en les mostres del conjunt de predicció extern i en un dels lots de producció de Diesin® Normal. S'observa que les mostres de laboratori es prediuen correctament però que les de Diesin presenten una desviació sistemàtica important. Aquests resultats tan desfavorables, s'atribueixen a l'elevada concentració d'altres compostos procedents de la matriu del detergent, sobretot als tensioactius per formació de mescleres, les quals provoquen que tant l'espectre com el comportament cinètic d'aquestes mostres reals no sigui exactament el mateix que el comportament de les mostres sintètiques. Després d'estudiar en detall

els dos grups de mostres, es veu que hi ha algunes petites diferències, sobre tot per longituds d'ona properes a 300 nm (290-340 nm) i temps curts de reacció, i que justament aquestes variables presenten residuals molt superiors en les mostres reals.

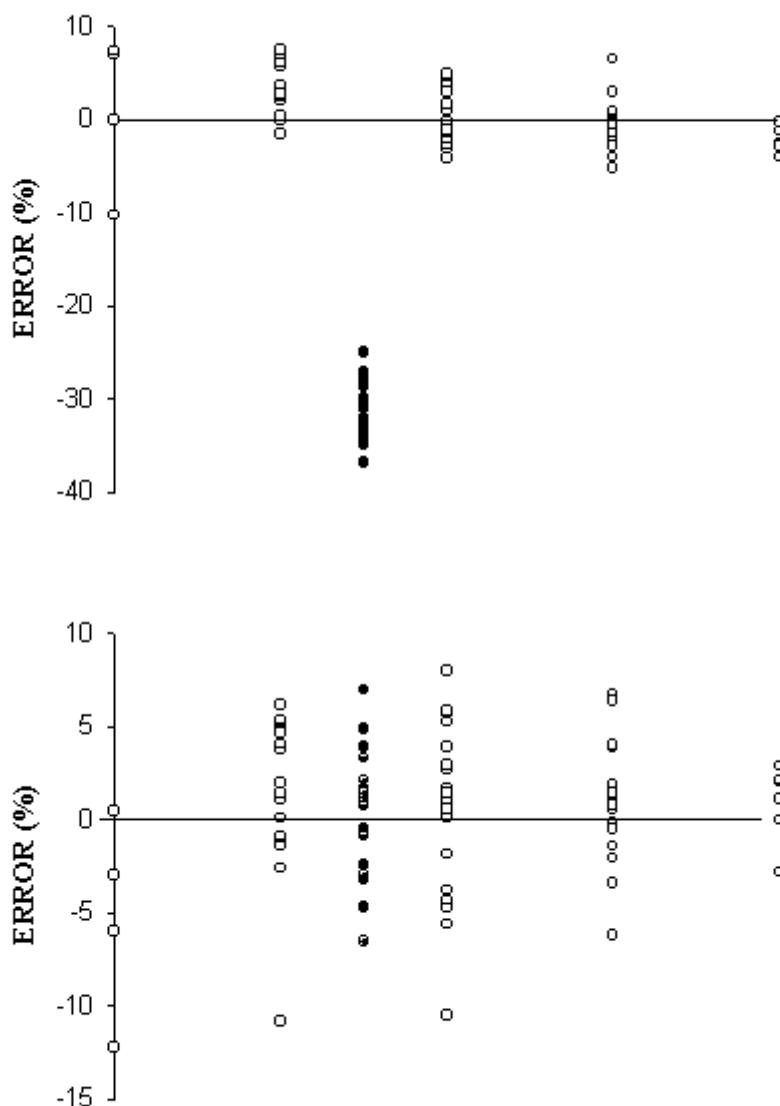


Figura 4.22. A-B. Error relatiu en la predicció del glioxal en le mostres de predicció extern (○) i del lot B de Diesin Normal (●) (A). En (B) el conjunt de calibració inclou mostres del lot A de Diesin Normal (○).

Es planteja la eliminació d'aquestes variables, però les prediccions no milloren massa i en canvi els models que es construeixen són força dolents, ja que justament en aquests valors d'absorbància és on es troba continguda la informació més important del sistema. Aleshores es prova també de derivar els espectres d'absorbància, però no s'aconsegueixen millores apreciables, malgrat que els dos conjunts de mostres s'assemblen una mica més.

Llavors s'opta per introduir alguns espectres de sistemes reals d'un lot de producció de Diesin®Normal en el conjunt de calibració i de test-set, 6 i 3 mostres respectivament, mantenint les mostres de l'altre lot com a conjunt per a comprovar la validesa del model. D'aquesta manera les mostres del laboratori aporten la informació deguda a la diferència de concentració i les mostres reals l'efecte de la matriu [Blanco, 1998; Riley, 1998]. Els nous models calculats, presenten ara una capacitat predictiva de la mateixa magnitud tant en les mostres preparades en el laboratori com en les del detergent (figura 4.22 B).

El número de factors significatius trobats en els diferents models PLS1 construïts amb les variables espectrals que s'han indicat abans, és de 11 pel formaldehid, de 8 pel glioxal, i de 9 pel glutaraldehid. Com en el sistema cinètic anterior, aquest valor de factors és molt superior al número d'analits la qual cosa s'atribueix també a les no-linealitats introduïdes al sistema actual pel complicat mecanisme cinètic de reacció. A la taula 4.6 es mostra el RSEP%, la R i la ARSD% obtinguts al quantificar els diferents conjunts de mostres preparades al laboratori, mitjançant aquests models PLS1.

Es pot observar que el formaldehid i el glioxal es quantifiquen amb molt bona exactitud i precisió (RSEP i ARSD comparables 3,5-4%). Però tenim que els resultats en conjunt són força pitjors en l'actual sistema cinètic, i això segurament es deu al fet que ara la variabilitat en les constants dels diferents processos involucrats afecta de forma molt directa a la precisió en les prediccions dels analits, segons es dedueix de l'equació 4.

Pel glutaraldehid la qualitat dels resultats és molt inferior, amb un valor de RSEP 9% i significativament superior al valor del ARSD (5%). Això indica que el PLS1 no és capaç de modelar bé el comportament d'aquest analit com a conseqüència de la seva baixa contribució, la qual pot quedar confosa amb el soroll experimental o bé amb el senyal majoritari per part dels altres analits.

Per tal de comprovar-ho, es mostren les figures 4.23 A-C on es representen les prediccions individuals per a cada analít vers la concentració afegida en les mostres del conjunt de test set i de predicció externa, i a la taula 4.7 els paràmetres de regressió d'aquestes rectes. Es pot veure que mentre que pel formaldehid i glioxal no sembla que hi hagi la presència d'errors sistemàtics en les prediccions, pel glutaraldehid la recta corresponent al conjunt de predicció extern es desvia de la recta teòrica de pendent unitari, cosa que afirma l'hipòtesi de que els models de calibració PLS1 calculats per aquest analít no són prou bons. A la vista d'això, es decideix assajar una calibració per xarxes neuronals (ANN).

Taula 4.6. RSEP%,R i ARSD% calculats amb els models PLS1 pel formaldehid, glioxal i glutaraldehid en els tres conjunts de mostres. Numero de PCs utilitzats en el model: a = 11, b= 8, c=9.

	Formaldehid ^a			Glioxal ^b			Glutaraldehid ^c		
	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD
Calibració	3,34	2,2×10 ⁻³ M	3,18	3,63	2,8×10 ⁻³ M	3,90	8,69	6,1×10 ⁻⁴ M	4,78
Test set	3,66	1,8×10 ⁻³ M	2,46	3,99	3,7×10 ⁻³ M	3,73	6,20	6,3×10 ⁻⁴ M	4,93
Predicció ext.	3,43	2,5×10 ⁻³ M	3,34	354,	3,5×10 ⁻³ M	3,50	8,63	6,1×10 ⁻⁴ M	4,24

Taula 4.7. Paràmetres de la recta concentració PLS vers concentració real de formaldehid, glioxal i glutaraldehid, per les mostres de calibració, test set i predicció externa. Intervalls de confiança del 95%. Número de mostres: a = 106, b=35 i c = 32.

	Formaldehid			Glioxal			Glutaraldehid		
	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació,
Calibració ^a	(4±5)×10 ⁻⁴	0,99±0,02	0,992	(2 ±8)×10 ⁻⁴	0,10± 0,02	0,992	(2 ±2)×10 ⁻⁴	0,95±0.04	0,95
Test set ^b	(0,8±1,2)×10 ⁻³	0,96±0,05	0,98	(0,7 ±2)×10 ⁻³	1,03±0,06	0,97	(1±3)×10 ⁻⁴	0,97±0.08	0,95
Predicció ^c	(0,02±1,6)×10 ⁻³	0,98±0,06	0,98	(0,4 ±2)×10 ⁻³	1,02±0,05	0,998	(7 ±3)×10 ⁻⁴	0,80±0.05	0,97

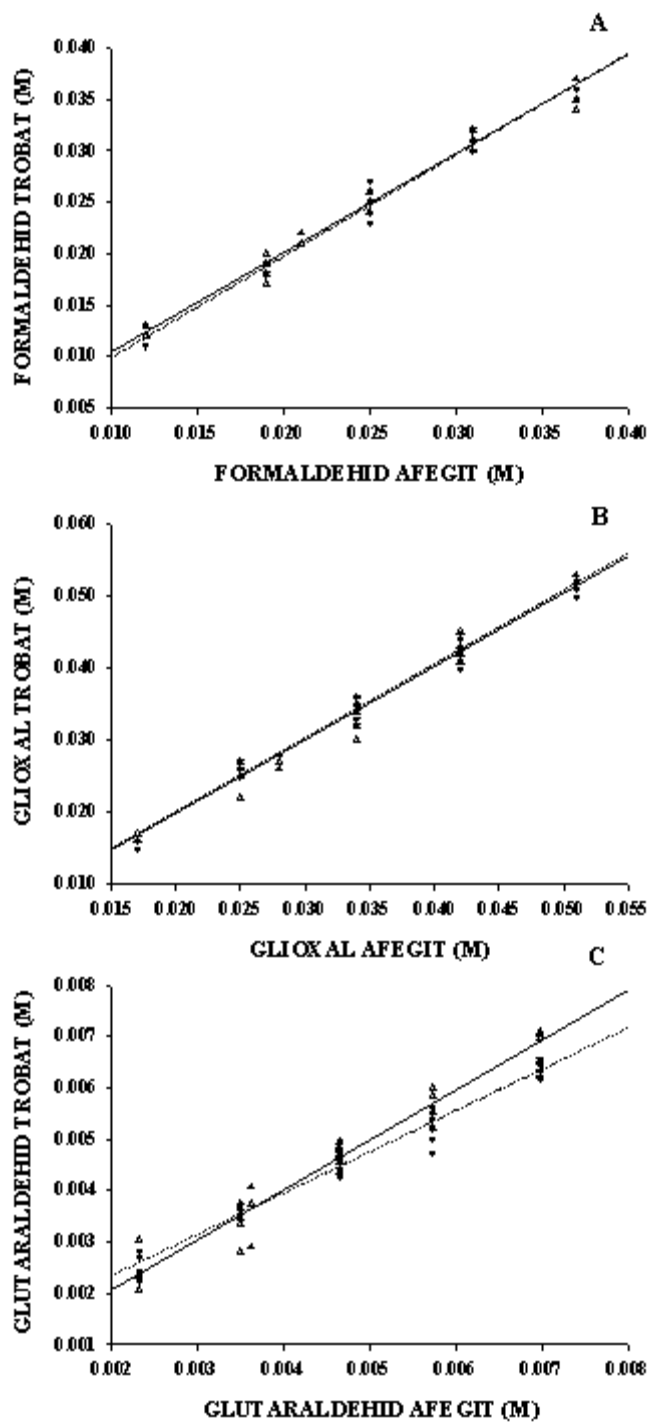


Figura 4.23 A-C. Concentració trobada a partir dels models PLS1 pel formaldehid (A), glioxal (B) i glutaraldehyd (C), vers la afegida en mostres de test set () i pred. ext.().

IV.5.2.2.2. Construcció de models ANN

La segona etapa d'aquest treball també consisteix en la utilització de les xarxes neuronals artificials, ja que es pensa que poden ser una eina molt valuosa pel tractament d'aquest sistema especialment complicat. Al mateix temps, i també com a conseqüència d'aquesta major complexitat, es considera oportú estudiar més en detall cada aldehid per mitjà de la construcció de models ANN amb una única neurona a la capa de sortida, els quals permeten quantificar-los de forma individual. Això d'entrada fa allargar molt el temps de càlcul, però es creu que els resultats tendiran a ser millors que si s'utilitza un model conjunt pels tres analits, tal i com es troba descrit en la bibliografia [Ni, 1999; López-Cueto, 2000].

Així doncs, els diferents paràmetres de les xarxes són estudiats amb l'objectiu de trobar les condicions òptimes per a cada aldehid, i només s'assagenr models del tipus PC-ANN per tal de poder treure el màxim partit tant de les diferències cinètiques com espectrals entre els diferents productes de reacció. Aquests models PC-ANN es construeixen a partir de la utilització de diferents conjunts de variables de la matriu cinètica. Inicialment s'assaja el rang complert, i després es va reduint el número de variables seguint les pautes que permet arribar als millors resultats amb els models PLS1.

Un aspecte que es considera d'especial importància en la construcció d'aquests models, és la selecció del número de PCs d'entrada en cada una de les xarxes, cosa que ens porta provar per a cada un dels models tres criteris de selecció diferents. En el primer s'agafen un número alt de PCs calculats en els models PCA, en aquest treball 15, en el segon s'agafen només els PCs significatius segons el criteri proposat per Haaland, i en el últim s' agafen només els PCs que mostren una certa correlació (coeficient de correlació superior a 0,1) amb l'aldehid que s'analitza. Aquest paràmetre de correlació s'obté de la representació de cada un dels PCs calculats front la concentració de l'aldehid en qüestió. Curiosament, cada una d'aquestes tres maneres diferents d'escollir les neurones d'entrada a les xarxes, és la millor en l'anàlisi d'un dels aldehids, on en el cas del glutaraldehid la selecció per correlació és la més efectiva. Això últim s'atribueix a què la variabilitat deguda a aquesta espècie en els models PCA és molt petita com a conseqüència de la seva baixa contribució a l'absorbància de la mescla, i que juntament amb la complexitat del sistema cinètic provoca que alguns dels PCs calculats, inclús dels inicials, no mostrin relació amb la seva

concentració, sinó que majoritàriament expliquen les variacions de concentració de les altres espècies.

Aleshores, es construeixen els diferents models assajant primer la funció d'activació sigmoïdal, i la distribució gaussiana dels pesos inicials en el rang de $\pm 0,1$, mentre que el número de neurones de la capa oculta es varia des de 1 a 4. No es considera un número de nodes superior ja que aquests nous models individuals són força simples. Un cop s'arriba a la millor arquitectura en cada cas estudiat, es torna a construir el model provant també la funció tangencial, i la distribució uniforme dels pesos inicials, amb l'objectiu d'experimentar com afecten aquests paràmetres als resultats. Però els millors resultats s'obtenen amb els paràmetres estudiats inicialment, i només la funció tangencial mostra ser lleugerament superior en els models calculats pel formaldehid. Finalment, també es fan alguns models pel glutaraldehyd normalitzant els scores d'entrada a la xarxa, però en cap d'ells es milloren els resultats ja obtinguts.

A la taula 4.8 es mostren els millors resultats obtinguts en quantificar els aldehids pels diferents conjunts de mostres, mitjançant els models PC-ANN (13,2,1) pel formaldehid, (15,3,1) pel glioxal, i (6,3,1) pel glutaraldehyd. En la construcció d'aquests models, només s'utilitza una part de la matriu de dades obtinguda del registre cinètic, i paral·lelament als models PLS1, pel glioxal s'utilitza l'espectre complet registrat fins als 5 primers minuts de reacció, mentre que pel formaldehid i glutaraldehyd només s'utilitza la banda centrada a 300 nm, durant els primers 5 minuts, i dels 2 als 10 minuts, respectivament. A la taula 4.8 es pot veure com els resultats tant pel formaldehid com pel glioxal són pràcticament idèntics als obtinguts per PLS1, mentre que els resultats pel glutaraldehyd són ara força millors, amb un valor del RSEP% 6 % i ARSD% 5. Sembla doncs, que la ANN presenta una major capacitat que el PLS1, per modelar la petita variabilitat deguda a aquest analit en les mostres. Per tal de comprovar-ho, a la figura 4.24 es representen les prediccions individuals vers la concentració afegida en les mostres del conjunt de test set i de predicció externa, que conjuntament amb els paràmetres de regressió d'aquestes rectes (la taula 4.9) permet concloure que no hi ha ara la presència d'errors sistemàtics en les prediccions.

Taula 4.8. RSEP%, R i ARSD% calculats amb els models ANN-PCA pel formaldehid, glioxal i glutaraldehyd en els tres conjunts de mostres. Arquitectura de les xarxes: (13,2,1)^a, (15,3,1)^b, (6,3,1)^c, respectivament.

	Formaldehid			Glioxal			Glutaraldehyd		
	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD
Calibració	2,94	$1,7 \times 10^{-3} \text{M}$	2,48	2,,52	$2,9 \times 10^{-3} \text{M}$	3,05	6,06	$5,2 \times 10^{-4} \text{M}$	4,06
Test set	3,56	$2,1 \times 10^{-3} \text{M}$	2,83	3,90	$3,6 \times 10^{-3} \text{M}$	3,87	6,18	$6,1 \times 10^{-4} \text{M}$	4,83
Predicció ext.	3,86	$2,7 \times 10^{-3} \text{M}$	356	3,52	$3,4 \times 10^{-3} \text{M}$	3,35	5,91	$6,1 \times 10^{-4} \text{M}$	4,25

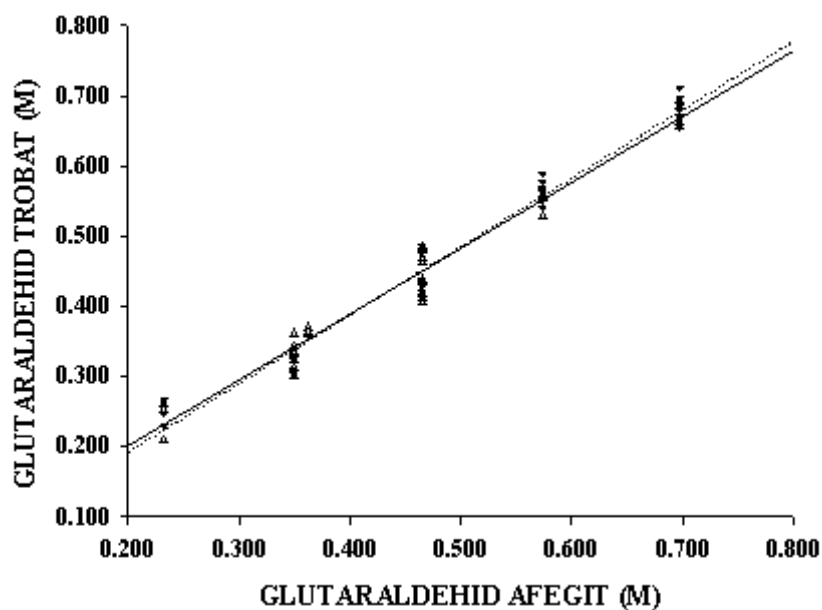


Figura 4.24. Concentració trobada a partir del model ANN-PCA (6,4,1) pel glutaraldehid, vers la afegida en mostres test set () i predicció externa ().

Taula 4.9. Paràmetres de la recta concentració ANN-PCA vers concentració realde glutaraldehid, per les mostres de calibració, test set i predicció externa. Intervals de confiança del 95%. Número de mostres: a = 106, b=35 i c = 32.

	Glutara ldehid		
	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient correlació, r
Calibració ^a	$(1\pm 2)\times 10^{-4}$	$0,98\pm 0,03$	0,98
Test set ^b	$(1\pm 3)\times 10^{-4}$	$0,94\pm 0,06$	0,98
Predicció ^c	$(0,2\pm 2)\times 10^{-4}$	$0,97\pm 0,05$	0,992

IV.5.2.2.3. Comparació dels mètodes de calibració emprats

Tal i com s'esperava d'un bon principi, en aquest treball s'ha comprovat que les ANN tenen una major capacitat pel tractament de les dades obtingudes de l'anàlisi cinètic, quan les reaccions que tenen lloc presenten un comportament marcadament no-lineal, i per tant, en aquests cas concret es prefereixen els models ANN-PC front als models PLS1. L'anterior afirmació s'ha pogut experimentar en la quantificació del glutaraldehyd, on la qualitat dels models construïts així com de les prediccions assolides, són força millors. En canvi, en la quantificació del formaldehyd i glioxal, els dos mètodes de calibració multivariable, han arribat a resultats pràcticament idèntics, cosa que s'atribueix al fet que no es possible millorar les prediccions per sota de la reproduïbilitat del mètode cinètic.

En l'actual sistema cinètic estudiat, la precisió obtinguda en les prediccions dels tres analits és força més pobre que en el mètode cinètic anterior, deguda la major influència de la variabilitat en les constant dels diferents processos involucrats, cosa que provoca que els resultats obtinguts en conjunt no siguin tant bons.

IV.5.2.3. ANÀLISI DELS DETERGENTS COMERCIALS

Seguint l'esquema utilitzat fins al moment, la darrera etapa del treball s'arriba en demostrar l'aplicabilitat del mètode cinètic posat a punt, en mostres que es troben al mercat. Així doncs, s'analitza un lot de detergent desinfectat Diesin® Normal, el qual no ha estat utilitzat en la construcció dels models de calibració. Aquest vegada però, no és possible l'anàlisi del detergent Diesin® Rapid, ja que com a conseqüència de les característiques tant extremes o peculiars del mètode cinètic actual, les quantitats dels diferents aldehids no poder ser contemplades en els nivells del disseny de calibració, per ser aquestes força més elevades.

A la taula 4.10 es mostra el contingut mig (en mg per 100 g de mostra), amb el seu interval de confiança, per l'aplicació dels models individuals ANN-PCA descrits anteriorment, així com del mètode cromatogràfic. Es pot apreciar que també en aquest cas, els valors són molt pròxims, podent afirmar que no existeixen diferències significatives entre els resultats obtinguts pels dos mètodes.

Taula 4.10. Contingut mig de formaldehid, glioxal i glutaraldehid (g/100g mostra) i el seu corresponent interval a $\alpha = 0,05$, obtingut mitjançant HPLC i els models ANN-PCA (n=9) pel mètode cinètic desenvolupat.

	DIESIN® NORMAL (0,7/1,8/0,4/100g) Glutaraldehid	
	ANN-PCR	HPLC
Formaldehid	0,69 ± 0,03	0,73 ± 0,03
Glioxal	1,77 ± 0,14	1,74 ± 0,11
Glutaraldehid	0,37 ± 0,04	0,40 ± 0,03

IV.5.3. CONCLUSIONS

S'ha posat a punt un mètode alternatiu d'anàlisi cinètic-espectrofotomètric per la quantificació simultània de formaldehid, glioxal i glutaraldehid, per tal de minimitzar al màxim la manipulació prèvia de la mostra. També en aquest mètode, s'utilitza la reacció amb MBTH, però ara la reacció segueix un mecanisme de pseudoprimer ordre respecte al reactiu. Això comporta que el mètode cinètic sigui més complicat de tractar, i ara la utilització de les ANN proporciona uns errors menors, demostrant la seva superioritat al PLS1 en el processament de les dades cinètiques registrades en aquest sistema concret.

Malgrat tot, els resultats assolits no són tant bons com els obtinguts pel mètode d'anàlisi anterior (pèrdua de precisió). Però tot i això, aquests nou mètode desenvolupat, resulta ser una alternativa molt vàlida per l'anàlisi de mesclades dels tres aldehids, i l'elecció d'un o altre mètode, vindrà determinada per les necessitats i/o prioritats de l'analista.

IV.6. CONCLUSIONS

Els dos mètodes proposats permeten resoldre la mescla dels tres analits amb una exactitud i precisió comparable al mètode HPLC.

El segon mètode, evita qualsevol manipulació prèvia de la mostra, encara que això produeixi una petita pèrdua de precisió. En aquest sentit, el incrementar la matriu de calibració amb mostres de producció permet modelar y corregir l'efecte de matriu d'una forma simple i eficaç.

La calibració PC-ANN ha demostrat una major capacitat de modelat que el PLS només en situacions d'elevada no-linealitat i poca contribució de l'analit al senyal de la mescla. En aquest sentit, s'ha de destacar que la capacitat predictiva del model ANN s'incrementa considerablement si prèviament es seleccionen les variables d'entrada, eliminant els PCs que no aporten informació sobre l'analit.

IV.7. REFERÈNCIES

- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M.; Villegas, N., *Analyst*, **121**, 395, 1996b .
- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; de la Pezuela, C., *Analyst*, **123**, 135R, 1998.
- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M.; Rodriguez, J.F., *Quim. Anal.*, **15**, 266, 1996a.
- British Pharmacopeia, 1993, HM Stationery Office, vol. 2, p. 931, London,, 1993.
- Bueldt, A.; Karst, U., *Anal. Chem.*, **69** (17), 3617, 1997.
- Carlson R., *Design and Optimization in Organic Synthesis*; p. 83, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- Cullen, T. F.; Crouch, S. R., *Mikrochim. Acta*, **126**, 1, 1997.
- Dahlgran, J. R.; Jameson, M. N, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71** (3), 560, 1988.
- Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, vol.13, Editors: Snell, F. D.; Ettore, L. S., p.108-109, Interscience Publishers, New York, 1971.
- Konnors, K. A., *Reaction Mechanisms in organic analytical chemistry*, p. 488-494, ed. John Wiley & Sons: New York, 1973.
- Lindahl, R.; Levin, J.O., *J. Chromatogr.*, **710**, 175, 1995.
- López-Cueto, G.; Ostra, M.; Ubide, C., *Anal. Chim. Acta*, **405**, 285, 2000.
- Menet, M.C.; Gueylard, D.; Fievet, M-H.; Thuillier, A., *J. Chromatogr. B*, **692**, 79, 1996.
- Ni, Y.; Liu, C., *Anal. Chim. Acta.*, **396**, 221, 1999.
- Papa, L.J.; Turner, L.P., *Journal of Chromatographic Science*, **10**, 747, 1972.
- Pérez-Bendito, D., *Analyst*, **115**, 689, 1990.
- Pötter, W.; Karst, U., *Anal. Chem.*, **68**, 3354, 1996.
- Riley, M. R.; Arnold, M. A.; Murhammer, D. W., *Appl. Spectrosc.*, **52**, 1338, 1998.
- Selim, S., *J. Chromatogr.*, **136**, 271, 1977.

Shriner, R. L.; Fuson, R. C.; Curtin, D. Y.; Morrill, T. C., The Systematic Identification of Organic Compounds, 6th ed.; Wiley: New York, 1980.

Zurek, G.; Karst, U., Anal. Chim. Acta., 351, 247, 1997.