



Figura 5.19. Cromatogrames d'una solució de GranadiSulfa (A), i una mescla que conté les quatre sulfonamides (B). L'ordre d'elució és: SDZ, SFT, SMRZ, SMTZ.

V.5. CONCLUSIONS

L'optimització de les condicions experimentals per aconseguir una adequada discriminació entre els senyals dels analits de cara a una resolució cinètico-espectrofotomètrica d'una mescla per mètodes de calibració multivariable és un tema complex el desenvolupament del qual està encara pendent de completar-se. La funció de resposta proposada és una forma simple d'abordar el problema, que encara que amb limitacions, pot ser una bona solució en molts casos.

Malgrat la complexitat del mecanisme cinètic, destaca la qualitat dels resultats obtinguts per PLS i nPLS. Tant a la capacitat predictiva com a la reproduïbilitat obtinguda per aplicació de PLS i nPLS és molt igual. És en la interpretació de los loadings on les possibilitats del nPLS es manifesten ser superiors, i per aquest motiu s'hauria de preferir front al PLS bilineal. No obstant això, el software comercial disponible actualment per la construcció de models PLS és molt superior, i un cop estudiat el sistema en detall es prefereix aquest per fer les prediccions d'altres mostres.

La potència del mètode proposat es veu ressaltada per la clara detecció de l'absència d'un analit previst en una mostra real. Les prediccions del mètode cinètic s'han vist completament corroborades per HPLC.

V.6. REFERÈNCIES

- Aguilar-Caballeros, M.P.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D., *Anal. Chim. Acta*, **354**, 173, 1997.
- Bro, R., *Multi-way calibration. Multi-linear PLS, J.Chemom.*, **10**, 47, 1996.
- Calvin Bratton, B.A.; Marshall, E.K., *J.Biol.Chem.*, **128**, 537, 1939.
- El-Kommos, M.E.; Emara, K.M., *Analyst*, 113, 133, 1988.
- Espinosa-Mansilla, A.; Salinas, F.; De Orbe Paya, I., *Fresenius' J.Anal.Chem.*, **354**(2), 245, 1996.
- Galeano Diaz, T.; Guiberteau Cabanillas, A.; Acedo Valenzuela, M.I.; Salinas, F., *Analyst*, **121**, 547, 1996.
- Goehl, T.J.; Mathur, L.K.; Strum, J.D.; Jaffe, J.M.; Pitlick, W.H.; Shah, V.P.; Poust, R.I.; Colaizzi, J., *J.Pharm. Sci.*, **67**, 404, 1978.
- Jen, J.F.; Lee, H.L.; Lee, B.N.; *J.Chromatogr. A*, **793**, 378, 1998.
- López Carreto, M.; Lunar, L.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D., *Anal. Chim. Acta*, **349**, 33, 1997.
- Mahedero, M.C.; Aaron, J.J., *Anal. Chim. Acta*, **269**, 193, 1992a.
- Mahedero, M.C.; Aaron, J.J., *Analisis*, **20**, 53, 1992b.
- Ng, C.L.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y., *J.Chromatogr.*, **632**, 165, 1993.
- Niessen, W. M. A., *J.Chromatogr. A*, **812**, 53, 1998.
- Nose, N.; Kobayashi, S.; Hirose, A.; Watanabe, A., *J.Chromatogr.*, **123**, 167, 1976.
- Perkins, J.R.; Games, D.E.; Startin, J.R.; Gilbert, J., *J.Chromatogr.*, **540**, 239, 1991.
- Poet, R.B.; Pu, H.H., *J.Pharm.Sci.*, **62** (5), 809, 1973.
- Porter, S., *Analyst*, **119**, 2753, 1994.
- Salinas, F.; Espinosa Mansilla, A.; Berzas Nevado, J.J., *Anal. Chim. Acta*, **233**, 289, 1990.
- Sánchez-Peña, M.; Muñoz de la Peña, A.; Salinas, F.; Mahedero, M.C., *Analyst*, **119**, 1177, 1994.
- Sánchez-Peña, M.; Acedo, M.J.; Salinas, F.; Mahedero, M.C.; Aaron, J.J., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **13**, 1107, 1995.

Sawicki, E.; Stanley, T.W.; Hauser, T.R.; Elbert, W.; Noe, J.L., *Anal. Chem.*, **33** (6), 722, 1961.

Sterling, J.M.; Haney, W.G., *J.Pharm.Sci.*, **63** (9), 1448, 1974.

Turczan, J., *J.Pharm.Sci.*, **57** (1), 142, 1968.

Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, part B*, pg 143, Elsevier, Amsterdam, 1998.

CONCLUSIONS I REFLEXIONS FINALS

Durant els darrers anys han augmentat de forma considerable l'aplicació de les tècniques de calibració multivariable sobre el tractament de les dades derivades del registre cinètic. Han estat importants les aportacions per demostrar el gran potencial analític de la simbiosi entre un registre multiparamètric d'un senyal cinètic i d'una calibració multivariable, que permet millorar de forma molt considerable l'exactitud i precisió dels mètodes cinètics convencionals, així com també per fer palès que els mètodes de calibració multivariable són mètodes d'aplicació de forma general que poden ser utilitzats en la majoria de les situacions. L'expressió de forma general, vol dir que són força independents del model cinètic i de l'existència de no-linealitats, fets que constitueix la principal limitació dels models de calibració utilitzats abans popularment en l'anàlisi cinètic diferencial. És difícil trobar les condicions experimentals òptimes que permetin una màxima discriminació del senyal proporcionat pels diferents analits si existeixen fortes limitacions en la naturalesa de les reaccions que poden ser utilitzades. A més, molts dels sistemes cinètics es troben subjectes a algun tipus de no-linealitat, la qual pot venir originada per diversos motius, tots ells força comuns. Per exemple, es freqüent no poder treballar en gran excés de reactiu, així com que hi hagi la presència no desitjada d'interacció entre analits.

Però cal remarcar que les contribucions en aquest camp, han estat assolides en moltes ocasions, a partir d'estudis teòrics/acadèmics basats en la simulació de sistemes cinètics.

Es per aquest motiu, que amb aquesta memòria es vol contribuir en el desenvolupament d'aquesta línia d'investigació, aplicant procediments cinètico-espectrofotomètrics diferencials d'anàlisi sobre sistemes

cinètics reals de naturalesa i complexitat molt variada. En tots els treballs s'han aplicat tècniques de calibració multivariables, pel tractament de les dades registrades.

De manera progressiva, s'han abordat sistemes de menys a més complexitat, tant pel que fa al nombre d'espècies que contribueixen al senyal analític, com per la naturalesa de les reaccions que tenen lloc.

Els resultats obtinguts són bons, la qual cosa el treball realitzat crec que pot contribuir en el procés de reactivació progressiva d'aquests mètodes cinètics per la resolució de mescles i obre la porta a abordar problemes de la indústria.

Les conclusions generals que poden extreure's d'aquesta memòria són les següents;

1. S'ha demostrat el gran potencial analític de la simbiosi entre un registre multiparamètric d'un senyal cinètic i d'una calibració multivariable que millora considerablement els resultats obtinguts pels procediments cinètics convencionals.
2. Aquestes tècniques permeten la quantificació d'un analit en presència d'un altre compost que reacciona més lentament, la resolució de mescles inclús en presència de reaccions creuades, així com de sistemes en què el reactiu es troba en considerable defecte ja sigui per la seva insolubilitat o bé perquè es descompongui en una reacció paral·lela.
3. El PLS es mostra com un procediment general de calibració, utilitzable en quasi totes les possibles situacions. Tan sols en un cas, component minoritari i en condicions de pseudoprimer ordre respecte el reactiu, s'ha vist que el PLS és incapaç de modelar-ho correctament. En aquest cas el sistema pot resoldre's mitjançant una calibració amb ANN.
4. En las ANN es poden utilitzar dos tipus de variables d'entrada, els scores d'un model PCA/PLS i les variables originals. El primer és un sistema més general, que contempla tota la informació enregistrada, però en determinades situacions pot ser més simple la utilització d'unes poques variables originals ben escollides.

5. La construcció d'un model ANN és bastant laboriosa ja que s'ha d'optimitzar un nombre elevat de paràmetres i que a més requereix d'un nombre elevat mostres. Per tant la utilització d'aquesta tècnica de calibració tant sols es justifica quan la precisió obtinguda amb un model PLS és significativament pitjor a la reproduïbilitat intrínseca del procediment analític, clara indicació que el PLS no es capaç de modelar les no-linealitats presents.
6. S'ha vist que la capacitat predictiva dels models nPLS és equivalent a l'obtinguda amb el PLS bilineal. Però al tractar independentment el mode cinètic i espectral, es facilita la interpretació dels corresponents dos loadings i per tant la interpretació dels fenòmens físico-químics que tenen lloc en la reacció. Malgrat tot, aquesta interpretació de moment és de tipus qualitatiu i es troba dificultada quan els models són molt no-lineals. Per altra banda, el software comercial dels models PLS bilineals són actualment molt superiors als dels nPLS, aportant un conjunt d'eines que faciliten la construcció i optimització del model.
7. L'optimització de les condicions experimentals té com a objectiu assolir la situació de màxima discriminació cinètico-espectral entre els components a quantificar. L'índex de discriminació proposat és un paràmetre simple i fàcil d'estimar, que pot ser emprat com a funció objectiu en la optimització del sistema a partir d'un adequat disseny experimental.
8. L'ús de la primera derivada del espectre augmenta lleugerament la discriminació espectral i redueix l'efecte que sobre el desplaçament de l'espectre produeix la formació d'un precipitat, o el desprendiments de gasos en el si de la reacció.
9. Un adequat disseny del conjunt de calibració, permet tant la correcta quantificació dels analits com detectar l'absència d'un dels compostos amb un elevat grau de fiabilitat.
10. L'elevada selectivitat de les reaccions utilitzades, a permès la quantificació dels analits en mostres comercials a partir de models de calibració obtinguts utilitzant mescles pures dels analits. La presència d'elevades concentracions d'espècies interferent o efectes de matriu, pot ser corregida a partir de la utilització de models mixtos de calibració formats per mostres de laboratori, les quals modelen la variació del senyal en funció de la concentració d'analit, i mostres reals que permeten modelar les interaccions existents.

LLISTAT D'ABREVIATURES I SÍMBOLS

X	Matriu de dades espectroscòpiques bidimensional
<u>X</u>	Matriu de dades espectroscòpiques tridimensional
<i>m</i>	Número de mostres
<i>m_c</i>	Número de mostres de calibració
<i>m_p</i>	Número de mostres de predicció
<i>k</i>	Número de variables espectroscòpiques/mesures experimentals/longituds d'ona <i>k</i>
<i>t</i>	<i>Número de variables de temps</i>
<i>x_{ik}</i>	Element de la matriu X per la variable <i>k</i> de la mostra <i>i</i>
Y	Matriu de les variables dependents/concentracions bidimensional
<i>p</i>	Número d'analits/espècies <i>j</i> o de variables en la matriu de concentracions Y
<i>y_{ij}</i>	Concentració calculada (variable dependent) de l'analit <i>j</i> a la mostra <i>i</i>
<i>y_{ij}</i>	Concentració real o experimental de l'analit <i>j</i> a la mostra <i>i</i>
<i>f_{ij}</i>	Residual de la concentració de l'analit <i>j</i> a la mostra <i>i</i>
<i>c</i>	Concentració mitja del conjunt de mostres <i>m</i>
PRESS	Sumatori del quadrat dels residuals
MSEP	Valor mig del sumatori del quadrat dels residuals de predicció
MSECV	Valor mig del sumatori del quadrat dels residuals per <i>VALIDACIÓ creuada</i>
RMSEP	Arrel quadrada del valor mig del sumatori del quadrat dels residuals de predicció
RSEP	Error quadràtic relatiu estàndard de predicció
<i>s_R</i>	Desviació estàndard
R	Reproduïbilitat límit
ARSD	Desviació estàndard relativa mitja
ARSDBR	Desviació estàndard relativa mitja entre replicats
MC	Calibració Multivariable
PCA	Anàlisi en Components Principals
ILS	Regressió Lineal Múltiple Inversa
PCR	Regressió en Components Principals
PLS	Regressió Parcial per Mínims Quadrats
PLS1	Regressió Parcial per Mínims Quadrats amb una variable dependent
PLS2	Regressió Parcial per Mínims Quadrats amb varies variable dependent

nPLS	Regressió Parcial per Mínims Quadrats Multi Via
PC/PCs	Component/s principal/s
a	Número de PC/factors òptims (on $a < k$).
T	Matriu de scores per la matriu de dades X
U	Matriu de scores per la matriu de la propietat a determinar Y
P	Matriu de loadings per la matriu de dades X
Q	Matriu de loadings per la matriu de la propietat a determinar Y
E	Matriu de residuals per la matriu de dades X
F	Matriu de residuals per la matriu de la propietat a determinar Y
B	Matriu de regressors
W	Matriu de loadings per la matriu de dades X (nPLS); W^T i W^W
Q	Matriu de loadings per la matriu de la propietat a determinar Y (nPLS); Q^L i Q^P
ANN	Xarxes Neuronals Artificials
MLP	Xarxes neuronals multi-capes perceptró
h_i	Número de neurones de la capa oculta i
O	Matriu de sortida d'una xarxa neuronal artificial
o_{ij}	Element de la matriu O per l'anàlisi j a la mostra i d'una xarxa neuronal artificial
	Constant de proporcionalitat anomenada <i>learning rate</i> o velocitat d'aprenentatge
	Constant de correcció (funció d'error)
	Moment
k	Constant de proporcionalitat, anomenada constant cinètica de velocitat
k_{ap}/k'_A	Constant de velocitat aparent de l'espècie A
S	Propietat física funció de la concentració d'una espècie
S_0/S_t	Propietat física/ senyal al començament de la reacció / a un temps t
MBTH	3-metil-2-benzotiazolona hidrazona
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazona
INH	àcid isonicotínic hidrazina o isoniàcid
SFT	Sulfatiazol
SDZ	Sulfadiazina
SMRZ	Sulfamerazina
SMTZ	Sulfametazina