

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TRATAMIENTO NUMÉRICO DE LOS DATOS EN EL
ANÁLISIS CUANTITATIVO POR ESPECTROMETRÍA
VIBRACIONAL

JAVIER MOROS PORTOLÉS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Santiago Maspoch Andrés
- D. Jesús Sanz Asensio
- D. Edmondo Pramauro
- D. Antonio Molina Díaz
- D^a. María Luisa Cervera Sanz

Va ser dirigida per:

D. Salvador Garrigues Mateo

D. Miguel de la Guardia Cirugeda

©Copyright: Servei de Publicacions
Javier Moros Portolés

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6826-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA  Facultat de Química

Departamento de Química Analítica

**TRATAMIENTO NUMÉRICO DE LOS DATOS
EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO
POR ESPECTROMETRÍA VIBRACIONAL**

Tesis Doctoral
Javier Moros Portolés
Valencia, 2007

*Tratamiento numérico de los datos en el análisis
cuantitativo por espectrometría vibracional.*

Tesis Doctoral



VNIVERSITATIS VALÈNCIA



**TRATAMIENTO NUMÉRICO DE LOS DATOS
EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO
POR ESPECTROMETRÍA VIBRACIONAL**

Memoria presentada por
Javier Moros Portolés
para conseguir el grado de
Doctor en Química
Valencia, 2007



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (Q*) Facultat de Química

Universitat de Valencia
Departamento de Química Analítica
Campus de Burjassot
46100 Burjassot, Valencia, España

El **Dr. D. MIGUEL DE LA GUARDIA CIRUGEDA**, Catedrático de Universidad y el **Dr. D. SALVADOR GARRIGUES MATEO**, Catedrático de Universidad, del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València (Estudi General),

CERTIFICAN

Que **D. Javier Moros Portolés** ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada "**Tratamiento numérico de los datos en el análisis cuantitativo por espectrometría vibracional**" bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, Diciembre de 2006.

Dr. D. Miguel de la Guardia Cirugeda

Dr. D. Salvador Garrigues Mateo

Índice de impacto de las publicaciones

El FACTOR de IMPACTO es una medida de la importancia de las revistas científicas. Así pues, el factor de impacto para cada una de las distintas revistas científicas en las cuales se han publicado los diferentes trabajos que componen la presente Memoria de Tesis son: **2.760** para *Analytica Chimica acta*, **2.695** para *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2.391** para *Talanta* y **1.889** para *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

AGRADECIMIENTOS

"Es de bien nacidos, ser agradecidos"

No cabe duda de que una tesis es uno de los puntos culminantes en el mundo académico; sin embargo, también es cierto que no deja de ser un eslabón más en la cadena de una vida. Por ello, a pesar de que uno no sabe como recompensar a todas las personas que le han ayudado en tan ardua tarea, apoyándole con su valiosa cooperación y ayuda; y moralmente, animándole y alentándole a seguir, desde estas líneas (a pesar de que las cosas se agradecen con hechos más que con palabras) pretendo expresar mi gratitud, a todas las muchas personas (intentando no olvidar a ninguna) que durante estos años han estado a mi lado, no sólo por el apoyo que me han prestado de forma desinteresada sino también por la confianza que en mi han depositado.

Me gustaría, en primer lugar, dar las gracias a mis directores, Salvador Garrigues Mateo y Miguel de la Guardia Cirugeda por su disponibilidad para enseñarme a aprender, por la aportación de su tiempo en aclarar mis dudas científicas y por sus observaciones críticas a la par que constructivas que me han permitido crecer intelectualmente.

También agradecer al resto de los profesores del Grupo de Investigación, Marisa Cervera, Ángel Morales y Agustín Pastor, su acogida y apoyo recibido durante mi estancia en el departamento. Gracias de corazón por hacerme un pequeño sitio dentro de este departamento que ya considero mi casa.

Al profesor Fernando Iñón (NANO), gracias por la amistad brindada, por el asesoramiento científico, así como por las sugerencias y contribuciones que para el desarrollo de este trabajo ha realizado.

A los profesores Soufiane Tahiri y Mohammad R. Khanmohammadi por sus aportaciones científicas a esta Memoria.

Mi agradecimiento, de corazón, a mis amigos de laboratorio Sergio, Paco, Guillermo, Bela, Eva y Josep, porque los buenos amigos son difíciles de encontrar, más difíciles de dejar e imposibles de olvidar y este es un buen momento para hacer memoria, para recordar los buenos ratos que hemos pasado juntos, compartiendo alegrías, salidas y aun dificultades.

En especial a mis padres, imprescindibles...sin ninguna duda, por su paciencia infinita para soportarme.

Gracias a mi hermano Vicente y a mi familia que estuvo a mi lado para ayudarme sin pedirme nada a cambio, escuchándome y alentándome.

A todos mis amigos (muchos, por suerte, como para poder nombrar uno a uno, y con quienes estoy en deuda) les agradezco su valiosa amistad y su desinteresado apoyo y espero poder recompensarles, en un futuro, el tiempo que haya podido robarles.

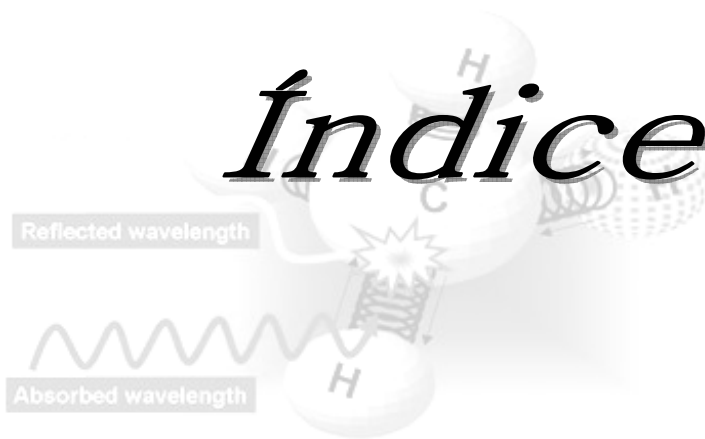
En definitiva, gracias a todas aquellas personas que, aunque sólo sea por curiosidad, se hayan detenido a leer estas líneas, porque, tal vez, ello significa que les preocupa saber si a ellas también las considero especiales.

A todos aquellos que creyeron que llegaría hasta aquí...

En último lugar, pero no por ello menos relevante, agradecer la financiación recibida del proyecto de la Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana Re. GV04B/247, de los proyectos I+D de la Oficina de Ciència i Tecnologia de la Conselleria d' Innovació i Competitivitat de la Generalitat Valenciana Re. GV01/249 y Grupos 03-118, de los proyectos CTQ2005-05604/BQU y FEDER del Ministerio de Educación y Ciencia, del proyecto UV-AE-20050203 de la Universitat de València y la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), que ha contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Solo los tontos han creado progresos en el mundo, porque los listos se han adaptado a lo que había sin necesidad de inventar.
(G. B. Shaw)

Índice



Índice

Objetivos	1
Introducción	6
1 La espectroscopía infrarroja	7
1.1 Consideraciones generales	7
1.2 Tipos de espectrometrías en la región infrarroja	10
1.2.1 Espectrometría de absorción (transmisión)	11
1.2.2 Espectrometría de Reflexión	12
- Espectrometría de reflexión especular	13
- Espectrometría de reflexión total atenuada (ATR)	13
- Espectrometría de reflexión difusa	15
2 Quimiometría	20
2.1 Consideraciones generales	20
2.2 La calibración	24
2.3 Etapas para construir un modelo de calibración	26
2.3.1 Selección del conjunto de calibración	26
2.3.2 Obtención de la señal analítica	27
2.3.3 Construcción del modelo	27
2.3.4 Evaluación de la capacidad predictiva del modelo	28
2.3.5 Aplicación del modelo	30
2.4 Tratamientos espectrales	30
2.4.1 Suavizado espectral (<i>smooth</i>)	30
2.4.2 Corrección de línea base	31
2.4.3 Espectroscopia derivada	33
2.4.4 Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC, <i>Multiplicative Scatter Correction</i>)	35
2.4.5 Variable normal estándar (SNV, <i>Standard Normal Variate</i>) y <i>De-trending</i>	36
2.5 Modelos de calibración	38
2.5.1 Métodos de predicción cualitativos	38
2.5.1.1 Métodos supervisados de análisis	39
2.5.1.2 Métodos no supervisados de análisis	40
Análisis de conglomerados (<i>cluster analysis</i>)	40
Análisis en componentes principales (PCA)	48

2.5.2 Métodos cuantitativos de análisis en la espectroscopia infrarroja	62
2.5.2.1 Modelos para la calibración univariante	63
2.5.2.2 Modelos para la calibración múltiple y multivariante (primer orden)	65
- Regresión lineal múltiple	66
- Modelos de calibración multivariante basados en reducción de variables	67
A- Regresión en componentes principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>)	68
B- Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR, <i>Partial Least Squares Regression</i>)	70
- Redes neuronales artificiales (RNA)	76
2.5.2.3 Métodos quimiométricos multivía	88
Resultados	94
Resumen	95
A. Obtención de la información analítica	98
B. Tratamiento de los objetos de análisis	100
C. Selección de las condiciones instrumentales de medida	104
D. Etapas para la elaboración del modelo de calibración	110
Diseño del conjunto de Calibración	110
Construcción de los modelos de calibración	114
- a) Empleo de la calibración de orden cero para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional	115
- b) Empleo de la calibración de primer orden para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional	118
- c) Empleo de la calibración de segundo orden para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional	125
E. Validación del modelo de calibración establecido	128
Capítulos	135
Capítulo 1. Calibración de orden cero	138
- <i>Quality control Fourier transform infrared determination of diazepam in pharmaceuticals</i>	139
- <i>Near infrared determination of diuron in pesticide formulations</i>	146
- <i>Quality control of metamitron in agrochemicals using Fourier transform infrared spectroscopy in the middle and near range</i>	153

- <i>Univariate near infrared methods for determination of pesticides in agrochemicals</i>	160
- <i>First-derivative FT-IR spectrometric determination of oxadiazon in commercial herbicide formulations</i>	169
Capítulo 2. Calibración de primer orden	178
- <i>Partial least-squares near-infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by using tanned solid wastes</i>	179
- <i>Comparison of two partial least squares infrared spectrometric methods for the quality control of pediculosis lotions</i>	185
- <i>Comparison of Two Vibrational Procedures For The Direct Determination Of Mancozeb in Agrochemicals</i>	193
- <i>Determination of the Energetic Value Of Fruit and Milk-Based Beverages Through Partial-Least-Squares Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry</i>	202
- <i>Evaluation of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry and Chemometrics for the Determination of Nutritional Parameters of Yogurt Samples</i>	216
- <i>Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy and Neural Networks for Measuring Nutritional Parameters in Chocolate Samples</i>	225
Capítulo 3. Calibración de segundo orden	234
- <i>Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis</i>	235
Conclusiones	246
Referencias bibliográficas	254



Objetivos

Aún cuando no lo consideremos así, el análisis químico es parte de nuestra vida diaria puesto que todo lo que comemos, utilizamos o manejamos, ha sido o debería haber sido analizado en algún momento.

El aumento en la exigencia de los consumidores, así como el hecho de que la calidad sea una condición prácticamente imprescindible para poder actuar en un mercado cada vez más global y competitivo, ha desembocado en un gran interés por parte de las industrias en el desarrollo de métodos de análisis que generen gran cantidad de información de calidad y en un tiempo lo más reducido posible.

Pese a que en la actualidad los principales procedimientos establecidos para llevar a cabo las distintas determinaciones cuantitativas son métodos normalizados por organismos oficiales, que se basan fundamentalmente en técnicas separativas, como la cromatografía líquida o gaseosa, acopladas a distintos tipos de detectores, y caracterizadas por su selectividad y alta sensibilidad, el desarrollo de métodos analíticos basados en la combinación de técnicas espectroscópicas y métodos quimiométricos se está convirtiendo en una práctica rutinaria en los laboratorios que desarrollan y optimizan métodos analíticos para el control de calidad de productos.

Esto ha provocado que dichos métodos hayan derivado en una tecnología ideal para análisis rápidos y sencillos de una inmensa variedad de productos en cualquiera de las etapas de su proceso de fabricación; pudiendo ser empleados para la evaluación de la calidad de la materia prima, para el análisis de los ingredientes empleados en la formulación de dicho producto y, finalmente, para la verificación de la calidad del producto final.

Aunque el empleo en el análisis de las metodologías espectroscópicas no es excesivamente complejo, dado que los instrumentos son fáciles de operar y generalmente no requieren de una manipulación intensiva de las muestras, la cantidad de datos analíticos que proporciona la aplicación de estas técnicas resulta tremendamente elevada. En consecuencia, el análisis de dichos datos para extraer de ellos la mayor cantidad posible de información y con un rigor exigible a todo planteamiento científico, requiere del auxilio de modelos estadísticos, en ocasiones sofisticados, que a menudo exigen usar potentes mecanismos de cálculo.

Ante estas premisas, el objetivo principal de la presente Memoria de Tesis es mostrar los diversos tratamientos que pueden llevarse a cabo sobre las señales obtenidas mediante el empleo de la espectroscopia infrarroja, basándonos para ello en la combinación de diferentes tipos de técnicas espectroscópicas con los métodos quimiométricos de análisis, para, de este modo, extraer la mayor cantidad posible de información y extender el conocimiento del sistema químico.

Con el fin de conseguir asegurar la calidad analítica mediante la combinación de distintas señales moleculares y su tratamiento quimiométrico como objetivo general, ha sido necesario plantear una serie de objetivos básicos tales como:

1.- Establecer la técnica espectroscópica más adecuada, atendiendo al tipo de objeto sobre el que se pretende llevar a cabo el análisis, que permita obtener la máxima información analítica posible con el mínimo esfuerzo, a través del estudio de los diferentes fenómenos que puede experimentar la radiación infrarroja al incidir en la muestra, mostrando así la flexibilidad y versatilidad de la espectroscopía infrarroja en sus distintas regiones del espectro electromagnético.

2.- Desarrollar y aplicar los métodos quimiométricos de análisis adecuados que permitan la extracción de toda la información relevante contenida en los datos analíticos obtenidos empleando la espectrometría vibracional.

Para la determinación de propiedades o parámetros en objetos de análisis desconocidos, ya sea de forma cualitativa o de manera cuantitativa, será necesario desarrollar un modelado adecuado del conjunto de datos analíticos estableciendo y ejecutando de forma adecuada una serie de etapas:

a) Selección de un conjunto de calibración apropiado. Puede considerarse como una de las etapas más críticas y decisivas para establecer el modelo de calibración, puesto que de ello depende la obtención de una buena capacidad predictiva del mismo.

El conjunto de calibración debe contener un número adecuado de muestras que represente toda la variabilidad tanto química como física

que pueda estar incluida en el desarrollo del análisis.

Una sobredimensión del conjunto de calibración implicaría, en negativo, un mayor consumo de tiempo y esfuerzo analítico que, en muchos casos no se ve compensado con los resultados que puedan obtenerse.

Para el caso en el que se disponga de estándares comerciales, se llevará a cabo la preparación del conjunto de calibración de manera que resulte representativo de todo el intervalo del parámetro que se pretende determinar.

Por el contrario, en el supuesto que no se disponga de dichos estándares, el conjunto de calibración se establecerá mediante la selección previa de un subconjunto de los mismos objetos destinados al análisis, de forma que se incorpore toda la posible variabilidad que pueda darse dentro de la totalidad de los objetos.

- b) Construcción del modelo de calibración adecuado.** Para desarrollar esta etapa se buscará la relación más sencilla que se pueda establecer, en las condiciones específicas, entre las distintas respuestas instrumentales obtenidas y la propiedad de interés que se pretenda evaluar, empleando algún soporte teórico o bien los pertinentes algoritmos matemáticos.

Para establecer los modelos más apropiados, se contemplará la importancia de aplicar, en ocasiones, posibles tratamientos matemáticos previos, a fin de corregir el efecto de los componentes ajenos a la información buscada, tratando en todo momento de mejorar características analíticas de especial relevancia como son la exactitud y la precisión de los resultados, así como la sensibilidad, la simplicidad y la rapidez del método.

- c) Validación del modelo.** Esta etapa consistirá en aplicar el modelo establecido a un determinado conjunto limitado de muestras conocidas, externas al conjunto de calibración, para posteriormente

comparar si los resultados así obtenidos resultan estadísticamente comparables con los valores obtenidos a través de diferentes procedimientos como son i) la aplicación de una metodología de referencia publicada o desarrollada previamente, ii) a partir de la información proporcionada por el fabricante del producto, o iii) recurriendo al estudio de recuperaciones en el análisis de muestras enriquecidas. A través de esta etapa se intentará garantizar no sólo la ausencia de errores en la metodología desarrollada sino que además se evaluarán los distintos indicadores de la calidad del procedimiento desarrollado verificando su utilidad para la predicción de la propiedad buscada en muestras desconocidas.

d) Aplicación del modelo. En esta etapa, el modelo se aplicará sobre objetos que poseen un valor desconocido de la propiedad que se pretende evaluar. Los resultados obtenidos mediante la aplicación del modelo se compararán entonces con los valores obtenidos para el análisis de estos mismos objetos empleando una metodología de referencia. En definitiva, esta fase puede ser considerada como una segunda comprobación de la capacidad de predicción del modelo.

3.- En línea con la política de reducción del uso de disolventes orgánicos y de los desechos analíticos en la que está inmersa nuestro grupo de investigación, se buscará desarrollar metodologías basadas en la espectroscopia infrarroja que resulten lo más medioambientalmente sostenible posible, minimizando así la cantidad de reactivos consumidos y de desechos generados y contribuyendo al desarrollo de una Química Analítica "limpia".



Introducción

1 La espectroscopia infrarroja

1.1 Consideraciones generales

La espectroscopia es una técnica analítica experimental basada en la detección de la emisión, absorción y/o reflexión de radiación electromagnética de ciertas energías, y la relación de las mismas con los niveles de energía implicados en la transición cuántica, pudiéndose llevar a cabo, de esta forma, análisis cualitativos o cuantitativos de una enorme variedad de sustancias ¹.

La espectroscopia infrarroja se basa en las distintas interacciones de la materia con la radiación infrarroja a las que dan lugar los distintos grupos funcionales que pueden presentar las diferentes moléculas.

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético se encuentra situada entre 10 cm^{-1} y 12800 cm^{-1} tal y como se aprecia en la Figura 1.

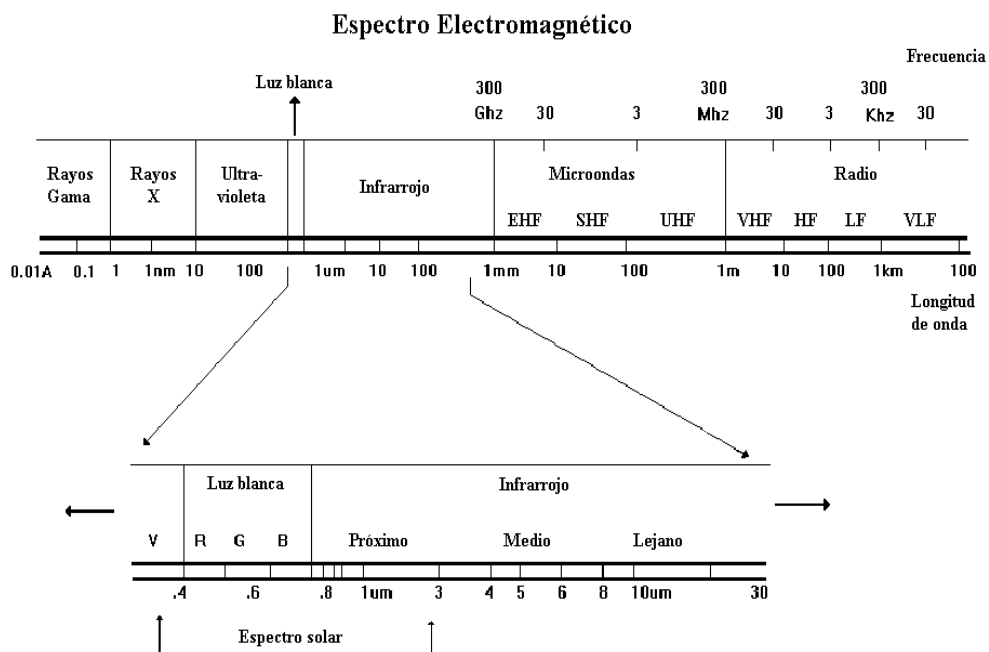


Figura 1. Distribución del espectro de ondas electromagnéticas.

La energía de los fotones IR resulta del mismo orden que las diferencias energéticas entre los estados vibracionales cuantificados de las moléculas. Así pues, la radiación IR puede llegar a inducir transiciones entre estos estados vibracionales si durante dicho movimiento vibracional tiene lugar un cambio en el momento dipolar eléctrico de la molécula.

Por esto, la espectroscopia infrarroja es el estudio de la interacción de la radiación infrarroja con la materia en función de la frecuencia del fotón. Esta interacción puede tomarse en forma de absorción, emisión o reflexión, de manera que permite considerar la espectroscopia IR como una técnica analítica fundamental para obtener información tanto cualitativa (posición de las bandas de absorción) como cuantitativa (intensidad de las bandas de absorción) sobre una sustancia en estado sólido, líquido o gaseoso ².

Es conveniente, tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, dividir la región infrarroja del espectro electromagnético en tres regiones tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Región		λ (cm)	ν (cm ⁻¹)
IR-cercano	NIR	$2.5 \cdot 10^{-4} - 7.8 \cdot 10^{-5}$	4000 – 12800
IR-medio	MIR	$5 \cdot 10^{-3} - 2.5 \cdot 10^{-4}$	200 – 4000
IR-lejano	FIR	$0.1 - 5 \cdot 10^{-3}$	10 - 200

Tabla 1. División de la región infrarroja del espectro electromagnético.

De esta manera, en función del diferente carácter de las transiciones implicadas en cada caso, cada parte del espectro juega un papel diferente en el análisis ^{3,4}.

La radiación en el IR-medio corresponde a transiciones fundamentales en las cuales un modo de vibración se excita desde su estado más bajo en energía hasta el primer estado excitado que posee. Es por ello que para un análisis de rutina se toma normalmente el espectro desde 600 cm⁻¹ hasta 4000 cm⁻¹. Hasta principios de los años ochenta, la instrumentación empleada para esta región era fundamentalmente de tipo dispersivo por lo que el MIR se utilizaba en mayor

medida para el análisis orgánico cualitativo y la determinación estructural, basándose en los espectros de absorción. Sin embargo, desde ese momento, con la aparición de la instrumentación de tipo transformada de Fourier, hasta la actualidad se ha producido un aumento notable no solo en el número sino también en el tipo de aplicaciones desarrolladas, y la espectrometría en esta región se ha empleado en el análisis cuantitativo de muestras complejas mediante la espectroscopia de absorción y reflexión.

Este incremento en las posibilidades y la flexibilidad de la espectroscopia en el MIR radica en el aumento de la relación señal/ruido, y en la mejora de los límites de detección, así como la velocidad de adquisición de los espectros que permite alcanzar la instrumentación interferométrica frente a los instrumentos dispersivos convencionales ².

La espectroscopia en el IR-cercano surge de las transiciones en las que el fotón excita un modo normal de vibración desde su estado más fundamental a un segundo estado vibracional excitado o uno superior (sobretonos) o de las transiciones en las que un fotón simultáneamente excita dos o más modos de vibración (bandas de combinación) ^{5, 6, 7}. Las medidas en esta región se realizan con fotómetros y espectrofotómetros similares a los empleados en la espectrometría ultravioleta/visible. El empleo de dicha espectroscopia, tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo, se ha visto incrementado debido a la mejora en la instrumentación, así como el desarrollo y la introducción de técnicas quimiométricas. Las aplicaciones más importantes de esta región espectral se encuentran en el análisis cuantitativo de materiales industriales y agrícolas y en los procesos de control ⁸.

Por último, la región lejana del espectro IR resulta especialmente útil en los estudios sobre compuestos inorgánicos ya que la absorción causada por las vibraciones de extensión y flexión de los enlaces entre átomos metálicos y ligandos inorgánicos u orgánicos, así como las vibraciones de red en sólidos cristalinos, se producen por lo general a frecuencias menores de 600 cm^{-1} ($>17\mu\text{m}$). Los estudios en el infrarrojo lejano de sólidos inorgánicos han proporcionado también información útil acerca de las energías de los retículos cristalinos y la energía de transición de los materiales semiconductores.

No obstante, pese a resultar potencialmente bastante útil, el hecho de haber estado limitada en el pasado como consecuencia de dificultades experimentales ha provocado que su empleo en análisis no resulte demasiado común⁹.

1.2 Tipos de espectrometría en la región infrarroja

Toda las especies moleculares, orgánicas e inorgánicas, absorben en la región del infrarrojo; de esta forma, la espectrofotometría infrarroja ofrece la posibilidad de determinar un número extraordinariamente elevado de sustancias. Además, la singularidad del espectro infrarrojo conduce a un grado de especificidad que es igualado o superado por relativamente pocos métodos analíticos.

Cuando la radiación infrarroja incide sobre la muestra, aquella puede sufrir diferentes fenómenos, tales como absorción, transmisión y reflexión. Así pues, existen diferentes modos de medida disponibles para obtener el espectro de infrarrojo de una gran variedad de tipos de muestras.

La técnica más adecuada para emplear sobre cada tipo de muestra depende de una serie de factores. De entre todos ellos, la forma física de la muestra podría considerarse uno de los más relevantes, sin embargo no pueden descuidarse otros como la información que se pretende obtener o la cantidad de tiempo que se está dispuesto a emplear.

Si bien es verdad que la medida más común en el infrarrojo es la que se basa en el fenómeno de la absorción (o intensidad de radiación transmitida) también se han desarrollado espectroscopias basadas en el fenómeno de la reflexión, como son la reflectancia total atenuada y la reflectancia difusa¹⁰, ésta última, de especial importancia en el infrarrojo cercano.

A continuación procederemos a realizar una breve descripción de estas técnicas, que son las que se han utilizado en el desarrollo de la presente Memoria de Tesis.

1.2.1 Espectrometría de absorción (transmisión)

La absorción es el efecto más significativo que tiene lugar cuando la radiación incide sobre el objeto que está siendo analizado. Sin embargo, éste no es el único fenómeno que puede observarse. Parte de la radiación incidente puede ser reflejada, dependiendo de la especie absorbente o de las diferencias entre el índice de refracción del medio donde la radiación se propaga y del medio que está siendo analizado, al mismo tiempo que otra parte puede simplemente ser dispersada, en el caso de que el medio no sea transparente y homogéneo. En consecuencia, la intensidad del haz medido después de atravesar la muestra resulta menor que la intensidad inicial ¹¹.

En estudios cuantitativos involucrando absorción de radiación, se necesita una medida experimental que pueda caracterizar la cantidad de radiación electromagnética absorbida por una muestra.

Entre las primeras investigaciones sobre la relación existente entre las intensidades de radiación incidente y transmitida, se destacan los experimentos de Pierre Bouguer (1729) y de Johann Heindrich Lambert (1760) y Beer (1852), quienes efectuaron observaciones independientes y verificaron que las propiedades asociadas al proceso de absorción de luz pueden enunciarse de acuerdo con la siguiente ley:

$$A = \epsilon l c \quad (1)$$

donde ϵ es el coeficiente de absortividad molar del analito para la longitud de onda a la que se está midiendo, l es la longitud del camino óptico y c la concentración del analito.

Esta espectroscopia, aunque puede emplearse para el análisis de muestras en cualquier estado físico, ha desarrollado su mayor número de aplicaciones para el análisis de muestras en estado líquido, empleando celdas de líquidos (Figura 2) que suelen presentar caminos ópticos cortos, constantes y reproducibles y que están dotadas de dos ventanas construidas con materiales resistentes a los solventes comúnmente empleados y transparentes a la radiación espectral correspondiente.

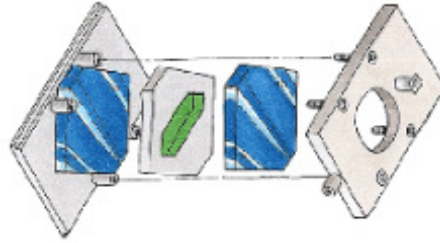


Figura 2. Ejemplo de celda de líquidos.

1.2.2 Espectrometría de Reflexión ^{12, 13}

La mayoría de los materiales absorben radiación infrarroja de forma muy intensa. Es por esto que para el análisis de muestras sólidas empleando la técnica de transmisión, éstas deben prepararse en forma de películas delgadas o diluidas en matrices no absorbentes con el fin de poder adquirir su correspondiente espectro.

Esta limitación, sin embargo, no existe en el caso de adquirir el espectro mediante la técnica de reflexión, por lo que ésta puede considerarse como una técnica más versátil para obtener, en estos casos, información espectroscópica.

La espectroscopia de reflexión en el infrarrojo ha encontrado varias aplicaciones, particularmente en el caso de muestras sólidas difíciles de manipular, como películas de polímeros y fibras, alimentos, gomas, productos agrícolas y muchos otros. Aunque no resultan idénticos a los correspondientes espectros de absorción, los espectros de reflexión en el infrarrojo medio son de una apariencia similar y proporcionan la misma información que sus equivalentes de absorción ¹.

Por otro lado, la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano se ha convertido en la herramienta más importante para la determinación cuantitativa rutinaria de los componentes de sólidos finamente divididos, siendo el uso más extendido de dicha técnica la determinación de proteínas, humedad, almidón, aceites, lípidos y celulosa en productos agrícolas tales como granos y semillas oleaginosas ^{14, 15}.

La reflexión de la radiación es de tres tipos: reflexión especular, reflexión interna o reflexión total atenuada (ATR) y reflexión difusa.

Espectrometría de reflexión especular

En esta técnica, también conocida con el nombre de reflexión externa, la radiación infrarroja se hace incidir sobre la superficie de una muestra, sufriendo una simple reflexión sobre dicha superficie, similar a la reflexión de la luz visible sobre un espejo ¹⁶.

La reflexión especular se observa cuando el medio reflectante es una superficie uniformemente pulida. En este caso, el ángulo de reflexión resulta idéntico al ángulo de incidencia de la radiación.

Si la superficie contiene una sustancia capaz de absorber radiación del infrarrojo, la intensidad relativa de la reflexión es menor en aquellas longitudes de onda en las que se ha producido la absorción. Por ello, al representar la reflectancia (fracción de la potencia radiante incidente que se refleja) frente al número de onda, se obtiene un espectro similar en su aspecto general al de transmisión.

La reflectancia externa fue analizada teóricamente como una técnica espectroscópica para películas en superficies reflectantes por Francis y Ellison en 1959 ¹⁷.

Pese a que se desarrollaron algunas aplicaciones a mediados de los años 60, y encontró un uso mucho más amplio en la década de los 70 cuando los accesorios llegaron a ser más accesibles, no se utiliza tanto como el resto de las espectroscopias de reflexión.

Espectrometría de reflexión total atenuada (ATR)

La espectroscopia ATR es una poderosa técnica para el análisis y la obtención de los espectros de infrarrojo de un amplio abanico de muestras que presentan

alguna dificultad, como sólidos de limitada solubilidad, películas, fibras, pastas, adhesivos y polvos.

Esta técnica fue introducida en el año 1960 y en la actualidad es ampliamente utilizada puesto que es una técnica rápida y de fácil empleo dado que requiere de poco o ningún tratamiento previo para la muestra ¹⁸.

Esta técnica se fundamenta en el paso de un haz de radiación desde un medio 1 con mayor densidad óptica a un medio 2 con menor densidad óptica, teniendo lugar un cambio en la dirección del haz en la interfase de acuerdo con la ley de Snell,

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2)$$

donde θ_1 y θ_2 son los ángulos de incidencia del haz de radiación con respecto a la normal de la interfase entre los dos medios de índices de refracción n_2 y n_1 , respectivamente ¹⁹.

Teórica y experimentalmente se ha demostrado que, durante el proceso de reflexión, el haz se comporta como si penetrase una cierta distancia en el medio menos denso antes de reflejarse ¹⁹, de tal manera que cuando se coloca en contacto con dicho cristal una sustancia activa a la radiación infrarroja, cada vez que el haz se refleja, interacciona con la misma a través de una serie de ondas verticales, conocidas con el nombre de ondas evanescentes, penetrando en la muestra (entre 1 y 4 micrómetros, dependiendo de la longitud de onda de la radiación) en cada uno de los puntos de reflexión.

De esta manera, cada vez que el medio menos denso absorbe la radiación evanescente, tiene lugar una atenuación del haz en las longitudes de onda de las bandas de absorción, tal y como se esquematiza en la Figura 3.

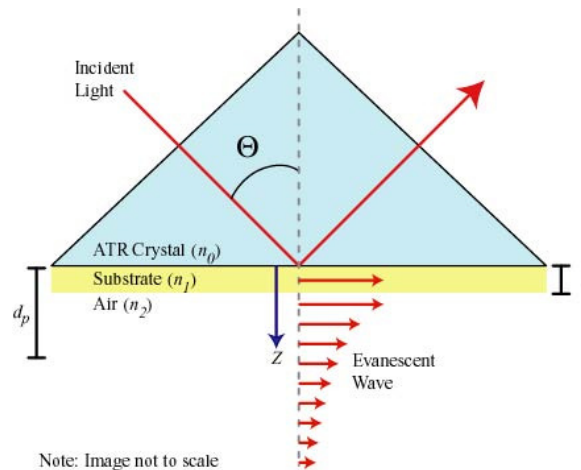


Figura 3. Generación de ondas evanescentes durante el fenómeno de reflectancia interna o total atenuada.

En cuanto a los espectros de reflectancia total atenuada obtenidos, se puede decir que resultan similares, aunque no idénticos, a los correspondientes de absorción por transmisión. En general se observan las mismas bandas pero sus intensidades relativas son distintas. Las absorbancias, aunque dependen del ángulo de incidencia, son independientes del grosor de la muestra, debido a que la radiación sólo penetra unos pocos micrómetros en la muestra²⁰.

Todo esto hace que la técnica ATR resulte ideal para poder obtener, con una mínima o ninguna preparación previa de la muestra, los espectros de absorción de una gran variedad de tipos de muestras como pastas, polvos, o suspensiones, que debido a sus características físicas o poca transparencia a la radiación no permiten llevar a cabo medidas directas por transmisión.

Espectrometría de reflexión difusa^{12, 21, 22}

La reflexión difusa es un proceso complejo que tiene lugar cuando un haz de radiación choca con la superficie de un sólido finamente dividido o de muestras con superficies rugosas.

En la técnica de la reflectancia difusa, a menudo conocida bajo el acrónimo DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) por sus siglas en inglés, cuando el haz de la radiación infrarroja incide sobre una muestra, aquél puede interactuar con la misma de dos posibles formas:

- La primera de ellas consiste simplemente en reflejarse sobre la superficie de las partículas de la misma manera que la luz visible lo hace sobre un espejo (reflexión especular), de tal manera que si la muestra posee un índice de refracción muy elevado, la reflexión especular puede provocar distorsiones importantes (conocidas como bandas de Restrahlen) en el espectro de infrarrojo final. Para minimizar estas distorsiones, la muestra debe molturarse con el fin de reducir el tamaño de partícula y, en algunos casos, mezclarse con una matriz no absorbente de la radiación infrarroja²³.

A pesar de que los accesorios de reflectancia difusa recogen la radiación debida a la reflexión especular junto con otros tipos de luz reflejada, el componente especular de la luz infrarroja que alcanza el detector se considera una interferencia puesto que no aporta información alguna sobre las características de absorción de la muestra y por lo tanto estos accesorios disponen de dispositivos para eliminar la mayor parte del componente especular.

- El segundo camino que puede seguir el haz infrarrojo incidente cuando interactúa con una partícula es penetrar en dicha partícula y luego dispersarse. En función del ángulo con el que el haz emerja de la partícula, que no será necesariamente igual al incidente, la luz dispersada puede penetrar en otras partículas desplazándose a través de ellas o bien reflejarse sobre sus superficies (Figura 4). En este caso la luz que viaja a través de las partículas de la muestra es parcialmente absorbida por ellas y el espectro resultante si contiene información acerca de las características de absorción de la muestra.

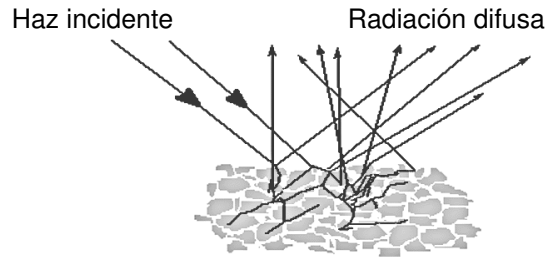


Figura 4. Fenómeno de reflectancia difusa para un sólido finamente dividido.

En este aspecto, las muestras que presentan una absorción elevada generarán, en el correspondiente espectro, bandas de absorción tremendamente intensas y que se identifican fácilmente por su forma achatada, puesto que la radiación liberada por la muestra será muy pequeña. Así estas muestras pueden mezclarse con una matriz no absorbente de la radiación infrarroja para disminuir la intensidad de la absorción.

Los principales factores que influyen en la calidad espectral para las medidas de reflectancia difusa son:

- El índice de refracción: cuanto mayor es para la muestra, más importante es la reflexión especular que tiene lugar sobre la superficie de la misma. Cuando la componentes especular de la reflectancia difusa medida es grande, las bandas del espectro resultante tienden a ensancharse y las relaciones entre la intensidad de las bandas y las concentraciones en la muestra llegan a ser no lineales.
- El tamaño de partícula: reduciendo el tamaño de las partículas de la muestra se reduce la contribución de la reflexión especular, de manera que partículas más pequeñas mejoran en gran medida la calidad del espectro proporcionando bandas más estrechas y con mejores intensidades relativas. Este fenómeno puede apreciarse en la Figura 5 que se indica a continuación.

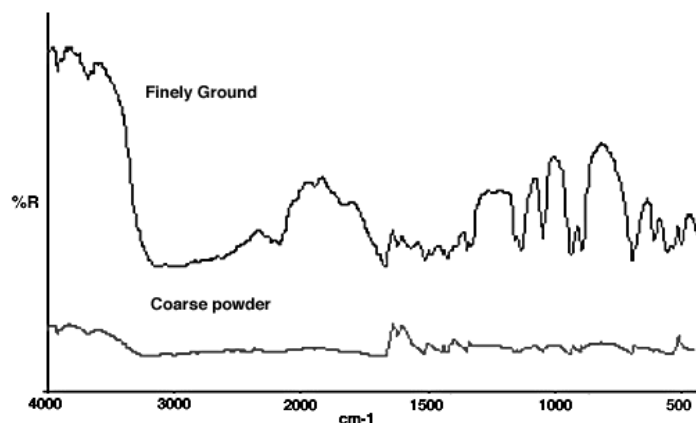


Figura 5. Espectro de reflectancia difusa para la glicina.

Como se puede apreciar, el espectro inferior correspondiente al compuesto sin tratar evidencia las características derivadas de la reflexión especular, mientras que el espectro correspondiente al material finamente molturado muestra rasgos más similares a las bandas de absorción, aún siendo todavía muy diferente al espectro de absorción o de reflectancia total atenuada.

- Homogeneidad de la muestra: cuanto mayor es la uniformidad de la muestra más lineal resulta, en el espectro obtenido, la relación entre la intensidad de la banda y la concentración.
- La concentración de la muestra: cuanto mayor es la concentración de la muestra, mayores son las distorsiones que muestra el espectro obtenido, debido a la reflectancia especular.

En la Figura 6 pueden verse los espectros de reflexión difusa para una aspirina pura y diluida con KBr. El espectro correspondiente a la muestra diluida con KBr es muy similar al obtenido para un disco de KBr. En el espectro de la aspirina pura las bandas más intensas presentan aproximadamente la misma intensidad al tiempo que sus formas están distorsionadas por la contribución de la reflexión superficial. Sin embargo, las bandas débiles presentan un aspecto similar en ambos espectros.

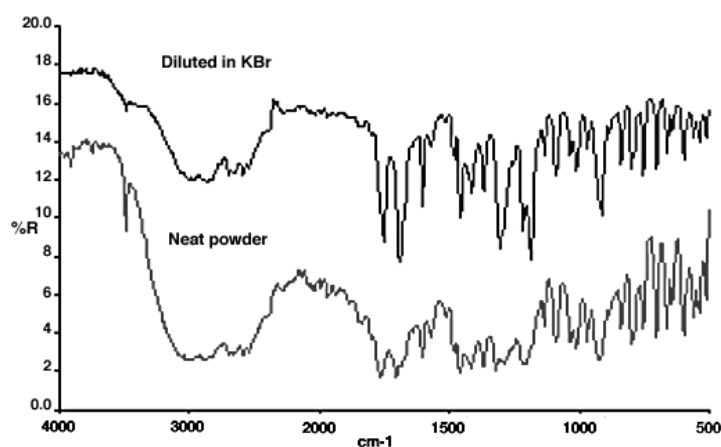


Figura 6. Espectro de reflectancia difusa para la aspirina.

El espectro de reflectancia difusa se suele representar en lo que se conoce como formato Kubelka-Munk más que en formato de absorbancia, concretamente como $\log(1/R)$ frente a la frecuencia, exhibiendo un parecido de muy buena calidad con el espectro de transmisión.

La intensidad Kubelka-Munk (K-M) se puede relacionar con la reflectancia medida a través de la ecuación:

$$K - M = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (3)$$

En unidades de Kubelka-Munk las intensidades espectrales que se obtienen resultan más proporcionales a la concentración que cuando se manejan unidades de absorbancia.

En la Figura 7 se muestra una comparación entre los espectros para una misma sustancia obtenidos empleando los dos tipos de formatos.

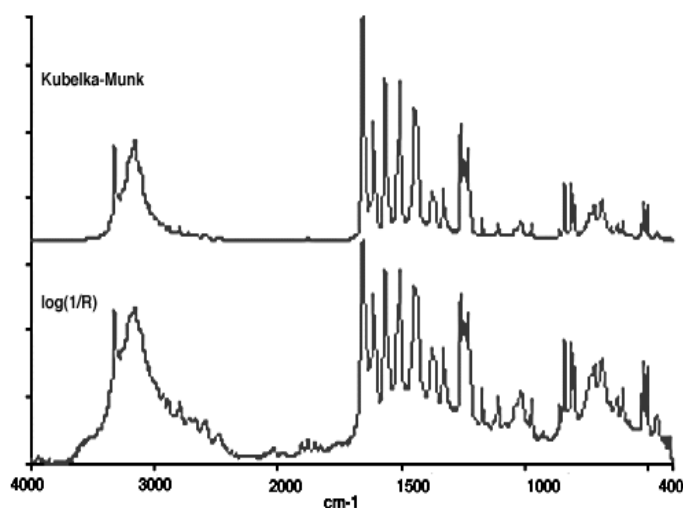


Figure 7. Espectros de reflectancia difusa para el paracetamol en unidades de Kubelka-Munk y $\log(1/R)$.

2 Quimiometría

2.1 Consideraciones generales

Hasta finales de los años 60, los datos analíticos se obtenían mayoritariamente a partir de procesos de análisis largos y costosos. Sin embargo, con la aparición de los métodos computerizados de análisis, que suponían la conexión de la naciente microinformática con la instrumentación analítica, la obtención y tratamiento de datos analíticos de calidad se facilitó en gran medida, siendo posible obtener gran cantidad de información analítica en tiempos relativamente cortos. A partir de ese momento, los químicos analíticos disponían de un gran volumen de información con el que poder tratar y abordar los diferentes problemas planteados ²⁴.

No obstante, de forma inmediata, apareció la necesidad de buscar métodos matemáticos que ofrecieran la posibilidad de extraer la información útil de aquella que no lo era, esto es seleccionar la información realmente importante, con el fin

de poder interpretar los datos para que éstos pudiesen ser utilizados y relacionados con el parámetro a determinar: una tarea compleja dado el gran volumen de información. Esta problemática propició el desarrollo de la Quimiometría, una ciencia que aplica conocimientos matemáticos e informáticos a los sistemas químicos.

El concepto de Quimiometría fue introducido en el año 1972 por el sueco Swante Wold y por el norteamericano Bruce R. Kowalski. Sin embargo, en 1975 *The Chemometrics Society* definió la Quimiometría, como “la disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos y con ello obtener la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”²⁴.

Ya en el año 1997 el profesor D. L. Massart definió la Quimiometría como “la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y obtener conocimientos a partir de sistemas químicos”²⁴. Como puede observarse, la definición de Massart añade el empleo de la lógica formal, base de la inteligencia artificial, y matiza dos hechos: i) que la información buscada debe ser “relevante” y ii) que la información sobre el sistema químico debe transformarse en un conocimiento global sobre el problema en estudio^{25, 26}.

La Quimiometría se puede considerar como una rama aplicada y especializada de ambas, la Química Analítica y la Estadística, con una función análoga a la que realizan disciplinas como la Biometría, Sociometría, Econometría o Psicometría en relación a la Biología, Sociología, Economía o Psicología respectivamente.

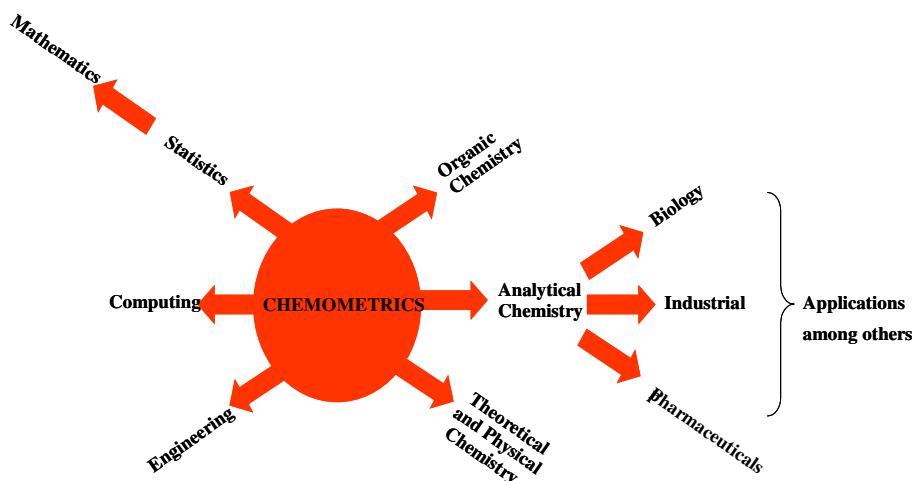


Figura 8. Relación de la Quimiometría con las ciencias.

Las diferencias entre las disciplinas metrológicas antes nombradas y la Quimiometría son debidas a las particulares características de los datos de origen químico: el limitado número de factores (concentraciones, pH, fuerza iónica, presencia de luz, etc.) que influyen sobre los resultados, la posibilidad de control de la mayoría de estos factores por parte del analista, la posibilidad de repetir las experiencias y obtener replicados de los datos o la incertidumbre relativamente pequeña que afecta a la mayoría de los datos.

Desde nuestro punto de vista analítico el objeto de la Quimiometría es extraer con unos recursos mínimos la máxima información relevante acerca de los sistemas materiales, utilizando para ello datos químicos, en forma exclusiva o en combinación con datos de cualquier otra índole que aporten información relacionada con el problema que se quiere resolver.

Pese a que la Quimiometría pretende potenciar y aumentar el rendimiento del proceso analítico, actuando sobre todas y cada una de las etapas del mismo, tal y como se puede apreciar en la Tabla 2, para el desarrollo de la presente Memoria de Tesis Doctoral nos hemos centrado principalmente en las técnicas quimiométricas aplicadas a la etapa del procedimiento analítico correspondiente al tratamiento de los datos.

Toma de muestra	Cómo obtener muestras representativas, con el mínimo coste, a un nivel de dispersión dado: estadística de toma de muestra.
Diseño del método	Cómo obtener la máxima información al mínimo coste. Selección de variables y diseño experimental: modelización y optimización del diseño.
Medidas	Cómo obtener información de la máxima calidad a un coste mínimo: procesado de señales (filtrado, suavizado, modulación, codificación).
Tratamiento de datos para un objeto	Calibración: construcción de modelos de regresión (lineal o no lineal, univariante o multivariante), análisis de residuales, técnicas de deconvolución, etc.
Tratamiento de datos para conjuntos de objetos	Obtención de información significativa a partir del conjunto de todas las muestras analizadas: análisis exploratorio de datos (preprocesado, reducción de dimensiones, representación gráfica), pruebas de significación, reconocimiento de pautas (análisis de grupos, técnicas de clasificación), construcción de modelos de regresión y aplicación de los mismos a la predicción, estimación de los límites de confianza a las predicciones.

Tabla 2. Técnicas estadísticas aplicadas a las diversas etapas del proceso analítico.

El desarrollo de la Quimiometría como disciplina científica puso al alcance de los usuarios una capacidad de cálculo elevada con unos costes relativamente bajos, permitiendo a los químicos analíticos comenzar a manipular un ingente número de datos así como generalizar la necesidad de tratarlos y extraer de ellos la información más relevante.

Estos dos factores, combinados, provocaron que la utilización de las herramientas quimiométricas de tratamiento comenzara a ser necesaria hasta el

punto que el *software* de control de los instrumentos de que hoy día se dispone las incorpore.

Cabe destacar que, pese a que se trata de herramientas con un trasfondo matemático complejo, su empleo se ha simplificado en gran medida, siendo en la actualidad utilizadas por un gran número de analistas.

Sin embargo, la relativa simplicidad en su uso es a menudo uno de sus principales inconvenientes. El relativo desconocimiento en algunos casos de los principios en los que se basan estos métodos hace que muchas veces se apliquen de forma demasiado directa, encaminándose hacia la búsqueda directa de resultados, en lugar de aprovechar su capacidad para elegir la información relevante de los datos analíticos y así captar nueva información del sistema.

La Quimiometría genera un valor añadido en dos sentidos: i) por un lado permite diseñar y realizar experimentos más eficaces para la obtención de datos de una determinada calidad con un mínimo esfuerzo experimental, y extraer más información a partir de dichos datos, aumentando la calidad de los resultados, facilitando su interpretación y fomentando así las conclusiones con rigor; ii) mientras que por otro potencia la incorporación del químico y, en general, del profesional del laboratorio, a la cadena de control del proceso productivo. Es de esta manera como dicho profesional deja de ser un simple productor de datos y se convierte en alguien que no solo genera, sino que además interpreta y comunica información relevante para la toma de decisiones.

2.2 La calibración

Un método de análisis instrumental proporciona un conjunto de datos, más o menos complejo, al que se le denomina señal analítica. Dichas señales medidas pueden considerarse magnitudes físicas que suelen estar basadas en características químicas o físico – químicas de los analitos.

La calibración se define clásicamente en Química Analítica como el conjunto de operaciones que establecen, en las condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento de medida (la señal obtenida) y los valores conocidos correspondientes a la propiedad analítica que se pretende

medir. Es la denominada calibración metodológica ²⁷.

Este proceso no siempre resulta directo, ya que la señal obtenida puede ser contribución de más de una especie o propiedad. Mientras que en el caso de los métodos cromatográficos, debido a la separación previa de los componentes de la muestra, cada señal analítica medida corresponde a un analito concreto, no ocurre lo mismo en los métodos espectroscópicos, donde, en muchas ocasiones la señal que proporciona el instrumento no es exclusiva de un solo componente de la muestra.

En el proceso de calibración se establece una relación matemática, conocida como modelo de calibración, entre la respuesta instrumental y un analito o propiedad determinada de la muestra que, por regla general en determinaciones cuantitativas, acostumbra a ser la concentración. Evidentemente, existen muchas alternativas matemáticas que permiten relacionar la respuesta de un instrumento con el valor de un parámetro que se desee determinar. En general, los modelos de calibración pueden clasificarse siguiendo varios criterios ²⁸, por lo que podemos diferenciar los métodos de calibración como:

- **Univariables-multivariables:** en función del número de variables de la respuesta que se emplean.
- **Lineales-no lineales:** según la función que relaciona las variables.
- **Directos-indirectos:** si los parámetros de la calibración se calculan a partir de la señal de los componentes puros o a partir de mezclas.
- **Clásica-inversa:** en función de cuál sea la variable independiente utilizada (concentración o señal analítica, respectivamente).
- **Espectro completo-selección de variables:** según el número de variables utilizadas.
- **Rígidos-flexibles:** en los primeros se debe disponer de información de todas las especies que contribuyen a la señal, mientras que en los segundos únicamente es necesario tener información de los analitos que se desea cuantificar.

Como puede deducirse de la anterior clasificación, existe una gran variedad de

estos métodos, por lo que la elección del más adecuado depende del tipo de muestra a analizar, del conocimiento que se tenga del sistema y de los datos disponibles.

Independientemente del tipo de modelo de calibración que se considere, el proceso de construcción del mismo presenta dos aspectos a considerar: el ajuste y la capacidad de predicción. Mientras que el primero refleja el modelado de los datos y de su estructura, la capacidad de predicción hace hincapié en el aspecto práctico del proceso de calibración, que no es otro que el de proporcionar predicciones fiables de los parámetros de interés para objetos que pueden ser o no desconocidos.

Aunque no tiene porque ser siempre así, ambas vertientes pueden proporcionar efectos contrapuestos. La búsqueda del mejor ajuste de los datos, comporta muchas veces el aumento en la complejidad de las ecuaciones de calibración, y este hecho acostumbra a derivar en capacidades predictivas que resultan poco estables.

2.3 Etapas para construir un modelo de calibración

Bien sea para establecer una clasificación o bien para la determinación cuantitativa de un determinado parámetro, la construcción de un modelo para un conjunto de datos, tiene como finalidad obtener una relación entre las distintas variables que posteriormente pueda emplearse para conseguir los fines para los que dicho modelo se ha establecido.

Para la obtención de un modelo robusto se deben seguir las etapas que se detallan a continuación:

2.3.1 Selección del conjunto de calibración

Tal vez deba considerarse como la etapa más importante de todas. En ella debe seleccionarse un conjunto de objetos, conocido como conjunto de calibración (o *training*), que representen toda la variabilidad existente, no solo

química sino también física, con el fin de lograr una buena capacidad de predicción para el modelo. En este sentido, para llevar a cabo predicciones cualitativas dicho conjunto debe incorporar toda la posible variabilidad que pueda darse para cada tipo de objeto. Por otro lado, si se pretende llevar a cabo una predicción cuantitativa, las muestras deben ser representativas de todo el intervalo del parámetro que se pretende determinar.

2.3.2 Obtención de la señal analítica

Una vez diseñado el conjunto de calibración deben obtenerse las señales analíticas sometiendo los distintos objetos al procedimiento instrumental que resulte más adecuado y permita obtener la mayor cantidad de información posible con el mínimo esfuerzo. En el caso que nos ocupa la obtención de la señal consiste en el registro de los correspondientes espectros en la región que se considere oportuna y empleando el tipo de espectroscopia y modo de medida que resulten más adecuados.

Después de que el sistema instrumental proporcione los datos resultantes, éstos se almacenan y quedan disponibles para su posterior tratamiento matemático.

2.3.3 Construcción del modelo

Construir el modelo de calibración consiste en aplicar una serie de herramientas matemáticas sobre la señal analítica que permitan establecer la relación entre ésta y la propiedad o parámetro que se pretende determinar, bien estableciendo la relación con la concentración de un analito o con parámetros físicos de la muestra (en el caso que el modelo este destinado al análisis cuantitativo), o bien estableciendo las características que definen una clase y fijando las fronteras que la separan de otra u otras clases (si la finalidad del modelo es una predicción cualitativa, como puede ser la clasificación de los objetos en grupos).

En ciertas ocasiones, antes de establecer la relación entre la señal analítica y el parámetro que se pretende determinar, es necesario efectuar una serie de tratamientos previos sobre dicha señal, cuya finalidad es corregir el efecto de los componentes ajenos a la información buscada, mejorando así la exactitud y precisión de los resultados en la capacidad predictiva del modelo.

Debido a su importancia, los tratamientos de las señales espectrales más habituales se abordarán de forma más detallada en un posterior apartado.

Una vez corregidos los datos analíticos, el modelo puede construirse teniendo en cuenta las bases teóricas (calibración univariante) que explican la relación entre una magnitud física de la señal analítica (altura o área de las diferentes bandas de absorción) con la propiedad a medir o bien por relaciones totalmente empíricas empleando una gran variedad de algoritmos matemáticos (calibración multivariada o multivariante).

2.3.4 Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

Una vez construido el modelo, éste se aplica a un número limitado de muestras, distintas de las que componen el conjunto de calibración y que componen lo que se denomina conjunto de validación, para las que se conoce el parámetro o la propiedad que se pretende predecir. Esta etapa se conoce con el nombre genérico de validación.

Los resultados que se obtienen tras la aplicación del modelo para estas muestras se comparan estadísticamente con los valores conocidos, comprobando si los resultados encontrados son estadísticamente comparables a los valores conocidos, pudiendo así afirmar si el modelo predice correctamente y, en consecuencia, resulta válido para la determinación de dicho parámetro o propiedad para un tipo dado de muestras u objetos.

Para aquellos modelos que tengan una finalidad clasificatoria la capacidad de predicción se evalúa por los aciertos en la clasificación de muestras externas al conjunto de calibración en las distintas clases previamente establecidas.

Por el contrario, en el caso de modelos con finalidades cuantitativas se realizan estudios estadísticos y cuantitativos de los resultados obtenidos empleando una serie de parámetros que permitan evaluar dicha capacidad predictiva.

Pese a que son muchos los parámetros descritos en la bibliografía que pueden emplearse para la validación de un método de análisis, tales como la especificidad, la selectividad, la precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), la exactitud, la linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación o la robustez, entre otros,²⁹ para el desarrollo de esta Memoria de Tesis solo se han empleado algunos de ellos.

Cuando nos referimos exclusivamente a la etapa de calibración, una práctica bastante común es asegurar la capacidad predictiva de un modelo de calibración mediante la comparación de las predicciones obtenidas empleando los diferentes procedimientos de análisis para los distintos objetos del conjunto de validación a través de la raíz cuadrada del error de predicción al cuadrado, también conocido como RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*), que puede expresarse como:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n_i}} \quad (4)$$

para un conjunto de **n** objetos.

Además del RMSEP, también se han empleado otros estimadores diferentes como la media de las diferencias (d_{x-y}) entre los valores obtenidos por el método que se pretende validar (\hat{C}_i) y los valores obtenidos aplicando el método de referencia (C_i), la desviación estándar del promedio de las diferencias (s_{x-y}), el coeficiente de calidad (**QC**) y el error estándar de predicción para la validación de las muestras (s_{reg})³⁰.

2.3.5 Aplicación del modelo

Después de haber comprobado la validez del modelo mediante la etapa de validación, éste puede aplicarse a la predicción de muestras desconocidas. Los resultados obtenidos para estas muestras deben ser aceptables y estadísticamente comparables con los obtenidos mediante el análisis de las mismas empleando también el pertinente método de referencia. Es por esto que esta etapa puede considerarse como una segunda comprobación de la capacidad predictiva del modelo.

2.4 Tratamientos espectrales

Generalmente, las señales analíticas obtenidas mediante el empleo de métodos espectroscópicos van acompañadas de efectos o componentes no deseados y que reciben la denominación global de ruido. Las fuentes de dicho ruido son de diferente naturaleza, pudiendo deberse a componentes de la instrumentación empleada para el registro de las señales (ruido instrumental), a condiciones ambientales (ruido ambiental) o a variaciones inherentes a la naturaleza de la muestra ³¹.

Para corregir o reducir este ruido de los datos espectrales es necesario aplicar un tratamiento previo a los espectros obtenidos.

Por ello, con este fin, procederemos a comentar algunos de los tratamientos que se emplean habitualmente en las técnicas de espectroscopia vibracional ³².

2.4.1 Suavizado espectral (*smooth*)

Uno de los procedimientos que puede emplearse para la reducción del ruido espectral es el suavizado de los espectros (conocido comúnmente por su expresión inglesa *smooth*). Este suavizado se lleva a cabo empleando el algoritmo de Savitzky-Golay. El suavizado tiene un efecto de maquillaje de los espectros,

reduciendo el ruido pero también distorsionando las intensidades de las señales ³³.

2.4.2 Corrección de línea base

La línea base de un espectro consiste, generalmente, en aquellas regiones del mismo donde no existen absorciones significativas (idealmente, la intensidad en estas regiones del espectro es de cero unidades de absorbancia - ó 100 % transmitancia -). En realidad, existen muchos factores que pueden afectar la línea base, incluyendo la calidad del “*background*” del espectro, de la muestra, la forma en que se haya preparado la muestra, el tipo de accesorio empleado, la estabilidad térmica del sistema, el alineamiento del divisor de haz (*beamsplitter*) y la purga del sistema. Debido a estos factores la línea base puede inclinarse, desplazarse o curvarse.

Existen una gran variedad de tipos de corrección de línea base, sin embargo, atendiendo a la disponibilidad del *software* empleado sólo detallaremos aquellos disponibles para establecer una línea base para un banda o una región de absorción dada del espectro.

Línea base en un punto: consiste en una línea horizontal que pasa a través del espectro a ese punto de línea base especificado. Cuando se selecciona este tipo de línea base, el *software* resta la línea base horizontal a la intensidad de la banda o región, a fin de proporcionar una medida corregida (Figura 9).

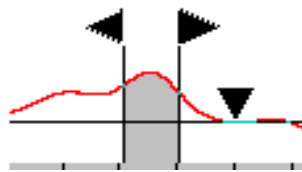


Figura 9. Ejemplo de corrección de línea base en un punto.

Línea base entre dos puntos: con este tipo de corrección, tal y como su nombre indica, la línea base se establece entre dos puntos del espectro. El *software* resta la contribución de la señal del espectro según la línea base establecida de la intensidad de la banda o la región seleccionada para establecer la medida corregida (Figura 10).

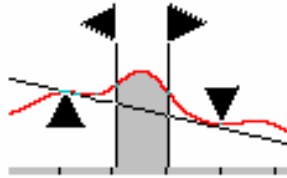


Figura 10. Ejemplo de corrección de línea base entre dos puntos.

Baseline Offset: Cuando se selecciona este tipo de corrección de línea base el *software* resta un valor constante al valor de la intensidad obtenida para cada uno de los puntos de la región específica seleccionada. Pese a que es similar a la corrección de línea base en un punto, presenta la ventaja de poder restar un valor constante que no tiene que corresponder necesariamente a un punto del espectro.

Linear Removed: con este tipo de corrección el *software* calcula mediante la línea base un ajuste lineal por mínimos cuadrados sobre la región de análisis especificada, para luego restar el valor de esa línea en cada punto de la región al valor de la intensidad que presenta el espectro para esos mismos puntos. De esta manera, la región resultante tiene eliminada toda esa información lineal, quedando solamente la parte de la región que presenta un orden mayor.

Esta propuesta asume que existe una línea base lineal implícita por debajo de cada región espectral que puede eliminarse al llevar a cabo este análisis. Sin embargo, toda la información lineal que está relacionada con los componentes también se elimina.

Este tratamiento espectral suele emplearse para el análisis por

regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS, *Partial Least Squares*) cuando las propiedades de la línea base de los espectros de calibración y de los espectros de las muestras desconocidas varían.

Quadratic Removed: La selección de este tipo de corrección de línea base implica que el *software* calcule un polinomio de segundo orden sobre la región especificada. Luego, el valor para dicho polinomio en cada número de onda de la región seleccionada se resta a la intensidad del espectro para cada uno de esos números de onda. En este caso, la región resultante ha visto eliminada toda su curvatura, quedando únicamente la parte de la región de mayor orden.

Este tipo de corrección asume que existe una línea base polinomial de segundo orden por debajo de cada región espectral. A través de este procedimiento no sólo se elimina la línea base curvada sino también toda la información en la curva de segundo orden que está relacionada con los componentes.

Este tipo de corrección se aplica cuando se pretende crear un método de regresión lineal múltiple gradual y generalmente combinada con la corrección de la variable normal estándar (SNV) y el *De-trending*, que se detallarán más adelante.

2.4.3 Espectroscopia derivada

En la Química Analítica los métodos espectroscópicos son ampliamente utilizados debido a su fiabilidad y rapidez. Sin embargo, el solapamiento de bandas espectrales dificulta y, a veces, imposibilita la identificación y cuantificación de grupos funcionales o compuestos.

Para resolver este problema se han utilizado diversos métodos, los cuales se basan en modelar la señal experimental a través de funciones teóricas.

Entre 1953 y 1955 algunos investigadores introdujeron la derivación de los espectros como una herramienta para magnificar la estructura fina de las curvas

espectrales.

Los espectros derivados consisten en el cálculo de la primera, segunda o derivadas de orden mayor de la absorbancia en función de la frecuencia o longitud de onda de la radiación. Los espectros derivados se representan mediante un gráfico de la derivada de orden n de la absorbancia en función de la longitud de onda promedio.

Diferenciando la ley de Lambert-Beer con respecto a la longitud de onda se obtiene:

$$A = \epsilon lc \quad (1) \quad \textbf{Ley de Lambert-Beer: derivada de orden cero}$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = lc \frac{d\epsilon}{d\lambda} \quad (5) \quad \textbf{Primera derivada o derivada de orden uno}$$

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = lc \frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} \quad (6) \quad \textbf{Segunda derivada o derivada de orden dos}$$

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = lc \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} \quad (7) \quad \textbf{Enésima derivada o de orden n}$$

Las expresiones anteriores muestran que las derivadas $\frac{d^n A}{d\lambda^n}$ resultan siempre proporcionales a la concentración de manera que las aplicaciones analíticas cuantitativas, basadas en este hecho, pueden también llevarse a cabo ^{34, 35, 36}.

El proceso de derivación de un espectro se podría asimilar al de un filtro, que permite observar cambios en pequeños intervalos de longitud de onda y por lo tanto realza la estructura del mismo obteniéndose una mejor discriminación de sus detalles ³⁷, de manera que, a pesar de que se trata de una técnica que no proporciona información adicional, los datos se redistribuyen de tal forma que resultan mucho más significativos.

Sin embargo, la aplicación del proceso de derivación tiene la limitación de que se produce una reducción de la relación Señal/Ruido, por lo que se utiliza especialmente en aquellas situaciones en las que dicha relación resulta elevada y se carece de estructura, aunque en ocasiones se intenta resolver este

inconveniente ³⁸.

La espectroscopia de derivadas ofrece dos ventajas importantes: de un lado un aumento en la resolución espectral, y por otra parte una discriminación en favor de las estructuras finas del espectro.

El aumento en la resolución permite emplear la espectroscopia derivada para resolver bandas que estén demasiado cerca y se encuentran solapadas en el espectro de absorción normal. La resolución aumenta con el orden de la derivada n , y este aumento depende de la forma de la banda y de la relación entre el ancho de banda y su altura. Debido al aumento en la resolución la derivada del espectro es una mejor huella que el espectro normal.

Además de resolver el problema del solapamiento de bandas, la espectroscopia derivada también permite minimizar desviaciones de línea base causadas por efectos de dispersión. El empleo de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada corrige, además, las desviaciones provocadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda.

Generalmente se utilizan la primera y segunda derivadas siendo poco habituales las derivadas de orden superior ³⁹.

Para efectuar el cálculo de derivación los dos métodos más utilizados son el de la ventana móvil (*moving averaged segment convolution*), propuesto por Norris y Williams ⁴⁰ y el propuesto por Savitzky y Golay.

2.4.4 Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*)

Este tipo de corrección ⁴¹ emplea una función matemática para compensar las diferencias en el camino óptico provocadas por el distinto tamaño de partícula de las muestras, y que dan lugar a una cierta dispersión del haz de radiación incidente.

Estas variaciones ocurren en mayor extensión en las medidas de reflectancia difusa, especialmente cuando se realizan las medidas en el rango correspondiente

al infrarrojo cercano ⁴².

Para aplicar este tipo de corrección se asume que la relación entre el paso óptico y su contribución a la señal de absorbancia es perfectamente lineal. Este método se ha diseñado para trabajar con espectros que también presentan una respuesta lineal para la concentración, es decir, espectros que se encuentran en unidades de absorbancia, de Log (1/R) o de Kubelka-Munk.

2.4.5 Variable normal estándar (SNV, *Standard Normal Variate*) y *De-trending*

Las muestras que se analizan mediante la espectroscopia de la reflectancia difusa presentan, a menudo, diferencias significativas en el espectro debido a que la distribución de las partículas no es homogénea. De hecho, muchas medidas espectrales de diferentes porciones de la misma muestra pueden parecer completamente diferentes. En muchos casos, esta dispersión puede ser una contribución predominante para el espectro, informando, en ocasiones, sobre la varianza en los datos.

El grado de dispersión depende del número de onda, del tamaño de la partícula y del índice de refracción de la muestra. Además la dispersión no es uniforme a lo largo del espectro. Generalmente la dispersión se manifiesta como una línea base desplazada, inclinada o en ocasiones curvada, donde el grado de influencia se aprecia de forma más acentuada para las longitudes de onda más altas del espectro.

La corrección SNV se aplica cuando existe una contribución multiplicativa a la señal espectral, debido a la dispersión o a cualquier otro efecto que esté relacionado con el paso óptico. También puede emplearse para la normalización de los espectros con el fin de minimizar los efectos del escalado o de los desplazamientos.

La corrección SNV es similar a la corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*) ⁴³. La MSC calcula un espectro ideal a partir de los espectros empleados para la calibración y lo emplea para la corrección de los datos, mientras que la corrección SNV elimina los efectos de la dispersión normalizando los espectros individualmente. Por ello se recomienda el

empleo de la corrección SNV, en lugar de la MSC, cuando se cree que los espectros de las muestras desconocidas que se pretenden medir pueden tener características de dispersión diferentes a las de los espectros de calibración o si se emplea una técnica de clasificación que implica múltiples clases.

Una de las ventajas de la corrección SNV es que para su aplicación no se requiere información adicional sobre el paso óptico durante el análisis de las muestras: el paso óptico se trata como una contribución multiplicativa de la señal espectral. Para cada espectro empleado en el modelo, el *software* calcula el promedio y la desviación estándar de la línea base de la región establecida. A continuación, para cada punto o puntos de la región espectral, el *software* resta dicho valor promedio y divide el resultado por la desviación estándar. Esto sitúa todos los espectros en la misma escala y la corrección SNV se aplica automáticamente a las muestras desconocidas que se pretenden analizar con dicho modelo.

Por otra parte, el *De-trending* normalmente persigue intentar eliminar las variaciones adicionales en el desplazamiento de la línea base, normalmente presentes también en los espectros de reflectancia difusa. De igual forma que para la corrección SNV, cada espectro se trata de forma independiente respecto del resto presentes en el conjunto de calibración, de manera que no existe una referencia externa. Es un cálculo relativamente simple, en el que se emplea una regresión lineal por mínimos cuadrados para ajustar un polinomio lineal o cuadrático a las respuestas del espectro. Posteriormente, dicho polinomio se resta al espectro para generar el espectro resultante.

En muchos casos la sola aplicación de la corrección SNV puede resultar muy útil para la interpretación de los vectores del modelo final, sin embargo, el *De-trending* no se suele aplicar solo, sino que se aplica más bien después de la corrección SNV, o directamente no se emplea ⁴⁴.

Hasta aquí se han revisado los tratamientos espectrales previos que comúnmente se emplean sobre los espectros de infrarrojo. En ocasiones, con el fin de conseguir mejorar los resultados obtenidos, resulta apropiado emplear más de un método de tratamiento espectral previo. No obstante, este procedimiento puede conllevar también una eliminación de información útil, de manera que resulta necesario evaluar en cada caso que tipo de tratamiento puede resultar

mejor o bien si es necesario aplicar más de uno para la corrección de los datos, sin que ello suponga una merma en la capacidad predictiva de los modelos de calibración que puedan construirse a partir de los espectros corregidos.

2.5 Modelos de calibración

En los siguientes apartados se van a comentar las técnicas estadísticas aplicables a la etapa del proceso analítico correspondiente al tratamiento de los datos para un objeto o para conjuntos de ellos y que pueden resumirse en la construcción de modelos de calibración y la obtención de información significativa a partir del conjunto de todas las muestras analizadas, estableciendo, en función de la finalidad, de un lado los **Métodos de predicción cualitativos** y por otro los **Métodos de predicción cuantitativos**.

Los primeros se emplean en la exploración de los datos para resaltar la existencia de estructuras o grupos, así como una posible clasificación; mientras que los segundos se utilizan para la construcción de modelos de regresión que relacionen las variables predictoras con las variables respuesta, permitiendo evaluar parámetros.

2.5.1 Métodos de predicción cualitativos

Los métodos aplicados para la predicción cualitativa, también conocidos como métodos para el reconocimiento de pautas o modelos, se fundamentan en el empleo de una serie de herramientas matemáticas que permiten la extracción de información (no obtenible a partir de simples medidas experimentales) de una serie de datos relacionados con diversos objetos (muestras) ⁴⁵.

Uno de los objetivos de la exploración de los datos es de tipo clasificatorio y consiste en resaltar las tendencias ocultas presentes en el conjunto de datos y estudiar las causas o fuentes de varianza a las que obedecen, permitiendo establecer grupos de los objetos estudiados en función de relaciones o características comunes existentes entre ellos o bien definir métodos de

clasificación para objetos desconocidos ⁴⁶. Para ello, se seleccionan, en primer lugar, una serie de variables que puedan medirse experimentalmente (variables manifiestas) y que se sabe o se supone que varían con los factores que se pretenden buscar, como puede ser el caso del espectro de infrarrojo, para posteriormente diseñar un conjunto de objetos sobre los que llevar a cabo la medida de dichas variables. Esto genera una matriz de datos a la que se aplican una serie de métodos estadísticos que permiten revelar las estructuras o conjuntos presentes que poseen una o varias propiedades en común y que reciben el nombre de **clases**.

En el caso de que previamente se conozcan las clases, el análisis de datos permite la asignación de nuevos objetos a estas clases. Por el contrario, si las clases no se conocen, estas herramientas nos permiten conocer si existen posibles agrupaciones de las distintas muestras y, por lo tanto, establecer una clasificación de las mismas. Así pues, la ausencia o no de este conocimiento previo posibilita la división de los métodos para el reconocimiento de pautas en dos grupos: **análisis supervisado de pautas** o análisis clasificatorio y **análisis no supervisado de pautas**.

2.5.1.1 Métodos supervisados de análisis

Tal como se ha comentado anteriormente, en este tipo de métodos hay un conocimiento previo de las clases que existen antes de llevar a cabo la asignación.

En este caso, el primer objetivo es la caracterización de las clases, entendiendo dicha caracterización como la selección y combinación óptimas de las variables que definen las distintas clases, para luego clasificar o asignar, dentro de ellas, los objetos desconocidos. Por ejemplo, si se está trabajando con la espectroscopia IR, las distintas clases se caracterizan atendiendo a su correspondiente espectro.

Para la aplicación de este método de reconocimiento de pautas es necesario, en primer lugar, disponer de un grupo de objetos (conocido como conjunto de entrenamiento o aprendizaje) que pueda utilizarse para formar y comprobar el entramado de clases y encontrar sus correspondientes características. Después

de esto, ya se puede proceder a comprobar a cual de las clases caracterizadas corresponde el nuevo objeto considerado. Por tanto, la aplicación del análisis supervisado de pautas consta de dos etapas: aprendizaje y predicción.

Como inconveniente o limitación de los resultados que puedan obtenerse comentar que, la calidad del grupo de aprendizaje resulta indispensable puesto que el mismo condiciona todo el análisis global dado que es el que se emplea para definir las características intrínsecas de cada clase.

2.5.1.2 Métodos no supervisados de análisis

Dado que en los métodos no supervisados la distribución de los objetos se desconoce totalmente, la identificación de las clases es el problema a resolver ⁴⁷. En consecuencia, después de la detección y caracterización de las clases, es posible llevar a cabo un análisis clasificatorio para la asignación de nuevos objetos.

Tal y como hemos introducido anteriormente, estos métodos se fundamentan en descubrir agrupaciones de los distintos objetos analizados sin saber a priori a qué clase pertenece cada uno de ellos.

En una serie de Capítulos de esta Memoria se describen algunos de los métodos existentes para el análisis no supervisado de pautas, de manera que a pesar de que podemos encontrar muchos más, nos centraremos en la descripción con detalle, única y exclusivamente, de aquellos que se han empleado a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Análisis de conglomerados (*cluster analysis*)

La pregunta general que muchos investigadores se plantean en las distintas áreas de investigación es como organizar los datos observados en estructuras significativas, es decir, lo que se conoce como “desarrollar taxonomías”.

El término *cluster analysis*, empleado por primera vez por Tryon en 1939 ⁴⁸, engloba una serie de algoritmos y diferentes métodos que permiten la agrupación de objetos de características similares en sus respectivas clases.

En otras palabras, se trata de una herramienta de análisis exploratorio de datos cuyo propósito es agrupar diferentes objetos en grupos, de tal manera que el grado de asociación entre dos objetos sea máximo si ambos pertenecen al mismo grupo o mínimo en el caso contrario. En resumen, el análisis de conglomerados descubre estructuras en los datos pero sin proporcionar una explicación/interpretación de por qué existen ⁴⁹.

Las técnicas de agrupación se han empleado para la resolución de una gran variedad de problemas desde sus inicios. Prueba de ello es el artículo de Hartigan (1975) ⁵⁰, que proporciona un sumario de algunos de los estudios publicados que detallan los resultados del análisis de grupos.

Pese a que existen varios métodos o algoritmos generales para el análisis de conglomerados ⁵¹, como son: *Joining (Tree Clustering)* ⁵², *Two-way Joining (Block Clustering)* y *k-Means Clustering* ⁵³, nos centraremos únicamente en el primero de ellos, puesto que es el que se ha empleado en el desarrollo de algunos de los Capítulos que componen la presente Memoria de Tesis.

Análisis jerárquico de conglomerados (*Tree Clustering*)

El propósito de este algoritmo es agrupar los distintos objetos en grupos empleando alguna medida de similitud o de distancia. El resultado típico de este tipo de agrupación se conoce como árbol jerárquico o **dendrograma**, de aspecto similar al que se muestra en la Figura 11.

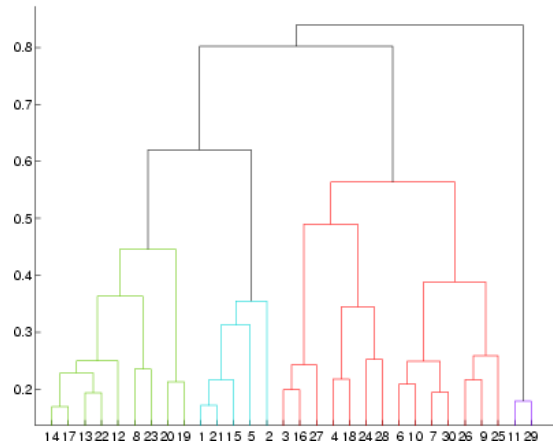


Figura 11. Ejemplo de un típico dendrograma.

El dendrograma es un esquema en el que los diferentes objetos se agrupan jerárquicamente de acuerdo a sus similitudes. Como puede apreciarse en la figura, el dendrograma presenta un aspecto de árbol que se bifurca desde un tronco común hasta alcanzar tantas ramas como objetos se pretenden agrupar o clasificar. El tronco común está constituido por el conjunto de todos los objetos, y constituye el grupo de mayor rango o jerarquía. El tronco se bifurca hasta alcanzar los objetos aislados, que ostentan la jerarquía más baja.

Para construir un dendrograma, el primer paso es decidir qué es lo que se quiere explorar, si la similitud entre objetos o entre variables. En segundo lugar, se elige el criterio de similitud que va a emplearse, es decir, las reglas que van a servir de criterio para llevar a cabo la agrupación o separación de los diferentes objetos.

A continuación detallaremos algunos de los criterios de similitud (distancias o correlaciones) que pueden emplearse para la generación de conglomerados jerárquicos.

Distancia Euclídea: es, probablemente, el criterio que más comúnmente se emplea. Se trata simplemente de la distancia geométrica en el espacio multidimensional y puede expresarse como:

$$\text{Distancia}(x, y) = \sqrt{\sum_i (x_i - y_i)^2} \quad (8)$$

Distancia Euclídea al cuadrado: se puede emplear el cuadrado de la distancia Euclídea estándar con el fin de colocar progresivamente mayores pesos sobre aquellos objetos que se encuentran más apartados. Esta distancia puede expresarse como:

$$\text{Distancia}(x, y) = \sum_i (x_i - y_i)^2 \quad (9)$$

La distancia Euclídea y su cuadrado se emplean normalmente para los datos originales y no para datos normalizados. Este último método tiene, además, la ventaja de que la distancia entre dos objetos cualquiera no se ve afectada por la inclusión de nuevos objetos en el análisis, aunque puedan ser objetos anómalos. No obstante, las distancias pueden verse tremendamente afectadas por diferencias en la escala de aquellas dimensiones para las que se pretende establecer las distancias.

Distancia Manhattan (*City-block*): esta distancia es simplemente el promedio de la diferencia a través de las dimensiones. En muchos casos, esta medida de distancia produce resultados similares a la distancia Euclídea. Puede expresarse como:

$$\text{Distancia}(x, y) = \sum_i |x_i - y_i| \quad (10)$$

Distancia de Chebychev: esta medida de distancia puede resultar apropiada en aquellas situaciones en las que se pretende definir dos objetos como diferentes si son diferentes en alguna de las dimensiones. La distancia de Chebychev se puede expresar como:

$$\text{Distancia } (x, y) = \text{Máxima } |x_i - y_i| \quad (11)$$

Distancia de Minkowski: en ocasiones es posible que se requiera aumentar o disminuir de manera progresiva los pesos que se asignan a las dimensiones para las que los respectivos objetos resultan muy diferentes. Esto puede lograrse a través de esta distancia, que puede expresarse como:

$$\text{Distancia}(x, y) = \sqrt[r]{\sum_i |x_i - y_i|^p} \quad (12)$$

donde **r** y **p** son parámetros definidos por el operador. El parámetro **p** controla el peso progresivo que ocupa las diferencias en las dimensiones individuales, mientras que el parámetro **r** controla el peso progresivo que ocupa las diferencias más grandes entre los objetos.

Porcentaje de desacuerdo: este tipo de medida resulta particularmente útil si los datos para las dimensiones incluidas en el análisis son de la misma naturaleza. Esta distancia puede expresarse como:

$$\text{Distancia } (x, y) = \frac{(\text{Número de } x_i \neq y_i)}{i} \quad (13)$$

Pese a que las discrepancias entre los distintos objetos se establecen a través del tipo de distancia empleada, es necesario disponer de unas reglas de enlace que permitan establecer cuando dos grupos son lo suficientemente similares como para poder enlazarlos.

Existen diferentes posibilidades para llevar a cabo esta selección ^{54, 55}, aunque aquí solo detallaremos las más relevantes como son:

Método de la unión simple (vecino más próximo o *single linkage*): con el empleo de este método, la distancia entre dos grupos se determina a través de la distancia de los dos objetos más cercanos (vecinos más próximos) de los diferentes grupos. Esta regla, de hecho, enlazará los objetos para formar grupos de tal forma que los diferentes grupos tenderán a representar largas cadenas.

Método de la unión completa (vecino más lejano o *complete linkage*): en este caso la distancia entre los distintos grupos se establece a través de la distancia más grande entre dos objetos que pertenecen a dos grupos distintos.

Método de la media (*average linkage*): con este criterio, la distancia entre dos grupos se calcula como la distancia media entre todos los pares de objetos que se encuentran presentes en los dos grupos. Sneath y Sokal (1973) ⁵⁵, en su libro, introducen la abreviatura UPGMA (acrónimo de *Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*) para hacer referencia a este método.

Método de la media ponderada (*weighted average linkage*): este método de enlace es prácticamente idéntico al anterior, con la salvedad de que en el desarrollo de los cálculos se emplea el tamaño de los respectivos grupos (considerado como el número de objetos que contiene cada uno de ellos) como pesos estadísticos. Este criterio resulta más práctico que el anterior en aquellas situaciones en las que se sospecha que el tamaño de

lo grupos va a ser muy irregular. Sneath y Sokal (1973)⁵⁵ se refieren a él como *WPGMA (Weighted Pair-Group Method using arithmetic Averages)*.

Método del centroide (*unweighted pair-group centroid*): el centroide de un grupo puede definirse como el punto medio situado en el espacio multidimensional definido por las dimensiones. En este sentido, el centroide de un grupo se corresponde con el centro de gravedad del mismo. Con el método del centroide, la distancia entre dos grupos se determina como la diferencia entre los centroides. *UPGMC (Unweighted Pair-Group Method using the Centroid average)* es el término que emplean Sneath and Sokal (1973)⁵⁵ para definir este método.

Método de la mediana (*weighted pair-group centroid*): este método puede considerarse prácticamente idéntico al anterior con la única excepción de que se introducen pesos estadísticos en los cálculos para tener en consideración las diferencias en el tamaño de los grupos. De este modo, cuando existen (o se sospecha que pueden existir) diferencias considerables en el tamaño de los grupos, de nuevo este método ponderado resulta más apropiado. Sneath y Sokal (1973)⁵⁵ sugieren en este caso la abreviatura *WPGMC (Weighted Pair-Group Method using the Centroid average)* para referirse a este método.

Método Ward: este criterio resulta totalmente distinto a todos los descritos anteriormente. El algoritmo de Ward intenta encontrar los grupos que resultan más homogéneos a través de un análisis de varianza. En concreto, este método intenta hacer mínima la suma de cuadrados de dos grupos cualesquiera que se formen en cada paso. Dichos dos grupos quedarán enlazados donde el resultado conduzca al menor crecimiento del factor de heterogeneidad (**H**). En este sentido, el dendrograma grafica en lugar de la distancia espectral el crecimiento de **H**⁵⁶.

Sin embargo, a pesar de todo lo descrito anteriormente, cabe resaltar que una de las finalidades más importante del reconocimiento de pautas es el análisis exploratorio de los datos, que se basa en buscar variables fundamentales (factores subyacentes, ambientales, clínicos, industriales,...) que expliquen la configuración de los grupos y de las correlaciones observadas. Es decir, se intenta identificar un pequeño número de factores que expliquen la máxima parte de la varianza aportada por un número máximo de variables manifiestas.

En este aspecto, es posible distinguir dos grandes tendencias: **análisis de componentes principales** (PCA, *Principal Components Analysis*) y **análisis factorial**.

El análisis factorial está muy relacionado con el análisis de componentes principales, y en ese sentido algunos autores consideran el segundo como una etapa del primero, aunque otros los consideran como técnicas diferentes.

De un lado el PCA trata de hallar componentes (factores) que sucesivamente expliquen la mayor parte de la varianza total, mientras que por otra parte el análisis factorial busca factores que expliquen la mayor parte de la varianza común.

En el análisis factorial se distingue entre varianza común y varianza única, siendo la primera la parte de la variación de la variable que es compartida con las otras variables, mientras que la varianza única es la parte de la variación de la variable que es propia de esa variable. En cambio, el PCA no hace esa distinción entre los dos tipos de varianza sino que, como se ha indicado, se centra en la varianza total.

Mientras que el PCA busca hallar combinaciones lineales de las variables originales que expliquen la mayor parte de la variación total, el análisis factorial pretende hallar un nuevo conjunto de variables, menor en número que las variables originales, que exprese lo que es común a esas variables, es decir, supone que existe un factor común subyacente a todas ellas.

En el PCA, el primer factor o componente principal sería aquel que explica una mayor parte de la varianza total, el segundo factor sería aquel que explica la mayor parte de la varianza restante, es decir, de la que no ha sido explicada por el primero, y así sucesivamente. De este modo sería posible obtener tantos componentes como variables originales aunque esto en la práctica no tiene

sentido ⁵⁷.

Teniendo en cuenta que el PCA se ha utilizado en algunos de los Capítulos que integran la presente Tesis, procederemos a comentarlo en mayor profundidad.

Análisis en componentes principales (PCA)

Como ya se ha comentado, uno de los aspectos importantes de la espectroscopia es el gran volumen de información que proporciona en un reducido espacio de tiempo; sin embargo, existen situaciones en las que parte de esta información no resulta relevante. En este sentido la Quimiometría juega un papel importante, puesto que una de sus numerosas aplicaciones ha sido el desarrollo de métodos de cálculo capaces de reducir, sin pérdidas relevantes, la ingente cantidad de datos analíticos que generan las técnicas instrumentales, con el fin de que la información quede contenida en un número reducido de variables.

El análisis de componentes principales (PCA) ^{58, 59} es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables), es decir, un método que ante un conjunto de datos con muchas variables, tiene como objetivo reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible (Jolliffe 1986) ^{60, 61}.

El objetivo del PCA consiste en dada una matriz de datos de dimensiones $n \times p$ que representa los valores de p variables en n objetos, investigar si es posible representar los objetos mediante r variables (siendo $r < p$) con poca (o ninguna, si es posible) pérdida de información. Estas nuevas variables descubiertas, llamadas **componentes principales** (PC, *Principal Components*), **factores** o también **variables latentes**, contienen la mayor parte de la variabilidad existente en el conjunto de los datos. Esto nos permite describir la información con un número considerablemente reducido de nuevas variables en relación a aquellas de que se disponía inicialmente. En definitiva, se trata de encontrar un nuevo conjunto de ejes ortogonales en el que la varianza de los datos sea máxima.

Hay que tener en cuenta que un análisis de componentes principales tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total.

Las reglas para el cálculo de los componentes principales resultan bastante sencillas. Así, el primer componente principal se corresponderá con aquella dirección, a través de los datos, que contenga la mayor variabilidad. El segundo componente principal, así como los posteriores, debe ser perpendicular al anterior y contener la máxima cantidad de la variabilidad remanente ⁶². Una idea de los componentes principales correspondientes a un grupo de datos queda reflejada en la Figura 12.

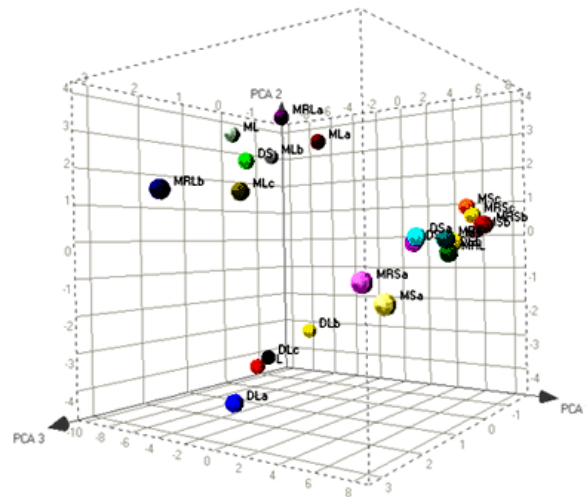


Figura 12. Ejemplo de componentes principales para un conjunto de datos.

Una vez conocidas las direcciones de los componentes principales es simple geometría la que nos permite expresar los valores de los objetos individuales en términos de los componentes principales, como combinaciones lineales de las variables originales multiplicadas por un coeficiente que describe el componente principal. Estos nuevos valores se conocen como puntuaciones factoriales (*scores*) y cada objeto tendrá una puntuación para cada componente principal.

Dichas puntuaciones se calculan mediante la expresión:

$$k \quad (14)$$

donde **a** son los coeficientes y **Z** son los valores estandarizados que tienen las

variables.

Previamente al cálculo de los componentes principales, suele ser conveniente centrar los datos de tal manera que estos varíen en torno a cero. Esto puede realizarse calculando el valor promedio de los valores obtenidos para cada una de las variables y luego restando dicho valor a cada uno de los mismos para cada una de ellas.

Pese a que las técnicas de calibración se comentarán más adelante, es necesario tener en cuenta que una de las tareas más complicadas a la hora de emplear cualquiera de las técnicas que implican una reducción previa de variables (como la regresión en componentes principales o la regresión parcial por mínimos cuadrados) es la elección del número de componentes principales (factores) que finalmente configuraran el modelo óptimo.

Elección del número de componentes principales

Los factores calculados se van ordenando de acuerdo con el grado de importancia que tienen para el modelo. Así, los primeros vectores del modelo es muy probable que sean los que están relacionados con los compuestos de interés, mientras que los últimos vectores generalmente contienen información relacionada con el ruido y que no resulta útil para la posterior predicción. De hecho, si estos últimos vectores están incluidos en el modelo las predicciones pueden resultar peores que para aquella situación en la que se excluyan.

De esta forma, la descomposición espectral empleando estas técnicas y la selección del número correcto de factores es una estrategia muy efectiva de eliminar el ruido.

A pesar de este efecto de reducción del ruido, si se emplean pocos factores para la construcción del modelo, la exactitud de la predicción para muestras desconocidas empeorará puesto que no se estarán empleando suficientes factores para el modelado de todas las variaciones espectrales que implican los componentes de interés. Además, resulta muy importante definir un modelo que contenga suficientes vectores para adecuarlo a los componentes de interés sin adicionar una contribución elevada de ruido.

Los modelos que incluyen vectores asociados al ruido o más vectores de los necesarios para la predicción sobre los componentes de interés se consideran sobredimensionados (*overfitting models*)⁶³. Por el contrario, los modelos que no incluyen el suficiente número de factores se conocen como subdimensionados (*underfitting models*)⁶⁴.

Aunque, no existe una clara indicación de cuantos factores se requieren para prevenir que se sobredimensione o se subdimensione el modelo, en la literatura están descritos un buen número de criterios que permiten seleccionar los subconjuntos de variables en el contexto del análisis de componentes principales, y entre los que podemos destacar los métodos de Jolliffe^{65,66} (1972, 1973), McCabe⁶⁷ (1984), Robert y Escoufier⁶⁸ (1976), Bonifas⁶⁹ (1984), Krzanowski^{70,71} (1987), Falguerolles y Jmel⁷² (1993), Tanaka y Mori⁷³ (1997) o los de Mori *et al.*^{74,75} (2000 a y b).

No obstante, uno de los más efectivos es el que calcula la suma de cuadrados del error residual de la predicción (PRESS, *Prediction Residual Error Sum of Squares*) para cada uno de los posibles factores⁷⁶.

Este parámetro se calcula construyendo un modelo de calibración con un número determinado de factores. A continuación, con la ayuda del modelo, se predice el parámetro que se pretende evaluar en objetos para los que el valor de dicho parámetro es conocido. Finalmente, la suma de los cuadrados de la diferencia entre los valores predichos y los conocidos proporciona el valor del PRESS para el modelo, tal y como expresa la siguiente fórmula.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (C_{p_{i,j}} - C_{i,j})^2 \quad (15)$$

donde **n** es el número de objetos sobre los que se ha llevado a cabo la predicción y **m** el número de componentes; **C_p** es la matriz de concentraciones predichas por el modelo para los distintos objetos, y **C** es la matriz de las concentraciones conocidas de los objetos.

El mínimo valor de PRESS es el que indica que método es el mejor para predecir las concentraciones de los componentes calibrados.

Calculando el valor del PRESS para un determinado modelo empleando distinto números de factores y posteriormente representado los resultados

en un gráfico se puede apreciar una clara tendencia.

La principal cuestión es saber qué datos deben emplearse para la etapa de predicción antes de calcular el valor de PRESS. Atendiendo a este aspecto podemos distinguir entre:

Auto-predicción (*Self-Prediction*)

Se trata del método más simple, al tiempo que el menos útil. En este método los modelos se construyen empleando todos los objetos que posteriormente serán predichos con los modelos desarrollados. El problema de este procedimiento es que los vectores del modelo se calculan a partir de los mismos objetos, por lo que al representar el valor del PRESS se puede apreciar que disminuye a medida que se van incluyendo más factores en el modelo, dando siempre la impresión de que todos los vectores están relacionados con los componentes y no existen vectores relacionados con el ruido, por lo que no resulta evidente seleccionar el número óptimo de factores del modelo, tal y como se aprecia en el ejemplo que se muestra en la Figura 13 y que corresponde a la validación de un conjunto de entrenamiento formado por 50 espectros de muestras de trigo medidas por reflectancia difusa en el rango NIR empleando el método de auto-predicción.

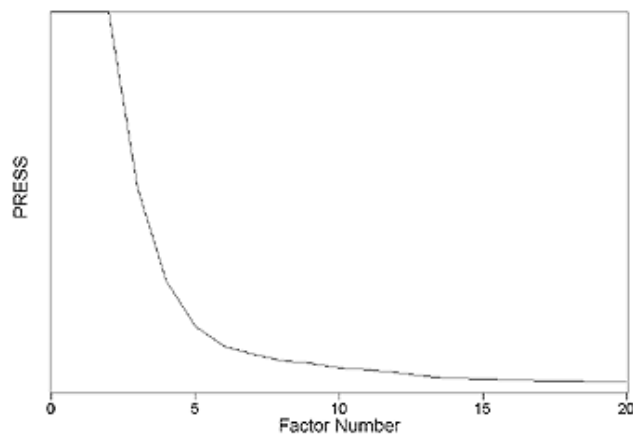


Figura 13. Gráfico del valor de PRESS en función del número de factores obtenido mediante el método de auto-predicción.

La única razón para emplear este método es que es muy rápido aunque, como ya se ha señalado, no indica el número óptimo verdadero de factores que se deben incluir en el modelo.

Validación cruzada (*Cross-Validation*)

La validación cruzada^{77, 78, 79} es, desde el punto de vista conceptual, muy simple de comprender, pero al mismo tiempo es el método que requiere de más cálculos para la optimización del modelo. En definitiva, la validación cruzada intenta simular la predicción de muestras desconocidas empleando el propio conjunto de entrenamiento. Para ello, la secuencia de pasos que se realizan para llevarla a cabo es la siguiente:

1. Se selecciona una muestra (o un grupo reducido de muestras en el caso de que el conjunto de calibración sea lo suficientemente grande), eliminándose toda la información de la misma (tanto espectral como de concentraciones) del conjunto de calibración y se coloca el contador de factores en $i = 1$.
2. Se emplea el resto del conjunto de calibración para llevar a cabo la descomposición y los cálculos para la calibración para el factor i .
3. Se predice la concentración de la muestra (o muestras) extraída del conjunto de validación empleando la ecuación de calibración establecida anteriormente y se calcula el valor del PRESS (i).
4. Se incrementa el contador de los factores ($i = i + 1$) y se repite desde el paso 2 hasta haber realizado todos los cálculos requeridos para el número máximo de factores considerados ($i = f$).
5. Se introduce de nuevo la/s muestra/s extraída/s previamente en el conjunto de calibración y se selecciona una muestra diferente (o un grupo de muestras), volviendo al paso 2 y repitiendo todos los cálculos descritos.

Cada vez que se excluye/n una/s muestra/s, el sistema añade el cuadrado del error residual calculado a todos los valores previos de

PRESS correspondiente al empleo de cada uno de los números de factores.

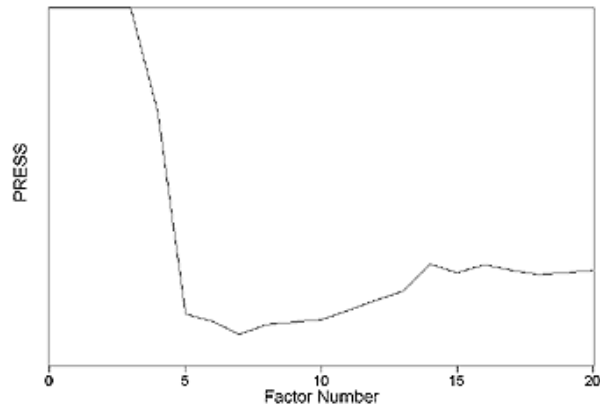


Figura 14. Representación del valor de PRESS en función del número de factores para la predicción mediante el método de la validación cruzada, considerando el mismo ejemplo mostrado en la Figura 13.

En la Figura 14 se representa la variación del PRESS en función del número de factores que se obtienen para la validación cruzada de los datos mostrados en el ejemplo anterior.

Como puede apreciarse, de 0 a 7 factores el error de predicción (PRESS) decrece a medida que se añade un nuevo factor al modelo. Esto indica que el modelo se encuentra subdimensionado y no hay suficientes factores para considerar completamente los compuestos de interés. También puede verse como el valor del PRESS alcanza un mínimo para, a continuación, comenzar de nuevo a crecer. Es a partir de este punto cuando el modelo comienza a adicionar factores asociados a ruido y que no pueden relacionarse con los componentes de interés. Cuando estos vectores se incluyen en el modelo, éste se sobredimensiona y su capacidad de predicción disminuye.

Existen dos ventajas importantes para la validación cruzada con respecto a otros métodos.

La primera ventaja de este procedimiento de selección del número óptimo de factores es la forma en como estima la ejecución del modelo.

Teniendo en cuenta que las muestras predichas no son las mismas que se emplean para la construcción del modelo, el valor de PRESS calculado de este modo puede considerarse un buen estimador del error en la exactitud del modelo cuando se emplee para una futura predicción de objetos desconocidos. De hecho, cuanto mayor sea el conjunto de calibración y menores los grupos de muestras excluidas en cada paso (en el mejor de los casos una muestra cada vez, aunque esto puede llevar mucho tiempo de cálculo) mejor será la estimación. Es como si el modelo se validara con un gran número de muestras desconocidas (ya que cada muestra del conjunto de entrenamiento se excluye al menos una vez) pero sin la necesidad de tener que medir un nuevo conjunto completo de objetos.

La segunda ventaja de la validación cruzada es que permite una mejor detección de los objetos discrepantes (*outliers*).

La validación cruzada es el único método que puede proporcionar una detección completa de datos discrepantes para el conjunto de datos de calibración. Ya que cada objeto se excluye de los modelos durante el proceso de la validación cruzada, es posible calcular cuan bien encaja el espectro del mismo en el modelo, pudiendo calcular una reconstrucción espectral y compararla con el espectro original del conjunto de calibración (a través del espectro residual). Si la concentración predicha para un objeto está fuera del rango y el espectro no encaja muy bien con el modelo, a pesar que el resto de datos funcionen muy bien, la muestra puede ser posiblemente un objeto discrepante. La identificación y eliminación de estos objetos discrepantes debe siempre mejorar la capacidad predictiva del modelo.

Resulta muy difícil llevar a cabo la detección de objetos discrepantes en el conjunto de calibración sin realizar una validación cruzada completa, ya que los resultados que se obtienen por la aplicación de otros métodos de validación (auto-predicción, predicción de la influencia o predicción sobre conjunto de validación) generalmente no resultan adecuados puesto que las predicciones se basan en un modelo construido con todas las muestras disponibles, esto es, incluyendo los posibles *outliers*. Desafortunadamente, la validación cruzada es un proceso muy costoso puesto que precisa recalcular los modelos para cada muestra excluida,

aunque es posible llevar a cabo una serie de aproximaciones. Así, si el número de objetos en el conjunto de calibración es demasiado grande, se puede excluir cada vez un grupo reducido de muestras. Este procedimiento obviamente no proporciona los mejores estadísticos para cada objeto individual, pero aumenta la rapidez de los cálculos y puede ser aceptable para determinar el número de factores del modelo aunque se merme la capacidad de detección de los posibles valores anómalos.

A pesar de lo comentado anteriormente, en ciertas situaciones, es preferible excluir al mismo tiempo grupos de objetos. La más evidente es aquella situación en las que el conjunto de calibración contiene réplicas de un mismo objeto. En este caso, las réplicas deben excluirse al mismo tiempo, puesto que sólo así se elimina completamente la contribución de ese objeto del modelo antes de realizar la predicción. En el caso de que una de las réplicas se utilice, habrá siempre en el conjunto de calibración un espectro similar al del objeto excluido, de manera que dicho objeto nunca podrá ser predicho como una muestra desconocida.

Otra posibilidad es emplear la validación cruzada para llevar a cabo la predicción sobre un conjunto de pseudo-validación. Si el conjunto de calibración es muy grande, la exclusión de la mitad de los objetos permite conseguir el mismo propósito. Construyendo el modelo con la mitad de los objetos del conjunto de calibración y empleando la otra mitad para obtener la predicción del modelo. En este caso, la representación del valor de PRESS proporcionará una tendencia similar. La ventaja añadida es que todos los objetos pueden, en última instancia, emplearse para construir la calibración final, haciéndola mucho más robusta.

Predicción de la influencia

Este método es un compromiso entre una validación cruzada completa (que resulta muy lenta, pero que proporciona el mejor estimador de cómo actúa el modelo a la hora de predecir muestras desconocidas) y una auto-predicción (que es mucho más rápida, pero proporciona una información limitada sobre la capacidad

predictiva del modelo).

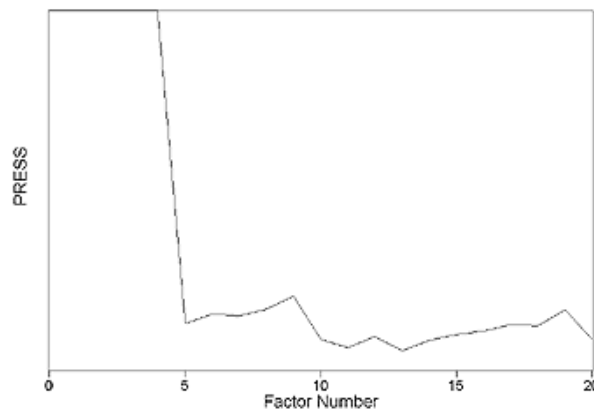


Figura 15. Representación del valor de PRESS en función del número de factores para la validación de la influencia de un modelo de regresión en componentes principales con los mismos datos que los considerados en la Figura 13.

Para el método que nos ocupa, los modelos se construyen empleando todos los objetos, de forma similar al método de la auto-predicción. De todos modos, cuando se predicen los objetos, las puntuaciones se corrigen según la influencia de los objetos individuales. La influencia es una medida de la importancia de la muestra para todas las ecuaciones del modelo. Generalmente, las muestras que presentan valores de concentración en los extremos del rango de concentraciones presentarán mayores influencias, mientras que las muestras que presentan una concentración cercana a la concentración media presentarán influencias bajas. Si una muestra simple tiene una influencia que resulta significativamente mayor que el resto del conjunto de entrenamiento, esto puede indicar que el espectro resulta muy diferente al resto de los espectros del conjunto de entrenamiento y no representa a la muestra actual, constituyendo lo que anteriormente se ha definido como valor anómalo, discrepante u *outlier*.

En el ejemplo que muestra la Figura 15, correspondiente al procesamiento de los mismos datos considerados en las Figuras 13 y 14, puede observarse que el mínimo se encuentra en 13 factores; sin embargo, sería posible discutir la elección de 11 factores como valor

óptimo. En cualquier caso, los resultados son mayores que los 7 factores que se obtenían mediante la validación cruzada para el mismo conjunto de datos.

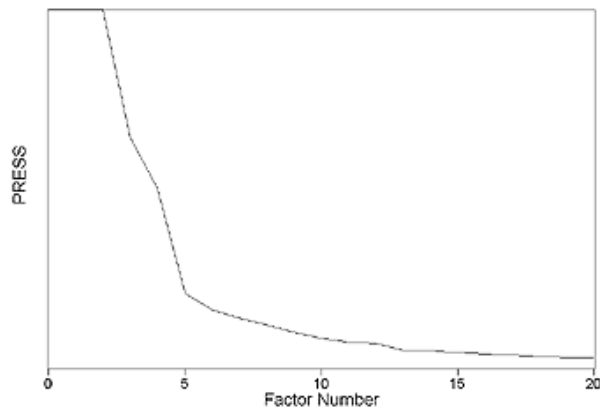


Figura 16. Representación del valor de PRESS en función del número de factores para la validación de la influencia del modelo de regresión parcial por mínimos cuadrados construido con los mismos datos que los considerados en la Figura 15.

Cuando se emplea este método, los modelos se calculan una sola vez, de manera que la velocidad de análisis aumenta significativamente. Sin embargo, la corrección de la influencia se aplica a las puntuaciones asumiendo que se emplearán posteriormente en la regresión. Así pues, el resultado es que la validación influyente funciona bastante bien para los modelos de regresión en componentes principales (PCR) pero sufre los mismos problemas que la auto-predicción cuando se aplica a los modelos de regresión parcial mediante mínimos cuadrados (PLS), puesto que los modelos PLS no utilizan un paso de regresión independiente. Este fenómeno puede apreciarse en la comparación de las figuras 15 y 16. En ésta última, como se puede apreciar, para el mismo conjunto de datos considerado, no se alcanza un valor mínimo de PRESS dentro de los 20 factores calculados.

Predicción sobre un conjunto de validación (*validation set prediction*)

Este método proporciona el mejor estimador de la capacidad predictiva del modelo ya que ninguna de las muestras que se emplean en el conjunto de validación ha sido empleada para construir el modelo.

El inconveniente de emplear un conjunto de validación aparte es el tiempo y el coste implicado en la generación de los datos. Cuando se emplea el método del conjunto de validación, generalmente se mide un conjunto muy grande de datos de entrenamiento (espectros y concentraciones). Dicho conjunto, posteriormente, se divide en dos grupos: un conjunto de datos de entrenamiento y un conjunto de datos de validación. En función del número de muestras disponibles, las divisiones podrían ser 80 / 20 %, 60 / 40 %, o incluso 50 / 50 %.

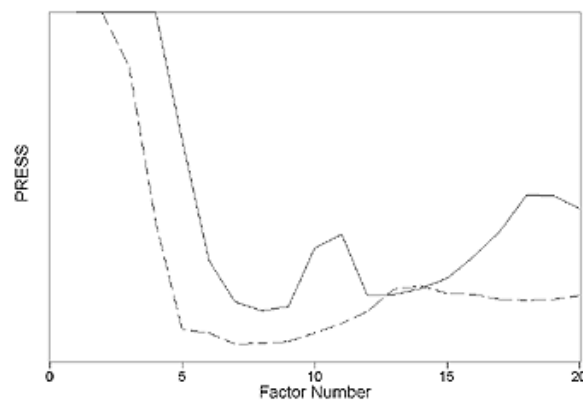


Figura 17. Representación del valor de PRESS en función del número de factores para la predicción de un conjunto de validación (línea continua) y la predicción mediante una validación cruzada (línea discontinua) para los mismos datos considerados en la Figura 13.

La principal ventaja de la predicción del conjunto de validación es la capacidad para comprobar el funcionamiento del modelo con un conjunto de datos totalmente distinto a los datos empleados para la calibración y el entrenamiento. Esto es muy importante para determinar el periodo de estabilidad del modelo. Si un modelo se construye y se emplea para la predicción de muestras durante un tiempo prolongado, no existe garantía

de que, por ejemplo, el espectrómetro continúe funcionando exactamente de la misma manera y, por tanto, los espectros registrados puedan ser tratados con el mismo modelo proporcionando resultados adecuados. Existen muchos factores que afectan al espectro de una muestra y que no pueden controlarse completamente: desgaste del detector y del espectrómetro, manipulación de la muestra, condiciones ambientales (humedad, temperatura). Empleando un conjunto de validación grande para la selección del modelo es una manera de asegurarse de que las concentraciones predichas están todavía dentro del rango de exactitud deseada.

En la Figura 17 se muestra una comparación de los valores de PRESS que se obtienen al emplear los métodos de la validación cruzada y la predicción sobre un conjunto de validación, pudiéndose observar que en el empleo de este último el mínimo valor de PRESS se encuentra en 8 factores.

Selección del número de factores basada en el valor de PRESS

Con el fin de evitar la construcción de un modelo sobre o subdimensionado, el número de factores para los que se alcanza un valor mínimo del PRESS debería ser la elección obvia para conseguir el mejor modelo (exceptuando el caso de la auto - predicción). A pesar de que el mínimo valor de PRESS puede ser la mejor elección para la predicción de un conjunto particular de muestras, es probable que no sea el óptimo para la predicción, en un futuro, de todas las muestras desconocidas.

Teniendo en cuenta que existe un número finito de muestras en el conjunto empleado para la predicción, en muchos casos el número de factores que proporciona el mínimo valor del PRESS puede resultar sobredimensionado para la predicción de muestras desconocidas. En otras palabras, existe la posibilidad estadística de que algunos de los vectores relacionados con el ruido, resultantes de la descomposición espectral, puedan estar presentes en alguna de las muestras. Estos vectores, puede parecer que mejoran ligeramente la calibración cuando, a través de una correlación aleatoria, se añaden al modelo. Sin embargo,

si estos mismos vectores asociados al ruido no se encuentran presentes en futuras muestras desconocidas (y es muy probable que no lo estén) las concentraciones predichas presentarán unos errores de predicción considerablemente más grandes que si dichos vectores se excluyen del modelo.

Una posible solución a este problema consiste en comparar el valor del PRESS mínimo con los valores del PRESS de todos los factores anteriores, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$F \text{ ratio}_i = \frac{PRESS_i}{PRESS_{min}} \quad (16)$$

donde i indica el número de factores en el modelo.

La relación entre estos valores se puede calcular y asignar a una significación estadística basada en el número de muestras empleadas en el conjunto de calibración.

Esta relación es un indicador de la significación relativa de cada modelo construido para un número dado de factores con el modelo formado por el número de factores que proporcionan un mínimo valor de PRESS. El número de factores para el cual la relación F presente un valor inferior al valor tabulado para una prueba F unilateral con un porcentaje de nivel de significación predefinido determina el número óptimo de factores para el modelo. Basándonos en un criterio meramente empírico, el valor de dicho nivel de significación recomendado por Haaland y Thomas es de $\alpha = 0.25$ ⁸⁰.

Para emplear de forma adecuada las tablas del estadístico F es necesario conocer los grados de libertad tanto del numerador (n_1) como del denominador (n_2) de la relación F . En relaciones de F basadas en los valores del PRESS, se considera como valor verdadero para ambos el número de muestras empleadas para la calibración del modelo. Además, en el caso de la validación cruzada, los grados de libertad deberían ser el número total de muestras del conjunto de entrenamiento menos el número de muestras excluidas en cada grupo. Para la predicción de un conjunto de validación, debería ser el número total de muestras del conjunto de entrenamiento.

La aplicación de una prueba F para los valores del PRESS obtenidos a través del método de la auto-predicción generalmente no funciona. Esto se debe al hecho

de que la prueba F está diseñada, ante todo, para encontrar el número de factores estadísticamente óptimo para la predicción de muestras que no están incluidas en la construcción del modelo.

Como etapa final, una vez seleccionados los componentes principales, se representan en forma de matriz. Cada elemento de ésta representa las correlaciones entre las variables y los componentes principales. La matriz tendrá, por tanto, tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables.

Un aspecto clave en el análisis de componentes principales es la interpretación de dichos componentes, ya que ésta no viene dada a priori, sino que debe ser deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales: habrá que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones. Esto no siempre es fácil y resulta de vital importancia el conocimiento que se tiene sobre la materia de investigación.

Para que un factor sea fácilmente interpretable debe tener las siguientes características, que son difíciles de conseguir:

- Los coeficientes factoriales deben ser próximos a 1.
- Una variable debe tener coeficientes elevados sólo con un factor.
- No deben existir factores con coeficientes similares.

2.5.2 Métodos cuantitativos de análisis en espectroscopia infrarroja

Pese a que la Quimiometría posee gran cantidad de aplicaciones y de muy diversa naturaleza, en los trabajos que engloban esta Memoria la aplicación de la misma se ha centrado principalmente en el desarrollo de diferentes métodos cuantitativos de análisis mediante espectroscopia infrarroja, tanto en la región media como en la región cercana del espectro, con el fin de poder relacionar las diferentes señales espectroscópicas obtenidas con las propiedades o parámetros de las distintas muestras analizadas.

2.5.2.1 Modelos para la calibración univariante

Como se ha señalado con anterioridad, para poder emplear la calibración univariante en la espectroscopia cuantitativa es necesario que exista un soporte teórico que la justifique. Un claro ejemplo es la Ley de *Lambert-Beer* que indica que la relación entre la absorbancia, a una determinada longitud de onda, de un determinado analito A_a y la concentración de interés del mismo c_a es:

$$A_a = \epsilon l c_a \quad (1)$$

donde ϵ es el coeficiente de absortividad molar del analito para esa longitud de onda y l es la longitud del camino óptico. Si el camino óptico es el mismo en todas las medidas, los términos ϵl se pueden agrupar en una constante $s_{\lambda,a}$ que es la absorbancia a concentración unidad 1:

$$A_a = s_{\lambda,a} c_a \quad (17)$$

No obstante en la muestra pueden existir otras especies (disolvente, reactivos, otros analitos,...) que también contribuyen a la absorbancia total A para esa longitud de onda:

$$A = s_{\lambda,a} c_a + s_{\lambda,b} c_b + \dots + s_{\lambda,k} c_k \quad (18)$$

Si su contribución es la misma en los patrones y en las futuras muestras a analizar, estos términos se pueden agrupar en una constante A_0 , dando lugar a la expresión:

$$A = A_0 + s_{\lambda,a} c_a \quad (19)$$

que se corresponde con la ecuación de la recta de calibración habitual, $y = a + bx$.

Para el caso del tratamiento de los datos espectroscópicos se dispone de una variable y (absorbancia), aleatoria y que se denomina respuesta o dependiente, que se supone relacionada con otra variable x (no necesariamente aleatoria) y que se denomina predictor o independiente (concentración). De este modo, a partir de un conjunto de n objetos para los que se dispone de los valores de ambas variables, $\{(x_i, y_i), i = 1, \dots, n\}$, es posible establecer una relación existente entre ambas.

El problema que subyace a la metodología de la regresión lineal simple es el de encontrar la relación (recta de regresión) que ajuste adecuadamente el conjunto de datos y que pueda ser empleada para predecir los valores de x a partir de los de y .

Tradicionalmente se ha recurrido para ello al método de mínimos cuadrados, que elige como recta de regresión aquella que minimiza las distancias verticales de las observaciones a la recta. Más concretamente, se pretende encontrar valores de a y b tales que den lugar al mínimo valor para la expresión:

$$\text{Min}_{\substack{a \in \mathbb{R} \\ b \in \mathbb{R}}} \sum_{i=1}^n (Y_i - a - bX_i)^2 \quad (20)$$

Resolviendo este problema mediante un sencillo cálculo de diferenciación, se obtienen los estimadores mínimos cuadráticos de los coeficientes de la recta de regresión:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{s_{xy}}{s_{xx}} \quad (21)$$

$$a = \bar{Y} - b\bar{X} \quad (22)$$

La contribución constante se puede modelar (en cuyo caso esperaríamos que $a = A_0$), o eliminar haciendo un blanco (y esperaríamos obtener $a = 0$).

Como ya se ha comentado en alguna ocasión, generalmente los sistemas químicos estudiados son complejos, de manera que para realizar correctamente una predicción con este modelo univariante, la absorbancia de las muestras problema sólo puede variar debido al analito de interés (bien en sistemas simplificados, tras separar el analito de las interferencias previa extracción o empleando reactivos específicos o técnicas de enmascaramiento, bien en sistemas que implican una serie de restricciones o aproximaciones a la región de aplicación del modelo a través de la búsqueda de una longitud de onda en la cual sólo absorba el analito de interés), debiendo ser la contribución de las otras especies la misma que se ha modelado (por ejemplo, empleando el método de las adiciones de patrón)⁸¹.

Sin embargo hay que tener en cuenta que algunas soluciones no sólo implican manipular más la muestra en el laboratorio, lo cual puede constituir una fuente de

error e incrementar el coste del análisis, sino que además implican la posibilidad de que no se alcance la selectividad requerida ⁸².

Una alternativa consiste en aprovechar que la espectroscopia proporciona fácilmente múltiples respuestas (señales multivariantes) y buscar la selectividad de forma matemática utilizando tratamientos espectrales previos o empleando la calibración multivariada.

2.5.2.2 Modelos para la calibración múltiple y multivariante (primer orden)

Es evidente que lo más sencillo y rápido para modelar el comportamiento de una variable es la calibración univariante. Sin embargo, existen ocasiones en las que resulta bastante obvio que el comportamiento de una determinada variable es imposible que sea explicado en gran medida por sólo una variable.

Si anteriormente hemos detallado el método de la regresión lineal univariante, mediante el que se obtenían modelos capaces de predecir una variable independiente (como la concentración de un analito) conociendo los valores de otra variable correlacionada con ella, variable dependiente (como la altura o el área de una banda de absorción característica), a continuación se procederá a describir los métodos de predicción cuantitativos considerando aquellas situaciones en las que resulta necesario tener en cuenta varias variables dependientes (como por ejemplo una región espectral) para predecir el valor de una única variable independiente (regresión múltiple), o también, para la predicción de varias variables interdependientes (regresión multivariante).

Como se ha descrito anteriormente, para la construcción del modelo de calibración lineal simple la señal instrumental **y** se ajustaba a través de una recta a las concentraciones **x** de una serie de estándares y una vez establecido, dicho modelo se utilizaba de forma inversa, esto es, para la predicción de valores de **x** a partir de valores de **y** (modelo “de retroceso”).

En cambio, en la predicción múltiple y multivariante, se emplean preferentemente modelos en los que la variable independiente, **x**, es siempre la predictora (una señal instrumental o una combinación lineal de varias señales instrumentales), tanto en la etapa de calibración como en la de predicción, y la

variable dependiente, **y**, es siempre la respuesta (por ejemplo, la concentración).

Dentro de la calibración multivariable, es posible clasificar los modelos en dos grandes grupos: **métodos rígidos**, en los que resulta necesario disponer de información sobre todas aquellas especies presentes que pueden contribuir a la señal, y **métodos flexibles**, en los que únicamente es necesario disponer de información de aquellos componentes que se pretenden cuantificar, aunque hayan presentes otras especies o fenómenos físicos que contribuyan a la señal registrada.

También es posible hacer una distinción entre **métodos de espectro completo**^{83, 84}, donde se utilizan todos los números de onda de que se dispone sin ninguna selección previa, o **métodos de selección de variables**⁸⁵, en los que se emplea un número reducido de variables. Además, dentro de los métodos de espectro completo es necesario destacar aquellos en los que se realiza una compresión de variables, basados en la descomposición de los datos en componentes principales.

Pese a que existen varios métodos de predicción para cada uno de los tipos anteriores, nos centraremos en detallar únicamente aquellos que se han empleado para el desarrollo de la presente Memoria de Tesis.

Regresión lineal múltiple

Con la regresión lineal simple es posible analizar si puede admitirse o no una relación de tipo lineal entre la variable independiente **x** y la dependiente **y**. Sin embargo, en la mayoría de los procedimientos espectroscópicos, lo habitual es que la variable dependiente **y** trate de expresarse también de forma lineal teniendo en cuenta que son varias las variables independientes (**x**₁, **x**₂, ... , **x**_k), según una expresión del tipo:

$$y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k \quad (23)$$

De esta forma, el propósito de la regresión lineal múltiple sigue siendo, por un lado, determinar cuáles de las covariables independientes **x**₁, **x**₂, ... , **x**_k son significativas a la hora de explicar la variable dependiente **y** para, luego, estimar los parámetros **b**₁, **b**₂, ..., **b**_k.

Por su parte, el modelo de regresión lineal multivariante consiste en un sistema de ecuaciones con tantas ecuaciones como respuestas interesa predecir.

Tanto en calibración múltiple como en calibración multivariante, la necesidad de incluir varias variables predictoras para predecir una o varias respuestas, respectivamente, surge de la presencia de distintas fuentes de varianza que pueden influir sobre ellas.

Este método de regresión lineal múltiple es recomendable utilizarlo en presencia de dos o tres fuentes de varianza, y cuando no existe una correlación muy alta entre las variables predictoras⁸⁶.

Modelos de calibración multivariante basados en reducción de variables

Cuando se dispone, entre otros, de espectros de infrarrojo, la selección de las variables a incluir en los modelos construidos mediante regresión lineal múltiple implica la pérdida de información útil. El aprovechamiento de toda la información útil, sin complicar el modelo y sin deteriorar sus prestaciones, se consigue mediante la rotación propia, que permite obtener los componentes principales.

Tal y como hemos descrito previamente, estos métodos se fundamentan en que la información presente en las variables de la señal medida experimentalmente puede estar contenida en un número menor de variables sin que haya pérdida de información relevante. El modelo de calibración se construye, no sobre los datos originales, sino sobre dichas nuevas variables, simplificándose en gran medida no sólo el modelo sino también la interpretación de los resultados.

Cualquier correlación entre las variables dependientes y las pertinentes variables latentes se establece a través de un modelo de regresión.

El proceso de regresión puede llevarse a cabo después de la creación de las variables latentes para las variables independientes y la eliminación de aquellas fuentes de variación que se considera que no tienen ninguna relación con los efectos sistemáticos que están siendo estudiados.

A- Regresión en componentes principales (PCR, *Principal Component Regression*)

La regresión en componentes principales aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión lineal múltiple (MLR) de la propiedad a determinar (datos del bloque y) sobre las puntuaciones de los componentes principales más importantes obtenidas en el PCA en lugar de realizarla sobre los datos originales. No existe pérdida de información útil, ya que las puntuaciones contienen la misma información que los datos originales pero habiendo eliminado el ruido ⁸⁷.

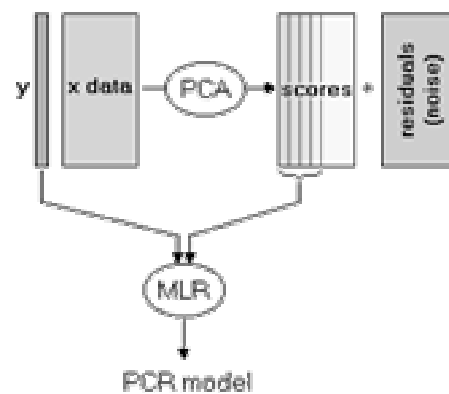


Figura 18. Esquema del fundamento de la regresión en componentes principales

Para construir modelos de regresión en componentes principales es conveniente preparar la matriz de datos \mathbf{X} realizando un centrado por columnas, que facilita los cálculos, y una ponderación distinta para cada variable, lo que puede contribuir muy eficazmente a mejorar el modelo final de regresión ⁸⁸. A continuación, se extraen los componentes principales de la matriz \mathbf{X} previamente procesada. El punto más importante de la regresión en componentes principales, igual que ocurre en la regresión lineal múltiple, es la selección adecuada de los vectores propios (variables, factores o componentes principales) que van a ser incluidos para evitar los problemas derivados de la subdimensión o la

sobredimensión del modelo. Así, deben incluirse aquellos componentes principales que explican las fuentes de varianza correlacionadas con la respuesta, mientras que deben excluirse los que contienen única y exclusivamente ruido. Dicha selección se efectúa a través de algunos de los métodos que se han detallado en un anterior apartado.

La regresión en componentes principales presenta ciertas ventajas con respecto a la regresión lineal múltiple:

- El ruido se mantiene en los residuales, ya que los vectores propios que muestran bajos valores propios representan sólo aquellas partes de los datos con una pequeña varianza.
- Los coeficientes de regresión son mucho más estables; esto se debe al hecho de que los vectores propios resultan ortogonales entre ellos.

Por otro lado, el empleo de los componentes principales como variables predictoras se fundamenta en la suposición de que las fuentes de varianza de mayor relevancia del bloque **X** se deben a variaciones en las concentraciones de los analitos e interferentes, y a los cambios del efecto matriz, producidos a lo largo del conjunto de estándares. Esta suposición resulta cierta si se ha establecido un buen diseño para el bloque **Y**, y las variables de ambos bloques, **X** e **Y**, realmente están correlacionadas.

Sin embargo, uno de los principales problemas que comporta el empleo de este tipo de regresión es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos puede que no resulten ser los más apropiados para efectuar la predicción de los parámetros que pretenden determinarse en los diferentes objetos de estudio.

Una posible solución a este problema consiste en establecer un modelo de calibración que intente concentrar el máximo poder de predicción en los primeros componentes principales. Este nuevo método es la **regresión parcial por mínimos cuadrados**.

B- Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR, *Partial Least Squares Regression*)

El método de regresión parcial por mínimos cuadrados fue desarrollado por H. Wold en 1975 ⁸⁹ y, al igual que la regresión por componentes principales, se basa en una transición lineal desde un elevado número de descriptores originales, hasta un espacio de nuevas variables basado en un pequeño número de factores ortogonales.

Sin embargo, para este método de regresión se emplean como variables predictoras aquellos vectores que establecen un compromiso razonable entre explicar una determinada cantidad de varianza y estar correlacionados con las respuestas. Dichos vectores reciben el nombre de variables latentes ⁸⁰.

La idea principal es calcular a través de las pertinentes descomposiciones, y en ocasiones tras los tratamientos de centrado y escalado de las variables originales ⁹⁰, las variables latentes para las matrices de datos **X** e **Y** con el fin de establecer un modelo de regresión entre dichas variables (y no entre los datos originales), como muestra el siguiente diagrama.

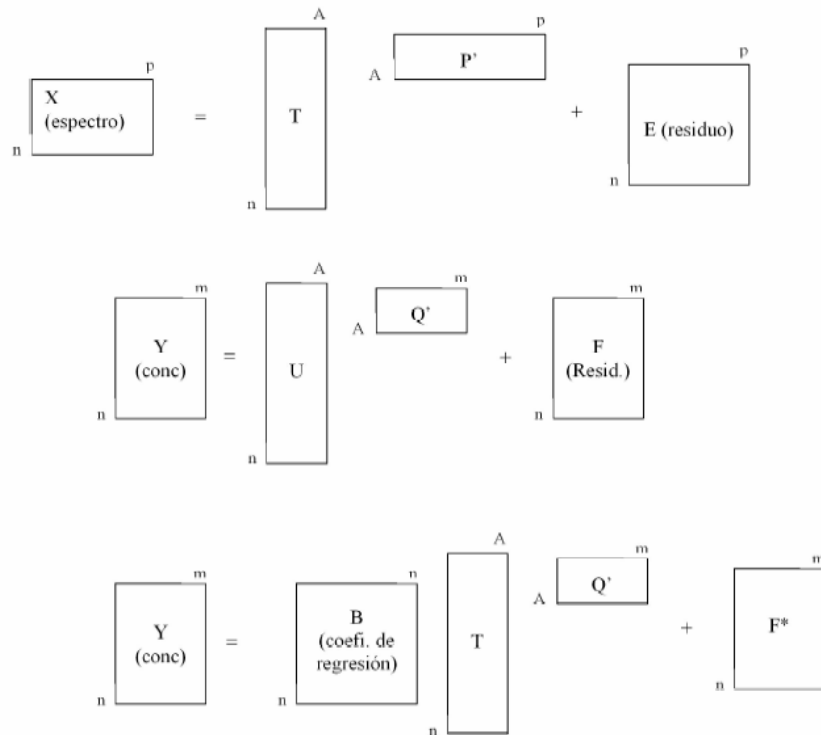


Figura 19. Representación gráfica de las relaciones internas y externas del modelo PLS ⁹¹.

Existen dos versiones del algoritmo PLS: PLS1 ⁹² (para regresión múltiple) y PLS2 ⁹³ (para regresión multivariante), y a pesar de que las diferencias entre ambos aparentemente son bastante sutiles, tiene efectos importantes en lo que a resultados se refiere.

Del mismo modo que el método PCR, el algoritmo PLS2 calibra todos los componentes de forma simultánea. En otras palabras, los resultados de la descomposición espectral para ambas técnicas proporcionan un conjunto de puntuaciones y un conjunto de vectores para la calibración de todos los componentes. Además, los vectores no se optimizan para cada componente individual. Esto puede sacrificar algo de precisión en las predicciones de las concentraciones de los componentes, especialmente cuando se trata de mezclas de muestras complejas.

Por el contrario, para el algoritmo PLS1, se calcula un conjunto de

puntuaciones y de vectores de carga para cada uno de los componentes de interés. En este caso, los conjuntos separados de vectores principales y puntuaciones están en perfecta sintonía con cada componente, y además, proporcionan predicciones más precisas que PCR o PLS2.

Existe, no obstante, una pequeña desventaja en el empleo del algoritmo PLS1 puesto que se debe generar un conjunto de vectores para cada uno de los componentes, de manera que los cálculos requieren más tiempo. Esta variable puede resultar bastante significativa para conjuntos de entrenamiento con un gran número de muestras y componentes.

Sin embargo, el algoritmo PLS1 puede tener una mayor ventaja cuando se analizan sistemas que presentan concentraciones de los componentes que varían ampliamente. Por ejemplo, un conjunto de espectros de calibración conteniendo un componente en un rango de concentración entre el 50 % y el 70 % y un segundo componente en un rango de concentración entre 0.1 y 0.5 %. En este caso, el algoritmo PLS1 proporcionará mejores predicciones que otras técnicas. Sin embargo, si los rangos de concentración de los componentes son similares, el algoritmo PLS1 no presenta ventajas sobre el PLS2 y además requerirá más tiempo para los cálculos.

El punto más importante cuando se ajusta un modelo PLS es tomar una decisión sobre el número óptimo de variables latentes implicadas en el mismo. Así, en la construcción del modelo de regresión se utilizarán las primeras variables latentes equivalentes al número de fuentes de varianza significativas presentes en el bloque **X**, que además estén correlacionadas con la respuesta.

Mientras que para el caso de otros modelos esta elección puede llevarse a cabo a través de diferentes criterios, para la regresión PLS el número idóneo de vectores debe determinarse empíricamente mediante una validación cruzada de cada modelo PLS generado al incorporar un número creciente de vectores, siguiendo el orden descendente del valor del cuadrado de la covarianza de dicho vector con la respuesta. En este sentido, el modelo que presente un menor valor para la suma de

cuadrados del error de predicción (PRESS) puede considerarse como el mejor o el más idóneo de los modelos (ver Figura 20).

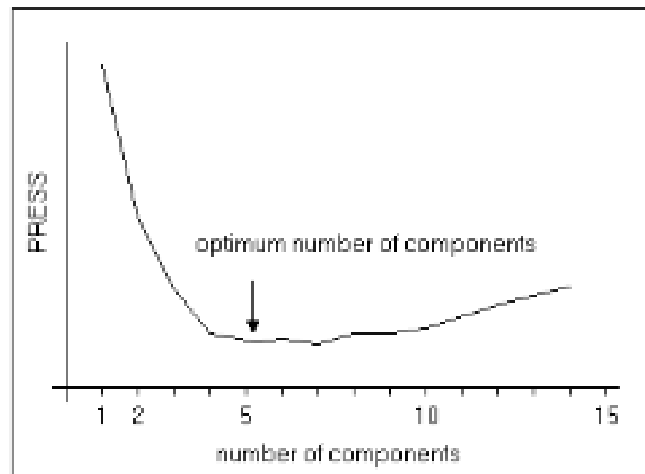


Figura 20. Ejemplo de la variación del PRESS en función del número de variables latentes en la regresión PLS.

Como puede apreciarse, a diferencia del PCR, para el caso del PLS las variables latentes son elegidas de manera que proporcionen la máxima correlación con las variables dependientes; de manera que el modelo PLS contiene el mínimo número de factores necesario ⁹⁴. Además, la inclusión de un número excesivo de factores en el modelo aumenta la exactitud de la descripción pero puede disminuir la capacidad predictiva en tanto que el modelo comienza a representar no sólo la correlación entre las variables y la concentración sino también ruido aleatorio y características individuales del conjunto de entrenamiento.

También, el método PLS permite detectar la relación entre la concentración y las variables incluso en aquella situación en la que las variables originales presentan poca contribución a los primeros vectores.

Este concepto queda ilustrado en la Figura 21 en la que se representa un hipotético conjunto de datos con dos variables independientes, x_1 y x_2 , y una variable dependiente y . En la figura, puede apreciarse fácilmente

que las variables originales x_1 y x_2 se encuentran fuertemente correlacionadas.

A partir de ellas, podemos obtener dos factores ortogonales (variables latentes) t_1 y t_2 que son combinaciones lineales de las variables originales.

Como resultado, se puede obtener un modelo que relaciona la variable dependiente y con la primera variable latente t_1 .

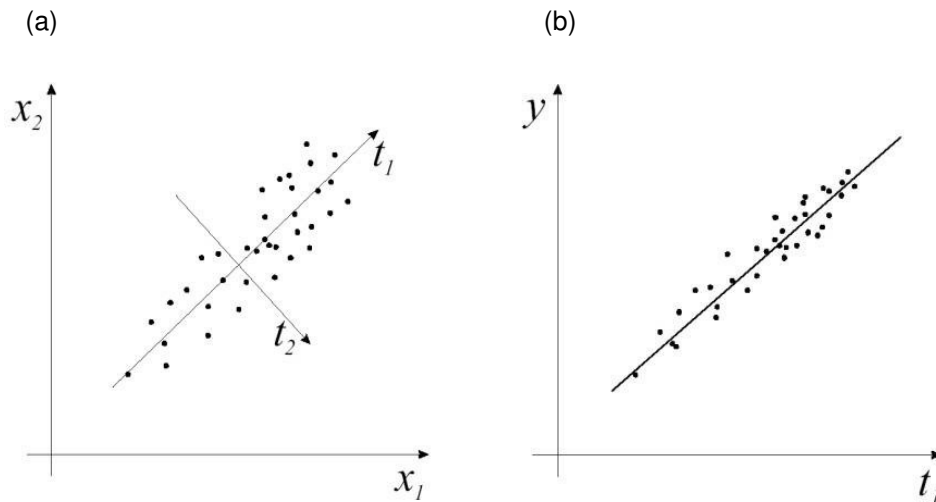


Figura 21. Transformación de las variables originales en variables latentes (a) y construcción del modelo conteniendo un factor PLS (b).

Existen diferentes algoritmos para poder llevar a cabo una regresión parcial por mínimos cuadrados y que muestran ligeras variaciones sobre los resultados obtenidos.

El algoritmo de iteración más comúnmente empleado es el que se conoce bajo su acrónimo en inglés como algoritmo NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), sin embargo, también puede calcularse por descomposición en valores singulares (*singular value decomposition*), que resulta mucho más rápido que el anterior.

A diferencia del PCR, la regresión PLS es un proceso que se desarrolla en un único paso, es decir, se lleva a cabo la descomposición simultánea tanto de los datos espectrales como de los datos de concentración. Cada vez que se calcula un factor para el modelo, las puntuaciones se intercambian antes de que la contribución de dicho factor sea eliminada de los datos originales.

Las nuevas matrices de datos reducidas se emplean posteriormente para calcular el siguiente factor, y así sucesivamente hasta calcular el número de factores deseado.

Desafortunadamente esto provoca que las ecuaciones para el modelo de regresión PLS resulten significativamente más complejas que las empleadas para PCR.

Como hemos mencionado previamente, una de las ventajas que ofrece el método de regresión PLS es que los vectores espectrales resultantes están directamente relacionados con los compuestos de interés. Esto es totalmente distinto en PCR, donde los vectores simplemente representan las variaciones espectrales más comunes en los datos, ignorando por completo su relación con los compuestos de interés hasta el paso final de la regresión.

Ventajas del algoritmo PLS

- Las calibraciones son generalmente más robustas siempre que el conjunto de calibración refleje de una forma exacta el rango de variabilidad que cabe esperar para las muestras desconocidas.
- Puede emplearse para el análisis de muchas mezclas complejas dado que sólo se requieren conocimientos acerca de los constituyentes de interés.
- En ocasiones puede emplearse para predecir los parámetros de interés en muestras que contienen componentes adicionales que no se encuentran presentes en las mezclas de calibración originales.

Mientras que todas estas técnicas anteriormente comentadas han sido

aplicadas con éxito para el análisis espectral cuantitativo, los argumentos reflejados en la literatura científica generalmente muestran que el PLS tiene una capacidad de predicción superior. En muchos casos, los métodos PLS proporcionarán mejores resultados que el PCR y, en concreto, el algoritmo PLS1 será más preciso que el algoritmo PLS2. De todos modos, existen muchas situaciones documentadas en la literatura donde ciertas calibraciones se han llevado a cabo mejor empleando PCR o PLS2 en lugar de PLS1.

Desventajas de la regresión PLS

- Los cálculos resultan más lentos que en el caso de los métodos clásicos, especialmente cuando se emplea el algoritmo PLS1.
- Los modelos son mucho más abstractos y en consecuencia resultan mucho más difíciles de comprender y de interpretar.
- Para una calibración adecuada generalmente se requiere un número elevado de objetos.
- La elección de las muestras de calibración puede resultar difícil puesto que debe evitarse la colinearidad de las concentraciones de los constituyentes.

Redes neuronales artificiales (RNA)

La idea que animó el modelo conexionista fue la de imitar el sistema de computación más complejo de los que se conocen hasta ahora, que es el cerebro. El cerebro está formado por millones de células llamadas neuronas, que funcionan como unos procesadores de información muy sencillos, con un canal de entrada de información (dendritas), un órgano de cómputo (soma) y un canal de salida de información (axón) ⁹⁵.

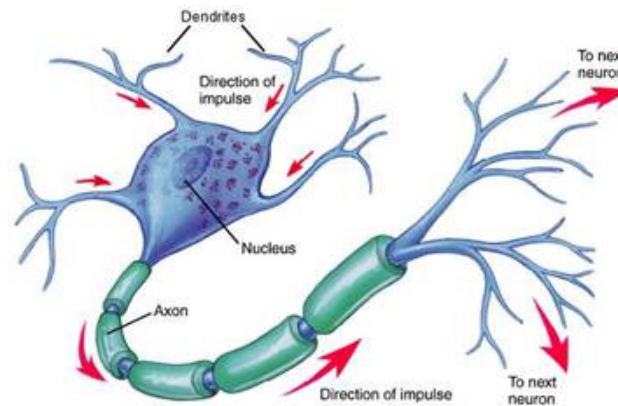


Figura 22. Representación de una neurona biológica.

De esta forma, las RNA imitan en cierto modo la estructura física y el modo de operación de un cerebro ⁹⁶. Teniendo en cuenta que el cerebro presenta las cualidades de procesamiento paralelo, procesamiento distribuido y adaptabilidad, un sistema de RNA dispone también de estas características ⁹⁷.

El sistema resulta ser intrínsecamente paralelo porque está formado por un conjunto de neuronas, cada una de las cuales realiza un procesamiento muy simple. El sistema es distribuido ya que la información no se almacena localmente en ciertas zonas concretas de la RNA, sino que se halla presente por toda ella, en concreto, se almacena en la sinapsis entre las diferentes neuronas. De igual forma, la computación es también distribuida. Al calcular la respuesta de la red neuronal, intervienen todos y cada uno de los procesadores elementales, los cuales se hallan distribuidos por toda la arquitectura de la red. Además, este carácter distribuido hace que la red presente una cierta tolerancia a posibles fallos: si se pierde una parte de las neuronas no se pierde toda la información.

Una red neuronal artificial presenta además un grado de adaptabilidad que se concreta en las capacidades de aprendizaje y generalización. Por aprendizaje entendemos la capacidad para recoger información de las experiencias y utilizarlas para actuar ante situaciones futuras. Estrechamente

relacionada con el aprendizaje está la generalización, que podría definirse como la capacidad para abstraer la información útil, más allá de los casos particulares. De esta manera, una RNA es capaz de responder ante casos desconocidos.

Las redes neuronales artificiales han experimentado un creciente interés durante los últimos años, aplicándose con éxito para resolver una ingente cantidad de problemas en campos tan diversos como la medicina ⁹⁸, la ingeniería, la geología ⁹⁹, la física y como no, también la química ¹⁰⁰. De hecho, allí donde existe un problema de predicción, clasificación o control, se han introducido las redes neuronales artificiales. Este éxito puede atribuirse a una serie de factores tales como:

- Potencia: las redes neuronales son unas técnicas de modelado muy sofisticadas capaces de actuar sobre funciones extremadamente complejas.
- Facilidad de uso: las redes neuronales emplean conjuntos representativos de datos y posteriormente apelan a algoritmos de entrenamiento (*training algorithms*) para aprender de forma automática la estructura de los datos. A pesar de que se requiere un conocimiento acerca de cómo seleccionar y preparar los datos, de cómo seleccionar las redes neuronales adecuadas y de cómo interpretar los resultados obtenidos, resulta mucho más sencillo que la aplicación de muchos métodos estadísticos no lineales que se emplean comúnmente.

Las redes neuronales artificiales son aplicables en aquellas situaciones para las que existe una relación entre las variables predictoras (independientes, entradas) y las variables respuesta (dependientes, salidas), incluso cuando dicha relación resulta tremendamente compleja y no es sencilla de explicar en los términos habituales de “correlaciones” o “diferencias entre grupos”.

Las redes neuronales artificiales tienen cierta analogía con las redes neuronales biológicas, tal como queda reflejado en la siguiente tabla.

<i>Redes Neuronales Biológicas</i>	<i>Redes Neuronales Artificiales</i>
Neuronas	Unidades de proceso
Conexiones sinápticas	Conexiones ponderadas
Efectividad de las sinápsis	Peso de las conexiones
Efecto reforzador o inhibitor de una conexión	Signo del peso de una conexión
Efecto combinado de las sinápsis	Función de propagación o de red
Activación -> tasa de disparo	Función de activación -> Salida

Tabla 3. Comparación entre las neuronas biológicas reales y las unidades de proceso artificiales.

Las neuronas se modelan mediante lo que se conoce como **unidades de proceso**. Tal y como se indica en la Figura 23, cada una de estas unidades se compone de una red de conexiones de entrada, una **función de red** encargada de computar la entrada total combinada de todas las conexiones, un **núcleo central de proceso** encargado de aplicar la función de activación y, finalmente, la **salida** por dónde se transmite el valor de activación a otras unidades.

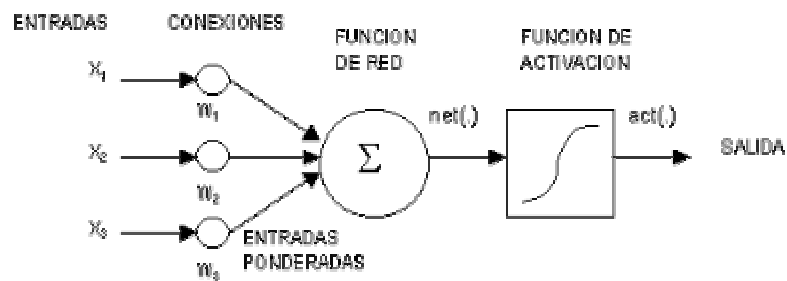


Figura 23. Unidad de proceso típica en una red neuronal artificial.

La función de propagación (de red o de base)

Tal y como hemos establecido anteriormente, esta función es la responsable de calcular la entrada total de la información en la neurona como combinación de todas las entradas. La función más utilizada, con diferencia, es la función lineal de base (LBF, *Linear Basis Function*), que consiste en el sumatorio ponderado de todas las entradas. Se trata de una función de tipo hiperplano, esto es, de primer orden.

Dada una unidad de procesado j , y n unidades conectadas a ésta, si definimos \mathbf{X} como el vector de entradas (que coincide con las salidas de las unidades de la capa anterior) y \mathbf{W}_j como el vector de pesos de las conexiones correspondientes, se podría definir la función de propagación como:

$$\text{net}_j(\mathbf{X}, \mathbf{W}_j) = \sum_{i=1}^n x_i w_{ij} \quad (24)$$

Al representar los pesos utilizamos dos subíndices para indicar que conectan dos unidades, i y j , dónde j se refiere a la unidad actual.

El valor de red es una combinación lineal de las entradas.

Otra de las funciones de propagación empleadas es la función radial de base (RBF, *Radial Basis Function*). Se trata de una función de tipo hiperesférico, de segundo orden, no lineal y que puede definirse como:

$$\text{net}_j(\mathbf{X}, \mathbf{W}_j) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - w_{ij})^2} \quad (25)$$

El valor de red obtenido en este caso representa la distancia a un determinado patrón de referencia.

La función de activación

El valor de red, expresado por la función de base, resulta inmediatamente transformado a través de una función conocida como función de activación que es la que nos da la salida de la neurona. Según para lo que se desee entrenar la red neuronal, se suele escoger una función de activación u otra en ciertas neuronas de la red.

Se suele distinguir entre i) funciones de activación lineales, en las que la salida es proporcional a la entrada, ii) funciones de umbral, en las cuales la salida es un valor discreto (típicamente binario 0/1) que depende de si la estimulación total supera o no un determinado valor de umbral; y iii) funciones no lineales, no proporcionales a la entrada.

En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, algunas de las funciones de activación más usuales.

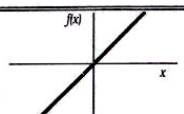
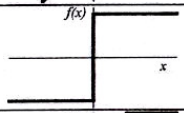
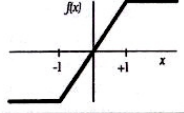
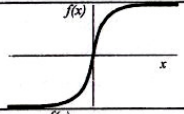
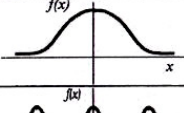

	Función	Rango	Gráfica
Identidad	$y = x$	$[-\infty, +\infty]$	
Escalón	$y = \text{sign}(x)$ $y = H(x)$	$\{-1, +1\}$ $\{0, +1\}$	
Lineal a tramos	$y = \begin{cases} -1, & \text{si } x < -l \\ x, & \text{si } -l \leq x \leq +l \\ +1, & \text{si } x > +l \end{cases}$	$[-1, +1]$	
Sigmoidea	$y = \frac{1}{1 + e^{-x}}$ $y = \text{tgh}(x)$	$[0, +1]$ $[-1, +1]$	
Gaussiana	$y = Ae^{-Bx^2}$	$[0, +1]$	
Sinusoidal	$y = A \text{sen}(\omega x + \varphi)$	$[-1, +1]$	

Tabla 4. Algunos ejemplos de las funciones de activación más usuales.

Casi todos los avances recientes, en lo que a conexiones neuronales se refiere, se atribuyen a arquitecturas multicapa que utilizan funciones de activación no lineales, como la función de tipo umbral, de tipo gaussiano o, en la mayoría de los casos, una función de tipo sigmoidea (Quinlan 1991) ¹⁰¹. Sin embargo, el problema de trabajar con modelos no lineales radica en que son difíciles de describir en términos lógicos o matemáticos convencionales

(Rumelhart & McClelland 1986) ¹⁰², lo que contribuye a crear ese apelativo de caja negra que suele atribuirse a las redes neuronales.

A- Función de umbral

En un principio se consideraba que las neuronas biológicas empleaban una función de umbral, es decir, que permanecían inactivas y sólo se activaban si la estimulación total superaba un cierto valor límite; esto se puede modelar con una función de tipo escalón: la más típica es el escalón unitario, para el que la función devuelve 0 por debajo del valor crítico (umbral) y 1 cuando es superior. Después se comprobó que dichas neuronas emitían impulsos de actividad eléctrica con una frecuencia variable, en función de la intensidad de la estimulación recibida, y que tenían cierta actividad hasta en reposo, con estimulación nula. Estos descubrimientos llevaron al uso en las redes neuronales artificiales de funciones no lineales con esas características, como es el caso de la función sigmoidea, con un perfil parecido al escalón de una función de umbral, pero siendo una función de tipo continuo.

B- Función sigmoidea o logística

Es, probablemente, la función de activación más empleada en la actualidad.

$$\text{act}_j(\text{net}_j) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{\text{net}_j}{\sigma}}} \quad (26)$$

Se trata de una función continua no lineal que posee un rango comprendido entre 0 y 1. Esto, aplicado a las unidades de proceso de una red neuronal artificial, significa que, sea cual sea la entrada, la salida estará comprendida entre los valores 0 y 1.

Esta función depende del parámetro σ , que usualmente toma el valor 1.

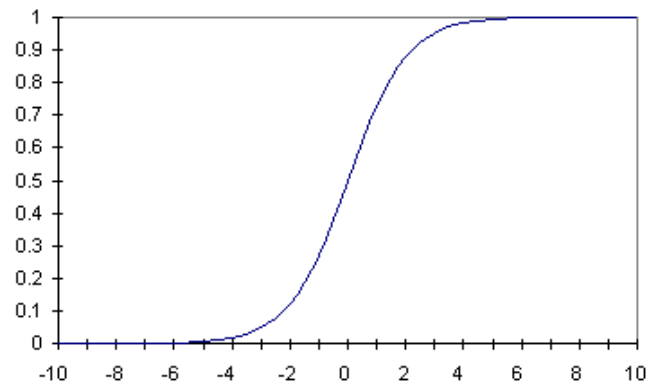


Figura 24. Ejemplo de la función sigmoidea, para un valor de $\sigma = 1$

Como puede apreciarse en la Figura 24, la salida de una unidad de proceso presenta un valor de 0.5 cuando la entrada es nula. Esto significa que la unidad tiene cierta actividad aún en ausencia de estimulación. Al aumentar la estimulación la unidad aumenta su activación, y la disminuye si la estimulación es inhibitoria, de forma parecida a como se comportan las neuronas reales.

Este tipo de función exhibe una serie de características deseables (Wassermann 1989)¹⁰³, ya que:

1. Permite acomodar señales muy intensas sin producir saturación.
2. Admite señales débiles sin excesiva atenuación.
3. Resulta fácilmente derivable, obteniéndose una expresión del tipo

$$f'(x) = f(x) \cdot (1 - f(x)) \quad (27)$$

Sin embargo, la principal limitación de esta función sigmoidea es que no sirve para expresar polaridades puesto que proporciona siempre valores positivos. En este caso, una función alternativa, con cualidades parecidas pero con un rango entre -1 y 1, es la función tangente hiperbólica. Desde un punto de vista fisiológico, el signo negativo se puede interpretar como una disminución de la tasa de disparo de una neurona por debajo de la tasa de disparo en reposo. Se trata de la función Gaussiana que puede definirse como:

$$\text{act}_j(\text{net}_j) = c \cdot e^{\frac{-\text{net}_j^2}{\sigma^2}} \quad (28)$$

Estructura y formas de interconexión

Para diseñar una red neuronal artificial previamente debe establecerse cómo van a estar conectadas unas unidades con otras y determinar adecuadamente cuales van a ser los pesos de las conexiones. Lo más usual es disponer las unidades de proceso en forma de capas, pudiéndose hablar de redes de una capa (unicapa), de dos capas (bicapa) o de más de dos capas (redes multicapa).

La situación más común es disponer de tres o más capas, tal y como se muestra en la Figura 25,

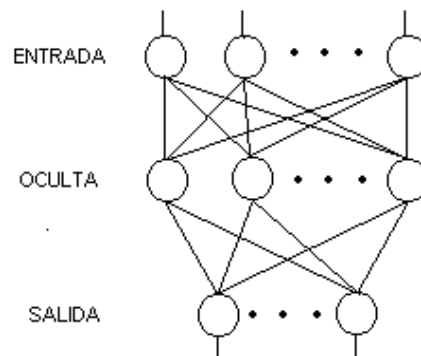


Figura 25. Modelo de red neuronal en cascada de 3 capas

donde la primera capa o capa de entrada actúa generalmente almacenando la información bruta suministrada a la red; la última capa, denominada capa de salida, actúa almacenando la respuesta de la red para que pueda ser leída; y las capas intermedias, denominadas capas ocultas, que son las principales encargadas de extraer, procesar y memorizar la información.

Además del número de capas de una red, en función de cómo se interconectan unas capas con otras, podemos hablar de **redes recurrentes** (*feed-back*) y **redes no recurrentes** o redes en cascada (*feed-forward*). En las redes no recurrentes la información fluye en una única dirección de una

capa a otra (desde la capa de entrada a las capas ocultas y de éstas a la capa de salida) y, además, no se admiten conexiones dentro de una misma capa. Por el contrario, en las redes recurrentes la información puede volver a lugares por los que ya había pasado, formando bucles, y en ellas sí que son admisibles las conexiones dentro de una misma capa (laterales), incluso de una unidad de proceso consigo misma.

Las conexiones entre una capa y otra pueden ser también totales, es decir, que cada unidad establece conexiones con todas las unidades de la capa siguiente, o por el contrario parciales, en las cuales una unidad se conecta con sólo algunas de las unidades de la siguiente capa, generalmente siguiendo algún patrón aleatorio o pseudo-aleatorio (por ejemplo, mediante algoritmos genéticos).

Desde una aproximación temporal es posible además distinguir entre conexiones sin retardo y conexiones con retardo.

Atendiendo al aspecto referido a la manera en que las unidades de proceso computan su activación en relación al tiempo es posible distinguir entre **redes síncronas** (si en cada ciclo de aprendizaje se calcula la activación de todas las unidades de una capa) y, **redes asíncronas** o probabilísticas (para las cuales cada unidad de proceso tiene una cierta posibilidad de computar su activación en cada ciclo de aprendizaje).

Las redes síncronas suelen emplear reglas de aprendizaje deterministas (métodos deterministas) mientras que, los métodos estadísticos, en cambio, se aplican en las redes asíncronas.

Algunos autores hablan de métodos de aprendizaje deterministas haciendo referencia al modo en que computan, paso a paso, las modificaciones en los pesos de las conexiones. Los métodos estadísticos hacen cambios pseudo-aleatorios en las conexiones y retienen los cambios sólo si mejoran la respuesta del sistema, pudiendo resultar más útiles en cuanto que permiten alcanzar soluciones globalmente óptimas, a diferencia de las soluciones localmente óptimas típicas de los métodos deterministas.

Características de las redes neuronales artificiales

1. *Aprendizaje inductivo*: no se le indican las reglas para dar una solución, sino que extrae sus propias reglas a partir de los ejemplos de aprendizaje, modificando su comportamiento en función de la experiencia.
2. *Generalización*: una vez entrenada, se le pueden presentar a la red datos distintos a los usados durante el aprendizaje. La respuesta obtenida dependerá del parecido de los datos con los ejemplos de entrenamiento.
3. *Abstracción o tolerancia al ruido*: las redes neuronales artificiales son capaces de extraer o abstraer las características esenciales de las entradas aprendidas; de esta manera pueden procesar correctamente datos incompletos o distorsionados.
4. *Procesamiento paralelo*: las neuronas reales trabajan en paralelo; en el caso de las redes artificiales es obvio que si usamos un solo procesador no podrá haber proceso paralelo real, sin embargo hay un paralelismo inherente; lo esencial es que la estructura y modo de operación de las redes neuronales las hace especialmente adecuadas para el procesamiento paralelo real mediante multiprocesadores (se están desarrollando máquinas específicas para la computación neuronal).
5. *Memoria distribuida*: el conocimiento acumulado por la red se halla distribuido en numerosas conexiones, esto tiene como consecuencia la *tolerancia a fallos*, por la cual una red neuronal es capaz de seguir funcionando adecuadamente a pesar de sufrir lesiones con destrucción de neuronas o sus conexiones, ya que la información se halla distribuida por toda la red, sin embargo en un programa tradicional un pequeño fallo en cualquier punto puede invalidarlo todo y dar un resultado absurdo o no dar ningún resultado.

Modo de operación de las redes neuronales artificiales

En cualquier red neuronal cabe distinguir la **fase o proceso de aprendizaje**, opcionalmente una **fase de prueba** (*test*), y la **fase de aplicación** (re-llamada).

El aprendizaje consiste en la presentación de patrones a la red, y la

subsiguiente modificación de los pesos de las conexiones siguiendo alguna regla de aprendizaje que trata de optimizar su respuesta, generalmente mediante la minimización del error.

Se puede distinguir entre 3 tipos de aprendizaje:

- **Aprendizaje supervisado:** es el más sencillo y consiste en la presentación de patrones de entrada junto a los patrones de salida deseados (*targets*) para cada uno de ellos.
- **Aprendizaje no supervisado:** tiene lugar cuando no se le presentan a la red los patrones de salida deseados, ya que no se le indica que resultados debe dar, sino que se le deja seguir alguna regla de auto-organización.
- **Aprendizaje reforzado:** a medio camino entre los dos anteriores, en este caso el supervisor se limita a indicar si la salida ofrecida por la red es correcta o incorrecta, pero sin llegar a indicarle que respuesta debe dar.

Cualquiera que sea el tipo de aprendizaje empleado, una característica esencial de la red neuronal artificial es la regla de aprendizaje usada, que indica como se modifican los pesos de las conexiones en función de los datos usados en la entrada.

El aprendizaje por retro-propagación del error, inventado por Bryson y Ho en 1969 y revisado en los años 80 (Rumelhart, Hinton, Williams), es una de las reglas de aprendizaje más empleada en la actualidad.

Inicialmente, se introduce una entrada en la red, y se propaga para conseguir la salida. Dicha salida se compara con la salida correcta (error). Finalmente, el peso de cada conexión a una unidad de salida se ajusta en la dirección adecuada (excitadora o inhibidora) y en la proporción adecuada para reducir el error. Se sigue un proceso similar para ajustar los errores de cada capa siguiente.

Estos tres pasos se repiten a través de un número de ciclos para diferentes patrones de entrada-salida. Normalmente en algunos cientos de ciclos el sistema converge y se obtienen los pesos adecuados.

El procedimiento de retro-propagación es una forma relativamente eficiente de calcular qué tanto se mejora el desempeño con los cambios individuales en los pesos. Se conoce como procedimiento de retro-propagación porque, primero calcula cambios en la capa final, reutiliza gran parte de los mismos cálculos para calcular los cambios de los pesos de la penúltima capa y, finalmente, regresa a la capa inicial.

Por otro lado, es usual disponer de un conjunto de datos distintos a los usados para el entrenamiento, para los cuales se conoce la respuesta correcta, y que se usan como prueba, evaluando con ello si la red responde adecuadamente frente a datos distintos a los usados durante el aprendizaje (evaluación de su capacidad predictiva). Si esto ocurre así se considera que la red funciona bien y se puede pasar a la fase de aplicación, es decir, se puede usar para obtener un resultado frente a datos totalmente nuevos para los que no se conoce la respuesta correcta.

Aunque la capacidad de aprendizaje es esencial y casi definitoria de lo que sería una RNA, también se han desarrollado modelos que no requieren modificar los pesos de las conexiones, sino que son precalculados y establecidos previamente antes de presentarle patrones a la red, como ocurre en el caso de las redes de Hamming y en las redes de Hopfield ⁹⁷.

2.5.2.3 Métodos quimiométricos multivía

Sánchez y Kowalski ¹⁰⁴ acuñaron los términos de calibración de orden cero, primer orden y segundo orden. Las calibraciones de orden cero y de primer orden hacen referencia a la calibración univariante y la calibración multivariante (PLS y PCR), respectivamente, comentadas en anteriores apartados.

Pese a que la calibración de primer orden ha representado una mejora bastante notable, ofreciendo una serie de ventajas en el campo del análisis químico con respecto a la calibración de orden cero ¹⁰⁵, como puedan ser la resolución de problemas analíticos de mayor complejidad, todavía existen algunos inconvenientes que deben superarse en el futuro tales como:

- Las metodologías basadas en la calibración multivariante deben poseer un sistema eficaz de detección de muestras discrepantes (*outliers*)¹⁰⁶, puesto que uno de los principales problemas de este tipo de calibración es la detección de múltiples *outliers*, provocando el llamado efecto de enmascaramiento (*masking effect*) según el cual varios *outliers* pueden interaccionar de una forma compleja para potenciar o minimizar cualquier otra influencia, dando lugar a resultados sesgados si los distintos componentes contenidos en la muestra que se pretende analizar, y que influyen en el espectro resultante, no están adecuadamente contemplados en el modelo de calibración¹⁰⁷.
- Cuando se detectan muestras discrepantes, no se posee la capacidad de corregirlas²⁹. Deben analizarse mediante la metodología univariante.
- La etapa de calibración resulta relativamente costosa, debido al elevado y variado número de muestras que normalmente se requiere.
- Si las muestras problema varían de composición con el tiempo debe recurrirse a procesos de re-calibración o estandarización de los modelos de calibrado.

En los últimos años se han desarrollado en Quimiometría nuevas técnicas llamadas multivía o de orden n , que permiten resolver, en principio, los inconvenientes antes mencionados¹⁰⁸.

En la presente Memoria de Tesis se incluye un Capítulo en el que se emplean este tipo de técnicas, en concreto la calibración de segundo orden. Este tipo de calibración utiliza respuestas instrumentales que consisten en matrices de datos (en lugar de vectores, como en la calibración de primer orden) para cada uno de los objetos analizados, tanto los que corresponden al conjunto de calibración como los que integran el conjunto de validación o los propios objetos problema.

Esta mayor cantidad de datos es posible conseguirla mediante la instrumentación acoplada (*hyphenated instruments*), es decir, el acoplamiento de dos instrumentos independientes de primer orden.

Esta disposición instrumental ofrece una serie de ventajas con respecto a la

calibración de primer orden. Una primera ventaja es la de poder llevar a cabo la determinación del analito en presencia de cualquier componente en la muestra desconocida que no haya sido incluido en el modelo de calibración (ventaja de segundo orden) ¹⁰⁹. Una importante segunda ventaja es la reducción del tiempo de análisis, puesto que no es necesario disponer de un elevado número de objetos para el conjunto de calibración, hasta el extremo de que en algunas situaciones concretas, un solo objeto de calibración puede resultar suficiente para predecir de forma satisfactoria el parámetro que se desea en el pertinente objeto problema ¹¹⁰.

Para la calibración de datos multidimensionales existen dos enfoques totalmente diferentes. La primera propuesta es la que separa los analitos y las interferencias, descomponiendo los datos en señales correspondientes a los componentes puros, para luego aplicar una estrategia de calibración univariante que permita correlacionar dichos datos con la propiedad de interés. El segundo enfoque puede interpretarse en términos de resolución de sistemas de ecuaciones acopladas para las distintas dimensiones de los datos ²⁹.

PARAFAC ¹¹¹ (*PARAllel FACtor Analysis*), conocido en sus inicios con el nombre de CANDECOMP (*CANonical DECOMPosition*) cuando fue independientemente propuesto por Harshman ¹¹² y por Carroll y Chang ¹¹³, es uno de los métodos empleados para la descomposición de datos multidimensionales en el cual un conjunto de datos en 3 dimensiones (3D) se descompone en triadas.

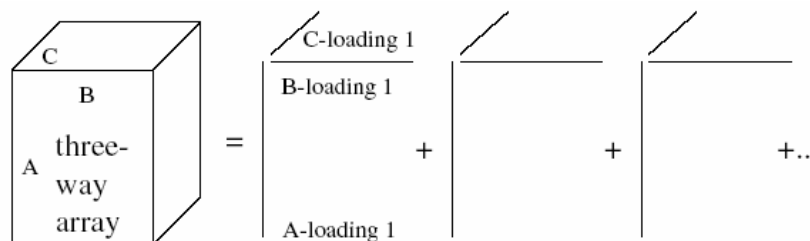


Figura 26. Fundamento del método de PARAFAC.

En la anterior figura se indica el esquema correspondiente al fundamento del modelo PARAFAC. Como puede observarse, un conjunto de datos en tres dimensiones se descompone en la suma del producto triple de los vectores denominados cargas (*loadings*).

Los dos principales competidores de esta metodología son el método Tucker3¹¹⁴ o, sencillamente, el desarrollo de un conjunto multidimensional hasta una matriz para posteriormente aplicar sobre ella métodos convencionales de descomposición de dos dimensiones como el análisis de componentes principales (PCA).

Según Kiers¹¹⁵, el método PARAFAC puede considerarse como una versión más restrictiva del método Tucker3, al tiempo que éste puede contemplarse como una versión más restrictiva del PCA de dos vías.

Cualquier conjunto de datos que puede modelarse de forma adecuada con el método PARAFAC, puede también modelarse a través de los métodos Tucker3 o PCA de dos vías; sin embargo, el método PARAFAC emplea menos grados de libertad que los dos anteriores, los cuales emplean un exceso de aquellos para el modelado del ruido o de la variación sistemática de una forma redundante.

De esta manera, considerando que siempre se pretende emplear el modelo más simple posible, el método PARAFAC puede considerarse como el modelo más simple y restrictivo, frente al modelo PCA que se considera el más complejo aunque el más flexible.

A pesar de que todos estos métodos tienen sus ventajas y sus inconvenientes (uno de los más molestos en PARAFAC es el tiempo requerido para el cálculo de los modelos), de entre los distintos modelos existentes para explicar las respuestas instrumentales de segundo orden, el modelo PARAFAC es el más utilizado en análisis químico y el que se ha empleado para el desarrollo de uno de los Capítulos incluidos en esta Memoria de Tesis.

Para el desarrollo de este método, los algoritmos empleados se encuentran, muy a menudo, basados en los mínimos cuadrados alternantes (*ALS, Alternating Least Squares*) inicializados bien por un valor aleatorio o bien a partir de valores calculados a través de una descomposición trilineal directa basada en el problema del autovalor generalizado.

Una de las ventajas evidentes del modelo PARAFAC es la unicidad de la solución. Para el caso de una descomposición espectral bilineal, las cargas reflejan el espectro puro de los analitos medidos, sin embargo no es posible encontrar realmente el espectro puro sin información externa debido al problema de la rotación.

En el caso del modelo PARAFAC, y más si los datos son trilineales, el verdadero espectro subyacente es posible encontrarlo si se emplea el número de componentes correcto y la relación señal-ruido es la apropiada.

El significado matemático de la unicidad es que el modelo PARAFAC calculado no puede ser rotado sin una pérdida de ajuste, en contraposición con los análisis de dos vías donde las puntuaciones y las cargas pueden rotarse sin que el ajuste del modelo se vea modificado.

Uno de los principales requerimientos para la aplicación del modelo PARAFAC es determinar el número óptimo de factores necesarios para la descomposición del conjunto de datos, dado que, en ocasiones, el incremento de la varianza residual no resulta lo suficientemente pronunciado, lo cual hace difícil una estimación apropiada del rango del modelo.

En PARAFAC no se reduce el conjunto porque el modelo trilineal, calculado simultáneamente para todos los componentes, puede mostrarse para ajustar mejor el conjunto que si los componentes se calculan sucesivamente, como en el caso del PCA ¹¹⁶. En consecuencia, la extracción de demasiados componentes no sólo significa que el ruido está siendo, cada vez, más modelado, sino que además los verdaderos factores están siendo modelados por más componentes (correlacionados).

A pesar de la existencia de varios procedimientos para una determinación adecuada del número de componentes, en el Capítulo desarrollado en esta Memoria de Tesis se ha empleado el diagnóstico de consistencia de la matriz central (CORCONDIA, *CORe CONSistency DIAgnostic*) ¹¹⁷.

Actualmente, el desarrollo de métodos de calibración de segundo orden se dirige fundamentalmente a:

- mejorar las propiedades matemáticas de los métodos de descomposición de datos de segundo orden, como el grado de ajuste a los datos o la robustez frente a relaciones señal/ruido poco favorables.
- incrementar el grado de convergencia y, con ello, la rapidez de los algoritmos.
- resolver problemas concretos derivados del incumplimiento del

modelo bilineal o trilineal (considerando el conjunto de muestras que intervienen en el análisis) por parte de las medidas instrumentales.

Se han propuesto diferentes aproximaciones para solventar dichas problemáticas, pero existe todavía un gran campo de investigación en este ámbito del desarrollo teórico.

Una vez desarrollado el método de análisis multivía requerido para una aplicación concreta (el cual incluye el instrumento y el método de calibración), éste también debe validarse como cualquier método de análisis calculando sus correspondientes parámetros de calidad, como la exactitud, la precisión, la selectividad, la sensibilidad o los límites de detección y cuantificación. Los parámetros de calidad analíticos se pueden utilizar como criterio para decidir si el método instrumental y el tratamiento numérico escogido son adecuados para resolver el problema analítico concreto.

A pesar de que se han descrito algunos de estos parámetros de calidad para instrumentos que generan datos de segundo orden y superiores ^{118, 119}, todavía no existen aproximaciones suficientemente buenas para calcular el error de predicción o el límite de detección para un método de calibración multivía concreto. Con respecto a los límites de detección, algunas aproximaciones abordan el problema transformando los datos de segundo orden a orden cero o uno, y aplican estrategias de cálculo univariantes o multivariantes (Saurina 2001) ¹²⁰. Otras, simplemente calculan el límite de detección como tres veces la desviación estándar de las medidas del blanco (Jiji 1999) ¹²¹; aunque en ningún caso se contemplan las recomendaciones de la IUPAC respecto a considerar las probabilidades de cometer falsos positivos y falsos negativos en el cálculo del límite de detección.

Finalmente, por lo que a aplicaciones se refiere, destacar que no son muchos los trabajos publicados pero cabe mencionar los presentados en el campo de los equilibrios en disolución por el grupo de Tauler y colaboradores en los que se determinan diferentes sustancias de naturaleza ácido-base, provocando cambios en la composición de la muestra a partir de diferentes causas, como puedan ser gradientes de pH ^{122, 123}.

Resultados





El desarrollo de la presente Tesis Doctoral está enfocado hacia la aplicación de algunos de los distintos tratamientos numéricos a los que pueden someterse los datos analíticos obtenidos mediante diferentes técnicas de medida en espectroscopia vibracional, buscando así potenciar y aumentar el rendimiento de los distintos procesos analíticos desarrollados, asegurando una mayor calidad de los resultados obtenidos.

Poner de manifiesto que los trabajos englobados en esta Memoria, que han formado parte de los proyectos “Análisis cuantitativo, ambientalmente sostenible, por espectrometría vibracional” (Oficina de Ciència i Tecnologia de la Conselleria d’ Innovació i Competitivitat de la Generalitat Valenciana, referencia GV01/249), “Aseguramiento de la calidad analítica mediante la combinación de distintas señales moleculares y su tratamiento quimiométrico” (Direcció General d’Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana, referencia GV04B/247), “Integración de señales para el control analítico” (Servei d’Investigació de la Universitat de València, referencia UV-AE-20050203) y “Automatización en el análisis cuantitativo por espectrometría vibracional” (Ministerio de Educación y Ciencia, referencia CTQ2005-05604/BQU y FEDER), han tratado en todo momento de ser novedosos, con el fin de poder ser considerados como una seria alternativa frente a otros métodos oficiales o procedimientos propuestos previamente en la bibliografía.

De este modo, con el ánimo de poder mostrar el amplio abanico de posibilidades que ofrece, no sólo la espectrometría vibracional, sino la aplicación de la Quimiometría sobre los datos instrumentales obtenidos, se seleccionaron una serie de muestras de naturaleza muy variada en cuanto a composición, estado y niveles de concentración de los analitos de interés, a la par que de un uso altamente extendido; englobando así productos farmacéuticos, alimentos o formulaciones comerciales de productos fitosanitarios.

El conjunto de trabajos incluido en esta Memoria debe entenderse como un intento de explorar y aplicar diferentes técnicas de calibración y tratamiento numérico sobre los espectros en el infrarrojo, con el fin de obtener una información analítica de calidad, que permita el objetivo final de resolución de problemas. En este sentido se ha realizado un especial esfuerzo en obtener los espectros bajo diferentes métodos de medida y con una mínima manipulación de las muestras o una mecanización del proceso de medida.

Es posible realizar una clasificación de las diferentes contribuciones que integran esta Tesis atendiendo a los modelos de calibración establecidos para el desarrollo de los distintos métodos de análisis. Tal y como se puede observar en la Figura 27, existen dos bloques bien diferenciados: de un lado aquellos métodos de análisis en los que se utilizó la calibración univariante para relacionar la señal analítica con el parámetro que se pretendía cuantificar, y de otro, aquellos en los que el problema se resolvió empleando una serie de algoritmos matemáticos, con el fin de intentar predecir la propiedad de interés a partir de respuestas instrumentales no selectivas.

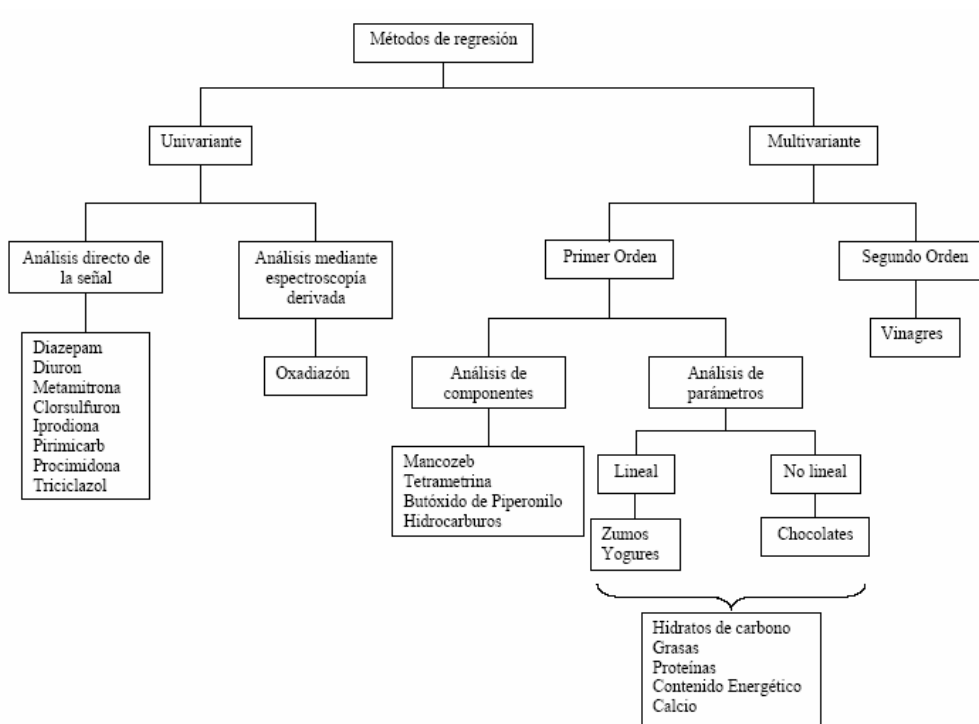


Figura 27. Clasificación de los estudios que componen la presente Memoria de Tesis Doctoral atendiendo a los diferentes tratamientos quimiométricos aplicados para la determinación cuantitativa mediante el empleo de la espectrometría vibracional.

No obstante, a pesar de dicha división, existen una serie de etapas implicadas en el desarrollo de procedimientos para la determinación cuantitativa mediante la espectroscopia infrarroja que resultaron comunes.

A. Obtención de la información analítica

Para la ejecución de los trabajos incluidos en esta Tesis la instrumentación que se empleó para la obtención de la información analítica en la región media del espectro infrarrojo (MIR) fueron dos espectrofotómetros de transformada de Fourier de las marcas Nicolet (modelo Magna 750) y Bruker (modelo Tensor 27), equipados con un detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS) y sulfato de triglicina deuterada dopado con L-alanina (LADTGS), respectivamente; y un divisor de haz de bromuro potásico (KBr) en ambos casos.

Para la adquisición de las señales analíticas en la región del infrarrojo próximo (NIR) se utilizó un espectrofotómetro de la marca Bruker, modelo MPA (*Multi Purpose Analyzer*), equipado con un detector de arseniuro de Indio y Galio (InGaAs) y un divisor de haz de cuarzo. Este equipo consta de un compartimento termostatzado para el análisis por medidas de transmisión de muestras líquidas, así como un módulo adicional con una sonda de fibra óptica (para medidas tanto de reflectancia difusa como de transflectancia) y una esfera integradora para el análisis de muestras sólidas por reflexión, que permiten ampliar las técnicas de muestreo y la adquisición de señales.

En lo que respecta a las espectroscopias empleadas, puede decirse que para cada tipo de muestra se empleó la técnica de medida que se consideró más apropiada para la obtención de la máxima información posible de calidad garantizada en un reducido espacio de tiempo y con un mínimo o ningún tratamiento químico previo de la muestra. Con ello se pretendió proseguir con la labor de desarrollo de una Química Analítica sostenible, respetuosa con el medio ambiente pero, al tiempo, altamente informativa y sin renunciar a las mejores características analíticas.

De esta forma, empleando las regiones media (MIR) y cercana (NIR) del espectro infrarrojo, se aplicaron distintas técnicas espectroscópicas de medida sobre las diferentes muestras objeto de análisis.

Tipo de muestra	Técnica espectroscópica empleada			
	Transmisión MIR	Reflectancia total atenuada MIR	Transmisión NIR	Reflectancia Difusa NIR
Productos fitosanitarios	metamitrona oxadiazon	mancozeb	diuron metamitrona clorsulfuron iprodiona pirimicarb procimidona triciclazol	mancozeb
Fármacos	diazepam			
Lociones para <i>pediculosis</i>	tetrametrina, butóxido de piperonilo	tetrametrina, butóxido de piperonilo		
Hidrocarburos			n-hexano isooctano tolueno	n-hexano isooctano tolueno
Productos alimenticios		zumos, yogures, vinagres		chocolates

Tabla 5: Relación de muestras/analitos estudiados y técnicas de medida empleadas.

Para las medidas de transmisión en el MIR se empleó una micro-celda de flujo de la marca Graseby-Specac (Orpington, UK), con ventanas de seleniuro de zinc (ZnSe) y fluoruro de calcio (CaF₂), con un camino óptico de 0.11 mm. Las medidas de transmisión en el NIR se realizaron utilizando viales de 6.5 mm de diámetro interno, así como otros viales estándar de cromatografía líquida de 9.5 mm de diámetro interno y 2 mL de volumen (como los que se emplean de forma habitual para los inyectores automáticos).

Para las medidas de reflectancia total atenuada (ATR) se utilizó principalmente un accesorio de ATR horizontal para muestras líquidas de la marca Graseby Specac (Orpington, UK) configurado con un cristal de ZnSe con un ángulo de incidencia de 45° que proporciona un número de 6 reflexiones. También se empleó un accesorio de ATR con cristal de diamante de la marca Smiths modelo "DuraSamplIR" equipado con un disco conteniendo un elemento de reflexión interna (IRE, *Internal Reflexion Element*) de diamante de 3 reflexiones y una prensa para el análisis de sustancias sólidas. Para el análisis de muestras líquidas

o en disoluciones se utilizó un disco con un elemento de reflexión interna (IRE) de 9 reflexiones al que puede acoplarse, también, una micro-celda de flujo (*micro volume liquid cell*).

Una vez configurada la instrumentación requerida resultó necesario determinar la selectividad de la señal analítica obtenida al adquirir los correspondientes espectros y que marcó a posteriori el tipo de tratamiento quimiométrico aplicado a los datos así como el modelo de calibración establecido.

B. Tratamiento de las muestras

Desde el punto de vista del tratamiento numérico de los datos analíticos obtenidos, destacar que en todo momento se intentó construir el modelo de calibración más sencillo posible que permitiese explicar la relación entre la señal analítica y el parámetro o la propiedad de interés, puesto que uno de los objetivos perseguidos era el de buscar un equilibrio entre simplicidad, adecuación y buen ajuste de los datos experimentales.

Tal y como se ha comentado en la introducción de esta Memoria, para poder emplear la calibración univariante, se requiere de cierta selectividad que permita llevar a cabo la medida y a su vez garantice una correspondencia clara entre la señal obtenida y el analito de interés. Esta necesidad es la que dificulta, en muchas ocasiones, poder trabajar con las muestras crudas, es decir, sin haberlas sometido a ningún tipo de tratamiento previo.

Como puede apreciarse en la Figura 28, la presencia de otros componentes en algunas de las muestras, acompañando al analito de interés, provocaba que en muchas situaciones existiese un solapamiento entre las bandas de absorción asociadas al analito y las correspondientes a aquellos componentes, lo que impedía establecer una relación directa entre la señal y el parámetro que se intentaba determinar.

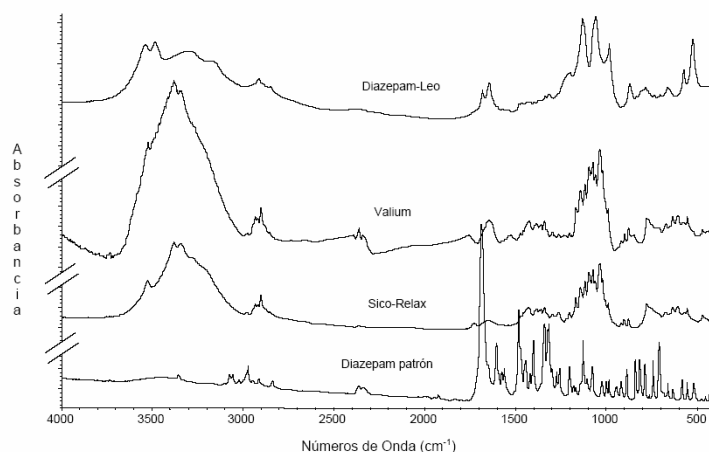


Figura 28 Espectros FTIR, en discos de KBr, para un patrón de diazepam y para tres fármacos conteniendo dicho ingrediente activo. Nota: los espectros han sido desplazados a lo largo del eje de ordenadas para que las bandas de absorción puedan apreciarse con mayor claridad. Condiciones instrumentales: 25 barridos del interferómetro, 4 cm^{-1} de resolución nominal.

Una de las posibles soluciones empleadas para resolver este inconveniente consistió en llevar a cabo una extracción previa, con un disolvente adecuado, que permitiese separar el analito de interés del resto o de la mayor parte de la matriz. Las consideraciones que tuvieron que tenerse en cuenta para la elección del disolvente fueron no sólo su compatibilidad con las propiedades físicas y químicas del analito de interés sino además la disponibilidad de una transparencia adecuada para la región del espectro infrarrojo en la que se pretendía trabajar.

Disolvente	Región no útil (cm^{-1})	Región no útil (cm^{-1})
Cloroformo (CHCl_3)	600-820	1175-1250
Tetracloruro de carbono (CCl_4)	750-950	
Benceno (C_6H_6)	600-750	3000-3100
Diclorometano (CH_2Cl_2)	600-820	1200-1300
Acetona	1100-1850	2800-3000
Dimetilsulfóxido	900-1100	
Tolueno	600-750	2800-3200

Tabla 6: Ejemplo de las regiones del espectro en el infrarrojo medio que no pueden utilizarse para algunos de los disolventes más comúnmente empleados en la espectroscopia infrarroja.

Con la ayuda de este pequeño tratamiento químico previo efectuado sobre la muestra, resultaba posible obtener espectros mucho más sencillos para las

muestras y con un mayor grado de similitud y concordancia con el espectro del propio analito, tal y como se puede apreciar en la Figura 29.

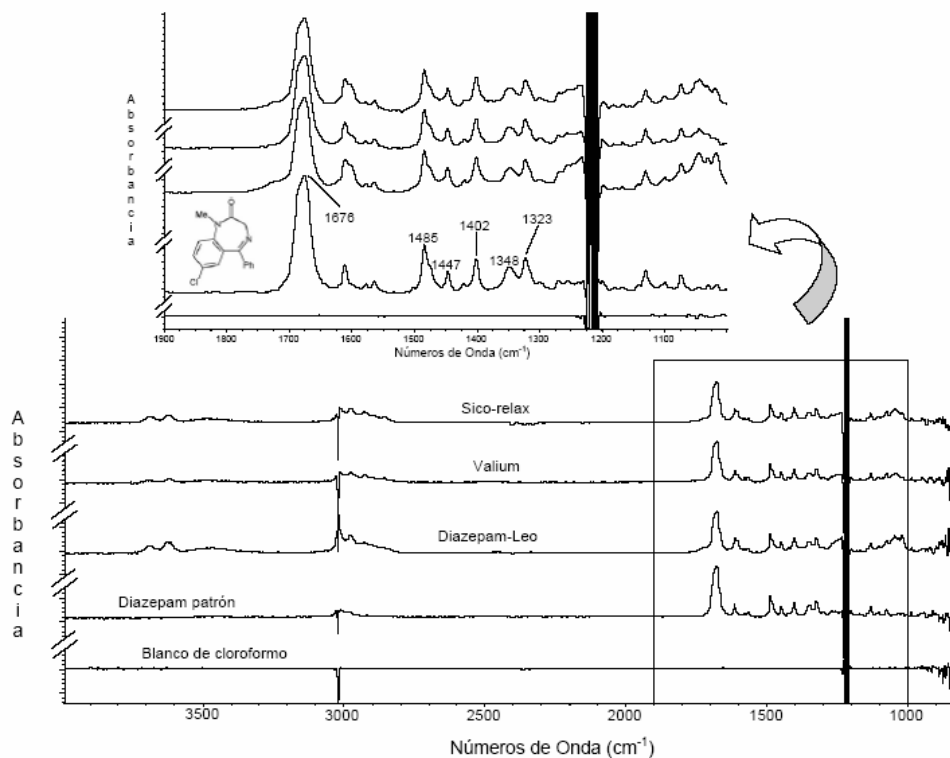


Figura 29. Espectros FTIR en disolución de cloroformo para un patrón de diazepam en concentración de 1 mg g^{-1} y los correspondientes extractos en cloroformo de cada uno de los fármacos analizados. Condiciones instrumentales 25 barridos por espectro y 4 cm^{-1} de resolución nominal, utilizando un *background* de la celda llena de cloroformo. Nota: los espectros se han desplazado a lo largo del eje de ordenadas para apreciar las bandas de absorción con mayor claridad.

No obstante, pese a conseguir con ello un aumento de la selectividad, se tuvo en consideración que los desechos resultantes de los disolventes y su utilización suelen clasificarse como peligrosos, así como el hecho de que la sustitución o la utilización más eficaz de los distintos disolventes tóxicos pueden tener efecto positivo sobre el medioambiente y en la cantidad de los desechos generados, respectivamente.

En este sentido, siguiendo con la política de nuestro Grupo de Investigación de desarrollar una Química Analítica medioambientalmente sostenible, en todos aquellos procedimientos de análisis que requirieron del empleo de disolventes se buscó en todo momento, no sólo minimizar la cantidad empleada de éstos sino que en aquellas situaciones en las que fue posible se desarrollaron metodologías enfocadas sobre la proyectada eliminación gradual del uso de disolventes clorados, desempeñando así una importante función en la reducción real de posibles efectos adversos para el medio ambiente y repercusiones ambientales en general.

En aquellos casos en los que se requirió un tratamiento de extracción previo a la adquisición de los espectros, en una etapa inicial se evaluaron las condiciones más adecuadas para llevarlo a cabo, tales como el modo de extracción más efectivo o el tiempo requerido para que dicha extracción resultase cuantitativa.

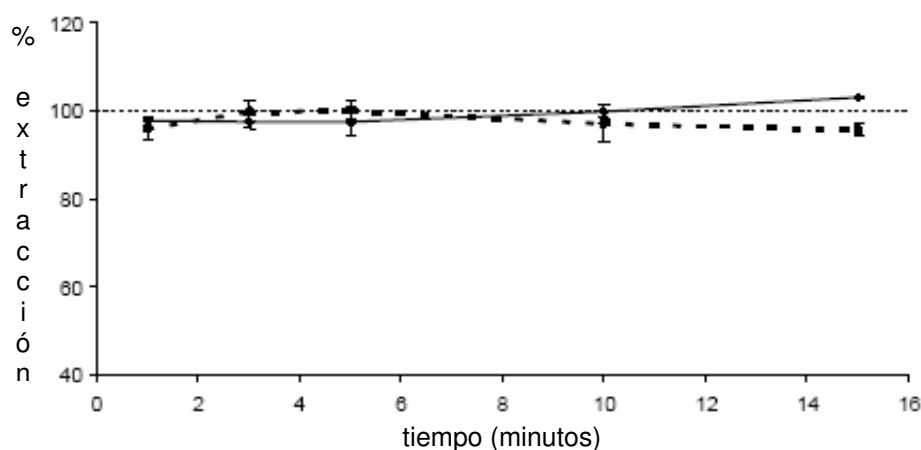


Figura 30. Efecto del tiempo de extracción en la recuperación del diazepam contenido en comprimidos empleando dos modos de extracción: mecánico (—) y asistido con baño de ultrasonidos (- - -). El cálculo del porcentaje de extracción se ha establecido a partir de la concentración de diazepam encontrada en la muestra a través de un procedimiento de referencia (UV-visible). Los valores indicados corresponden a la media para tres determinaciones independientes con sus correspondientes barras de error establecidas a partir de las desviaciones estándar.

Tal y como se indica en la Figura 30, para este fin se evaluaron dos modos de extracción: mecánica y a través del empleo de ultrasonidos. Se diseñó una

experiencia basada en la determinación del porcentaje de recuperación del correspondiente analito de interés en función del modo de extracción empleado y del tiempo invertido. En dicha figura, correspondiente a los resultados obtenidos en el análisis de diazepam en fármacos, se puede apreciar que la extracción asistida por ultrasonidos resultó ser más eficaz, puesto que permitía una extracción cuantitativa del analito en un menor período de tiempo. El hecho de que una extracción prolongada empleando los ultrasonidos proporcionase un menor porcentaje de extracción puede fundamentarse en la posible descomposición del analito de interés por efecto de éstos ¹²⁴.

Finalmente, el acondicionamiento de las disoluciones obtenidas se completó sometiendo las mismas a un proceso de filtración con el fin de obtener unos extractos totalmente transparentes.

Por otra parte, en el resto de situaciones en las que se evidenció cierta dificultad para conseguir una selectividad adecuada a través de un pequeño tratamiento químico previo sobre la muestra, se trabajó con las muestras crudas, buscando la selectividad para el desarrollo de estas metodologías de forma matemática, aprovechando las múltiples respuestas (señales multivariantes) proporcionadas por los espectrofotómetros.

C. Selección de las condiciones instrumentales de medida

Una vez adecuadas las muestras, para proceder a la obtención de los correspondientes espectros, otro de los estudios previos a desarrollar fue la selección de los parámetros de medida más adecuados que, a posteriori, permitirían obtener una información analítica de calidad adecuada.

En este aspecto, dos de los parámetros instrumentales más importantes que se tuvieron en cuenta a la hora de obtener espectros infrarrojos que proporcionasen información significativa fueron el número promediado de barridos del interferómetro (*scans*) para obtener el espectro y la resolución nominal.

La resolución nominal puede considerarse como la definición con la que pueden obtenerse los espectros, permitiéndonos incluso, en ciertas ocasiones, poder diferenciar bandas de absorción que se encuentren relativamente próximas.

Sin embargo, trabajar con un valor de resolución nominal pequeño, esto es, disponer de una mejor definición espectral de las bandas, acarrea en consecuencia un aumento del ruido espectral. No obstante, gracias a la ventaja de los instrumentos que trabajan con transformada de Fourier que permiten obtener un barrido muy rápidamente, es posible promediar una gran cantidad de barridos con el fin de obtener una mejora en la relación señal/ruido (S/R).

Con todo esto, no hay que descuidar que una gran acumulación de barridos del interferómetro o una resolución espectral muy elevada (menor valor, expresado en cm^{-1} o nm), llevan asociado un considerable aumento en el tiempo que se requiere para la adquisición de cada uno de los espectros.

Así pues, para una adecuada selección de dichos parámetros, se desarrolló una experiencia, basada en un diseño monoparamétrico, consistente en evaluar la relación señal/ruido (S/R) obtenida al variar el valor de uno de los parámetros, manteniendo el otro constante. Como rango general de estudio se estableció el intervalo entre 2 y 16 cm^{-1} para la resolución nominal y entre 10 y 75 barridos acumulados, teniendo en cuenta las limitaciones instrumentales de los equipos empleados, mientras que la S/R se evaluó bien empleando el estimador de ruido RMS (*Root Mean Square*) incluido en el *software* del equipo o bien como el cociente entre la señal obtenida para un patrón de concentración conocida empleando un criterio de medida establecido y el ruido generado en un blanco utilizando ese mismo criterio de medida.

En ningún momento se consideró la posibilidad de mejorar la resolución de forma artificial mediante el empleo de valores superiores para la función *zero-filling*.

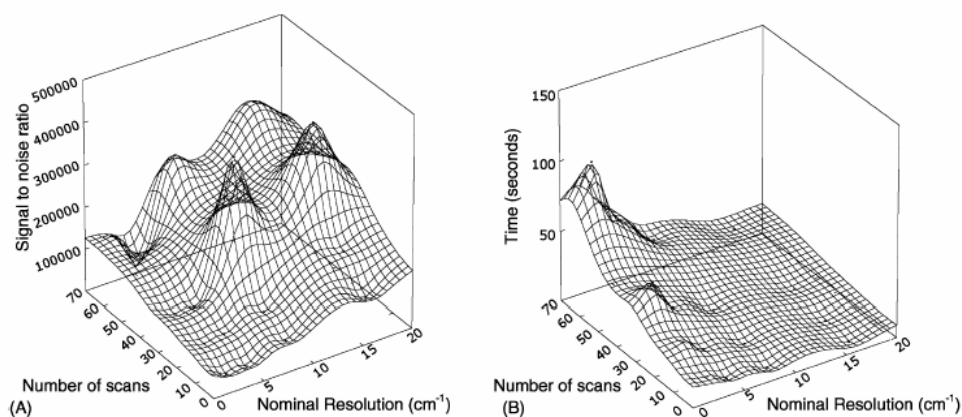


Figura 31. Efecto de la resolución nominal y del número de barridos acumulados del interferómetro sobre la relación señal/ruido (A) y sobre el tiempo de adquisición (B) del correspondiente espectro FT-NIR para un patrón de Diuron de concentración 15.3 mg g^{-1} . Nota: la relación S/R se obtuvo a partir del cociente entre los valores del área medida entre 2025 y 2047 nm corregida con línea base de un punto establecido en 2071 nm para la disolución del patrón y el ruido (medido como raíz cuadrada promedio, RMS, de la señal obtenida para las condiciones anteriormente indicadas) correspondiente a una disolución blanco de acetonitrilo. (Fuente: *Analytica Chimica Acta* 543 (2005); 124-129)

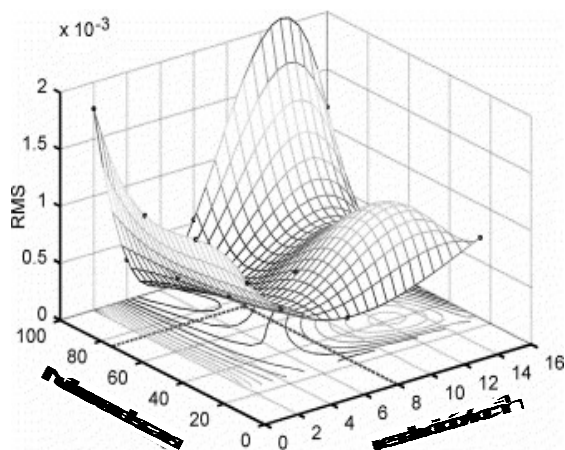


Figura 32. Efecto de los parámetros instrumentales sobre la relación señal/ruido para los espectros FTIR, medidos por reflectancia total atenuada (ATR), correspondientes a muestras de zumos. La evaluación se llevó a cabo para la región espectral comprendida entre 1800 y 1000 cm^{-1} empleando el estimador RMS; los puntos negros indican los valores obtenidos experimentalmente y a partir de los cuales se ha ajustado la curva de superficie. La línea discontinua en la base del gráfico indica la condición instrumental elegida adquiriendo un compromiso entre la relación señal/ruido y el tiempo requerido para la adquisición del espectro. El estudio se realizó para una velocidad del espejo del interferómetro de 0.6329 cm s^{-1} . (Fuente: *Analytica Chimica Acta* 538 (2005); 181-193)

La elección de las condiciones instrumentales más adecuadas para efectuar las medidas en cada situación, no sólo se fundamentó en una información analítica de calidad (la mejor relación S/R) sino también en una frecuencia de análisis elevada.

En las Figuras 31 y 32 se han mostrado algunos ejemplos de este tipo de estudios realizados para distintos modos de medida.

Otro de los parámetros instrumentales que puede afectar a la calidad de las señales es la velocidad del espejo del interferómetro. En este sentido una mayor velocidad del espejo permite acumular un mayor número de barridos para un mismo tiempo de adquisición, sin embargo, también genera una mayor cantidad de ruido. Aunque dicho parámetro también se evaluó a través de un compromiso entre la relación S/R y la frecuencia de análisis, se optó finalmente por trabajar con la velocidad del espejo establecida por defecto por el fabricante de la instrumentación empleada.

Cabe resaltar que para el caso de los métodos desarrollados para llevar a cabo una determinación cuantitativa de los diferentes parámetros nutricionales en muestras de zumos y yogures mediante el empleo de la espectroscopia de reflectancia total atenuada en la región media del infrarrojo (ATR-FTIR), no sólo se evaluaron la resolución nominal y el número de barridos acumulados, sino que también se realizó un estudio de la evolución del espectro con el tiempo para evaluar posibles cambios como consecuencia de la deposición de materia (muestras de zumo conteniendo fibra y/o pulpa) o de la separación de la muestra en diferentes fases (yogures), así como estrategias para la limpieza de la celda de medida que evitasen una contaminación cruzada entre muestras.

Una vez adecuadas las muestras y establecidos los valores más adecuados de los parámetros instrumentales ya se estaba en disposición de obtener los correspondientes datos instrumentales (espectros) con los que establecer el modelo de calibración pertinente.

Mención especial merece, llegados a este punto, la obtención de la información analítica para el desarrollo de una metodología que permitiese la determinación del grado de acidez en muestras de vinagre mediante un tratamiento de segundo orden de los espectros registrados en función del tiempo. Para configurar el correspondiente dispositivo experimental se tomó como

referencia el trabajo presentado por Marsili *et al.*¹²⁵ para la determinación de agentes antimicrobianos en zumo de naranja, en el cual, una muestra previamente basificada, era introducida en un sistema de inyección en flujo con detección ultravioleta (UV) empleando una disolución de ácido clorhídrico como portador.

Fue necesario considerar que cuando se emplea un espectrofotómetro FTIR como detector, el gradiente de pH debe resultar mucho más largo (menos acusado) que el requerido para medidas UV puesto que el tiempo necesario para la adquisición y el promediado de los espectros es mucho mayor para IR que en el caso de UV. Fue por esta razón, por lo que se decidió utilizar un sistema basado en el empleo de la multiconmutación como herramienta de automatización.

Además, con el sistema propuesto, la manipulación de la muestra por parte del analista quedaba reducida al mínimo. De esta forma, las muestras y los estándares se introducían en el sistema empleando el canal muestra/patrón (como se puede apreciar en la Figura 33) y a través de un conjunto de instrucciones específicas de operación enviadas al sistema de válvulas solenoides el dispositivo se auto-ejecutaba.

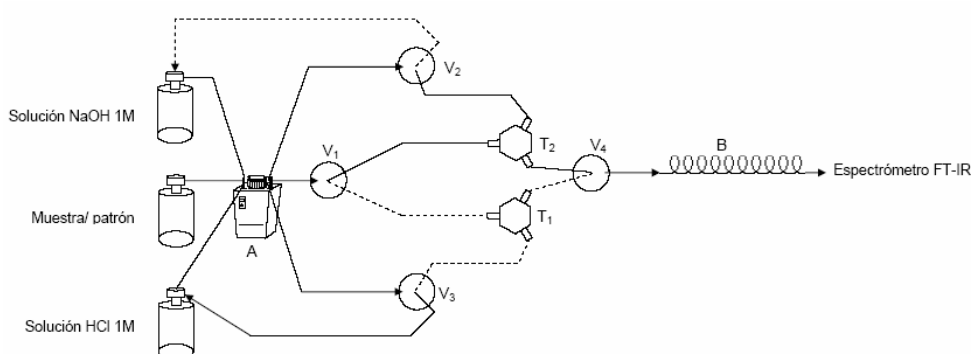


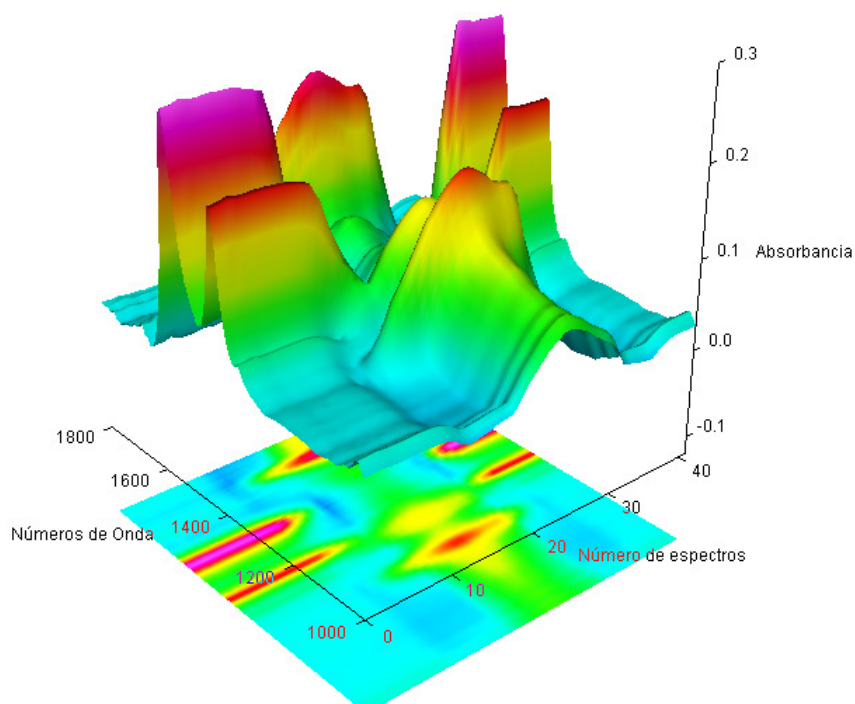
Figura 33. Dispositivo utilizado para la determinación, mediante el empleo de la multiconmutación combinada con la espectroscopia ATR, de la acidez total de muestras comerciales de vinagre. V₁, V₂, V₃, y V₄, son válvulas solenoides de 3 vías, B, serpentín de mezclado; A, bomba peristáltica; T₁ y T₂, puntos de unión. Las líneas continuas en el interior del símbolo de las válvulas indican la dirección del flujo cuando las válvulas se encuentran energizadas, mientras que las líneas punteadas se corresponden con el camino del flujo cuando las válvulas se encuentran no energizadas.

Previo a las medidas de multiconmutación se estableció un *background* de la disolución de NaOH empleada como portador. Como puede apreciarse, la red de flujo estaba compuesta por un conjunto de 4 válvulas solenoides de tres vías controladas mediante ordenador y que permitían una mejor manipulación de las disoluciones a través de la utilización de una bomba peristáltica de múltiples canales. De acuerdo con la configuración mostrada, cuando se iniciaba el *software* de control, las válvulas solenoides, V_1 , V_2 y V_4 se encontraban energizadas de manera que las disoluciones de patrones o las muestras junto con la disolución de NaOH fluían juntas hacia el espectrofotómetro después de haberse mezclado en el punto T_2 , mientras que la válvula V_3 permanecía no energizada y la disolución de HCl recirculaba hacia su recipiente. Posteriormente, a través de una estrategia coordinada de ciclos de las válvulas, la válvula V_3 se energizaba durante fracciones variables de tiempo mientras que, simultáneamente, las válvulas V_1 , V_2 y V_4 pasaban a un estado no energizado, de tal manera que muestras o patrones se juntaban con la disolución de HCl en el punto de confluencia T_1 y se mezclaban en el serpentín de reacción B generando un gradiente de pH durante su desplazamiento hacia el espectrofotómetro.

De este modo se conseguía que tras la válvula V_4 la composición de la disolución variase linealmente desde un 100 % de la disolución fluyendo a través del punto de unión T_2 hasta un 0% (100% de la disolución fluyendo a través del punto de unión T_1) en un tiempo de 1 minuto para luego retornar a un 100 % durante otro minuto. Este procedimiento resultaba similar a la aplicación de un gradiente en forma de "V" durante 2 minutos. Resaltar que el factor de dilución entre las muestras y las disoluciones de NaOH o HCl, en cada canal, se controló, a través del diámetro interno de los tubos de bomba peristáltica escogidos, para que fuese el mismo en todo momento.

Con la ayuda de esta instrumentación fue posible obtener señales instrumentales de segundo orden, esto es, los espectros de disoluciones estándar y muestras a diferentes valores de pH (en función del tiempo), de aspecto similar al que se muestra en la Figura 34.

Con este tipo de información analítica fue posible utilizar herramientas quimiométricas basadas en el empleo del algoritmo de calibración de segundo



orden conocido como PARAFAC (acrónimo de su nombre en inglés *PARAllel FACtor analysis*).

Figura 34. Espectros FTIR en función del tiempo obtenidos mediante multicommutación y medidas de ATR, correspondientes a una disolución estándar de ácido acético en agua de concentración 6.56 % p/v, en el rango espectral entre 1800 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} .

D. Etapas para la elaboración del modelo de calibración

Diseño del conjunto de Calibración

Para poder establecer un modelo de calibración, dotado de una buena capacidad de predicción, que permitiese llevar a cabo la determinación cuantitativa

de los distintos analitos en las diferentes matrices manejadas en el desarrollo de esta Tesis fue necesario diseñar un conjunto de objetos que representasen toda la variabilidad existente, no solo química sino también física, conocido como conjunto de calibración.

El diseño de este conjunto se realizó, cuando fue posible, teniendo en cuenta la disponibilidad de estándares comerciales de los analitos de interés.

Para aquellos casos en los que se dispuso de estándares comerciales, el conjunto de calibración se diseñó preparando un mínimo de cinco patrones de diferente concentración por dilución con un diluyente lo más semejante posible a la matriz que contenía el analito en los objetos de análisis. De este modo, en los procedimientos en los que las muestras se trataron previamente, se empleó, para la preparación de los patrones de calibración, el disolvente utilizado para llevar a cabo las extracciones.

Destacar que para el análisis en fase sólida de formulaciones comerciales de pesticidas conteniendo mancozeb, se empleo el caolín como polvo diluyente para elaborar los patrones de calibración, no sólo por ser una sustancia con cierta transparencia a la radiación NIR, sino también porque comúnmente se emplea como carga o coadyuvante en la preparación de estos productos fitosanitarios sólidos, por su carácter antiapelmazante y su baja o nula reactividad.

Por otra parte, para la determinación de tetrametrina y butóxido de piperonilo en lociones contra la *pediculosis*, mediante medidas de transmisión y de reflectancia total atenuada en la región media del espectro infrarrojo, el hecho, no sólo de disponer de estándares comerciales de ambos analitos sino también de información acerca de algunos de los componentes contenidos en las muestras, permitió preparar un conjunto de patrones combinados (*matched standards*) de características muy similares a la propia matriz. Del mismo modo, también para la determinación cuantitativa de hidrocarburos se prepararon patrones combinados de los tres analitos considerados (tolueno, *n*-hexano e isoctano).

En el caso de los métodos desarrollados para el análisis de parámetros nutricionales (carbohidratos, proteínas, grasas y valor energético o contenido de cacao) en distintos productos alimenticios, el no disponer de estándares comerciales apropiados para los analitos de interés, obligó a establecer el diseño del conjunto de calibración a partir de las propias muestras de análisis empleando

las técnicas del análisis no supervisado de pautas (análisis de conglomerados). En nuestra opinión, el empleo de este procedimiento, en estas situaciones, garantizaba calibraciones más robustas puesto que el conjunto de calibración reflejaba de una forma más exacta el rango de variabilidad que cabía esperar para las muestras desconocidas.

El propósito de esta metodología no era otro que agrupar los distintos objetos en grupos empleando alguna medida de similitud o de distancia a partir de los correspondientes espectros IR y que dichos grupos pudiesen explicarse en función de la composición de las muestras seleccionadas. Es por ello que, a diferencia de la anterior situación, en estos casos todas las señales analíticas (espectros) se debieron adquirir con anterioridad al diseño del conjunto de calibración.

Así, para la evaluación cuantitativa de los principales parámetros nutricionales en muestras de zumos y batidos, yogures o chocolates, se evaluó en primer lugar la influencia de los diferentes tipos de distancias para la generación de los conglomerados (*clusters*) así como el algoritmo de enlace entre los diferentes grupos generados, considerándose como criterio más apropiado aquel que permitió explicar de forma coherente la separación de los objetos en grupos en base a los valores de los distintos parámetros nutricionales. En todos los casos se utilizó la distancia Euclídea como medida de similitud y el algoritmo Ward como método de enlace entre los diferentes grupos establecidos.

Otra variable que se evaluó fue el efecto que provocaba en los grupos generados el hecho de trabajar con el espectro completo o sobre las puntuaciones (centradas o no) de los componentes principales más relevantes obtenidos tras un análisis de componentes principales (PCA).

Finalmente comentar que, en el caso concreto del análisis de zumos y batidos, se comprobó el efecto de la aplicación del algoritmo de corrección ATR, como otra variable de tratamiento previo de los datos, para comprobar el efecto del mismo en la clasificación de los distintos objetos para la construcción de los conglomerados.

A modo de ejemplo, la Figura 35 muestra los diferentes dendrogramas obtenidos, empleando la distancia y el algoritmo de enlace anteriormente citados, a partir de las puntuaciones correspondientes a los componentes principales más relevantes obtenidos, a partir de los datos no centrados, tras un análisis de componentes principales.

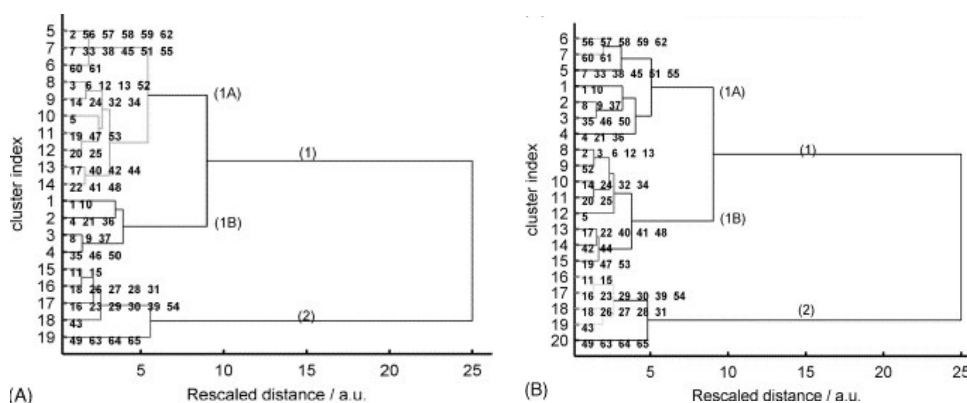


Figura 35. Clasificación dendrográfica, basada en los espectros obtenidos mediante medidas de reflectancia total atenuada en el MIR, de las distintas muestras de zumos y batidos empleadas para el análisis de parámetros nutricionales a partir de las puntuaciones de los 5 primeros componentes principales extraídos vía PCA, empleando la distancia Euclídea y el algoritmo Ward para los datos espectrales previamente tratados mediante el algoritmo de corrección ATR (A) y sin corregir (B). (Fuente: *Analytica Chimica Acta* 538 (2005); 181-193).

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de conglomerados se establecieron una serie de criterios para establecer la composición del conjunto de calibración. El primer criterio para la selección de muestras que conformarían el conjunto de calibración se fundamentó en los siguientes principios: como mínimo un objeto de cada uno de los grupos formados se escogió para formar parte del conjunto de calibración, además, en aquellos casos en los que el grupo estaba integrado por más de un objeto, el número de objetos seleccionado para el conjunto de calibración fue el número más cercano a la raíz cuadrada del total de los objetos contenidos en el grupo, mientras que el resto de los objetos no seleccionados pasaban a formar parte del denominado conjunto de validación. La selección de los objetos dentro de cada grupo se realizó de forma aleatoria.

Resaltar, que en el trabajo relacionado con el análisis de parámetros nutricionales en muestras de zumo y batidos, con el fin de evaluar la representatividad de los conjuntos de calibración y validación establecidos mediante este procedimiento se desarrolló un estudio alternativo consistente en

establecer un segundo criterio de selección basado en emplear un modelo de calibración extendido que incluía las muestras de todos los grupos individuales, pero en esta ocasión la raíz cuadrada de los objetos de los grupos que contenían más de un objeto se reservó para el conjunto de validación mientras que el resto se incluyó en el conjunto de validación. En consecuencia, mediante este criterio, el número de muestras que formaban parte del conjunto de calibración era mayor que en el caso anterior.

En la Tabla 7, a modo de ejemplo, se indica la composición de los conjuntos de calibración y validación empleados para el análisis de zumos y batidos, atendiendo a los dos criterios de selección anteriormente comentados.

		Número de objetos	Valor Energético promedio \pm s (kJ/100mL)	Contenido Carbohidratos promedio \pm s (g/100mL)
Criterio 1	Conjunto de calibración	27	204 \pm 69	11.0 \pm 3.3
	Conjunto de Validación	38	224 \pm 84	11.4 \pm 3.7
Criterio 2	Conjunto de calibración	40	203 \pm 81	10.7 \pm 3.8
	Conjunto de Validación	25	203 \pm 70	10.7 \pm 2.9

Tabla 7. Descripción y resumen de las propiedades de los conjuntos de calibración y validación establecidos tras la aplicación de los 2 criterios de selección sobre el dendrograma obtenido a partir de los espectros de infrarrojo mediante medidas de reflectancia total atenuada empleados para el análisis de parámetros nutricionales en muestras de zumos y batidos. (Fuente: *Analytica Chimica Acta 538 (2005); 181-193*).

Construcción de los modelos de calibración

Una vez obtenida toda la información analítica deseada se procedió a la construcción del modelo de calibración que permitiese establecer, de forma simple, la mejor relación entre la señal analítica y la propiedad o parámetro que se pretendía cuantificar.

El grado de selectividad ofrecido por la información espectral es el que en definitiva marcó la selección del modelo de calibración, y de acuerdo con la

clasificación mostrada en la Figura 27, los trabajos que engloban la presente Memoria de Tesis pueden dividirse en varios bloques:

- a) Empleo de la calibración de orden cero para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional

Para el desarrollo de modelos matemáticos basados en la calibración univariante, los espectros obtenidos, tanto para el conjunto de calibración como para las distintas muestras, se compararon con el fin de comprobar si se apreciaban las mismas bandas de absorción libres de interferencias o, por el contrario, las bandas características del componente que se pretendía evaluar se encontraban solapadas o afectadas por las correspondientes a otros componentes de la muestra, lo que indicaría que las etapas previas no habrían proporcionado la selectividad adecuada.

El siguiente paso, fue seleccionar los criterios de medida que permitirían establecer el modelo de calibración más adecuado con las mejores características analíticas para llevar a cabo las correspondientes determinaciones. Para ello se evaluaron distintas condiciones de medidas de altura y/o área para aquellas bandas de absorción que previamente se consideraron mejor relacionadas con el analito de interés, empleándose un adecuado tratamiento espectral, como por ejemplo, una corrección de línea base, que permitiesen reducir al máximo las posibles interferencias espectrales que pudiesen permanecer tras el proceso de extracción del analito y obtener, en consecuencia, mejores características analíticas en los resultados finales.

La elección del criterio más adecuado para llevar a cabo la cuantificación se estableció llegando a un compromiso entre los valores encontrados para las distintas características analíticas consideradas, entre otras, buena precisión y exactitud, buena linealidad, elevada sensibilidad y bajos límites de detección y cuantificación.

De este modo, dentro de los procedimientos desarrollados basados en el empleo de la calibración univariante, fue posible establecer dos situaciones:

Por un lado, aquella en la que, el tratamiento previo de extracción sobre la muestra resultó ser altamente selectivo, de manera que el modelo de calibración se pudo establecer a partir de la medida directa de la altura o área de la banda de absorción característica, como fue el caso de los procedimientos desarrollados para la determinación de diazepam en formulaciones farmacéuticas o la determinación de distintos ingredientes activos como, metamitrona, diuron, clorsulfuron, iprodiona, pirimicarb, procimidona y triciclazol en formulaciones de productos fitosanitarios y, por otra parte, la situación en la que se requirió de una serie de tratamientos matemáticos adicionales, como el empleo de la espectroscopia derivada, con el fin de poder establecer un modelo más exacto y preciso, como fue el caso de la determinación de oxadiazon en formulaciones comerciales de herbicidas, ya que, como puede apreciarse en la Figura 36, existe un importante contribución por parte de otros componentes presentes en la muestra que hace imposible la relación directa y requiere de la utilización de la primera derivada (Figura 37).

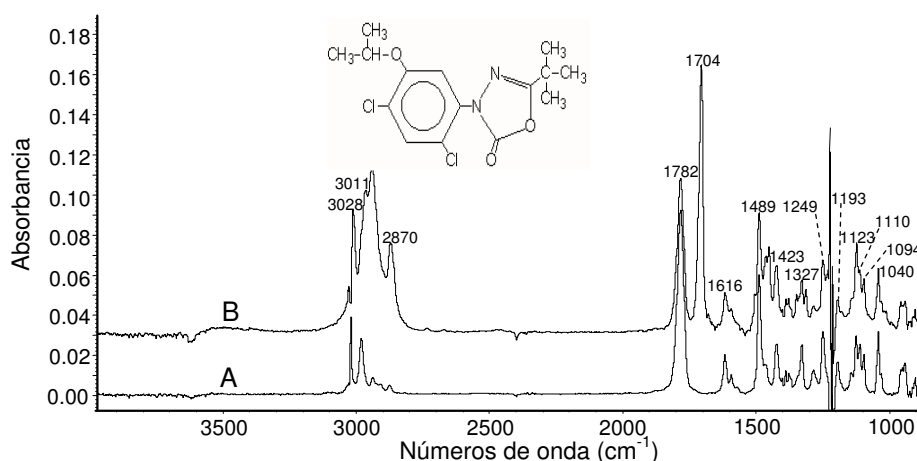


Figura 36. Espectros FTIR de oxadiazon: (A) patrón de oxadiazon en cloroformo, con una concentración de 1.63 mg g^{-1} y (B) extracto de una muestra comercial. *Nota:* los espectros han sido desplazados en el eje y para mostrar más claramente sus bandas. Condiciones instrumentales: 25 barridos del interferómetro por espectro, resolución nominal de 4 cm^{-1} , empleando un *background* de la celda llena de cloroformo.

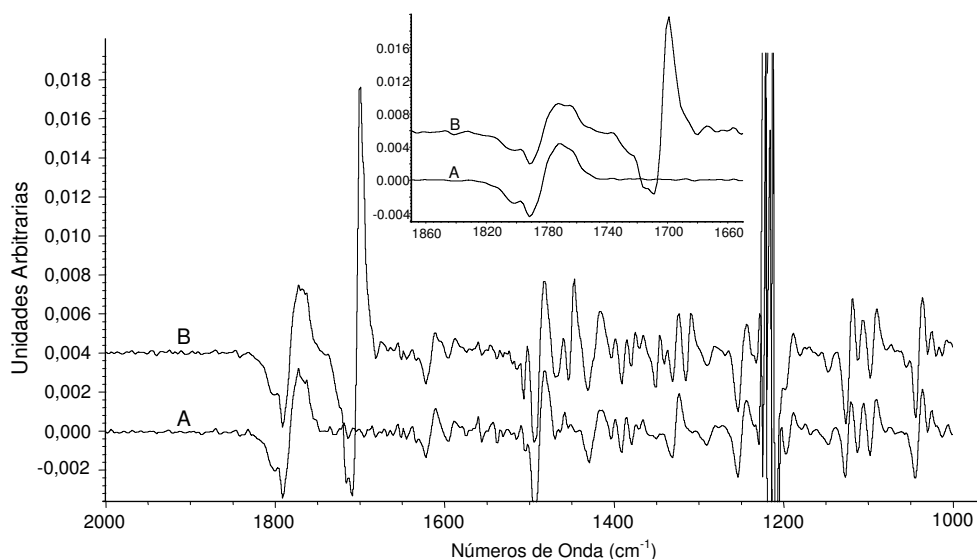


Figura 37. Espectros FTIR en primera derivada de oxadiazon: (A) patrón y (B) extracto de una muestra. En el recuadro se indican en detalle los espectros en la región de 1870 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} tras aplicar un suavizado de 5 puntos. *Nota:* los espectros han sido desplazados en el eje y para mostrar más claramente sus bandas. Condiciones instrumentales: 25 barridos del interferómetro por espectro, resolución nominal de 4 cm^{-1} , empleando un *background* de la celda llena de cloroformo.

Analito	Altura/ Área (cm^{-1})	Línea base (cm^{-1})	Curva de calibración $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) C (\text{mg g}^{-1})$		r	R.S.D. %	LOD (mg g^{-1})
			$a \pm s_a$	$b \pm s_b$			
Diazepam	1682-1672	1850-1524	0.0052 ± 0.0017	0.4574 ± 0.0016	0.9999	0.5	0.006
Diuron	4948-4885	4829	0.005 ± 0.006	$81.6 \pm 0.3^{**}$	0.9999	0.03	0.013
Metamitrona	6434-6394	6555-6228	0.01 ± 0.02	0.0619 ± 0.0007	0.9990	0.07	0.004
Clorsulfuron	4688-4623	4710-4604	-0.0001 ± 0.0018	0.03791 ± 0.00012	0.9999	0.17	0.03
Iprodiona	4922-4860	4821	-0.026 ± 0.012	0.1427 ± 0.0007	0.9998	0.04	0.005
Pirimicarb	4679-4659	4787-4636	-0.0016 ± 0.0007	0.00555 ± 0.00004	0.9996	0.4	0.05
Procimidona	4691-4653	4756-4621	-0.003 ± 0.007	0.0409 ± 0.0004	0.9994	0.7	0.17
Triciclazol	4681-4640	4700-4632	-0.0008 ± 0.0016	0.02720 ± 0.00010	0.9999	0.05	0.02
Oxadiazon*	1774-1770	1950	-0.00009 ± 0.00007	0.00721 ± 0.00004	0.9998	1.3	0.03

Tabla 8. Resumen de las condiciones de medida seleccionadas y de las características analíticas alcanzadas para los modelos de predicción basados en el empleo de la calibración univariante para llevar a cabo la determinación cuantitativa de distintos analitos de interés empleando medidas obtenidas mediante espectroscopia de transmisión en las regiones media y cercana del espectro infrarrojo. (Nota: *empleo de la espectroscopia derivada, **C expresada en g g^{-1}).

A modo de ejemplo, en la Tabla 8 se detallan algunas de las características analíticas, tal como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, como son la precisión o variabilidad, expresada como RSD (*Relative Standard Deviation*) para patrones, la linealidad, representada por el coeficiente de correlación múltiple (r), la sensibilidad, entendida como la pendiente de la curva de calibración (b) y el límite de detección (LOD, *Limit Of Detection*), calculado como 3 veces la desviación estándar de la señal obtenida para un blanco dividida por la pendiente de la curva de calibración (IUPAC, 1975, Long and Winefordner).

- b) Empleo de la calibración de primer orden para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional

A pesar de que cuando se utiliza una técnica instrumental en análisis cuantitativo lo más habitual, a la vez que lo más sencillo, es calcular un modelo matemático univariante que permita predecir la propiedad de interés a partir de la medida instrumental, cuando no se dispone de la selectividad adecuada o ésta no puede alcanzarse con un pequeño tratamiento previo sobre la muestra, es necesario emplear los modelos de calibración multivariante para predecir la propiedad de interés a partir de las múltiples respuestas instrumentales. Entre sus ventajas frente a los modelos basados en el empleo de la calibración univariante podríamos señalar que permiten llevar a cabo la determinación cuantitativa a partir de medidas no selectivas (es decir, en presencia de interferencias) y que es posible detectar muestras discrepantes en la predicción.

Estos modelos resultan especialmente útiles para el análisis cuantitativo mediante técnicas espectroscópicas puesto que la medida de un espectro es una forma rápida y simple de generar varios cientos de datos. La calibración multivariante permite cuantificar a partir de ellos y mejorar la velocidad de análisis puesto que se evita realizar los tratamientos previos necesarios para alcanzar el grado de selectividad requerido por los métodos univariantes para su aplicación.

En la segunda parte de esta Memoria de Tesis, se han establecido una serie de procedimientos para la determinación cuantitativa de distintos componentes y parámetros en diferentes matrices haciendo uso de la calibración multivariante y que, además, podían agruparse bajo la premisa de que en ellos no se requirió ningún tratamiento químico previo de las muestras, a excepción del análisis de hidrocarburos (tolueno, *n*-hexano, e isooctano), por lo que las medidas podían efectuarse directamente sobre las mismas muestras.

Para la gran mayoría de los procedimientos desarrollados en este apartado se utilizó el algoritmo de regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) para establecer la correlación entre las distintas variables y obtener el correspondiente modelo predictivo. Con el empleo de este método los espectros IR se descompusieron para que su información quedase contenida en un número reducido de factores sin que ello implicara una pérdida de información relevante. Además, con la eliminación de ciertas regiones del espectro que no aportaban información se pretendía establecer modelos de calibración mejores y mucho más robustos.

La principal ventaja de este método fue permitir el análisis de mezclas complejas dado que sólo se requerían conocimientos acerca de los constituyentes de interés e incluso, en ocasiones, pudo emplearse para predecir los parámetros de interés en muestras que contenían componentes adicionales que no se encontraban presentes en las mezclas de calibración empleadas. Sin embargo, pese a ser una técnica de análisis estadístico, conviene resaltar que en algunas de las ocasiones se pudo correlacionar la información espectral con la concentración o el parámetro a determinar sin necesidad de emplear un elevado número de patrones de calibración, lo que adquiere una especial importancia desde el punto de vista de la productividad del laboratorio, ya que el tiempo requerido para la etapa de calibración es menor.

En el estudio de los correspondientes modelos se emplearon el programa TurboQuant Analyst (versión 6.0) desarrollado por Thermo Nicolet Corp. (Madison, WI, USA) y el paquete de herramientas quimiométricas, desarrollado para el programa MATLAB por Olivieri *et al.*,

conocido bajo la denominación de calibración multivariante 1 (MVC1) ¹²⁶.

Para la elaboración, en cada caso, del mejor modelo se realizó una selección del número óptimo de factores, que permitiesen describir la variación en cada modelo, basándose en el criterio de Haaland y Thomas ⁸⁰, es decir, que minimizasen el valor de la raíz cuadrada de la media del error al cuadrado para un proceso de validación cruzada (RMSECV). Además para mejorar la eficacia predictiva del modelo de regresión establecido, se consideró la búsqueda del mínimo valor para la suma de cuadrados del error residual de la predicción (PRESS) en función del número de factores, dado que cada vez que un factor que representa información útil se incluye en el modelo de calibración, el error se reduce y el valor del PRESS disminuye.

Basándonos en estas consideraciones, se estudiaron, para el conjunto de calibración previamente establecido, diversas regiones espectrales para construir los modelos de predicción más apropiados, buscando siempre la minimización tanto del error de calibración como del error de predicción.

Para determinar el grado de ajuste de los datos mediante el empleo del modelo se evaluó la medida de la raíz cuadrada del promedio del error de calibración al cuadrado (RMSEC), que se puede definir como:

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n_i}} \quad (29)$$

donde \hat{C}_i indica los valores del parámetro de interés predichos para todos los n objetos que forman parte del conjunto de calibración y están siendo empleados para la construcción del modelo y C_i , los valores de dicho parámetro evaluado mediante una metodología oficial o de referencia para esos mismos objetos.

El valor de RMSECV también puede considerarse como una medida de la capacidad predictiva de un modelo construido empleando una parte de los objetos en el conjunto de calibración y considerando el resto como objetos de predicción. El RMSECV puede definirse mediante la anterior

ecuación, pero con la excepción de que $\hat{\mathbf{C}}_i$ corresponde, en esta ocasión, a predicciones para objetos no incluidos en la construcción del modelo, y siendo n los grados de libertad son el número de veces que se repite el proceso de validación cruzada.

Redes Neuronales Artificiales (RNA)

Dentro del empleo de la calibración multivariante (o de primer orden) merece una mención aparte el empleo de las redes neuronales artificiales.

A pesar de la amplia variedad de redes neuronales y algoritmos de entrenamiento existentes, la determinación de los principales parámetros nutricionales en muestras de chocolate, empleando medidas de reflectancia difusa en la región cercana del espectro infrarrojo, se centró en el empleo de una red bicapa en cascada (*double-layer feed-forward*) entrenada mediante el algoritmo de retro-propagación (*back-propagation learning rule*), principalmente por tratarse de un tipo de red neuronal que permite resolver problemas que impliquen clasificación, representación gráfica, modelado u optimización y por la simplicidad de su desarrollo, además de su versatilidad, que han hecho de este tipo de red uno de los más empleados para la resolución de problemas en el área química.

En el proceso de optimización de una red neuronal, los parámetros relacionados con cada función (sesgos -bias- y valores de peso de la función de transferencia de cada neurona) se calcularon a partir de los valores espectrales y de concentraciones del conjunto de calibración establecido previamente con el fin de minimizar el valor de RMSEP para un conjunto de validación. En cada modelo ensayado, se estableció un único nodo de salida para llevar a cabo la optimización de los anteriores parámetros.

Teniendo en cuenta que la calidad de un modelo generado mediante una red neuronal depende, en gran medida, de la calidad de los datos suministrados, se decidió realizar un tratamiento previo de los mismos basado en el análisis en componentes principales, para posteriormente

construir los modelos a partir de las puntuaciones de los factores extraídos, en lugar de emplear todas las variables espectrales obtenidas, puesto que en este último caso la capacidad computacional que se requiere es mucho mayor y resulta más complejo no sólo construir sino también optimizar la red neuronal.

Es importante destacar que el análisis en componentes principales es una técnica de reducción lineal, mientras que las redes neuronales artificiales se emplean preferiblemente para sistemas no lineales. Esto justifica el hecho de que fuese necesario, para el desarrollo de los pertinentes modelos, evaluar un mayor número de componentes principales puesto que las contribuciones no lineales no quedan extraídas en los factores más significativos. La siguiente figura muestra la superficie de contorno para el RMSEP en función del número de componentes principales y del número de neuronas contenidas en la capa oculta. A partir de estas representaciones fue posible escoger tanto el número óptimo de componentes principales como de neuronas (considerando sólo la función de transferencia tangente hiperbólica para la capa oculta y lineal para la capa de salida).

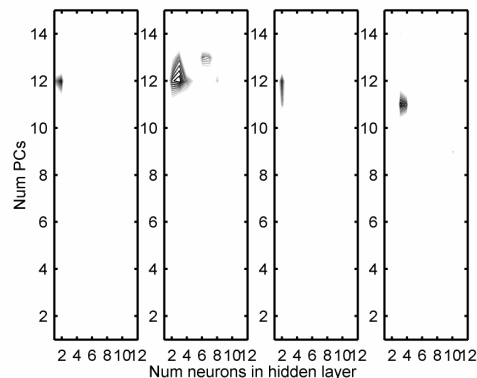


Figura 38. Superficies de contorno para los valores de RMSEP de distintos parámetros nutricionales evaluados a través del tratamiento mediante redes neuronales artificiales de los espectros correspondientes a muestras de chocolates obtenidos mediante medidas de reflectancia difusa en el NIR. De izquierda a derecha: hidratos de carbono, grasa, valor energético y cacao. Todas las neuronas de la capa oculta tenían una función de transferencia tangente hiperbólica.

Como puede apreciarse, para todos los parámetros nutricionales evaluados, el número óptimo de componentes principales se encontró en torno a 12, aunque la contribución a la varianza global del duodécimo componente principal resultó inferior al 0.01%.

Opcionalmente, los datos originales pueden auto-escalarse antes de llevar a cabo el análisis en componentes principales. De este modo, se realizó el análisis en componentes principales con y sin auto-escalado de los espectros. En todos los casos se consiguieron mejores resultados de predicción con el empleo de los espectros originales.

En contraste con el empleo de la regresión parcial por mínimos cuadrados, normalmente, en las redes neuronales no resulta necesario centrar en la media las variables de entrada antes del entrenamiento ya que los sesgos actúan como compensaciones en el modelo.

El entrenamiento de las redes neuronales no se fundamenta en la maximización de la varianza-covarianza, y además no resulta necesario escalar las diferentes variables a varianza la unidad. La única restricción para las redes neuronales es escalar cada variable de entrada de tal manera que el entrenamiento se inicie dentro del rango activo de las funciones de transferencia no lineales. Así, en este trabajo, las muestras se escalaron empleando una aplicación lineal denominada *min-max scaling*, determinada para el conjunto de entrenamiento y aplicada a todos los objetos en estudio.

En el caso de otros parámetros, el comportamiento de las neuronas no lineales se comprobó por medio de un gráfico de la activación de los nodos ocultos para los datos del final del entrenamiento.

Si la activación de un nodo oculto tenía lugar solo en la parte lineal de la función de transferencia, dicho nodo podía ser reemplazado por una función de transferencia lineal. Por el contrario, cuando se encontraba activado en una porción no lineal, sugería la presencia de un comportamiento no lineal y, en ese caso, la función lineal no podía emplearse. De este modo fue posible obtener información sobre el grado de no linealidad para un conjunto dado de datos y reemplazar neuronas lineales por no-lineales.

La Figura 39 muestra, para el estudio de la determinación del contenido de cacao en chocolates, la activación de los nodos a partir de las muestras de validación. Como se puede apreciar, para la mayoría de los nodos, la activación tuvo lugar en la porción lineal, mientras que en unos pocos ocurrió en la porción no lineal. Lo mismo sucedió para el resto de los parámetros analizados, con la excepción del valor energético, para el cual todos los nodos tenían las activaciones en la porción no lineal.

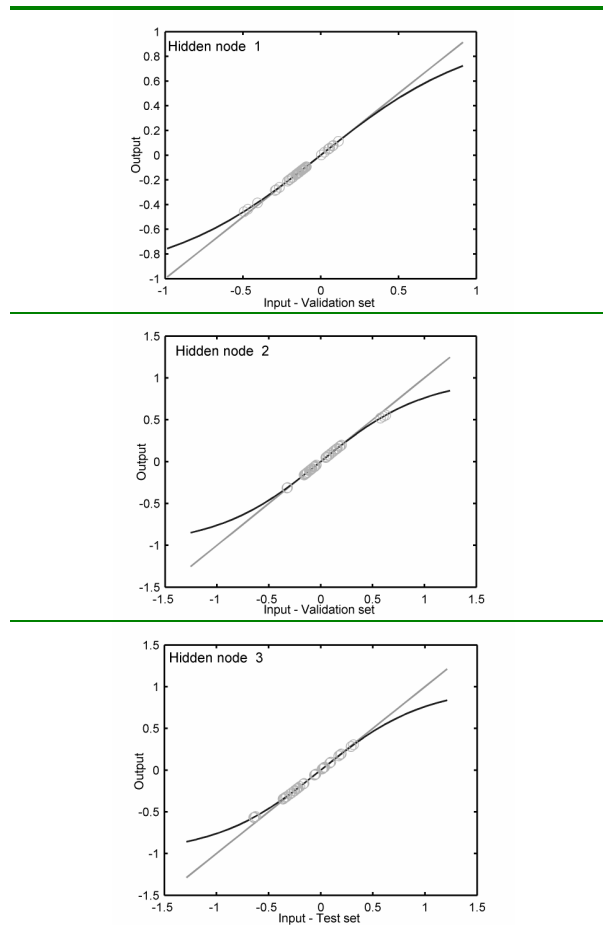


Figura 39. Nodos de activación para el análisis, empleando redes neuronales artificiales, del contenido de cacao en chocolates por medidas de reflectancia difusa en el NIR considerando una función de transferencia no lineal.

Además, para cada uno de los analitos en estudio se evaluó el número de neuronas lineales y no lineales en términos del valor de RMSEP.

La Tabla 9 resume las diferentes características de los modelos de redes neuronales óptimos construidos para los distintos parámetros evaluados.

	Carbohidratos	Grasa	Valor energético	Cacao
Numero de factores	12	12	9	12
Topografía de la primera capa +	LH	LHHHHH	HHHHHH	LH
RMSEC*	2,5	1.2	27	1.2
RMSEP*	1.0	1.0	50	1.4

Nota: * Valores expresados en % p/p, excepto para el valor energético que están expresados en KJ/100 g.

+ L y H indican una neurona con función de transferencia lineal o hiperbólica, respectivamente. En todos los casos la topografía establecida para la capa oculta fue una única neurona con una función de transferencia lineal.

Tabla 9. Características de los modelos óptimos de redes neuronales construidos para los distintos parámetros evaluados en el estudio de chocolates por medidas de reflectancia difusa.

- c) Empleo de la calibración de segundo orden para el tratamiento de datos analíticos obtenidos mediante espectroscopia vibracional

Resulta también reseñable el Capítulo en el que se propuso el empleo de la calibración de segundo orden para llevar a cabo la determinación del grado de acidez en muestras de vinagre. El desarrollo de la metodología propuesta se dividió fundamentalmente en dos aspectos. De un lado el diseño del dispositivo experimental para la generación de gradientes de pH mediante un sistema de flujo empleando la multiconmutación, que requiere una mínima intervención por parte del analista (como se ha descrito anteriormente) y, de otro, el tratamiento quimiométrico de los datos de dos dimensiones.

A pesar de que una característica interesante de la regresión PLS es que la calibración puede llevarse a cabo ignorando las concentraciones de todos los otros componentes excepto el analito de interés, todos los métodos de calibración de primer orden, incluido el PLS, resultan sensibles a la presencia de componentes no modelados. Una buena alternativa para la resolución de este inconveniente relacionado con interferentes inesperados consiste en proponer datos de segundo orden, los cuales resultan particularmente convenientes para el análisis cuantitativo de muestras multicomponentes complejas. En este sentido, en relación con el tratamiento quimiométrico, el análisis factorial paralelo (PARAFAC) fue el método elegido para la manipulación de los datos obtenidos en tres dimensiones (*three-way array*).

El algoritmo PARAFAC es de tipo iterativo, y ha sido ampliamente utilizado por considerarse menos sensible al ruido instrumental y a las desviaciones del modelo. Este algoritmo resulta especialmente útil cuando los datos siguen el llamado modelo trilineal (*trilinear model*), es decir, modelos que disponen de una estructura que permite la disección matemática de espectros de muestras complejas sin el uso de ninguna otra información sobre las propiedades del analito. Esto se debe al hecho de que la descomposición de los conjuntos de datos en tres dimensiones, contruidos con matrices respuesta medidas para un número de muestras, es a menudo única, permitiendo extraer directamente perfiles espectrales así como concentraciones de componentes individuales de la muestra.

Así pues, para el caso que nos ocupó, el método PARAFAC fue el procedimiento de descomposición que nos permitió simplificar el conjunto de datos en tres dimensiones (3D), compuesto, en cada caso, por los espectros acumulados de todos los estándares de calibración más los de la muestra que se pretendía analizar, en tres matrices de cargas (una relacionada con el perfil espectral, otra con el tiempo o variación del pH, y la tercera relacionada con la concentración del componente individual).

Teniendo en cuenta que el método PARAFAC es un algoritmo de tipo iterativo, con el fin de reducir el tiempo destinado a la computación sólo se consideró la región espectral comprendida entre 1800 y 1230 cm^{-1} , teniendo en cuenta que se trataba de la región que comprendía las

bandas de absorción más significativas, correspondientes a los enlaces carbonilo de la molécula del ácido acético/acetato.

$$\begin{aligned}
 \underline{X} &= \begin{matrix} c_1^T \\ b_1^T \\ a_1 \end{matrix} + \begin{matrix} c_2^T \\ b_2^T \\ a_2 \end{matrix} \dots + \begin{matrix} c_F^T \\ b_F^T \\ a_F \end{matrix} + \underline{E} \\
 &= \begin{matrix} \underline{C^T} \\ \underline{B^T} \\ \underline{A} \end{matrix} + \underline{E}
 \end{aligned}$$

The diagram shows a 3D cube labeled \underline{X} with axes j , k , and l . It is decomposed into a sum of F triads, each consisting of three vectors a_i , b_i^T , and c_i^T . The first triad is labeled 'Triade'. The final decomposition shows a vertical vector \underline{A} , a horizontal vector $\underline{B^T}$, and a horizontal vector $\underline{C^T}$ (represented as a plane), plus a 3D error cube \underline{E} .

Figura 40. Representación gráfica del desarrollo del modelo PARAFAC, aplicado a la descomposición de un conjunto de datos tridimensional en F tríadas de vectores peso.

Uno de los primeros requisitos para la aplicación del modelo PARAFAC fue determinar el número de factores necesario para la simplificación del conjunto 3D para cada una de las muestras de vinagre. Para este propósito se utilizó el **diagnóstico de consistencia** de la matriz central (CORCONDIA, *CORe CONSistency DIAgnostic*)¹¹⁷. A diferencia de lo que ocurre cuando trabajamos con la calibración de primer orden, en la de segundo orden el número de factores depende de la muestra y, por este motivo, para cada una de ellas debe ser comprobado. El conjunto interno de concordancia del modelo es el que permite corroborar el número de factores en cada caso (que está relacionado con el número de analitos modelados). En nuestro caso el valor de la consistencia se calculó, en función del número de componentes, para el conjunto interno de concordancia del modelo compuesto cada vez por 15 series temporales de espectros correspondientes a los estándares de calibración más una serie temporal de espectros correspondiente a una muestra.

En todos los casos, el valor de consistencia descendía, haciéndose prácticamente insignificante cuando se empleaban tres componentes

espectrales para modelar el conjunto. Esto sugería que dos componentes resultaba ser la elección óptima.

El perfil espectral de cada componente estaba bastante relacionado con el espectro del vinagre a pH ácido y básico, esto es, el espectro del ácido acético y del acetato, respectivamente.

En contraste con las técnicas de primer orden, en el método PARAFAC es necesario llevar a cabo la identificación del componente relacionado con el parámetro de interés (en el caso que nos ocupó, la acidez, determinada a partir del contenido de ácido acético). Esta asignación se fundamentó en la observación, antes mencionada, del espectro del vinagre en medio ácido y básico. Para todas las muestras el primer componente fue el que estaba relacionado con el analito de interés.

Las concentraciones absolutas del analito se obtuvieron tras una apropiada calibración empleando disoluciones patrón de ácido acético en agua. El procedimiento implica la descomposición del conjunto 3D (formado por la unión de las series temporales de los espectros de las muestras de calibración y una serie temporal de espectros de las muestras desconocidas del conjunto de entrenamiento) de tal manera que el procedimiento de descomposición del conjunto debió realizarse de forma repetida para cada muestra analizada.

E. Validación del modelo de calibración establecido

Finalmente, una vez establecido en cada caso el modelo de calibración apropiado, se procedió a confirmar que el procedimiento desarrollado se encontraba libre de errores, tanto sistemáticos como aleatorios.

Como se trataba de métodos desarrollados en el propio laboratorio (métodos internos), la validación que se realizó de los mismos fue en función del uso al que se iba a destinar cada uno de ellos, definiendo su campo de aplicación y teniendo en cuenta que, en algunos casos, un cambio en las condiciones del mismo implicaría una nueva validación (parcial o total) de los mismos ¹²⁷.

Los parámetros a evaluar se fundamentan en el tipo de ensayo que se pretende validar, y quedan reflejados, a modo de ejemplos en la Tabla 10.

Tipo de ensayo	Parámetro
Identificación	Especificidad/Selectividad
Determinación cuantitativa de un componente	Rango o intervalo de trabajo Función de respuesta/Linealidad Especificidad/Selectividad Precisión Exactitud Límite de cuantificación
Determinación semi-cuantitativa de un componente	Precisión Exactitud Función de respuesta Selectividad/Especificidad
Determinación cualitativa	Especificidad/Selectividad Límite de detección

Tabla 10. Parámetros de calidad a considerar en la evaluación de distintos ensayos analíticos.

La ausencia de errores aleatorios fue posible determinarla a través de la **precisión**, entendida ésta como el grado de congruencia entre resultados de pruebas individuales cuando el método es aplicado repetidamente a muestreos múltiples de una muestra homogénea o de varios lotes de una misma muestra. Se pudo comprobar que la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos para las distintas muestras, analizadas mediante el empleo de los diferentes métodos vibracionales desarrollados, resultaban adecuadas y cumplían con la ecuación de Horwitz ¹²⁸.

$$RSD_R = 2C^{-0,1505} \quad (30)$$

Como muestra la Figura 40, esta curva idealizada suave es función de la concentración (C) pero independiente de la naturaleza del analito o de la técnica analítica utilizada para efectuar la medición. En general, los valores tomados de esta curva son indicativos de la precisión alcanzable y aceptable del método analítico por diferentes laboratorios. Su aplicación proporciona un medio satisfactorio sencillo de evaluar la aceptabilidad de la precisión del método.

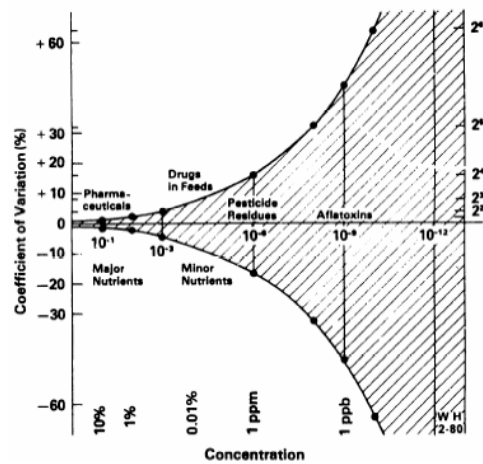


Figura 41. Coeficiente de variación inter-laboratorio como función de las concentraciones

La existencia de errores sistemáticos puede deberse al hecho de haber cometido alguna equivocación en el proceso de selección del criterio de medida que permite llevar a cabo la cuantificación. Las predicciones obtenidas mediante un modelo univariante sólo resultan fiables si la señal es suficientemente selectiva para el analito de interés, por lo que una vez establecido el correspondiente modelo de calibración, fue requisito indispensable comprobar que el mismo presentaba la habilidad de determinar, sin ninguna equivocación, el analito en presencia de otros componentes que se esperaba que pudiesen estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Teniendo en cuenta, que en todas las situaciones evaluadas resultaba prácticamente imposible disponer de muestras de calibración en coincidencia con la matriz, se eligió el método de la adición estándar para comprobar que el método desarrollado se encontraba libre de interferencias, entendiéndose éstas como cualquier modificación de la señal analítica del método producida por la presencia de sustancias distintas al analito problema ¹²⁹. A través de dicho procedimiento también se evaluó el porcentaje de recuperación, que, pese a no ser garantía de una buena exactitud si presenta unos valores adecuados, sí que resulta realmente un claro indicativo de falta de exactitud cuando se obtiene un pobre valor del mismo.

Para una comprobación más exhaustiva de la **exactitud** de los métodos desarrollados, se realizaron estudios de comparación de los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta con aquellos encontrados a través de otro procedimiento empleado como referencia, normalizado y debidamente evaluado, permitiendo establecer el valor correspondiente a un error absoluto o relativo, evaluador de la exactitud.

Además, de cara a valorar la concordancia del procedimiento desarrollado con la metodología de referencia, se hallaron las dimensiones de la elipse de confianza (para un nivel de confianza del 95%) generada a partir de los valores de la pendiente y la ordenada en el origen obtenidos para la regresión de los valores resultantes por aplicación de ambas metodologías (Figura 42).

En todos los casos se comprobó que el valor teórico de pendiente igual a 1 y ordenada en el origen igual a 0, se encontraba dentro de la elipse de confianza, pudiéndose concluir que todas las metodologías desarrolladas resultaban estadísticamente comparables para un nivel de significación del 95%, por lo que resultaban susceptibles de poder emplearse para sus correspondientes propósitos.

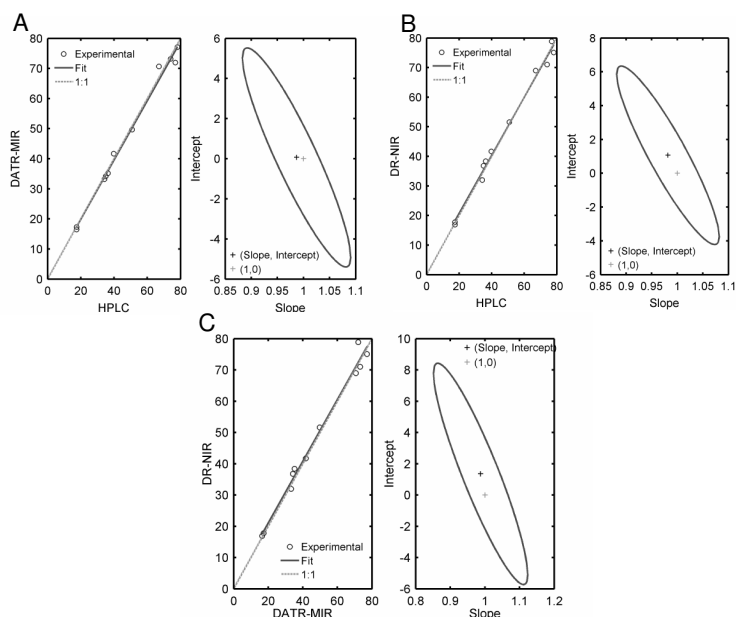


Figura 42. Ejemplo de los gráficos de correlación y las regiones elípticas de confianza obtenidas para los resultados predichos mediante medidas ATR en el MIR (A) y a través del empleo de la reflectancia difusa en el NIR (B) para la determinación cuantitativa de mancozeb en formulaciones comerciales, validadas empleando un método cromatográfico (HPLC) de referencia, así como para la comparación de los resultados ATR-MIR y RD-NIR para el análisis de un conjunto de muestras comerciales (C).

Otras características analíticas que se establecieron para poner de manifiesto la calidad de los métodos analíticos desarrollados fueron el **límite de cuantificación** y el **límite de detección** (sensibilidad del método).

El límite de detección puede definirse como la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada bajo las condiciones experimentales establecidas, mientras que por límite de cuantificación se entiende la menor cantidad de analito que podría ser cuantificada con aceptable precisión y veracidad.

El valor de estos parámetros se calculó siguiendo los criterios establecidos por la IUPAC (*The International Union of Pure and Applied Chemistry*).

A pesar de que los valores para dichos límites, en la gran mayoría de las situaciones, resultaron ser de órdenes superiores a los proporcionados por las

metodologías de referencia (principalmente técnicas cromatográficas), dada la menor sensibilidad asociada a los procedimientos basados en el empleo de la espectroscopia infrarroja, se pudieron considerar adecuados teniendo en cuenta los niveles de concentración en los que se encontraban los distintos analitos en las muestras sometidas a estudio.

Para la validación de los métodos basados en el empleo de la calibración multivariante, pese a que desde el punto de vista conceptual las características analíticas evaluadas fueron las mismas, la manera de obtenerlas fue diferente.

En estos casos, como la capacidad del modelo para ajustar los datos de calibración no resulta una medida directa de su capacidad de predicción, se compararon los valores predichos para nuevos objetos que no habían sido empleados para la construcción del modelo. Esta evaluación se llevó a cabo calculando el valor de la raíz cuadrada del promedio para el error de predicción al cuadrado (RMSEP) cuando el modelo se aplicaba a nuevas muestras para las que se conocía el valor de referencia. El RMSEP se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n_i}} \quad (4)$$

Para estas metodologías las características analíticas, tales como sensibilidad y selectividad, se obtuvieron a partir de cálculos sobre la señal pura del analito (NAS, *Net Analyte Signal*)¹³⁰, como es el caso del Capítulo en el que se aborda la determinación del contenido de carbohidratos y del valor energético para muestras de zumos y batidos.

En estas contribuciones, además, para la evaluación de la exactitud de los procedimientos desarrollados, se emplearon dos estimadores diferentes como son la media de las diferencias (\mathbf{d}_{x-y}) entre los valores obtenidos por el método que se pretende validar ($\hat{\mathbf{C}}_i$) y los valores obtenidos aplicando el método de referencia o en algunos casos, los propios declarados por el fabricante (\mathbf{C}_i); y la desviación estándar del promedio de las diferencias (\mathbf{s}_{x-y}).

La reproducibilidad de estas determinaciones se estableció a partir de la desviación estándar promedio de los replicados (\mathbf{s}_{trip}), así como del error estándar

de predicción para la validación de las muestras (s_{reg}), teniendo en cuenta además que este último parámetro establece también una estimación de la incertidumbre en la aplicación del modelo.

Otro parámetro que permitió determinar la calidad de los modelos establecidos basados en la calibración multivariante fue el coeficiente de calidad (**QC**, *Quality Coefficient*)¹³¹. A pesar de que el valor de QC se encuentra asociado a la linealidad, resulta un claro indicador acerca de la calidad de la calibración dado que refleja la dispersión de los datos experimentales alrededor de la curva de calibración ajustada, por lo que puede emplearse como estimador del error que puede cometerse en la predicción de un nuevo resultado.

En la mayoría de las situaciones evaluadas se encontraron valores de QC inferiores al 5%, salvo en la determinación de tetrametrina en lociones para *pediculosis* a partir de medidas de ATR en la que, debido al nivel en el que se encuentran, a la fuerte interferencia por parte del resto de componentes y a la menor sensibilidad que presentan este tipo de medidas, únicamente se alcanza un valor del 8.3 %.

Finalmente, comentar que en aquellas situaciones en las que se emplearon valores de referencia no obtenidos mediante ningún método oficial o establecido en la bibliografía, como en los casos relacionados con la determinación de parámetros nutricionales en muestras de zumos, yogures y chocolates, la adecuación de las metodologías vibracionales desarrolladas se estableció por comparación de las capacidades predictivas de los distintos modelos empleados con las directrices establecidas por organismos oficiales como por ejemplo la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EEUU¹³².



Capítulos

En este apartado van a exponerse, en forma de trabajos individuales, los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y considerando como eje conductor el tipo de calibración empleado, se ha considerado adecuada la presentación de los trabajos agrupados en los tres Capítulos que a continuación se detallan:

Capítulo 1. Calibración de orden cero

En el primer Capítulo se han incluido aquellos trabajos en los que se utilizaron modelos basados en la calibración univariante. Todos estos trabajos, tal y como se ha citado anteriormente, se caracterizan, principalmente, por disponer de una elevada selectividad para la señal analítica, conseguida tras una extracción previa del analito de interés con disolventes orgánicos apropiados. Los trabajos incluidos son los siguientes:

- *Quality control Fourier transform infrared determination of diazepam in pharmaceuticals.*
- *Near infrared determination of diuron in pesticide formulations.*
- *Quality control of metamitron in agrochemicals using Fourier transform infrared spectroscopy in the middle and near range.*
- *Univariate near infrared methods for determination of pesticides in agrochemicals.*
- *First-derivative FT-IR spectrometric determination of oxadiazon in commercial herbicide formulations.*

Capítulo 2. Calibración de primer orden

En el segundo Capítulo quedan englobados los trabajos en los que se emplearon modelos basados en la calibración multivariante. En estos trabajos, el hecho de llevar a cabo un análisis multicomponente, el no disponer de estándares comerciales ni poder efectuar un tratamiento

químico previo sencillo sobre la muestra, son las razones fundamentales por las que los modelos de calibración se han construido empleando una gran variedad de algoritmos matemáticos.

Así, este Capítulo contiene los siguientes trabajos:

- *Partial least-squares near Infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by using tanned solid wastes.*
- *Comparison of two partial least-squares infrared spectrometric methods for the quality control of pediculosis lotions.*
- *Comparison of two vibrational procedures for the direct determination of mancozeb in agrochemicals.*
- *Determination of the energetic value of fruit and milk-based beverages through partial least-squares attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometry.*
- *Evaluation of attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometry and chemometrics for the determination of nutritional parameters of yogurt samples.*
- *Near infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples.*

Capítulo 3. Calibración de segundo orden

Este último Capítulo incluye un trabajo en el que se emplean las técnicas quimiométricas llamadas multivía o de orden n , aplicándose a la determinación de la acidez del vinagre a partir de los espectros IR obtenidos tras la generación de un gradiente de pH.

- *Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis.*

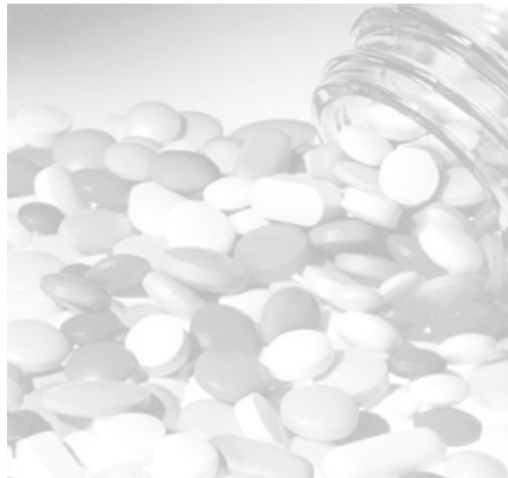
Capítulo 1

Calibración de orden cero

“Quality Control Fourier Transform Infrared
Determination of Diazepam in
Pharmaceuticals”

Javier Moros, Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43 (2007) 1277-1282





Quality control Fourier transform infrared determination of diazepam in pharmaceuticals

Javier Moros, Salvador Garrigues*, Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 50 Dr. Moliner Street, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 10 March 2006; received in revised form 18 October 2006; accepted 19 October 2006

Abstract

A quality control procedure has been developed for the determination of diazepam in pharmaceuticals using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The method involves the off-line extraction of diazepam with chloroform by sonication and direct determination in the extracts through peak area measurement in the interval between 1672 and 1682 cm^{-1} using a baseline correction defined between 1850 and 1524 cm^{-1} . For standardization it was used an external calibration line established from standard solutions of diazepam in chloroform. The method provides a limit of detection of 0.04 mg per tablet ($n=5$), a relative standard deviation (R.S.D.) of 0.5% for five independent measurements of a standard solution at a concentration level of 0.76 mg g^{-1} and a sampling frequency of the whole procedure of 4 h^{-1} , being required only 45 s for the measurement step. Results obtained by FTIR agree with those obtained by a reference methodology based on ultraviolet spectrometry and thus the developed procedure offers a good alternative for the determination of diazepam in pharmaceuticals.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: FTIR; Transmittance; Pharmaceuticals; Diazepam; Benzodiazepines; Tablets

1. Introduction

Benzodiazepines are depressants used therapeutically to produce sedation, to induce sleep, to relieve anxiety and muscle spasms, and to prevent seizures. In general, benzodiazepines act as hypnotics in high doses, anxiolytics in moderate doses, and sedatives in low doses, being among the most widely prescribed medications [1].

Diazepam (7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) is a benzodiazepine compound, which enhances the activity of *gamma*-aminobutyric acid, the most common inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. It is used in the treatment of severe anxiety disorders, as a hypnotic in the short-term management of insomnia, as a sedative and premedicant, as an anticonvulsant, and in the management of alcohol withdrawal syndrome [2].

The pharmaceutical regulatory authorities for good manufacturing practices [3] require accurate analysis of finished pharmaceutical products, such as tablets and capsules, to

confirm that they contain the required amount of the active ingredient.

There are only few references about the determination of diazepam in pharmaceuticals. Commonly, diazepam has been determined in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography (HPLC) [4], micellar liquid chromatography [5] or thin-layer chromatography [6].

Capillary zone electrophoresis [7], voltametry [8] and polarography [9] have been also employed for diazepam determination in tablets.

Ultraviolet spectrophotometric has been used for the diazepam determination based on zero order [10] or first order derivation signals [11]. Additionally, diazepam has been determined in the visible region based on the formation of an ion-association complex with bromocresol green [12] and by flow injection fluorimetry [13]. However, in our knowledge only a precedent exists on the use of vibrational spectroscopy to solve this problem based on the quotient between the absorbance at two wavenumbers in the infrared region [14].

So, the main purpose of this study has been the development of a fast, accurate and sensitive alternative for the determination of diazepam in pharmaceuticals for quality control of this type of samples.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Nicolet Magna model 750 Fourier transform infrared spectrometer (Madison, WI, USA), equipped with a temperature stabilized deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector, a KBr Ge coated beam splitter and a global IR source, was employed for FTIR spectra acquisition, using a Graseby-Specac (Orpington, England) microflow through cell with ZnSe and CaF₂ windows and a pathlength of 0.11 mm by averaging 25 scans per spectrum with a nominal resolution of 4 cm⁻¹.

The manifold employed permits a fast and reproducible filling and cleaning of the microflow cell for the stopped-flow measurements. It consists of a Gilson P-2 Minipuls peristaltic pump (Villiers-le-bel, France), with Viton (iso-versinic) flexible tubes of 1 mm i.d. and 3 mm o.d., resistant to chlorinated solvents, used to introduce samples and standards into the flow cell.

All the tubes employed to connect the different parts of the manifold are made in TeflonTM and they have 1.57 mm o.d. and 0.8 mm i.d.

Reference procedure measurements were carried out with a Hewlett-Packard Model 8452A diode array spectrophotometer equipped with a 1 cm optical path Hellma quartz cell (Müllheim-Germany).

A J.P. Selecta (Barcelona, Spain) ultrasonic water bath was used to carry out the active ingredient extraction from samples with CHCl₃ for FTIR determinations.

Megafuge 1.0 centrifuge (Heraeus Sepatech, Hanau, Germany) was employed to centrifuge samples after extraction in the proposed procedure.

Diazepam standard (100.5%, w/w) was purchased from Guinama (Valencia, Spain) and chloroform (stabilized with amylene), chromatographic gradient grade, was supplied by Scharlau (Barcelona, Spain). Pharmaceuticals analyzed in this

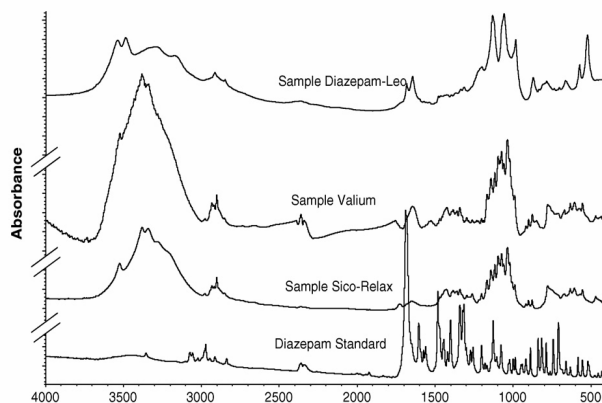
study were obtained from the Spanish market with official authorization.

2.2. Reference procedure

Twenty tablets were weighed and finely powdered. An accurately weighed portion of the powder, equivalent to about 4 mg of diazepam, was transferred to a glass-stoppered centrifuge tube, and 40 mL of chloroform were added. The mixture was shaken mechanically for 20 min, centrifuged, and the chloroform extracts transferred to a 100 mL volumetric flask. The extraction was repeated with a 30 mL portion of chloroform, and both extracts combined in the volumetric flask, and finally diluted with chloroform to volume. This solution was transferred to a 250 mL separator, and 40 mL of pH 9.7 borate buffer solution (prepared by mixing 30 mL of 0.1 M sodium hydroxide with 70 mL of a solution made with 12.4 g of boric acid dissolved in 100 mL of 1 M sodium hydroxide and diluted with water to 1000 mL) were added. The mixture was well shaken, and the chloroform layer was passed through a funnel containing a pledget of glass wool layered with 1 g of anhydrous sodium sulfate. About 10 mL of the filtrate were transferred to a 50 mL volumetric flask, and evaporated under a stream of nitrogen to dryness. The residue was first dissolved using a 1 in 360 solution of sulfuric acid in dehydrated alcohol and then diluted with the same solvent to volume, and mixed. Absorbance of all solutions was determined at 285 nm using the same alcoholic sulfuric acid as the blank in 1 cm cell and an external calibration line of diazepam standards directly prepared in the same acid medium [15].

2.3. FTIR proposed procedure

Tablets from each type of pharmaceutical were accurately weighed and powdered. An accurate weight of powder, equivalent to one tablet, was mixed with 7 g of chloroform. The sample was placed inside an ultrasonic water-bath for 5 min, in order to assess the quantitative extraction of the active



ingredient. The extract was directly filtrated into a vial using a paper Whatman 42 filter.

FTIR spectra from clear solutions were recorded in the wavenumber range between 4000 and 850 cm^{-1} , averaging 25 scans per spectra using a nominal resolution of 4 cm^{-1} and employing a background spectra of the cell filled with the solvent, measured in the same instrumental conditions used for samples.

Peak area values in the interval between 1672 and 1682 cm^{-1} , corrected with a two points baseline established between 1850 and 1524 cm^{-1} , were employed to quantify diazepam in samples using an external calibration line obtained with six standard solutions of diazepam dissolved in chloroform, covering a concentration range from 0.16 to 2.14 mg g^{-1} , measured in the same conditions than samples.

3. Results and discussion

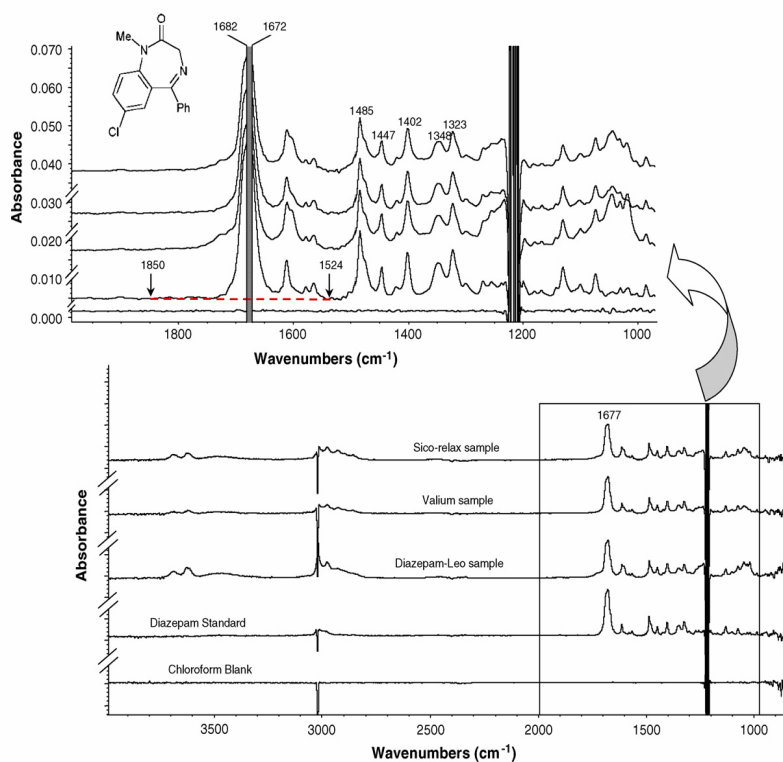
3.1. FTIR spectra of diazepam

Spectra of both, samples and standards were obtained in KBr disks and in solution with chloroform.

As depicted in Fig. 1, the FTIR spectrum of a diazepam standard diluted in potassium bromide disks exhibits numerous well defined bands, thus indicating that direct sample measurements, such as solid attenuated total reflectance (ATR) [16] or diffuse reflectance (DRIFT) [17], could be an alternative for a fast sample analysis, but using also multivariate calibration techniques. However, the presence of high quantities of lactose and cellulose, used as excipients in the pharmaceuticals under study, prevents the direct determination of diazepam using univariate calibration models and, because of that, a previous separation of the active principle from the samples is required.

In this sense, Fig. 2 shows the FTIR spectra of chloroform solutions of a diazepam standard and the extracts obtained from samples, all of them obtained using a background established with the cell filled with chloroform. As can be seen, spectra of samples and standard are very similar and present several coincident vibrational bands suitable to be used for direct determination of diazepam in commercially available tablets.

As it can be seen in Fig. 2, the most intense band present for a chloroformed diazepam standard and extract is centered at 1676 cm^{-1} and it can be related to the presence of a carbonyl



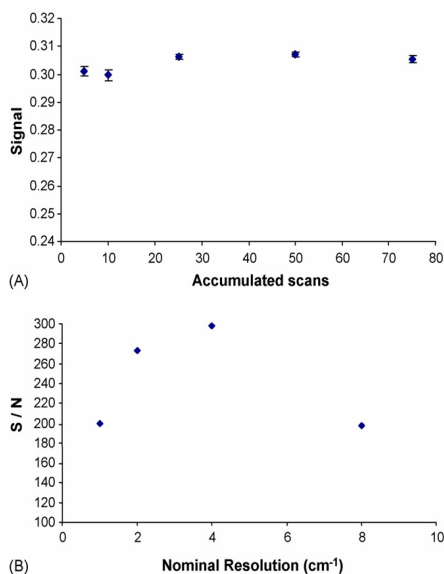


Fig. 3. Effects of the averaged scans per spectrum (A) and the nominal resolution (B) employed to carry out the instrumental measurements. The study was carried out using a standard with 1 mg g⁻¹ concentration and the measurements were obtained working with area values for the interval between 1672 and 1682 cm⁻¹ with a baseline correction between 1850 and 1542 cm⁻¹.

group (C=O). Other less intense bands that are located at 1485, 1447, 1402, 1348 and 1323 cm⁻¹ could be associated to the in-plane C–H bending vibrations of the benzene ring that interacts (sometimes strongly) with various ring CC vibrations [18].

3.2. Effect of instrumental and experimental conditions

The effects of the number of cumulated scans and the spectral resolution employed for data acquisition were evaluated in order to improve the measurement conditions. With this purpose, a

monoparametric study was performed. In this sense the number of cumulated scans per spectrum was modified from 5 to 75, working with a fixed spectral resolution of 4 cm⁻¹, and also the spectral resolution varied from 2 to 8 cm⁻¹ averaging 25 scans.

As can be seen in Fig. 3A, working with peak area values in the interval between 1672 and 1682 cm⁻¹ corrected with a two points baseline established between 1850 and 1524 cm⁻¹, when 50 and 25 scans were cumulated, the most intense and precise results were achieved, but the time required for spectrum collection was two times higher for 50 scans than that required for 25. Thus, in order to ensure a compromise between time-consumption for developing the whole procedure, sensitivity and precision, 25 scans were selected, that involves a measurement time of 45 s per espectrum.

On the other hand, it can be observed in Fig. 3B that the best signal to noise ratio was found for a 4 cm⁻¹ nominal resolution.

To carry out the extraction of diazepam from tablets, two extraction modes, mechanical and ultrasonic, were tested using different times from 1 to 15 min. Fig. 4 shows the effect of both shaking modes on the diazepam extraction yield and as it can be seen sonication with CHCl₃ for 5 min are enough to achieve diazepam quantitative extraction, being required 10 min of mechanical shaking to obtain the same results.

Additionally, it can be appreciate a slight decrease of the extraction percentage for an over dimensioned sonication time. As it has been reported previously, in other cases [19] this fact seems to be related with damage on the active principle molecules due to the generation of free radicals.

3.3. Selection of bands for FTIR determination of diazepam

In order to choose the best analytical performance of the FTIR determination of diazepam in pharmaceuticals, different bands and baseline correction criteria were evaluated, as can be seen in Table 1. In every case, it was also considered the use of peak height and peak area absorbance measurement modes.

In terms of sensitivity, taking into consideration the calibration slope values, it is clear that peak area measurements provide at least one order magnitude better sensitivity than peak height values, but limit of detection data are comparables for

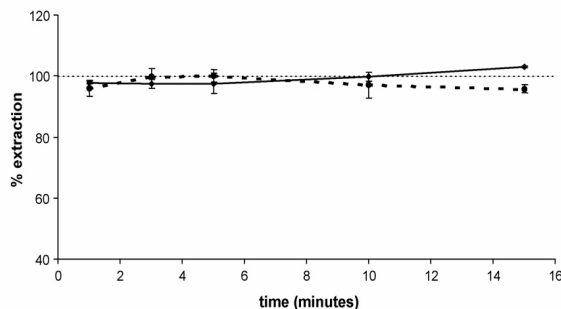


Table 1
Analytical features of the FTIR determination of Diazepam in pharmaceuticals using peak height and peak area criteria with different baseline corrections

Peak height (cm ⁻¹)	Baseline correction (cm ⁻¹)	External calibration line ^a $y = (a \pm CL_a) + (b \pm CL_b)$ [Diaz]	r ^{2b}	% R.S.D. ^c	LOD ^d	LOQ ^e
1677	1850–1524	$y = (0.0009 \pm 0.0004) + (0.04922 \pm 0.0004)$ [Diaz]	0.9997	0.6	0.04	0.13
	1850–1434	$y = (0.0006 \pm 0.0004) + (0.0485 \pm 0.0004)$ [Diaz]	0.9997	0.2	0.04	0.12
1485	1524–1434	$y = (0.00038 \pm 0.00016) + (0.02007 \pm 0.00015)$ [Diaz]	0.9997	0.9	0.16	0.5
	1524–1384	$y = (0.0005 \pm 0.0002) + (0.02027 \pm 0.00019)$ [Diaz]	0.9996	0.9	0.2	0.7
1447	1524–1434	$y = (0.00006 \pm 0.00011) + (0.00835 \pm 0.00010)$ [Diaz]	0.9993	2	0.4	1.3
1402	1434–1283	$y = (0.00017 \pm 0.00009) + (0.01238 \pm 0.00009)$ [Diaz]	0.9998	2	0.14	0.5
1348	1385–1283	$y = (0.00028 \pm 0.00012) + (0.00891 \pm 0.00011)$ [Diaz]	0.9993	1.3	0.3	1.1
1323	1385–1283	$y = (0.00025 \pm 0.00012) + (0.01282 \pm 0.00011)$ [Diaz]	0.9997	0.6	0.18	0.6
Peak area (cm ⁻¹)	Baseline correction (cm ⁻¹)	External calibration line ^a $y = (a \pm CL_a) + (b \pm CL_b)$ [Diaz]	r ^{2b}	% R.S.D. ^c	LOD ^d	LOQ ^e
1682–1672	1850–1524	$y = (0.005 \pm 0.004) + (0.457 \pm 0.003)$ [Diaz]	0.9998	0.5	0.04	0.14
	1850–1434	$y = (0.002 \pm 0.004) + (0.451 \pm 0.003)$ [Diaz]	0.9997	0.3	0.04	0.12
1700–1654	1850–1524	$y = (0.015 \pm 0.012) + (1.415 \pm 0.011)$ [Diaz]	0.9997	0.9	0.08	0.3
	1850–1434	$y = (0.001 \pm 0.012) + (1.383 \pm 0.011)$ [Diaz]	0.9997	0.5	0.05	0.18
1488–1479	1524–1434	$y = (0.0027 \pm 0.0018) + (0.1552 \pm 0.0017)$ [Diaz]	0.9994	1.1	0.2	0.7
	1524–1384	$y = (0.004 \pm 0.002) + (0.157 \pm 0.002)$ [Diaz]	0.9992	1.2	0.3	0.9
1453–1441	1524–1434	$y = (-0.0005 \pm 0.0014) + (0.0685 \pm 0.0013)$ [Diaz]	0.998	3	0.5	1.5
1407–1396	1434–1283	$y = (-0.0005 \pm 0.0012) + (0.1051 \pm 0.0011)$ [Diaz]	0.9995	3	0.13	0.4
1333–1306	1385–1283	$y = (0.003 \pm 0.002) + (0.199 \pm 0.002)$ [Diaz]	0.9995	1.1	0.2	0.7

^a Calibration curve where $(a \pm CL_a)$ and $(b \pm CL_b)$ correspond to the intercept and the slope, respectively \pm their corresponding confidence limits (for a 95% confidence level), being [Diaz] the concentration of Diazepam expressed in mg g⁻¹.

^b Correlation coefficient.

^c % relative standard deviation (for five independent measurements) calculated for a standard of 1 mg g⁻¹ concentration.

^d Limit of detection expressed in mg per tablet and calculated using 3 s criteria, where s corresponds to the standard deviation of five measurements of the blank solution.

^e Limit of quantification expressed in mg per tablet and calculated using 10 s criteria, where s corresponds to the standard deviation of five measurements of the blank solution.

both measurement criteria applied to a same band. Moreover, data in Table 1 also report the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) values and the relative standard deviation (R.S.D.%) found on using the different criteria. As it can be seen, several studied conditions provided appropriate characteristics for pharmaceutical analysis.

The band at 1677 cm⁻¹ provides the best precision, sensitivity and limit of detection/quantification values. However, as it

can be seen in Fig. 2 for sample spectra there is a little shoulder near the selected band and it does not present a good symmetry, probably due to a possible spectral interference from other sample ingredients. Because of that we have considered to work with a peak area interval centred in the maximum of the band, between 1682 and 1672 cm⁻¹ and using a baseline correction defined between 1850 and 1524 cm⁻¹ or, alternatively, a baseline fixed between 1850 and 1434 cm⁻¹.

Table 2
Determination of Diazepam in pharmaceuticals by UV and FTIR procedures

Conditions for FTIR determination		FTIR method (mg per tablet) ^a	UV method (mg per tablet) ^a	Relative accuracy error (%) ^b	t _{exp} ^c	% Recovery ^d
Peak area (cm ⁻¹)	Baseline correction (cm ⁻¹)					
1682–1672	1850–1524	5.02 ± 0.05	4.98 ± 0.05	0.8	1.403	98.2 ± 0.9
		4.95 ± 0.05	4.96 ± 0.04	-0.2	0.442	101.6 ± 1.4
		4.929 ± 0.011	4.91 ± 0.04	0.4	1.347	104.1 ± 1.2
	1850–1434	5.07 ± 0.05	4.98 ± 0.05	1.8	3.157	98.7 ± 0.9
		4.93 ± 0.03	4.96 ± 0.04	-0.6	1.697	102.3 ± 1.0
		5.077 ± 0.019	4.91 ± 0.04	3	10.667	104.3 ± 0.7

^a Concentration values are the average of three independent triplicate analyses \pm their standard deviation. The three pharmaceuticals analyzed correspond, from the top to the bottom, to Diazepam-Leo, Valium and Sico-relax.

4. Analysis of commercial available pharmaceuticals

In order to validate the developed FTIR procedure, three pharmaceuticals containing diazepam were analyzed by both, the FTIR developed procedure and the UV reference method, and results found are summarized in Table 2.

It was confirmed that using a baseline correction established between 1850 and 1524 cm^{-1} , data found by FTIR agree better than those obtained by UV than in the case of using 1850 to 1434 cm^{-1} correction.

Additional experiments made on spiking real samples with diazepam amounts from 2.5 to 8.5 mg provided recovery percentage from 98.2 to 104.1% in the selected conditions.

On the other hand, the statistical comparison of paired results, also summarized in Table 2, provided t_{exp} values that are lower than 2.120, the theoretical t value for a confidence level of 95% and 16 freedom degrees, thus indicating that results of both procedures are statistically comparables on using the selected conditions.

5. Conclusions

The proposed transmittance FTIR procedure offers an appropriate alternative to the reference UV method for the determination of diazepam in tablets. Accurate and precise results are obtained using a simple external univariate calibration. This method provides an adequate sensitivity and precision, with a limit of quantification of 0.14 mg per tablet, with a repeatability of 0.5%, only requiring 7 g of CHCl_3 per sample instead the 100 mL CHCl_3 plus 50 mL ethanol consumed by the UV reference method. The sampling throughput was 4 h^{-1} in front of 0.5 h^{-1} for the UV method and the measurement step requires only 45 s per sample. The sampling throughput can be easily increased taking into consideration that the diazepam extraction by sonication can be made simultaneously for a series of samples.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604/BQU, Feder) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (Project ACOMP06-161).

References

- [1] <http://www.dea.gov/concern/benzodiazepines.html>, U.S. Drug Enforcement Administration.
- [2] J.E.F. Reynolds (Ed.), Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 30th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993.
- [3] <http://www.fda.gov/oc/ia/ecmutual.htm>, EC-U.S. Mutual Recognition Agreement Sectoral annex for pharmaceutical good manufacturing practices (GMPs).
- [4] C. Ferreyra, C. Ortiz, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 493–499.
- [5] M.F. Cholbi-Cholbi, J.J. Martinez-Pla, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 27 (2004) 153–170.
- [6] M. Bakavoli, M. Kaykhaei, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 1185–1189.
- [7] S. Furlanetto, S. Orlandini, G. Massolini, M.T. Fauci, E. la Porta, S. Pinzauti, Analyst 126 (2001) 1700–1706.
- [8] M.M. Coreira-dos-Santos, V. Família, M.L. Simoes-Goncalves, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 1074–1081.
- [9] M. Guadalupe-García, A. García, I. Gonzalez, Talanta 40 (1993) 1775–1779.
- [10] C.F. Ferreyra, C.S. Ortiz, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 811–818.
- [11] S. Jain, M. Tiwari, S.C. Chaturvedi, Indian Drugs 35 (1998) 696–699.
- [12] S. Sadeghi, R. Takjoo, S. Haghgo, Anal. Lett. 35 (2002) 2119–2131.
- [13] J. Dolejsova, P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 357–362.
- [14] J.V. de Julian, M. de la Guardia, Can. J. Spectrosc. 35 (1990) 44–50.
- [15] The United States Pharmacopoeia, 20th Revision, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Twinbrook Parkway, Rockville, MD, 1980.
- [16] A. Salari, R.E. Young, Int. J. Pharm. 163 (1998) 157–166.
- [17] K. Pöllänen, A. Häkkinen, M. Hulthanen, S.P. Reinikainen, M. Karjalainen, J. Rantanen, M. Louhi-Kultanen, L. Nyström, Anal. Chim. Acta 544 (2005) 108–117.
- [18] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, London, England, 1991.
- [19] E. Leonhardt, R. Stahl, Anal. Chem. 70 (1998) 1228–1230.

“Near Infrared Determination of Diuron in Pesticide Formulations”

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues
y Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta 543 (2005) 124-129





Near infrared determination of Diuron in pesticide formulations

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues*, Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry, Universitat de València, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 4 February 2005; received in revised form 15 April 2005; accepted 18 April 2005
Available online 11 May 2005

Abstract

A simple, fast and environmentally friendly near infrared (NIR)-based methodology was developed for Diuron determination in pesticide formulations. This methodology was based on the pesticide extraction with acetonitrile and subsequent transmittance measurement determination by peak area measurement between 2021 and 2047 nm, corrected with a single point baseline established at 2071 nm. The repeatability, as relative standard deviation of five independent analysis of a 15.3 mg g^{-1} Diuron standard was 0.03% and the limit of detection 0.013 mg g^{-1} . The reagent consumption was clearly reduced in front of a chromatographic reference procedure from 39.1 ml acetonitrile per sample, required by liquid chromatography (LC), to 1 ml of acetonitrile consumed for NIR. The sample measurement throughput obtained by the NIR methodology was 120 h^{-1} , 10 times higher than that obtained by LC (12 h^{-1}). It can be concluded that the proposed vibrational method is appropriate for the quality control of pesticide commercial formulations.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Near infrared; Pesticide; Formulations; Agrochemicals

1. Introduction

Diuron (3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) is a substituted urea herbicide used to control a wide variety of annual and perennial broadleaf and grassy weeds, as well as mosses. It is used on non-crop areas and many agricultural crops such as fruit, cotton, sugar cane, alfalfa and wheat. Diuron is slightly toxic to mammals, the oral LD_{50} in rats being 3400 mg kg^{-1} [1].

Diuron may be found in formulations as wettable powders (80%, w/w) and suspension concentrates (50%, w/v) [2].

Diuron has been determined at trace levels by liquid chromatography (LC) with diode array detection in water [3], in human urine [4], in marine sediments [5] and in soil [6], by LC coupled to mass spectrometry in water [7] and in crops [8], by capillary electrophoresis with UV detection in water [9], by micellar electrokinetic capillary chromatography in fruits [10] and by gas chromatography with electron capture

detection [11] or coupled to mass spectrometry detection [12] in water samples and in soil [6].

Other methods less commonly used for Diuron determination are amperometric biosensors [13], fluorescence polarization immunoassay [14], differential pulse polarography [15] and low-temperature phosphorimetry [16].

On the other hand, it is well known that near infrared (NIR) spectroscopy provides high features to be used in routine control analyses such as its ability to provide fast and accurate results, the lack of complex sample pre-treatments required, the low cost of analyses and the capability to perform simultaneous determination of several parameters in a same sample. In recent years, the number of applications of NIR spectrometry in quantitative analysis has terribly grown, especially in the pharmaceutical industry [17,18].

However, there are no precedents of the applicability of NIR spectrometry to the quality control of agrochemical formulations [19]. So, the aim of this paper has been the development of a simple, fast, low cost and environmentally friendly NIR spectrometry-based procedure for Diuron determination in commercial pesticide formulations, which could open the door for future applications in this field.

* Corresponding author. Tel.: +34 354 3158; fax: +34 354 4838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Bruker MPA (Bremen, Germany) FT-NIR spectrometer equipped with a quartz beamsplitter, an air-cooled NIR source and an InGaAs detector, using a standard glass vial (6.5 mm i.d.) as sample cell was used for transmittance NIR measurements. Diffuse reflectance FT-NIR spectra were obtained using an integrating sphere accessory. For measurement control and data acquisition was employed the OPUS program (Version 4.1) from Bruker (Bremen, Germany). Spectra treatment and data manipulation was carried out using Omnic 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

A Hewlett-Packard HPLC Series 1050 liquid chromatograph, equipped with a variable wavelength UV–vis detector and a reversed phase C-18 (Kromasil) column of 250 mm length and 4.6 mm i.d. with 5 μm particle diameter, was employed for the analysis of Diuron formulations, being used this methodology as a reference procedure for the validation of NIR measurements.

Diuron standard (99.4%, w/w) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) and acetonitrile, chromatographic gradient grade, was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

Samples 1–3 were obtained directly from the Spanish market, they contain 80% (w/w) Diuron as wetting powder and Sample 4 was prepared from Sample 1 by addition of CaCO_3 with a final concentration of 40% Diuron.

2.2. Reference procedure

A 10 (± 0.01) mg of sample were accurately weighed inside a 25 ml volumetric flask and diluted to the volume with acetonitrile. After shaking, 1 ml of the suspension was diluted to 10 ml with acetonitrile and filtered through a 0.22 μm nylon filter. A 20 μl of this solution were directly injected in a 85:15 acetonitrile:water mobile phase, at a flow rate of 1 ml min^{-1} and Diuron was determined in the isocratic mode by absorbance measurements at 254 nm. Area values of the chromatographic peaks obtained at a retention time of 3.3 min were interpolated in an external calibration line established from five standard solutions of Diuron containing from 10.9 to 43.7 mg l^{-1} .

A typical calibration line obtained in the aforementioned conditions was $A = (2.8 \pm 3.2) + (67.60 \pm 0.13)C_{\text{Di}} \text{ with } R^2 = 0.9999$, where A is the area values of the chromatographic peaks and C_{Di} is the concentration in mg l^{-1} . The repeatability, established as the relative standard deviation, for five independent injections of a 10.9 mg l^{-1} Diuron standard was 0.18% and a limit of detection, established as three times the standard deviation of five independent measure-

2.3. FT-NIR procedure

A 12 (± 0.01) mg of sample were extracted with 750 mg acetonitrile by manual shaking. This slurry was filtered and transferred to a glass vial of 6.5 mm i.d. used as measurement cell. The FT-NIR transmission spectra was recorded from 2500 to 833 nm, using a nominal resolution of 8 cm^{-1} , accumulating 32 scans and employing a background spectra of the cell filled with acetonitrile, measured in the same instrumental conditions used for samples.

Peak area values between 2021 and 2047 nm, corrected with a horizontal baseline established at 2071 nm, were employed to quantify Diuron in samples using an external calibration line obtained with six standard solutions of the pesticide dissolved in acetonitrile in the concentration range between 4.9 and 19.4 mg g^{-1} , measured in the same conditions than samples and adjusted by classical least squares regression.

3. Results and discussion

3.1. FT-NIR spectra of Diuron

Fig. 1 shows the NIR spectra of a Diuron standard diluted in NaCl and a commercial sample containing Diuron, both obtained by diffuse reflectance measurements on the solid products placed in glass vials with a base diameter of 10 mm.

From this figure, it can be identified the tremendous possibilities offered by the NIR technique to do the direct determination of pesticides, like Diuron in solid agrochemical products.

However, problems found with the effect of sample size and those related to the difficulties offered by standardization with solid standards, decided us to evaluate other alternatives based on the selective extraction of the pesticide in an appropriate solvent and the use of an external calibration adjusted by classical least squares. In this sense, it was evaluated the use of acetonitrile as a convenient solvent to do the quantitative extraction of Diuron and because acetonitrile presents a low absorbance in the NIR range.

Fig. 2 shows the transmission FT-NIR spectra, in the wavelength range from 2500 to 850 nm, of a 15.3 mg g^{-1} Diuron standard dissolved in acetonitrile, those of four insecticide sample extracts and a blank of acetonitrile. As it can be seen in this figure, the most intense bands were the carbonyl stretching second overtone (CO–NH) peak at 2032 nm, the carbonyl stretching second overtone (CO–N–CH₃) peak at 2010 nm, and the symmetric and asymmetric C–H stretching located at 2141 and 2164 nm, respectively. Another less important absorption band is located at 1490 nm, due to the N–H stretching first overtone [20].

On comparing the spectra of the Diuron standard and those

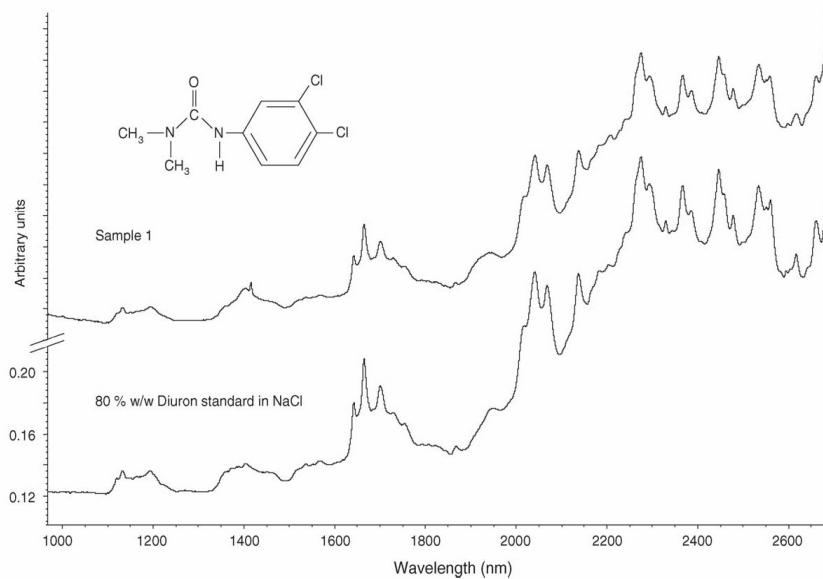
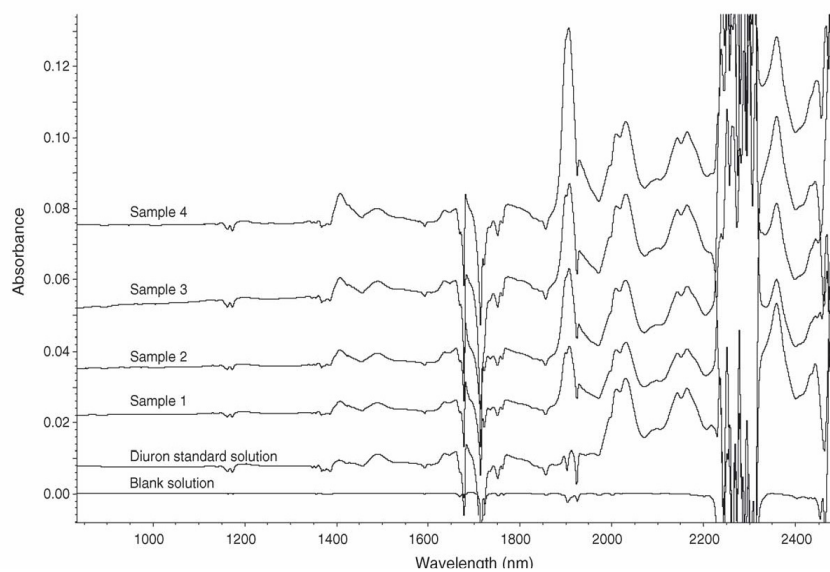


Fig. 1. NIR reflectance spectra of a 80% (w/w) standard of Diuron diluted with NaCl and a solid sample containing 80% (w/w) Diuron. Note: spectra were shift on the y-axis to clearly show their bands. Instrumental conditions: 32 scans and 8 cm^{-1} nominal resolution.



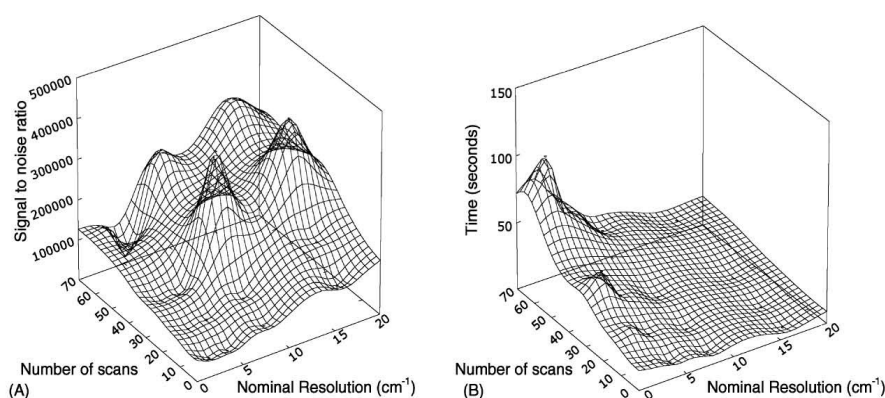


Fig. 3. Effect of the nominal resolution and the number of cumulated scans (A) on the signal to noise ratio of a 15.3 mg g^{-1} Diuron standard and (B) on the acquisition time of FT-NIR spectra. Note: the signal to noise ratio was obtained from the quotient between the peak area values from 2025 to 2047 nm, corrected with a single point baseline established at 2071 nm and the noise measured as root mean square for an acetonitrile blank solution using the aforementioned region.

for the determination of Diuron in pesticide formulations extracted with acetonitrile.

3.2. Effect of instrumental conditions on Diuron determination

The effect of instrumental parameters, such as the number of accumulated scans and nominal resolution employed for data acquisition, were evaluated in order to improve the measurement conditions. For this selection, a monoparametric study has been carried out by triplicate measurements, in different conditions, of a Diuron standard solution containing 15.3 mg g^{-1} .

The number of cumulated scans was tested at four levels 4, 16, 32 and 64 and the nominal resolution studied for 2, 4, 8 and 16 cm^{-1} . Fig. 3A shows the results obtained. Signal to noise ratio values were established as the quotient between the signal of a Diuron standard solution (measured as peak area values from 2021 to 2047 nm, corrected with a single point baseline at 2071 nm) and the noise of an acetonitrile blank solution (measured as root mean square signal between 2025 and 2047 nm). As can be seen, 32 cumulated scans at resolution values of 8 and 16 cm^{-1} provide the best values. Considering also the measurement frequency (see Fig. 3B) and the repeatability of data (results not shown), 32 cumulated scans and 8 cm^{-1} resolution were chosen as a compromise between sensitivity, speed and precision.

On the other hand, precision of Diuron determination could be affected by sample positioning changes and possible vial variations. In order to evaluate the effect of these vari-

tion of 0.12% for measurements made on different positions of the same vial and 0.5% for different vials, which offer acceptable precision data to carry out Diuron determination in herbicide formulations.

3.3. Selection of bands for NIR determination of Diuron

Different bands, measurement modes and baseline correction criteria were performed in order to improve the analytical conditions of the NIR determination of Diuron in pesticide formulations, as it can be seen in Table 1.

In general, band area values were one order of magnitude more sensitive than band height intensity ones. The limits of detection found (for details, see footnote of Table 1) were in the range from 0.013 to 0.7 mg g^{-1} and the repeatability, as relative standard deviation of five measurements of a 15.3 mg g^{-1} Diuron standard solution was between 0.03 and 0.7%.

In short, the use of band area measurement between 2021 and 2047 nm with a single point baseline fixed at 2071 nm provides the highest sensitivity, a variation coefficient of 0.03% and a limit of detection of 0.013 mg g^{-1} .

3.4. Analytical figures of merit

A recovery study, carried out on actual samples (4.81 mg g^{-1}) spiked with known amounts of Diuron from 5.02 to 10.83 mg g^{-1} , provided mean recoveries of $100.7 \pm 1.2\%$, thus indicating the lack of systematic errors.

The absence of matrix effects was confirmed by compar-

Table 1
Analytical characteristics of NIR determination of Diuron using different measurement modes, bands and baseline corrections

	Baseline correction (nm)	Regression line ($y = a + bC$) (g g^{-1})	r	R.S.D. (%) ^a	LOD ^b (mg g^{-1})	LOQ ^c (mg g^{-1})
Peak height (nm)						
1490	1531	$y = (-0.00007 \pm 0.00003) + (0.221 \pm 0.003)$ [Diuron]	0.9990	0.05	0.08	0.3
1490	1457–1531	$y = (0.00000 \pm 0.00003) + (0.274 \pm 0.002)$ [Diuron]	0.9995	0.11	0.4	1.2
2010	2071	$y = (0.00044 \pm 0.00011) + (1.207 \pm 0.009)$ [Diuron]	0.9996	0.07	0.3	0.9
2010	1972–2071	$y = (0.00095 \pm 0.00014) + (1.451 \pm 0.012)$ [Diuron]	0.9995	0.5	0.9	3
2010	1972	$y = (0.0013 \pm 0.0002) + (1.611 \pm 0.018)$ [Diuron]	0.9990	0.7	1.2	4
2031	2071	$y = (0.00021 \pm 0.00008) + (1.510 \pm 0.007)$ [Diuron]	0.9998	0.05	0.13	0.4
2031	1972–2071	$y = (0.00054 \pm 0.00012) + (1.671 \pm 0.010)$ [Diuron]	0.9997	0.3	0.5	1.6
Peak area (nm)						
1472–1510	1531	$y = (-0.012 \pm 0.005) + (28.4 \pm 0.4)$ [Diuron]	0.998	0.11	0.14	0.5
2124–2152	2071	$y = (0.008 \pm 0.010) + (56.6 \pm 0.8)$ [Diuron]	0.998	0.3	0.4	1.4
1999–2047	2071	$y = (0.003 \pm 0.011) + (143.4 \pm 0.9)$ [Diuron]	0.9997	0.16	0.18	0.6
2021–2047	2071	$y = (0.005 \pm 0.006) + (81.6 \pm 0.3)$ [Diuron]	0.99990	0.03	0.013	0.04
1999–2071	1972–2071	$y = (0.056 \pm 0.011) + (182.6 \pm 0.9)$ [Diuron]	0.9998	0.2	0.4	1.4
2021–2047	1972–2071	$y = (0.025 \pm 0.006) + (90.7 \pm 0.5)$ [Diuron]	0.9998	0.2	0.4	1.4
1472–1510	1457–6530	$y = (0.000 \pm 0.005) + (37.4 \pm 0.4)$ [Diuron]	0.9995	0.4	0.4	1.3

^a Relative standard deviation values of five independent measurements of a Diuron standard solution of 15.3 mg g^{-1} .

^b Limit of detection values were established from three times (a probability level of 99.6%) the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

^c Limit of quantification values established as 10 times the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

was $A = (0.399 \pm 0.003) + (81.4 \pm 0.3)C_{\text{Diu}}$ (g g^{-1}) with $r = 0.99995$, which is statistically comparable with that obtained by external calibration $A = (0.005 \pm 0.006) + (81.6 \pm 0.3)C_{\text{Diu}}$ (g g^{-1}) with $r = 0.99990$.

4. Analysis of pesticide formulations

The NIR procedure developed in this study provided results, for the analysis of commercial pesticide sample formulations, statistically comparable with those obtained by an LC reference method, as it can be seen in Table 2, being found in all cases, experimental t -values lower than 1.812 for a paired t -test for a probability level of 95% and 10 d.f. (six data found by each method minus two parameters). For the analysis of commercial samples, variation coefficients of three independent analyses between 0.4 and 1.1% were obtained. This repeatability compares well with that obtained for LC and it is in accordance with the level of precision required

Table 2
Determination of Diuron in pesticide formulations by LC-UV and NIR procedures

Sample	LC-UV (% w/w) ^a	NIR (% w/w) ^a	t_{exp} ^b
1	82.7 ± 0.3	82.3 ± 0.9	0.943
2	82.6 ± 0.4	82.7 ± 0.8	0.250
3	83.0 ± 0.4	82.7 ± 0.3	1.342
4	40.3 ± 0.5	40.7 ± 0.3	1.534

^a Concentration values are the average of two independent analysis measured in triplicate \pm the corresponds standard deviation of the six values

for the active ingredient content in pesticide formulations [21].

5. Conclusion

The proposed NIR method is a fast and serious alternative to the chromatographic procedures usually employed in quality control process of commercial formulations containing Diuron.

In spite of the fact that the limit of detection found for NIR was 0.013 mg g^{-1} , 200 times less sensitive than that obtained by LC, the concentration level at which Diuron is present in the commercially available formulations reduces the importance of this analytical feature.

The main advantages of the developed NIR procedure are that: (i) it requires a reduced sample preparation, based on the extraction of Diuron with acetonitrile, (ii) the measurement sampling throughput is 120 h^{-1} , 10 times higher than that obtained by LC (12 h^{-1}) and (iii) only 1 ml acetonitrile is consumed for each sample analysis, in front of the 39.1 ml required by the LC determinations. So, it can conclude that the NIR determination of Diuron is a low cost and environmentally friendly methodology and a reliable alternative to procedures based on the use of chromatography.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Di-

References

- [1] EXTTOXNET Extensión Toxicology Network Pesticide Information Profiles, Oregon State University, Corvallis, OR, 1996.
- [2] C. de Liñan, *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*, Ediciones Agrotécnicas S.L., Madrid, 2000.
- [3] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, J. Hernández-Mendez, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 71.
- [4] J.M. Pozzebon, S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, M.A. Kapor, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 381.
- [5] G. Gatidou, A. Kotrikla, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 153.
- [6] J.F. Lawrence, C. Van-Buuren, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 630.
- [7] J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernandez, *Analyst* 129 (2004) 38.
- [8] J. Klein, L. Alder, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 1015.
- [9] M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, A. Sanchez, R. Gonzalez, *Electroanalysis* 16 (2004) 311.
- [10] F.M. Lancas, S.R. Rissato, M.S. Galhiane, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 519.
- [11] K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, J. Begerow, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 755 (2001) 215.
- [12] A.C. Gerecke, C. Tixier, T. Bartels, R.P. Schwarzenbach, S.R. Mueller, *J. Chromatogr. A* 930 (2001) 9.
- [13] T.M. Anh, S.V. Dzyadevych, M.C. Van, N.J. Renault, C.N. Duc, J.M. Chovelon, *Talanta* 63 (2004) 365.
- [14] S.A. Eremin, A.E. Bochkareva, V.A. Popova, A. Abad, J.J. Mancus, J.V. Mercader, A. Montoya, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1835.
- [15] M. Mutz, T. Stahl, A. Iwanowitsch, H.P. Latscha, *GIT Lab. Fachz.* 43 (1999) 128.
- [16] N.L. Trautwein, J.C. Guyon, *Mikrochim. Acta (II)* (5,6) (1982) 393.
- [17] M. Blanco, M.A. Romero, M. Alcalá, *Talanta* 64 (2004) 597.
- [18] T. Herkert, H. Prinz, K.A. Kovar, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2001) 9.
- [19] S. Armenta, G. Quintas, S. Garrigues, M. de la Guardia, *TrAC-Trend Anal. Chem.*, in press.
- [20] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, *Handbook of near infrared spectroscopy*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1992.
- [21] Collaborative International Pesticide Analytical Council, *Guidelines on Method Validation to be Performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations (CIPAC 3807)*, Black Bear Press, Cambridge, 1999.

“Quality Control of Metamitron in
Agrochemicals Using Fourier Transform Infrared
Spectroscopy in the Middle and Near Range”

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues
y Miguel de la Guardia.

Analytica Chimica Acta 565 (2006) 255-260





Quality control of Metamitron in agrochemicals using Fourier transform infrared spectroscopy in the middle and near range

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues*, Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 25 October 2005; received in revised form 9 February 2006; accepted 13 February 2006

Available online 6 March 2006

Abstract

Two vibrational spectrometry-based methodologies were developed for Metamitron determination in pesticide formulations. Fourier transform-middle infrared (FT-MIR) procedure was based on the extraction of Metamitron by CHCl_3 and latter determination by peak area measurement between 1556 and 1533 cm^{-1} , corrected with a two points baseline established from 1572 to 1514 cm^{-1} . Fourier transform-near infrared (FT-NIR) determination was made after the extraction of Metamitron in acetonitrile and measuring the peak area between 6434 and 6394 cm^{-1} corrected using a two points baseline defined between 6555 and 6228 cm^{-1} . Repeatability, as relative standard deviation, of 5 independent measurements at mg g^{-1} concentration level, of 0.16% and 0.07% for MIR and NIR and a limit of detection of 0.03 and 0.004 mg g^{-1} were obtained for MIR and NIR, respectively.

NIR determination provides a sample frequency of 120 h^{-1} , higher than that found by MIR and liquid chromatographic methods (60 and 15 h^{-1} , respectively). On the other hand, the NIR method reduces the solvent consumption and waste generation, to only 1 ml acetonitrile per sample as compared with 3.4 ml chloroform required for the MIR determination and 60 ml acetonitrile used in the chromatographic reference procedure. So, vibrational procedures can be considered serious alternatives to long and time consuming chromatographic methods usually recommended for quality control of commercially available pesticide formulations.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metamitron; Fourier transform-middle infrared (FT-MIR) spectroscopy; Fourier transform-near infrared (FT-NIR) spectroscopy; Pesticide formulations; Agrochemicals

1. Introduction

Agriculture is the world's major economical activity, over 50% of the world's population being dependent upon agriculture for their livelihood. It has been evidenced by data reported in 2000 and 2001 that the world pesticide expenditures totalize more than 32.5 billion dollars per year and that the amount used of these products exceeded 5.0 billion pounds per year [1].

The registration, manufacturing and sale of a pesticide formulation imply a number of different controls among which its evaluation, safety and composition are the most important. In order to characterize a pesticide, it is necessary to be able to determine its composition and chemical and physical properties.

Many standardized methods are available to analyze technical products and commercial formulations, such as those of the Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC) [2] and the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [3]. Chromatographic techniques have been till today the most widely used procedures. However the concentration range of the active principles in the samples allows us that vibrational spectrometry-based procedures could be employed as a serious alternative in the quality control of pesticide commercial formulations.

It is well-known that the applicability of the middle-infrared spectrometry (MIR) for the quality control of agrochemical formulations, being available methods for Artemisinin [4], Buprofezin [5], Chlorsulfuron [6], Cyromazine [7], Fenoxycarb [8], Fenvalerate [9] and Metalaxyl [10] determination after their extraction in an appropriate solvent, generally a chlorinated compound. However, there is only a single one precedent on the use of near infrared (NIR) spectrometry

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

for the quality control of pesticides, being Diuron determined in commercial formulations [11] after extraction with acetonitrile.

The main advantages of NIR spectrometry are its non-destructive nature, the possibility to analyze products in real time, the low cost of equipment maintenance, the fast response times and the possibility to measure directly solid samples, with no sample pre-treatment. On the contrary, the main drawback is that the overlapped bands of the NIR spectra are influenced by a number of chemical, physical and structural variables and the use of chemometrics to extract relevant information is necessary.

So, the aims of the present study were to develop and compare a NIR-based procedure with a MIR method for the quality control of pesticides in agrochemicals. Metamitron, 4-amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(4*H*)-one, was selected as test molecule for this purpose.

Metamitron is a widely used herbicide for the control of grasses and broad-leaved weeds in sugar and red beets, fodder beet, and certain strawberry varieties. Metamitron is slightly toxic by ingestion, with reported oral LD₅₀ values of 3343 mg kg⁻¹ in rats [12].

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Bruker Tensor 27 (Bremen, Germany) FT-MIR spectrometer equipped with a temperature-stabilized deuterated tryglycine sulfate (DGTS) detector, was employed for spectral measurements, using a 0.11 mm pathlength micro-flow cell (Graseby-Specac, Orpington, UK) with ZnSe and CaF₂ windows. For instrument control and data acquisition the OPUS program version 4.1 from Bruker was employed. Spectra treatment and data manipulation have been carried out using Omnic 2.1 and OmnicMacros 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

A Gilson P-2 Minipuls peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) equipped with 3 mm o.d. and 1 mm i.d. solvent resistant Viton (Isoversinic) tubing was employed for the sample introduction in the measurement cell.

A Bruker MPA (Bremen, Germany) FT-NIR spectrometer equipped with an InGaAs detector, using a standard glass vial (6.5 mm i.d.) as sample cell, was used for transmittance NIR measurements. For instrument control and data acquisition the OPUS program version 4.1 from Bruker was employed. Spectra treatment and data manipulation was carried out using Omnic 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

A Dionex P680 Liquid Chromatograph (Sunny Vale, CA, USA), equipped with a C-18 reversed phase (Kromasil) column (250 mm × 4.6 mm i.d. and 5 μm particle diameter), and an UVD 170U variable wavelength UV-vis detector was also used for the determination of Metamitron in pesticide formulations, being employed this methodology as a reference procedure for

Metamitron PESTANAL[®] grade standard (99%, w/w) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). Analytical grade chloroform stabilized with ethanol and acetonitrile supplied by Scharlau (Barcelona, Spain), were employed for the preparation of samples and standards. Metamitron wettable powder commercial formulations, containing a declared value of 70% (w/w), were obtained directly from the Spanish market and synthetic samples were prepared by dilution of commercial ones with calcium carbonate.

2.2. Liquid chromatography-ultraviolet (LC-UV) reference procedure

Forty milligrams of sample was accurately weighed, inside a 50 ml volumetric flask and diluted to the volume with CH₃CN, being sonicated during 5 min in an ultrasonic water bath to assess the pesticide extraction from the sample matrix. 0.6 g of the extract were diluted to 6 g with acetonitrile and filtered through a 0.22 μm nylon filter. Twenty microliters of this latter solution were directly injected in a 80:20 acetonitrile:water mobile phase of 1 ml min⁻¹ carrier flow and Metamitron determined in the isocratic mode by absorbance measurements at 225 nm. Area values of the chromatographic peaks obtained at a retention time of 2.60 min were interpolated in an external calibration line established from the measurement of six standard solutions of Metamitron containing from 21.4 to 79.8 mg l⁻¹.

Calibration line obtained in the aforementioned conditions was $A = (0.06 \pm 0.07) + (0.8848 \pm 0.0014)C_{\text{MET}}$ with a $r = 0.99995$ for Metamitron. The repeatability, established as the relative standard deviation, of five independent injections of a 21.4 mg l⁻¹ Metamitron concentration, was 0.14% and a limit of detection, established as three times the standard deviation of the signal obtained for a Metamitron standard of 21.4 mg l⁻¹ divided by the calibration slope, of 0.09 mg l⁻¹ (0.00012 mg g⁻¹ or 0.00048% (w/w) in a sample mass of 40 mg) was achieved by this procedure.

2.3. FT-MIR procedure

Thirty to 50 mg of sample were accurately weighed and diluted with 5 g of CHCl₃. The mixture was sonicated for 2 min in an ultrasonic water bath. After that, the sample extract was passed through a 0.22 μm nylon filter and introduced in the MIR measurement cell by using a peristaltic pump. The MIR spectra were obtained in the stopped-flow mode at 4 cm⁻¹ nominal resolution and accumulating 25 scans per spectrum, from 4000 to 900 cm⁻¹, using a background of the cell filled with the solvent. The *Blackman-Harris-3-term* apodization function, a phase resolution of 64 cm⁻¹, a *Mertz* phase correction method and a zero filling factor value of 2, were employed.

Peak area values between 1556 and 1533 cm⁻¹, corrected with a two points baseline established from 1572 to 1514 cm⁻¹, were employed to quantify Metamitron in samples using an external calibration line obtained with 5 standard solutions of

2.4. FT-NIR procedure

Twenty milligrams of sample was dissolved with 750 mg acetonitrile by ultrasonic shaking for 2 min. This solution was filtered and transferred to a glass vial of 6.5 mm i.d. used as measurement cell. The FT-NIR spectra were recorded from 12 500 to 4000 cm^{-1} , using a nominal resolution of 8 cm^{-1} , accumulating 32 scans and employing a background spectrum of the cell filled with acetonitrile measured in the same instrumental conditions used for samples. In all cases, the *Blackman-Harris-3-term* apodization function, a phase resolution of 64 cm^{-1} , a *Power Spectrum* phase correction method (recommended for NIR measurements) and a zero filling factor value of 2, were used.

A calibration line was established for Metamitron with standard solutions of the pesticide in the concentration range between 8.93 and 25.72 mg g^{-1} by measuring peak area values between 6434 and 6394 cm^{-1} corrected using a two points baseline defined between 6555 and 6228 cm^{-1} . Sample spectral data obtained in the same conditions as standards, were interpolated in Metamitron calibration line.

3. Results and discussion

3.1. MIR measurements

3.1.1. MIR transmittance spectrum

Fig. 1 shows the MIR spectra, in the wavenumber region from 4000 to 950 cm^{-1} , of a chloroform solution of Metamitron at 3.82 mg g^{-1} and different commercial samples. The spectra of standard and sample solutions in CHCl_3 present the main absorption bands corresponding to the Metamitron molecule, thus indicating a good extraction of the pesticide.

The bands located at 1680 and 1544 cm^{-1} , are due to the amide I band and $\text{C}=\text{N}$ stretching in triazinones, respectively, and this latter seems to be free from matrix interferences and could be useful for Metamitron determination in pesticide formulations. Other less intense absorption bands are located at

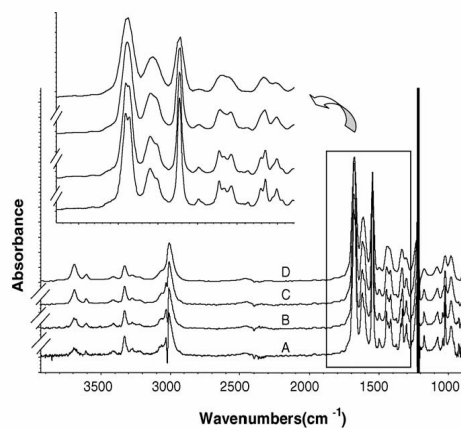
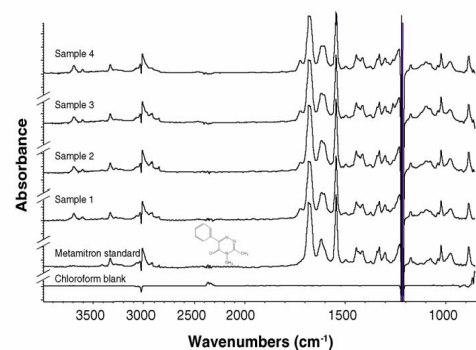


Fig. 2. Effect of the nominal resolution on the MIR signal of a Metamitron standard of 1.84 mg g^{-1} , accumulating 25 scans per spectrum. Note: Spectra were shift on the y axis to clearly show their bands using 2, 4, 8 and 16 cm^{-1} (A, B, C and D) nominal resolution, respectively.

1617, 1329 1021 and 886 cm^{-1} due to ring stretching in benzene derivatives, $\text{N}-\text{NH}_2$ stretching, and $\text{C}-\text{N}=\text{C}$ asymmetric and symmetric stretching, respectively [13].

3.1.2. Effect of MIR measurement conditions

In order to select the most appropriate measurement conditions for the MIR determination of Metamitron, it was studied the effect of nominal resolution and number of cumulated scans on the signal to noise ratio (S/N) of a 1.84 mg g^{-1} Metamitron standard. S/N values were obtained from the quotient between the peak area values from 1556 to 1533 cm^{-1} (corrected with a two points baseline established from 1572 to 1514 cm^{-1}), and the noise in the same spectral range, calculated as root mean square (without any baseline correction) for a chloroform blank solution.

The nominal resolution was varied between 2 and 16 cm^{-1} and the number of scans was modified from 9 to 49, using in all cases a zero filling factor value of 2. Fig. 2 shows the effect of the nominal resolution on the FT-MIR spectra. The use of a high value of nominal resolution, 8 or 16 cm^{-1} , cannot be recommended, because of the deformation of the absorption bands and the loss of spectral information. A nominal resolution of 4 cm^{-1} was chosen, which provides good sensitivity, with a loss of only a 1.6% with respect to that found using 2 cm^{-1} , and implies a 50% reduction of the acquisition time, thus increasing the sample throughput.

Regarding to the number of cumulated scans, 25 scans were selected for further measurements in order to ensure a compromise between sample measurement frequency and signal to noise ratio.

Table 1
Analytical characteristics of MIR determination of Metamitron using different measurement modes, bands and baseline corrections

Peak height (cm ⁻¹)	Baseline criteria (cm ⁻¹)	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b)C_{Met}$	r ($n=15$)	R.S.D. % ^a	LOD ^b (mg g ⁻¹)	LOQ ^c (mg g ⁻¹)
1545	1572–1514	$y = (0.0011 \pm 0.0003) + (0.02654 \pm 0.00010)C_{Met}$	0.99992	0.19	0.04	0.14
1545	1572	$y = (0.0011 \pm 0.0003) + (0.02617 \pm 0.00010)C_{Met}$	0.99990	0.18	0.04	0.14
1545	1514	$y = (0.0010 \pm 0.0003) + (0.02697 \pm 0.00009)C_{Met}$	0.99993	0.3	0.04	0.14
1682	1643	$y = (0.0009 \pm 0.0003) + (0.02115 \pm 0.00011)C_{Met}$	0.9998	0.2	0.03	0.08
1022	1032–1009	$y = (0.00001 \pm 0.00006) + (0.00632 \pm 0.00002)C_{Met}$	0.99994	0.7	0.08	0.3
1022	1009	$y = (0.00050 \pm 0.00010) + (0.00662 \pm 0.00003)C_{Met}$	0.99990	1.7	0.07	0.2
1331	1358–1319	$y = (0.00015 \pm 0.00009) + (0.00588 \pm 0.00003)C_{Met}$	0.99990	0.5	0.07	0.2

Peak area (cm ⁻¹)	Baseline criteria (cm ⁻¹)	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b)C_{Met}$	r ($n=15$)	R.S.D. % ^a	LOD ^b (mg g ⁻¹)	LOQ ^c (mg g ⁻¹)
1556–1533	1572–1514	$y = (0.009 \pm 0.011) + (0.3531 \pm 0.0011)C_{Met}$	0.99994	0.16	0.03	0.10
1556–1533	1572	$y = (0.010 \pm 0.004) + (0.3419 \pm 0.0013)C_{Met}$	0.99991	0.3	0.03	0.11
1556–1533	1514	$y = (0.008 \pm 0.003) + (0.3604 \pm 0.0010)C_{Met}$	0.99995	0.17	0.03	0.10
1695–1661	1643	$y = (0.010 \pm 0.007) + (0.540 \pm 0.002)C_{Met}$	0.99990	0.07	0.012	0.04
1028–1016	1032–1009	$y = (0.0003 \pm 0.0005) + (0.04940 \pm 0.00017)C_{Met}$	0.99993	0.6	0.08	0.3
1028–1016	1009	$y = (0.0030 \pm 0.0008) + (0.0536 \pm 0.0003)C_{Met}$	0.9998	1.9	0.13	0.4
1358–1319	1358–1319	$y = (0.0024 \pm 0.0011) + (0.1092 \pm 0.0003)C_{Met}$	0.99994	0.7	0.04	0.13

^a Relative standard deviation values of five independent measurements of a Metamitron standard solution of 1.24 mg g⁻¹.

^b Limit of detection values were established from the three times (a probability level of 99.6%) the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

^c Limit of quantification values established as 10 times the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

and area values employing different baseline correction were assayed for MIR analysis.

The repeatability, expressed as relative standard deviation, of five independent measurements at a concentration level of 1.24 mg g⁻¹ varied between 0.07 and 1.9% and limit of detection values, established from the standard deviation of five measurements of a blank solution divided by the calibration slope, varied from 0.012 to 0.13 mg g⁻¹, being in all cases adequate for the determination of this active principle in commercially available formulations.

Peak area values were in general one order of magnitude more sensitive than peak height ones. Peak area data between 1556 and 1533 cm⁻¹, corrected with a two points baseline established from 1572 to 1514 cm⁻¹, were selected because they provide a higher selectivity than the amide I band, located at 1682 cm⁻¹, a R.S.D. of 0.16% and a limit of detection of 0.03 mg g⁻¹, equivalent to 0.12% (w/w) for a sample mass of 40 mg.

3.2. NIR measurements

3.2.1. NIR transmittance spectrum

Fig. 3 shows the transmission NIR spectra, in the wavelength range from 8000 to 4400 cm⁻¹, of a 19.87 mg g⁻¹ Metamitron standard dissolved in acetonitrile, those of four pesticide sample extracts and a blank of acetonitrile. As it can be seen in this figure, the most intense bands were the carbonyl stretching second overtone peak at 4902 cm⁻¹ and the carbonyl stretching combination located at 4630 cm⁻¹. Another less important absorption band is located at 6404 cm⁻¹, due to the N–H stretching first overtone [14].

free from matrix interferences and seem appropriate to be employed for the determination of Metamitron in pesticide formulations extracted with acetonitrile.

3.2.2. Effect of NIR measurement conditions

The effect of instrumental parameters, such as the number of cumulated scans per spectrum and nominal resolution employed for data acquisition, were also studied to improve the measurement conditions, in the same way than in MIR spectrometry.

The number of cumulated scans was modified from 8 to 64, and the nominal resolution varied from 2 to 16 cm⁻¹. In this case, the wide absorption bands in NIR region, due to overtones, are not as affected by the nominal resolution as those located in the

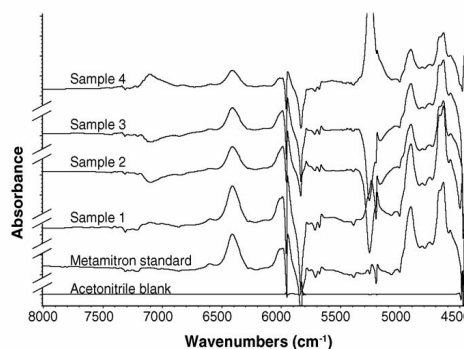


Table 2
Analytical characteristics of NIR determination of Metamitron using different measurement modes, bands and baseline corrections

Peak region (cm ⁻¹)	Baseline criteria (cm ⁻¹)	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b)C_{Met}$	r ($n=15$)	R.S.D. % ^a	LOD ^b (mg g ⁻¹)	LOQ ^c (mg g ⁻¹)
6409	6555–6228	$y = (0.0003 \pm 0.0003) + (0.001659 \pm 0.000017)C_{Met}$	0.9993	0.06	0.003	0.011
4902	5003	$y = (0.0012 \pm 0.0008) + (0.00334 \pm 0.00005)C_{Met}$	0.999	1.1	0.04	0.14
4902	5003–4834	$y = (0.0008 \pm 0.0005) + (0.00263 \pm 0.00003)C_{Met}$	0.9991	0.7	0.02	0.08
4630	4728–4590	$y = (0.0008 \pm 0.0005) + (0.00263 \pm 0.00003)C_{Met}$	0.9993	0.11	0.017	0.06
6434–6394	6555–6228	$y = (0.01 \pm 0.02) + (0.0619 \pm 0.0007)C_{Met}$	0.9993	0.07	0.004	0.012
4929–4889	5003	$y = (0.04 \pm 0.03) + (0.1230 \pm 0.0019)C_{Met}$	0.999	1.2	0.04	0.13
4929–4889	5003–4834	$y = (0.027 \pm 0.018) + (0.0959 \pm 0.0011)C_{Met}$	0.9991	0.7	0.02	0.07
4656–4616	4728–4590	$y = (0.018 \pm 0.017) + (0.0968 \pm 0.0010)C_{Met}$	0.9993	0.14	0.014	0.05
4656–4616	4795	$y = (-0.01 \pm 0.03) + (0.1187 \pm 0.0017)C_{Met}$	0.999	0.6	0.016	0.05
4694–4619	4728–4590	$y = (0.03 \pm 0.03) + (0.1668 \pm 0.0017)C_{Met}$	0.9993	0.2	0.012	0.04

^a Relative standard deviation values of five independent measurements of a Metamitron standard solution of 8.63 mg g⁻¹.

^b Limit of detection values were established from the three times (a probability level of 99.6%) the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

^c Limit of quantification values established as 10 times the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.

Table 3
Determination of Metamitron in pesticide formulations by HPLC–UV, MIR and NIR procedures

Sample	HPLC–UV (% w/w) ^a	MIR (% w/w) ^a	t_{exp} ^b	NIR (% w/w) ^a	t_{exp} ^b
1	49.8 ± 0.3	49.7 ± 1.3	0.168	50.2 ± 0.4	1.789
2	52.5 ± 0.3	52.8 ± 0.3	1.581	52.3 ± 0.4	0.894
3	50.1 ± 0.4	50.4 ± 0.9	0.681	49.8 ± 0.5	1.048
4	25.3 ± 0.2	25.7 ± 0.5	1.661	25.0 ± 0.4	1.500

^a Concentration values are the average of two independent analysis measured in triplicate ± the corresponding standard deviation of the six values found.

^b $t_{tab} = 1.812$ with a probability level of 95% for 10 freedom degrees, applying a two tails assay.

MIR range. In this sense, a nominal resolution of 8 cm⁻¹ was selected for further experiments.

On the other hand, when a low number of scans were accumulated, the relative standard deviation of three independent measurements increase, so, in order to achieve a compromise between repeatability and sampling frequency 32 cumulated scans per spectrum were selected for NIR determination of Metamitron in pesticide formulations.

3.2.3. Selection of bands for NIR determination

Different absorption bands, measurement modes and baseline criteria were tested in order to improve the analytical conditions of the Metamitron determination in pesticide formulations by NIR spectrometry, as can be seen in Table 2.

The limits of detection found were in the range from 0.003 to 0.04 mg g⁻¹ and the repeatability, as relative standard deviation of five measurements of a 8.63 mg g⁻¹ Metamitron standard solution, varied between 0.06 and 1.2%, being found the best precision for band area measurements.

In short, the use of band area measurement between 6434 and 6394 cm⁻¹ with a two points baseline correction between 6555 and 6228 cm⁻¹ provides a variation coefficient of 0.07% and a limit of detection of 0.004 mg g⁻¹, that is equivalent to 0.008% (w/w) for a sample mass of 20 mg.

3.3. Analytical figures of merit of the developed procedures

cial samples spiked with different amounts of Metamitron and diluted with CHCl₃ or CH₃CN with a total Metamitron concentration from 2.03 to 5.62 mg g⁻¹ and from 6.48 to 16.47 mg g⁻¹, for MIR and NIR determination, respectively.

The average recoveries of Metamitron from spiked samples were 99.9 ± 1.4 and 100.5 ± 1.6%, for MIR and NIR measurements, respectively. The absence of matrix effects was confirmed by comparing the slopes of the external calibration and the standard addition regression lines of the developed procedures. The equations obtained for the MIR procedure were $y = (0.698 \pm 0.017) + (0.354 \pm 0.007)C_{Met}$ mg g⁻¹ with $r = 0.9980$ ($n = 12$) and $y = (0.009 \pm 0.011) + (0.3531 \pm 0.0011)C_{Met}$ mg g⁻¹ with $r = 0.9994$ ($n = 15$), for the standard addition and external calibration, respectively. NIR based methodology provided and standard addition curve $y = (0.425 \pm 0.003) + (0.0613 \pm 0.0005)C_{Met}$ mg g⁻¹ with $r = 0.9994$ ($n = 12$) and an external calibration line $y = (0.01 \pm 0.02) + (0.0619 \pm 0.0007)C_{Met}$ mg g⁻¹ with $r = 0.9993$ ($n = 15$), being observed that the slope values of the two pairs of lines are statistically comparable.

4. Comparison between different methodologies developed

The vibrational spectrometry-based methodologies, proposed in this paper, provided statistically comparable results with those obtained by HPLC reference method for the analysis

probability level of 95% and 10 freedom degrees (6 data found by each method minus 2 parameters).

The main advantages offered by the vibrational procedures are a strong reduction of the volume of organic solvent required for the analysis (60 ml acetonitrile for HPLC, 3.4 ml chloroform for MIR and only 1 ml acetonitrile for NIR) and the increase of the measurement frequency from 15 h^{-1} in the case of HPLC to 60 h^{-1} for MIR and 120 h^{-1} for NIR.

It can be concluded that the proposed spectrometric methodologies are fast and environmentally friendly alternatives to the classic chromatographic procedures for the quality control of commercial formulations in the agrochemical sector and although these procedures present a worse limit of detection than that obtained by HPLC, it is enough for the determination of active principles in pesticide formulations.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Project GV04B/247) and Grupos 03-118, Universitat de València (Project UV-AE-20050203) and Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604/BQU). S. Armenta also acknowledges the FPU Grant of the MECED (Ref. AP2002-1874).

References

- [1] Pesticide Sales and Usage Report Biological and analysis division Office of pesticide programs, US Environmental Protection Agency, PA, USA, 2002. <http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/01pestsales/sales2001.html>.
- [2] Collaborative International Pesticide Analytical Council, CIPAC Methods, Abingdon, England, 1994.
- [3] AOAC International, Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, 2002.
- [4] B.Y. Liu, H.J. Tian, J. Cui, Z.J. Song, *Yaowu Fenxi Zazhi* 14 (2004) 47.
- [5] S. Armenta, G. Quintás, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 81.
- [6] G. Quintás, S. Armenta, A. Morales-Noe, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Spectrosc. Lett.* 36 (2003) 511.
- [7] S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 257.
- [8] G. Quintás, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Ciencia* 11 (2003) 319.
- [9] S. Gupta, K.K. Sharma, S.K. Handa, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 1260.
- [10] G. Quintás, S. Armenta, A. Morales-Noé, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 11.
- [11] J. Moros, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 124.
- [12] The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th ed., Merck & Co. Inc., Rahway, N.J., USA, 1996.
- [13] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, London, England, 1991.
- [14] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, *Handbook of Near Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

“Univariate Near Infrared Methods for Determination
of Pesticides in Agrochemicals”

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues
y Miguel de la Guardia.

Analytica Chimica Acta 579 (2006) 17-24



Available online at www.sciencedirect.com ScienceDirect

Analytica Chimica Acta 579 (2006) 17–24

**ANALYTICA
CHIMICA
ACTA**

www.elsevier.com/locate/aca

Univariate near infrared methods for determination of pesticides in agrochemicals

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues*, Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry, Universitat de València, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 4 May 2006; received in revised form 4 July 2006; accepted 5 July 2006

Available online 11 July 2006

Abstract

It has been developed a general strategy for the determination of pesticides in agrochemicals by Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. The methodology is based on previous extraction of the active principles through sonication with acetonitrile and direct determination by transmission measurements, using glass vials as measurement cells and univariate calibration at selected wavenumbers as a function of the pesticide to be analyzed. Chlorsulfuron, metamitron, iprodione, pirimicarb, procymidone and tricyclazole were used as test molecules and data obtained by FT-NIR for 20 samples containing one of these active principles compare well with those found by reference liquid chromatography (HPLC) procedures. In short, FT-NIR provides relative standard deviations between 0.04 and 0.7% and limit of detection values ranging from 0.004 to 0.17 mg g⁻¹ with recovery values between 96.4 and 100.5%. On the other hand, FT-NIR offers a 10 times faster methodology than chromatography ones and an environmentally friendly alternative which reduces the reagent consumption to 1 mL acetonitrile per sample.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Near infrared; Pesticide formulations; Chlorsulfuron; Metamitron; Iprodione; Pirimicarb; Procymidone; Tricyclazole

1. Introduction

Pesticides are substances intended to prevent, destroy, repel or mitigate any pest, including insects, rodents and weeds as defined by the Food and Agricultural Organization (FAO) [1]. In the last decade, pesticide sector has been one of the world's major industry, with world expenditures higher than 32.5 billion dollars per year, with herbicides accounting for the largest proportion of the total (more than 40%), followed by insecticides, fungicides, and other pesticides, respectively [2].

Pesticide manufacturers must ensure the properties of their products in order to provide information to consumers and fulfill regulatory requirements. International organizations, such as the Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC), or the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), recommend different procedures for the quality control of agrochemicals. Methods suggested by the CIPAC for pesticide formulations are, in general, based on the use of gas chromatography (GC) or liquid chromatography (HPLC), the

most powerful techniques for pesticide-residue analysis. Nevertheless, these techniques involve occasionally long and tedious sample preparation steps and generally the use of big amounts of solvents. So, there is a need for new alternatives to quality control of pesticide formulations which could reduce the time of analysis and the environmental side effects.

In recent years, vibrational spectroscopy based procedures have been developed for control analysis of pesticide formulations [3,4]. However, methods based on the measurement at the mid infrared (MIR) region commonly employ halogenated hydrocarbons which are ozone depleting agents and thus it is convenient to look for the possibilities of near infrared (NIR) spectroscopy to do these determinations. This last technique has gained wide acceptance within the industry for raw materials testing [5], product quality control [6] and process monitoring [7], emphasizing its use in the pharmaceutical sector [8]. The growing interest in FT-NIR spectroscopy is probably a direct result of its major advantages over other analytical techniques, namely, an easy sample preparation with reduced pre-treatment steps, the possibility to use fibre optic probes, and the prediction of chemical and physical sample parameters from a single spectrum based on the use of multivariate calibration. However,

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.

NIR to the determination of active ingredients like diuron [9], buprofezin [10] and hexythiazox [11] in pesticide commercial formulations.

So, in this paper we have explored the possibilities that FT-NIR spectroscopy offers to the agrochemical sector by means of the development of simple, fast, accurate and environmentally friendly methods to the quality control of commercially available agrochemicals.

In fact six pesticides such as chlorsulfuron, metamitron, iprodione, pirimicarb, procymidone and tricyclazole were used as test molecules.

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A multi purpose analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer from Bruker (Bremen, Germany), equipped with a quartz beamsplitter, an air cooled NIR source and an InGaAs detector, was used in this study. For instrument control and data acquisition the OPUS program Version 4.1 from Bruker was employed. Spectra treatment and data manipulation have been carried out using Omnic 2.1 and OmnicMacros 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

A Hewlett-Packard HPLC Series 1050 high performance liquid chromatograph with a variable wavelength UV–vis detector, and a Dionex P680 liquid chromatograph (Sunny Vale, CA, USA) with an UVD 170U detector, both equipped with a C-18 reversed phase (Kromasil) column (250 mm × 4.6 mm i.d. and 5 µm particle diameter), were employed for the determination of pesticides in commercial formulations, being used this methodology as reference procedure for the validation of FT-NIR data.

An ultrasonic water bath J.P. Selecta (Barcelona, Spain) was used to carry out the pesticide extraction.

Chlorsulfuron (99.8%, w/w), iprodione (99.8%, w/w), metamitron (99%, w/w), pirimicarb (99.4%, w/w), procymidone (99.1%, w/w) and Tricyclazole (99.7%, w/w), all of them PESTANAL[®] grade standards, were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). Analytical grade acetonitrile supplied by Scharlau (Barcelona, Spain), was employed for the extraction of sam-

ples and standards preparation. Commercial formulations were obtained directly from the Spanish market.

2.2. Reference HPLC procedure

High performance liquid chromatography based procedures were employed as reference methods to analyze the different samples. The main parameters of the employed liquid chromatography procedures and their analytical characteristics are summarized in Table 1.

The appropriate amount of sample, from 15 to 40 mg (see Table 1 for details) was accurately weighed inside 25 mL volumetric flasks and dissolved with the organic solvent. In order to provide an appropriate concentration level, samples were diluted in each case with the mobile phase. After that, solutions were filtered and discrete volumes (20 µL, except in the case of iprodione determination for which 10 µL were used) were directly injected in the corresponding mobile phase, using a flow rate of 1 mL min⁻¹. Pesticides were determined in the isocratic mode by absorbance measurements at different wavelengths. Area values of the chromatography peaks obtained, at the reported retention times, were interpolated in external calibration lines established from pure standard solutions prepared in the mobile phases used in each case.

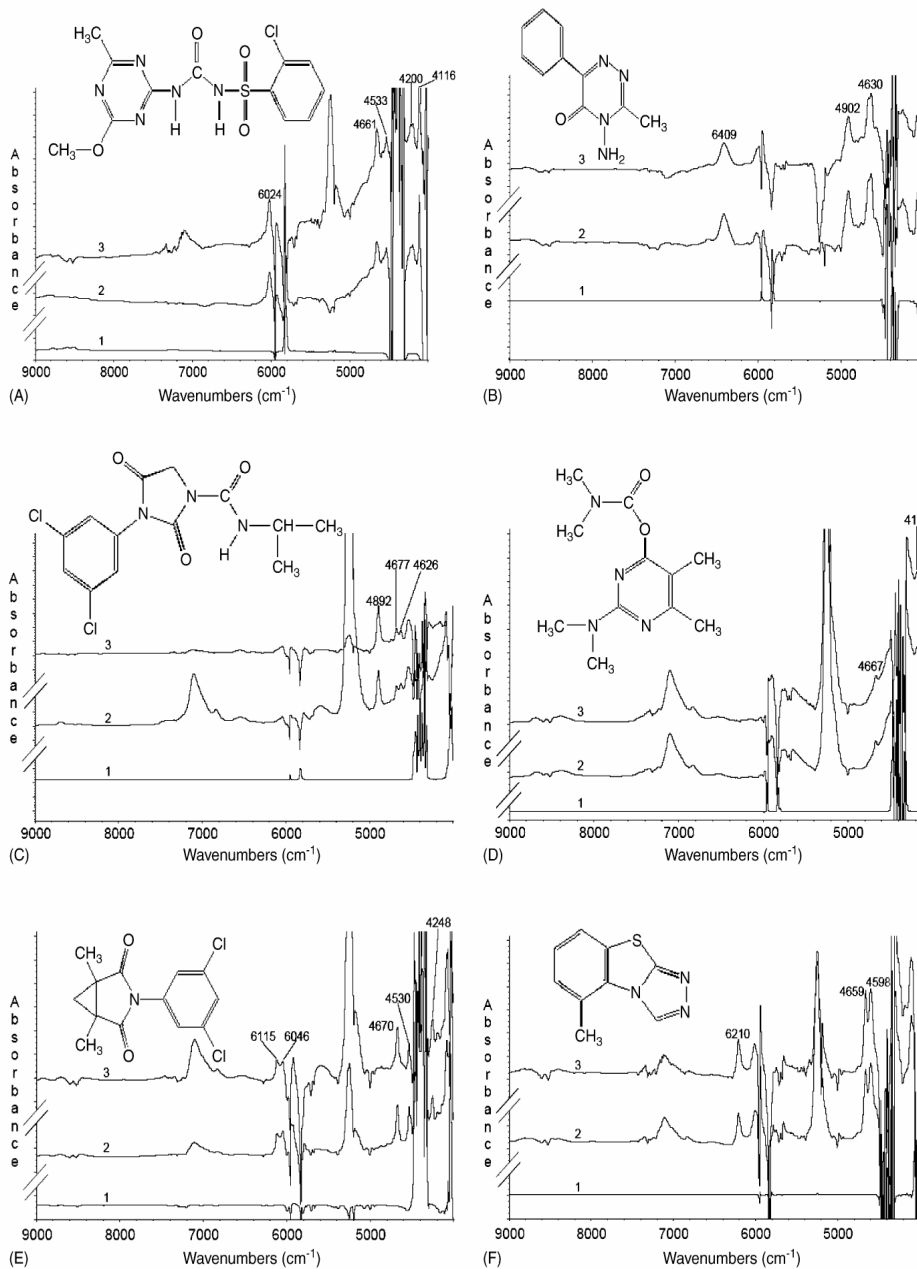
2.3. FT-NIR procedure

An appropriate amount of sample, from 15 to 50 mg, was dissolved with 750 mg acetonitrile by ultrasonic shaking for 5 min. This solution was filtered and transferred to a glass vial of 6.5 mm i.d. used as measurement cell. The FT-NIR spectrum was recorded from 12500 to 4000 cm⁻¹ using a nominal resolution of 8 cm⁻¹, accumulating 32 scans per spectrum and using a background of the cell filled with acetonitrile and measured in the same instrumental conditions used for samples.

Data found for samples, at appropriate wavenumbers, were interpolated in external calibration lines established from five standard solutions of each pesticide in the concentration range between 5 and 25 mg g⁻¹, by measuring either the corresponding peak height or peak area values corrected using different baseline criteria.

Table 1
Selected parameters for the high performance liquid chromatography reference procedures and their analytical characteristics for the determination of studied pesticides in commercial formulations

Pesticide	Sample amount (mg)	Volume injected (µL)	Mobile phase	Wavelength (nm)	Retention time (min)	R.S.D. (%) ^a	LOD ^b (µg L ⁻¹)
Chlorsulfuron	40	20	85:15 MetOH:phosphate buffer pH 4	226	2.8	0.02	13
Iprodione	30	10	85:15 ACN:water	229	4.2	0.1	20
Metamitron	40	20	80:20 ACN:water	225	2.6	0.14	12
Pirimicarb	20	20	65:35 ACN:water	250	4.9	0.5	5
Tricyclazole	15	20	85:15 ACN:water	275	2.8	0.06	30



3. Results and discussion

3.1. FT-NIR spectra of pesticide formulations

Fig. 1A–F shows the transmission FT-NIR spectra in the wavenumber range from 12500 to 4000 cm^{-1} of the six studied pesticides: chlorsulfuron, metamitron, iprodione, pirimicarb, procymidone and tricyclazole, both in sample extracts and for pure standards dissolved in acetonitrile, together with a reference blank of acetonitrile. It can be seen in these figures the main wavenumbers of the pesticides which can be used for their determination.

On comparing the NIR spectra of chlorsulfuron standard and sample extract (Fig. 1A) it can be observed the presence of several bands, which seem to be appropriate for the determination of chlorsulfuron. However, only the band located at 4661 cm^{-1} was useful, because the rest of the bands were located close to dark regions of the NIR spectra created by the use of acetonitrile as sample solvent. The aforementioned band could be assigned in solution to the C–H stretch, C=O stretch combination or symmetric C–H deformation [12].

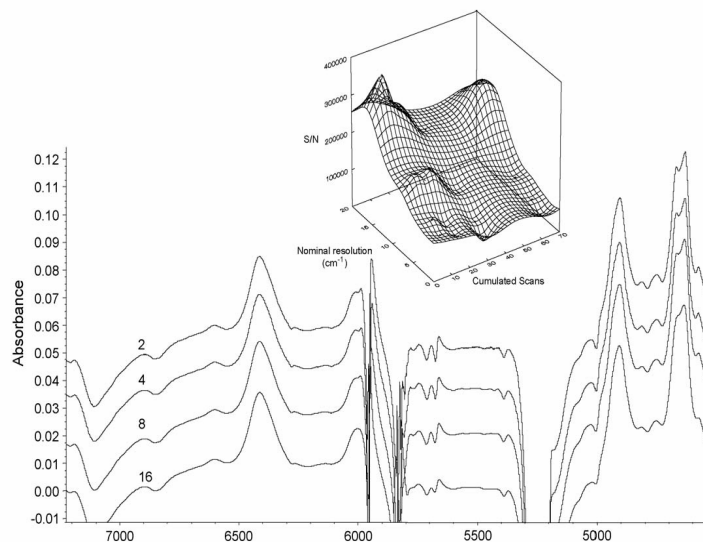
As it can be seen in Fig. 1B, the most intense bands of metamitron are the carbonyl stretching second overtone peak at 4902 cm^{-1} and the carbonyl stretching combination located at 4630 cm^{-1} . Another less important absorption band, located at 6409 cm^{-1} , is due to the N–H stretching first overtone [12]. On comparing the spectra of the metamitron standard and that of the sample extract it can conclude that these bands are well resolved and apparently free from matrix interferences and seem

appropriate to be employed for the determination of the pesticide in agrochemicals extracted with acetonitrile.

Fig. 1C shows characteristic vibration bands from iprodione centred at 4892 cm^{-1} associated to the C=O stretch second overtone and other less significant, such as those located at 4677 cm^{-1} , related to C–H stretch, C=O stretch combination or symmetric C–H deformation, and another one at 4626 cm^{-1} , which could be considered to belong to the asymmetric C–H stretch or C–H deformation combination [12]. So, all these bands could be considered suitable for the quantification of iprodione in commercially available formulations.

As can be seen in Fig. 1D, for the comparison between a pirimicarb standard and a pirimicarb extract, both solved in acetonitrile, only the band located at 4667 cm^{-1} , which could be associated to the C–H stretch, C=O stretch combination or symmetric C–H deformation seems to offer the possibility to determine pirimicarb in agrochemical formulations [12]. The band around 7100 cm^{-1} , which seems to be present in sample and standard, was finally an artifact which appears in some cases, probably due to a solvent impurity.

Fig. 1E evidences the similarity between the spectra of a procymidone standard and a sample extract for bands located at 6115 and 6046 cm^{-1} , related to C–H stretch first overtone. Moreover, a more intense band centred at 4670 cm^{-1} , that could be associated to the C–H stretch, C=O stretch combination or symmetric C–H deformation, and another band placed at 4248 cm^{-1} , which could correspond to the CH₂ bend second overtone [12], could be used for procymidone determination.



Figures of merit of the NIR pesticide determination in agrochemicals

	Wavenumber (cm ⁻¹) (measurement mode)	Baseline criteria (cm ⁻¹)	External calibration line Standard addition calibration line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) [C]^a$	r ^b	R.S.D. (%) ^c	LOD ^d mg g ⁻¹	LOQ ^e mg g ⁻¹	Recovery % ^f	Accuracy (Relative error %) ^g
n	4688–4623 (area)	4710–4604	$y = (-0.0001 \pm 0.0018) + (0.03791 \pm 0.00012) [C]$ $y = (0.2589 \pm 0.0017) + (0.0378 \pm 0.0002) [C]$	0.9999 0.9998	0.17	0.03	0.10	99.5 ± 1.3	1.4
	4688–4623 (area)	4710	$y = (-0.007 \pm 0.004) + (0.0441 \pm 0.0002) [C]$ $y = (0.343 \pm 0.015) + (0.0344 \pm 0.0018) [C]$	0.9998 0.98	0.08	0.03	0.10	99 ± 12	1.4
	6434–6394 (area)	6555–6228	$y = (0.01 \pm 0.02) + (0.0619 \pm 0.0007) [C]$ $y = (0.425 \pm 0.003) + (0.0613 \pm 0.0007) [C]$	0.9990 0.9994	0.07	0.004	0.012	100.5 ± 1.6	0.9
	4892 (height)	4952–4821	$y = (-0.0008 \pm 0.0004) + (0.00400 \pm 0.00002) [C]$ $y = (0.0194 \pm 0.0002) + (0.00402 \pm 0.00004) [C]$	0.9998 0.9997	0.11	0.004	0.014	100.1 ± 1.0	2.2
e	4922–4860 (area)	4821	$y = (-0.026 \pm 0.012) + (0.1427 \pm 0.0007) [C]$ $y = (0.674 \pm 0.009) + (0.1424 \pm 0.0014) [C]$	0.9998 0.9996	0.04	0.005	0.017	99.8 ± 0.8	0.8
	4679–4659 (area)	4787–4636	$y = (-0.0016 \pm 0.0007) + (0.00555 \pm 0.00004) [C]$ $y = (0.0358 \pm 0.0005) + (0.00568 \pm 0.00003) [C]$	0.9996 0.9998	0.4	0.05	0.2	96.4 ± 0.8	0.8
	4670 (height)	4715	$y = (0.0005 \pm 0.0003) + (0.001198 \pm 0.000019) [C]$ $y = (0.01301 \pm 0.00004) + (0.001145 \pm 0.000004) [C]$	0.998 0.9999	0.7	0.13	0.4	99.1 ± 0.6	1.6
	4691–4653 (area)	4756–4621	$y = (-0.003 \pm 0.007) + (0.0409 \pm 0.0004) [C]$ $y = (0.4260 \pm 0.0018) + (0.04078 \pm 0.00015) [C]$	0.9994 0.9999	0.7	0.17	0.6	100.5 ± 1.1	1.9
	6237–6185 (area)	6283	$y = (-0.0004 \pm 0.0016) + (0.03164 \pm 0.00010) [C]$ $y = (0.5514 \pm 0.0014) + (0.03000 \pm 0.00018) [C]$	0.9999 0.9999	0.04	0.03	0.08	99.2 ± 1.1	1.8
	4681–4640 (area)	4700–4632	$y = (-0.0008 \pm 0.0016) + (0.02720 \pm 0.00010) [C]$ $y = (0.45239 \pm 0.00016) + (0.02677 \pm 0.00002) [C]$	0.9999 0.9999	0.05	0.02	0.07	98.4 ± 0.5	1.1

on lines expression where $(a \pm s_a)$ means the intercept and its standard deviation and $(b \pm s_b)$ indicates the slope and its standard deviation being $[C]$ the concentration of pesticide expressed in mg g⁻¹. If standard addition calibration lines, they were obtained from the spike of sample extracts with known amounts of pesticide on the concentration range from 7 to 36 mg g⁻¹. correlation coefficient.

ge of relative standard deviation for three measurements of a standard solution located in the middle part of the calibration range.

detection established using 3s criterion and expressed in mg g⁻¹ units.

quantification established using 10s criterion and expressed in mg g⁻¹ units.

covery percentage for five samples spiked with different amounts of pesticide standard.

relative error between values obtained by HPLC and NIR proposed method for agrochemical samples containing the corresponding pesticide.

The main characteristic bands present at tricyclazole standard spectrum are also present in the acetonitrile extract of an agrochemical sample (see Fig. 1F). Bands located at 6210 cm^{-1} (C–H stretch first overtone), 4659 cm^{-1} (C–H stretch, C=O stretch combination or symmetric C–H deformation) and 4598 cm^{-1} (asymmetric C–H stretch or C–H deformation combination) [12] seem appropriate for the analysis of commercial formulations containing this pesticide.

In short, from spectra reported in Fig. 1A–F it can be concluded that the acetonitrile extraction of pesticides from agrochemicals offers a good way for the determination of the six evaluated compounds based on univariate external calibration and NIR measurements in selected conditions.

3.2. NIR measurement conditions

The effect of the spectral resolution (from 2 to 16 cm^{-1}) and that of the number of accumulated scans (from 4 to 64) were evaluated considering the signal to noise ratio at the wavenumber conditions selected for each pesticide.

In spite of the fact that in several cases the use of a 16 cm^{-1} nominal resolution provided the highest signal to noise ratio (S/N), it is clear that on using a so low resolution the spectral information could be lost.

As an example, Fig. 2 shows the spectra found for 32 cumulated scans of a metamitron concentration of 16.53 mg g^{-1} for different resolution values of 2 , 4 , 8 and 16 cm^{-1} and, in the inset, it can be seen the variation of S/N as a function of both,

the nominal resolution and the number of cumulated scans. It can be seen from the aforementioned figures that the maximum S/N was found for 16 cm^{-1} and 8 cumulated scans. However, on increasing the resolution the shape of spectra was modified and some bands or details of them could be lost.

On the other hand, 32 accumulated scans provided a good compromise between sensitivity, precision and sampling frequency.

3.3. Selection of bands for FT-NIR determination

Different bands, using peak height and peak area measurement modes and different baseline correction criteria, were evaluated for all considered compounds. The most relevant information is summarized in Table 2. The main analytical figures of merit found for each compound, in the best conditions, were evaluated, and thus, in Table 2 it has been included the equations of the univariate external calibration lines obtained for each criterion considered, the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ) and the relative standard deviation for a standard solution of 15 mg g^{-1} . It has been also included the standard addition calibration lines in order to provide information about the presence or not of matrix interferences.

The LOD and LOQ data were obtained from the concentration corresponding to 3 times and 10 times, respectively, the standard deviation of the blank divided by the slope of the calibrates.

Table 3
Determination of pesticides in agrochemicals by both HPLC and NIR

Pesticide	Sample	HPLC-UV ^a (% w/w) ± s	NIR ^a (% w/w) ± s	Accuracy (relative error %) ^b
Chlorsulfuron	1	76.41 ± 0.11	76.1 ± 0.4	-0.4
	2	76.4 ± 0.2	74.4 ± 0.7	-2.7
	3	76.4 ± 0.2	75.6 ± 0.3	-1.0
Metamitron	1	49.6 ± 0.3	50.2 ± 0.4	1.2
	2	52.5 ± 0.3	52.3 ± 0.4	-0.3
	3	50.1 ± 0.4	49.8 ± 0.5	-0.6
	4	25.3 ± 0.2	25.0 ± 0.3	-1.3
Iprodione	1	50.22 ± 0.02	49.09 ± 0.19	-2.2
	2	48.94 ± 0.03	48.9 ± 0.5	-0.0
	3	49.04 ± 0.03	49.0 ± 0.2	-0.0
Pirimicarb	1	46.9 ± 0.2	46.9 ± 0.8	-0.0
	2	46.83 ± 0.13	46.5 ± 0.2	-0.7
	3	46.94 ± 0.09	46.4 ± 0.4	-1.2
	4	47.97 ± 0.12	47.4 ± 0.5	-1.1
Procymidone	1	50.6 ± 0.4	51.4 ± 0.7	1.5
	2	51.6 ± 0.2	51.1 ± 0.2	-1.0
	3	50.5 ± 0.3	52.0 ± 0.8	3.0
Tricyclazole	1	76.0 ± 0.5	75.70 ± 0.11	-0.4
	2	77.5 ± 0.2	75.3 ± 0.3	-2.8
	3	75.5 ± 0.11	75.6 ± 0.11	0.0

4. Analytical figures of merit of the developed procedures

Regarding the analytical repeatability, the relative standard deviation (R.S.D.) of three measurements of a pesticide concentration located in the middle part of the calibration line, provided results for the different pesticides in study which varied between 0.04 and 0.7%.

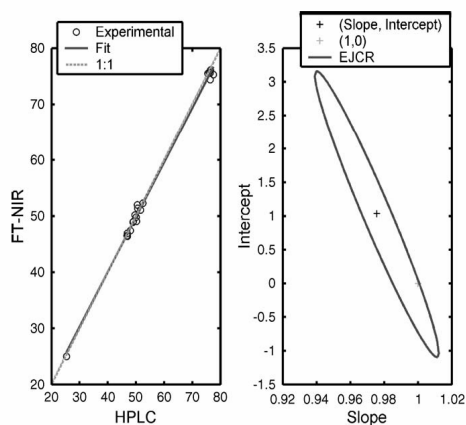
Limit of detection values found were ranged between 0.004 and 0.17 mg g⁻¹, as a function of the compound considered.

On comparing the aforementioned figures of merit with those found by HPLC (see Table 1) it can be seen that HPLC provides the most sensitive way for the determination of pesticides. However, at the concentration level of the pesticides in commercially available samples, the sensitivity obtained by NIR is enough and the repeatability of data was comparable.

On the other hand, recovery studies, carried out on actual samples spiked with different known amounts of the pesticides under study, provided values between 98.4 and 100.5%, except for pirimicarb (a mean recovery value of 96.4%), thus indicating the lack of systematic errors.

The absence of matrix effects was confirmed by comparing the slopes obtained for external calibration and standard addition regression lines (see Table 2) and once again it can conclude that FT-NIR spectroscopy offers an accurate way for quality control of pesticide formulations.

On considering sample throughput and solvent consumption, it is clear that the use of FT-NIR improves the laboratory productivity 10 times as compared with HPLC and that the amount of organic solvent consumed per analysis by FT-NIR is 1 mL, thus being lower than that required by HPLC. So, FT-NIR spectroscopy offers a fast and environmentally friendly alternative to HPLC for quality control analysis of agrochemicals.



5. Analysis of commercial samples

Commercially available formulations of pesticides were analyzed using NIR measurements after extraction with acetonitrile and data found were compared with the reference chromatography methods (see Table 3). The results obtained by NIR were statistically comparable with those obtained by HPLC.

Fig. 3 shows the regression between data found, for all pesticides and samples analyzed, by FT-NIR and HPLC; and the elliptic joint confidence region test for the slope and the intercept of this regression. The regression coefficient for FT-NIR versus HPLC concentration of pesticide in these samples was 0.997, thus evidencing a good regression between obtained values, being the slope equal to 0.976 ± 0.012 and the intercept equal to 1.0 ± 0.7 . As it can be seen in Fig. 3 also, no systematic errors are present as the theoretical point intercept=0 and slope=1 is located inside the corresponding elliptic joint confidence region.

6. Conclusion

FT-NIR spectroscopy has been successfully used for the rapid quality control of commercially available formulations of pesticides.

The proposed NIR method is a fast and serious alternative to the chromatographic procedures usually employed in quality control process of commercial formulations.

In spite of the inherent selectivity of HPLC and on the fact that the limits of detection found for FT-NIR are ranged between 1000 and 5000 times higher than those obtained by HPLC, the complexity and the concentration level at which pesticides are present in agrochemicals reduces the importance of the aforementioned analytical features.

The main advantages of the developed FT-NIR procedure are that: (i) it requires a reduced sample preparation, based on a simple previous extraction of the active ingredient with acetonitrile without any kind of dilution, (ii) it provides a high sampling throughput, because sample extraction can be made in 5 min and sample extract measurements only involves 30s providing 10 times reduction of the measurement time required per sample, (iii) it reduces drastically the amount of solvent used (in fact, the FT-NIR method provides between 36 and 38 times reduction of solvent consumed), and (iv) the development time required to establish an appropriate measurement procedure based on NIR is clearly minor than that involved on the optimization of a chromatography method.

So, it can be concluded that the FT-NIR quality control of commercially available formulations of pesticides is a low cost and environmentally friendly methodology and a reliable alternative to procedures based on the use of chromatography.

In the present study, the use of univariate calibration procedure has been selected in front of the use of multivariate calibration and it must be recognized that the proposed procedures are terribly simple, not require any complex calibration soft-

tion sets of previously analyzed samples commonly required on using multivariate approaches.

So, the methods proposed are, in our opinion, highly interesting for both, routine laboratories without any experience on chemometrics and control laboratories which do not work with high series of analyzed samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604, FEDER) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (ACOMP06-161). S. Armenta acknowledges the FPU grant of the Ministerio de Educación y Ciencia (Ref. AP2002-1874).

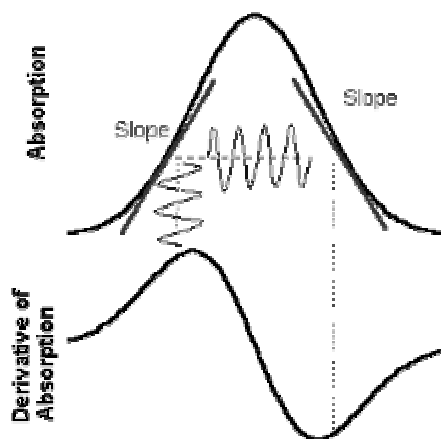
References

- [1] UN Food and Agricultural Organization, International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, UN FAO, Rome, Italy, 2002.
- [2] US Environmental Protection Agency, Pesticides industry sales and usage: 1996 and 1997 market estimates. Pesticide industry 1994 and 1995 sales and usage, US EPA, Washington DC, USA, 1999.
- [3] S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Trac-Trend Anal. Chem.* 24 (2005) 772.
- [4] S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 257.
- [5] H.C. Henriksen, T. Næs, R. Rødbotten, A. Aastveit, *Chemom. Intell. Lab. Lab.* 77 (2005) 238.
- [6] C. Miralbé, *Food Chem.* 88 (2004) 621.
- [7] Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* 61 (2005) 100.
- [8] P. Chalus, Y. Roggo, S. Walter, M. Ulmschneider, *Talanta* 66 (2005) 1294.
- [9] J. Moros, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 124.
- [10] S. Armenta, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *JNIRS* 13 (2005) 161.
- [11] J.F. Ventura-Gayete, S. Armenta, S. Garrigues, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta* 68 (2006) 1700.
- [12] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, *Handbook of Near Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1992.

“First-Derivative Fourier Transform Infrared Determination of Oxadiazon in Commercial Herbicide Formulations”

Javier Moros, Guillermo Quintás, Sergio Armenta,
Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

(enviado para su publicación)



(Sent for publication)

First-derivative Fourier Transform infrared determination of oxadiazon in commercial herbicide formulations

Javier Moros, Guillermo Quintás, Sergio Armenta, Salvador Garrigues* and Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry. University of Valencia. Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner. 46100 Burjassot. Valencia. Spain

Abstract: A Fourier transform infrared (FTIR) method has been developed for the quantification of oxadiazon in herbicide formulations. The method involves the extraction of the active ingredient by sonication of the samples with CHCl_3 and direct measurement of the peak area values in first-order derivate spectra from 1770 cm^{-1} to 1774 cm^{-1} corrected with a baseline point located at 1950 cm^{-1} and after a 5 points smoothing. A limit of detection (3 s) of 0.03 mg g^{-1} and a typical relative standard deviation (R.S.D) of 1.3 % were found. Results obtained were comparable with those found by liquid chromatography with UV detection. The proposed method involves a 7 times reduction in solvent consumption and 20 times increase of the sampling throughput as compared with the chromatography procedure and thus, it can be concluded that the proposed method is a sustainable alternative for quality control of pesticide commercial formulations.

Keywords: *Fourier Transform Infrared; first derivative spectroscopy; oxadiazon; herbicide formulations*

1 INTRODUCTION

Pesticides are biologically active chemicals designed to control pests but with a residual toxicity for humans. So, it is essential that the risks they pose to human health, animals and the environment can be properly controlled. In order to carry out this, before a pesticide can be sold, supplied, stored, used or advertised in Spain it must be approved by the Dirección General de Salud Pública- Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral.¹ Additionally, the assessment of chemical preparations to be placed in the European market, must accomplish the European Union and national legislations.

Notification schemes for new chemical substances, manufactured or imported within EU industries requires not only details on the notifier/manufacturer and the identity of the chemical, but also a technical dossier providing

information on the substance and results from analysis of physical and chemical properties, including quantitative data on the concentration of active principles and test reports from toxicological and ecotoxicological assays.²

Oxadiazon, 5-tert-butyl-3-(2,4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one, is a selective pre-emergence herbicide present as active ingredient in several commercially available formulations. It is used for the control of annual grasses and many broadleaf weeds in turf and landscape ornamentals.

Products containing oxadiazon control weeds growing from seeds, not controlling those emerged or established, by killing young weed seedling as they come in contact with oxadiazon during germination.^{3,4}

J Moros *et al.*

After a bibliographic research in the Analytical Abstracts database in the period for 1980 to February 2006 it was verified that the main part of methods proposed for the determination of oxadiazon in different kind of matrices such as juice⁵, honey⁶, soil⁷, wines⁸ and cereals⁹ are based on chromatography techniques.

The single precedent on the determination of oxadiazon at percentage level corresponds to Liu *et al.*¹⁰ who determines oxadiazon combined with butachlor and simetryn, using gas chromatography-mass spectrometry.

However, there are no precedents about the use of infrared spectrometry nor methodologies proposed for the determination of oxadiazon in commercial formulations in spite of the tremendous development of Fourier transform infrared based methods for the determination of pesticides in agrochemicals made in the last years.¹¹

So, the aim of this study was the development of a FTIR procedure for a fast, accurate and direct determination of oxadiazon in commercial herbicide formulations which can be used in the quality control of these products and could avoid the application of chromatography procedures which work better for residue analysis than for products containing oxadiazon at percentage level.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Apparatus and reagents

A Magna 750 FTIR spectrometer from Nicolet (Madison, WI, U.S.A.), equipped with a temperature-stabilized DGTS detector, a long-lasting Ever-Glo source and a KBr beamsplitter, was employed for spectral measurements, using a Specac micro-flow cell with ZnSe and CaF₂ windows and 0.11 mm pathlength. The equipment employs the 2.1 version of the OMNIC software developed by Nicolet Corporation for the acquisition and processing of the FTIR data.

A Gilson P-2 Minipuls peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) furnished with Viton (isobutylene) tubes (1 mm i.d. and 3 mm o.d.) resistant to chlorinated solvents, which provides flow rates from 0.2 to 3 ml min⁻¹, and PTFE tubes of 1.6 mm o.d. and 0.8 mm i.d. were used to introduce solutions into the micro-flow cell.

A Hewlett-Packard HPLC Series 1050 High Performance Liquid Chromatograph, equipped with a Kromasil C-18 column (250 x 4.6 mm i.d. and 5 µm particle diameter) and a variable wavelength UV-Vis detector was employed for the

Oxadiazon standard (99.7 % (w/w)) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). Analytical grade chloroform stabilized with 150 mg l⁻¹ amylene and acetonitrile were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain) and were employed for the preparation of samples and standards. Emulsifiable concentrate commercial formulations containing Oxadiazon 25 % (w/v) were obtained directly from the Spanish market.

2.2 Reference procedure

25 mg of sample were accurately weighted, inside a 25 ml volumetric flask and diluted to the volume with CH₃CN, being sonicated during 5 minutes in an ultrasounds water bath to extract oxadiazon from the matrix and to ensure a complete homogenization. 1 ml of the extract was diluted to 10 ml and filtered through a 0.22 µm nylon filter. 20 µl of this latter solution were directly injected in a Kromasil C18 (250 x 4.6, 5 µm) column using an 80:20 acetonitrile:water mobile phase at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Oxadiazon was determined in the isocratic mode by absorbance measurements at 292 nm using area values of the chromatogram peak obtained at a retention time of 10.37 min for samples and interpolating them in an external calibration line established from five oxadiazon standard solutions in acetonitrile in the concentration range from 3.81 to 38.1 ppm measured in the same conditions than samples.

2.3 FTIR recommended procedure

50 mg of sample were diluted with 7 g of CHCl₃ and sonicated for 5 minutes. This solution was passed through a 0.22 µm nylon filter and then introduced in a FTIR measurement micro-flow cell by using a peristaltic pump. The spectra were obtained in the stopped-flow mode from 4000 to 900 cm⁻¹ at 4 cm⁻¹ nominal resolution and accumulating 25 scans per spectrum, requiring each averaged spectrum an acquisition time of 30.9 seconds. It was established the background from the cell filled with the solvent.

Peak area values of the first-order derivative spectra between 1770 and 1774 cm⁻¹, corrected with a single point baseline established at 1950 cm⁻¹ after a 5 points smoothing were employed to quantify oxadiazon. Data found from samples were interpolated in an external calibration line obtained with 5 standard solutions of the pesticide in the concentration range between 0.68 and 2.91 mg cm⁻¹

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Absorbance spectra of oxadiazon

Examples of zero order absorbance spectra from 4000 to 850 cm^{-1} of both, an oxadiazon standard dissolved in chloroform and an extract of a commercial sample are shown in Figure 1.

The band located at 1782 cm^{-1} is due to the carbonyl group, that at 1616 cm^{-1} could be assignable to the $-\text{C}=\text{N}-\text{N}-$ group tension and the band observed at 1489 cm^{-1} could be related to the $\text{O}-\text{CH}$ group deformation from the aliphatic ether.¹²

Other characteristic bands appear at 1423 cm^{-1} due to benzene ring tensions, 1327 cm^{-1} corresponding to the interaction between CH_3 groups from *t-butyl* group, 1249 cm^{-1} (Aryl-O tension from the aromatic ether) and 1040 cm^{-1} ($\text{O}-\text{CH}$ tension from the aromatic ether too).

Moreover a series of bands at 1193, 1123, 1110 and 1094 cm^{-1} corresponding to the several tensions of $\text{C}-\text{Cl}$ bonds from the benzene ring could be identified.¹²

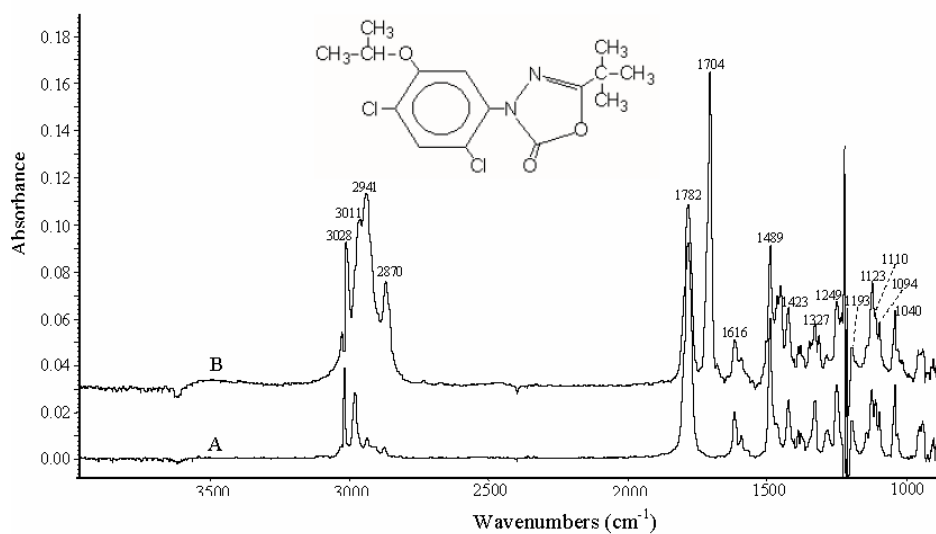
All the aforementioned bands are also present in the sample extract and additional bands corresponding to other formulation components as that of 1704 cm^{-1} which corresponds to cyclohexanone, a usual co-formulated agent present in this kind of formulations.

3.2 Selection of the appropriate bands for oxadiazon determination

In order to obtain the best analytical performance of the FTIR determination of oxadiazon in formulated samples several peak area and peak height measurements using different baseline criteria were tested. Table 1 summarizes the most relevant results obtained.

In terms of sensitivity, it can be appreciate that peak area measurements provide one order of magnitude better sensitivity than peak height values and that the band at 1489 cm^{-1} is that which provides the lowest accuracy errors. Because of that peak area measurements between 1494 and 1482 cm^{-1} corrected with a baseline point established at 1436 cm^{-1} could be considered the most appropriate criterion for the determination of oxadiazon.

Data in Table 1 also reports the limit of detection (LOD) values found on using different bands. LOD values were established, as recommended by the IUPAC as the pesticide concentration, which provides an absorbance value equal to three times the standard deviation of 10 measurements of a blank solution (99.6% confidence level). Additional indicators such as



al characteristics of FTIR determination of oxadiazon in agrochemicals using different measurement modes from zero order absorbance spectra.

Wavelength/Area (μm^2)	Baseline criteria (cm^{-1})	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) C_{\text{Oxa}}$	r^2 ($n = 15$)	R.S.D. (%) ^b	L.o.D. ^c (mg g^{-1})	L.o.Q. ^d (mg g^{-1})	Oxadiazon concentration (% w/v) ^e		Accuracy error (%) ^f
							FTIR	HPLC	
32	1950	$y = (-0.0010 \pm 0.0004) + (0.0405 \pm 0.0002) C_{\text{Oxa}}$	0.9998	0.15	0.004	0.012	26.48 \pm 0.14	24.9 \pm 0.2	6.4
							26.20 \pm 0.12	25.0 \pm 0.2	4.8
							26.46 \pm 0.17	24.9 \pm 0.3	6.3
1777	1950 - 1550	$y = (-0.009 \pm 0.004) + (0.442 \pm 0.002) C_{\text{Oxa}}$	0.9998	0.07	0.0007	0.0024	26.51 \pm 0.12	24.9 \pm 0.2	6.5
							26.29 \pm 0.11	25.0 \pm 0.2	5.2
							26.53 \pm 0.10	24.9 \pm 0.3	6.5
39	1473	$y = (0.0000 \pm 0.0002) + (0.01960 \pm 0.00014) C_{\text{Oxa}}$	0.9997	1.0	0.03	0.10	23.37 \pm 0.15	24.9 \pm 0.2	-6.1
							23.39 \pm 0.18	25.0 \pm 0.2	-6.4
							23.7 \pm 0.3	24.9 \pm 0.3	-4.8
1482	1436	$y = (-0.0003 \pm 0.0003) + (0.02380 \pm 0.00014) C_{\text{Oxa}}$	0.9998	0.6	0.06	0.18	25.6 \pm 0.3	24.9 \pm 0.2	2.7
							25.4 \pm 0.11	25.0 \pm 0.2	1.4
							25.6 \pm 0.2	24.9 \pm 0.3	2.9
13	1473	$y = (0.002 \pm 0.003) + (0.2003 \pm 0.0017) C_{\text{Oxa}}$	0.9995	1.2	0.04	0.12	22.7 \pm 0.3	24.9 \pm 0.2	-8.8
							22.75 \pm 0.17	25.0 \pm 0.2	-9.0
							23.0 \pm 0.4	24.9 \pm 0.3	-7.5
1416	1436	$y = (-0.002 \pm 0.002) + (0.2571 \pm 0.012) C_{\text{Oxa}}$	0.9999	0.6	0.04	0.14	25.6 \pm 0.2	24.9 \pm 0.2	2.8
							25.35 \pm 0.07	25.0 \pm 0.2	1.4
							25.58 \pm 0.12	24.9 \pm 0.3	2.7
17	1436	$y = (0.00028 \pm 0.00015) + (0.00831 \pm 0.00008) C_{\text{Oxa}}$	0.9993	0.6	0.12	0.39	27.9 \pm 0.3	24.9 \pm 0.2	12
							27.9 \pm 0.3	25.0 \pm 0.2	12
							28.4 \pm 0.4	24.9 \pm 0.3	14
1321	1363	$y = (0.0005 \pm 0.0010) + (0.0853 \pm 0.0005) C_{\text{Oxa}}$	0.9997	1.5	0.07	0.22	26.9 \pm 0.2	24.9 \pm 0.2	8.2
							27.0 \pm 0.3	25.0 \pm 0.2	8.0
							27.4 \pm 0.4	24.9 \pm 0.3	10
1321	1363	$y = (0.00030 \pm 0.00011) + (0.00912 \pm 0.00006) C_{\text{Oxa}}$	0.9997	0.5	0.04	0.13	26.9 \pm 0.2	24.9 \pm 0.2	8.1
							26.7 \pm 0.2	25.0 \pm 0.2	6.9
							27.0 \pm 1.0	24.9 \pm 0.3	8.2
1321	1363	$y = (0.0024 \pm 0.0011) + (0.0817 \pm 0.0006) C_{\text{Oxa}}$	0.9996	0.7	0.04	0.13	27.6 \pm 0.3	24.9 \pm 0.2	11
							27.5 \pm 0.3	25.0 \pm 0.2	10
							27.7 \pm 1.1	24.9 \pm 0.3	11

correlation coefficient for a set of 15 standard measurements.
 standard deviation for 3 independent measurements of a oxadiazon standard solution of 1.63 mg g^{-1} .
 detection established from three times (a probability level of 99.6%) the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.
 quantification values established as 10 times the standard deviation of a blank solution divided by the slope of the calibration line.
 ation values are the average of three independent analysis measured in triplicate \pm the corresponding standard deviation of all values found for an emulsifiable
 te formulation with a declared value of 25 % w/v.
 accuracy error (%) found from the comparison with results obtained by HPLC.

the r value, RSD or LOQ are also reported being confirmed that the use of zero order absorbance spectra of oxadiazon provides good linearity in the experimental conditions chosen with a LOD of 0.04 mg g^{-1} and a LOQ of 0.14 mg g^{-1} with RSD values of the order of 0.6 %.

However, the accuracy errors remain in the range from +1.4 % to +2.8 % as compared with data found by HPLC.

This fact could be due to the influence of formulation components which can be co-extracted with oxadiazon in CHCl_3 and can affect the sample spectra.

3.3 First-order derivative FTIR measurements

The use of derivative spectra instead of zero order ones in analytical spectroscopy is a single and easy way to correct for irrelevant background absorption and has been widely used in multicomponent analysis and to avoid matrix effects on selected bands.

Because of that, in the present study it was evaluated the use of first order derivative spectra to determine oxadiazon in samples extracts in order to avoid matrix effects which could be the reason for the high accuracy errors observed on using zero order spectra.^{13,14}

Figure 2 shows the first order derivative spectra in the region from 2000 to 1000 cm^{-1} of an oxadiazon standard solved in chloroform together

with that of a chloroform extract of pesticide formulation sample.

As it can be appreciate, in the derivative spectra, the band intensity and consequently the signal-to-noise-ratio decrease as compared with the zero order ones (see Figure 1). In this sense, based on the previously obtained results, it has been selected the carbonyl band at 1782 cm^{-1} because of its high intensity for the determination of oxadiazon.

Inset in Figure 2 shows in detail the first order derivative for carbonyl band in the spectral range compressed between 1870 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} and for smoothed spectra.

Analytical features obtained using different measurement modes and baseline criteria are reported in Table 2. It can be observed that, based on first order derivative spectra measurements, the accuracy errors were reduced significantly by a factor of three compared with the best results found with absorbance measurements for the band at 1489 cm^{-1} . Other quality parameters such as the linearity of the model fitting, the signal repeatability (evaluated for the RSD), the L.O.D. and the L.O.Q are also detailed in Table 2.

Ensuring a compromise between all the aforementioned parameters the area measurements in the first order derivative spectra, between 1770 cm^{-1} and 1774 cm^{-1} with a baseline correction point established at 1950 cm^{-1} was selected to carry out the quantification of oxadiazon in herbicide formulates.

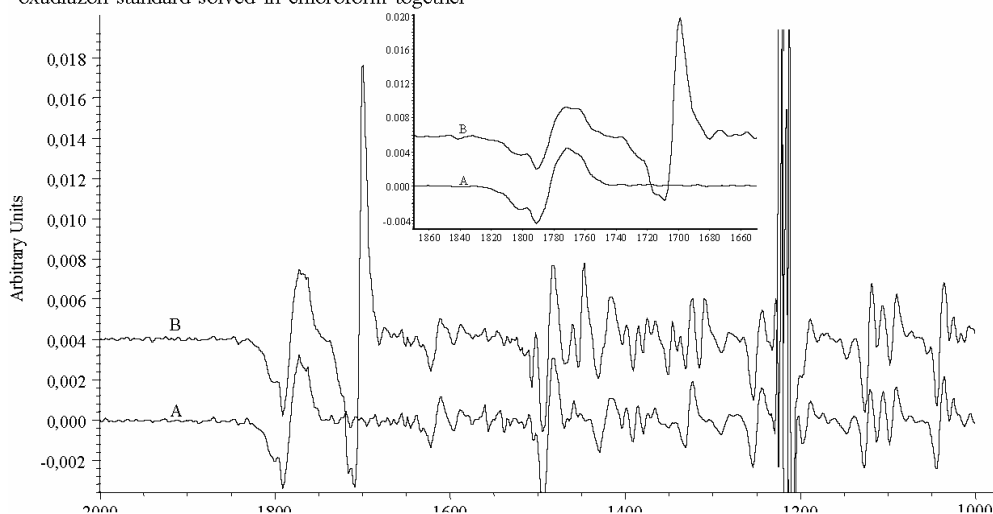


Table 2
Analytical features for the determination of oxadiazon in emulsifiable concentrates: formulates based on first order derivative spectra of the carbonyl band

height/area (cm ⁻¹)	Baseline criteria (cm ⁻¹)	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) C_{Oxa}$	r^2 ($n = 15$)	R.S.D. (%) ^b	L.o.D. ^c (mg g ⁻¹)	L.o.Q. ^d (mg g ⁻¹)	Oxadiazon concentration (% w/v) ^e		Accuracy error (%) ^f
							FTIR	HPLC	
1792	1950	$y = (-0.00002 \pm 0.00002) - (0.002001 \pm 0.000012) C_{Oxa}$	0.9998	2.2	0.03	0.10	24.4 ± 0.3 24.3 ± 0.4	24.9 ± 0.2 25.0 ± 0.2	-2.2 -2.7
1771-1773	1950	$y = (-0.00017 \pm 0.00004) + (0.00374 \pm 0.00002) C_{Oxa}$	0.9998	2.2	0.03	0.11	24.4 ± 0.2 25.2 ± 0.6 25.0 ± 0.4	24.9 ± 0.3 24.9 ± 0.2 25.0 ± 0.2	-2.0 1.1 -0.15
1772	1950	$y = (0.00001 \pm 0.00002) + (0.001998 \pm 0.000012) C_{Oxa}$	0.9998	2.2	0.06	0.20	25.3 ± 0.5 24.4 ± 0.3	24.9 ± 0.3 24.9 ± 0.2	1.4 -2.2
1770-1774	1950	$y = (-0.00006 \pm 0.00007) + (0.00729 \pm 0.00004) C_{Oxa}$	0.9998	1.6	0.04	0.13	24.3 ± 0.4 24.4 ± 0.2	25.0 ± 0.2 24.9 ± 0.3	-2.7 -2.0
							24.7 ± 0.4 24.7 ± 0.3	24.9 ± 0.2 25.0 ± 0.2	-0.9 -1.2
							24.73 ± 0.18	24.9 ± 0.3	-0.7

(note: for details, see the footnotes of Table 1)

3.4 Smoothing treatment on first derivative FTIR spectra of oxadiazon

It can be noticed that for the successful application of differentiation in quantitative analytical applications, it is essential to use differentiation in combination with sufficient data smoothing, in order to optimize the signal-to-noise ratio.¹⁵ However, this treatment implies several drawbacks such as peak height reduction or peak shape modification.

To select the best smoothing conditions it was evaluated the effect of smoothing from 5 to 25 points on the analytical features of oxadiazon determination.

Results obtained are reported in Table 3. As it can be seen, a slight improvement in accuracy errors was achieved when 5 points smooth correction treatment was applied. In short, the use of first order derivative smoothed data reduces the accuracy errors (relative values in %) to a range between +0.15 % to -0.6 %.

3.5 Analytical figures of merit of the proposed procedure

Additionally than reported features it was evaluated the recovery percentage of added oxadiazon on commercial samples spiked with different amounts of this pesticide from 1.38 to 3.75 mg g⁻¹ and the average recovery of oxadiazon was 101.5 ± 0.8 %.

The absence of matrix effects was confirmed by comparing the slopes of external calibration and standard addition regression lines. The equations obtained in the same measurement session were $y = (0.01086 \pm 0.00004) + (0.00756 \pm 0.00003) C_{Oxa}$ mg g⁻¹ with $r = 0.9999$ ($n = 18$) and $y = (0.00008 \pm 0.00003) + (0.007596 \pm 0.000016) C_{Oxa}$ mg g⁻¹ with $r = 0.99996$ ($n = 18$), for the standard addition and external calibration, respectively; being observed that the slope values of these lines are statistically comparables.

Moreover, in the aforementioned conditions, results obtained for three different herbicides formulates were statistically comparable for a probability level of 99.5 % to those obtained by HPLC.

4 CONCLUSIONS

From results obtained it can be concluded that FTIR procedure developed is a simple, fast, accurate and environmentally friendly alternative to HPLC methods for the quality control analysis of herbicide formulates containing oxadiazon.

oxadiazon in commercial herbicide formulations

procedure used only 4.8 ml of chloroform instead of 35 ml acetonitrile per sample analyzed.

In spite of the fact that HPLC provides a LOD of 0.022 µg ml⁻¹ for oxadiazon, which is three orders of magnitude lower than that found by FTIR, it can be concluded that relative low sensitivity associated to FTIR spectrometry is not a problem in the analysis of pesticide formulations which contain the active ingredient at a percentage level. The FTIR procedure developed in this work provides statistically comparable results with those obtained by HPLC, for a probability level of 95%, and permits a measurement sampling throughput of 116 h⁻¹, nearly 20 times higher than that found by HPLC which is of the order of 6 h⁻¹.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604, FEDER) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (Project 017609). Sergio Armenta also acknowledges the FPU grant (MEC; Ref. AP2002-1874).

REFERENCES

- 1 Official website from Ministerio de Sanidad y Consumo (see <http://www.msc.es>).
- 2 Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council of 31 May 1999 concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations. Official Journal L 200:0001 - 0068 (30/07/1999).
- 3 Pesticide Management Education Program (PMEP) website. 5123 Comstock Hall Cornell University Ithaca, NY 14853-0901. Pesticide Active Ingredient Information (including the Extoxnet -EXTension TOXicology NETwork- Pesticide Information Profiles, EPA -Environmental Protection Agency- and the Federal Register information, and Pesticide product registration letters from the NYS Department of Environmental Conservation). Available: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/naa-rimsulfuron/oxadiazon/herb-prof-oxadiazon.html> [23 May 2006].
- 4 de Litañ C. Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales, Ediciones Agrotécnicas S. L. Madrid (2000).
- 5 Chu XG, Hu XZ and Yao HY, Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. J Chromatogr A 1063:201-210 (2005).
- 6 Albero B, Sanchez-Brunete C and Tadeo JL, Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Agric Food Chem 52:5828-5835 (2004).
- 7 Sanchez-Brunete C, Albero B and Tadeo JL, Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. J Agric Food Chem 52:1445-1451 (2004).
- 8 Wong JW, Webster MG, Halverson CA, Hengel MJ, Ngim KK and Ebeler SE, Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with

Table 3
Effect of smoothing of the first order derivative spectra on the analytical features of the FTIR determination of oxadiazon.

Smooth Points	Dataspacing (cm ⁻¹) ^a	Spectral range (cm ⁻¹)	Regression line $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) C_{\text{ox}}$	r (n = 15)	R.S.D. (%) ^b	L.O.D. (mg g ⁻¹)	L.O.Q. (mg g ⁻¹)	Oxadiazon concentration (% w/v)		Accuracy error (%)
								FTIR	HPLC	
5	9.642	1770-1774	$y = (-0.00009 \pm 0.00007) + (0.00721 \pm 0.00004) C_{\text{ox}}$	0.9998	1.3	0.03	0.10	24.8 ± 0.3	24.9 ± 0.2	-0.4
								24.9 ± 0.3	25.0 ± 0.2	-0.6
7	13.500	1769-1773	$y = (-0.00042 \pm 0.00011) + (0.00730 \pm 0.00006) C_{\text{ox}}$	0.9996	1.0	0.02	0.08	25.1 ± 0.5	24.9 ± 0.2	0.9
								25.0 ± 0.3	25.0 ± 0.2	-0.13
9	17.357	1769-1773	$y = (-0.00036 \pm 0.00009) + (0.00722 \pm 0.00005) C_{\text{ox}}$	0.9997	0.6	0.02	0.07	25.3 ± 0.5	24.9 ± 0.2	1.6
								25.3 ± 0.5	24.9 ± 0.2	1.5
11	21.213	1768-1772	$y = (-0.00029 \pm 0.00008) + (0.00721 \pm 0.00004) C_{\text{ox}}$	0.9998	0.3	0.011	0.04	25.1 ± 0.2	25.0 ± 0.2	0.4
								25.4 ± 0.4	24.9 ± 0.3	2
17	32.784	1768-1772	$y = (-0.00020 \pm 0.00007) + (0.00723 \pm 0.00004) C_{\text{ox}}$	0.9998	0.17	0.002	0.008	25.5 ± 0.3	24.9 ± 0.3	2
								25.76 ± 0.11	24.9 ± 0.2	3
25	48.212	1766-1770	$y = (-0.00009 \pm 0.00005) + (0.00628 \pm 0.00003) C_{\text{ox}}$	0.9999	0.17	0.010	0.03	25.34 ± 0.14	25.0 ± 0.2	1.3
								25.66 ± 0.18	24.9 ± 0.3	3
								25.62 ± 0.07	24.9 ± 0.2	3
								25.35 ± 0.10	25.0 ± 0.2	1
								25.62 ± 0.15	24.9 ± 0.3	3

^a Wavenumber range employed by the software for the adjust at the polynomial function for a nominal resolution of 4 cm⁻¹.
Note: For detail about the rest of parameters see footnotes in Table 1.

J Moros *et al.*

- selective ion monitoring. *J Agric Food Chem* 51:1148-1161 (2003).
- 9 Li YJ, Huang ZQ and Yi WL, Determination of oxadiazon residues in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Sepu* 20:190-192 (2002).
 - 10 Liu F, Mu W and Wang JX, Quantitative analysis of butachlor, oxadiazon and simetryn by gas chromatography. *Sepu* 17:217-218 (1999).
 - 11 Armenta S, Quintás G, Garrigues S and de la Guardia M, Mid-infrared and Raman spectrometry for quality control of pesticide formulations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24:772-781 (2005).
 - 12 Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WB and Graselli JG, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston (1991).
 - 13 de la Guardia M, Gallignani M and Garrigues S, Flow-injection derivative Fourier transform infrared determination of methyl *tert*-butyl ether in gasolines. *Anal Chim Acta* 282:543-550 (1993).
 - 14 Gallignani M, Garrigues S and de la Guardia M, Derivative Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. *Anal Chim Acta* 287:275-283 (1994).
 - 15 Wentzell PD and Brown CD, Signal Processing in Analytical Chemistry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. by Meyers RA. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 9764-9800 (2000).

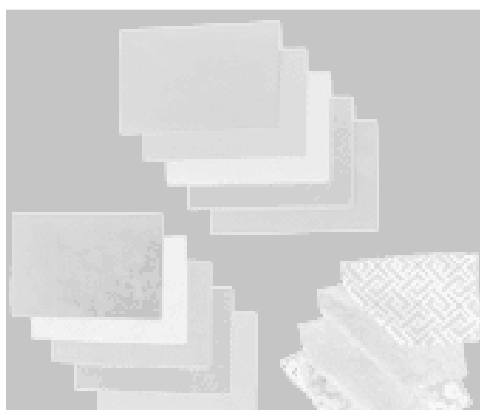
Capítulo 10.2

Calibración de primer orden

“Partial least-squares near-infrared
determination of hydrocarbons removed
from polluted waters by using tanned solid
wastes”

A. Gammoun, J. Moros, S. Tahiri, S. Garrigues y M. de la Guardia

Anal Bioanal Chem 385 (2006) 766-770



A. Gammoun · J. Moros · S. Tahiri ·
S. Garrigues · M. de la Guardia

Partial least-squares near-infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by using tanned solid wastes

Received: 21 December 2005 / Revised: 13 March 2006 / Accepted: 14 March 2006 / Published online: 27 April 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract A new procedure has been developed for the determination of hydrocarbons retained in solid tanned wastes from polluted waters. The method uses near-infrared (NIR) transmission spectra obtained from leachates of the hydrocarbons with CCl_4 using a partial least-squares (PLS) calibration model based on the use of mixtures of *n*-hexane, isooctane, and toluene diluted with CCl_4 . This methodology was applied to the evaluation of the absorption capacity of chrome shavings in water samples polluted with hydrocarbons, resulting in a maximum absorption capacity of 6.30 g hydrocarbons per g solid waste.

Keywords Hydrocarbons · Isooctane · Toluene · *n*-Hexane · Tannery solid wastes · NIR determination · PLS

Introduction

Hydrocarbons are the main components of water pollution from oil and grease. The standard protocol for their determination in polluted waters is based on a liquid–liquid extraction with Freon 113 and gravimetric or infrared determination, using a mixture of hydrocarbons to establish the appropriate calibration [1].

A. Gammoun
Faculté des Sciences - Université Hassan II Aïn Chock,
Casablanca, Morocco

S. Tahiri
Faculté de Sciences d'El Jadida. Département de Chimie,
Université Chouaib Doukkali,
El Jadida, Morocco

J. Moros · S. Garrigues · M. de la Guardia (✉)
Department of Analytical Chemistry, University of Valencia,
Research building, 50th Dr. Moliner St.,
46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: miguel.delaguardia@uv.es
Tel.: +34-96-3544838

In a previous paper, we demonstrated that the microwave-assisted extraction of oils with CCl_4 from polluted water provides a quantitative extraction of hydrocarbons after 1-min irradiation of samples [2]. Other studies also report that CCl_4 is a very convenient solvent for the extraction of hydrocarbons [3, 4]. Only preliminary studies have been reported on the use of near-infrared (NIR) for the determination of major hydrocarbons in gasoline [5] and the prediction of physical properties of aromatic-rich hydrocarbon mixtures [6]. However, to the best of our knowledge, there is no precedent for the use of NIR spectrometry for the determination of hydrocarbons in polluted water samples.

Based on our experience with the use of solid tannery wastes for the removal of water pollutants [7, 8], the main objective of this study was the development of a NIR methodology for the determination of hydrocarbons in wastes after removal by using chrome shaving solids and leaching with CCl_4 .

In fact, tannery solid wastes could provide an alternative to the use of cotton fibers [9] or recycled wool-based nonwoven materials [10].

Experimental

Apparatus and reagents

A Bruker (Bremen, Germany) MPA FT-NIR spectrometer, equipped with a quartz beamsplitter, an air-cooled NIR source, and an InGaAs detector, using 2-mL standard glass chromatography vials (12×32 mm) as sample cells, was used for transmittance and reflectance NIR measurements; an integrating sphere was used in the latter case.

For measurement control and data acquisition the OPUS program (Version 4.1) from Bruker was used. Spectra treatment and PLS data treatment were carried out using Omnic 2.1 and TQ Analyst (Version 6) software from Nicolet (Madison, WI, USA).

Table 1 Instrumental parameters used for FT-NIR measurements in PLS-NIR determination of hydrocarbons

Acquisition parameters	
Acquisition mode	Double-sided, forward backward
Number of background scans	32
Number of sample scans	32
Resolution (cm^{-1})	8
Scan time (s)	14.935
Result spectrum	Transmittance or reflectance
FT parameters	
Apodization function	Blackman Harris 3-term
End frequency limit for spectra (cm^{-1})	3,500
Start frequency limit for spectra (cm^{-1})	14,000
Phase resolution	64
Phase correction mode	Power spectrum
Stored phase mode	No
Zero filling factor	2

An ultrasonic water bath (Selecta, Barcelona, Spain) was employed for sample extraction.

n-Hexane (96 % v/v) for GC residue analysis and 2,2,4-trimethylpentane (isooctane) for ultra-trace analysis were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain); toluene for analysis was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Carbon tetrachloride (analytical reagent grade) was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). All the aforementioned reagents and solvents were employed for the preparation of samples and standards. All solutions were prepared by weighing the appropriate amounts of standards and solvents.

Chrome shavings, the small pieces of 100-nm fibers of leather shaved off when the thickness of wet chrome-tanned leather is rendered uniform by using a blader cylinder, were obtained from industrial tannery wastes from Mohammedia (Morocco) and used without further treatment.

Sample preparation and FT-NIR measurements

A 0.5-g sample of chrome shavings was immersed in 50 mL water, polluted with known amounts of hydrocarbons, and the mixture was allowed to stand for 10 min at room temperature. The solid waste was then separated and

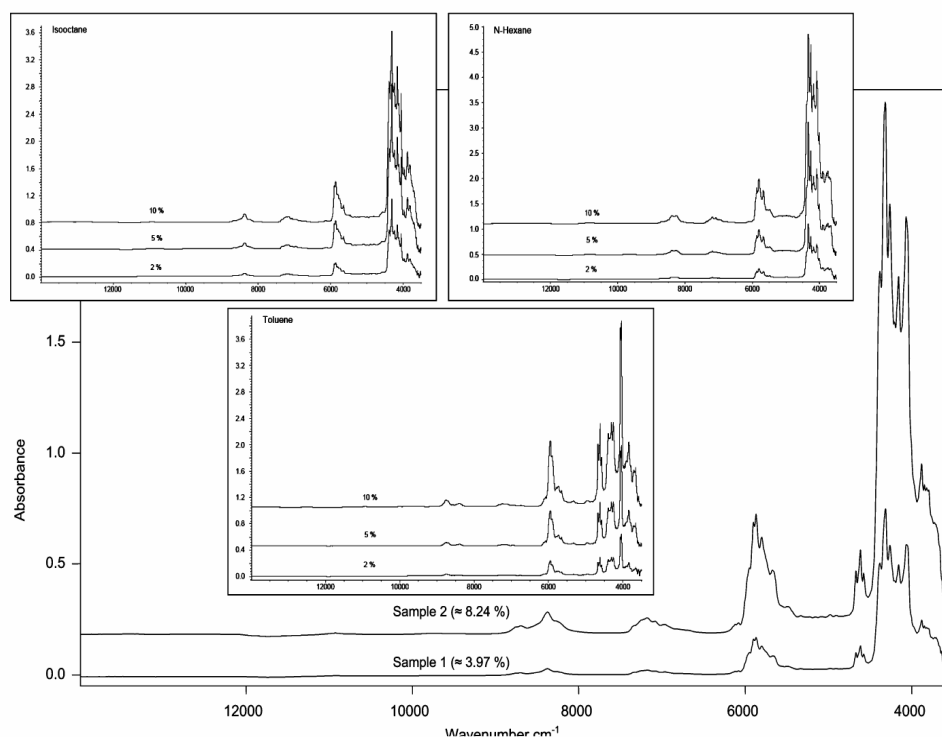


Table 2 Spectral regions considered for PLS-FT-NIR determination of hydrocarbons in transmission mode

Spectral range (cm ⁻¹)	Baseline correction		Compound considered
	Criteria	Wavenumber(s)	
6,283 5,944	One point	6,109	Toluene
4,646 4,001	Two points	4,655 4,590	Toluene
4,397 4,370	Linear removed		<i>n</i> -Hexane and isooctane
4,204 4,111	None		<i>n</i> -Hexane and isooctane
5,712 5,739	Linear removed		<i>n</i> -Hexane

treated with 10 g CCl₄ in an ultrasonic water bath for 30 min using a 50–60 Hz sonication at an HF power of 10 W (42 kHz). After separation of the solids, samples were directly measured by FT-NIR using standard glass chromatography vials of 9.5-mm internal diameter. The transmission and reflectance spectra were obtained with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating 32 scans per spectrum. In the case of transmission measurements, the background was established with the vial filled with pure CCl₄; and for the reflectance measurements the background was established using the closed integrating sphere. Spectral data were processed by using a PLS model established from a series of mixed standard solutions of *n*-hexane, isooctane, and toluene (total amount 4–8 % w/w) in CCl₄ and pure standard solutions (2 % w/w) of each individual hydrocarbon in CCl₄.

Results and discussion

FT-NIR transmission spectra

Figure 1 shows the NIR transmission spectra (over the whole wavenumber range) of 2 mixed standard solutions containing *n*-hexane, isooctane, and toluene at different concentration levels and, in the inset, the spectra corresponding to pure standard solutions of the three compounds under study.

As can be seen, all the hydrocarbons evaluated present well-defined bands between 6,500 cm⁻¹ and 4,000 cm⁻¹, which correspond to overtones of CH vibrations. However, it is clear that for complex extracts containing mixtures of hydrocarbons in CCl₄, specific bands useful for the selective determination of each compound can also be detected. So, in the present study, the possibility of using multivariate calibration, based on partial least-squares (PLS) for data treatment was evaluated.

Calibration conditions in transmission mode

Preliminary studies using the whole spectra evidence the poor predictive capability of the PLS models based on pure standard solutions and, because of that, the use of restricted wavenumber ranges was evaluated. Table 2 summarizes the spectral ranges selected, also indicating the baseline correction criteria, for the determination of each hydrocarbon considered.

From the aforementioned conditions two spectral ranges were selected for toluene modeling, two additional ones for

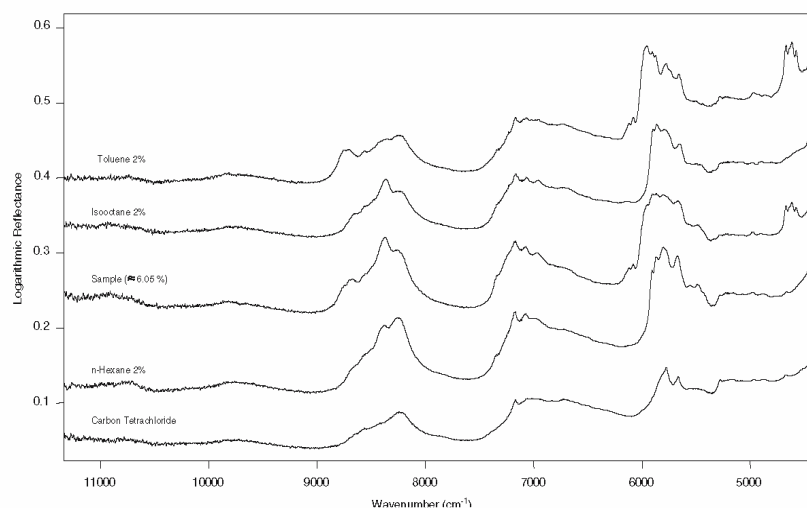


Table 3 Spectral regions considered for PLS-FT-NIR determination of hydrocarbons in the reflectance mode

Spectral range (cm ⁻¹)	Baseline correction		Compound considered
	Criteria	Wavenumber(s)	
6,106 6,061	Two points	6,106 6,061	Toluene
8,516 7,860	Two points	9,075 7,612	<i>n</i> -Hexane and isooctane
5,718 5,598	Linear removed		<i>n</i> -Hexane and isooctane
8,972 8,624	Linear removed		Toluene

isooctane, and three for *n*-hexane. Based on a maximum number of ten calculated factors, PLS models were built for each one of the three compounds studied through the evaluation of the number of factors which provided a maximum explained variance and minimum prediction residual error sum of squares (PRESS). For *n*-hexane two factors provided a correlation coefficient (R^2) of 0.995 and a root mean standard error of calibration (RMSEC) of 0.11 % w/w for the standards employed. In the case of isooctane one factor provided an R^2 value of 0.994 and an RMSEC of 0.13 % w/w; for toluene one factor was enough to obtain an R^2 value of 0.997 and an RMSEC of 0.06 % w/w. So, these results confirm the coherence of the models developed for single compound determination.

FT-NIR reflectance spectra

Figure 2 shows the FT-NIR reflectance spectra of pure CCl₄ together with those of pure solutions of each hydrocarbon studied in CCl₄ and that of a mixture of isooctane, toluene, and *n*-hexane. As can be seen, reflectance spectra provide poorer signals than transmission spectra, as the hydrocarbons signals are affected by signals due to CCl₄. However, four regions between 9,000 cm⁻¹ and 5,000 cm⁻¹ can be identified which could be useful for PLS-FT-NIR analysis of hydrocarbon mixtures leached with CCl₄ (see Table 3).

The differences in spectral range employed for each kind of measurement are due to the noise of the blank measurements and the sensitivity of signals found in the two modes assayed.

Calibration conditions in reflectance mode

Based on the previously reported spectral ranges and on the use of mixed standard solutions of isooctane, toluene, and *n*-hexane in CCl₄ in the concentration range 4–8 % w/w and pure solutions containing 2 % w/w of individual hydrocarbons in CCl₄, the use of PLS models based on the consideration of a maximum number of ten factors was evaluated.

For *n*-hexane one factor is enough to provide an R^2 value of 0.9992 and a RMSEC of 0.05 % w/w. However in the case of isooctane and toluene it was necessary to use five and four factors, respectively. For isooctane an R^2 value of 0.9997 and a RMSEC of 0.03 % w/w were found, whereas for toluene an R^2 value of 0.9998 and a RMSEC of 0.02 % w/w were achieved. So, we can conclude that PLS models based on reflectance measurements are more coherent than those based on the use of transmission mode. However the use of a high number of factors to evaluate the concentration of isooctane and toluene could create some doubts about the robustness of the developed models.

Analysis of hydrocarbon mixtures

Five hydrocarbon mixtures extracted by using chrome shavings and leached with CCl₄ were analyzed by PLS-FT-NIR using both transmission and reflectance modes, and based on the calibration models indicated in previous sections.

From data summarized in Table 4 it can be concluded that transmission measurements provide from 10 to 100 times better precision than reflectance measurements. Additionally, on comparing actual concentrations with those found by NIR it can be observed that accuracy errors found in transmission mode varied from -20 to 0.6 % for toluene, from -1.8 to 12.5 % for isooctane, and from -7 to 0.9 % for *n*-hexane. However, for reflectance measurements accuracy errors varied from 2 to 21 % for toluene, from -4.6 to 14 % for isooctane, and from -20 to -1 % for *n*-hexane, thus evidencing that in spite of the excellent calibration figures of merit obtained in reflectance mode, this kind of measurement seems to be less appropriate for the determination of hydrocarbons than those based on the use of transmission mode.

Table 4 Determination of hydrocarbons by PLS-FT-NIR using transmission and reflectance modes

Sample	Actual concentration (% w/w)			PLS-FT-NIR concentrations found (% w/w)					
	<i>n</i> -Hexane	Isooctane	Toluene	Transmission mode			Reflectance mode		
				<i>n</i> -Hexane	Isooctane	Toluene	<i>n</i> -Hexane	Isooctane	Toluene
1	2.498	2.498	1.670	2.3352±0.0008	2.4521±0.0009	1.6885±0.0019	2.01±0.04	2.200±0.009	1.52±0.03
2	2.554	2.554	1.703	2.4054±0.0017	2.4994±0.0006	1.730±0.011	2.71±0.04	2.922±0.006	2.06±0.03
3	3.182	3.182	2.121	2.9660±0.0012	2.9687±0.0013	2.186±0.002	2.678±0.013	2.84±0.05	1.97±0.04
4	1.704	1.704	1.136	1.7109±0.0005	1.9165±0.0015	0.911±0.002	1.49±0.02	1.63±0.04	1.23±0.04

In fact, the discrepancies in prediction capability observed between transmission and reflectance measurements could be explained in terms of the best sensitivity and the highest number of well-defined bands observed in transmission spectra as compared with reflectance spectra, as can be seen on comparing spectra shown in Figs. 1 and 2.

Analysis of waters polluted by hydrocarbons mixtures

A 100-mL portion of polluted water samples containing hydrocarbons was treated with different amounts of chrome shavings, from 0.1 to 1.5 g, to evaluate the capacity of this tannery solid waste to perform the quantitative removal of hydrocarbons. Results found evidence that the maximum sorption capacity of chrome shavings correspond to 6.30 g of hydrocarbon per g of solid. On the other hand, it was confirmed that the retention process of hydrocarbons from water is quasi-instantaneous due to the big affinity of the hydrophobic compounds for tanned solid wastes.

Acknowledgement Authors acknowledge the financial support of AECI (Agencia Española de Cooperación Internacional), Project 128/04/R/M.

References

1. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF) (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edn. American Public Health Association. Washington, DC, USA
2. Daghbouche Y, Garrigues S, Morales-Rubio A, de la Guardia M (1997) *Anal Chim Acta* 345:161-171
3. Hayakawa K, Yoneda Y, Okamoto Y, Kumamaru T, Ikeda M (1999) *Anal Sci* 15:803-805
4. Stienen G, Woehrmann J, Hees C, Wenzel W, Huebschmann HJ (2000) *LaborPraxis* 24:42-43
5. Liu S, Zhu H, Chen XL, Yuan HF, Lu WZ (2002) *Fenxi Ceshi Xuebao* 21:40-43
6. Reboucas MV, de Barros-Neto B (2001) *JNIRS* 9:263-273
7. Tahiri S, Bouhria M, Albizane A, Messaoudi A, Azzi M, Alami Younsi S, Mabrou J (2004) *J Am Leather Chem As* 99:16-25
8. Gammoum A, Tahiri S, Albizane A, Azzi M, Moros J, Garrigues S, de la Guardia M (2006) *Water Res* (in press)
9. Deschamps G, Caruel H, Borredon ME, Bonnin C, Vignoles C (2003) *Environ Sci Technol* 37:1013-1015
10. Radetic MM, Jovic DM, Jovancic PM, Petrovic ZLj, Thomas HF (2003) *Environ Sci Technol* 37:1008-1012

“Comparison of Two Partial Least Squares
Infrared Spectrometric Methods for the Quality
Control of Pediculosis Lotions”

J. Moros, S. Garrigues y M. de la Guardia

Analytica Chimica Acta 582 (2007) 174-180





Comparison of two partial least squares infrared spectrometric methods for the quality control of pediculosis lotions

J. Moros, S. Garrigues*, M. de la Guardia

Analytical Chemistry Department, University of Valencia, 50 Dr. Moliner Street, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 14 March 2006; received in revised form 24 July 2006; accepted 23 August 2006

Abstract

Two vibrational spectroscopy procedures have been developed and compared for the direct and simultaneous determination of piperonyl butoxide and tetramethrin, the active ingredients of alcoholic capillary lotions, for hair pediculosis diseases. Nine lotions, purchased from the Spanish market, were analyzed using both, attenuated total reflectance (ATR) and transmission FT-IR measurements, and based on the use of partial least squares (PLS) multivariate calibration. A reduced set of 15 matched standards (11 for calibration and 4 for validation) was employed using both measurement modes. The spectral wave number ranges between 1757 and 1712 cm^{-1} was selected to determine tetramethrin by both, transmittance and reflectance measurements. For the analysis of piperonyl butoxide the 1513–1479 cm^{-1} and 1576–1479 cm^{-1} regions were selected for ATR and transmission measurements, respectively. Results found for commercial samples compared well with those obtained by a liquid chromatography reference method that evidenced the applicability of the proposed strategy for the analysis of commercial formulations.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transmission; Attenuated total reflectance; Pediculosis lotions; Piperonyl butoxide; Tetramethrin; Partial least squares calibration

1. Introduction

Pediculosis is a skin inflammation caused by tiny parasitic insects [1]. Lindane has been used for pediculosis treatment but safer alternatives are based on the use of permethrin, pyrethrin or malathion [2]. Modern lice formulations contain pyrethrum extract combined with piperonyl butoxide.

The human health risks of pyrethrins [3–6] together with the effect of piperonyl butoxide as enzyme inhibitor and its possible effect of skin and/or eyes irritation [7] justifies the need for a carefully formulation and control of capillary lotions including tetramethrin and piperonyl butoxide.

There are only few references about the simultaneous determination of tetramethrin and piperonyl butoxide in pharmaceutical or pesticide formulations.

Gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID) was used to determine mixtures of these active ingredients

in pesticides [8] and in shampoos or lotion samples [9] and, in recent years GC with mass spectrometry detection has been used for household products and aerosol spray analysis [10,11].

The use of liquid chromatography (LC) for the determination of mixtures of piperonyl butoxide and tetramethrin was proposed by Jimena-García et al. in 1996 and applied to the analysis of insecticide formulations [12].

The single precedent on the use of direct spectrometric methods for the simultaneous determination of tetramethrin and piperonyl butoxide is that developed by Sharaf-El-Din and El-Brashy [13] in sprays and lotions through UV spectrometry. However, in our knowledge there is no precedent on the use of vibrational spectroscopy to solve this problem.

So, the main purpose of this study has been the development of fast, accurate and sensitive vibrational methods for the simultaneous determination of piperonyl butoxide and tetramethrin in pediculosis lotion samples for manufacturing quality control of this type of products. Additionally, to avoid the need of the use of a high number of analyzed samples to create calibration models it was assayed in this study the use of a reduced set of external standards.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Bruker FTIR spectrometer model Tensor 27 controlled by OPUS 4.2 for Windows software (Bremen, Germany) and equipped with a Specacamp IN-Compartment Contact Sampler horizontal ATR from Graseby-Specac (Orpington, UK) with a 45° ZnSe crystal through top-plate, with six internal reflections, was employed for spectra acquisition in attenuated total reflectance mode. Moreover, a micro-flow cell from Graseby-Specac (Orpington, UK) with ZnSe and CaF₂ windows and a path length of 0.11 mm was used for transmission measurements. For the introduction of samples and standards in the flow cell a Gilson Minipuls peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) with solvent resistant viton tubes of 3 mm o.d. and 1 mm i.d. was used. The connection between cell and peristaltic pump was made using PTFE tube (1.6/0.8 mm o.d./i.d.).

For instrumental and measurement control and data acquisition it was employed the OPUS program (version 4.1) from Bruker. Spectra treatment and data manipulation were carried out using Omnic 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA). PLS calibration models were obtained by using TurboQuant Analyst 6.0 software developed by Thermo Nicolet Corp.

A Hewlett-Packard HPLC Series 1050 High Performance Liquid Chromatograph with a variable wavelength UV–vis detector and equipped with a reversed phase Kromasil C-18 column (250 mm × 25 mm i.d. and 4 μm particle diameter) was employed for the reference procedure.

Piperonyl butoxide and tetramethrin, standard grade were purchased from Laboratorios Belloch, S.A. (Valencia, Spain). Isopropyl alcohol and ethyl alcohol employed for the preparation of matched standards were also supplied by Laboratorios Belloch, S.A. (Valencia, Spain). Millipore Q-purified water (Bedford, MA, USA) and analytical grade acetonitrile, provided by Scharlau (Barcelona, Spain), were employed in the chromatography analysis.

Commercial lotions were obtained directly from the Spanish market.

Room and sample compartment temperatures were monitored using a mercury thermometer with a precision of ±0.5 °C. Both temperatures did not differ significantly and were 26 ± 1 °C during spectra acquisition of all samples and standards.

2.2. Reference procedure

Eighty milligrams of sample were accurately weighed inside a 10 mL volumetric flask and diluted to the volume with acetonitrile. Twenty microlitres of this solution, previously passed through a 0.45 μm nylon filter, were directly injected in a 92:8 (v/v) acetonitrile:water mobile phase using a 1.0 mL min⁻¹ carrier flow. Both active ingredients were determined in the isocratic mode by absorbance measurements at 230 nm. Peak area values at retention times of 5.5 min (piperonyl butoxide) and 4.9–5.1 min (corresponding to the both tetramethrin isomers) of the chromatograms obtained for samples were interpolated in external calibration lines established from five standard solutions of piperonyl butoxide and tetramethrin in acetonitrile at concentration ranges from 24.6 to 147.4 mg L⁻¹ and from 7.2 to 57.5 mg L⁻¹, respectively.

2.3. Vibrational methodologies

2.3.1. Attenuated total reflectance (ATR) procedure

Samples were directly poured into the ATR cell and the FTIR spectra were scanned in absorbance mode from 4000 to 700 cm⁻¹ by averaging 25 scans per spectrum using a nominal resolution of 4 cm⁻¹ (data spacing of 1.93 cm⁻¹) with a mirror velocity of 0.6329 cm s⁻¹ and employing a background for the empty ATR plate cell measured at the same instrumental conditions.

The PLS model was built from 11 external standards and validated using additional four standards. All these standards were prepared containing water, ethyl alcohol, isopropyl alcohol, piperonyl butoxide and tetramethrin covering an appropriate wide % (w/w) concentration level, to provide similar characteristics than samples, as detailed in Table 1.

2.3.2. Transmission procedure

For this method, samples were directly introduced into the micro-flow cell by using a peristaltic pump. Spectra were obtained in the stopped-flow mode at 4 cm⁻¹ nominal resolution and accumulating 25 scans per spectra from 4000 to 850 cm⁻¹ using a background of the instrument without the micro-flow cell, in order to avoid the interference bands due to the cell band pass.

The PLS model was built as described above from standard mixtures measured at the same conditions than samples.

Table 1

Composition range of the external sets of matched standards used for calibration and validation and concentration levels of piperonyl butoxide and tetramethrin in the samples analyzed

Set	Number of matched standards or samples	Range of concentrations				
		Water (% w/w)	Ethyl alcohol (% w/w)	Isopropyl alcohol (% w/w)	Piperonyl butoxide (% w/w)	Tetramethrin (% w/w)
Calibration	11	16.88–41.26	53.85–73.83	0.88–6.86	0.21–1.24	0.07–0.26

2.3.3. Data analysis

Several spectral windows were tested in order to evaluate the prediction capabilities of the corresponding PLS models for the validation set but only most significant results will be summarized in this paper.

In order to validate the two vibrational methodologies, different quality indicators were given. Among them, it was considered: (i) the mean difference (d_{x-y}) between vibrational-PLS predicted values and reference data; (ii) the standard deviation of mean differences (s_{x-y}); (iii) the quality coefficient (QC); and (iv) the pooled standard deviation for validation samples (s_{trip}). As stated by Massart et al. the QC is to be preferred over correlation coefficient “not only because it gives a better idea of the spread of the data points around the fitted straight line but also because it gives some indication on the percentage error to be expected for the estimated concentration”. QC was calculated as the mean-square-sum of the relative prediction error of each validation sample (predicted minus actual concentration) divided

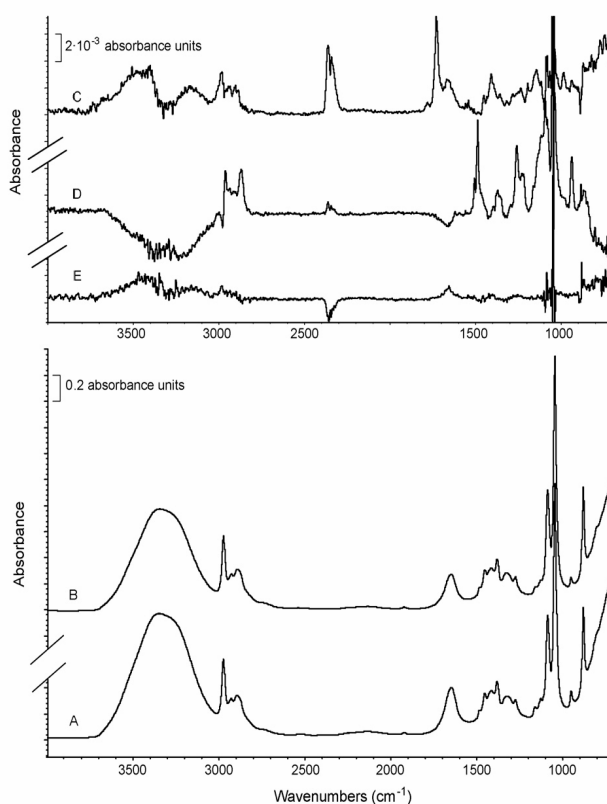
by the actual concentration [14]. Several figures of model's fit to the data and predictive power such as root mean square error of calibration (RMSEC), root mean square error of cross-validation (RMSECV), and root mean square error of prediction (RMSEP) were also used [15].

3. Results and discussion

3.1. ATR and transmission spectra

Fig. 1 shows typical ATR spectra of a Pediculosis lotion and a synthetic standard containing ethyl alcohol, water, isopropyl alcohol, piperonyl butoxide and tetramethrin. As it can be seen well defined and intense bands in the wave number range between 1120 and 860 cm^{-1} and at 2974 cm^{-1} are shown.

On the other hand, typical transmission spectra of a matched standard and a Pediculosis lotion are shown in Fig. 2. It can be appreciated that, for this measurement mode, absorbance



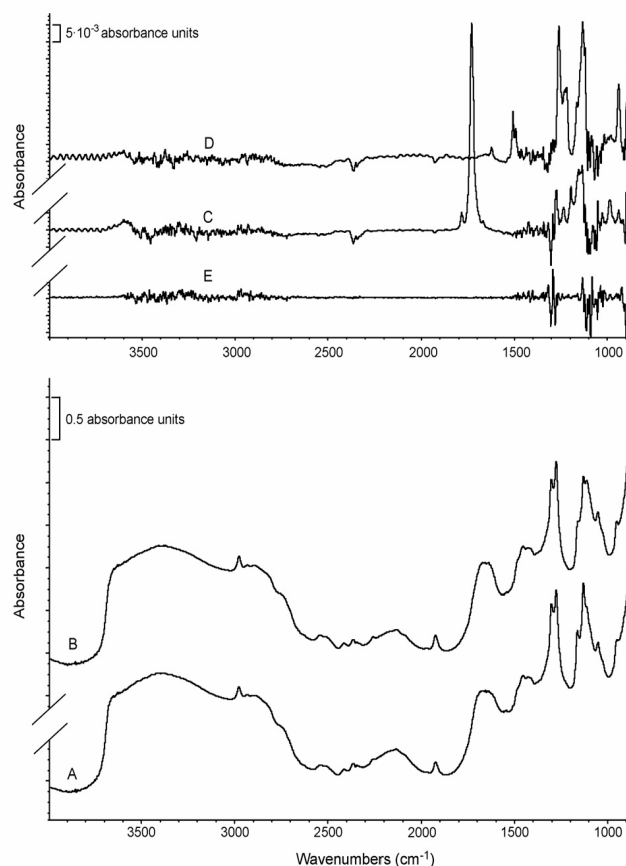


Fig. 2. Transmission-FTIR spectra of capillary lotion components: (A) a matched standard, (B) a capillary lotion sample, both collected in the stopped-flow mode using 4 cm^{-1} nominal resolution and 25 accumulated scans per spectrum from 4000 to 850 cm^{-1} with a background obtained without cell, (C) spectrum of a 0.2% (*w/w*) tetramethrin, (D) that of a 0.8% piperonyl butoxide, both solutions prepared in ethanol and measured in front of a and (E) blank of ethanol, using the same instrumental conditions. *Note:* Spectra were shift on the y-axis to clearly show their bands.

values are higher than those obtained in ATR mode. Several well defined and intense bands at 2976 , 1924 cm^{-1} , and at the wave number range compressed between 1350 and 1000 cm^{-1} can be appreciated. In both cases, broad bands at 3345 , 2893 and at 1650 cm^{-1} are present as well due to the contribution of alcohols and water. Moreover some bands with a low intensity exist.

In fact, for both measurement modes, spectra of standards and the samples are close similar, thus indicating those bands found correspond to all the components employed in the preparation of matched standards.

It is clear that, the IR bands present in both kinds of spec-

related to the active ingredients considered in the study, piperonyl butoxide and tetramethrin.

Spectra of pure solutions of both active principles in ethanol (see Figs. 1 and 2) obtained at the concentration level at which these products are present in commercially available lotions, evidence the poor signals from which concentration data must be obtained and indicate the reduced possibilities of the use of univariate calibration models to do this kind of analysis in spite of the presence of a fingerprint information provided in the spectral range from 1700 to 1200 cm^{-1} .

3.2. Determination of piperonyl butoxide

Table 2
Prediction capabilities of PLS-FTIR for both measurement modes for the determination of piperonyl butoxide

	Measurement mode	
	Attenuated total reflectance	Transmission
Spectral region (cm ⁻¹)	1513–1479	1576–1479
Baseline criteria	None	Linear removed
Factors	6	4
r	0.998	0.990
RMSEC (% w/w)	0.019	0.04
RMSECV (% w/w)	0.06	0.10
RMSEP (% w/w)	0.03	0.03
RRMSEP (%)	5	3
d _{x-y} (% w/w)	0.016	0.006
s _{x-y} (% w/w)	0.03	0.03
s _{trip} (% w/w)	0.018	0.02
QC (%)	6	3

Note: Factors were selected looking for the best prediction capabilities of the model for the validation set. r is the multiple correlation coefficient for calibration. RMSEC is the root mean square error of calibration; RMSECV is the root mean square error of cross-validation, RMSEP is the root mean square error of prediction and RRMSEP is the RMSEP divided by the mean value of piperonyl butoxide concentration in the validation dataset described in Table 1. s_{x-y} is the standard deviation of three replicates. d_{x-y} and s_{x-y} are the mean difference and the standard deviation of mean differences between predicted vs. actual piperonyl butoxide concentration (% w/w), respectively. QC is the quality coefficient.

The obtained models were compared in terms of RMSECV and RMSEP values for both, attenuated total reflectance and transmission measurement modes. However, only most significant results are shown in this paper.

Table 2 summarizes the prediction capabilities of the best PLS models built for piperonyl butoxide. Mean centering spectra data pre-treatment was employed to eliminate common spectral information in both cases.

In order to obtain the best number of latent variables for each measurement mode, the leave one out cross-validation procedure was used through the predicted residual error sum of squares (PRESS).

Table 3
Prediction capabilities of PLS-FTIR for both measurement modes for the determination of tetramethrin

	Measurement mode	
	Attenuated total reflectance	Transmission
Spectral region (cm ⁻¹)	1757–1712	1757–1712
Baseline criteria	Linear removed	Linear removed
Factors	6	6
r	0.993	0.994
RMSEC (% w/w)	0.007	0.007
RMSECV (% w/w)	0.02	0.02
RMSEP (% w/w)	0.02	0.011
RRMSEP%	13	7
d _{x-y} (% w/w)	-0.015	0.009
s _{x-y} (% w/w)	0.015	0.007

Table 4
Prediction capabilities of PLS-FTIR for both measurement modes for the determination of piperonyl butoxide and tetramethrin in commercial pediculosis lotions using the calibration models indicated in Tables 2 and 3

	Tetramethrin			Piperonyl butoxide		
	HPLC-UV %, w/w ± s ^a	ATR %, w/w ± s ^a	Transmission %, w/w ± s ^a	HPLC %, w/w ± s ^a	ATR %, w/w ± s ^a	Transmission %, w/w ± s ^a
Accuracy ^b	1.5	1.5	4	0.7	0.7	2
RMSEC (% w/w)	0.1999 ± 0.0004	0.203 ± 0.004	0.208 ± 0.007	0.846 ± 0.003	0.852 ± 0.017	0.864 ± 0.018
RMSECV (% w/w)	0.1796 ± 0.0006	0.156 ± 0.006	0.1757 ± 0.0012	0.823 ± 0.004	0.831 ± 0.015	0.826 ± 0.014
RMSEP (% w/w)	0.1844 ± 0.0003	0.162 ± 0.004	0.184 ± 0.005	0.818 ± 0.002	0.797 ± 0.010	0.809 ± 0.019
RRMSEP	0.193 ± 0.003	0.194 ± 0.010	0.185 ± 0.006	0.855 ± 0.014	0.834 ± 0.014	0.826 ± 0.016
d _{x-y} (% w/w)	0.2036 ± 0.0017	0.2188 ± 0.0012	0.205 ± 0.002	0.853 ± 0.007	0.832 ± 0.012	0.83 ± 0.03
s _{x-y} (% w/w)	0.1924 ± 0.0003	0.195 ± 0.006	0.1952 ± 0.0018	0.839 ± 0.002	0.834 ± 0.013	0.85 ± 0.02
s _{trip} (% w/w)	0.1861 ± 0.0011	0.175 ± 0.003	0.180 ± 0.008	0.835 ± 0.005	0.818 ± 0.014	0.833 ± 0.013
QC (%)	0.1850 ± 0.0003	0.197 ± 0.007	0.178 ± 0.005	0.8199 ± 0.0014	0.856 ± 0.012	0.833 ± 0.012
Accuracy ^b	4	4	1.6	1.8	1.8	1.1
RMSEC (% w/w)	0.1706 ± 0.0004	0.178 ± 0.005	0.173 ± 0.003	0.772 ± 0.002	0.771 ± 0.002	0.78 ± 0.03
RRMSEP	5.8	5.8	2.4	1.8	1.8	1.5

Accuracy values are the average of two independent analysis (for HPLC) and a single analysis (vibrational procedures) measured in triplicate ± the corresponding standard deviation. RMSEC is calculated as (vibrational) - [HPLC-UV] × 100/[HPLC-UV], where [vibrational] and [HPLC-UV] belong to the concentrations found using the corresponding vibrational procedure and the HPLC-UV, respectively.

PLS analysis of the 11 synthetic standard solutions used for calibration indicate that the spectral range compressed between 1576 and 1479 cm^{-1} or the corresponding subset region between 1513 and 1479 cm^{-1} were the best suited for determining the piperonyl butoxide content by using transmission or ATR measurements, respectively. Cross-validation indicate that four and six-factor PLS calibration models were appropriate for these determinations, providing correlation coefficients of $r=0.990$ and 0.998 for transmission and ATR measurement mode, respectively.

Taking into consideration that for transmission measurement the background was obtained without the micro-flow cell for the spectra data treatment “linear removed” baseline criterion was employed. When this correction criterion is selected, the software calculates a linear least squares fit over the specified analysis region. Then it subtracts the value of this line at each data point. This approach assumes that there is an implicit linear baseline beneath each spectral region.

On the other hand, for the validation set of four standards, the mean difference (d_{x-y}) of the piperonyl butoxide concentration was higher for ATR than for transmission measurements, probably due to the high sensitivity of the last one, and the standard deviation of mean differences (s_{x-y}) were of the same order in both cases.

The repeatability of the determination, established from the mean standard deviation of each triplicate of the standards from the validation set was approximately the same for both measurement modes, about 0.02% (w/w). Nevertheless, the Quality Coefficient (QC), an estimator for the error of a new result, is better for transmission measurements, than for ATR data.

3.3. Determination of tetramethrin

A similar procedure than that used for piperonyl butoxide determination in lotions was made for building a calibration-prediction model for tetramethrin. Table 3 shows the prediction capabilities obtained for this analyte using both measurement modes assayed. In this case, the same spectral region was used for both techniques. Moreover, as it can be seen, the same number of factors was extracted and the same baseline correction criterion was applied.

PLS analysis of the synthetic standard solutions indicated that the 1757–1712 cm^{-1} region was the best for tetramethrin determination. Six-factor were appropriate, providing correlation coefficients of $r=0.994$ and 0.993 for transmission and ATR modes, respectively.

The mean difference (d_{x-y}) and the standard deviation of mean differences (s_{x-y}) of the tetramethrin concentration in the validation set were higher for ATR than for transmission measurements.

For tetramethrin, the repeatability of the determination was approximately the same for both measurement modes (around 0.006%, w/w). The QC parameter exhibits higher values than for piperonyl butoxide.

3.4. Analysis of commercial lotions

In order to check the accuracy and the precision of the PLS models built, nine commercial lotions containing piperonyl butoxide and tetramethrin were analyzed by both procedures. Results obtained by vibrational analysis have been compared with those found by HPLC (reference data). Table 4 summarizes the results obtained and as it can be seen, both measurement modes evaluated in this study provide accurate results for piperonyl butoxide determination in commercial samples with relative errors lower than 4%. Moreover, a similar mean accuracy error of 1.5% and 1.8% were obtained for transmission and reflectance measurements, respectively, as compared with data found by HPLC.

On the other hand, it can be appreciate that for tetramethrin, transmission measurements provided more accurate results than reflectance ones. Mean accuracy errors of 2.4% and 5.8% for transmission and reflectance measurements, respectively, were found in good agreement with the values obtained for the QC parameter.

3.5. Use of lotions samples for validation of calibration models

In order to evaluate the selected strategy to build and validate the calibration models it was assayed the use of the 9 authentic

Table 5
Prediction capabilities of PLS-FTIR models using 11 or 15 matched calibration standards and 9 authentic lotions for validation in the analysis of piperonyl butoxide

	11 matched standards (measurement mode)		15 matched standards (measurement mode)	
	Attenuated total reflectance	Transmission	Attenuated total reflectance	Transmission
Spectral region (cm^{-1})	1513–1479	1576–1479	1513–1479	1576–1479
Baseline criteria	None	Linear removed	None	Linear removed
Factors	6	4	6	4
r	0.996	0.99	0.996	0.99
RMSEC (% w/w)	0.027	0.044	0.025	0.040
RMSECV (% w/w)	0.08	0.10	0.05	0.08
RMSEP (% w/w)	0.018	0.02	0.019	0.023
RRMSEP (%)	2.1	2.8	2.3	2.8
d_{x-y} (% w/w)	0.004	−0.002	−0.007	−0.0018

Table 6
Prediction capabilities of PLS-FTIR models using 11 or 15 matched calibration standards and 9 authentic lotions for validation in the analysis of tetramethrin

	11 matched standards (measurement mode)		15 matched standards (measurement mode)	
	Attenuated total reflectance	Transmission	Attenuated total reflectance	Transmission
Spectral region (cm ⁻¹)	1757–1712	1757–1712	1757–1712	1757–1712
Baseline criteria	Linear removed	Linear removed	Linear removed	Linear removed
Factors	4	6	5	5
<i>r</i>	0.99	0.994	0.99	0.99
RMSEC (% w/w)	0.0089	0.0065	0.0098	0.0082
RMSECV (% w/w)	0.030	0.023	0.017	0.015
RMSEP (% w/w)	0.011	0.007	0.011	0.009
RRMSEP (%)	6.0	3.5	6.1	4.6
<i>d</i> _{x→y} (% w/w)	-0.0008	-0.0010	0.005	-0.005
<i>s</i> _{x→y} (% w/w)	0.011	0.007	0.010	0.007
<i>s</i> _{trip} (% w/w)	0.006	0.005	0.008	0.004
QC (%)	9.2	4.8	8.3	7.2

lotions as validation set for using 11 or 11 + 4 matched standards to calibrate.

Tables 5 and 6 summarize for piperonyl butoxide and tetramethrin, respectively, the prediction capabilities of the two aforementioned strategies. As it can be seen in Table 6, using the selected wave number ranges, it can be obtained in all cases for piperonyl butoxide a clear enhancements as compared with the use of four matched standard as validation set and considering the same number of factors. However, for tetramethrin determination the use of authentic lotions for validation affects the number of factors which is reduced in all the cases except for transmittance measurements mode using 11 standards and, additionally a clear improvement of the prediction capability was found in all the cases, thus evidencing that the proposed methodology, based on the use of matched standards to built the calibration model, is very appropriate for the analysis of lotion samples.

4. Conclusions

In spite of the low vibrational signals found for piperonyl butoxide and tetramethrin in commercial formulations of Pediculosis lotions, it can be concluded that, based on the use of PLS models established from a reduced number of matched standards, good prediction capabilities were found on using both, ATR and transmission signals.

On comparing the two assayed methodologies, it is clear that transmission measurements are the best choice probably due to the sensitivity provided by the use of a pathlength of 0.11 mm as compared with the ATR measurements.

On the other hand, the good comparability between data found by PLS-IR spectroscopy and liquid chromatography evidence the accuracy of the proposed method and its suitability as fast and environmentally friendly alternative to the reference procedure because IR measurements could be made directly on untreated samples with the use of neither additional solvents nor

reduced number of external matched standards used for calibration in this study opens exciting possibilities for the use of PLS models in laboratories which do not carry out a type of analysis systematically and thus can not have a lot of well characterized samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Universitat de València (Project UV-AE-20050203), Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (Project ACOM6-161) and Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604/BQU, Feder).

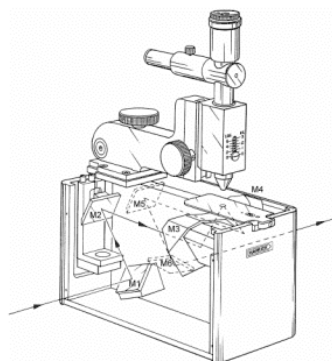
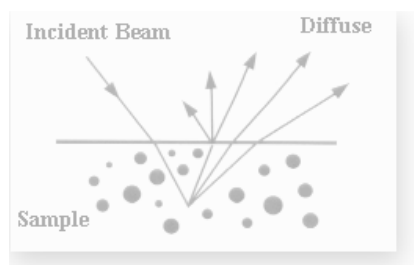
References

- [1] http://www.headliceinfo.com/book_sample.htm.
- [2] R.J. Roberts, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1645.
- [3] K.N. Jones, C. Joseph, *Clin. Infect. Dis.* 36 (2003) 1355.
- [4] P.M. Wax, R.S. Hoffman, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 32 (1994) 457.
- [5] S.L. Wagner, *West J. Med.* 173 (2000) 86.
- [6] US Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2003, Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids, Atlanta.
- [7] National Pesticide Information Center (NPIC), General Fact Sheet for Piperonyl Butoxide, National Pesticide Telecommunications Network (NPTN), Oregon, 2000.
- [8] S. Lorusso, A. Di-Muccio, M. Boccacci-Mariani, G. Notarangelo, *Rass. Chim.* 35 (1983) 117.
- [9] A. Richard, G. Andermann, *J. Chromatogr. Sci.* 22 (1984) 207.
- [10] A. Utunomiya, K. Hasegawa, Y. Mori, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 43 (1997) 366.
- [11] M. Barbe-Le-Borgne, A. Coursimault, C. Droguet, *Analisis* 24 (1996) 93.
- [12] J.A. Jimena-Garcia, J. Gimenez-Plaza, J.M. Cano-Pavon, *Anal. Chim. Acta* 321 (1996) 273.
- [13] M. Sharaf-El-Din, A. El-Brashy, *Spectrosc. Lett.* 23 (1990) 899.
- [14] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (Parts A and B)*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997.
- [15] J. Moros, F.A. Liñón, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 538

“Comparison of Two Vibrational Procedures for the Direct Determination of Mancozeb in Agrochemicals”

Javier Moros, Sergio Armenta,
Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

Talanta 72 (2007) 72 - 79





Comparison of two vibrational procedures for the direct determination of mancozeb in agrochemicals

Javier Moros, Sergio Armenta, Salvador Garrigues*, Miguel de la Guardia

Department of Analytical Chemistry, Universitat de València, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 17 April 2006; received in revised form 20 September 2006; accepted 27 September 2006

Abstract

The direct determination of mancozeb in agrochemicals has been made by diamond attenuated total reflectance (ATR) Fourier transform infrared spectroscopy in the middle range (DATR-MIR) and diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy in the near range (DR-NIR) methods using in both cases a previous identification of the samples using a dendrographic classification and an appropriate partial least squares (PLS) calibration established from a set of nine external standards and optimized for each type of sample. It was analyzed a heterogeneous population of 11 samples obtained from the Spanish market, containing different co-formulated products, such as fosetyl-Al, copper oxychloride, metalaxyl or cymoxanil. High performance liquid chromatography (HPLC) was used as reference method for validation of both vibrational strategies. The close agreement between values found for both, DATR-MIR and DR-NIR methods, and reference HPLC values indicates the accuracy and reliability of the proposed techniques for the direct determination of mancozeb in commercially available formulations.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mancozeb; Mid infrared; Near infrared; Attenuated total reflectance; Diffuse reflectance; Non-linear; Partial least squares; Pesticide formulations

1. Introduction

The agrochemical sector is the world's major industry area, over 50 percent of the world's population being dependent upon agriculture for its livelihood. It has been evidenced by data reported in 2000 and 2001 that the world pesticide expenditures totalize more than 32.5 billion dollars per year and that the amount used of these products exceeded 5.0 billion pounds per year [1].

The registration and sale of a pesticide formulation implies a number of different controls among which its evaluation, safety and composition are the most important aspects [2].

Mancozeb, a mixture of [[1,2-ethilenbis(dithiocarbamate)](2-)] of manganese and zinc is one of the most used pesticides around the world because of its effect against a wide spectrum of fungal diseases, including potato blight, leaf spot, scab (on apples and pears) and rust (on roses) and due to its low oral lethal dose LD₅₀ (greater than 5000 mg/kg to greater than 11,200 mg/kg in rats) [3].

Mancozeb is practically insoluble in common organic and inorganic solvents and indirect methods for its determination include spectrophotometric [4], gas chromatography (GC) [5], headspace solid phase micro-extraction GC [6] or reversed phase ion-pair chromatography [7] determination of the reaction products liberated after reduction, in an acidic medium, to carbon disulfide.

Other methods employed for the determination of ethylenbis(dithiocarbamates) rely on the measurement of the metallic portion of these compounds, and therefore, many of these methods are similar to those used for determination of inorganic manganese or zinc [8].

Liquid chromatography has been employed after transformation of dithiocarbamates onto water-soluble sodium salts, methylation and ultraviolet detection at 272 nm [9] to determine and distinguish thiocarbamates and dithiocarbamates.

Mancozeb has been also determined in solid pesticide formulations by Fourier transform infrared, FTIR spectrometry based on the use of the ratio between the absorbance of a characteristic band of mancozeb and that of an internal standard measured in the FTIR spectra obtained from KBr pellets [10]. However, we must recognize that this procedure is tedious and time consuming. Recently, our research group has been proposed

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.
E-mail address: salvadorgarrigues@uv.es (S. Garrigues).

a simple procedure for mancozeb determination in agrochemicals based on the use of photoacoustic Fourier transform infrared spectroscopy (PAS-FTIR) measurements [11], but this method requires the employ of a special detector.

Nowadays, there is an ongoing interest in the development of fast and non-destructive techniques with no sample preparation or manipulation, which can be useful for the quality control of manufactured products or raw materials. In this sense, it is clear that vibrational spectroscopy-based techniques with a chemometric treatment of the data provide valuable tools to solve this problem in other industrial areas [12,13].

Attenuated total reflectance (ATR) accessories are especially useful for obtaining IR spectra of difficult samples that cannot be readily examined by the normal transmission mode. They are suitable for studying thick or highly absorbing solid and liquid materials, including films, coatings, powders, threads, adhesives, polymers and aqueous samples. ATR requires little or no sample preparation for most samples and is one of the most versatile sampling techniques [14].

On the other hand, taking into account that most of formulated pesticides are in solid form, diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy in the near range (DR-NIR) is a technique which can be considered highly useful, since it was developed to facilitate analysis with minimal sample preparation and without physical alteration from a wide variety of samples.

In spite of the aforementioned considerations, in our knowledge, only one work related to the quality control of metronidazole based on near infrared reflectance has been previously published [15].

The aim of this paper is to develop, evaluate and compare aforementioned two vibrational sampling techniques (ATR-MIR using a diamond accessory and DR-NIR) in terms of precision, accuracy, sensitivity, sampling frequency and reagents consume for its use in the quality control of a variety of solid commercial pesticide formulations containing mancozeb.

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Bruker model Multipurpose Analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer controlled by OPUS[®] for Windows[®] software from Bruker GmbH (Bremen, Germany) and equipped with a single detector onto which the radiation is focused by means of an integrating sphere, used as measurement accessory, was employed for NIR spectra acquisition.

For ATR spectra acquisition it was employed a DuraSamplIR with a three-reflection diamond/KRS-5 composite DiComp[™] DuraDisk[™], which was installed on a Bruker FTIR spectrometer model Tensor 27 equipped with a KBr beamsplitter and a DLATGS detector.

For instrumental and measurement control and data acquisition it was employed the OPUS program (Version 4.1) from Bruker. Spectra treatment and data manipulation were carried

A Dionex P680 High Performance Liquid Chromatograph (Sunny Vale, CA, USA), with an UVD 170U variable wavelength UV–vis detector and equipped with a C-18 reversed phase (Kromasil) column (250 mm × 4.6 mm i.d. and 5 μm particle diameter), was employed for the determination of mancozeb in the reference methodology.

Mancozeb standard (88.1%, w/w) was supplied by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and acetonitrile, chloroform, hexane and sodium hydroxide (all of them analytical reagent grade), and also methanol (HPLC gradient grade), were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). EDTA disodium salt 2-hydrate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain) and tetrabutylammonium hydrogen sulfate, methyl iodide and 1, 2-propanediol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Kaolin was purchased from Afrasa S.A. (Valencia, Spain) and commercially available mancozeb samples were obtained directly from the Spanish market.

Samples evaluated could be classified in four groups corresponding to: (i) group 1 integrated by samples which contain mancozeb and copper oxychloride, (ii) group 2 of samples formulated with fosetyl-Al, (iii) group 3 corresponding to formulations of mancozeb and metalaxyl and (iv) group 4 of samples that contain mancozeb and cymoxanil.

2.2. Reference procedure

A high performance liquid chromatography (HPLC) method based on the work of Gustafsson and Thompson [16] was used as reference procedure for mancozeb determination based on a previous methylation process. Lo et al. [9] also used this methodology to determine and distinguish different dithiocarbamates such as propineb, thiram and mancozeb, maneb and zineb.

A 10–20 mg of sample were weighted inside a 100 ml beaker and 50 ml of 0.25 M EDTA in 0.45 M sodium hydroxide solution (pH 9.5–9.6) were added and stirred during 10 min. The EDTA extract was filtered through a Whatman 42 (Brentford, Middlesex, UK), 2.5 μm pore size cellulose filter paper. The extraction beaker and the filter were rinsed with 20 ml water. The pH of the solution was adjusted to 6.5–8.5 by addition of 8 ml of HCl 2 M and 5 ml of aqueous tetrabutylammonium hydrogen sulfate solution 0.4 M. The mixture was shaken in a separatory funnel for 5 min with 30 ml of methyl iodide 0.05 M in chloroform:hexane 3:1. The organic phase was collected and the aqueous phase was rinsed with 10 ml of methyl iodide solution. Both organic phases were combined and concentrated by rotary evaporation at 30 °C after the addition of 5 ml of 1,2-propanediol 20% (v/v) in chloroform. The residue was transferred to a 10 ml volumetric flask and diluted to the volume with methanol. After manual stirring 0.5 g of the solution were diluted to 10 g with methanol and 20 μl of this solution were directly injected in a 50:50 acetonitrile:water mobile phase of 1 ml min⁻¹ carrier flow and mancozeb determined, in the isocratic mode, by absorbance measurements at 272 nm. Area values of the chromatogram peaks obtained at 9.3 min for samples were interpolated in an external

Additionally, samples of group 2, that contains fosetyl-AI, were previously mixed with 50 ml slightly hot water (60 °C) to solve fosetyl-AI and to avoid its interference in the determination of mancozeb. After that, the slurry was centrifuged during 3 min at 3000 rpm and the procedure continued by the aforementioned way.

Samples of group 1 cannot be analyzed by using the selected methodology due to the copper oxychloride interferences. So, values provided by the manufacturer were taken as reference for data evaluation.

2.3. Diamond attenuated total reflectance (DATR-MIR) procedure

Powdered samples or standards were placed onto the DATR accessory and an integrated torque press was used to apply a constant force of 25 lbs. Spectra were recorded between 4000 and 600 cm⁻¹, using a nominal resolution of 4 cm⁻¹, accumulating 32 scans per spectrum with a mirror velocity of 10 KHz (26 s per spectrum).

Unknown samples are firstly identified and classified from DATR spectra using an hierarchical cluster and later the analyte is quantified by using a calibration model developed for this kind of sample.

Although, it is commonly accepted that to make an useful PLS trial calibration a minimum of one hundred samples is required [17], a simplest approach, that uses external standards as calibration set in the PLS model, has been developed to determine mancozeb in different commercial samples.

PLS models were built using nine external standards covering a concentration range from 5.43 to 83.59% (w/w) as calibration set. These standards were prepared by mixing, in an agate mortar, different amounts of mancozeb and kaolin and the wavenumber range, baseline correction and number of factors, were selected as a function of the type of sample. An heterogeneous population of 11 different samples, containing different co-formulated products, has been used as validation set.

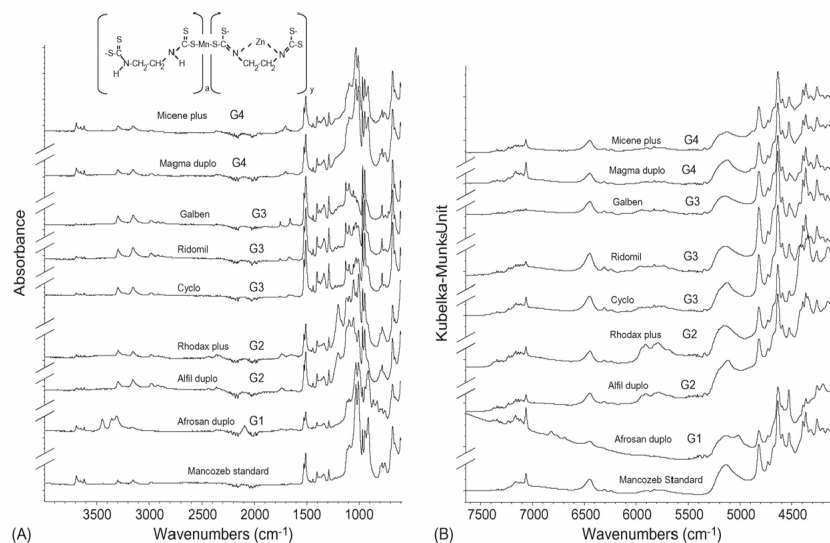
In order to minimize the cross-contamination the DATR crystal surface was cleaned between samples using soft paper slightly wetted with acetone.

2.4. Diffuse reflectance (DR-NIR) procedure

Powdered samples were placed in 2 ml standard glass chromatographic vials (12 mm × 32 mm) of 9.5 mm internal diameter used as measurement cell. The spectra were collected in Kubelka–Munk mode with a nominal resolution of 8 cm⁻¹, accumulating 36 scans per spectrum (17 s data acquisition). The closed integrating sphere was used to collect the corresponding background at the same instrumental conditions than samples.

Sample type was identified based on the use dendrographic spectra treatment and from this information, the appropriate PLS calibration model was selected for mancozeb determination in each unknown sample.

PLS models were built using the nine aforementioned external standards and choosing, for each group of sample types, the appropriate wavelength range and number of factors.



3. Results and discussion

3.1. DATR-MIR and DR-NIR spectra of mancozeb

Fig. 1 shows DATR-MIR (A) and DR-NIR (B) spectra of a mancozeb standard in kaolin and different commercial samples of agrochemicals containing mancozeb. It can be appreciated that for both spectral regions, MIR and NIR, the main absorption bands corresponding to mancozeb are present in samples and standards, and additionally than these, characteristic bands of the other active constituents contained in formulations, such as copper oxychloride, fosetyl-Al, metalaxyl or cymoxanil are also evidenced.

For MIR spectra, bands located at 1528 and 1512 cm^{-1} are due to the amide II band in CSNH structures and seem to be free from matrix interferences and thus could be useful for mancozeb determination in pesticide formulations. Other less intense bands located at 1402, 1335, 1287, 1039 and 968 cm^{-1} can be associated to CNH stretching-bending, CNH stretch-open, C=S and CNC stretching and NCS deformation, respectively [18].

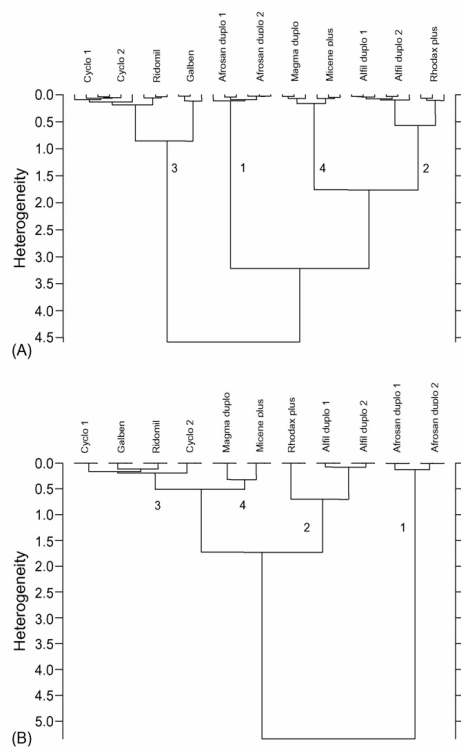


Fig. 2. Dendrographic classification of 11 agrochemical samples containing mancozeb using the Euclidean distance based on their DATR-MIR spectra (A) and DR-NIR spectra (B).

capabilities of linear PLS-DATR-MIR for mancozeb determination in commercial pesticide formulations

wavenumber conditions	Figures of merit		ATR corrected spectra								
	PLS factors extracted		Raw spectra		RMSESEC		QC				
Region (cm^{-1})	RMSSEC (%)	RMSEP (w/w) (%)	RMSSEC (%)	RMSEP (w/w) (%)	d_{c-y} (%)	s_{c-y} (w/w) (%)	d_{c-y} (%)	s_{c-y} (w/w) (%)			
306	3	1.4	1.1	6	-0.3	1.1	0.5	8	0.5	8	
508, 3192–3108	2	2.5	5	13	3	4	3	14	2.1 ^a	3 ^a	2 ^a
323	1	2.9	3	4	0.4	3	3	2	2.5	3	3
207	1	3.5	10	21	7	7	4	32	3.3	19	3

SEC and RMSEP are the root mean square error of calibration and prediction, respectively. RMSESEC is the RMSEP divided by the mean value of mancozeb concentration in the validation dataset. s_{c-y} is the standard deviation of three replicates. d_{c-y} and s_{c-y} are the mean difference and the standard deviation of mean differences between predicted vs. actual mancozeb concentration (% w/w), respectively. QC is the coefficient. No baseline correction has been used in groups 1, 2 and 4. In group 3, a linear removed correction has been applied.

In the case of NIR spectra, it can be seen several bands corresponding to mancozeb. The band located at 6448 cm^{-1} related to the CSNHR first overtone, band centred at 4817, 4730 and 4632 cm^{-1} could be associated to the band combination of the structure CSNHR and the bands situated at 5137 cm^{-1} correspond to the second overtone of C=S in CSNHR. Moreover, it is possible to distinguish the band at 4392 cm^{-1} related to C–H stretch or CH₂ deformation. Finally, bands located at 4365 and 4254 cm^{-1} could be related to C–H and CH₂ second overtone, respectively [19].

3.2. Clustering of mancozeb samples from their MIR and NIR spectra

Pesticide formulations considered as samples in the present study correspond to mancozeb associated with other constituents, appropriate solvents or surfactants.

In order to evaluate possible classes among samples considered, taking into account the additional co-formulated products, a clustering discriminant study was made before PLS data treatment.

The similarity between samples was evaluated using the distance concept, calculated using a mathematical relationship (i.e., Euclidean norm) of numerical properties of the samples (i.e., absorbance at different wavelengths).

In our opinion, this previous step is an important task, which allows us to select properly the PLS model, thus improving the prediction of unknown samples. It must be indicated that the classification of samples is based on their spectra but could be interpreted through the obtained clusters considering the differences in sample composition.

Cluster analysis from MIR and NIR spectra, was carried out using vector normalization pre-processing for the regions compressed between 4000 and 600 cm^{-1} and between 7500 and 4000 cm^{-1} , respectively, and employing the standard algorithm which uses the Euclidean distance to determine the spectral distances.

In both cases, in order to calculate the spectral distances between the clusters, Ward's algorithm, which attempts to find the most homogeneous groups, was used. Thus,

instead of the spectral distance the growth in heterogeneity is monitored.

Results are presented in the two dendrograms of Fig. 2. It can be appreciate that all commercially available samples employed for this study were classified in the same four groups regardless of whether the MIR or NIR spectral region were tested, thus achieving a good classification agreement with their composition in attending to the additional co-formulated active constituents.

3.3. MIR and NIR partial least square modelization for mancozeb determination

The use of an external monoparametric calibration for the determination of mancozeb in commercial formulations by using both spectral regions, provided a very poor linearity and high relative errors for all sample groups considered and, because of that, the possibility to use a multivariate calibration technique, such as partial least squares (PLS), for the treatment of data, was evaluated for each group of samples selected from the hierarchical cluster analysis.

Although, several spectral regions were tested and different models were built and compared in terms of root mean square standard error of prediction (RMSEP) values in order to evaluate their prediction capabilities for the samples analyzed at both spectral regions, MIR and NIR, only most significant results will be summarized in this paper.

In order to validate the two vibrational methodologies assayed, different quality indicators were given. Among them, it was considered: (i) the mean difference (d_{x-y}) between vibrational-PLS predicted values and reference data; (ii) the standard deviation of mean differences (s_{x-y}); (iii) the quality coefficient (QC); (iv) the pooled standard deviation for validation samples (s_{tip}) [20]. As stated by Massart et al., the QC is to be preferred over correlation coefficient of the regression between predicted and reference data “not only because it gives a better idea of the spread of the data points around the fitted straight line but also because it gives some indication on the percentage error to be expected for the estimated concentration”. QC was calculated as the mean square sum of the

Table 2
Prediction capabilities of non-linear PLS-DATR-MIR for mancozeb determination in commercial pesticide formulations

Calibration conditions			Figures of merit								
Spectral region (cm^{-1})	Baseline correction (cm^{-1})	PLS factors extracted	r	RMSEC (% w/w)	RMSEP (% w/w)	RRMSEP (%)	d_{x-y} (% w/w)	s_{x-y} (% w/w)	s_{tip} (% w/w)	QC (%)	
Group 1 1382–1288	None	4	0.999	1.4	0.8	5	–0.6	0.6	0.4	6	
Group 2 1533–1506, 3192–3108	None	4	0.998	1.8	2	6	–1.0	1.9	2	3	
Group 3 1543–1488	None	3	0.998	2.0	3	5	–0.7	3	1.6	5	

relative prediction error of each validation sample (predicted minus actual concentration) divided by the actual concentration. Several figures for the fitting of the model to the data, such as root mean square error of calibration (RMSEC) and multiple correlation coefficient (r), were also used [21].

3.4. Linear PLS-DATR-MIR modelling

Table 1 shows the analytical features of PLS-DATR-MIR models based on the use of both, raw and ATR corrected spectra (ATR correction multiplies the sample spectrum by a wavelength-dependent factor to adjust the relative peak intensities), using mancozeb standards prepared by mixing different amounts of the pesticide with kaolin, as calibration set, for mancozeb determination in pesticide formulations as a function of the use of different spectral regions and baseline criteria for each group of samples considered. The spectral regions studied were those for which the contribution of the concomitants and the other constituents was minimum. Mean centring spectra data pre-treatment was employed to eliminate common spectral information in both cases.

The leave one out cross-validation procedure was used to obtain the best number of latent variables for each pesticide using the predicted residual error sum of squares (PRESS).

In spite of the use of the most appropriate spectral regions for each one of the four sample groups established and on the fact that good correlation coefficients (r) were obtained using a low number of PLS factors, prediction capabilities achieved were not acceptable in all the cases, providing QC values ranging from 2 to 32%. It can be seen that the ATR correction, provides a slight improvement of results obtained without correction. However, in the case of samples corresponding to group 4, analytical characteristics obtained using linear PLS were absolutely unacceptable, obtaining a QC parameter value of the order of 30%.

3.5. Non-linear PLS-DATR-MIR modelization for mancozeb

On considering the possibility that the system being modelled exhibit a non-linear behaviour, probably due to the high concentrations employed for calibration or because possible interactions between co-formulated products, a non-linear PLS approach was applied in order to obtain satisfactory and robust calibration models.

Several spectral regions were tested, taking into consideration the DATR spectra of the other substances present in the samples to avoid spectral interferences, and different models were built but only most significant results are indicated in Table 2.

It can be seen the prediction capabilities achieved when non-linear models were built for each group.

Although the spectral regions employed for the non-linear modelization are not the same than those used for linear modelling for groups 3 and 4, all of them agree with the respective

capabilities of PLS-DATR-MIR for mancozeb determination in commercial pesticide formulations

Validation conditions Spectral region (cm ⁻¹)	Figures of merit														
	PLS factors extracted						Raw spectra								
	PLS factors extracted	RMSEC (% w/w)	RMSEP (% w/w)	RRMSEP (%)	d_{x-y} (% w/w)	s_{x-y} (% w/w)	s_{strip} (% w/w)	QC (%)	RMSEC (% w/w)	RMSEP (% w/w)	RRMSEP (%)	d_{x-y} (% w/w)	s_{x-y} (% w/w)	s_{strip} (% w/w)	QC (%)
335	2	1.7	0.8	5	-0.5	0.7	0.6	5	1.7	0.7	4	-0.12	0.7	0.6	4
563	5	1.5	3	8	0.7	3	2	6	1.5	3	7	0.7	3	2	6
784, 4709–4663	2	3.9	3	4	-0.5	3	2	4	3.9	3	4	-0.5	3	2	4
559	4	1.8	1.9	4	1.7	0.8	0.6	6	1.8	1.6	3	1.4	0.9	0.6	5

meaning of each parameter as indicated in footnote of Table 1. Linear removed correction has been used in groups 1, 2 and 4. In group 3, a baseline established from 4879 to 4759 cm⁻¹ in the first region or removed correction has been applied for second region.

required for linear models, because the first approach includes the additional factors needed in order to explain the non-linearity of the system. However, the number of extracted factors for these models, through cross-validation, ranged between 3 and 5, and thus they can be considered enough robust and flexible in the prediction of the response, on considering the matrix of samples.

As it can be seen in Table 2, good correlation coefficients were achieved providing RMSEC values ranging between 1.4 and 2.0% (w/w). The non-linear PLS models developed provide QC values from 3 to 6%, for the different groups of samples. They were of the same order than those obtained by linear approach except in the case of group 4 where, probably due to the composition of this type of samples (the concomitant or the other active constituent interfere or interact with the analyte), a clear improvement of the results has been obtained.

3.6. PLS-DR-NIR modelling

Table 3 shows the analytical features of PLS-DR-NIR models built for each group of samples considered also based on the use of both, raw and corrected spectra, using the aforementioned mancozeb standards as calibration set. Mean centring spectra data pre-treatment was also employed in both cases.

As can be seen, for this situation, spectral regions used are different for each one of the four groups established taking into account their respective co-formulated active constituents NIR spectra.

Good correlation coefficients were obtained for a number of PLS factors between 2 and 5, showing RMSEC values from 1.5 to 3.9% (w/w), as it can be seen in Table 3.

In this case, the general automatic baseline correction applied, in which software selects some baseline points and

automatically corrects the selected spectra, slightly improves the prediction capabilities, providing QC values between 4 and 6%.

3.7. Analysis of commercially available formulations

DATR-MIR and DR-NIR methodologies provided statistically comparable results with those obtained by HPLC reference method or manufacturer values (in the case of group 1) for mancozeb analysis in 11 commercially available formulations, as can be seen in Table 4.

Occasionally, standard deviations for DATR-MIR and DR-NIR data are slightly higher than HPLC ones. In deed, we should measure spectra with high repeatability. Unfortunately, in DATR spectroscopy, spectra of solid samples can vary considerably when applying different pressures to the sample as this is directly influencing the contact of the sample with the crystal.

Moreover, it can be seen that accuracy errors obtained for the comparison of data found by both vibrational methodologies with HPLC were lower than 7% in all cases studied.

On the other hand, the regression between all the average values of results found for all commercial samples assayed by non-linear PLS-DATR-MIR and PLS-DR-NIR procedures as a function of HPLC reference method provided equations of $C_{\text{DATR}} = (0.1 \pm 1.6) + (0.99 \pm 0.03)C_{\text{HPLC}}$ and $C_{\text{DR}} = (1.1 \pm 1.6) + (0.98 \pm 0.03)C_{\text{HPLC}}$ with correlation coefficient values of $r=0.996$ and with $r=0.996$, providing root mean square error (RMSE) values of 2.1 and 2.0, respectively.

A regression between data obtained through both vibrational procedures provided an equation of $C_{\text{DR}} = (1 \pm 2) + (0.99 \pm 0.04)C_{\text{DATR}}$ with $r=0.993$, in this case with a RMSE value of 2.7.

Table 4
Determination of mancozeb in pesticide formulations by HPLC-UV and vibrational methodologies base on DATR-MIR and DR-NIR procedures

Sample	HPLC-UV (% w/w) ^a	DATR-MIR (% w/w) ^a	Er ^b (%)	DR-NIR (% w/w) ^a	Er ^c (%)
Group 1 ^a					
Afrosan duplo 1	17.5 ± 0.6	17.3 ± 0.2	-0.9	17.8 ± 0.8	1.7
Afrosan duplo 2	17.5 ± 0.8	16.5 ± 0.5	-5.8	16.9 ± 0.3	-3.4
Group 2					
Alfil duplo 1	36.3 ± 0.8	35.2 ± 1.5	-3.0	38.4 ± 1.4	5.8
Alfil duplo 2	34.2 ± 1.1	33 ± 3	-2.9	32 ± 4	-6.4
Rhodax plus	35.0 ± 0.7	34.2 ± 1.3	-2.3	36.8 ± 1.1	5.1
Group 3					
Cyclo 1	78.1 ± 0.7	77.1 ± 1.4	-1.3	75.1 ± 1.7	-3.8
Cyclo 2	67.0 ± 0.9	70.7 ± 1.7	5.5	69 ± 3	3.0
Galben	76.9 ± 1.8	72 ± 2	-6.4	78.9 ± 0.9	2.6
Ridomil	74.0 ± 1.8	73.2 ± 1.4	-1.1	71 ± 2	-4.1
Group 4					
Magma duplo	39.7 ± 0.4	42 ± 3	5.0	41.7 ± 0.4	5.0
Micene plus	50.9 ± 1.7	49.7 ± 1.0	-2.4	51.6 ± 0.8	1.4

^a Concentration values are the average of two independent analysis measured in triplicate for HPLC procedure and three independent measurements for vibrational

Additionally it has been checked, for all samples analyzed, the elliptic joint confidence test for the slope and the intercept of the aforementioned regressions, being observed the good comparability between the methodologies assayed. So it can conclude that the regression lines obtained present slope and intercept values statistically comparable with 1 and 0, respectively, which evidence the absence of systematic errors.

4. Conclusion

It can conclude that both vibrational procedures developed provide simple, rapid and reliable tools for mancozeb determination in the agrochemicals considered. Moreover, these methods are non-destructive and they allow collection of good-quality infrared spectra from any solid sample with almost no sample preparation.

Although both vibrational procedures can be used to collect data from a reduced amount of sample, providing quantitative results, without any sample preparation step, DR-NIR technique could be considered the most appropriate because a clean step is not required and samples and standards can be stored in the measurement cells for additional studies.

On the other hand, both, DATR-MIR and DR-NIR procedures offer main advantages versus HPLC procedure such as a strong reduction of the volume of reagents consumed and waste generated, and the increase of the measurement frequency from 2 h^{-1} in the case of HPLC to 60 or 120 h^{-1} for DATR and DR, respectively.

So, both proposed spectrometric methodologies are fast and environmentally friendly alternatives to the classic reference chromatographic procedures used for routine analysis of agrochemicals.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of Ministerio de Educación y Ciencia (*Project CTQ2005-05604/BQU, FEDER*) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (*Project ACOMP06-*

161). S. Armenta also acknowledges the FPU Grant of the MECED (Ref. AP2002-1874).

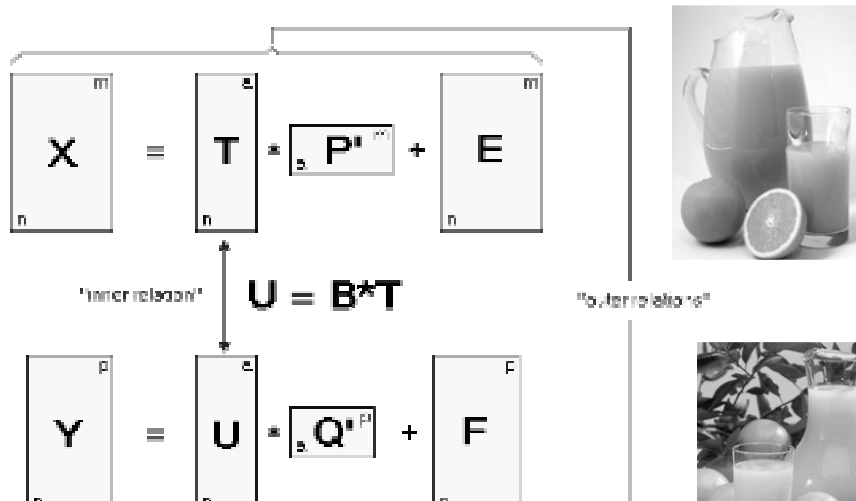
References

- [1] EPA: Pesticides–2000/2001 Pesticide Sales and Usage Report, Biological and Analysis Division Office of Pesticide Programs, Washington, 2002, <http://www.epa.gov/opbhead1/pestsales/01pestsales/sales2001.html>.
- [2] Pesticide Registration Program, US Environmental Protection Agency (US EPA), Washington, 2004, <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/registration.htm>.
- [3] EXTTOXNET. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles, 1996, <http://exttoxnet.orst.edu/pips/mancozeb.htm>.
- [4] E.D. Caldas, M.H. Conceição, M.C.C. Miranda, L.C.K.R. de Souza, J.F. Lima, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4521.
- [5] A. Zena, P. Conte, A. Piccolo, Fresenius Environ. Bull. 8 (1999) 116.
- [6] M. Bekbolet, Chim. Acta Turc. 18 (1990) 353–357.
- [7] H. van Lishaut, W. Schwack, J. AOAC Int. 83 (2000) 720.
- [8] R.J. Cassella, V.A. Salim, S. Garrigues, R.E. Santelli, M. de la Guardia, Anal. Sci. 18 (2002) 1253.
- [9] C.C. Lo, M.H. Ho, M.D. Hung, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 2720.
- [10] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Talanta 65 (2005) 971.
- [11] S. Armenta, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 567 (2006) 255–261.
- [12] A. Salari, E. Richard, Int. J. Pharm. 163 (1998) 157.
- [13] G.A. Norton, J.F. McClelland, Miner. Eng. 10 (1997) 237.
- [14] A.J. Vreugdenhil, M.S. Donley, N.T. Grebasch, R.J. Passinault, Prog. Org. Coat. 41 (2001) 254.
- [15] X.J. Cui, Z.Y. Zhang, P.D. Harrington, Y.L. Ren, Chem. J. Chin. Univ. 25 (2004) 1251.
- [16] K.H. Gustaffson, R.A. Thompson, J. Agric. Food Chem. 29 (1981) 729.
- [17] A.M.C. Davies, Spectrosc. Eur. 18 (2004) 23–24.
- [18] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, London, 1991.
- [19] J.S. Shenk, J.J. Workman, M.O. Westerhaus, Application of NIR spectroscopy to agricultural products, in: D.A. Burns, E.W. Ciureczak (Eds.), Handbook of Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series, vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, pp. 393–395.
- [20] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (Part A and B), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997.
- [21] J. Moros, F.A. Iñón, S. Garrigues, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 538 (2005) 181.

“Determination of the Energetic Value of Fruit and Milk-Based Beverages Through Partial-Least-Squares Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry”

Javier Moros, Fernando A. Iñón,
Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta 538 (2005) 181-193





Determination of the energetic value of fruit and milk-based beverages through partial-least-squares attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry

Javier Moros^a, Fernando A. Iñón^b, Salvador Garrigues^a, Miguel de la Guardia^{a, *}

^a *Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Edificio Jerónimo Muñoz C/ Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot (Valencia), Spain*

^b *Laboratorio de Análisis de Trazas, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina*

Received 8 November 2004; received in revised form 25 January 2005; accepted 1 February 2005

Available online 2 March 2005

Abstract

The estimation of important nutritional parameters, such as carbohydrates content and energetic value (calories) in commercially available fruit juice and flavour milk shakes has been made by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) using a partial-least-square (PLS) calibration approach. A highly heterogeneous population of 65 samples obtained from the Spanish market, covering fruit juices, flavour milk shakes and milk-added fruit juices was used. The spectral range and the size of the calibration set for building the PLS model have been evaluated.

Considering a calibration set comprised of 27 samples, selected via hierarchical cluster analysis, and a validation data set of 38 samples, the absolute mean difference (d_{x-y}) and standard deviation of mean differences (s_{x-y}) of the total carbohydrate content were 0.06 and 0.66 g/100 mL, respectively. The reproducibility of this determination established as the mean standard deviation of each triplicate analysis was 0.05 g/100 mL. In the case of energetic value, the d_{x-y} and s_{x-y} were 2.8 and 18 kJ/100 mL, respectively. The reproducibility of this determination corresponded to a standard deviation of 2.4 kJ/100 mL, for three replicate analyses. The root-mean-square error of prediction (RMSEP) was 18.4 kJ/100 mL and 0.72 g/100 mL for energetic value and total carbohydrates, respectively.

The developed methodology favourably compares with that reported in previous works in much restricted sample composition and provided figures of merit which agree with the US-FDA statutory tolerance values.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carbohydrates determination; Fruit juice; Milk shake; Milk; Hierarchical cluster analysis; Partial-least-squares; Attenuated total reflectance; Infrared

1. Introduction

Carbohydrates offer energy sources for vital metabolic processes and are constituents of cellular substances such as nucleic acids, being also enzyme cofactors and structural components of cell walls and cell membranes [1].

The main intake of carbohydrates in human beings is through food stuff and liquid beverages. As an example, the basic sources of carbohydrates, in a usual diet, are fruit juice or milk shakes that people generally have for breakfast.

Apart from the beneficial properties of carbohydrates, its excess also cause generalized vascular disease. The high-carbohydrate diet, which is now so popular, can result not only in chronic *hyperglycemias*, also called “high blood sugar” but also in obesity. Moreover, excess insulin also causes hypertension and helps initiate the sequence of events in the arterial wall which leads to atherosclerosis and heart disease. Nevertheless, it is not healthy to avoid carbohydrates; just control the amount that someone eats [1].

Scientists in the food and beverage industry are faced with many different quality control tasks. Nowadays, knowledge about all foodstuffs is an important task for manufactures in the food industry in order to inform the consumers about it.

* Corresponding author. Tel.: +34 3544900; fax: +34 3544900.

E-mail address: miguel.delaguardia@uv.es (M. de la Guardia).

In this sense, there are many reasons for analysing juices and in general fruit-based beverages such as identity and authenticity control of raw materials, purity control, control of the hygienic status, determination and control of the parameters for nutritional information, control of the conformity of the recipe, official regulations and quality control.

Traditional methods of food analysis, usually regulated by organizations such as the US-food and drugs administration (US-FDA, for food safety), the United State Department of Agriculture (USDA), or the AOAC (Association of Official Analytical Chemists), normally feature wet-chemical methods or some form of chromatographic separation [2–4]. However, the need of a fast analytical control of too many samples at day demands for alternative procedures based on spectrometric data of untreated samples.

A bibliographic search has been carried out in order to investigate previous works related with the analysis of carbohydrates in juices, juices containing milk and milk by-products such as milk shakes by means of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics (see Table 1). The mid-infrared region at 4000–400 cm^{-1} is the most widely used range for various applications, generally using transmission, and more recently attenuated total reflectance (ATR), measurements due to the high content of water in fruit-based beverages in the wavenumber range between 1400 and 900 cm^{-1} .

The most significant works are related with the determination of carbohydrates in apple juice [5–7], mango juice [8], diverse mixtures of sugars [9], milk [10], synthetic ternary mixtures of glucose, fructose and sucrose applied to recovery studies in soft-drinks and fruit juice [11,12], fruit-based soft-drinks [13] and sugar cane juices [14,15].

Some other application of FTIR can be mentioned such as the detection of adulteration in fruit concentrates by ATR for raspberry purees [16] and using transmission measurement for apple juices [17].

In order to provide a complete picture of the state-of-the-art of PLS-FTIR analysis of fruit and milk-based beverages, Table 1 summarizes the main characteristics of previous works like the number of samples and composition of the calibration and validation set, the typical absolute mean difference (d_{x-y}) and standard deviation of mean differences (s_{x-y}) between predicted versus actual values obtained by PLS-FTIR methods and chemical methods and the root-mean-squared error of prediction (RMSEP) of most significant works.

As it can be concluded from the aforementioned table, most of the works reviewed involved the quantification of carbohydrates in juice of only one kind of fruit or for synthetic samples prepared, using aqueous mixtures of the three main carbohydrates (glucose, fructose and sucrose). Most of these works were focused only on the main sugars determination, but few estimates (i.e., [11,12]) the total content of

(PCR). Moreover, in some cases, a previous data treatment such as First or Second Derivative was employed.

Taking into account all these considerations, there is a precedent about the determination of carbohydrates and energetic value in complex datasets, comprising different kinds of samples. Thus, we decided to evaluate a fast and accurate method which allows us to estimate these important quality parameters in several fruit and milk-based liquid foods obtained from the Spanish market using ATR-FTIR spectroscopy in order to provide an appropriate tool for the quality control of these products, widely consumed around the world.

As fruit juice and milk shakes are basically water solutions, suspension and/or emulsions, we decided to evaluate the use of a ZnSe ATR cell for FTIR measurements, instead of transmission flow cells in order to avoid problems found in the transmission measurements for high content of water samples.

Due to the heterogeneity of the proposed sample set, the selection of calibration dataset is a critical point, which was addressed using a previously developed methodology based in hierarchical cluster analysis [18].

Calibration models were selected by means of the (i) cross-validation (RMSECV), (ii) the root-mean-square-error of prediction (RMSEP) and (iii) the relative standard deviation of predicted values of an independent validation set of samples.

As it is well known, the elimination of non-informative wavenumbers yields, in many cases, the best and robust multivariate models. Therefore, direct efforts have been conducted for selecting the best spectral range for each analyte that minimizes both prediction and calibration errors.

Analytical figures of merit, based on net analyte signal calculations [19], were obtained for the sensitivity and selectivity of the determination of carbohydrates and energetic value in fruit and milk-based beverages.

2. Experimental

A Nicolet 750 FTIR spectrometer controlled by the Omnic for Windows software from Nicolet Instrument Corp. (Madison, WI, USA) and equipped with Specacamp IN-Compartment Contact Sampler horizontal ATR from Graseby Specac (Orpington, UK) with a 45° crystal ZnSe through top-plate, was employed for spectra acquisition. Room and sample compartment temperatures were monitored using a mercury thermometer with a precision of $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Both temperatures did not differ significantly and were $26 \pm 1^\circ\text{C}$ during spectra acquisition of all samples.

2.1. Samples

1 Summary of the content of previously published PLS-FTR procedures for the determination of carbohydrates in juices and related samples

Calibration set		Validation set		Selection mode		Factors number		$d_{s,y}$		RMSEP		Technique	
Type	Standards amount	Type	Samples amount	mode	Factors number	$d_{s,y}$	Factors number	$d_{s,y}$	RMSEP	Technique			
Synthetic apple juice (sucrose, glucose, fructose, sorbitol, citric acid, and malic acid)	39	Commercial juice varieties and juice extracted from different apple varieties	11	–	PCR 9, PLS 8	PCR –0.012, PLS –0.009	PCR 2.5, PLS 2.2	PCR 0.030, PLS 0.021	–	PLS-ATR-FTIR			
Standard mixtures of glucose, fructose, sucrose, and citric acid	22	Mango juice samples	8	–	Sucrose 4, fructose 4, glucose 4	0.18	Sucrose 5.1%, fructose 6.7%, glucose 8.0%	3	Sucrose 5.1%, fructose 6.7%, glucose 8.0%	First derivative-PLS-ATR-FTIR			
Standard mixtures of glucose, fructose and sucrose	–	Standard mixtures of glucose, fructose and sucrose	–	–	–	–	1.3% w/v (RMSEP)	–	–	Transmission PLS-1 (first derivative)			
Commercially available milks	33	Commercially available milks	48	Cluster analysis	Fat 6, protein 7, carbohydrates 12, calories 10, Ca 12	0.06% w/v fat, 0.03% w/v protein, –0.18% w/v CH, 0.06kcal, –4.5 mg Ca/100mL	0.38% w/v fat, 0.18% w/v protein, 0.41% w/v CH, 3.8kcal, 9mg Ca/100mL	–	–	PLS-ATR-FTIR			
Pure apple juice diluted with Milli-Q water	First set (2–20%) [A] 134, second set (25–100%) [B] 86	Pure apple juice diluted with Milli-Q water	A 39, B 44	–	PLS A 2, B 2; SIMCA (different for each standard)	–	–	–	–	PLS, potential functions, SIMCA and ANNs models to classify 23 apple juice-based commercial beverages			
Ternary mixtures of glucose, fructose, sucrose with Milli-Q water	8	Synthetic ternary mixtures	14	–	Sucrose 4, fructose 4, glucose 4	–	0.7%	–	–	PLS-ATR-FTIR (absorbance and first-derivative mode)			
Ternary mixtures of glucose, fructose, sucrose with Milli-Q water	8	Synthetic ternary mixtures	14	–	Sucrose 4, fructose 4, glucose 4	–	0.7%	–	–	PLS-ATR-FTIR and PLS-Circle-cell-FTIR			
Sucrose, glucose, fructose and δ -gluconolactone aqueous calibration standards	8	Commercially available fruit juice drinks	3	–	2 (mean centering pre-processing data)	–8.3	7.2%	8.9	–	FTIR			
Raw sugar cane juices	107	Samples that cover the entire sugar harvest and different geographical regions	1267	–	5	0.17	–	1.4	–	PCA-PCR-ATR-FTIR			
Raw sugar cane juices	20	Spectra of raw, sugar cane juices	19	–	–	0.09	–	0.17	–	ATR-FTIR			

(cocoa, vanilla, etc.) and mixtures of fruit juices and milk products. Thirty nine samples were juices from different fruit mixtures (19 of them also contained milk) and the others 26 samples were composed by: 10 juices obtained from a single fruit, 13 flavour milk shakes and 3 milks (whole, semi-skimmed and skimmed). Table 2 shows a brief description of each sample.

The sell-by-date of the samples varied between end December 2002 and beginning of November 2003, while the production dates range from beginning of June to middle of August 2002. Therefore it is considered that samples were nearly of the same age, while the differences in the sell-by-date values are ascribed to the differences in the preservation strategy and the characteristics of the product. ATR-FTIR spectra were obtained in October 2002. Concentration reference data of energetic value (EV) and total carbohydrates (CH) values of the samples were provided by the producers.

2.2. FTIR analysis

Original samples were placed in the same temperature controlled room where the spectrometer was located before to carry out the analysis. The sample compartment temperature

was monitored and it remained stable at 26 ± 1 °C during the acquisition of IR spectra of all analyzed samples.

Samples were only shaken gently before filling the ATR cell. After shaking, three sub-samples were poured into the ATR cell and the FTIR spectra were taken as described below. As some samples did contain some pulp, the effect of the acquisition time and the possible deposition of substances on the ATR cell were assessed (see Section 3).

In order to select the instrumental conditions for carrying out the ATR measurements, several parameters including the number of accumulated scans per spectra, nominal resolution and mirror velocity were tested. After this evaluation the following conditions were chosen: sample spectra were scanned between 4000 and 600 cm^{-1} , by averaging 75 scans per spectrum with a nominal resolution of 8 cm^{-1} (data spacing of 3.86 cm^{-1}) and a mirror velocity of 0.6329 cm s^{-1} . The acquisition of each averaged spectrum requires 57 s.

The background and blank spectra were collected filling the ATR plate cell with Millipore Q-purified water (Bedford, MA, USA) and using the same instrumental conditions than those employed in the case of samples. Background spectrum was scanned at a seven samples interval, while blank spectrum was collected after the measurement of each sample, for

Table 2
General description of samples employed in this study

Sample no.	Brand	Milk product	Juice	Multifruits	Fiber or pulp	Sample no.	Brand	Milk product	Juice	Multifruits	Fiber or pulp
1	Pascual	Milk	Yes	Yes	No	34	Puleva	Milk	Yes	Yes	Yes
2	Choleck	Milk	Yes	Yes	Yes	35	Nutrexpa	Milk	No	No	No
3	Juver	Milk	Yes	Yes	Yes	36	Central Asturiana	Milk	Yes	Yes	No
4	Central Asturiana	Milk	Yes	Yes	No	37	Central Asturiana	Milk	No	No	No
5	Hero	No	Yes	Yes	No	38	RAM	Milk	Yes	No	No
6	Juver	No	Yes	Yes	Yes	39	Fuente Liviana	No	Yes	Yes	No
7	Feiraco	Milk	No	No	No	40	Kasfruit	No	Yes	No	No
8	Feiraco	Milk	No	No	No	41	Juver	No	Yes	Yes	Yes
9	Carrefour	Milk	No	No	No	42	Hero	No	Yes	No	No
10	Pascual	Yogurt	Yes	Yes	No	43	Emig	No	Yes	Yes	No
11	Hero	No	Yes	Yes	No	44	Juver	No	Yes	No	Yes
12	Juver	Milk	Yes	Yes	Yes	45	Carrefour	Milk	No	No	No
13	Juver	Milk	Yes	Yes	Yes	46	Carrefour	Milk	No	No	No
14	Celta	Milk	Yes	No	Yes	47	Compal	No	Yes	Yes	Yes
15	Hero	No	Yes	Yes	No	48	Carrefour	No	Yes	Yes	No
16	Juver	No	Yes	Yes	Yes	49	Puleva	Milk	No	No	No
17	Carrefour	No	Yes	No	No	50	Puleva	Milk	No	No	Yes
18	Carrefour	No	Yes	No	No	51	Puleva	Milk	Yes	No	No
19	Carrefour	No	Yes	Yes	No	52	Capel Big Vit	Milk	Yes	No	No
20	Son Fil	Milk	Yes	No	No	53	Fuentsanta	No	Yes	No	Yes
21	Kas Fruit	No	Yes	Yes	No	54	Fuentsanta	No	Yes	Yes	No
22	Kas Fruit	No	Yes	Yes	No	55	Puleva	Milk	No	No	No
23	Capel Big Vit	No	Yes	Yes	No	56	Hacendado	Milk	Yes	Yes	Yes
24	Compal	No	Yes	Yes	Yes	57	Hacendado	Milk	Yes	Yes	Yes
25	Compal	No	Yes	Yes	Yes	58	Hacendado	Milk	Yes	Yes	Yes
26	Compal	Milk	Yes	No	Yes	59	Hacendado	Milk	Yes	Yes	Yes
27	Compal	Milk	Yes	Yes	No	60	Pascual	Milk	Yes	Yes	No
28	Compal	Milk	Yes	Yes	Yes	61	Pascual	Milk	Yes	Yes	Yes
29	Solán cabras	No	Yes	Yes	No	62	Carrefour	Milk	Yes	Yes	Yes
30	Solán cabras	No	Yes	Yes	Yes	63	Auchan	Milk	No	No	No
31	Solán cabras	No	Yes	Yes	No	64	Auchan	Milk	No	No	No
32	Puleva	Milk	Yes	Yes	Yes	65	Auchan	Milk	No	No	No

assessing that cross-contamination of IR spectra was minimized after cleaning the ATR crystal.

Both, sample and blank spectra were collected in the absorbance mode. The regions between 4000 and 3200 cm^{-1} and between 840 and 600 cm^{-1} were eliminated prior the calculations as it was observed that variations in these regions cannot be ascribed to variations in sample composition. Furthermore, the absorption band around 2400 and 2260 cm^{-1} , which are due to atmospheric CO_2 , were also cut-off from raw spectra. These bands could be also minimized by purging the ATR cell with N_2 . Nevertheless, as the IR region in which they are located does not provide any relevant information about samples, N_2 purging was considered unnecessary and this region was cut-off from raw spectra.

The spectra of the three sub-samples of each sample were taken by refilling the ATR cell.

2.3. Data analysis

Data obtained from Ommic were exported in text format and analyzed using Matlab® (The Mathworks Inc., South Natick, MA, USA). First of all internal and home-made Matlab functions were used for hierarchical cluster analysis in order to evaluate the similarity of samples in terms of their ATR-FTIR spectra and to assess the number of characteristic subsets in which the available samples could be divided. Similar criteria to that already published for milk classification have been used [10]. Multivariate calibration calculation was made with the MVC1 toolbox [20].

The following figures of model's fit to the data and predictive power have been use throughout the text. In all of the cases, the scope was to estimate the average deviation of the model from the data.

PRESS is the sum of squares prediction error (quadratic sum term in Eq. (1)) for the model, which includes A factors. The root-mean-square error of calibration (RMSEC) is a measure of how well the model fits the calibration data, and is defined as:

$$\text{RMSEC} = \left[\left(\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2 \right) (\text{d.f.})^{-1} \right]^{0.5} \quad (1)$$

where \hat{C}_i means the values of the predicted parameter (in our case energetic value and carbohydrates) when all samples are included in the model building and d.f. is the number of degrees of freedom calculated as the number of calibration samples with known concentration (C_i) minus $A + 1$, the number of factors kept in the model plus one.

The root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) is a measure of predictive ability of the model formed on part of a dataset to predict the remainder of the data. The RMSECV is defined as the previous equation

out cross-validation d.f. is equal to the number of calibration samples).

As the ability of the model to fit the calibration data is not a direct measurement of its prediction capabilities, it is mandatory to compare the values predicted for new samples not used to build the model. This can be performed by calculating the root-mean-square error of prediction (RMSEP) when the model is applied to new data for which the reference values are known. RMSEP is calculated exactly as in Eq. (1) except that the estimates for C_i are based on a previously developed model, in which the sample concentrations of the validation set are excluded in the model-building step and the degree of freedom is the number of samples in this set.

In order to build and select PLS models, the following iterative procedure was carried out for. For building the best calibration model, a selection of the optimum number of factors, which minimize the root-mean-square error of cross-validation, was made based on the criterion of Haaland and Thomas [21]. To improve the prediction performance of the regression method, a search for suitable sensors was considered. In this sense, one subroutine from MVC1 toolbox was used to find the minimum PRESS, as a function of the number of factors, based on a moving spectral window strategy [20]. Several spectral windows were tested in order to evaluate their prediction capabilities for the validation set. Only most significant results will show here.

2.4. Cluster analysis

In hierarchical cluster analysis, the similarity between samples is calculated using the distance concept, calculated using a mathematical relationship (i.e., Euclidian norm) of numerical properties of the samples (i.e., absorbance at different wavelengths). In a successive procedure, each sample is linked to the closest sample or group of samples and a characteristic distance is used to describe this union. This distance between groups of samples can be evaluated in different ways and is the main difference among common linkage methods (Ward, complete, average, etc.). In other words, by this procedure, each sample is replaced by a group comprised of the sample and their neighbour samples located within the given similarity distance. The results are represented in a dendrogram, which shows at which normalised or rescaled distance (i.e., each distance rationed to the maximum distance, multiplied by a factor) a group of samples is differentiated from others, when it is read from right to left. At the far-left end each replicate of each sample comprises a group of one member, that is, each spectrum is unique. Thus, for a given rescale distance, different number of groups are kept. At this stage we have proposed [10] to use the similarity distance between triplicates as minimum cut-off criterion. Actually taking into account the con-

3. Results and discussion

3.1. Instrumental and experimental conditions for FTIR data acquisition

Before the acquisition of IR sample spectra, several instrumental and experimental conditions were evaluated in order to improve the spectra quality.

The number of accumulated scans per spectrum and the nominal resolution were tested in terms of signal to noise ratio and the time required for spectra collection.

The assays were carried out by varying the nominal resolution between 2 and 16 cm^{-1} and the number of scans between 25 and 100 for MilliQ-water, juice and a flavour milk shake as samples. The noise in the spectrum of these totally different samples was compared, using the RMS (root-mean-square) estimator, in the region where no bands were observed 1900–2200 cm^{-1} . As in this spectral range no significant differences in the noise level has been noticed for these samples in all tested conditions, it was considered that the use of water was suitable for selecting the instrumental conditions in a spectral range with more analytical significance. This region was selected seeking the greater number of bands observed and related to the sample composition (see below). Therefore, the RMS was evaluated using water as sample in the spectral region compressed between 1800 and 1000 cm^{-1} (see Fig. 1).

Using this criterion, the best time/benefits compromise was found for a nominal resolution of 8 cm^{-1} and 75 scans accumulated per spectrum for which a measurement time of 57 s was required. The decrease in the RMS value achievable when acquiring 100 scans (see Fig. 1) does not compensate the increment on the acquisition time (approximately 20 s).

Mirror velocity was also tested at three different values (0.4747, 0.6329 and 0.9494 cm s^{-1}) averaging 75 scans

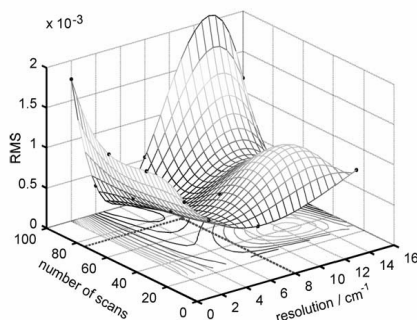


Fig. 1. Effect of the instrumental parameters on the signal to noise ratio of ATR-FTIR spectra of flavour milk shake and fruit juice samples. ATR-FTIR analysis evaluated in the spectral region compressed between 1800 and 1000 cm^{-1} using RMS (root-mean-square) estimator; black points indicate actual condition measured. Dashed line in the floor plane indicates the instrumental condition chosen to ensure a compromise between signal

with a nominal resolution of 8 cm^{-1} . It also was evaluated in terms of signal to noise ratio and the time required for spectrum collection (67, 57 and 43 s respectively). The best time/benefits compromise was found for a mirror velocity of 0.6329 cm s^{-1} .

On the other hand, in order to minimize the cross-contamination and to establish an appropriate strategy for cleaning the ATR cell between samples, different procedures were tested using background and blank controls. Satisfactory results were achieved when samples were removed from the ATR device with a 5% w/v commercial detergent/water solution, which was removed afterward by a 10% v/v ethanol/water solution. Methanol was finally used for drying quickly the surface of the ATR cell. The whole cleaning procedure consumes less than 60 s.

To evaluate possible sample sedimentation on the ATR cell during the spectra acquisition for samples containing fiber or pulp continuous a series of spectra were collected with a 1 min interval for the ATR cell filled with a multifruit juice. No changes on the spectra were observed after 15 min.

3.2. Juice and flavour milk shake FTIR spectra

Fig. 2 shows the spectra of a flavour milk shake sample, a multifruit juice sample, a multivitamin fruit-based softdrink and MilliQ-water blank. Regions compressed between 4000 and 3200 cm^{-1} and between 840 and 600 cm^{-1} presented high absorption of the incident light principally by components of the system (water and the ZnSe crystal) and were ignored for this study.

In Fig. 2 the main wavelengths belong to protein, carbohydrates and fat present in fruit juice, flavour milk shake and milk are shown. The amide groups (CONH) of proteins absorb at 1546 cm^{-1} , whereas the hydroxyl groups (OH) of sugars absorb at 1052 cm^{-1} . The increase in absorbance from 2600 cm^{-1} upward is ascribed to overtones and combination bands of saccharides [22]. The chemical structure of the fat molecules can be divided into two portions: (A) the glycerol connected by an ester linkage (carbonyl) and (B) the alkyl chains of the fatty acid. The carbon-hydrogen groups (C-H) and the carbonyl groups (C=O) of samples absorb energy at 2929 and 1653 cm^{-1} , respectively. The Fat A measurement counts the ester linkage, while Fat B uses CH_2 and CH_3 absorption centres [22], being these bands presents only in products containing milk. The band around 928 cm^{-1} corresponds to the symmetric COC skeletal stretch due to the aliphatic ethers [23].

As it can be seen in Fig. 2, spectra from multifruit juice and milk shake differs mainly in the region 3000–2500 and 1700–1500 cm^{-1} . These differences are due to the lack of proteins and fats in juices. The region between 1500 and 1200 cm^{-1} correspond to combination bands and, as it will be shown, it can be correlated for both type of samples with the energetic value. In the 1200–1000 cm^{-1} region both sam-

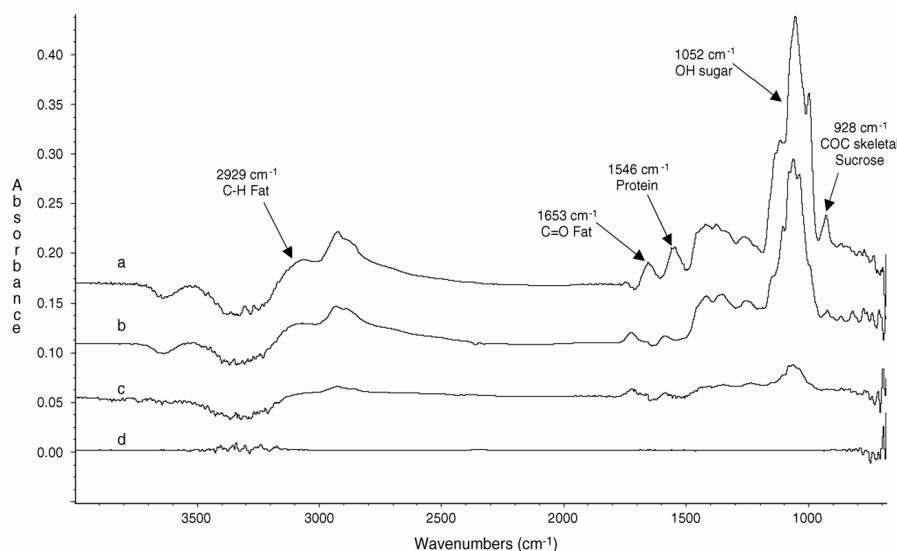


Fig. 2. ATR-FTIR spectra of a flavour milk shake (a), tropical multifruit juice (b) and a multivitamin soft drink containing multifruit juice (c), in comparison with a MilliQ-water blank (d). Experimental conditions: nominal resolution of 8 cm^{-1} , 75 scans per spectra accumulated and a mirror velocity of 0.6329 cm s^{-1} . Sample composition: (a) 0.9% fat, 2.5% protein and 12.8% carbohydrates; (b) 0.1% fat, 0.31% protein and 9.6% carbohydrates; (c) 0.04% fat, 0.1% protein and 1.7% carbohydrates.

bands in this region changes depending on the type of sample, because the total and relative amount of the different saccharides are sample dependent. As an example, the occurrence of lactose band will be only seen in milk-based beverages. For samples containing fruit juices and milk derivatives, bands related with lactose, fructose, glucose and sucrose will be observed. This variation on the relative and total amount of saccharides really imposes a challenge when seeking the determination of total carbohydrates by multivariate methods. Therefore a suitable correction of ATR-FTIR spectrum and selection is mandatory for achieving representativeness.

3.3. Correction of ATR-FTIR data

When comparing all ATR-FTIR collected spectra for samples considered and in spite of the careful control of the cell cleaning a significant shift of the baseline, sometimes even within replicates of the same sample, was observed. These variations make difficult the subtraction of blanks to the corresponding sample spectra.

Different procedures to deal with this problem in milk samples has been evaluated in the literatures [10,24]. Our previous experience shows that good results, evaluated as minimum misclassification of samples (see below) and bet-

In this case, the average of absorbance values between 2000 and 2200 cm^{-1} was used for performing the spectral correction. In consequence, these corrected spectra were utilized for further calculations.

As the optics involved in ATR are quite different from those used in the transmission experiments, the infrared spectrum of a sample obtained by ATR exhibits some significant differences when compared to its transmission counterpart. Some of these differences are desirable and have been used to improve the possibility of measuring aqueous samples. Less desirable characteristics of ATR are its distortion of the relative intensities of bands and the introduction of a shift to lower frequencies.

The distortion of relative peak intensities in an ATR spectrum is well known. In the transmission experiment, the pathlength is defined by the thickness of the sample and is therefore constant across the spectrum. However, in the ATR experiment, the depth to which the sample is penetrated (d_p) by the infrared beam is a function of wavelength (λ), incident angle (θ), ATR crystal refractive index (n_c), and sample refractive index (n_s) (see Eq. (2)). The most simple and common-applied correction is based on the hypothesis that the effect of the incident angle, ATR crystal refractive index, and sample refractive index on the absorbance is fairly constant between samples. Therefore, as the pen-

value and rationing the result by the maximum wavenumber in the spectrum. The resulting spectrum can be optionally rescaled to the highest absorbance acquired for visualisation purposes.

$$dp = \lambda(2\pi)^{-1}(n_c^2 \sin^2\theta - n_s^2)^{-0.5} \quad (2)$$

This correction has dissimilar application rate in the analytical literature. In general it is always done when spectra will be compared to a reference spectrum taken in transmission mode, but is more rarely applied for quantitative analysis. A priori, it is possible to expect that this correction will be insignificant when quantitative analysis is done at a single wavelength or small wavelength range. Nevertheless, when the whole spectra are used with multivariate regression analysis, such a non-linear correction may improve or worsen the prediction capabilities. Moreover, when a cluster analysis strategy is used, as in this work, to assess how samples can be grouped from their IR spectra, the increase in absorbance values at high wavenumbers, produced after correction, may affect the cluster results.

We have made an iterative study applying or not the aforementioned correction, grouping the samples based on cluster analysis, selecting the calibration and validation set from these groups and generating and assessing the multivariate model from the number of factor, optimum spectral range, etc., for each parameter. As this process implies too much information, only the most significant results will be shown here.

3.4. Clustering of juices and flavour milk shake samples from their FTIR spectra

In order to evaluate possible classes among samples considered, a clustering method was carried out before PLS data treatment. In our opinion, it is a very important task which allows us to select properly a representative calibration set, thus improving the prediction of unknown samples. This clustering method should be done prior the determination of selected target parameters of commercially juices and flavour milk shakes of different composition and trademark. Moreover, the classification of samples based on their spectra may be interpreted through the obtained clusters also considering the differences in sample composition.

In a previous work we applied a hierarchical cluster analysis for selecting a calibration set for milk analysis and we confirmed that this procedure has some advantages for selecting the calibration set when compared to others [10,18]. Further investigation has been carried out in this way, evaluating other distance and linkage methods. The effect of these variables on the obtained dendrogram will be discussed.

In this study, several distance types [25] such as Euclid-

were 47, 16, 44 and 24, respectively, with different numbers of samples in each one.

When Euclidean, Euclidean square and Minkowsky four distances were compared between them we found that clusters were formed nearly by the same samples. Moreover, the three dendrograms can be reduced to the same dendrogram by choosing in each case an appropriate cut-off rescaled distance. On the other hand, the dendrogram obtained using any of these three distances could be easily explained in terms of sample composition. Therefore, the use of any of these three measuring distances can be considered as equivalent. However it was not the case when it was used the Pearson correlation distance. For this measuring distance there is a trend to form few cluster comprised of a high number of samples, but “chemically” different between them. In fact, the spectrum of a dilution of a given sample is highly correlated (Pearson coefficient almost equals to 1) with that of the undiluted sample. In our opinion, this distance groups in terms of relative similar composition (i.e., similar ratios of fats to carbohydrates), which is not useful for selecting a calibration set that spans a large composition range and it was more or less the same on using Euclidean square criterion.

Cluster analysis could be done also with the scores of the most significant principal components selected after a principal components analysis (PCA), centring or not data. For this particular case, only Euclidean distance was tested. The dendrograms obtained from PCA data can be also explained in terms of sample nutritional values although some groups were modified due to variations in the fingerprint regions of the spectra.

The consideration of the Euclidean distance using raw spectral data provided 36 clusters including a single sample each one and incorporates one misclassified triplicate. This fact may suggest that this strategy is more dependent on small differences in sample spectra than that based on a previous PCA, which reduces a little bit the number of sample groups from 47 to 43 but especially increases the number of samples included in each group. Moreover, as PCA drastically reduces the number of variables to be considered for clustering, the computer memory requirements are also reduced.

Based on the obtained results we have selected the dendrogram classification found using Euclidean distance with average within-groups linkage for the scores of the PC using not centred data to be compared with other linkage and pre-treatment method.

When applying the Ward linkage method, it originated more compact clusters than complete or average linkage method. The number of cluster was reduced from 43 to 20 and the number of samples in each cluster increased. Therefore, following comparisons were performed using Ward linkage.

The effect on the classification of samples of the use of an ATR correction algorithm for a previous data treatment was evaluated using the Euclidean distance after PCA analysis.

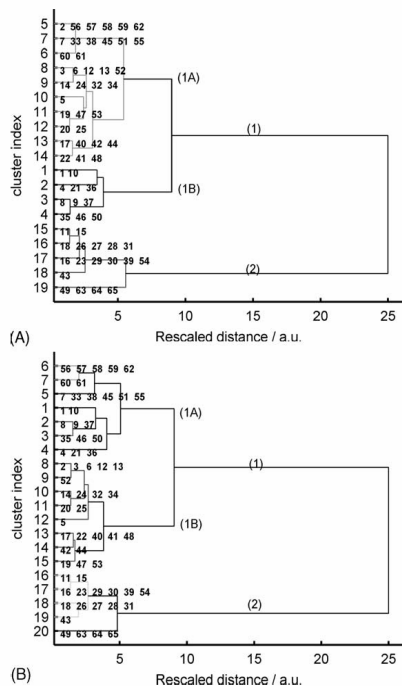


Fig. 3. Dendrographic classification of samples using the Euclidean distance after PCA analysis of ATR-FTIR spectra and applying the Ward linkage method. (A) Corrected with an ATR algorithm and (B) uncorrected. Cut-off distance was set to 1.4 a.u. Typical dissimilarity distance between replicates 0.5 a.u.

correction algorithm, respectively, using Ward linkage. As it can be seen, in most cases the application of the correction does not affect the group of samples in each small cluster (most samples are grouped together with the same samples in both cases), but changes the distribution of the big groups, for example the cluster 1B in Fig. 3A is a sub-cluster of the 1A in Fig. 3B. These changes may be explained by the fact that when applying the ATR correction, the intensity of the bands in the spectral region around 2800–3000 cm⁻¹ increase.

It is important to notice that the fact that for most samples the near neighbourhood of each sample does not change when

applying the ATR correction indicates that the selection of the calibration samples will not be affected by this correction. In fact only two samples have different neighbour samples in Fig. 3A when compared to those of Fig. 3B. Moreover in both cases, the number of cluster formed is similar (19 and 20, respectively). Therefore the application of the ATR correction is considered not important at the sample selection step.

The main group of clusters formed (from right to left up to rescaled distance equals to 5) are directly correlated with the mean intensity of the FTIR spectra of the samples in these groups and, thus, samples with high absorbance level are grouped together. As the absorbance intensity is mainly related with the total amount of carbohydrates, fats and proteins the groups are basically related with the similar content of these analytes between the samples.

Table 3 shows the mean and the standard deviation of the energetic value and the carbohydrate content of the main five clusters obtained using the Euclidean distance after PCA analysis of corrected ATR spectra (Fig. 3A). Basically, clustering criteria seems to be based on carbohydrates content, which separated samples into two main groups. In each one, samples were separated using other parameters such as protein and fat (which depends strong on the milk presence). So, it can conclude that the energetic value of fruit and milk-based beverages is the most important characteristic from both, alimentary and FTIR viewpoints.

Fig. 4 shows a plot of the carbohydrate content of the samples vs. their energetic values. As can be seen, there is a strong correlation between these two parameters for the main part of samples being those corresponding to pure fruit juices (see Table 2). For samples containing appreciable fat amounts like juices with milk samples or milk shakes, the contribution of fat to the energetic value avoids a close correlation between carbohydrates and energetic value.

3.5. Selection of the calibration set

The determination of the number and the nature of samples to be used for calibration is always a critical factor in multivariate analysis. As it was pointed out in the previous section, the choice of Fig. 3A or Fig. 3B is of no great concern. In the present work it was done based on the hierarchical cluster analysis results, using dendrogram of Fig. 3A for selecting

Table 3
Characteristics of the samples grouped in the main clusters

Cluster branch	Number of samples	EV (kJ), mean ± S.D.	CH (g), mean ± S.D.	Sample number
1B	11	293 ± 39	13.8 ± 1.3	1, 4, 8, 9, 10, 21, 35, 36, 37, 46, 50
1A top	14	248 ± 36	12.3 ± 1.4	2, 7, 33, 38, 45, 51, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62
1A bottom	22	201 ± 22	11.2 ± 1.2	3, 5, 6, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 34, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 52, 53

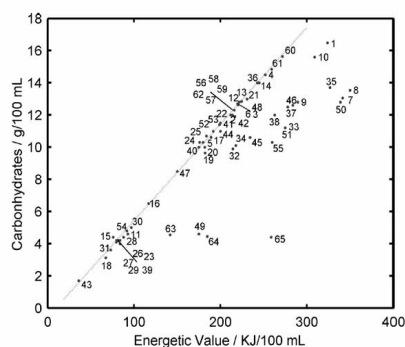


Fig. 4. Correlation between energetic value and total carbohydrate content in fruit and milk-based beverages. The dashed line represents a regression line of samples in which the energetic value is highly correlated with the carbohydrates content ($\text{CH (g/100 mL)} = 0.060\text{EV (kJ/100 mL)} - 0.528$). To identify the each samples see Table 2.

the calibration and validation datasets. The sample selection criterion was based on the following principles. At least one sample of each cluster was selected for calibration. If the cluster is comprised of more than one sample, the number of samples selected for calibration was approximately the root square of the total number of samples included in the cluster, while the remaining samples were integrated in the validation data set. So, the number of samples assigned to the validation was equal or higher than the number of those employed for calibration. The samples within a given cluster were selected randomly.

As summary, 27 samples, with an average energetic value of 204 ± 69 kJ/100 mL and a carbohydrate content of 11.0 ± 3.3 g/100 mL were selected for calibration (\pm values correspond to the standard deviation) and 38 samples with

an average energetic value of 224 ± 84 kJ/100 mL and a carbohydrate content of 11.4 ± 3.7 g/100 mL were used for prediction.

In order to evaluate the representativeness of the aforementioned calibration and validation sets, an extended calibration model was also used. This extended calibration set includes the samples of all individual clusters but now the root square of samples from clusters with more than one was reserved for validation and the rest included in the calibration set. This calibration set was composed by 40 samples, corresponding to 203 ± 81 kJ/100 mL and 10.7 ± 3.8 g of carbohydrates per 100 mL and the remaining 25 samples were using for validating the model. For this validation set, the energetic value and carbohydrate average content were 203 ± 70 kJ/100 mL and 10.7 ± 2.9 g/100 mL, respectively.

3.6. Determination of the energetic value

Different models were built and compared in terms of RMSECV and RMSEP values for both, calibration and extended calibration sets. In all the cases, slightly better RMSEP values (around 2%) were obtained using spectra corrected by the ATR algorithm (data not shown).

It is interesting to notice that there are two spectral ranges in which a good prediction of the energetic value of samples can be carried out. These ranges are the $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ and the $2760\text{--}2923\text{ cm}^{-1}$ regions. Table 4 and Fig. 5 show the optimised prediction capabilities obtained for this parameter for both sets and spectral ranges.

As it can be seen, the $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ range is dependent on the composition of the calibration set. There is not a clear reason that justifies the fact that when the optimum spectral range of the extended set is used for the reduced one, a reduction on the prediction capabilities is obtained. A possible explanation is that this region is formed by many different combination bands, and thus, a greater variability of features

Table 4
Prediction capabilities of PLS-ATR-FTIR for energetic value determination of fruit and milk-based beverages

Set	Factors	Spectral range	RMSECV (kJ/100 mL)	RMSEP (kJ/100 mL)	RRMSEP (%)	R^2	
1	5	2769–2923	13.2	18.4	8.2	0.939	
2	5	2769–2923	16.2	13.8	6.8	0.9594	
1	5	1461–1500	16.1	16.9	7.5	0.9484	
2	4	1300–1493	16.7	12.6	6.2	0.9666	
Set 1 (2769–2923 cm^{-1})			Set 2 (2769–2923 cm^{-1})				
		Overall	Milk shakes	Juices	Overall	Milk shake	Juices
s_{trip} (kJ/100 mL)		2.4	2.8	2.3	2.2	2.0	2.3
s_{reg} (kJ/100 mL)		3.5	5.9	3.5	3.5	3.7	3.4
$d_{\text{c} \rightarrow \text{y}}$ (kJ/100 mL)		2.8	–10.5	4.1	2.8	4.7	2.0
$s_{\text{c} \rightarrow \text{y}}$ (kJ/100 mL)		18			18		
Selectivity (%)		5.1			5.3		
Sensitivity		4.1E–05			4.1E–05		
LD (kJ/100 mL)		9.5			9.9		

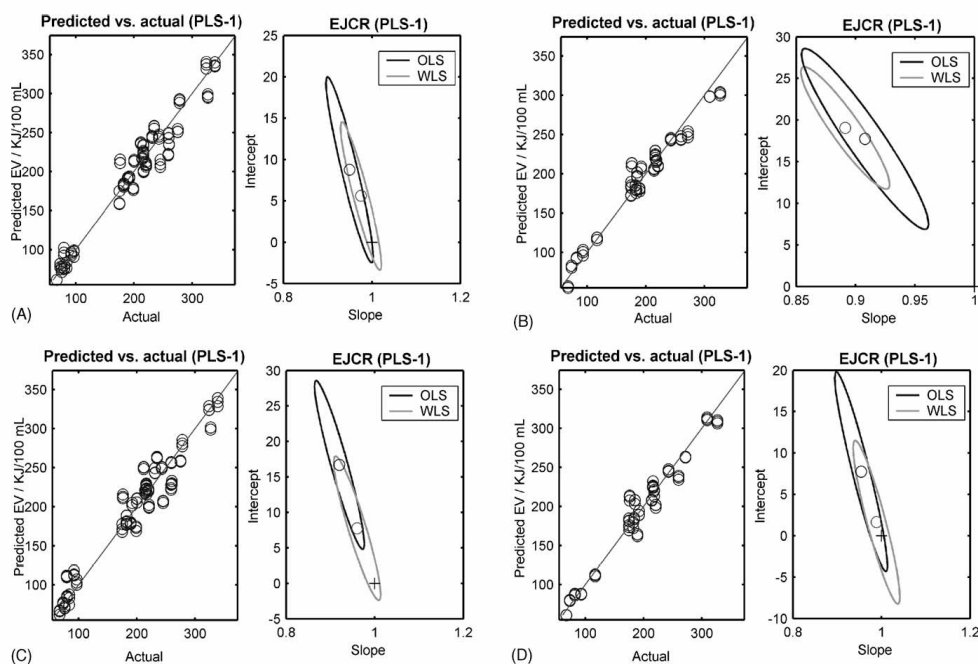


Fig. 5. Prediction of energetic value in samples of fruit and milk-based beverages. Predicted vs. actual values and their elliptic confidence test for the slope and the intercept for (A)–(C) using a reduced calibration set of 27 samples (set 1) and (B)–(D) for an extended calibration set of 40 samples (set 2). Spectral ranges: (A) 1461–1500 cm^{-1} , (B) 1300–1493 cm^{-1} , (C) 2769–2923 cm^{-1} , (D) 2769–2923 cm^{-1} .

should be present in the calibration set for obtaining a more robust model.

From the consistency of the spectral range, we select the 2769–2923 cm^{-1} region for evaluating the analytical performance of the methodology. Table 4 includes the figures of merit obtained under the aforementioned conditions for both calibration sets discriminating the prediction capabilities as a function of the type of samples.

The reproducibility of the determination, established from the mean standard deviation of each triplicate and the standard error of prediction (that includes the uncertainty from the model [26,27]) were 2.4 and 3.5 kJ/100 mL. Additionally it can be seen from Table 4 that there is no significant difference in the obtained figures of merit, neither between type of samples nor on the basis of the number of samples in the calibration set.

For comparative purposes it must be noticed that the tolerance levels of variation accepted by the US-FDA are 21 and 42 kJ/100 mL for samples with an energetic value lower than 210 and higher than 210 kJ/100 mL, respectively [2]. These reference values indicate that an s_{x-y} of 18 kJ/100 mL

milk shake samples for both calibration sets employed and two spectral ranges evaluated. This figure also evidences the absence of systematic error as the theoretical point intercept equal to 0 and slope equal to 1 were located inside the corresponding confidence ellipses.

3.7. Determination of total carbohydrates

A similar procedure to that followed for energetic value determination in fruit and milk-based liquid foods was made for building a calibration-prediction model for total carbohydrates concentration. In this case, there is only one spectral region correlated with this parameter, which is that corresponding to the absorption of the hydroxyl groups of sugars (see Fig. 2). Table 5 and Fig. 6 show the optimised prediction capabilities obtained for this parameter using both calibration sets assayed.

As it can be seen, there is neither significant difference in the main prediction indicator values nor in the optimum spectral range (1020–1175 cm^{-1}) selected for models constructed with 27 or with 40 samples. Moreover, the optimum

Table 5
Prediction capabilities of PLS-ATR-FTIR for total carbohydrates determination in fruit and milk-based beverages

Set	Factors	Spectral range	RMSECV (g/100 mL)	RMSEP (g/100 mL)	RRMSEP (%)	R^2
1	3	1020–1175	0.89	0.72	6.3	0.9700
2	3	1020–1175	0.91	0.65	6.1	0.9708

	Set 1			Set 2		
	Overall	Milk shake	Juices	Overall	Milk shake	Juices
s_{trip} (g/100 mL)	0.05	0.07	0.05	0.04	0.06	0.04
s_{reg} (g/100 mL)	0.19	0.20	0.18	0.26	0.23	0.27
d_{x-y} (g/100 mL)	0.06	0.13	0.04	0.08	-0.20	0.18
s_{x-y} (g/100 mL)	0.66			0.69		
Selectivity (%)	31.60			33.20		
Sensitivity	2.6E-02			2.7E-02		
LD (g/100 mL)	0.2			0.3		

Note: Set 1 and Set 2 include 27 and 40 Calibration samples, respectively. RRMSEP, is the RMSEP divided the mean value of total carbohydrate content in the validation dataset. LD was calculated as three times the standard deviation of the norm of net analyte signal of 10 blanks divided by the sensitivity. s_{trip} and s_{reg} are the standard deviation and the standard error of prediction respectively. For more details see the text.

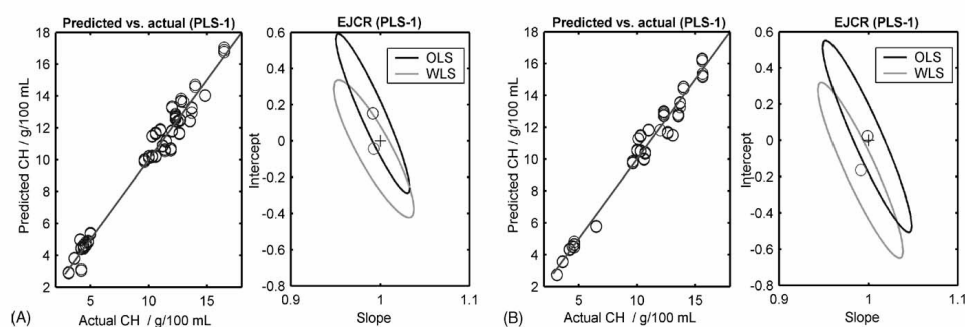


Fig. 6. Prediction of total carbohydrate concentration in samples of fruit and milk-based beverages. Predicted vs. actual values and their elliptic confidence test for the slope and the intercept for a reduced calibration set of 27 samples (set 1) (A) and an extended calibration set of 40 samples (set 2) (B). Spectral ranges: (A) 1020–1175 cm^{-1} , (B) 1020–1175 cm^{-1} .

three factors can be perfectly justified taking into account the heterogeneity of the sample population, comprising not only fruit juices of different fruits, but also different composition of milk and milk shakes.

Table 5 also shows the figures of merit and prediction capabilities of total carbohydrates for both calibration sets discriminated by the type of sample. For the reduced set of 27 samples, the d_{x-y} and the s_{x-y} values were 0.06 and 0.66 g/100 mL, respectively. The reproducibility of the determination established from the mean standard deviation of each triplicate and from the standard error of prediction (keep in mind that this latter parameter includes the uncertainty of the model) were 0.05 and 0.19 g/100 mL, respectively. As it can be seen from Table 5, there is no significant difference in the obtained figures of merit, neither between type of samples nor for the number of samples employed in the calibration set.

As Fig. 6 indicates, the regression between predicted and actual values of the total carbohydrates in the samples

the absence of systematic errors in the PLS-ATR-FTIR methodology.

The increment rounding for the US-FDA is 1 g/100 mL for samples containing more 1 g/100 mL, whereas the insignificance amount is 0.5 g/100 mL [2]. From obtained results, it is clear that the proposed method is suitable for complying with these statutory values.

The selectivity and sensitivity for the PLS-ATR-FTIR determination of total carbohydrates in fruit and milk beverages are higher than those obtained for the energetic value, because of the specificity of the optimised spectral range for sugars. As a final remark and regarding the high heterogeneity of the calibration set, the global performance obtained here favourably compares with that obtained in previous works (Table 1) in much restricted sample composition.

4. Conclusions

available fruit juice and flavour milk shakes samples were discussed. The use of ATR measurements in front of the use of transmission ones can be justified by the good signal to noise ratio obtained in a wide range of wavenumbers, being less affected by the presence of water than transmission measurements.

Hierarchical cluster analysis has been used for selecting samples for calibration dataset, using triplicate measurements distance as internal distance to compare how different the clusters are. This is an interesting attribute. Due to the high heterogeneity of the sample population, the lowest root-mean-square error of prediction was obtained when the number of samples extracted from each cluster for the calibration set equals the root square of the number of samples in the cluster.

The cluster classification of sample population, from the mid-IR spectra is mainly related to the total amount of carbohydrates and fats, and therefore to the energetic value.

With regards to the application of the ATR correction algorithm, it has been shown that although it affect the dendrogram, it does not affect the sample selection stage using the internal cut-off distance provided by the replicate analysis of samples. Moreover, this correction has only a slight effect on the prediction performance.

The performance of the developed methodology favourably compares with that obtained in previous works in much restricted sample composition and the proposed methods are suitable for complying with the US-FDA statutory values.

Acknowledgments

The financial support of the Oficina de Ciència i Tecnologia de la Conselleria d' Innovació i Competitivitat de la Generalitat Valenciana (Project GV 01-249, Grupos 03-118 and invited professor F.A. Iñón grant) and the University of Buenos Aires (X013) is acknowledged.

References

- [1] B.G. Davis, A.J. Fairbanks, *Carbohydrate Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2002.
- [2] FDA (United States Food and Drug Administration) Nutrition Labeling Manual, 1998. <http://www.fda.gov>.
- [3] P. Cunniff, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, Washington, 1995.
- [4] D.M. Sullivan, D.E. Carpenter, *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*, AOAC International, Washington, 1993.
- [5] J. Tewari, M. Joshi, A. Gupta, R. Mehrotra, S. Chandra, *J. Sci. Ind. Res.* 58 (1999) 19.
- [6] J. Irudayaraj, J. Tewari, *Appl. Spectrosc.* 57 (2003) 1599.
- [7] M. Gestal, M.P. Gomez-Carracedo, J.M. Andrade, J. Dorado, E. Fernandez, D. Prada, A. Pazos, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 225.
- [8] I.F. Duarte, A. Barros, I. Delgado, C. Almeida, A.M. Gil, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3104.
- [9] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, *Appl. Eng. Agric.* 16 (2000) 543.
- [10] F.A. Iñón, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 401.
- [11] F.J. Rambla, S. Garrigues, N. Ferrer, M. de la Guardia, *Analyst* 123 (1998) 277.
- [12] S. Garrigues, F.J. Rambla, M. de la Guardia, *Fresen. J. Anal. Chem.* 362 (1998) 137.
- [13] R. Kellner, B. Lendl, I. Wells, P.J. Worsfold, *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 227.
- [14] F. Cadet, B. Offmann, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 166.
- [15] F. Cadet, *Talanta* 48 (1999) 867.
- [16] E.K. Kemsley, J.K. Holland, M. Defernez, R.H. Wilson, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3864.
- [17] S. Sivakesava, J.M.K. Irudayaraj, R.L. Korach, *Appl. Eng. Agric.* 17 (2001) 815.
- [18] F.A. Iñón, J.M. Garrigues, S. Garrigues, A. Molina, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 59.
- [19] A. Lorber, K. Faber, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1620.
- [20] A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, F.A. Inon, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 189.
- [21] D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193.
- [22] H.J. Luinge, E. Hop, E.T.G. Lutz, J.A. van Hemert, E.A.M. de Jong, *Anal. Chim. Acta* 284 (1993) 419.
- [23] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.B. Fateley, J.G. Graselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston, 1991.
- [24] S. Sasic, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 163.
- [25] N. Blanco, V. Cerdà, *Quimiometria*, Bellaterra: Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 1988.
- [26] K. Faber, B.R. Kowalski, *J. Chemometr.* 11 (1997) 181.
- [27] A.C. Olivieri, *J. Chemometr.* 16 (2002) 207.

J. Moros · F. A. Iñón · M. Khanmohammadi ·
S. Garrigues · M. de la Guardia

Evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectrometry (ATR–FTIR) and chemometrics to the determination of nutritional parameters of yogurt samples

Received: 30 November 2005 / Revised: 28 February 2006 / Accepted: 5 March 2006 / Published online: 17 May 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract A critical evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy (ATR–FTIR) and partial least squares (PLS) to the determination of several nutritional parameters, such as the energetic value and the carbohydrate, protein and calcium contents, in commercially available yogurt samples was carried out. To this end, a highly heterogeneous population of 48 samples covering a wide range of yogurts obtained from the Spanish market was used. After correcting the spectra, hierarchical cluster analysis was performed in order to select a representative calibration set and the corresponding validation sample set. Different PLS models and several spectral windows were tested in order to evaluate their prediction capabilities for the validation set. For all nutritional parameters, with the exception of fat content, the procedure developed here provided good precision; the values obtained complied with the statutory values declared by the US FDA.

Keywords Carbohydrates · Fat · Protein · Calories · Yogurt · Hierarchical cluster analysis · PLS · Attenuated total reflectance · Infrared

Introduction

Cultured dairy foods are milk products that result from the fermentation of milk or its products by starter cultures (i.e., selected specific microorganisms) that produce lactic acid from lactose under controlled conditions [1]. A wide variety of cultured dairy foods differing in flavor and consistency are on the market. In this work, we have focused our attention on yogurt and flavored yogurts.

Yogurt-making is thought to have been originated by nomadic Balkan tribes thousands of years ago, probably first by accident and then as a means of preserving milk. Yogurt is defined as a dairy product that is the result of a mixture of milk and cream products that have fermented and coagulated. They are cultured by friendly bacteria such as *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, although other bacterial cultures (e.g., *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*) and select strains of other bacteria may be also used. The bacteria convert the milk sugar lactose into lactic acid. Moreover, sweeteners, flavorings and other ingredients may be added [2].

Nowadays, yogurt is made under carefully controlled conditions; pasteurized and usually homogenized milk is inoculated with the cultures, and then warmed in an incubator for several hours. Non-fat milk solids are often added to thicken the yogurt; this also adds protein. In some types of yogurt, the bacteria survive the processing; in other cases, the milk is pasteurized again after cultured, and the bacteria are destroyed [3].

Countries such as Germany, the United Kingdom, Holland, Finland, the USA, Canada and Australia use the term “yogurt” to denote not only traditional yogurt but also fermented milk that has undergone thermal treatment. On

J. Moros · S. Garrigues · M. de la Guardia (✉)
Analytical Chemistry Department, Universitat de Valencia,
Jerónim Muñoz building, C/ Dr. Moliner, 50,
46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: miguel.delaguardia@uv.es

F. A. Iñón
JENCK S.A.,
Av. Alvarez Thomas 228,
Buenos Aires, C1427CCP, Argentina

M. Khanmohammadi
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Imam Khomeini International University,
Qazvin, Iran

F. A. Iñón
Laboratorio de Análisis de Trazas, Departamento de Química
Inorgánica, Analítica y Química Física,
Universidad de Buenos Aires.

Argentina is that the term “yogurt” can only be applied to live dairy food in which lactic fermentation is carried out by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.

Despite the wide variety of commercial yogurts produced, according to the US Food and Drug Administration (FDA), there are three existing US federal standards of identity for yogurt: non-fat yogurt, low-fat yogurt and yogurt.

Plain yogurt is made from milks with different fat contents, and flavoring ingredients are not added. It contains not less than 3.25% milk fat and 8.25% non-fat solids. The addition of vitamins A and D is optional. Low-fat yogurt is similar in composition to yogurt except that it contains 0.5, 1, 1.5, or 2% milk fat. Non-fat yogurt contains less than 0.5% milk fat [1].

Many other steps are involved in the production of flavored yogurt, such as the addition of: i) sugar and either artificial flavorings or natural fruit (or both), ii) gelatin or stabilizers for a thicker texture, iii) solid fruit, where the fruit can either be at the bottom of the yogurt, ready to be mixed in by the consumer, or it can be pre-stirred into the yogurt.

Frozen yogurt, which resembles soft-serve ice cream in texture, is manufactured by freezing a pasteurized mix of milk, sweeteners and emulsifiers that is cultured after pasteurization. Since the product may be treated with a second pasteurization, frozen yogurt may or may not contain live, active cultures. Therefore, at present, there are no federal definitions or standards of identity for this kind of yogurt, although many states have established standards [3].

The International Dairy Foods Association (IDFA) and one of its constituent organizations, the Milk Industry Foundation (MIF), consider that the existing standards for non-fat yogurt, low-fat yogurt and yogurt are outdated and need revision to reflect and accommodate new technology related to food ingredients and processing methods as well as current consumer preferences. Also, it is in the best interest of both yogurt manufacturers and consumers for the FDA to modernize these standards to reflect food labeling changes that were enacted with the Nutrition Labeling and Education Act (NLEA) of 1990. Therefore, the FDA's Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) has a stated goal of developing a new rule that amends yogurt identity standards [4].

Faced with all of the aforementioned considerations, we considered that it would be interesting to carry out a systematic study of the kind of samples on the market in order to develop an easy way to determine the main nutritional parameters of yogurts based on their spectroscopic properties.

A bibliographic search was carried out in order to investigate previous work related to the analysis of nutritional parameters in yogurts by means of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and it was found that the most significant works related to the determination of cholesterol [5] and sorghum fermentation control [6].

Therefore, we decided to develop a fast and accurate

carbohydrate, fat and protein contents and the energetic value, in order to provide an appropriate tool for the quality control of these products that are widely consumed around the world.

As yogurts are basically fermented milk emulsions, we decided to evaluate the use of a ZnSe ATR cell for FTIR measurements, instead of transmission flow cells, in order to avoid problems encountered when measuring samples with high water contents and to aid sample manipulation and cleaning during the FTIR measurements.

Due to the heterogeneity of the proposed sample set, the selection of the calibration dataset is critical, and this issue was addressed using a previously developed methodology based on hierarchical cluster analysis [7].

Therefore, our efforts concentrated on selecting the best calibration set and spectral range for each analyte, which then minimizes both calibration and prediction errors.

Experimental

A Tensor 27 FTIR spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) controlled by Opus for Windows software and equipped with a Specacamp IN-Compartment Contact Sampler Horizontal ATR from Graseby Specac (Orpington, UK) was employed for spectral acquisition with a 45° crystal and a six-reflection ZnSe cell through the top-plate. Room and sample compartment temperatures were monitored using a mercury thermometer with a precision of ± 0.5 °C. Both temperatures did not differ significantly and were 26 ± 1 °C during the spectral acquisitions of all samples.

Samples

Forty-eight commercial yogurt samples were obtained from the Spanish market, covering a wide range of the available types of yogurt: plain, added-sugar or non-fat, low fat or high fat content, flavored yogurts, yogurt mousse, etc.

Reference concentration data for the nutritional parameters in the samples were provided by the manufacturers.

FTIR analysis

The original samples were placed in the same temperature-controlled room containing the spectrometer before carrying out the analysis.

The samples were shaken vigorously before the ATR cell was filled. After shaking, four replicate FTIR spectra were taken for each sample. As the samples were converted into emulsions after shaking, the effect of the acquisition time and the possible separation of the yogurt emulsion into two phases in the ATR cell were assessed.

Taking into account our previous works [7–9], the

scanned from 3,150 to 700 cm^{-1} , averaging 49 scans per spectrum with a nominal resolution of 8 cm^{-1} and 23 s total measurement time.

Background and blank spectra were collected by filling the ATR plate cell with Millipore Q-purified water (Bedford, MA, USA) and then using the same instrumental conditions as those employed for the samples. Background and blank spectra were taken after each sample measurement to clean the ATR crystal and thus ensure that cross-contamination of IR spectra was minimized.

Both sample and blank spectra were collected in the absorbance mode. The wide absorption bands at around 2,400 and 2,260 cm^{-1} related to atmospheric CO_2 could have been minimized by purging the ATR cell with N_2 ; however, this was considered unnecessary, and these bands were cut from the raw spectra because they were in IR regions that do not provide any relevant information about the samples.

Data analysis

Data obtained from Opus were exported in text format and analyzed using Matlab from The Mathworks Inc. (South Natick, MA, USA). In-house-written Matlab functions were used for hierarchical cluster analysis in order to evaluate the similarity between samples in terms of their ATR-FTIR spectra and to assess the number of characteristic subsets into which the samples could be divided.

Similar criteria to those already published for milk and fruit juice classification were used [8, 9]. Multivariate calibration calculations were made with the MCVI toolbox [10].

In order to validate the FTIR-PLS methodology, various quality indicators were used. These included the mean difference (d_{x-y}) between the predicted FTIR-PLS values (\hat{C}_i) and the reference data (C_i), the standard deviation of the mean difference (s_{x-y}), the quality coefficient (QC) and the pooled standard error of prediction for validation samples (s_{reg}) [11]. As stated by Massart et al., the QC is preferred to the correlation coefficient (\hat{C}_i vs C_i) "not only because it gives a better idea of the spread in the data points around the straight line fit, but also because it gives some indication of the percentage error to be expected for the estimated concentration". QC was calculated as the mean-square-sum of the relative prediction error of each validation sample (predicted minus actual concentration) divided by the actual concentration. Several figures related to the model's fit to the data and the predictive power, such as the root mean square error of calibration (*RMSEC*), the root mean square error of cross-validation (*RMSECV*) and the root mean square error of prediction (*RMSEP*) were also used [9, 10, 12, 13]. In all cases, the aim was to estimate the average deviation of the model from the data.

Several spectral windows were tested in order to evaluate the prediction capabilities of the corresponding models for the validation set. Only the most significant results are shown here.

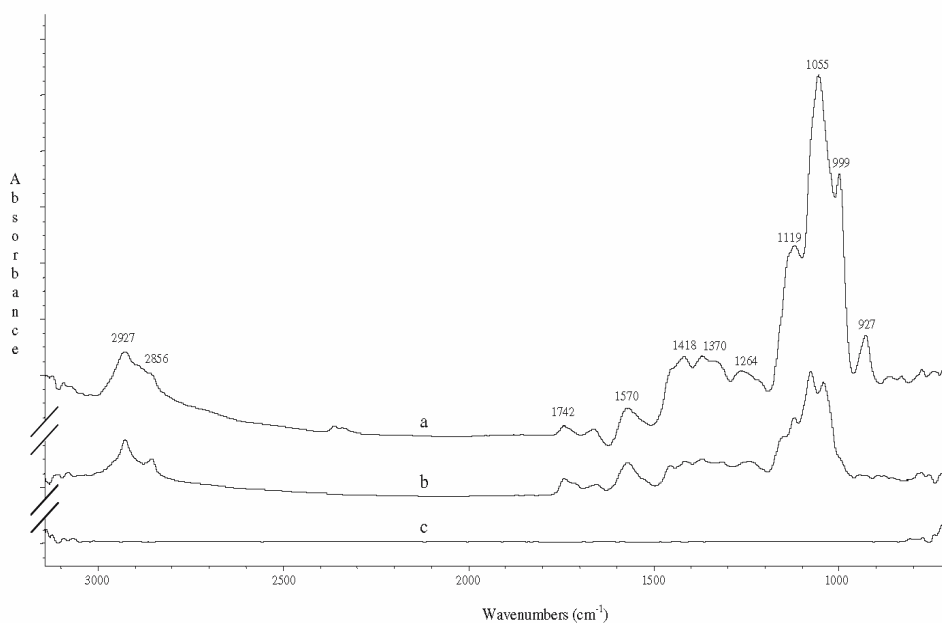


Fig. 1a–c ATR-FTIR spectra of an added-sugar (a) and a plain 49 scans per spectra. Note: the spectra were obtained after the

Cluster analysis

In hierarchical cluster analysis, the similarity between samples is established using the concept of a “distance” (calculated using a mathematical relationship; i.e., the Euclidian norm) between samples which is related to how similar the numerical properties of the samples are (e.g., the absorbance at different wavelengths). Each sample is linked to the closest sample or group of samples and a characteristic distance is used to describe this union. This distance between groups of samples can be evaluated in different ways, and is the main difference between the common linkage methods (Ward, complete, average, etc.) [9]. For this study, the Euclidean normal and Ward methods were used.

Results and discussion

First of all, in order to minimize cross-contamination and to establish an appropriate strategy for cleaning the ATR cell between samples, different procedures were tested using background and blank controls. Satisfactory results were achieved when the samples were removed from the ATR device with water.

To evaluate the possibility of spectral changes during spectral acquisition due to the variability in the process of depositing the sample into the ATR cell, spectra were collected at one minute intervals from an ATR cell filled with a high-fat sample. No significant changes in the spectra were observed after seven minutes, thus showing the homogeneity and stability of the yogurt emulsion.

Yogurt FTIR spectra

Figure 1 shows the spectra of a plain and an added-sugar yogurt and a Milli-Q-water blank for the complete spectral range collected.

The main wavelengths related to the proteins, carbohydrates and fats present in yogurt samples are also apparent in this figure [14, 15]. Bands located around the so-called fatty acid region ($3,050$ to $2,800$ cm^{-1}) at $2,926$ and $2,856$ cm^{-1} can be ascribed to peaks that mark the vibrations of the CH_2 and CH_3 groups of the fatty acids present in yogurt samples, respectively. The band at $1,742$ cm^{-1} is centered on a region where protein and peptide bands dominate, and it can be associated with the $\text{C}=\text{O}$ stretch of an ester or carboxylic acid function.

On the other hand, the region between $1,570$ cm^{-1} and $1,259$ cm^{-1} is a mixed region containing vibrational bands of fatty acids, proteins and polysaccharides (i.e., $\text{C}=\text{O}$ stretches of amide I groups, $\text{C}=\text{C}$ stretches of nonconjugated *trans*- and *cis*-lipids, $\text{N}-\text{H}$ bends of amide II groups, etc.). Finally, the high absorbance region located at $1,200$ – 900 cm^{-1} is dominated by polysaccharide peaks; note the 927 cm^{-1} band related to the presence of added sugar (sucrose), which is

Correction of ATR-FTIR data

Upon comparing all of the ATR-FTIR yogurt spectra collected from the samples, a significant shift in the baseline was observed. Therefore, the raw ATR-FTIR spectra were corrected by subtracting the average absorbance in a fairly flat region ($1,800$ – $1,880$ cm^{-1}) from each spectrum, thus eliminating additive artifacts. The corrected spectra were used in further calculations.

Classifying yogurt samples into clusters based on their FTIR spectra

In order to evaluate possible classes among the samples considered, a clustering method was carried out before PLS data treatment. In our opinion, this is a very important task that allows us to properly select a representative calibration set, thus improving the prediction of unknown samples.

Taking into account our previous works [7–9], we selected dendrogram classification using a Euclidean distance with Ward linkage upon considering the scores for each sample in terms of the principal components (PC, or factors) obtained after performing principal component analysis (PCA) on the mean-centered spectral data.

Figure 2 shows the dendrographic classification of samples obtained with three factors, using Ward linkage. From this figure ten different types of samples could be identified.

It is important to note that the dendrogram was built using both of the regions between $3,000$ and $2,820$ cm^{-1} and $1,810$ and 900 cm^{-1} , avoiding the other spectral regions as they were considered to be uninformative in terms of yogurt composition.

Table 1 shows the means and the standard deviations of the nutritional parameters of the ten clusters obtained, ordered from the top to the bottom of Fig. 2. As can be seen

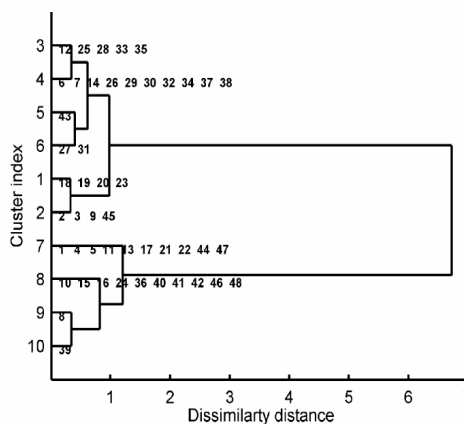


Fig. 2 Dendrographic classification of yogurt samples based on the

Table 1 Characteristics of the samples into clusters after dendrographic classification

Cluster index	Number of samples	Energetic value (kJ/100 g)		Protein (g/100 g)		Fat (g/100 g)		Carbohydrate (g/100 g)		Calcium (mg/100 g)		Samples
		mean	± s	mean	± s	mean	± s	mean	± s	mean	± s	
oup 1	1	163	7	4.2	0.1	0.1	0.0	4.9	0.5	99	59	18, 19, 20, 23
	2	235	52	3.5	0.3	2.6	1.5	4.2	0.4	123	6	2, 3, 9, 45
	3	161	24	4.5	0.4	0.1	0.0	4.6	0.7	89	78	12, 25, 28, 33, 35
	4	191	34	4.3	0.5	0.9	1.0	4.9	1.0	80	66	6, 7, 14, 26, 29, 30, 32, 34, 37, 38
	5	426	-	5.0	-	7.0	-	4.8	-	150	-	43
oup 2	6	168	37	3.9	0.8	0.1	0.0	5.4	1.0	142	24	27, 31
	7	375	35	3.5	0.5	2.5	0.9	12.8	0.6	109	37	1, 4, 5, 11, 13, 17, 21, 22, 44, 47
	8	381	47	3.5	0.4	2.4	1.1	13.6	0.4	49	61	10, 15, 16, 24, 36, 40, 41, 42, 46, 48
	9	670	-	4.7	-	9.3	-	14.5	-	121	8	8
	10	624	-	4.2	-	8.1	-	14.9	-	109	39	-

note: ±s refers to the standard deviation (of the mean)

by comparing the information contained in both Table 1 and Fig. 2, the separation between the two main groups seems to be related to their carbohydrate content, which is directly correlated with the intensity of the main ATR-FTIR band. In each group, samples were separated into clusters according to other parameters such as protein, fat, and calcium contents, as well as carbohydrate content.

Selecting the calibration set

The number and nature of the samples to be used for calibration are always critical factors in multivariate analysis. In the present work, these factors were chosen based on the results from hierarchical cluster analysis, using the dendrogram of Fig. 2 to select the calibration and validation datasets. In this sense, the selection criterion was to use at least one sample from each cluster for calibration. If the cluster contained more than one sample, the number of samples used for calibration was approximately the square root of the total number of samples included in the cluster; the remaining samples were integrated into the validation data set (samples were randomly selected). So, the number of samples assigned to the validation set was equal to or higher than the number of samples employed for calibration.

Based on this approach, we established a single model that used 19 samples for calibration and 29 samples for prediction, as shown in Table 2.

Moreover, in order to evaluate how representative the aforementioned calibration and validation sets really are, an extended calibration model was also assayed. In this case, the number of samples placed in the validation set was the square root of the number of samples in the cluster (unless there was only one sample in the cluster), and the rest of the samples were included in the calibration set. So, the new extended calibration set comprised 32 samples, and the remaining 16 samples were used to validate the model.

Both models were used for to determine each sample parameter via PLS-ATR-FTIR using the corresponding region of the IR spectrum, and the results were compared in terms of RMSECV and RMSEP. In order to keep this contribution concise, only the most important results are shown here (in other words, those that are most relevant when evaluating the proposed methodology).

Determining the nutritional parameters

For each one of the parameters considered, a PLS calibration model that had been optimized in terms of both spectral range and the number of factors employed was developed. In the following sections, the process and results obtained for energetic values, total carbohydrates, proteins, calcium and fat determination will be described. On the other hand, Fig. 3 shows the net analyte signal (NAS) vectors [19] obtained for those parameters for which

Table 2 Mean values for the nutritional parameters considered in this study for both single model and extended model calibration and validation sets, established after dendrographic classification of all yogurt samples

Single model	Number of samples	Energetical value (kJ/100 g)		Proteins (g/100 g)		Fat (g/100 g)		Carbohydrates (g/100 g)		Calcium (mg/100 g)	
		Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s
Calibration	19	334	154	4.1	0.7	2.7	3.0	9.4	4.2	135	22
Validation	29	268	106	3.8	0.5	1.6	1.4	8.4	4.4	125	6
Extended model	Number of samples	Energetical value (kJ/100 g)		Proteins (g/100 g)		Fat (g/100 g)		Carbohydrates (g/100 g)		Calcium (mg/100 g)	
		Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s	Mean	± s
Calibration	32	295	137	3.9	0.7	2.1	2.3	8.8	4.4	129	16
Validation	16	277	100	3.9	0.4	1.7	1.4	8.6	4.4	127	12

Determining the energetic value of yogurt

Spectral ranges were chosen using the moving window strategy, thus minimizing the RMSEP values. In fact, the spectral ranges used to predict the energetic values of yogurt samples were the 1,076–1,230 cm^{-1} and the 1,083–2,850 cm^{-1} regions. Table 3 shows the best energetic value prediction capabilities shown by the PLS-ATR-FTIR technique based on both calibration sets and spectral ranges.

The reproducibility of the determination, established from the mean standard deviation of each replicate and the standard error of prediction, which includes the uncertainty in the model [16, 17], were 4 and 40 kJ/100 g, respectively.

For comparative purposes, it is worth noting that the US FDA's acceptable levels of variation, based on the rounding rules of this organization, are 21 and 42 kJ/100 g for samples with energetic values lower than 210 and higher than 210 kJ/100 g, respectively [18]. These reference values indicate that the $s_{x,y}$ value of 30 kJ/100 g obtained by the procedure developed here is acceptable.

For both calibration sets employed and the two spectral ranges evaluated, good regressions were obtained between the predicted energetic values of the yogurt samples and the actual values.

Determining total carbohydrates

A similar procedure to that followed when determining energetic values in yogurts was used to build a calibration-prediction model for total carbohydrates. The spectral regions between 1,369 and 1,601 cm^{-1} and from 1,045 to 1,161 cm^{-1} were used to evaluate the aforementioned parameter. Table 4 shows the best prediction capabilities achieved for carbohydrate content using both models assaying over these two spectral ranges.

It is clear from Table 4 that the extended calibration model achieved the best results.

Table 4 also gives the figures of merit and total carbohydrate prediction capabilities for both calibration sets. For the reduced set of 19 samples, the $d_{x,y}$ and the $s_{x,y}$ values were 0.3 and 0.7 g/100 g, respectively. The mean standard deviation of each replicate and the standard error

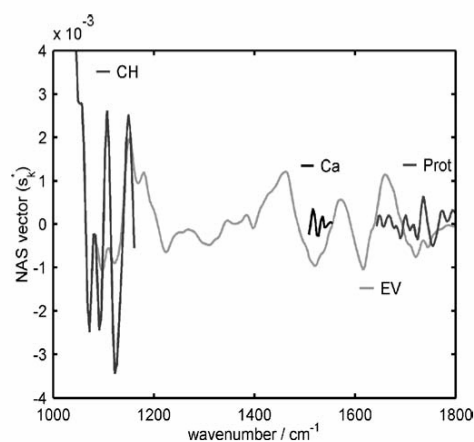


Fig. 3 Net analyte signal (NAS) vectors obtained for the parameters

Table 3 Prediction capabilities of PLS-ATR-FTIR when determining the energetic values of yogurt samples

	Single model	Extended model
Number of factors	6	7
Spectral range (cm^{-1})	1076–1230	1083–2850
RMSEP (kJ/100 g)	41	36
RRMSEP %	15	13
$d_{(x,y)}$ (kJ/100 g)	5	-5
$s_{(x,y)}$ (kJ/100 g)	30	40
QC %	14	15
S_{trip} (kJ/100 g)	4	4
S_{reg} (kJ/100 g)	40	12

Note: RRMSEP is the RMSEP divided by the mean energetic value from the validation dataset. S_{trip} and S_{reg} are the standard deviation of four replicates and the standard error of prediction respectively. $d_{(x,y)}$ and $s_{(x,y)}$ are the mean difference and the standard deviation of the mean difference between the predicted

Table 4 Total carbohydrate prediction capabilities of PLS ATR FTIR for the yogurt samples

	Single model	Extended model
Number of factors	5	4
Spectral range (cm ⁻¹)	1369 1601	1045 1161
RMSEP (kJ/100 g)	0.8	0.8
RRMSEP %	9	10
$d_{(x \rightarrow)}$ (g/100 g)	0.3	0.04
$s_{(x \rightarrow)}$ (g/100 g)	0.7	0.9
QC %	14	10
S_{trip} (g/100 g)	0.09	0.02
S_{reg} (g/100 g)	0.3	0.11

Note: for an explanation of the terms used in the table, see the footnote for Table 3

of prediction for this parameter were 0.09 and 0.3 g/100 g, respectively. Also, a good regression between the predicted and actual values of total carbohydrates was obtained for the samples assayed.

The US FDA rounding increment is 1 g/100 g carbohydrates for samples containing over 1 g/100 g, whereas the insignificance amount is 0.5 g/100 g [18]. From the results obtained, it is clear that the proposed method complies with these statutory values.

Determining proteins

Two spectral regions were used for PLS-ATR-FTIR when determining protein in yogurt. Table 5 shows the analytical results obtained for this parameter upon assaying both calibration sets.

The reproducibilities of these protein determinations, established from the mean standard deviation of each triplicate and from the standard error of prediction, were 0.03 and 0.08 g/100 g, respectively. Moreover, it is worth noting that the correlation between the predicted values and the actual ones shows good linearity.

The US FDA rounding increment for protein is similar to that for carbohydrates: 1 g/100 g for samples containing

Table 5 Prediction capabilities of PLS ATR FTIR when determining the protein contents in yogurt samples

	Single model	Extended model
Number of factors	5	7
Spectral range (cm ⁻¹)	1515 1800	1643 1800
RMSEP (g/100 g)	0.2	0.3
RRMSEP %	7	7
$d_{(x \rightarrow)}$ (g/100 g)	-0.06	0.005
$s_{(x \rightarrow)}$ (g/100 g)	0.3	0.3
QC %	7	7
S_{trip} (g/100 g)	0.03	0.07
S_{reg} (g/100 g)	0.8	0.6

over 1 g/100 g, whereas the insignificance amount is 0.5 g/100 g [18]. In this sense, the results achieved when determining this parameter using the proposed method agree with US FDA statutory values.

Determining calcium

Since the calcium in yogurt is normally associated with casein, and yogurt is produced through milk fermentation, we considered the possibility of determining calcium in yogurt by PLS-ATR-FTIR in the same way as we did for milk in a previous work [8]. After evaluating different spectral regions, the region between 1,461 and 1,636 cm⁻¹ was considered suitable for Ca determination.

The reproducibilities of the determinations, established from the mean standard deviation of each triplicate and the standard error of prediction, were 0.7 and 2 mg/100 g, respectively. A RRMSEP value similar to that obtained for protein was found for Ca determination, which justified the indirect estimation of Ca by evaluating casein bands. Table 6 shows the figures of merit and Ca prediction capabilities of the single and the extended models.

The US FDA rounding increment for Ca is 1% of the daily value based on a daily intake of 2,000 calories. For adults and children of four or more years of age, this is 1% of 1,000 mg [18]. From the results obtained, we can conclude that the proposed method complies with these statutory values. However, it should be noted that the PLS-ATR-FTIR determination of Ca used here is an indirect method, and thus may only be suitable for naturally occurring Ca.

Determination of fat

No matter whether PLS models based on the single calibration dataset or the extended one were used, and no matter which spectral range was considered, it was not possible to obtain accurate estimates for the fat in the yogurt samples, probably due to the strong overlap of the lactic acid bands between 1,700 and 1,000 cm⁻¹ with those

Table 6 Prediction capabilities of PLS ATR FTIR for calcium in yogurt samples

	Single model	Extended model
Number of factors	4	6
Spectral range (cm ⁻¹)	1461 1636	1461 1636
RMSEP (mg/100 g)	9	9
RRMSEP %	8	7
$d_{(x \rightarrow)}$ (mg/100 g)	3	0.2
$s_{(x \rightarrow)}$ (mg/100 g)	9	10
QC %	8	8
S_{trip} (mg/100 g)	0.7	1.9
S_{reg} (mg/100 g)	2	8

from the fatty components. Therefore, it is our preliminary conclusion that the determination of fat content in yogurt samples by ATR-FTIR requires further work, such as including lactic acid data during modeling.

Conclusions

Performing ATR measurements instead of transmission measurements permits easier manipulation of yogurt samples and reduces the effect of water on the IR measurements.

Due to the heterogeneity of the sample population, it is necessary to use hierarchical cluster analysis to select the calibration data set, since cluster classification based on the mid-IR spectra of yogurts is mainly related to the total amount of carbohydrate, fat and protein, and therefore to the energetic value of the yogurt in question.

Good estimations were obtained for all nutritional parameters, including Ca, with the exception of fat content, where the estimation technique may be impeded by the presence of lactic acid bands in the IR region of where fatty compounds absorb.

It should be noted that the results obtained by the proposed method for most of the nutritional parameters comply with the US FDA statutory values.

Upon comparing the results obtained using single and extended models, which had different numbers of samples in their calibration sets, it is clear that the inclusion of additional samples affects the optimum spectral range to be used when determining the nutritional parameters of the yoghurts, and it also tends to increase the number of factors required for an accurate analysis. This indicates that the PLS-ATR-FTIR analysis of yogurt samples is not very robust. Therefore, the technique requires further development, such as the addition of more data, for example the lactic acid content, or its application needs to be restricted to samples produced in a similar way.

Acknowledgements The financial support from the Oficina de Ciència i Tecnologia de la Conselleria d' Innovació i Competitivitat de la Generalitat Valenciana (Project GV 01-249, Grupos 03-118 and the grant for the invited professor F.A. Iñón), Universitat de València (Project UV-AE-20050203) and the University of Buenos Aires (X013) is acknowledged. Professor Khomeini acknowledges Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

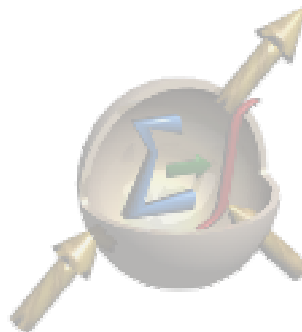
References

1. National Dairy Council (2000) Yogurt and other cultured dairy products. National Dairy Council, Rosemont, IL (see http://www.nationaldairyCouncil.org/nationaldairyCouncil/nutrition/products/product_yogurt.pdf, last accessed 5th May 2006)
2. Herbst ST (2001) The new Food Lover's Companion, Barron's Educational Series Inc, 3rd ed, Hauppauge, NY
3. Institute of Food Technologists (2005) Teacher resources: introduction to the food industry, Chicago, IL (see <http://www.ift.org/cms/?pid=1000413>)
4. CFSAN (2005) CFSAN 2005 program priorities. Center for Food Safety & Applied Nutrition, US Food and Drug Administration (FDA), College Park, MD (see <http://www.cfsan.fda.gov>, last accessed 5th May 2005)
5. Paradkar MM, Irudayaraj J (2002) *Int J Dairy Technol* 55:127-132
6. Correia I, Nunes A, Duarte IF, Barros A, Delgado I (2005) *Food Chem* 90:853-859
7. Iñón FA, Garrigues JM, Garrigues S, Molina A, de la Guardia M (2003) *Anal Chim Acta* 489:59-75
8. Iñón FA, Garrigues S, de la Guardia M (2004) *Anal Chim Acta* 513:401-412
9. Moros J, Iñón FA, Garrigues S, de la Guardia M (2005) *Anal Chim Acta* 538:181-193
10. Olivieri AC, Goicoechea HC, Iñón FA (2004) *Chemom Intell Lab Syst* 73:189-197
11. Massart DL, Vandeginste BG M, Buydens LMC, de Jong S, Lewi PJ, Verbeke J (1997) *Handbook of chemometrics and qualimetrics (Parts A and B)*. Elsevier, Amsterdam
12. Haaland DM, Thomas EV (1988) *Anal Chem* 60:1193-1202
13. Luíng HJ, Hop E, Lutz ETG, van Hemert JA, de Jong EAM (1993) *Anal Chim Acta* 284:419-433
14. Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG (1991) *Infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*, Academic, London
15. Kümmerle M, Scherer S, Seiler H (1998) *Appl Envir Microbiol* 64:2207-2214
16. Faber K, Kowalski BR (1997) *J Chemom* 11:181-238
17. Olivieri AC (2002) *J Chemometr* 16:207-217
18. Sullivan DM, Carpenter DE (1993) *Methods of analysis for nutrition labeling*. AOAC Int., Washington, DC
19. Lorber A, Faber K, Kowalski BR (1997) *Anal Chem* 69:1620-1626

“Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy and Neural Networks for Measuring Nutritional Parameters in Chocolate Samples”

Javier Moros, Fernando A. Iñón,
Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta 584 (2007) 215 - 222





Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples

J. Moros^a, F.A. Iñón^b, S. Garrigues^{a,*}, M. de la Guardia^a

^a Analytical Chemistry Department, Universitat de Valencia, Jerònim Muñoz Building, C/Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Research and Development, JENCK S.A., Av. Álvarez Thomas 228 Buenos Aires (C1427CCP), Argentina

Received 20 July 2006; received in revised form 26 October 2006; accepted 6 November 2006

Abstract

A rapid and non-destructive method has been developed for the characterization of chocolate samples based on diffuse reflectance near-infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and artificial neural networks (ANNs). This methodology provides a potentially useful alternative to time-consuming chemical methods of analysis. To assess its utility, 36 chocolate samples purchased from the Spanish market were analyzed for the determination of the main nutritional parameters like carbohydrates, fat, proteins, energetic value and cocoa content.

Direct triplicate measurements of each sample were carried out by DRIFTS. Cluster hierarchical analysis was used for selecting calibration and validation data sets, resulting in a calibration set comprised of 19 samples and a validation data set of 17 samples. As it is common the presence of non-linear effect in reflectance spectroscopy, ANNs was chosen for data pretreatment. The root-mean-square error of prediction (RMSEP) values obtained for carbohydrates, fat, energetic value and cocoa were 1.0% (w/w), 1.0% (w/w), 50 kJ (100 g)⁻¹ and 1.4%, respectively. The mean difference (d_{x-y}) and standard deviation of mean differences (s_{x-y}) of the carbohydrates, fat, proteins content, energetic value and cocoa content were 0.9 and 2.4% (w/w), 0.2 and 1.0% (w/w), 9.1 and 50 kJ (100 g)⁻¹, and -0.5 and 1.4%, respectively. The maximum error for the prediction (QC) of any of these three parameters for a new sample did not exceed 5.2%.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Carbohydrates; Fat; Protein; Energetic value; Chocolates; Near-infrared reflectance spectroscopy; Neural networks

1. Introduction

Chocolate is commonly referred by the public as the solid cocoa and fat combination, sweetened with sugar and other ingredients, that is made into bars. It describes a number of raw and processed products originated from the fermented, roasted, and ground beans taken from the pod of the tropical cocoa tree *Theobroma cocoa* native to Central America with more than one billion people worldwide consuming some form of it every day.

Moreover, chocolate is an extremely popular ingredient in many kinds of sweets, chocolate candy, ice creams, cookies, cakes, pies, and desserts, and is available in many presentations. Different forms and flavors of chocolate are produced by varying the amount of the ingredients. Other flavors can be obtained by varying the time and temperature when roasting the beans [1].

All foods, including chocolate and cocoa products, have a nutritional value that is related to the amount and kind of carbohydrates, fats, and proteins that they contain.

Cocoa and chocolate main fat is the cocoa butter but also can contain other edible fats. Despite of the presence of a great variety of amino acids in cocoa protein and an approximate pure protein content of 25% in cocoa solids, cocoa and plain chocolate are not an important source of protein as would be expected. Carbohydrates in the form of sugars are present in high quantities in chocolate products.

Chocolate is made from many different recipes and contains extra ingredients in addition to cocoa products. Therefore, the nutritional value will vary with the ingredients. For example, dark chocolate has a high proportion of cocoa solids and will therefore retain more of the nutritional value of cocoa than milk chocolate which has a lower proportion of cocoa than dark one. In milk chocolate, the milk provides a rich source of proteins which the body can use and so its protein value is higher than that of dark chocolate [2].

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3158; fax: +34 96 354 4838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

The presence of cocoa, milk and sugar in chocolate composition is the warranty of an appropriate ingestion of proteins, carbohydrates, fats, minerals and vitamins [3].

Under the Nutrition Labeling and Education Act (NLEA) regulations, most food products are required to display nutrition information on their packages. This information is considered necessary by the government to provide a nutritional guidance for consumers.

Faced to all the aforementioned considerations and taking into account that quality control of dairy food products is becoming more and more important nowadays since national and international authorities are setting quality levels for certain parameters, we considered that it would be interesting to carry out a systematic study about chocolate samples in order to develop a fast and accurate alternative method of analysis for quality control applications which allows us to determine the main nutritional parameters of chocolate like carbohydrates, fat, proteins and energetic value based on their spectroscopic properties using Diffuse Reflectance near-infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS).

There are in the scientific literature many analyzed procedures proposed for the determination of a series of compounds in chocolate, like theobromine and caffeine (methylxanthines) [4], serotonin, histamine [5], phenethylamine and spermidine [6] (biogenic amines), and lead, cadmium and nickel (minerals) [7] using traditional labor-intensive and/or time-consuming methods established for food constituents. Additionally, there are a few applications of vibrational procedures for the analysis of this kind of samples and thus the potential of infrared spectroscopy as a method for detecting adulteration on chocolate [8] or for predicting its quality [9] were investigated.

On the other hand the use of near-infrared (NIR) spectroscopy for the prediction of nutritional parameters (like sucrose, lactose, fat and moisture) and rheological properties (viscosity and yield) in chocolates has been reported by Tarkosová and Copiková [10]. The method proposed in this paper is based on the use of partial least squares (PLS) algorithm to create calibration models and the application of the first or second derivative transformation of the original NIR spectra in order to obtain the best accuracy.

In the present study, a highly heterogeneous population of chocolates, including unsweetened chocolate, dark chocolate, couvertures, milk chocolate, semi-sweet chocolate, bittersweet chocolate, white chocolate and cocoa cream, thus covering a wide range of chocolates obtained from the Spanish market was used.

Due to the heterogeneity of the proposed sample set, the selection of calibration dataset is a critical point, which was addressed using a previously developed methodology based in hierarchical cluster analysis [11].

Therefore, direct efforts have been conducted for selecting the best calibration set and spectral range for each analyte that minimizes both calibration and prediction errors

2. Experimental

A Bruker model Multipurpose Analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer controlled by OPUS[®] for Windows[®] software from Bruker GmbH (Bremen, Germany) and equipped with an integrating sphere was employed for spectra acquisition. The instrument has a single detector onto which the radiation is focused by means of the integrating sphere. Room temperature was monitored using a mercury thermometer and was kept at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ during spectra acquisition.

2.1 Samples

Thirty-six commercial chocolate samples were obtained from the Spanish market, covering an important range of available types of chocolates. Table 1 summarizes a brief description of samples assayed in this study.

Concentration reference data of nutritional parameters of the samples were established by reference procedures provided by the producers.

2.2 Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) analysis

Original samples were placed in the same temperature controlled room where the spectrometer was located before to carry out the analysis.

Samples were directly deposited covering the sample compartment cell. After that, triplicate DRIFT spectra were recorded for each sample. Taking into account previous works [12], the following instrumental conditions for carrying out the appropriate measurements were selected: chocolate sample spectra were scanned from 714 to 2857 nm ($14,000$ to 3500 cm^{-1}) by averaging 36 scans per spectrum using a nominal resolution of 8 cm^{-1} which take 16.8 s as measurement time per spectrum.

Spectra were recorded in Kubelka–Munk units being, in this way, directly corrected for the fact that radiation of a higher wavelength penetrates further into the sample and it is thus better absorbed.

The background spectrum was acquired from the integrating sphere using the same instrumental conditions than those employed for samples. High background stability has been found in all the cases. Therefore it was considered unnecessary to scan a new background spectrum after the measurement of each sample. To ensure that cross-contamination of FT-NIR spectra was minimized, the crystal cell compartment was cleaned using slightly acetone wet soft paper after each sample spectrum.

For the measurement of each sample replicate, the sample was rotated to achieve a higher measured sample volume taking into account the heterogeneity of the solid samples.

2.3 Data analysis

Table 1
Composition of chocolate samples employed in this study

Sample no.	Description	Energetic value (kJ(100g) ⁻¹)	Carbohydrates (g(100g) ⁻¹)	Fat (g(100g) ⁻¹)	Protein (g(100g) ⁻¹)	Cocoa (%)
1	High-milk chocolate	2287.0	57.4	32.1	6.5	26
2	Chocolate with milk	2142.0	63.9	25.9	5.7	25
3	Dark chocolate	2054.0	58.7	26.3	4.9	44
4	Sugar free	1678.0	60.6	24.5	5.3	38
5	Superfine chocolate with milk	2412.0	47.0	40.0	7.8	33
6	Chocolate with milk and fructose	2318.0	48.0	36.0	10.0	34
7	Superfine chocolate fondant	2129.0	48.2	32.5	6.3	55
8	Hazelnut cream	2227.0	57.0	31.0	6.5	7.4
9	Cocoa cream with hazelnuts	2276.0	56.5	33.4	4.7	8.5
10	Cocoa cream with hazelnuts	2259.8	58.5	31.9	5.0	6
11	Bitter chocolate with fructose	2165.0	41.0	36.0	8.0	60
12	Bitter dark chocolate	2508.0	44.0	44.0	7.7	72
13	Superfine chocolate with milk	2306.8	55.7	33.0	7.8	30
14	Superfine chocolate with milk	2122.0	64.9	25.1	5.5	30
15	Bitter chocolate 100% BIO/EKO	2081.0	43.0	33.0	6.0	58
16	Grands Chocolats – Dark Ecuador	2199.0	43.5	36.4	6.6	60
17	Dark chocolate for sweetening	2232.0	60.0	30.0	6.0	52
18	Superfine dark chocolate	2112.0	54.0	29.8	5.4	49
19	Superfine chocolate with milk	2201.4	57.2	30.0	7.0	30
20	Swiss premium chocolate with milk	2240.0	57.0	31.0	6.5	30
21	Dark chocolate for sweetening	2232.0	60.0	30.0	6.0	52
22	Chocolate with milk 100% BIO/EKO	2266.0	51.0	34.0	7.0	32
23	Chocolat – Chocolate with milk	2260.0	59.0	31.0	6.5	30
24	Chocolate fondant without cholesterol. Maltitol as edulcorant	1921.0	50.0	34.0	6.0	N.A.
25	Chocolate Grand Fondant	2204.0	54.0	32.0	6.0	55
26	Noir – Dark chocolate with cocoa seeds	2314.0	46.0	37.0	9.6	72
27	Selection – Dark chocolate	2475.0	36.0	47.0	7.3	75
28	White chocolate	2258.0	62.0	30.0	5.5	N.A.
29	Gold – White chocolate	2285.0	56.0	32.0	8.0	24
30	White chocolate	2281.0	58.3	31.6	7.1	N.A.
31	White chocolate	2352.0	54.8	35.1	7.0	29
32	Chocolate with milk	2240.0	60.0	30.0	6.5	30
33	Gold – Dark chocolate	2285.0	56.0	32.0	8.0	55
34	Dark chocolate	2177.0	50.5	32.8	6.1	52
35	Cup chocolate	2027.0	60.6	24.5	5.3	37.5
36	Superfine chocolate with milk	2274.0	53.6	33.3	7.4	33

N.A.: value not available.

hierarchical cluster analysis to evaluate the similarity between samples in terms of their NIR spectra and to assess the number of characteristic subsets in which the available full set of samples could be divided [13].

For building and optimizing neural networks models, a Tyler-made Graphical User Interface (GUI) for maximizing the potential of the neural network calibration routines of the ChemoAC Toolbox was used [14].

The following figures for the model's fit to the data and the predictive power were used throughout the text: PRESS, RMSEC, RMSEP, RRMSEP, d_{x-y} , s_{x-y} , QC and s_{trip} . In all cases the scope was to evaluate the average deviation of the model from the actual data.

PRESS is the sum of squares prediction error for the model, which includes A factors. The root-mean-square error of calibration (RMSEC) is a measure of how well the model fits the

capabilities, parameters as the root-mean-square error of prediction (RMSEP) and the relative root-mean-square error of prediction (RRMSEP) were also reported [15].

Different quality indicators such as the absolute mean difference (d_{x-y}) between predicted values (\hat{C}_i) and reference data (C_i), the standard deviation of mean differences (s_{x-y}), the quality coefficient (QC) and the pooled standard error of prediction for validation samples (s_{trip}) [16] were also provided for validation of the proposed methodology.

In artificial neural network models, many factors for building calibration models such as (i) the requirement or nor of a previous principal component analysis (PCA) for reducing the number of variables, and in this case, the number of extracted component; (ii) the topology of the network (number of input and output nodes); (iii) the type of transfer function; must be taken into consideration.

sidered. In all the cases, the number of hidden layers was fixed to one.

Cluster analysis was used as an exploratory data analysis tool which aims at sorting different objects into groups in a way that the degree of association between two objects is maximal if they belong to the same group and minimal otherwise. Thus, cluster analysis simply discovers structures in data without explaining why they exist. Hierarchical clustering method uses the dissimilarities (similarities) or distances (calculated using a mathematical relationship) between objects when forming the clusters based on how similar the numerical properties of the samples are (e.g., the absorbance at different wavelengths). Each sample is linked to the closest sample or group of samples and a characteristic distance is used to describe this union.

The most straightforward way of computing distances between objects in a multi-dimensional space is to compute Euclidean distances, being that used for this study. Distance between groups of samples was evaluated in different ways, and is the main difference between the common linkage methods (Ward, complete, average, etc.) [17].

In this study cluster analysis was used as a filter for an objective selection of the calibration and validation data sets.

3. Results and discussion

3.1. DRIFT spectra of chocolates

Fig. 1 shows the diffuse reflectance NIR spectra, acquired in Kubelka–Munk units, of six different types of chocolates for the spectral region compressed between 1000 and 2700 nm.

From spectra depicted in Fig. 1 it can conclude that all the samples considered present the same bands, being the spectrum of the cocoa cream with hazelnuts that which presents the highest difference in terms of sensitivity and bands structure.

It is well known that cocoa butter is a main ingredient in chocolate and besides cocoa butter, chocolate also contains sugar and cocoa mass. These ingredients contribute to the spectral signals because of the content of peptide and carbohydrate bonds. In this sense, from the NIR spectra it was possible to distinguish peaks at 1728 nm (5786 cm^{-1}), 1761 nm (5678 cm^{-1}),

and 1213 nm (8247 cm^{-1}), which match the C–H bonds in CH_2 groups. Besides the common peaks cocoa butter also had absorbance peaks corresponding to C–H bonds in both CH and CH_2 groups and, furthermore, C=C and =C–H bonds.

Spectra also show amide II and amide III bands at 2010 nm (4975 cm^{-1}) and 2050 nm (4878 cm^{-1}), which means that cocoa butter, and consequently chocolate, contains a small amount of protein.

Moreover, chocolate spectra show peaks, indicating that they contain sugar, e.g. O–H absorbance in sucrose at 1440 nm (6944 cm^{-1}) and 2080 nm (4808 cm^{-1}).

NIR spectra of fatty acids and esters contain bands at 1180, 2143 and 2190 nm. Other specific bands of fat located at 2304 and 2343 nm due to the presence of milk in chocolate are also present [18,19].

3.2. Classifying chocolate samples into clusters based on their DRIFT spectra

Before data treatment, a clustering method was applied in order to evaluate possible classes among the samples considered. As we have commented in previous works [11,15], this is a very important task that allows to select a representative calibration set on a proper way, thus improving the prediction of unknown samples.

Based on our previous results for other kind of samples, Euclidean distance with Ward linkage was selected for this purpose, upon considering the scores for each sample in terms of the principal components (PC, or factors) obtained after performing principal component analysis (PCA) on raw (not centered) spectral data.

Dendrographic classification of the 36 chocolate samples considered, obtained with five factors, is depicted in Fig. 2. As

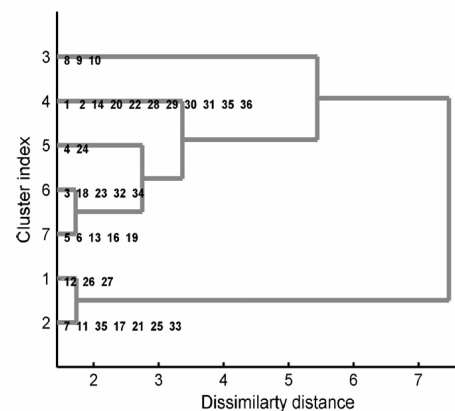
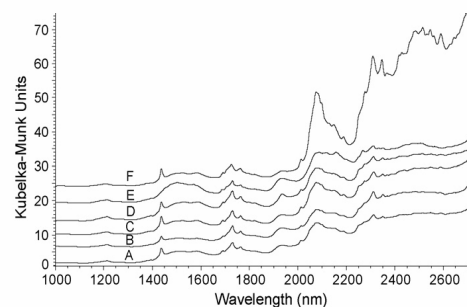


Fig. 2. Dendrographic classification of samples using the Euclidean distance after PCA analysis of diffuse reflectance-NIR spectra. Cut-off distance was set

Table 2
Characteristics of the sample clusters obtained after dendrographic classification

Cluster index	Number of samples	Carbohydrates (g (100 g) ⁻¹)		Fat (g (100 g) ⁻¹)		Proteins (g (100 g) ⁻¹)		Energetic value (kJ (100 g) ⁻¹)		Cocoa (%)		Sample clusters
		Mean	±s	Mean	±s	Mean	±s	Mean	±s	Mean	±s	
Group 1												
1	3	42	5	43	4	8.2	1.1	2432	90	73.0	1.7	12, 26, 27
2	7	52	7	32	2	6.6	0.9	2190	66	55	3	7, 11, 15, 17, 21, 25, 33
Group 2												
3	3	57.3	1.0	32.1	1.2	5.4	0.8	2254	22	7.3	1.3	8, 9, 10
4	11	58	4	30	4	6.5	0.9	2230	91	30	4	1, 2, 14, 20, 22, 28, 29, 30, 31, 35, 36
5	2	55	6	29	5	5.7	0.4	1800	133	38		4, 24
6	5	56	4	30	2	5.9	0.7	2169	80	41	10	3, 18, 23, 32, 34
7	5	50	5	35	3	7.8	1.2	2287	83	37	13	5, 6, 13, 16, 19

Note: See Fig. 2 and Table 1 for details.

it can be seen, seven different types of samples could be identified on using the cut-off value of 1.6 obtained by considering a statistical difference among samples.

It must be noticed that dendrogram was built using the spectral region compressed between 1073 and 2634 nm, avoiding the other spectral regions as they were considered to be uninformative in terms of chocolate composition.

Table 2 summarizes the mean and the standard deviation of each nutritional parameter for the seven clusters obtained just as the reference of samples contained in each one of the groups formed ordered from the bottom to the top of Fig. 2.

As can be seen by comparing the information contained in Table 1, Fig. 2 and that detailed by the manufacturer, the separation between the two main groups seems to be related to the cocoa content. In this sense group 1 contains dark chocolates with high cocoa content between 50 and 70% and group 2 includes mild taste chocolate containing around 35% cocoa and cocoa creams.

Into group 1, separation between clusters 1 and 2 seems to be do attending to the cocoa, fat and protein content, because the absorbance intensity is mainly related with the amount of carbohydrates.

For the given group 2, separations into 2 important groups are achieved (cluster 3 versus clusters 4, 5, 6, 7). It is clear that cluster 3 corresponds to cream samples with the lowest cocoa content while the remaining clusters include samples with around high cocoa content.

Clusters 6 and 7 seem to be separated according to the protein content.

On the other hand, cluster 5 includes samples containing maltitol (a reduced calorie bulk sweetener); this fact can be check by the decrease of the energetic value for this cluster.

Finally, samples included into cluster 4 seem to be discriminate according to their protein content.

Based on the fact that it was possible to detect a cluster structure underneath the sample and to interpret those clusters based on the different nutritional parameters in study, the analysis with this method can be considered appropriate for an adequate selection of the calibration dataset.

3.3. Selection of the calibration set

Based on the dendrogram obtained under aforementioned conditions, calibration and validation datasets were built using the criterion based on selecting at least one sample of each cluster for calibration. For clusters containing more than one sample, the number of samples selected for validation was approximately the root square of the total number of samples included in the cluster, being the remaining samples assigned to the calibration data set. So, the number of samples assigned to the calibration was equal or higher than the number of those employed for validation. Samples within a given cluster were selected randomly.

Following the aforementioned rules, the calibration and validation sets comprising 19 and 17 samples, respectively, were established. Table 3 summarizes the descriptive statistics (mean and standard deviation) of the calibration and validation sets considering each nutritional parameter to be determined. As can

Table 3
Descriptive statistics of calibration and validation datasets used for DRIFT analysis of chocolates

Data set	Number of samples	Mean ± s				
		Carbohydrates (g (100 g) ⁻¹)	Fat (g (100 g) ⁻¹)	Proteins (g (100 g) ⁻¹)	Energetic value (kJ (100 g) ⁻¹)	Cocoa (%)

be seen the selection of the calibration data set can be considered representative of each cluster in all the cases.

3.4 Prediction models based on artificial neural networks (ANNs)

Among the multiple developed artificial neural network structures available nowadays, that chosen for this work was a double-layer feed-forward type with the error back-propagation learning rule. We suggest to a reader with little experienced on this subject to read the excellent review of Despagne and Massart which address all details of ANNs [14].

Basically, a neural network is a set of mathematical functions (each one called a neuron) interconnected by an underneath structure. In the optimization process of ANNs, the parameters related to each function (known as the bias and weight values of the transfer-function of each neuron) are calculated based on spectral and concentration values of the calibration dataset explored in order to minimize the RMSEP values of a monitoring dataset. The output result of a neuron is given through an “output nodes” and in each model it was fixed to one. Thus the optimization of an ANN for each nutritional parameter has been carried out.

Input data for a neuron (in our case spectral data) can be either the raw spectra acquired or the result of any data reduction procedure based on the raw spectra. Due to the high number of wavelengths and the power of calculation for dealing with them in the training process of ANNs, it is almost impossible to construct and optimize the neurons from the original variables. Therefore a compression technique (a pre-treatment based on PCA) has been adopted in order to reduce the number of variables entering into the neurons. Thus, models are building based on the scores of extracted principal components (PCs), rather than using raw spectral data.

It is important to note that PCA is a linear compression method and ANNs are preferable employed for non-linear systems. Thus, and in contrast to normal PCA analysis in which only the most significant PCs are kept, in ANNs higher PCs has to be evaluated to model non-linearity aspects which cannot be extracted from the most significant PCs [14]. Therefore, when applying this reduction technique, it is important to construct a surface response curve to evaluate how many PCs should be kept. Optionally, the original data can be auto-scaled before performing PCA. We have tested the use of PCA with and without auto-scaled spectra, and in all the cases better predictive results were achieved using raw spectra. In contrast to PLS, normally, in ANNs, it is not necessary to mean-center input variables before training since the biases act as offsets in the model. ANNs training is not based on variance–covariance maximization, and therefore it is not necessary to scale the different variables to unit variance. The only constraint for ANNs is to scale each input variable so that training starts within the active range of the non-linear transfer functions. In this work samples were range-scaled with a linear mapping called min–max scaling determined for

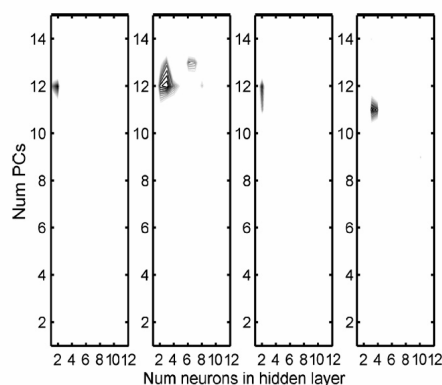


Fig. 3. Contour plots for RMSEP values for ANNs treatment of DRIFT spectra of chocolates. From left to right: carbohydrates, fat, energetic value, and cocoa. All neurons in the hidden layer have a hyperbolic tangent transfer function.

is varied. From these plots it is possible to choose the optimum number of PCs and neurons (considering only hyperbolic tangent transfer function for the hidden layer and linear one for the output layer). Under these conditions, the optimum number of PCs and neurons for (i) carbohydrates, (ii) fat, (iii) energetic values and (iv) cocoa were: (i) 12 and 2, (ii) 12 and 3, (iii) 12 and 2, and (iv) 11 and 3. As it can be seen, in all the cases the optimum number of PCs was around 12, although the contribution of the 12th principal components to the global variance is less than 0.01%. Results for protein content determination are not shown; because RMSEP values were considered unacceptable for estimation of this parameter and the best obtained QC value was 9.2% (see below).

In the case of other parameters, the behavior of non-linear neurons has been checked by means of a plot of the hidden nodes activation of calibration or validation data at the end of training [14]. If the activation of a given hidden node is only done in the linear part of the transfer function then this node may be replaced by a linear transfer function. In contrast, when it is activated in a non-linear portion, it suggests the presence of a non-linear behavior then linear function should not be used. Thus, it is possible to obtain information on the degree of non-linearity of a given data set and to replace non-linear neurons by linear ones. This analysis allows specific neurons to catch linear and non-linear behaviors of the data.

Fig. 4 shows, for cocoa, the activation of the nodes by validation samples. As it can be seen, in some nodes the activation occurs in the linear portion, whereas in other occurs in the non-linear portion. The same happens in the remaining analytes, except for energetic value in which all the nodes have activations in the non-linear portion. Therefore for each analyte the number of linear and non-linear neurons has been evaluated in terms of the RMSEP value. Table 4 summarizes different characteristics of the optimum ANN model built for all the considered parame-

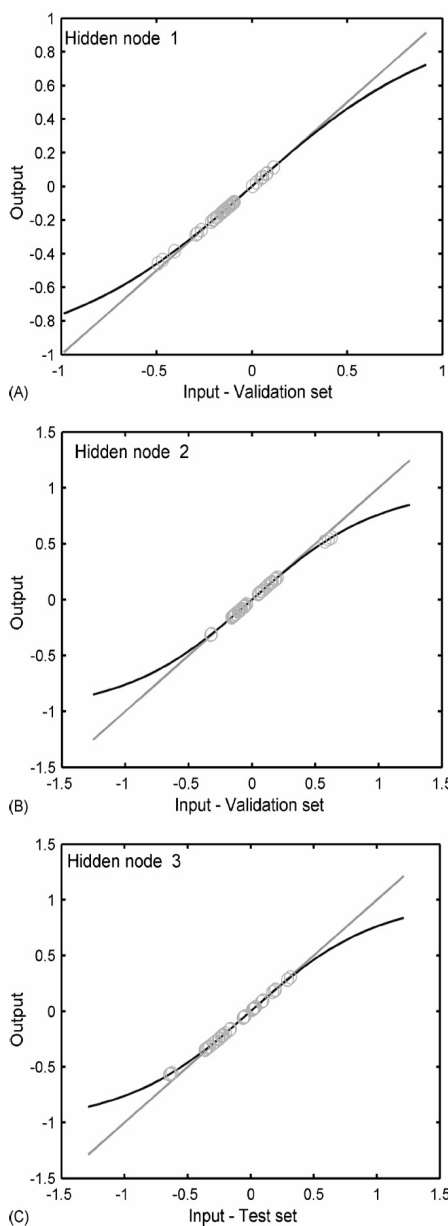


Fig. 4. Activation nodes for ANNs-DRIFT analysis of cocoa in chocolates considering non-linear transfer function. All neurons in the hidden layer have a

Table 4
Prediction capabilities of a NN-DRIFT for carbohydrates, fat, energetic value and cocoa in chocolate samples

	Carbohydrates	Fat	EV	Cocoa
Factors	12	12	9	12
Topology first layer ^a	LH	LHHHHH	HHHHHH	LH
RMSEC ^b	2.5	1.2	27	1.2
RMSEP ^b	1.0	1.0	50	1.4
RRMSEP (%)	3.3	3.3	2.4	3.5
$d_{(x-y)}$ ^b	0.9	0.2	9.1	-0.5
$s_{(x-y)}$ ^b	2.4	1.0	50	1.4
QC (%)	5.2	3.1	2.4	3.3
s_{rep} ^b	0.5	0.5	8.8	0.6

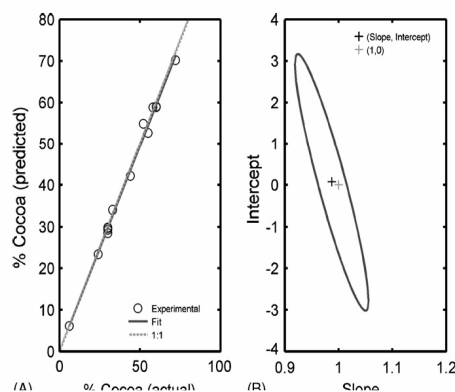
^a L and H mean a neuron with a linear and hyperbolic transfer function, respectively. In all the cases the topology of the hidden layer was a single neuron with a linear transfer function. For additional details see the text.

^b Values given in % (w/w) except for energetic value (EV) that are expressed in kJ(100 g)⁻¹.

were kept in the optimized model and the topology of the network consisted in 1 linear and 5 non-linear neuron in the hidden layer. For energetic value the model was based on 6 non-linear neurons in the hidden layer and 9 extracted factors. Finally, for cocoa 12 PCs were kept and only 2 neurons were required (1 linear and 1 non-linear) in the hidden layer.

Table 4 also includes the figures of merit obtained under the aforementioned conditions. RMSEP values are 1.0% (w/w), 1.0% (w/w), 50 kJ(100 g)⁻¹ and 1.4% (w/w) for carbohydrates, fat, energetic value and cocoa, respectively. The maximum percentage of error values to be expected for new determinations (QC) of these nutritional parameters were 5.2, 3.1, 2.4 and 3.3%, respectively. The reproducibility of the determination, established from the pooled standard deviation of predicted concentrations in each triplicate, were, 0.5% (w/w), 0.5% (w/w), 8.8 kJ(100 g)⁻¹ and 0.6% (w/w), for carbohydrates, fat, energetic value and cocoa, respectively.

In the case of protein, although a relative good RMSEC value was obtained, the prediction capabilities of the best obtained



model were unacceptable for us, yielding a RMSEP value of 0.61% (w/w), a QC value of 9.2% but a poor correlation between actual and predicted values in the validation data set. Therefore, ANNs-DRIFT is not proposed for the quantification of protein in chocolates.

Our special interest was focused on cocoa, because there are few methods published for its determination and none of this based on NIR data. Fig. 5 shows the plot of the regression between the predicted concentration and the reference values for samples in the prediction dataset, including the elliptic joint test for the slope and the intercept. As it can be seen there is an excellent agreement between predicted and actual values, thus proving the proposed method a unique, fast, and reliable cocoa measurement in chocolates.

4. Conclusions

In this work the possibility of the use of FT-NIR for the estimation of the main nutritional parameters in chocolates is reinforced. Since no chemicals or time-consuming sample preparation processes are necessary, NIR spectroscopy provides an ideal analytical method for at-line and in-line measurements not only for the finished products, but also for raw materials or in-process materials.

In this paper, we have demonstrated the useful tool provided by NIR spectroscopy combined with neural network analysis for the successful prediction of the main nutritional parameters of chocolates. Good results for carbohydrates, fat, and energetic value were achieved with QC values lower than 5.2%, and mainly remarkable are results obtained for the determination of the cocoa percentage, based on diffuse reflectance FT-NIR spectra with a QC value of 3.3%, maybe related to physical characteristics, such as colour, rheological properties, etc., highly correlated with the NIR spectrum shape.

The use of hierarchical cluster analysis based on the NIR spectra proposed for selecting samples for calibration and validation datasets, instead of the use of a randomly selection, is an interesting methodology, which allows an objective and appropriate selection of calibration data set in order to include, inside the model, a suitable representation of different samples composition.

It is remarkable the fact that the ANNs model can handle non-linearities occurring in DRIFT spectroscopy. Finally, as the

activation of the nodes lies in non-linear portions, the use of ANNs instead of PLS is justified.

Acknowledgments

Authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604, FEDER) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (Project ACOMP6-161) and the grant for the invited professor F.A. Iñón.

References

- [1] <http://en.wikipedia.org>.
- [2] <http://www.icco.org> (International Cocoa Organization).
- [3] C.M. Campos, T.H.D. Benedet, *Boletim da Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28 (1994) 113.
- [4] A.G. Caudle, L.N. Bell, *J. Am. Dietetic Assoc.* 100 (2000) 690.
- [5] P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparò, S. Cavalli, G. Saccani, *J. Chromatogr. A*, 1098 (2005) 111.
- [6] G.B. Baker, J.T.F. Wong, R.T. Coutts, F.M. Pasutto, *J. Chromatogr.* 392 (1987) 317.
- [7] S. Dahiya, R. Karpe, A.G. Hegde, R.M. Sharma, *J. Food Compos. Anal.* 18 (2005) 517.
- [8] Y.B. Che Man, Z.A. Syahariza, M.E.S. Mirghani, S. Jinap, J. Bakar, *Food Chem.* 90 (2005) 815.
- [9] A.M.C. Davies, J.G. Franklin, A. Grant, N.M. Griffiths, R. Shepherd, G.R. Fenwick, *Vib. Spectrosc.* 2 (1991) 161.
- [10] J. Tarkosová, J. Copíková, *J. Near Infrared Spectrosc.* 8 (2000) 251.
- [11] F.A. Iñón, J.M. Garrigues, S. Garrigues, A. Molina, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 59.
- [12] J. Moros, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Talanta* (2006), doi:10.1016/j.talanta.2006.09.027.
- [13] A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, F.A. Iñón, *Chemometr. Intell. Lab. Tech.* 73 (2004) 189.
- [14] F. Despagné, D.L. Massart, *Analyst* 123 (1998) 157R.
- [15] J. Moros, F.A. Iñón, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 181.
- [16] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (Part A and B)*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997.
- [17] P.H.A. Sneath, R.R. Sokal, *Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco, 1973.
- [18] B.G. Osborne, T. Fearn, P.H. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy*, Longman Scientific & Technical, Harlow, UK, 1993.
- [19] G. Svenstrup, H. Heimdal, L. Nørgaard, *Int. J. Food Sci. Tech.* 40 (2005) 953.

C
a
c
í
t
u
l
o
3

Calibración de segundo orden

“Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis”

Javier Moros, Fernando A. Iñón,
Salvador Garrigues y Miguel de la Guardia

(Enviado para su publicación)



$$\underline{X} = \begin{matrix} C_1 \\ a_1 \\ b_1 \end{matrix} + \begin{matrix} C_2 \\ a_2 \\ b_2 \end{matrix} = \begin{matrix} C \\ A \\ B \end{matrix}$$

Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis

J. Moros^a, F. A. Iñón^b, S. Garrigues^{a*} and M. de la Guardia^a

^a *Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

^b *Research and Development, JENCK S.A., Av. Álvarez Thomas 228 Buenos Aires (CCP1427) Argentina*

First and second-order multivariate calibrations were assayed for the determination of vinegar acidity using a mechanized procedure based upon vibrational spectroscopy and the emerging multicommutation methodology. The second-order methodology relies on the use of a flow system based on multicommutation and binary sampling. The flow network comprises a set of 3-way solenoid valves, computer-controlled to provide facilities to handle the sample, pH gradient generator, and carrier solutions. The procedure is based on the volumetric fraction variation approach that maintains the same volume of sample solution and varies the pH gradient generator solution step by step. The analysis of second-order Absorbance-pH matrices was performed using parallel factor analysis (PARAFAC). Results were compared with first-order absorbance data analyzed with linear calibration and partial least-squares regression (PLS) and they were employed for a discussion of the relative advantages of the applied chemometric tools. As excellent accuracy is obtained without the need of any sample pre-treatment, the procedure can be fully mechanized (i.e., by means of an auto-sampler device).

Accuracy was assessed by comparing the results with those obtained by titration reference procedure.

Keywords: multicommutation, second-order calibration, parallel factor analysis (PARAFAC), partial least square (PLS), vinegars, acetic acid

1 Introduction

material of agricultural origin, containing starch, sugars or starch and sugars, by the process of double fermentation, alcoholic and acetous, that can constrain a specified amount of acetic acid.

The United States Food and Drug Administration (FDA) require that any product called "vinegar" contain at least 4% acidity. The Codex standard proposed a minimum of 6% for wine vinegar and 5% for others because the percent of acetic acid present in the product varies according to what they are made from. Vinegars also contain other components, such as esters, and possibly small amounts of sugars, thus the determination of acidity can not distinguish between true vinegar and a product made by dilution of synthetic acetic acid.

In this paper we have explored the possibilities of attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FT-IR) spectroscopy for the quality control of commercially available vinegars. As vibration of the C=O of esters and carboxylic acid are overlapped,² the use of different chemometric techniques was evaluated.

Acetic acid in vinegars has been determined using different methodologies, such spectrophotometry using a fiber-optic sensor with a dye-modified chitosan/poly(vinyl alcohol),³ capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography with conductimetric detection,⁴ liquid chromatography and gas chromatography,⁵ titration system with spectrophotometric detection at 480 nm⁶ and by the use of a disposable voltammetric cell using three pencil leads as working, reference, and counter electrodes.⁷

However, in spite of the general use of IR techniques in the food industry in recent decades, no reference about the acetic acid determination using any vibrational procedure was found in the literature.

In the present work, a multicommutation-based ATR-FT-IR procedure based on pH gradient generation by using sodium hydroxide and hydrochloric acid was developed for acetic acid determination in commercial vinegar samples. This procedure presents many advantages as low-reagent consumption, the ability to handle various reagent solutions employing a multiple pumping channel, and two important characteristics related to the chemometric analysis of second-order bilinear spectroscopic data methodologies such as i) accuracy of the analysis in the case of complex multi-component samples in the presence of unsuspected constituents (achieved thanks to the so-called second-order advantage which is inherent to second-order data)⁸ and ii) another relevant issue concerns the figures of merit such as prediction errors (accuracy), precision, sensitivity among others.⁹

An important objective of this work has been to develop a spectroscopic methodology based on the use of a reduced set of aqueous synthetic standards, rather than to use natural samples. This is a very hard test for many predictive models (mainly those based on standard linear regression and first-order multivariate data), but is a very beneficial and important characteristic for end-users in routine analysis. As it is supported by the evidence shown below, we greatly succeeded to fulfill this objective.

2 Experimental

2.1 Apparatus and reagents

A Bruker Tensor 27 (Bremen, Germany) FT-IR spectrometer equipped with a temperature-stabilized deuterated tryglycine sulfate (DGTS) detector, was employed for spectral measurements, using the in-compartment ATR accessory DuraSamplIR II equipped with a 9 reflection diamond DuraDisk plate (Smiths Detection, Inc. Warrington, England).

For instrument control and data acquisition the OPUS program version 4.1 from Bruker was employed. Spectra treatment and data manipulation have been carried out using Omnic 2.1 and OmnicMacros 2.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

For the multicommutation-ATR-FT-IR measurements, the micro volume liquid cell with clamp (Smiths Detection, Inc. Warrington, England) was attached to the DuraDisk. A Gilson P-2 Minipuls peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) was employed for sample and standards introduction in the measurement cell.

Reaction coils and flow lines were made of Polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing (i.d. = 0.5 mm). Four NResearch 161T031 three-way solenoid isolation valves (Stow, MA, USA) and a 486 microcomputer equipped with a PCL 711S Advantech electronic interface, were also employed for the multicommutation experiments.

A program written in QUICKBASIC 4.5 was used for valve pulses program.

Glacial acetic acid ($\geq 99.5\%$) purchased from Fluka (Barcelona, Spain) was used to prepare standard solutions.

Reagent grade hydrochloric acid 37% and potassium hydroxide pellets were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) and were used to prepare solutions employed as carrier and pH gradient generation in multicommutation.

Potassium hydrogen phthalate primary standard grade for sodium hydroxide solution normalization was purchased from Carlo-Erba (Milan, Italy) and 2% phenolphthalein (Riedel-de Haën) solution in ethanol was used as indicator in the reference titration method.

2.2 Samples

Ten commercial vinegar samples were obtained from the Spanish market, covering an important range of available types of vinegars, such as wine vinegar, sherry vinegar, apple cider vinegar or balsamic vinegar. Table 1 shows a brief description of each sample.

Table 1 General description of samples employed in this study

Sample number	Type	Additional components	Acidity (% w/v)	
			Declared ^a	Titration ^b
1	Wine Vinegar	----	6	6.05 ± 0.03
2	Apple Cider Vinegar	----	5	5.009 ± 0.017
3	Aging Wine Vinegar	----	8	8.005 ± 0.017
4	Modena Balsamic Vinegar	Concentrated grape must and natural grape must	6	----
5	White Wine Vinegar	caramel	6	6.001 ± 0.017
6	Red Wine Vinegar	----	6	6.050 ± 0.017
7	Wine Vinegar	Garlic	6	6.07 ± 0.03
8	Apple Cider Vinegar	----	5	4.980 ± 0.017
9	Sherry Wine Vinegar	----	7	7.100 ± 0.017
10	Wine Vinegar	Tarragon	6	6.001 ± 0.017

^a Total acidity content declared by the manufacturer.

2.3 Reference procedure

Commercial vinegar samples were analyzed by titration to determine the total acidity content following the AOAC reference method.¹⁰ In this experiment a NaOH solution normalized with potassium hydrogen phthalate primary standard (ACS), was gradually added to a 5 mL of the vinegar solution. The complete neutralization was observed by the phenolphthalein added indicator color change. Samples were analyzed by triplicate and the average of the three analyses was used as reference value. The mean standard error (pooled standard deviation divided by the average acidity content) was 0.32%.

Apart from the tedious, slow and operator dependent results, one of the main drawbacks of the simple titration technique is that colored samples can not be directly analyzed. For example sample number 4 need to be decolorized first, if not it will mask the color change of the indicator.

In spite of the fact that in natural vinegar samples we were dealing with mixtures of acids rather than a single one, the general procedure is to quote values in terms of one of the acids (usually the one which predominates). So acidity value was calculated according to:

$$\text{Acidity content (\%)} = (\text{mass of Acetic acid/volume of solution}) \times 100$$

2.4 Direct analysis procedure by ATR-FTIR

Original samples and standards were placed in the same temperature controlled room where the spectrometer was located before to carry out the analysis. The sample compartment temperature was monitored and it remained stable at 26 ± 1 °C during the acquisition of ATR spectra of all analyzed samples.

Any previous chemical treatment on the sample was carried out on-line before filling the ATR cell. Standards and samples were poured directly into the ATR cell and the FT-IR spectra were taken as described below.

As all samples were free from appreciable solid material, the effect of the acquisition time and the possible deposition of substances on the ATR cell were not considered necessary to evaluate. This assumption was made based upon previous results reported by our laboratory in a much more complicated matrix, such as natural juices,¹¹ in which no effect on spectra was obtained in the time elapsed for spectra acquisition. In this sense, ensuring a compromise between rapidity and accuracy to carry out the quantitative analysis of samples using multireflection ATR the following conditions were chosen: sample spectra were scanned between 3800 and 700 cm^{-1} , by averaging 32 scans per spectrum with a nominal resolution of 4 cm^{-1} . The acquisition of each averaged spectrum requires 26.4 s.

The background and blank spectra were collected filling the ATR cell with Millipore Q-purified water (Bedford, MA, USA) and using the same instrumental conditions than those employed in the case of samples. Background spectrum was scanned at a height samples interval, while blank spectrum was collected after the measurement of each sample, for assessing that cross-contamination of IR spectra was avoided after cleaning the ATR crystal.

Both, sample and blank spectra were collected in the absorbance mode. The spectra of the three sub-samples of each sample were taken by refilling the ATR cell each time.

2.5 Proposed procedure based on multicommutation-ATR-FTIR

The manifold scheme depicted in Figure 1 was set up and the experimental steps detailed below were used for multicommutation based on-line procedure able to provide second order multivariate calibrations from pH gradient spectra.

Previously to start the multicommutation measurements a NaOH carrier solution background was established.

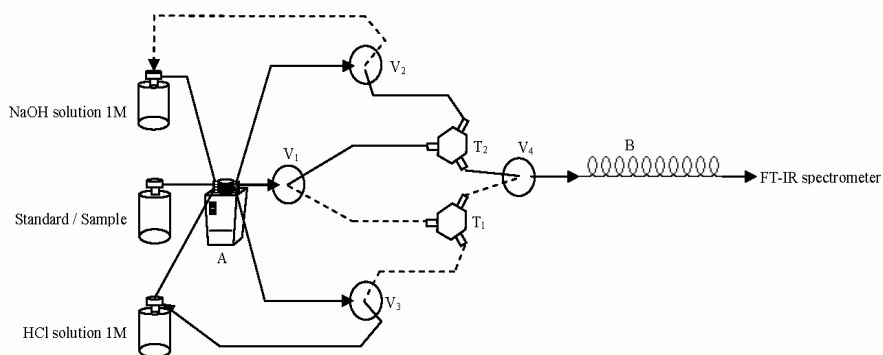


Fig. 1 Manifold employed for the multicommutation ATR-FT-IR determination of vinegar acidity through second order multivariate calibration. V_1 , V_2 , V_3 , and V_4 , three-way solenoid valves; B, mixing coil 22 cm length; A, peristaltic pump; T_1 and T_2 , joint points.

As it can be seen, the flow network comprises a set of four 3-way solenoid valves computer-controlled to provide facilities to handle the solutions by using a multiple pumping channel.

In the configuration indicated, when the control software was started, solenoid valves, V_1 , V_2 and V_4 were switched on (energized), thus standard or samples and NaOH solution flowed to the FT-IR spectrometer after mixing them through T_2 , while V_3 remained switched off (not energized) and HCl solution was flowed to its storage vessel by a recirculation system. Following the valves timing course strategy, the solenoid valve V_3 was switched on for a variable time fraction at the same time that V_1 , V_2 , V_4 were switched off. So, standards or sample and hydrochloric solutions were merged together through the confluence point T_1 and mixed into the reaction coil B generating a pH gradient during the displacement towards the spectrometer. Thus, the composition of the solution after valve V_4 was linearly varied from 100% of the solution flowing by the T_2 -junction (T_2) to a 0% (100% of the solution flowing by the T_1 T-junction) in 1 minute and then returns to the 100% after 1 minute. This is like to apply an “V” gradient shape for a period of 2 minutes. In each channel the dilution factor between the sample and the NaOH solution (or HCl solution) was the same and was controlled through the selection of the i.d. diameter of the lines and the chosen peristaltic tubes and the length of the PTFE tubes connected to V_2 and V_3 valves.

Each standard solution and each sample were measured at different pH values over time, and thus, a different spectrum was obtained for each pH value. It is possible to plot the time spectra series (Figure 2) recording for each sample as a function of the number of

the spectra, which in fact depends on the pH of the studied solution. So, time reproducibility is essential for pH-gradient reproducibility.

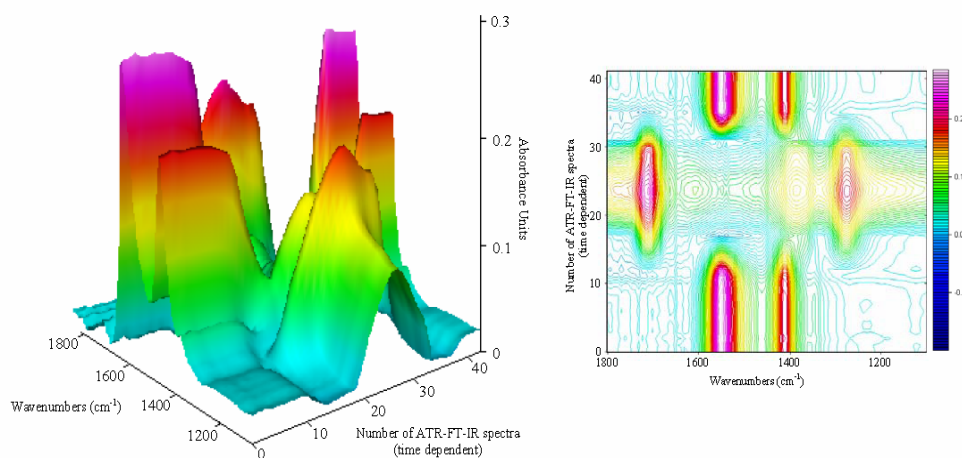
Three sub-samples were processed into the multicommutation system and the corresponding time dependent spectra series recording was continuously depicted from the transient signals obtained in the spectral range between 3800 and 700 cm^{-1} considering the following instrumental conditions: sample spectra were scanned, by averaging 6 scans per spectrum with a nominal resolution of 8 cm^{-1} . Under these conditions the acquisition of each averaged spectrum requires 3.64 s and the total spectral serie was recorded during 2.55 min .

The duration of the pH gradient was selected in order to be able to complete the analysis in about 3 minutes. It may be argued that this process can be improved by increasing the acquisition time; however, in such case the sample through put will decrease.

Taking into account the time for collecting each averaged spectrum, for each sample/standard solution 43 ATR-FT-IR spectra were obtained for each sample with a 3.6 s time interval.

2.6 Data Analysis

Data obtained from OPUS were converted to jcamp-dx file format and analyzed using OmnicMacros 2.1 and TurboQuant Analyst 6.0 software developed by Thermo Nicolet Corp.(Madison, WI, USA) for building the PLS calibration models and, on the other hand, exported in text format and analyzed using Matlab[®] from The Mathworks Inc. (South Natick, MA, USA) for second-order treatment.



For the evaluation of the different ATR-FT-IR methodologies assayed, several quality indicators were given. Among them, it was considered the mean difference ($d_{s,y}$) between ATR-FT-IR predicted values (\hat{C}_i) and titration reference data (C_i), the standard deviation of mean differences ($s_{s,y}$), the quality coefficient (QC) and the pooled standard error of prediction for validation samples (s_{reg}).¹² Several figures of model's fit to the data and predictive power, such as Root Mean Square Error of Calibration (*RMSEC*), and Root Mean Square Error of Prediction (*RMSEP*) were also used.¹³ In all the cases, the scope was to estimate the average deviation of the model from the reference data.

It is beyond the scope of this work to provide any theoretical background in parallel factor analysis (PARAFAC). The interested reader can address the Bro's review¹⁴ for particular details. In fact, second order calculations were done using MATLAB 6.0.

Appropriate routines for applying PARAFAC, developed by Bro, are available on internet,¹⁵ and were implemented through a useful MATLAB graphical interface for easy data manipulation and graphics presentation.

The aforementioned interface also implements other second order methods, such as, multi-way Partial Least Squares (N-PLS), self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD) and bilinear least-squares (BLLS), but for this work only PARAFAC was considered. Many comparisons between these methods have been published, and in general PARAFAC performance seems at least equals or better than the other ones.

The selection of restricted spectral regions was considered in order to decrease computation time. The number of factors was selected following *core consistency diagnostic* (CORCONDIA)¹⁶ and calibration curves were obtained using the pseudo-univariate calibration graphs strategy.¹⁴

As stated by Ferré and Faber¹⁷, in multivariate calibration not all the recorded data is used for prediction. The part of the recorded data that is related to the signal from the concomitants is lost. Only the data that can be uniquely assigned to the analyte is used. This part, called the net analyte signal (NAS), is calculated for sample i as $r_i^* = c_i s^*$, where c_i is the predicted concentration for sample i and s^* is the net sensitivity vector. On considering that PLS model is calculated on mean-centred data, c_i is the mean-centred prediction and r_i^* is the NAS for the mean-centred spectrum.

Using the NAS, the PLS model can be represented like a usual univariate calibration model, *i.e.*, as a scatter plot of the concentrations of standards and their signal (so-called pseudo-univariate calibration).

Due to N-PLS uses only a fraction of the number of parameters that PLS uses to model the spectral data, in a mathematical sense, N-PLS obtains optimal predictions with the simplest model. Therefore one can argue that the N-PLS model is the most appropriate model. However, the N-PLS model does not possess the uniqueness properties of PARAFAC. Improved results over unfolded-PLS and N-PLS were found with PARAFAC, SWATLD, and BLLS, methods that exploit the second-order advantage.¹⁸

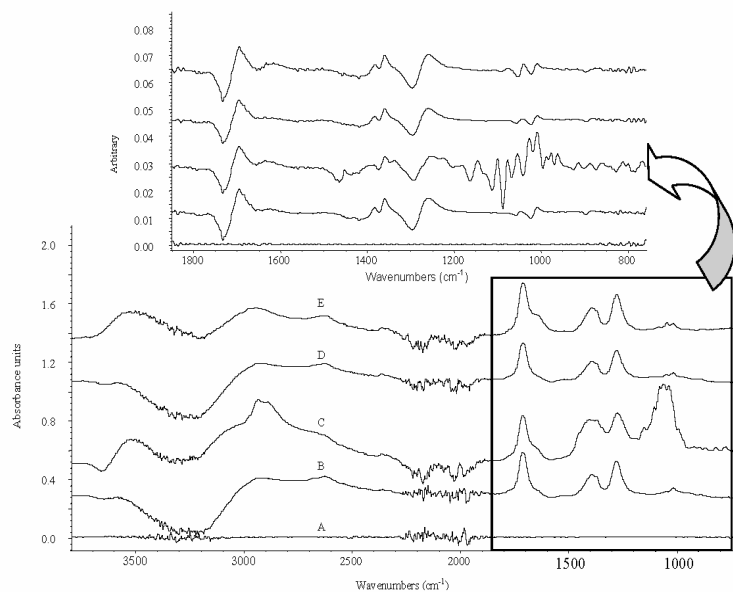


Fig. 3 ATR-FT-IR spectra for some evaluated vinegar samples: Modena balsamic vinegar (C), Red wine vinegar (D) and Sherry wine vinegar (E), compared with a pure acetic acid standard 6.56 % w/v (B) and a reference blank of Millipore Q-purified water (A), in the wavenumber range from 3800 cm^{-1} to 700 cm^{-1} . The inset

3 Result and discussion

3.1 Zero order approach

Figure 3 shows the ATR-FT-IR spectra for some evaluated vinegars compared with a pure acetic acid standard in water together with a reference blank of Millipore Q-purified water, in the wavenumbers range from 3800 cm^{-1} to 700 cm^{-1} . It can be seen in this figure the main bands of acetic acid which can be used for the acidity content determination.

On comparing the ATR spectra of acetic acid standard and raw vinegar samples it can be observed the presence of the principal bands, which seems to be appropriate for the determination of acetic acid, located at 1711 cm^{-1} , which could be assigned to the C=O group, and two bands near 1290 and 1410 cm^{-1} both involving interacting C-O stretch and C-O-H in-plane bending (stretch-open and stretch-bend).²

As it can be appreciate the region between 2317 and 1841 cm^{-1} was not considered, as it was observed that variations in this region can be ascribed to the lack of transparency of the diamond cell.

In order to choose the best analytical performance of the ATR-FT-IR determination of total acidity in vinegars, the aforementioned bands with the appropriate baseline correction criteria were evaluated using both, zero and first order derivative spectra (see inset in Figure 3). Table 2 summarizes the prediction capabilities of using univariate models in ATR-FT-IR.

In terms of sensitivity (results not shown), it is clear that peak area measurements provide at least one order magnitude of better sensitivity than peak height values. So, only the use of peak area absorbance measurement mode was considered.

Moreover, data in Table 3 report the % w/v of acetic acid in all vinegar samples tested using different univariate calibration models built from the direct ATR-FT-IR analysis compared with values obtained by the reference titration procedure.

As it can be appreciate in Table 2, in spite of models built, which shows good linearity and apparently low prediction errors, that seem to be suitable for carrying out the determination of acetic acid, data detailed in Table 3 evidence the lack of accuracy for some samples analyzed, possibly due to the signal contributions from other compounds present in the sample.

Table 2 Prediction capabilities of univariate models for the determination of vinegar total acidity by ATR-FT-IR using both, zero order absorbance and first order derivative measurements

Parameters	Univariate calibration models				
	Absorbance		First derivative		
	Model A	Model B	Model C	Model D	Model E
Peak Area (cm^{-1})	1303 - 1252	1745 - 1676	1712 - 1664	1279 - 1236	1374 - 1352
Baseline correction (cm^{-1})	1333	1500	1550	1150	1374
R ²	0.9992	0.9994	0.9994	0.996	0.9990
RMSEC (% w/v)	0.093	0.081	0.084	0.20	0.10
RMSEP (% w/v)	0.6	0.4	1.3	1.6	0.5
RRMSEP (%)	10	7	21	26	8
d _(xy) (% w/v)	-0.4	0.12	-1.1	-0.6	-0.4
s _(xy) (% w/v)	0.5	0.4	0.7	1.5	0.3
QC (%)	11	7	21	28	9
s _{trip} (% w/v)	0.004	0.009	0.08	0.06	0.09

Note: RMSEC is the Root Mean Square Error of Calibration; RMSEP is the Root Mean Square Error of Prediction and RRMSEP is the RMSEP divided by the mean value of acetic acid concentration in the validation dataset. s_{trip} is the standard deviation of 3 replicates. d_(xy) and s_(xy) are the mean difference and the standard deviation of mean differences between predicted and actual acetic acid concentration (% w/v), respectively. QC is the Quality coefficient.

Table 3 Data of total acidity of vinegar samples obtained by titration and by means direct ATR-FT-IR, using both, zero order absorbance and first order derivative measurements

Sample	Titration	ATR-FT-IR acidity (% w/v)				
		Absorbance		First derivative		
		Model A	Model B	Model C	Model D	Model E
1	6.05 ± 0.03	5.647 ± 0.004	5.728 ± 0.006	5.61 ± 0.10	5.726 ± 0.018	5.49 ± 0.10
2	5.009 ± 0.017	4.5516 ± 0.0016	4.733 ± 0.004	4.72 ± 0.08	4.65 ± 0.04	4.30 ± 0.10
3	8.005 ± 0.017	7.7814 ± 0.0015	8.318 ± 0.004	6.130 ± 0.009	7.921 ± 0.013	7.58 ± 0.03
4	6*	4.320 ± 0.009	6.099 ± 0.017	5.45 ± 0.15	1.06 ± 0.04	6.36 ± 0.04
5	6.001 ± 0.017	5.592 ± 0.003	5.681 ± 0.005	5.44 ± 0.10	5.76 ± 0.03	5.48 ± 0.04
6	6.050 ± 0.017	5.607 ± 0.002	5.660 ± 0.017	5.67 ± 0.04	5.791 ± 0.018	5.42 ± 0.12
7	6.07 ± 0.03	6.068 ± 0.003	6.350 ± 0.004	4.36 ± 0.08	6.10 ± 0.13	5.97 ± 0.11
8	4.980 ± 0.017	4.891 ± 0.004	5.434 ± 0.005	3.427 ± 0.014	4.97 ± 0.09	4.74 ± 0.11
9	7.100 ± 0.017	7.11 ± 0.004	7.687 ± 0.011	5.28 ± 0.08	7.50 ± 0.04	6.30 ± 0.09
10	6.001 ± 0.017	6.077 ± 0.004	6.573 ± 0.014	4.26 ± 0.07	6.07 ± 0.06	5.86 ± 0.05

3.2 First order approach

It is well known that in spectrometric analysis the application of first-order multivariate calibration techniques for the analysis of mixture components with strong overlapping spectra is required. In this sense, taking into account the poor results obtained using univariate calibration models, it was assayed the use of a multivariate calibration technique, the partial least squares (PLS) approach, for the treatment of direct measurements based ATR-FT-IR data of vinegar samples. An interesting characteristic of this approach is that calibration can be performed by ignoring the concentrations of all other components except the analyte of interest, in this case the acetic acid concentration.

To build PLS calibration models fit was decided to use synthetic standards rather than natural samples. It is a very hard test for many multivariate models, but is a very beneficial and important characteristic for end-users in routine analysis.

As PLS is sensitive to the presence of unmodeled interferents, as may happen when dealing with natural samples of complex composition, such as vinegars, the use of synthetic standards should carefully evaluated, for example through the previous selection of different spectral regions.

Although, several spectral regions were tested and different models were built and compared in terms of RMSEP, only the most significant results are summarized below.

Table 4 shows and compares analytical features of PLS-ATR-FT-IR models built to determine acetic acid in vinegars. All the evaluated models were based on the use of five acetic acid standards in water as calibration set, covering a concentration range from 2.34% to 9.47%. Mean centering spectra data pre-treatment was employed to eliminate common spectral information in all the cases prior the model development.

The spectral ranges assayed in the final models considered to predict the acidity content of vinegar samples were the 1811 - 1174 cm^{-1} and the 1510 - 1120 cm^{-1} regions. The leave one out cross-validation procedure was used to obtain the best number of latent variables using the predicted residual error sum of squares (PRESS).

Based on the aforementioned criterion, 1 PLS factor was chosen to be enough to explain the prediction and response variation for both models built. The prediction capability of PLS-ATR-FT-IR models assayed provided RMSEP values slightly better than those found through univariate calibration, but they are still too high.

The aforementioned data clearly show that the possible presence of different active ingredients in some vinegar commercial samples strongly affect the prediction capability of PLS models at least when a single set of external standards was used to built the calibration.

Taking into account the aforementioned considerations a "Linear removed" baseline criterion was employed for

The mean difference (d_{x-y}) of the total acidity and the standard deviation of mean differences (s_{x-y}) data found, were of the same order for the two spectral regions considered. The reproducibility of the determination, established from the mean standard deviation of triplicate analysis of the validation set samples was also approximately the same for both, univariate and PLS calibration models (first-order derivative based models not considered). Nevertheless, only the Quality Coefficient (QC), an estimator for the error of a new result, is better for model G than for model F and univariate models.

Table 5 summarizes data on the acidity content of samples determined by using PLS-ATR-FT-IR models and from the experimental errors found, it can be concluded that ATR-FT-IR data must be processed on using a most powerful methodology suitable to solve the problem of unexpected interferents and thus second-order data treatment¹⁴ was assayed.

Table 4 Prediction capabilities of PLS-ATR-FT-IR for the determination of vinegar total acidity

Parameters	Partial Least Squares models	
	Model F	Model G
Spectral region (cm^{-1})	1811 - 1174	1510 - 1120
Baseline correction Type	Linear removed	Linear removed
PLS factors extracted	1	1
R ²	0.9998	0.9997
RMSEC (% w/v)	0.062	0.062
RMSEP (% w/v)	0.41	0.25
RRMSEP (%)	7	4
d_{x-y} (% w/v)	-0.10	-0.11
s_{x-y} (% w/v)	0.4	0.2
QC (%)	7	4.5
s_{mp} (% w/v)	0.004	0.002

Note: Number of factors was selected looking for the best prediction capabilities of the model for the validation set considering a leave-one-out cross validation. See Table 2 for details about the meaning of the different parameters evaluated.

Table 5 Data of total acidity of vinegar samples obtained by titration and PLS-ATR-FT-IR.

Sample	Titration	PLS-ATR-FT-IR acidity (% w/v)	
		Model F	Model G
1	6.05 ± 0.03	5.723 ± 0.004	5.673 ± 0.003
2	5.009 ± 0.017	4.8305 ± 0.0018	4.707 ± 0.002
3	8.005 ± 0.017	7.691 ± 0.005	7.8908 ± 0.0004
4	6 *	7.046 ± 0.005	6.1017 ± 0.0010
5	6.001 ± 0.017	5.647 ± 0.002	5.605 ± 0.002
6	6.050 ± 0.017	5.667 ± 0.005	5.631 ± 0.004
7	6.07 ± 0.03	5.8931 ± 0.0008	6.1204 ± 0.0019
8	4.980 ± 0.017	4.897 ± 0.003	5.0645 ± 0.0010
9	7.100 ± 0.017	7.005 ± 0.007	7.225 ± 0.003
10	6.001 ± 0.017	5.894 ± 0.003	6.119 ± 0.003

3.3 Proposed methodology

In spite of the aforementioned PLS characteristic, all first-order methods, including PLS, are sensitive to the presence of un-modeled components. A good alternative to this problem is to move to second-order data,¹⁴ which are particularly suitable for the quantitative analysis of complex multicomponent samples (as some “especial” vinegars).

The development of the proposed methodology can be divided in two aspects. The first one regarding on the experimental set up, that can produce pH gradients in a flow system with minimum intervention of the analyst. The second related to the chemometric treatment of the second-order (three-way) data.

For the former aspect, we were inspired by the work presented by Marsili *et al.*¹⁹ for the determination of antimicrobials in orange juices, in which a sample, previously basified, was introduced in a flow injection system with UV-detection in which an HCl solution was used as carrier.

When using a FT-IR spectrometer as detector, the pH gradient must be much longer (less sharp) than that required for UV measurements because the time required for acquiring and averaging the obtained spectra is much longer for IR than in the case of UV. For this reason a multicommutation systems was chosen.

On the other hand, with the proposed system, a minimum sample handling is required (actually in our case none as vinegar samples not contain any suspended solid). So, samples were directly introduced in the system using the standard/sample channel of Figure 1 and through a specific instruction of the valves, the whole system was self primed. Additional details were already given in the experimental section.

Regarding the chemometric treatment, PARAFAC was chosen as the multiway method to resolve the multicomponent mixtures. This iterative algorithm is widely employed as it is considered to be less sensitive to instrumental noise and model deviations. Moreover it is especially useful when the data follow the so-called trilinear model²⁰ (The trilinear models have a structure that permits the mathematical dissection of spectra from complex specimens without the use of any other information about the properties of the specimen). This is due to the fact that decomposition of a three-way data array built with response matrices measured for a number of samples is often unique, allowing spectral profiles as well as relative concentrations of individual sample components to be extracted directly (the aforementioned second-order advantage, fully exploited by this algorithm).

In order to reduce the long time required to calculate the models (disadvantage of iterative algorithms), only the spectra between 1800 and 1230 cm^{-1} was considered. This region was chosen taking into account that it comprises the most significant carbonyl absorption bands.

PARAFAC is a decomposition procedure in which a three dimensions (3D) array (comprised by the stacked

sample to be analyzed) is deconvoluted into three loading matrices (one related to the spectra profile, the other to the time profile -pH variation- and the third to the relative concentration of individual component).

One of the first requirements in order to apply PARAFAC is to determine the optimum number of factors required to deconvolute the 3D array in each vinegar sample. Thus, the value of the core consistency was analyzed. For all the samples the consistency value obtained for the array composed by the 15-calibration plus each sample at time was calculated as a function of the component number. In all the cases the core consistency drops to a negligible value when using three (3) spectral components to model the array, suggesting that 2 is an optimum choice.

The spectral profile of each component is quite related to the vinegar spectrum at acid and basic pH (data not shown), that is, the spectrum of acetic acid and that of acetate, respectively.

In contrast to first order techniques, in PARAFAC one have to carry out the identification of the component related to each analyte of interest (in our case only that of acetic acid). This assignment was based on the previously above mentioned observation on acid and basic vinegar spectra and for all samples the first component was that related to the analyte of interest.

Absolute analyte concentrations were obtained after proper calibration by employing the extended calibration set described in the Experimental section. The procedure involves decomposing the 3D array (formed by joining the spectra of calibration samples and one of the training unknown samples) and it implies that the array decomposition should be repeated for each newly analyzed sample.

Prediction capabilities for PARAFAC for the analysis of multi-component mixtures from the use of single component aqueous standards are listed in Table 6. The RMSEC and quality coefficient (QC) show that the methodology is capable of precise calibration with RMSEC better than 0.15 (% w/v) and QC values lower than 3 %. The quantitative capabilities of the PARAFAC methodology are better on comparing with zero and first order calibration strategies as given by the RRMSEP. The RRMSEP was 3 %, 4 % and 7% for acidity by PARAFAC, partial least squares (model G) and univariate (model B) calibrations, respectively.

Moreover the reproducibility of the determination, established from the mean standard deviation of each replicate and the standard error of prediction, which includes the uncertainty in the model, were 0.09 and 0.05 (% w/v), respectively.

On the other hand, Table 7 shows the total acidity content values achieved for samples under study by using PARAFAC. As it can be seen there is an excellent agreement between the reference method and the proposed methodology, even for difficult samples such as the Modena vinegar.

Table 6 Prediction capabilities of PARAFAC-ATR-FT-IR for the determination of vinegar total acidity

Parameters	PARAFAC
Spectral region (cm ⁻¹)	1547 - 1238
Baseline correction Type	-----
PLS factors extracted	2
RMSEC (% w/v)	0.150
RMSEP (% w/v)	0.180
RRMSEP (%)	3.0
d _{x,y} (% w/v)	0.093
s _(x,y) (% w/v)	0.15
QC (%)	2.99
s _{sp} (% w/v)	0.09
s _{se} (% w/v)	0.05

Note: See Table 2 for details about the meaning of the different parameters evaluated. s_{sp} is the standard error of prediction.

Table 7 Data of total acidity of vinegar samples obtained by titration and PARAFAC-ATR-FT-IR

Sample	Titration	PARAFAC
1	6.05 ± 0.03	6.35 ± 0.09
2	5.009 ± 0.017	5.19 ± 0.07
3	8.005 ± 0.017	8.07 ± 0.02
4	6 *	5.87 ± 0.13
5	6.001 ± 0.017	6.30 ± 0.06
6	6.050 ± 0.017	5.94 ± 0.12
7	6.07 ± 0.03	6.10 ± 0.10
8	4.980 ± 0.017	5.07 ± 0.10
9	7.100 ± 0.017	7.26 ± 0.12
10	6.001 ± 0.017	6.03 ± 0.012

* Declared value

Note: See Table 3.

3.4 Critical comparison

To compare the performance of the different ATR-FT-IR methodologies assayed, it was used the elliptic joint confident region (EJCR)²¹ for the slope and the intercept of the regression line between data found by FT-IR and reference titration results for samples analyzed. Figure 4 shows the ideal point (1, 0) with the line equation for the proposed methodology, [slope = 0.99 (std. error 0.05), intercept = 0.1 (std error 0.3)]; PLS-model G, [slope = 1.03 (std error 0.10), intercept = -0.3 (std error 0.6)] and univariate model B [slope = 1.131 (std error 0.16), intercept = -0.7 (std error 1.0)]. As it can be seen, the proposed methodology performs better than the others, as it yields a narrower ellipsis comprising in it the ideal point.

Although the size of the ellipsis can be related with the precision of the method, it may be argued that it is influenced by the quality of the regression and not only to the precision in the quantification of each sample. Therefore the pooled standard deviation for the triplicate measurement of all the samples was compared. In this case it can be seen that all methods have similar precision and they are also similar to that of the reference method. Nevertheless, only that based on the proposed methodology provide an

acetic acid as calibration set. This is also confirmed by the better values obtained in PARAFAC-ATR-FT-IR than for other models for indicators such as d_{x,y}, s_{x,y} and QC.

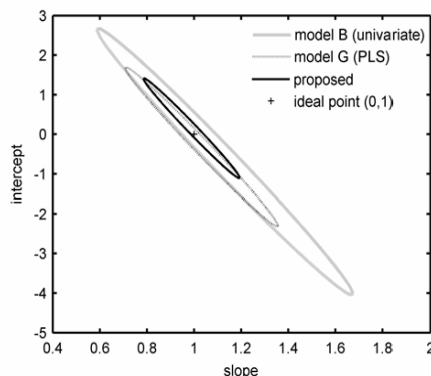


Fig. 4 Elliptic Joint Confidence test for the slope and intercept obtained from the regression between the concentration data and the reference titration data predicted for the best of each zero, first and second order models built for the total acidity determination by ATR-FT-IR in 10 commercially available vinegar samples.

Conclusions

In this work different strategies were evaluated for the determination of the vinegar acidity by means of the use of ATR-FTIR and chemometric treatment. The main objective was to keep as far as possible the calibration procedure, by means of the use of synthetic external standard solutions of acetic acid in water. Although excellent calibration results can be obtained through the use of univariate and first order multivariate treatment of the FTIR spectra, prediction results for real samples are not acceptable. Nevertheless, the automated system described herein supplies 2D data which provide accurate results comparable to those obtained by reference methods.

It was shown that multicommutation methods coupled to three-way chemometric analytical methods can be used for the development of robust sensors for the analysis of acidity in vinegar samples.

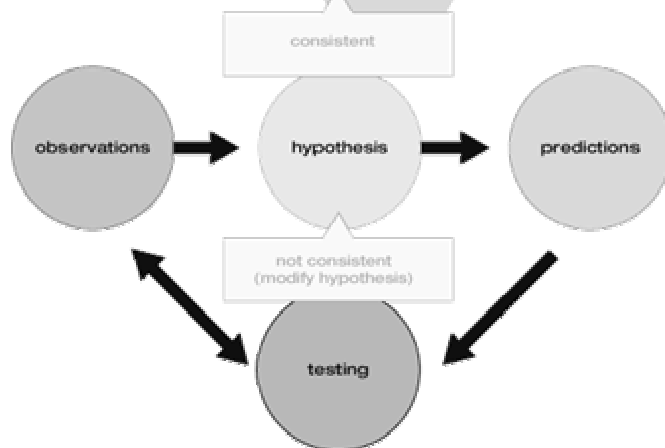
Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604, FEDER) and Direcció General d'Investigació i Transferència Tecnològica de la Generalitat Valenciana (Project 017609) and the grant for the invited professor F.A. Iñón.

References

- 1 www.codexalimentarius.net
- 2 Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., and Grasselli, J. G., *Infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*, Academic Press, London, England, 1991.
- 3 Kurauchi, Y., Ogata, T., Egashira, N., and Ohga, K., *Anal. Sci.*, 1996, **12**, 55.
- 4 Castro, R., Moreno, M. V. G., Natera, R., Garcia-Rowe, F., Hernandez, M. J., and Barroso, C. G., *Chromatographia*, 2002, **56**, 57.
- 5 Cocchi, M., Lambertini, P., Manzini, D., Marchetti, A., and Ulrici, A., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5255.
- 6 Lenghor, N., Jakmunee, J., Vilen, M., Sara, R., Christian, G. D., and Grudpan, K., *Talanta*, 2002, **58**, 1139.
- 7 Kitamura, N., Kotani, A., and Kusu, F., *Bunseki Kagaku*, 2004, **53**, 1097.
- 8 Booksh, K. S., and Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 782A.
- 9 Currie, L. A., *Anal. Chim. Acta*, 1999, **391**, 105.
- 10 Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 930.35, AOAC Vol.1, 16th Edition, 1995.
- 11 Moros, J., Iñón, F. A., Garrigues, S., and de la Guardia, M., *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 181.
- 12 Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., de Jong, S., Lewi, P. J., and Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics* (Part A and B), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997.
- 13 Iñón, F. A., Garrigues, S., and de la Guardia, M., *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 401.
- 14 Bro, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1997, **38**, 149.
- 15 <http://www.models.kvl.dk/source/>
- 16 Bro, R., and Kiers, H. A. L., *J. Chemom.*, 2003, **17**, 274.
- 17 J. Ferré and N. M. Faber, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2003, **60**, 123.
- 18 Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., Mora Díez, N., Bohoyo Gil, D., Olivieri, A. C., and Escandar, G. M., *Appl. Spectrosc.*, 2006, **60**, 330.
- 19 Marsili, N. R., Lista, A., Fernandez Band, B. S., Goicoechea, H. C., and Olivieri, A. C., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2479.
- 20 Bro, R., *J. Chemom.*, 1996, **10**, 47.
- 21 González, A. G., Herrador, M. A., and Asuero, A. G., *Talanta*, 1999, **48**, 729.

Conclusiones



Más que un conjunto de aplicaciones, esta Tesis pretende ser una guía acerca del empleo de las técnicas de calibración para el estudio y tratamiento de datos obtenidos por espectroscopia vibracional y, en ese sentido, es posible diferenciar a lo largo de ella un progresivo grado de dificultad de las técnicas empleadas, con el propósito de resolver aquellos aspectos que con modelos más sencillos no permitían alcanzar el grado de satisfacción requerido o exigido.

A partir de los resultados obtenidos en los distintos trabajos que engloban la presente Tesis Doctoral, es posible extraer las siguientes conclusiones:

1. La espectrometría vibracional es una técnica analítica muy versátil y flexible que permite obtener los espectros de infrarrojo, tanto en la región media - MIR - como en la región cercana - NIR -, de una gran variedad de tipos de muestras con ninguna o una mínima preparación química previa de la muestra.

A través de los distintos trabajos desarrollados se ha puesto de manifiesto la posibilidad de emplear la espectroscopia de transmisión en ambos rangos del espectro, medio y cercano, para el control de la calidad de formulados fitosanitarios y productos farmacéuticos tras una sencilla extracción previa del analito de interés con un disolvente adecuado.

Además se han desarrollado metodologías basadas en la medida directa de las muestras empleando la espectroscopia de reflectancia difusa en la región cercana del espectro para el caso de muestras sólidas, como chocolates o productos fitosanitarios, con las que no resulta apropiado o posible trabajar en disolución. También se ha utilizado la espectroscopia de reflectancia total atenuada en la región media del espectro IR para el estudio de muestras líquidas (zumos), emulsiones (yogures) e incluso muestras sólidas (productos fitosanitarios).

2. La espectrometría vibracional es, además, una técnica analítica que permite obtener gran cantidad de información en tiempos extremadamente

cortos. Esto ha dado la posibilidad de mostrar la amplia variedad de recursos y la aplicabilidad que ofrece la Quimiometría, a través del empleo de distintos métodos matemáticos y estadísticos, para el tratamiento numérico de dichos datos analíticos y que han supuesto el desarrollo de diferentes modelos de calibración para su posterior empleo en la predicción de analitos y/o propiedades de interés.

Así, durante la ejecución de la presente Tesis Doctoral, se han podido desarrollar metodologías analíticas basadas en diferentes modelos de calibración para su posterior aplicación en la resolución de problemas específicos de relevancia:

A.- De un lado, las basadas en la calibración empleando la regresión por mínimos cuadrados (univariante o de orden cero) en aquellas situaciones en las que ha sido posible conseguir una especificidad adecuada de la señal a través de simples extracciones con un disolvente apropiado, como en el caso del análisis de los ingredientes activos en formulaciones de productos farmacéuticos (diazepam) o fitosanitarios (clorsulfuron, diuron, iprodiona, metamitrona, oxadiazon, pirimicarb, procimidona y triciclazol).

Objeto reseñable en este aspecto es el empleo de dicha calibración para las medidas realizadas en la región cercana del espectro infrarrojo, NIR, a la que frecuentemente ha ido ligada la calibración multivariante.

B.- Por otro lado, se han desarrollado metodologías basadas en la calibración multivariante, o de primer orden, para la extracción de la información relevante en aquellas situaciones en las que la condición de especificidad ha resultado costosa, en términos de tiempo y de recursos humanos y materiales, o imposible de conseguir. En este sentido, se han empleado distintas técnicas de análisis multivariante en función de los objetivos perseguidos:

- El análisis de componentes principales (PCA) se ha utilizado para reducir la dimensión del conjunto de datos sin perder información analítica.
- El análisis de conglomerados se ha empleado como método no supervisado para el reconocimiento de pautas, en concreto, con la finalidad de detectar y establecer agrupaciones de las muestras analizadas a partir de su correspondiente espectro infrarrojo, como procedimiento previo para efectuar un diseño razonable del conjunto de calibración cuando no ha sido posible disponer de estándares comerciales del analito de interés y se ha requerido el empleo de parte de las propias muestras para confeccionar dicho conjunto de calibración, como en el caso de la determinación de los principales parámetros nutricionales (valor energético, carbohidratos, grasas, proteínas, calcio o contenido de cacao) en muestras de zumos, yogures y chocolates.
- Se han establecido modelos de calibración basados en la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS), que han permitido el análisis de muestras complejas sin necesidad de disponer de conocimiento alguno sobre otros componentes, distintos al analito/s de interés, que se hallaban presentes en las muestras.
- Además, también se ha estudiado la aplicación de otros recursos, como el modelado mediante el uso de redes neuronales artificiales (RNA), para la determinación cuantitativa de los distintos parámetros nutricionales en muestras de chocolate.

C.- Finalmente, se ha desarrollado un procedimiento de análisis basado en la calibración de segundo orden para la determinación de la acidez del vinagre mediante medidas de reflectancia total atenuada en la

región media del espectro infrarrojo empleando la multicommutación para la manipulación y la medida de las muestras.

3. La validación o confirmación mediante la aportación de evidencias objetivas para demostrar el cumplimiento de los principales requisitos, como precisión, exactitud y sensibilidad, que posibilitan el uso específico previsto de los procedimientos analíticos desarrollados, se ha realizado a través de la evaluación de determinados criterios y características de calidad establecidas por diversos organismos internacionales de reconocido prestigio como la ISO (International Standards Organization), la IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) o la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), entre otros.

A.- Para el caso en el que se han empleado modelos de calibración univariante se han incluido, por ejemplo, parámetros tales como la linealidad, la exactitud, la precisión o incertidumbre, los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del procedimiento, la recuperación aparente y la selectividad del procedimiento.

La adecuada exactitud de los diferentes procedimientos desarrollados se ha demostrado a través de la comparación de los resultados obtenidos mediante el correspondiente método vibracional y un método de referencia apropiado (generalmente cromatográfico), tratados como datos independientes.

La precisión proporcionada por los procedimientos vibracionales desarrollados se encontró, en todos los casos, dentro de los límites establecidos por la curva de Horwitz.

A pesar de que los límites de detección y cuantificación, calculados según el criterio de la IUPAC de 1975 (Long and Winefordner), resultaron ser de orden superior a los obtenidos mediante los métodos de referencia (métodos cromatográficos), dado que la espectroscopia vibracional no resulta una técnica demasiado sensible, la sensibilidad resultó ser

adecuada para el empleo de dichas aplicaciones en la determinación cuantitativa sobre los tipos de muestras consideradas evitando en muchos casos las diluciones requeridas cuando se emplea la cromatografía.

La selectividad de los procedimientos desarrollados se garantizó demostrando la ausencia de efecto matriz (interferencias debidas a otros componentes de la muestra distintos al analito de interés) mediante el método de las adiciones.

B.- Para el caso de los procesos analíticos basados en el empleo de la calibración multivariante se incluyeron parámetros tales como el RMSEP, sensibilidad, selectividad y límite de detección (estos tres basados en la señal neta del analito, NAS, *Net Analyte Signal*), el coeficiente de calidad (entendido como un parámetro indicador del % de error que cabe esperar para la estimación de la correspondiente propiedad en una nueva muestra) y el error estándar de predicción (s_{reg}), comprobándose que los métodos desarrollados resultaban comparables con los empleados como referencia o en su defecto cumplían con las especificaciones establecidas por el pertinente organismo oficial.

4. Las metodologías vibracionales desarrolladas pueden también considerarse como procedimientos de análisis medioambientalmente sostenibles. El hecho de poder llevar a cabo determinaciones cuantitativas con un mínimo o ningún tratamiento químico previo de las muestras, se traduce en una considerable disminución en el consumo de disolventes que se emplean, así como en una reducción de la cantidad de residuos generados, en comparación con otras técnicas que comúnmente se suelen emplear como métodos de análisis para el control de calidad de productos. A este aspecto también ha contribuido el empleo de microceldas de flujo, así como de viales de vidrio como celdas de medida para el NIR.

El empleo, en algunos casos, de disolventes alternativos a los de tipo clorado para la etapa de extracción y posterior determinación cuantitativa

mediante medidas de transmisión ha supuesto una mejora en la seguridad y la calidad del trabajo en el laboratorio, así como en el posible impacto medioambiental.

5. El empleo de viales de vidrio como celdas de medida permite la manipulación de una menor cantidad de muestra, así como el almacenamiento de las mismas para un posterior análisis o reutilización, dado que las técnicas empleadas son no destructivas.

6. Las metodologías establecidas son simples, de fácil aplicabilidad y rápidas, desde el punto de vista operacional, proporcionando un considerable aumento de la productividad, en especial si se comparan con los métodos cromatográficos que comúnmente comportan procedimientos químicos previos para la adecuación de las muestras.

7. Además, también se ha podido poner de manifiesto que la especificidad de la señal analítica, uno de los paradigmas del análisis químico, se convierte en un aspecto menos relevante mediante la Quimiometría; No siendo de obligado cumplimiento, en muchos de los casos, la eliminación las interferencias para poder obtener un resultado correcto. Con ello, es posible soslayar las etapas tediosas de tratamiento químico previo de las muestras para aislar los analitos puesto que resulta posible conseguir la selectividad mediante métodos quimiométricos, no físico-químicos.

8. Con el desarrollo de la presente Memoria de Tesis también se ha corroborado la afirmación de que la Quimiometría permite hacer realidad diversas tendencias buscadas hoy día por la Química Analítica, como son la rapidez o velocidad de respuesta, el abaratamiento de costes, una reproducibilidad y repetibilidad altas, la miniaturización o la portabilidad de instrumentos.

9. Los Capítulos desarrollados en la presente Memoria de Tesis ponen de manifiesto la utilidad de la combinación de la espectrometría infrarroja con adecuados tratamientos quimiométricos como técnica predictiva de parámetros nutricionales en productos alimenticios, dado que su espectro proporciona una huella característica que viene determinada por todos los grupos funcionales que absorben radiación infrarroja, tras la interacción de ésta con la muestra, los cuáles, a su vez, están relacionados con las características físico-químicas del producto.

Así pues, por todo lo expuesto anteriormente, es posible concluir que las distintas aplicaciones desarrolladas en la presente Tesis Doctoral para la determinación cuantitativa, mediante el empleo de la espectroscopia vibracional, de distintos analitos considerados a diferentes niveles de concentración y contenidos en matrices sólidas, semisólidas (emulsiones) o líquidas, pueden considerarse como serias alternativas a los procedimientos de análisis establecidos.



Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- 1 D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. *Principios de Análisis instrumental*. Quinta Edición. McGRAW-HILL / Interamericana de España, S. A. U., 2000.
- 2 D. Steele. *Infrared Spectroscopy: Theory*. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, Vol. 1. J. M. Chalmers and P. R. Griffiths. (Eds), Wiley, Chichester, UK, 2002; 44–70.
- 3 N. B. Colthup, L. H. Daly y S.E. Wiberley. *Introduction to infrared and Raman Spectroscopy*. 3ª Ed. N. B., San Diego: Academic Press, 1990.
- 4 B. Schrader. *Infrared and Raman Spectroscopy*. New York: VCH Press, 1995.
- 5 W. Herschel. *Experiments on the Refrangibility of the invisible Rays of the Sun*. **Phil. Trans. Roy. Soc. London** 90 (1800b); 284-292.
- 6 W. Herschel. *Experiments on the solar and on the terrestrial Rays that occasion Heat, Part I*. **Phil. Trans. Roy. Soc. London** 90 (1800c); 293-326.
- 7 W. Herschel. *Experiments on the solar and on the terrestrial Rays that occasion Heat, Part II*. **Phil. Trans. Roy. Soc. London** 90 (1800d); 437-538.
- 8 F. E. Barton. *Theory and principles of near infrared spectroscopy*^a; **Spectroscopy Europe**, 14/1 (2002).
- 9 P. R. Griffiths. *Far-infrared Spectroscopy, Handbook of vibrational spectroscopy*, Jhon Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1 (2002); 229-240.
- 10 J. Inczédy, T. Lengyel y A. M. Ure. *International Union of Pure and Applied Chemistry, Compendium of Analytical Nomenclature, definitive rules*, Third Edition, Chapter 17. 1997.
- 11 H. B. Briggs y R. C. Fletcher. *Absorption of Infrared Light by Free Carriers in Germanium*. **Physical Review** 91 (1953); 1342-1346.
- 12 G. Kortum. *Reflectance spectroscopy*. **Springer**, New York, 1969.
- 13 N. J. Harrick. *Internal Reflection Spectroscopy*. **Interscience**, New York, 1967.
- 14 C. A. Watson. *Near infrared reflectance spectrophotometric analysis of agricultural products*. **Analytical Chemistry** 49 (1977); 835A-840A.
- 15 D. L. Wetzel. *Near-infrared reflectance analysis: sleeper among*

-
- spectroscopic techniques. Analytical Chemistry* 55 (1983); 1165A-1176A.
- 16 J. B. Reeves, B. A. Francis y S. K. Hamilton. *Specular Reflection and Diffuse Reflectance Spectroscopy of Soils. Journal of Applied Spectroscopy* 59 (2005); 39-46.
- 17 S. A. Francis y A. H. Ellison. *Infrared Spectra of Monolayers on Metal Mirrors. Journal of the Optical Society of America* 49 (1959); 131-138.
- 18 S. Bennett. *Infrared Spectroscopy by Attenuated Total Reflection. Applied Spectroscopy* 18 (1964); 7-9.
- 19 J. Fahrenfort. *Attenuated Total Reflection. Spectrochimica Acta* 17 (1961); 698-709.
- 20 Pike Technologies. *ATR – Theory and Applications*. Application Note.
- 21 W. W. Wendlandt y H. G. Hencht. *Reflectance Spectroscopy*. John Wiley and Sons, New York, 1966.
- 22 H. Maulhardt y D. Kunath. *Diffuse-reflectance spectroscopy in the infrared. Talanta* 29 (1982); 237-241.
- 23 Pike Technologies. *Diffuse Reflectance - Theory and Applications*. Application Note.
- 24 G. Ramis Ramos y M^a C. García Álvarez-Coque. *Quimiometría*. Editorial Síntesis S. A. España, 2001.
- 25 P. Geladi y K. Esbensen. *Review Article: The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part 1. Journal of Chemometrics* 4 (2005); 337-354.
- 26 K. Esbensen y P. Geladi. *Review Article: The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part 2. Journal of Chemometrics* 4 (2005); 389-412.
- 27 K. Danzar y L. A. Currie. *Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration. Pure & Applied Chemistry* 70 (1998); 993-1014.
- 28 H. Martens y T. Naes. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, England, 1989.
- 29 A. C. Olivieri, N. (Klaas) M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J. H. Kalivas y H. Mark. *Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry* 78 (2006); 633-661.
-

-
- 30 H. J. Luinge, E. Hop, E. T. G. Lutz, J. A. van Hemert y E. A. M. de Jong. *Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry*. **Analytica Chimica Acta** 284 (1993); 419-433.
- 31 H. V. Andersen, A. Friderichsen, S. Clausen y J. Bak. *Comparison of noise sources in dual- and single-beam Fourier-transform near-infrared spectrometry*. **Applied Optics** 44 (2005); 6167-6175.
- 32 V. M. Fernandez Cabanas, A. Garrido Varo, D. Perez Marin y P. Dardenne. *Evaluation of pretreatment strategies for near-infrared spectroscopy calibration development of unground and ground compound feedingstuffs*. **Applied Spectroscopy** 60 (2006); 17-23.
- 33 A. Savitzky y M. J. E. Golay. *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. **Analytical Chemistry** 36 (1964); 1627-1639.
- 34 F. R. Stauffer y H. Sakai. *Derivative spectroscopy*. **Applied Optics** 7 (1968); 61-65.
- 35 J. Steiner, Y. Termonia y J. Deltour. *Comments on smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure*. **Analytical Chemistry** 44 (1972); 1906-1909.
- 36 M. R. Whitbeck. *Second Derivative Infrared Spectroscopy*. **Applied Spectroscopy** 35 (1981); 93-95.
- 37 H. H. Madden. *Comments on the Savitzky-Golay Convolution Methods for Least Squares Fit Smoothing and Differentiation of Digital Data*. **Analytical Chemistry** 50 (1978); 1383-1386.
- 38 M.R. Fetterman. *Fourier-transform infrared derivative spectroscopy with an improved signal-to-noise ratio*. **Optical Letters** 30 (2005); 2311-2313.
- 39 H. Mark y J. Workman. *Derivatives in spectroscopy. I. The behavior of the derivative*. **Spectroscopy** 18 (2003); 32-37.
- 40 K. H. Norris y P. C. Williams. *Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat: I. Influence of particle size*. **Cereal Chemistry** 61 (1984); 158-165.
- 41 P. Geladi, D. MacDougall y H. Martens. *Linearization and scatter-correction for NIR reflectance spectra of meat*. **Applied Spectroscopy** 39 (1985); 491-500.
- 42 T. Isaksson y T. Næs. *The Effect of Multiplicative Scatter Correction*
-

-
- (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy. **Applied Spectroscopy** 42 (1988); 1273-1284.
- 43 M. S. Dhanoa, S. J. Lister, R. Sanderson y R. J. Barnes. *The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra*. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 2 (1994); 43-47.
- 44 R. J. Barnes, M. S. Dhanoa y S. Lister. *Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra*. **Journal of Applied Spectroscopy** 43 (1989); 772-777.
- 45 C. H. Chen, L. F. Pau y P. S. P. Wang. *Handbook of Pattern Recognition & Computer Vision*, 2nd ed., World Scientific Publishing Co, Inc. River Edge, NY, USA, 1993.
- 46 J. Shawe Taylor y N. Cristianini. *Kernel methods for pattern analysis*. Cambridge University Press, 2004.
- 47 R. W. Liddell y P. C. Jurs. *Interpretation of Infrared Spectra Using Pattern Recognition Techniques*. **Applied Spectroscopy** 27 (1973); 371-376.
- 48 R. C. Tryon. *Cluster analysis*. New York, MacGraw-Hill, 1939.
- 49 N. Bratchell. *Cluster analysis*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 6 (1989); 105-125.
- 50 J. A. Hartigan. *Clustering Algorithms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975.
- 51 G. W. Milligan y M. C. Cooper. *Methodology review: Clustering methods*. **Applied Psychological Measurement** 11 (1987); 329-354.
- 52 A. H. Lipkus, T. J. Lenk, K. K. Chittur y R. M. Gendreau. *Cluster analysis of protein Fourier transform infrared spectra*. **Biopolymers** 27 (1988); 1831-1838.
- 53 L. Zhang, G. W. Small, A. S. Haka, L. H. Kidder y E. N. Lewis. *Classification of Fourier Transform Infrared Microscopic Imaging Data of Human Breast Cells by Cluster Analysis and Artificial Neural Networks*. **Applied Spectroscopy** 57 (2003); 14-22.
- 54 <http://www.statistics.com/content/glossary/l/linkage.php>
- 55 P. H. A. Sneath y R. R. Sokal. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, 1973.
- 56 J. H. Ward. *Hierarchical grouping to optimize an objective function*. **Journal of the American Statistical Association** 58 (1963); 236-244.
-

-
- 57 W. F. Velicer y D. N. Jackson. *Component analysis versus common factor analysis: Some issues in selecting an appropriate procedure*. **Multivariate Behavioral Research** 25 (1990); 1-28.
- 58 J. E. Jackson, *User's Guide to Principal Components*, Wiley, New York, 1991.
- 59 S. Wold, K. Esbensen y P. Geladi. *Principal Component Analysis*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 2 (1987); 37-52.
- 60 I. T. Jolliffe. *Principal component analysis*. Springer, New York, second edition, 2002.
- 61 S. Wold y M. Sjöström. *Chemometrics, present and future success*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 44 (1998); 3-14.
- 62 A. M. C. Davies y T. Fearn. *Back to basics: the principles of principal component analysis*. **Spectroscopy Europe** 16 (6) (2004/2005); 20-23.
- 63 J. L. Fava y W. F. Velicer. *The effects of overextraction on factor and component analysis*. **Multivariate Behavioral Research** 27 (1992); 387-415.
- 64 J. L. Fava y W. F. Velicer. *The Effects of underextraction in Factor and Component Analyses*. **Educational and Psychological Measurement** 56 (1996); 907-929.
- 65 T. Jolliffe. *Discarding variables in a principal component analysis, I Artificial data*. **Applied Statistics** 21 (1972); 160-173.
- 66 I. T. Jolliffe. *Discarding variables in a principal component analysis, II Real data*. **Applied Statistics** 22 (1973); 21-31.
- 67 G. P. McCabe. *Principal variables*. **Technometrics** 26 (1984); 137-144.
- 68 P. Robert y Y. Escoufier. *A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient*. **Applied Statistics** 25 (1976); 257-65.
- 69 I. Bonifas, Y. Escoufier, P. L. Gonzalez y R. Sabatier. *Choix de variables en analyse en composantes principales*. **Revue de Statistique Appliquée** 23 (1984); 5-15.
- 70 W. J. Krzanowski. *Selection of variables to preserve multivariate data structure, using principal components*. **Applied Statistics** 36 (1987a); 22-33.
- 71 W. J. Krzanowski. *Cross-validation in principal component analysis*. **Biometrics** 43 (1987b); 575-584.
-

-
- 72 A. Falguerolles y S. De et Jmel. *Un critere de choix de variables en analyse en composantes principales fonde sur des modeles graphiques gaussiens particuliers*. **Revue Canadienne de Statistique** 21 (1993); 239-256.
- 73 Y. Mori, T. Tanaka y T. Tarumi. Principal component analysis based on a subset of qualitative variables, In: C. Hayashi et al. (eds.), *Proceedings of IFCS-96: Data Science, Classification and Related Methods*, Springer-Verlag (1997); 547-554.
- 74 Y. Mori, M. Iizuka, T. Tarumi y Y. Tanaka. Statistical software "VASPCA" for variable selection in principal component analysis, In: W. Jansen y J.G. Bethlehem (eds.) *COMPSTAT2000 Proceedings in Computational Statistics (Short Communications)* (2000a); 73-74.
- 75 Y. Mori, M. Iizuka, T. Tarumi y Y. Tanaka. *Study of variable selection criteria in data analysis*, *Proceedings of the 10th Japan and Korea joint Conference of Statistics*. (2000b); 547-554.
- 76 Algorithms - Principal Component Analysis Methods, Optimization: Selecting the Principal Component, Thermo Electron Corporation.
- 77 M. Stone. *Cross-validators choice and assesment of statistical predictions (with discussion)*. **Journal of the Royal Statistical Society B** 36 (1974); 111-147.
- 78 S. Wold. *Cross-validators estimation of the number of components in factor and principal components models*. **Technometrics** 20 (1978); 397-405.
- 79 D. W. Osten. *Selection of optimal regression models via cross-validation*. **Journal of Chemometrics** 2 (1988); 39-48.
- 80 D. M. Haaland y E. V. Thomas. *Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information*. **Analytical Chemistry** 60 (1988); 1193-1202.
- 81 <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/calmul.pdf>
- 82 <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>
- 83 H. Martens y T. Naes. *Multivariate calibration by Data Compression in Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Ed. P Williams y K. Norris, American Society of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minesota, 1987.
- 84 D. M. Haaland y R. G. Easterling. *Improved Sensitivity of Infrared Spectroscopy by the Application of Least Squares Methods*. **Applied**
-

- Spectroscopy** 34 (1980); 539-548.
- 85 W. R. Hruschka. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Eds. P. Williams y K Norris, American Society of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota, 1987.
- 86 N. M. Najafi, A. S. Hamid y R. K. Afshin. *Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression*. **Microchemical Journal** 75 (2003); 151-158.
- 87 J.T. Webster, R.F. Gunst y R.L. Mason. *Latent root regression analysis*. **Technometrics** 16 (1974); 513-522.
- 88 M. B. Seasholtz y B. R. Kowalski. *The Effect of Mean Centering on Prediction in Multivariate Calibration*. **Journal of Chemometrics**. 6 (1992); 103-111.
- 89 H. Wold. *Soft modelling by latent variables: the non-linear iterative partial least squares approach*. *Perspectives in Probability and Statistics, Papers in Honour of M.S. Bartlett*, ed. J. Gani. Academic Press, London, 1975. 117-144.
- 90 P. Geladi y B.R. Kowalski. *Partial Least Squares Regression: A Tutorial*. **Analytica Chimica Acta**. 185 (1986); 1-17.
- 91 C. Araujo Andrade, I. Campos-Cantón, J. R. Martínez, G. Ortega Zarzosa y F. Ruiz. *Modelo de predicción basado en el análisis multivariante para la determinación de la concentración de azúcar en solución*. **Revista Mexicana de Física E** 51 (2005); 67-73.
- 92 B. Jørgensen y Y. Goegebeur. *ST02: Multivariate Data Analysis and Chemometrics, Module 7: Partial least squares regression I*. <http://statmaster.sdu.dk/courses/ST02>.
- 93 B. Jørgensen y Y. Goegebeur. *ST02: Multivariate Data Analysis and Chemometrics, Module 8: Partial least squares regression II*. <http://statmaster.sdu.dk/courses/ST02>.
- 94 A. Höskuldsson. *PLS regression methods*. **Journal of Chemometrics** 2 (1988); 211-228.
- 95 I. Aleksander y H. Morton. *An introduction to neural computing*. 2nd edition, International Thomson Computer Press, London, 1995.
- 96 B. J. Wythoff. *Backpropagation neural networks; A tutorial*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 18 (1993); 115-155.
- 97 A. K. Jain, J. Mao y K. M. Mohiuddin. *Artificial Neural Networks: A*

- Tutorial. Computer* 29 (1996); 31-44.
- 98 K. Papik, B. Molnar, R. Schaefer, Z. Dombovari, Z. Tulassay y J Feher. *Application of neural networks in medicine - a review. Medical Science Monitor* 4 (1998); 538-546.
- 99 H. Adeli. *Neural Networks in Civil Engineering: 1989–2000. Computer-Aided Civil and Infrastructure Engineering* 16 (2001); 126-142.
- 100 M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch y J. Pages. *NIR calibration in non-linear systems: different PLS approaches and artificial neural networks. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 50 (2000); 75-82.
- 101 P. Quinlan. *Connectionism and Psychology: A Psychological Perspective on New Connectionist Research*. University of Chicago Press, 1991.
- 102 J. L. McClelland, D. E. Rumelhart y the PDP Research Group. (eds). *Parallel distributed processing. Explorations in the Microstructure of Cognition* Vol. 2. MIT Press, Cambridge, 1986.
- 103 P. D. Wassermann. *Neural Computer Theory and Practice*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1989.
- 104 E. Sanchez y B. R. Kowalski. *Tensorial Calibration. I. First Order Calibration. Tensorial Calibration. II. Second Order Calibration. Journal of Chemometrics* 2 (1988); 247-280.
- 105 R. Bro. *Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist?. Analytica Chimica Acta* 500 (2003); 185-194.
- 106 M. Riani y S. Salini. *Robust and Efficient Multivariate Calibration*. (www.stat.jyu.fi/icors2005/icorsabstracts/riani.pdf)
- 107 H. Martens y T. Naes. *Multivariate Calibration*. Wiley, New Cork, 1989.
- 108 A. Smilde, R. Bro y P. Geladi. *Multi-way Analysis: Applications in the Chemical Sciences*, John Wiley & Sons Inc, 2004.
- 109 K. S. Booksh y B. R. Kowalski. *Theory of Analytical Chemistry. Analytical Chemistry* 66 (1994); 782A-791A.
- 110 E. Sanchez y B. R. Kowalski. *Generalized rank annihilation factor analysis. Analytical Chemistry* 58 (1986); 496-499.
- 111 R. Bro. *PARAFAC. Tutorial and applications. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 38 (1997); 149-171.
- 112 R. Harshman. *Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an "exploratory" multimodal factor analysis. UCLA*

- Working Papers in Phonetics** 16 (1970); 1-84.
- 113 J. D. Carroll y J. Chang. *Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of "Eckart—Young" decomposition*. **Psychometrika** 35 (1970); 283-319.
- 114 P. M. Kroonenburg. *Three-mode principal component analysis. Theory and applications*. DSWO Press, Leiden, 1983.
- 115 H. A. L. Kiers. *Hierarchical relations among three-way methods*. **Psychometrika** 56 (1991); 449-470.
- 116 S. Leurgans y R. T. Ross. *Multilinear Models: Applications in Spectroscopy*. **Statistical Science** 7 (1992); 289-310.
- 117 R. Bro y H. A. L. Kiers. *A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models*. **Journal of Chemometrics** 17 (2003); 274-286.
- 118 N. M. Faber, A. Lorber y B. R. Kowalski. *Analytical figures of merit for tensorial calibration*. **Journal of Chemometrics** 11 (1997); 419-461.
- 119 N. J. Messick, J. H. Kalivas y P. M. Lang. *Selectivity and related measures for nth- order data*. **Analytical Chemistry** 68 (1996); 1572-1579.
- 120 J. Saurina, C. Leal, R. Compañó, M. Granados, M. Dolors Prat y R. Tauler. *Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution*. **Analytica Chimica Acta** 432 (2001); 241-251.
- 121 R. D. Jiji, G. A. Cooper y K.S. Booksh. *Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons*. **Analytica Chimica Acta** 397 (1999); 61-72.
- 122 J. Diewok, A. de Juan, R. Tauler y B. Lendl. *Quantitation of mixtures of diprotic organic acids by FTIR flow titrations and multivariate curve resolution*. **Applied Spectroscopy** 56 (2002); 40-50.
- 123 J. Diewok, A. de Juan, M. Maeder, R. Tauler y B. Lendl. *Application of a combination of hard and soft modelling for equilibrium systems to the quantitative analysis of pH-modulated mixture samples*. **Analytical Chemistry** 75 (2003); 641-647.
- 124 E. Leonhardt y R. Stahl. *Decomposition of Acenaphthylene by Ultrasonic Irradiation. Technical Note*. **Analytical Chemistry** 70 (1998); 1228-1230.
- 125 N. R. Marsili, A. Lista, B. S. Fernández Band, H. C. Goicoechea y A. C.

- Olivieri. *New Method for the Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Commercial Orange Juices Based on Second-Order Spectrophotometric Data Generated by a pH Gradient Flow Injection Technique*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52 (2004); 2479-2484.
- 126 A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea y F. A. Iñón. *MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 73 (2004); 189-197.
- 127 M. Thompson, Stephen L. R. Ellison y R. Wood. *Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report)*. **Pure Applied Chemistry** 74 (2002); 835-855.
- 128 W. Horwitz, L. R. Kamps y K. W. Boyer. *Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents*. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 63 (1980); 1344-1354.
- 129 W. Funk, V. Dammann y G. Donnevert. *Quality assurance in analytical chemistry*. (Transl. by Ann Gray) VCH, Weinheim, New York, 1995.
- 130 A. Lorber, K. Faber y B.R. Kowalski. *Net analyte signal calculation in multivariate calibration*. **Analytical Chemistry** 69 (1997); 1620-1626.
- 131 D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi y J. Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (Part A and B)*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997.
- 132 M. M. Bender, J. I. Rader y F. D. McClure. *Guidance for Industry. FDA Nutrition Labeling Manual - A Guide for Developing and Using Data Bases*. 1998 Edition.
(<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/nutrguid.html>).