

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
MEDIOAMBIENTALMENTE SOSTENIBLES POR
ESPECTROMETRÍA FTIR**

JOSEP FRANCESC VENTURA GAYETE

**UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007**

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Ángel Ríos Castro
- D. Jordi Coello Bonilla
- D^a. Pilar Ortega Barrales
- D^a. María Rosario Pereiro García
- D^a. Adela de los Reyes Mauri Aucejo

Va ser dirigida per:

D. Miguel de la Guardia Cirugeda
D. Salvador Garrigues Mateo

©Copyright: Servei de Publicacions
Josep Francesc Ventura Gayete

Depòsit legal:
I.S.B.N.:978-84-370-6800-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
MEDIOAMBIENTALMENTE SOSTENIBLES
POR ESPECTROMETRÍA FTIR**

Josep Francesc Ventura Gayete

Universitat de València

Valencia, 2006

Los directores de Tesis:

El Dr. Miguel de la Guardia Cirugeda, Catedrático de Universidad,
el Dr. Salvador Garrigues Mateo, Catedrático de Universidad,
del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia,

Certifican:

Que **Don Josep Francesc Ventura Gayete**, Licenciado en Química por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión la presente **Tesis Doctoral** que lleva por título:

"Desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles por espectrometría FTIR"

Para poder optar al grado de Doctor en Química y autorizamos la presentación y defensa de la correspondiente memoria en la Facultad de Química de la Universidad de Valencia. Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente autorización.

Valencia, Diciembre de 2006

Fdo.: Dr. Miguel de la Guardia

Fdo.: Dr. Salvador Garrigues

Índices de impacto

Las revistas en las que se han publicado los trabajos que forman parte de esta Tesis presentan los siguientes índices de impacto (año 2005):

Talanta: 2.391

Analytica Chimica Acta: 2.760

Microchemical Journal: 1.806

Los artículos de los que consta esta Tesis por compendio de publicaciones son los siguientes:

1. Attenuated total reflectance infrared determination of sodium nitrilotriacetate in alkaline liquid detergents.

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues

Talanta 70 (2006) 870–875

2. Multicommunication ATR-FTIR: determination of sodium alpha-olefin sulfonate in detergent formulations.

Josep Francesc Ventura-Gayete, Boaventura F. Reis, Salvador Garrigues, Ángel Morales-Rubio, Miguel de la Guardia

Microchemical Journal 78 (2004) 47– 54

3. Multicommunication Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline.

Eva Ródenas-Torralba, Josep Ventura-Gayete, Ángel Morales-Rubio, Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta 512 (2004) 215–221

4. Multicommutation-NIR determination of Hexythiazox in pesticide formulations.

Josep F. Ventura-Gayete, Sergio Armenta, Salvador Garrigues, Ángel Morales-Rubio,
Miguel de la Guardia

Talanta 68 (2006) 1700–1706

5. On-line Fourier-Transform Infrared determination of methidathion and tricyclazole in water samples after solid phase extraction.

Josep F. Ventura-Gayete, M. Khanmohammadi, Salvador Garrigues and Miguel de la Guardia

Enviado para publicación

6. Pressurized solvent extraction-Fourier Transform Infrared determination of fat.

Josep F. Ventura-Gayete, Salvador Garrigues, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Enviado para publicación

7. On-line sample treatment and FT-IR determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals.

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues

Talanta 70 (2006) 1100–1106

Agradecimientos

Condensar en unas pocas palabras todo aquello que debo agradecer a quienes han formado parte de mi mundo durante estos años es una tarea difícil. Por una parte, no habría sido posible realizar esta tesis sin el apoyo y supervisión de mis directores. Gracias a Miguel y a Boro por su ayuda durante estos años y por confiar en mí como doctorando.

Gracias también a mis compañeros del laboratorio durante estos años, a los demás profesores del departamento (Ángel, Marisa y Agustín), que siempre me han echado una mano cuando hacía falta, al profesor Khanmohammadi por su colaboración en mi último trabajo y especialmente a Boa por su ayuda y por ser una excelente persona.

Gracias a mis amigos de la Universidad por sus comentarios y apoyo.

Por otra parte, no puedo dejar de lado a mis amigos y amigas del Orfeón Universitario de Valencia, con los que he compartido los últimos años y he vivido mil momentos emocionantes. No caben aquí ni todos los nombres ni todo lo que les debo, pero sin ellos no habría terminado esta Tesis.

Por último, gracias a mi familia, a mis padres, abuelos, hermana, cuñado, y a mi sobrino. Especialmente a mis padres, que han soportado estoicamente que decidiera terminar la Tesis a pesar de las dificultades.

Paradójicamente, me siento afortunado de vivir en este país, en el que, sin recibir beca alguna, he conseguido realizar esta Tesis.

*Las estrellas en su curso
combaten por el hombre justo.*

Proverbio chino.

[\emptyset^*]

A mi familia

Prefacio

Qué es y qué no es esta Tesis.

La obtención del título de doctor requiere, según el RD 56/2005, la presentación y defensa de una Tesis Doctoral. La modalidad de Tesis por compendio de publicaciones que hasta ahora representaba una alternativa a la Tesis en formato clásico desaparece de la nueva normativa. Esta Tesis será, por tanto, una de las últimas que se ajusten al formato por compendio de publicaciones.

Por un lado, el formato clásico permite explicar en toda su extensión el trabajo realizado durante los años de investigación, aunque existe el riesgo de que la Tesis se convierta en una enumeración más o menos elaborada de los datos -ya sean experimentales o bibliográficos- recopilados durante ese tiempo. Implica, en cierta medida, la máxima cantidad de información sobre el trabajo que se ha realizado, y la pone a disposición del lector especializado en el tema. La redacción de una Tesis de estas características supone una inversión enorme de esfuerzo y tiempo.

Por otra parte, la modalidad por compendio de publicaciones se centra en el rendimiento obtenido por el doctorando a la hora de publicar los trabajos incluidos en la Tesis. Parecería injusto obviar el proceso que conduce a la publicación de un artículo en una revista científica. Una Tesis en este formato no puede dar cabida a todo este proceso, sólo a los resultados publicados desde una perspectiva unitaria. De otro modo no existiría diferencia con una Tesis por formato clásico. Así se sacrifican todos los detalles sobre los resultados no satisfactorios, las investigaciones fallidas y todo aquello que no se incluye en un artículo por prudencia o porque no hay más remedio. La contrapartida a esta visión parcial es la de la posibilidad de una mayor claridad en la Tesis y el consabido ahorro de tiempo y papel, que es lo que el doctorando más desea después de años contando los días que le quedan para terminar.

La cuestión radica en si una Tesis es útil o no, si ofrece una idea justa del trabajo que se ha llevado a cabo y si proporciona información clave o sólo es relleno burocrático. En caso de una Tesis como ésta creo que el factor más importante a tener en cuenta es que resulte útil para cualquier persona que esté interesada en la Química Analítica, desde el punto de vista de la Industria o la Universidad, aunque no sea un especialista en el tema. Pienso que así se cumple una de las premisas éticas que debiéramos seguir siempre: hacer comprensible nuestro trabajo.

En esta Tesis Doctoral en modalidad por compendio de publicaciones se pretende lograr este objetivo a través de la exposición de la teoría básica en que se fundamenta la investigación desarrollada y los antecedentes de ésta (Capítulo I, Introducción), los objetivos de la Tesis y el plan de trabajo (Capítulo II), el resumen de los artículos y de los resultados obtenidos (Capítulo III), los artículos propiamente dichos (Capítulo IV) y las conclusiones finales (Capítulo V). Se incluye un apéndice (Capítulo VI) que he juzgado necesario para explicar cómo se crea y cómo funciona el *software* utilizado en los trabajos de multiconmutación. Finalmente, el Capítulo VII se dedica a la bibliografía.

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de las líneas de trabajo que nuestro grupo ha venido explotando durante los últimos años. Por un lado, la búsqueda de aplicaciones de la espectroscopía FTIR con fines cuantitativos y, por otro, la automatización de los métodos de análisis. Ambas líneas de investigación han tenido en común una característica fundamental: el desarrollo, en la medida en que ha sido posible, de prácticas respetuosas con el medio ambiente en lo que a los métodos analíticos se refiere. La espectroscopía FTIR ha utilizado tradicionalmente disolventes tóxicos y nocivos (p.ej. organoclorados). Así pues, como consecuencia natural de los cambios en las legislaciones estatales e internacionales y de la concienciación medioambiental que, afortunadamente, se ha ido produciendo a todos los niveles, la espectroscopía FTIR aplicada al análisis químico ha tenido que evolucionar en sentido positivo. Respecto al uso de disolventes organoclorados, la tendencia es a reducir su consumo a través de la automatización y miniaturización de los métodos analíticos, a la par que se estudian alternativas válidas que permitan la medida de disoluciones acuosas (como el empleo de la técnica de Reflectancia Total Atenuada o ATR). Como efectos secundarios

de estas tendencias, aunque no por ello menos interesantes desde el punto de vista del análisis químico, se producen mejoras en la eficiencia analítica y en la versatilidad de los métodos. Resultado de la investigación en este campo, esta Tesis Doctoral incluye los elementos básicos de los avances en la espectroscopía FTIR aplicada al análisis cuantitativo que, al ser en formato de compendio de publicaciones, se han materializado en artículos publicados o pendientes de publicar en revistas de Química Analítica.

Los trabajos incluidos en la Tesis se han agrupado en función de las características de los métodos desarrollados y empleados en cada uno de ellos. Así pues, aparecen cuatro grupos que se corresponden con:

1. Análisis directos de muestras acuosas. En este caso se utiliza la técnica ATR-FTIR. Este grupo incluye un único artículo, sobre la determinación de nitriloacetato sódico en detergentes líquidos de pH elevado por ATR-FT-MIR con celda de diamante.

2. Métodos de análisis por espectrometría FTIR que utilizan multiconmutación. Se incluyen tres artículos en este grupo, uno para el MIR (Infrarrojo medio) acoplado con medidas ATR, un segundo también para el MIR pero con medidas de transmisión y, finalmente, otro más para medidas de transmisión pero en el NIR (Infrarrojo cercano):

2.1. Determinación de α -olefinsulfonato sódico en detergentes líquidos por ATR-FT-MIR.

2.2. Determinación FT-MIR de benceno en gasolina.

2.3. Determinación FT-NIR de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias.

3. Métodos FT-MIR con extracción previa del analito. En este grupo se presentan dos artículos. En el primero de ellos se aplica la técnica de extracción denominada Extracción en Fase Sólida (SPE), y en el segundo la técnica PSE (Extracción Presurizada con Disolvente):

3.1. Determinación de methidathion y tricyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y posterior elución en línea.

3.2. Determinación de grasa en leche en polvo, empleando la extracción PSE.

4. Método de análisis FT-MIR con extracción en línea. En este grupo se incluye un único trabajo, correspondiente a la determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas con extracción en línea.

En el Capítulo II (Objetivos) se presentan detalladamente los objetivos de esta Tesis debidamente justificados.

Así pues, esta Tesis está centrada en los logros obtenidos y en las dificultades encontradas a lo largo del desarrollo de los métodos de análisis FTIR propuestos, más que en los resultados en sí mismos. Las líneas de investigación que en su día fueron abandonadas por los resultados negativos obtenidos no se comentan en esta Tesis pero, de alguna manera, sí que han servido para encauzar y reconducir el trabajo hasta alcanzar los objetivos fijados.

Lista de acrónimos

AOS	α -olefinsulfonato sódico
ASE	Extracción acelerada con disolvente (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
ATR	Reflectancia Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
CV	Coeficiente de variación
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FA	Análisis en flujo (<i>Flow Analysis</i>)
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
FIA	Análisis con inyección en flujo (<i>Flow Injection Analysis</i>)
FIR	Infrarrojo lejano (<i>Far-Infrared</i>)
FT	Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform</i>)
HG	Generación de hidruros (<i>Hydride Generation</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IR	Infrarrojo (<i>Infrared</i>)
LLE	Extracción Líquido-Líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
MIR	Infrarrojo medio (<i>Mid-Infrared</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NIR	Infrarrojo cercano (<i>Near-Infrared</i>)
NTA	Nitrilotriacetato sódico
PFE	Extracción presurizada con fluido (<i>Pressurized Solvent Extraction</i>)
PLE	Extracción presurizada con líquido (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PSE	Extracción presurizada con disolvente (<i>Pressurized Solvent Extraction</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno
SIA	Análisis con inyección secuencial (<i>Sequential Injection Analysis</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VPG	Generación de fase vapor (<i>Vapor Phase Generation</i>)

Índice

Índices de impacto.....	<i>ii</i>
Agradecimientos.....	<i>iv</i>
Prefacio.....	<i>vii</i>
Acrónimos.....	<i>xi</i>
Índice.....	<i>xii</i>

I. Introducción.....	2
1. Introducción a la Espectroscopía vibracional.....	2
1.1. Orígenes históricos de la Espectroscopía.....	2
1.2. Fundamentos teóricos de la Espectroscopía MIR y NIR.....	4
1.2.1. El espectro electromagnético.....	5
1.2.2. Espectroscopía IR.....	8
Modos de vibración.....	9
Características del espectro IR.....	11
2. Instrumentación y modos de medida.....	16
2.1. Espectrómetros de Transformada de Fourier.....	16
2.2. Materiales de la celda de medida.....	22
2.3. Modos de medida.....	24
2.3.1. Medidas por Transmisión.....	24
Celdas de líquidos.....	25
2.3.2. Medidas por Reflectancia.....	26
3. Aspectos operativos de los métodos de análisis cuantitativo.....	29
3.1. Tipos de operaciones analíticas y características de los métodos.....	28
3.1.1. Tratamiento de la muestra: técnicas de extracción.....	30
Extracción en fase sólida (SPE).....	30
Extracción presurizada con disolvente (PSE).....	33

3.2. Métodos de análisis: tipos de medidas y diseño de montajes experimentales.....	35
3.2.1. Medidas en modo discontinuo.....	36
3.2.2. Medidas en continuo.....	38
3.2.3. Multiconmutación.....	39
3.3. Acoplamiento con las técnicas vibracionales.....	45
4. El papel de la espectrometría vibracional en el control de calidad.....	51
5. Análisis medioambientalmente sostenible.....	53
6. Antecedentes de la Tesis.....	56
 II. Objetivos.....	 60
 III. Resumen de los trabajos y discusión.....	 64
1. Análisis directo por ATR-FTIR con celda de diamante: determinación de NTA en detergentes.....	64
Introducción.....	64
Resumen y discusión.....	65
Conclusiones.....	74
2. Desarrollo de métodos de análisis por espectrometría vibracional con multiconmutación.....	75
2.1. Determinación ATR-FTIR de alfa-olefinsulfonato sódico: sistemas con multiconmutación y medidas en stopped-flow.....	75
Introducción.....	75
Resumen y discusión.....	76
Conclusiones.....	80
2.2. Determinación FTIR de benceno en gasolina: uso de la multiconmutación como estrategia alternativa al FIA.....	81
Introducción.....	81
Resumen y discusión.....	81

Conclusiones.....	86
2.3. Determinación de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias: aplicación de la multiconmutación acoplada a la espectrometría FT-NIR.....	87
Introducción.....	87
Resumen y discusión.....	88
Conclusiones.....	94
3. Desarrollo de métodos de análisis FT-MIR con extracción previa del analito.....	95
3.1. Determinación de methidathion y trycyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y elución en línea.....	95
Introducción.....	95
Resumen y discusión.....	97
Conclusiones.....	102
3.2. Determinación de grasa en leche en polvo con extracción presurizada con disolvente.....	103
Introducción.....	103
Resumen y discusión.....	105
Conclusiones.....	109
4. Tratamiento en línea de la muestra: determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas.....	111
Introducción.....	111
Resumen y discusión.....	112
Conclusiones.....	120
IV. Resultados.....	122
1. Análisis directo por ATR -FTIR con celda de diamante: determinación de NTA en detergentes.....	122
2. Desarrollo de métodos de análisis por espectrometría vibracional con multiconmutación.....	129

2.1. Determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico: sistemas con multiconmutación y medidas en modo stopped-flow.....	129
2.2. Determinación FTIR de benceno en gasolina: uso de la multiconmutación como estrategia alternativa al FIA.....	138
2.3. Determinación de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias: aplicación de la multiconmutación acoplada a la espectrometría FT-NIR.....	146
3. Desarrollo de métodos de análisis FT-MIR con extracción previa del analito.....	154
3.1. Determinación de methidathion y tricyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y elución en línea.....	154
3.2. Determinación de grasa en leches en polvo con extracción presurizada con disolvente.....	179
4. Tratamiento en línea de la muestra: determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas.....	199
V. Conclusiones.....	207
VI. Apéndices.....	216
Apéndice I: programación con Quickbasic 4.5.....	216
Apéndice II: glosario.....	222
VII. Bibliografía.....	224

Capítulo I

Introducción

I. Introducción

1. Introducción a la Espectroscopia vibracional

1.1. Orígenes históricos de la Espectroscopia

La Química Analítica se sirve de técnicas instrumentales espectroscópicas desde finales del siglo XIX. Por este motivo comenzaremos esta Introducción con una breve historia general de la Espectroscopia, para describir más tarde los fundamentos teóricos de las técnicas espectroscópicas vibracionales utilizadas en las investigaciones que dan origen a esta Tesis Doctoral.

Se entiende como espectroscopia el estudio de los fenómenos de absorción, emisión y dispersión de la radiación electromagnética producidos por la interacción de ésta con la materia -átomos neutros, iones o moléculas-. La radiación electromagnética se distingue en función de su longitud de onda característica. A grandes rasgos, la espectroscopia requiere una radiación procedente de una fuente, un selector de longitud de onda y un detector. Su desarrollo se haya íntimamente relacionado, por tanto, con el de la Óptica y otras ramas de la Física.

El primer antecedente clásico que se puede asociar con el concepto de espectroscopia (del latín *spectrum*, imagen, y del griego *σκοπέω*, mirar) se corresponde con la serie de experimentos llevados a cabo por Isaac Newton (1643-1727) a partir de 1665 (Hollas, 2004). En estos famosos ensayos, Newton estudió la descomposición de la luz blanca en bandas de diferentes colores conseguida con la ayuda de un prisma triangular. Este fenómeno se conocía, no obstante, desde la Antigüedad. El arco iris y otros fenómenos meteorológicos producen el mismo espectro de colores. Sin embargo fue Newton el primero en identificar correctamente la descomposición de la luz como causa de este efecto. Tendrían que pasar más de cien años para que se diera otro paso importante en el campo de la

Espectroscopia. En el año 1800, el astrónomo William Herschel (1738-1822) midió la temperatura de las bandas de luz producidas al descomponer la luz blanca con un prisma (Davies, 1998). Advirtió que el termómetro media temperaturas más altas conforme se pasaba del extremo azul del espectro al rojo. Y más allá todavía, en la zona en la que el ojo humano no percibía color alguno, la temperatura continuaba en aumento. Denominó infrarrojo (IR) a esta parte del espectro, que está “más allá” (Latín *infra*) del color rojo. Puesto que el prisma estaba construido con vidrio y éste absorbe la radiación en la región del espectro correspondiente al infrarrojo medio, Herschel había descubierto el infrarrojo cercano (NIR).

Un año más tarde, J. Ritter (1776-1810) detecta por primera vez la radiación ultravioleta al hacer incidir el espectro solar sobre cloruro de plata, encontrando la máxima descomposición del compuesto en la región espectral anterior al color azul (Meadows, 2001). En 1802, William Wollaston (1766-1828) descubre líneas oscuras en el espectro solar. Una década más tarde, Josef Fraunhofer (1787-1826) estudia estas líneas con precisión, hasta encontrar más de 600 (*líneas de Fraunhofer*) (Meadows, 2001). Es en los primeros años del siglo XIX cuando se comienza a relacionar la naturaleza química de una sustancia con su espectro característico. Léon Foucault (1819-1868) es el primero en identificar los procesos de absorción y emisión de la luz como origen de las líneas oscuras (absorción) y las brillantes (emisión) que aparecen en el espectro solar (Meadows, 2001).

A la par de estos avances, se desarrollan en aquellos años las bases técnicas que permitieron la puesta a punto de los primeros espectrógrafos. En 1830, L. Nobili (1787-1835) describe el termopar, cuyo principio de funcionamiento es fundamental en la Espectroscopia infrarroja: cuando incide un rayo de luz en la unión entre dos piezas de metales diferentes se produce una corriente eléctrica debida al calor generado. Por otra parte, Langley (1834-1906) construye en 1881 el primer bolómetro, dispositivo que detecta el calor producido por la radiación infrarroja al producir cambios en alguna propiedad física del material que lo constituye (Allegheny Observatory, 2001). En ese mismo año Alexander G. Bell (1847-1922) desarrolla una versión primitiva de un detector fotoacústico, que utiliza un micrófono para

captar el calentamiento de un gas encerrado en una celda hermética cuando incide radiación sobre ésta (Ciurczak, 1995).

Robert Bunsen (1811-1899) y Gustav Kirchhoff (1824-1887) sientan a partir del año 1860 las bases del diseño de los instrumentos al construir un espectrógrafo con el que obtienen los espectros de numerosos compuestos químicos (Kirchhoff, 1860). De esta manera consiguen descubrir los elementos Cesio, que presenta dos líneas de emisión de color azul, y el Rubidio, que presenta dos líneas de color violeta. Son los primeros pasos de la Espectroscopía de Emisión Atómica, y por ende, de la aplicación de la espectroscopía al análisis químico.

La aplicación de la Espectroscopía Infrarroja a la Química Analítica, si bien como primeros balbuceos, surge con los trabajos de Abney y Festing en 1882, que obtienen fotografías de los espectros IR de varias sustancias (Ciurczak, 1995). El empuje final a esta disciplina lo realiza W. W. Coblenz (1873-1962), con la publicación en 1905 de *Investigations of Infrared Spectra* y diversos artículos (Coblenz, 1905). A partir de este momento, la investigación en el campo de la Espectroscopía Infrarroja prosigue con éxito. Durante la II Guerra Mundial, el interés por el infrarrojo surge tanto de los Aliados como del Eje. Tras el conflicto, el diseño de instrumentos asequibles y rápidos hace posible la expansión de la técnica hasta los niveles actuales (Gilbert, 2000).

1.2. Fundamentos teóricos de la Espectroscopía MIR y NIR

Definiremos en primer lugar el concepto de radiación electromagnética. Ésta es una forma de energía que presenta características de corpúsculo y onda. Su origen se encuentra en el movimiento de las partículas con carga eléctrica. Consiste en unos campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí y que se propagan en dirección perpendicular a sí mismos con velocidad constante. La radiación electromagnética puede estar polarizada, de modo que el campo eléctrico y el magnético oscilan en un plano definido. Habitualmente, la radiación no se encuentra polarizada, así que en ella existen campos oscilando perpendicularmente a su dirección de propagación en todos los planos

posibles. La Figura 1 reproduce el esquema de la radiación electromagnética polarizada en el plano.

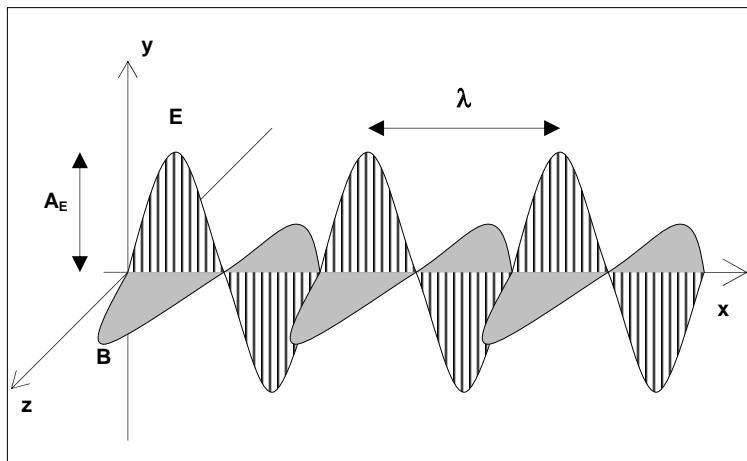


Figura 1. Representación de la radiación electromagnética polarizada en el plano, siendo E el campo eléctrico y B el campo magnético. De manera ilustrativa se indica la longitud de onda λ , y la amplitud A_E , para el componente eléctrico de la radiación.

El componente eléctrico de la radiación se puede expresar como:

$$E = A_E \sin(2\pi v t + \phi) \quad \{1\}$$

donde E es el campo eléctrico para un tiempo t , A_E es la amplitud máxima del campo, v es la frecuencia o número de oscilaciones por unidad de tiempo y ϕ es la fase de la onda. De manera análoga se define la componente magnética de la radiación, utilizando la amplitud máxima del campo magnético, en este caso A_B .

1.2.1. El espectro electromagnético

De todas las propiedades inherentes a la radiación electromagnética, las más utilizadas para su clasificación en Espectroscopía son la longitud de onda λ y sus magnitudes relacionadas frecuencia v y número de onda \bar{v} . En el vacío, se define:

$$\lambda = \frac{c}{v} \quad \{2\}$$

siendo c la velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$). Sin embargo, en el campo de la Espectroscopia Infrarroja se utiliza de forma generalizada la magnitud número de onda \bar{v} , cuya unidad es cm^{-1} . Esta magnitud se define como $1/v$. En la Figura 2 se indican las diferentes regiones en que se divide el espectro electromagnético, o conjunto continuo de radiaciones electromagnéticas de diferente frecuencia. La intensidad de la radiación es proporcional a la amplitud mientras que la energía lo es a \bar{v} .

La energía total de una molécula se define como suma de las energías de los distintos niveles energéticos posibles:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} + E_{\text{traslacional}} \quad \{3\}$$

Cada uno de estos términos energéticos se corresponde con transiciones de niveles de energía en los que están implicados electrones, vibraciones, rotaciones y traslaciones de la molécula.

En el caso de las técnicas espectroscópicas vibracionales, entre las que encontramos la Espectroscopia IR, la absorción de radiación electromagnética provoca cambios en la vibración de los diferentes átomos o grupos de átomos de la molécula respecto de la posición media de los enlaces.

Las diferentes técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Un átomo o molécula se encuentra en un determinado estado energético. Al interactuar con la radiación electromagnética, el estado de la molécula puede cambiar, de tal modo que se puede expresar la variación de energía entre los dos estados ΔE como:

$$\Delta E = h\nu \quad \{4\}$$

ecuación que nos indica que el cambio de energía está cuantizado, es decir, que sólo son posibles unos determinados valores de energía, siendo \hbar la constante de Planck.

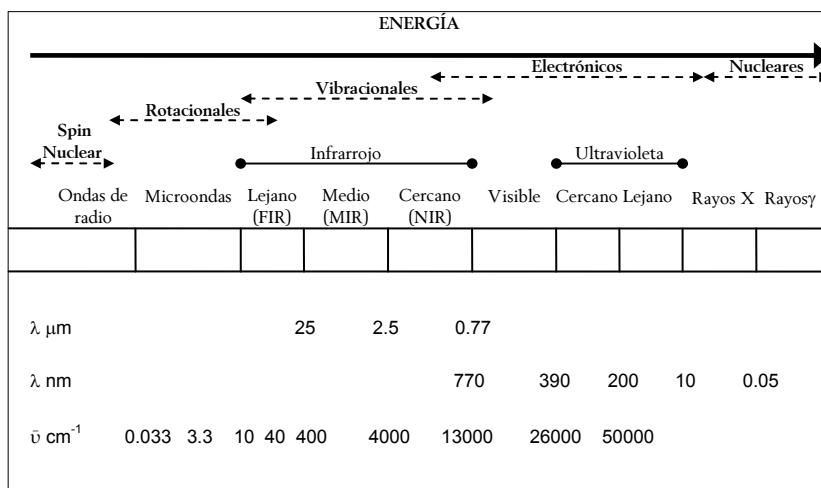


Figura 2. Regiones del espectro electromagnético. Se indica el tipo de niveles energéticos asociados a cada una de las regiones y los límites de éstas (Hollas, 2004).

La interacción de la radiación electromagnética con la materia (para simplificar llamaremos a la materia M en el estado fundamental y M^* en el estado excitado, considerándola como molécula) puede ocurrir a través de tres procesos diferentes (Hollas, 2004):

- Absorción inducida: $M + h\nu \rightarrow M^*$, donde M representa la molécula en el estado energético fundamental y M^* la misma molécula en el estado excitado.
- Emisión espontánea: $M^* \rightarrow h\nu + M$, donde la molécula se des-excita emitiendo radiación $h\nu$.
- Emisión estimulada: $M^* + h\nu \rightarrow M + 2h\nu$, donde la absorción de radiación electromagnética por la molécula en el estado excitado provoca la des-excitación de ésta con emisión de radiación.

La absorción inducida es el fenómeno básico que explotan las técnicas espectroscópicas vibracionales utilizadas en esta Tesis. A continuación trataremos de los fundamentos específicos de la Espectroscopia Infrarroja.

1.2.2. Espectroscopia IR

La parte del espectro electromagnético que se corresponde con transiciones vibracionales, denominada infrarrojo (IR), se divide habitualmente en tres regiones como consecuencia de su diferente uso en aplicaciones prácticas, la instrumentación que se requiere para su generación y detección y la naturaleza de las transiciones vibracionales implicadas. Estas tres regiones son: *IR cercano* entre 13000 y 4000 cm⁻¹ (NIR), denominado así porque se encuentra a continuación de la región visible del espectro; *IR medio* entre 4000 y 400 cm⁻¹; e *IR lejano* (FIR) entre 400 y 10 cm⁻¹. Trataremos en primer lugar las generalidades de la teoría del IR medio (similar para el FIR) y después las peculiaridades del NIR.

La frecuencia con la que vibra una molécula diatómica es igual a la de un oscilador armónico, que se define según la *ley de Hooke* (Coates, 2000) como:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \{5\}$$

donde **k** es la constante de fuerza y **μ** la masa reducida de la molécula diatómica [$(m_1 m_2)/(m_1 + m_2)$]. De esta manera, la constante **k** es una medida de la fuerza del enlace entre los átomos 1 y 2 de la molécula. En consecuencia diferentes enlaces tendrán **k** diferentes y, por tanto, su frecuencia de vibración **ν** será distinta.

De la Mecánica Cuántica (*ecuación de Schrödinger*) se deduce el valor de la energía para los niveles energéticos del oscilador armónico, que se identifica para una mayor sencillez con la molécula diatómica. La exposición de tal deducción (Hollas, 2004) sobrepasa los objetivos de esta Introducción y por tanto obviaremos su desarrollo completo, así que la ecuación resultante se expresa como:

$$E_v = (v + \frac{1}{2})\hbar\nu_0 \quad \{6\}$$

donde E_v es la energía del nivel vibracional “ v ” de la molécula, v es el número cuántico vibracional, y ν_0 es la frecuencia de vibración en el estado fundamental, que se obtiene de la expresión clásica {5}. La absorción de radiación electromagnética de frecuencia igual a la del oscilador armónico produce un cambio en el estado energético vibracional de la molécula. En otras palabras, la radiación IR provoca cambios en la vibración de las moléculas. Es la absorción de esta radiación la que detectamos en la Espectroscopía IR. Por otra parte, la ecuación {6} es una aproximación en la que se asume que la molécula diatómica se comporta como un oscilador armónico. En realidad, existe un efecto de anarmonicidad, de manera que intervienen más términos en la expresión de E_v (Figura 3).

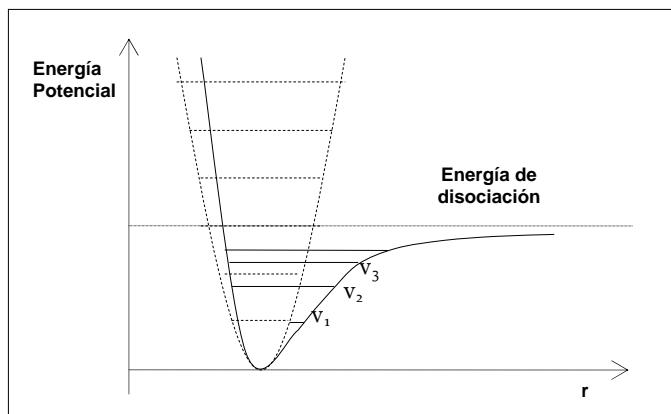


Figura 3. Curva de energía potencial para un oscilador armónico (curva discontinua) y para un oscilador anarmónico (curva continua), con sus niveles energéticos, en función de la separación entre los dos átomos oscilantes (r).

Modos de vibración

El número de vibraciones diferentes que puede presentar una molécula depende de los grados de libertad vibracionales de ésta. Una molécula no lineal de N átomos tiene $3N-6$ modos fundamentales de vibración. Para una molécula lineal, los modos de vibración son $3N-5$. Sin embargo, la sola existencia de modos de vibración no es condición suficiente para

que una molécula sea activa en el IR. Estrictamente, la vibración será activa cuando se produzca un cambio en el momento dipolar de la molécula como consecuencia del movimiento de vibración (Figura 4), lo que constituye la regla de selección del IR. El momento dipolar escalar μ (no confundir con masa reducida) se define como:

$$\mu = qd \quad \{7\}$$

donde q es la carga eléctrica total y d la distancia. De este modo, si la distancia d entre dos átomos varía también lo hará μ y, en consecuencia, tal vibración será activa en el IR.

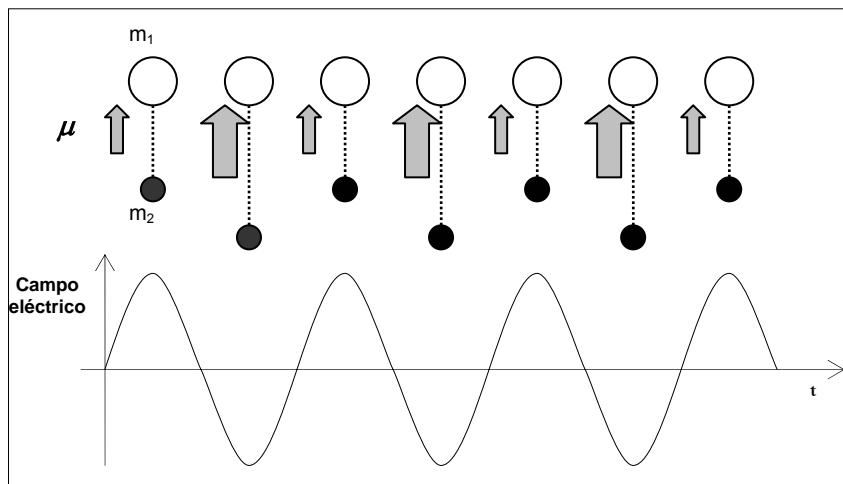


Figura 4. Esquema de la dependencia del momento dipolar de una molécula diatómica con la vibración.

Los modos de vibración de una molécula dependen, como hemos visto, de la estructura espacial y del número de átomos de ésta. En general, pueden ser de dos tipos:

- i) Vibraciones de tensión, que producen una variación en la distancia que separa los átomos.
- ii) Vibraciones de deformación, en las que se produce un cambio en los ángulos de enlace entre los diferentes átomos.

Características del espectro IR

Como veremos a continuación, pueden existir bandas que no se deban a vibraciones fundamentales. Dos frecuencias fundamentales pueden sumarse generando bandas de combinación, y también pueden aparecer bandas debidas a múltiplos de las frecuencias fundamentales o sobretonos (Steele, 2000). En resumen, en un espectro IR aparecerán mayor o menor número de bandas dependiendo de:

- a) Los modos de vibración posibles ($3N-6$ ó $3N-5$).
- b) Los cambios en el momento dipolar (regla de selección).
- c) La aparición de bandas de combinación.
- d) La existencia de sobretonos.
- e) La región en la que aparecen las frecuencias fundamentales (si están fuera de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ no aparecerán en un espectro de IR medio).
- f) La intensidad de las bandas fundamentales.
- g) Los solapamientos de bandas de frecuencia similar.
- h) La degeneración de los modos de vibración.

En la Figura 5, a modo de ejemplo, se indican las bandas más características de algunos grupos funcionales importantes.

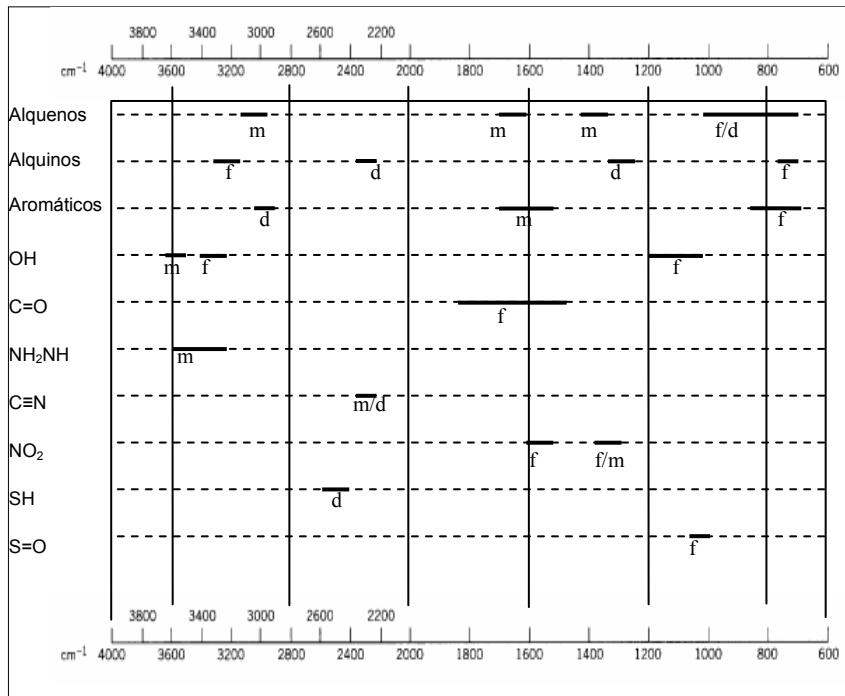


Figura 5. Esquema de las regiones en las que aparecen bandas de absorción para diferentes grupos funcionales y su intensidad relativa: f, fuerte; m, media; d, débil (Silverstein, 1998).

Para cuantificar la absorción de la radiación, en Espectroscopia IR se utilizan de manera habitual dos magnitudes diferentes. Éstas se denominan Transmision (T) y Absorbancia (A). Las medidas en Transmision son útiles cuando se pretende identificar un compuesto correlacionando las bandas del espectro IR de un patrón con la muestra problema. La Transmision se define como:

$$T(\%) = 100 \frac{I}{I_0} \quad \{8\}$$

donde T es la Transmision expresada en porcentaje, I es la intensidad de la radiación tras atravesar la muestra e I_0 es la intensidad inicial.

La magnitud denominada Absorbancia se define como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \{9\}$$

Mientras que la Transmitancia no está relacionada linealmente con la concentración de un compuesto y por tanto no puede utilizarse con fines de análisis cuantitativo, la Absorbancia sí lo está y además es aditiva:

$$A = aLC \quad \{10\}$$

donde **L** es el grosor de la celda que contiene la muestra o paso óptico, **a** es la absorvidad y **C** es la concentración de la sustancia a cuantificar. Esta ecuación se conoce como *Ley de Beer-Lambert* y es el fundamento de los métodos de análisis cuantitativos por espectrometría IR, objeto de la presente Tesis. Como ilustra la Figura 6, existen desviaciones de esta ley a causa de:

- a) El cambio del índice de refracción del medio y las interacciones intermoleculares que se producen para concentraciones elevadas del analito.
- b) La formación de enlaces de hidrógeno y equilibrios ácido-base.
- c) La dependencia de la absorvidad respecto de la longitud de onda, debido a que la instrumentación no permite utilizar radiación monocromática pura.

Como hemos visto a lo largo de esta sección, existen bandas que no se corresponden con transiciones permitidas por la regla de selección. Aunque aparecen en toda la región IR, es en el NIR donde adquieren mayor relevancia práctica. Por tanto, trataremos el origen de estas bandas no permitidas centrándonos en la región NIR. Como ya se ha indicado anteriormente, ésta se extiende entre los 4000 y 13300 cm⁻¹ y las bandas que aparecen en la misma se deben a sobretonos y bandas de combinación de frecuencias fundamentales (Bugay, 2001). La ecuación {6} se corresponde con los niveles de energía vibracionales para una molécula diatómica que se comporta como un oscilador armónico.

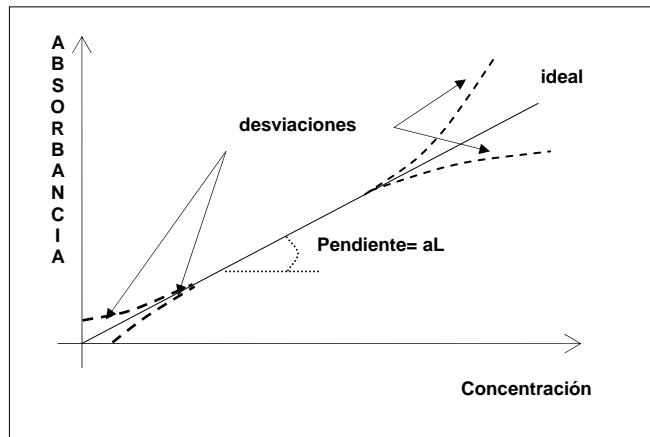


Figura 6. Relación ideal entre Absorbancia y concentración y desviaciones de la misma.

Generalizando la ecuación {6} para una molécula poliatómica:

$$E(v_1, v_2, v_3, \dots) = \sum_{i=1}^{3N-6} (v_i + \frac{1}{2})hv \quad \{11\}$$

donde v_1, v_2, v_3 son los niveles vibracionales y v_i el número cuántico vibracional (0, 1, 2, 3,...). Aquí la molécula es considerada como una serie de osciladores armónicos diatómicos independientes. La transición de $v_i=0$ a $v_i=1$ es la permitida por la regla de selección y se denomina vibración fundamental. Si la transición ocurre entre $v_i=0$ y $v_i=2, 3, \dots$ se trata de un sobretono. Por otro lado, si la transición ocurre entre el estado fundamental y $v_i=1$ y $v_i=1$ simultáneamente, entonces aparecen las bandas de combinación. Estrictamente, estas transiciones no están permitidas por la regla de selección. Sin embargo, ésta se deriva de la suposición de que los osciladores son armónicos. Esto no es más que una aproximación, ya que las moléculas poliatómicas se comportan como osciladores anarmónicos debido a la interacción entre los diferentes átomos (Hollas, 2004). Considerando la anarmonicidad del oscilador, la expresión para los niveles de energía que se obtiene despreciando los términos de exponente mayor que 2 resulta de la forma:

$$E_v = (v + \frac{1}{2}) h\omega_e - (v + \frac{1}{2})^2 \omega_e \chi_e \quad \{12\}$$

donde ω_e es la frecuencia vibracional (definida como ν en la ec. {5}) y $\omega_e \chi_e$ es la constante de anarmonicidad. Tal expresión justifica la presencia de los sobretonos en los espectros IR, especialmente en la región NIR. Al ser transiciones no permitidas, su intensidad es entre 10 y 1000 veces menor que la de las vibraciones fundamentales. En el NIR, los sobretonos provienen de tensiones X-H (O-H, S-H, C-H, N-H). Los sobretonos pueden combinarse con frecuencias fundamentales en lo que se denomina *Resonancia de Fermi* (Ciurczak, 2002). A estas bandas hay que añadir las bandas de combinación, que también provienen de transiciones prohibidas y que en consecuencia presentan una débil intensidad.

2. Instrumentación y modos de medida

El impulso definitivo a la Espectroscopia IR aplicada a la Química Analítica se ha producido a lo largo de la segunda mitad del siglo XX gracias al desarrollo de una tecnología que permite la obtención rápida y precisa de espectros IR. Hasta la década de 1980, la mayoría de los espectrómetros IR eran dispersivos. Sin embargo, los modernos equipos de *Transformada de Fourier* (FT) presentan grandes ventajas frente a los dispersivos y, debido a la reducción de su coste en los últimos años, han desplazado casi por completo a estos últimos.

2.1. Espectrómetros de Transformada de Fourier

La obtención del espectro IR con un equipo dispersivo implica la dispersión de un haz de radiación procedente de una fuente mediante un prisma o una red de difracción. La longitud de onda de la radiación que atraviesa la muestra es seleccionada con un monocromador, que deja pasar una estrecha franja de radiación. Para obtener un espectro de absorción es necesario rotar el prisma o la red de difracción, de tal modo que la muestra reciba un estrecho haz de radiación de longitud de onda $\lambda_i \pm \Delta\lambda_i$ diferente para cada punto del espectro (que se corresponde con una posición fija del elemento dispersor) hasta completarlo. Este barrido de λ se traduce en unos tiempos de medida del orden de minutos para la adquisición de un único espectro IR (Spraggs, 2000a).

En cambio, en un espectrómetro de FT la radiación de todas las longitudes de onda se mide simultáneamente, objetivo que se consigue mediante el uso de un interferómetro y de la aplicación de la FT. De esta manera se necesitan tiempos de barrido tan pequeños como 1 s, lo que supone una excelente eficacia en la obtención de los espectros (Spraggs, 2000a).

En la Figura 7 se describe el esquema básico de los espectrómetros FT que utilizan el *interferómetro de Michelson*, que es el más común en estos equipos. La radiación

policromática procedente de la fuente alcanza el *beam splitter* (divisor de haz) del interferómetro y es dividida en dos haces de igual intensidad: uno se refleja en el espejo fijo y el otro en el espejo móvil, de tal manera que al unirse ambos haces de nuevo tras atravesar por segunda vez el *beam splitter*, se produce el fenómeno de interferencias constructivas y destructivas. Al variar la posición del espejo móvil varía la diferencia de camino óptico entre los dos haces de radiación policromática y se obtiene el interferograma. Éste es el registro de la señal que llega al detector frente a la diferencia de camino óptico (retardo).

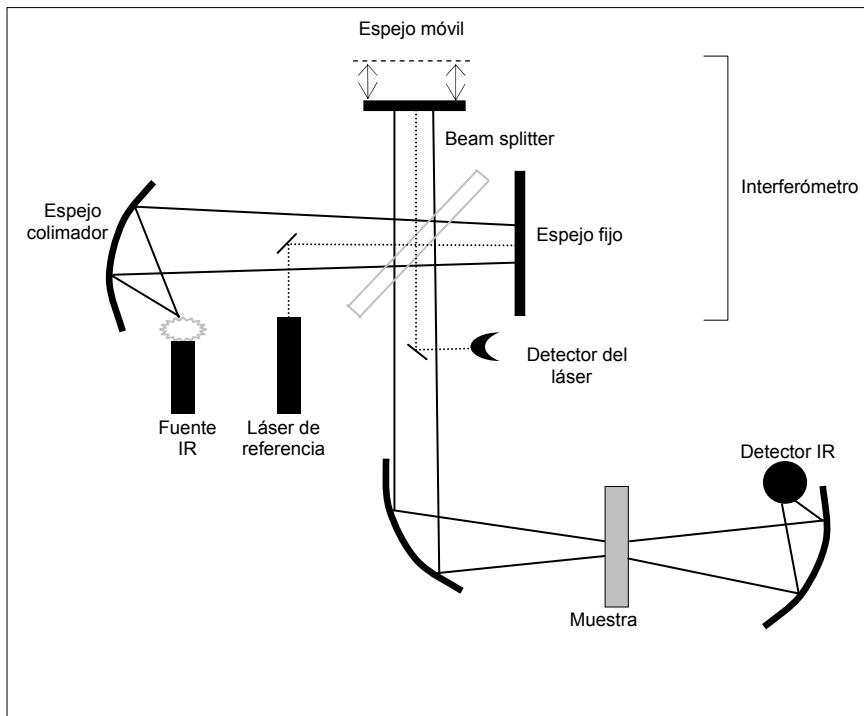


Figura 7. Diseño óptico básico de un espectrómetro FT con interferómetro de Michelson.

Una vez obtenido el interferograma, el equipo digitaliza los datos y realiza automáticamente la Transformada de Fourier. El interferograma de una radiación monocromática es una función sinusoidal, que se puede expresar como coseno. El interferograma de una radiación policromática equivale a la suma de las funciones coseno de cada radiación monocromática que la compone. Mediante la FT se consigue convertir esta función sinusoidal de señal frente a camino óptico en otra función sinusoidal de señal

frente a longitud de onda o frecuencia (Figura 8). El algoritmo matemático FFT (*Fast Fourier Transform*) fue desarrollado por Cooley y Turkey en 1965 y permite realizar la computación de la FT en un brevísimo lapso de tiempo (Spraggs, 2000a).

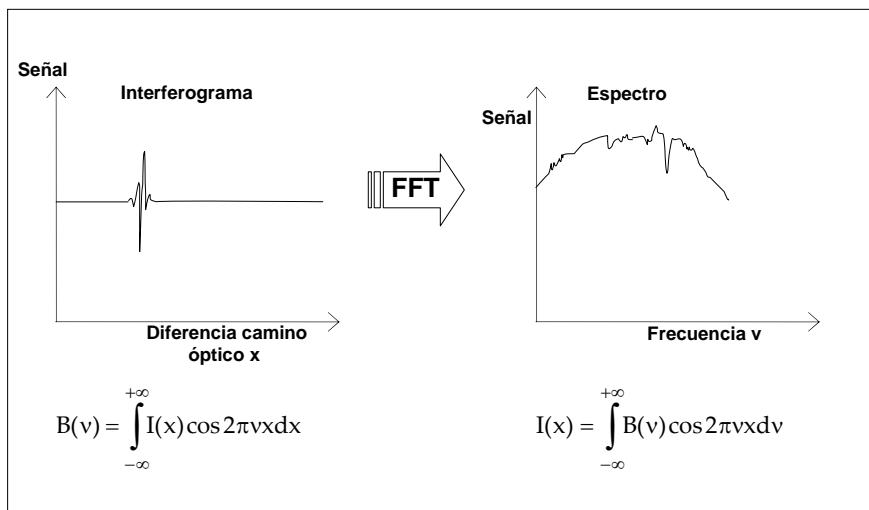


Figura 8. Esquema de la aplicación de la Transformada de Fourier (FT) en la obtención de un espectro (señal frente a frecuencia).

El intervalo de frecuencias que se pueden identificar a partir del interferograma depende de la longitud de éste, siendo necesarios al menos dos puntos por cada ciclo de la frecuencia mayor (*criterio Nyquist*). Si no se aplica este criterio no se pueden asignar los puntos inequívocamente a una única frecuencia, es decir, que la señal obtenida para una frecuencia es indistinguible de la obtenida para otra (Curbelo, 2000).

Por otra parte, la resolución del espectro depende del espaciado de las frecuencias proporcionado por la FT, que está determinado por el recorrido del interferómetro. Las frecuencias utilizadas en una FT son las que ajustan un número exacto de ciclos en la diferencia óptica máxima del interferómetro. La separación de dos frecuencias es la inversa de la diferencia máxima de camino óptico expresada en cm. Así pues, una resolución de 1 cm^{-1} requiere una diferencia de camino óptico de 1 cm, siendo además constante en todo el espectro. No obstante, en la práctica, la resolución efectiva es ligeramente diferente a causa

de las pequeñas desviaciones de los haces producidas al reflejarse en los espejos. Este problema se controla incorporando una *apertura Jacquinot* que reduce estas desviaciones hasta un valor mínimo (Spraggs, 2000a). A pesar de la disminución de la energía que alcanza la muestra y el detector, inherente al uso de este dispositivo, para una resolución determinada la intensidad de radiación que alcanza el detector es mayor en un espectrómetro FT que en uno dispersivo con rendija rectangular como monocromador. Este hecho se conoce como *ventaja Jacquinot* y es el motivo de la mayor sensibilidad de los equipos FT frente a los dispersivos.

La escala del interferograma se establece mediante la señal producida por un láser He-Ne de λ perfectamente definida ($0.6328 \mu\text{m}$) que se mide con un segundo detector. Al ser radiación monocromática produce una señal sinusoidal de periodo igual a la λ del láser, siendo la variable independiente el desplazamiento del espejo. En cada punto con señal=0 del interferograma de este láser de referencia se mide la señal de la radiación del haz IR. Así se escala el interferograma con una precisión mucho mayor que la conseguida con espectrómetros dispersivos, lo que se conoce como *ventaja Connes* (Spraggs, 2000a).

Con el objetivo de mejorar la relación señal/ruido, los espectrómetros FT-IR promedian una serie de *scans* o barridos (N) obtenidos sucesivamente en las mismas condiciones. La relación señal/ruido depende de \sqrt{N} y, por tanto, se puede aumentar incrementando el número de *scans* acumulados por cada espectro obtenido. Esta relación señal/ruido es mayor para un espectrómetro FT que para uno dispersivo, lo que se conoce como *ventaja Fellgett multiplex*, debido a que se registran todas las frecuencias del espectro al mismo tiempo (Gilbert, 2000). Por otra parte, como el espejo móvil del interferómetro realiza el recorrido completo para cada *scan* y tiene que volver a la posición inicial antes de llevar a cabo el siguiente barrido en un tiempo no despreciable, es necesario realizar una corrección de fase para sumar adecuadamente los diferentes *scans* obtenidos, operación que se realiza antes de la transformación, aunque existen equipos más sofisticados que solucionan este problema con dos detectores para la señal procedente del láser de referencia.

Los espectrómetros FT-NIR utilizan fuentes mucho más intensas, detectores más sensibles que los FT-MIR y se aplican a muestras con absorbtividad mucho menor que en el

MIR. Así pues, las ventajas de los espeñómetros de FT como la *Fellgett multiplex* y *Jacquinot* no son aplicables, en general, a los espeñómetros FT-NIR (Ciurczak, 2002). El exceso de radiación de la fuente puede incluso quemar la muestra. La principal ventaja de los FT-NIR es su excelente resolución, que permite resolver con mayor detalle las bandas características de esta región que, en muchas ocasiones, presentan un elevado grado de solapamiento. Este hecho es de gran importancia en la región NIR a causa del limitado número de bandas características de algunos de los compuestos más analizados por espectrometría NIR: los principios activos de preparados farmacéuticos. En la Figura 9 se representa el esquema del espeñómetro MPA (Multi Purpose AnalyzerTM) de Bruker, utilizado en el trabajo FT-NIR que se incluye en esta Tesis.

El algoritmo FFT requiere que el número de puntos que son transformados sea igual a 2^n . Sin embargo, para una resolución determinada, el número de puntos no tiene por qué coincidir con 2^n . Para solucionar este problema, se añaden tantos puntos con valor igual a cero como sea necesario para que el total sea igual a 2^n . Este proceso se denomina *zero-filling* y, aunque no cambia la resolución, mejora el aspecto del espectro.

Por otra parte, la señal sinusoidal del interferograma es finita, al ser finito el recorrido del espejo móvil del interferómetro. Esto implica que la función generada por FT tenga una forma peculiar (Figura 10). Para mejorar su aspecto, se aplica la denominada *apodización* (Spraggs, 2000a), que consiste en multiplicar el interferograma por una función especial, cuyo efecto es el de alisar la función generada. Existen diversas funciones de apodización (*Triangular*, *Boxcar*, *Blackmann-Harris*, *Happ-Genzel*,...).

Un espeñómetro de Transformada de Fourier requiere elementos diferentes dependiendo de la región del IR en la que deba operar. En la Tabla 1 se resumen los principales tipos de fuentes de radiación, detectores y *beam splitters* utilizados en estos instrumentos.

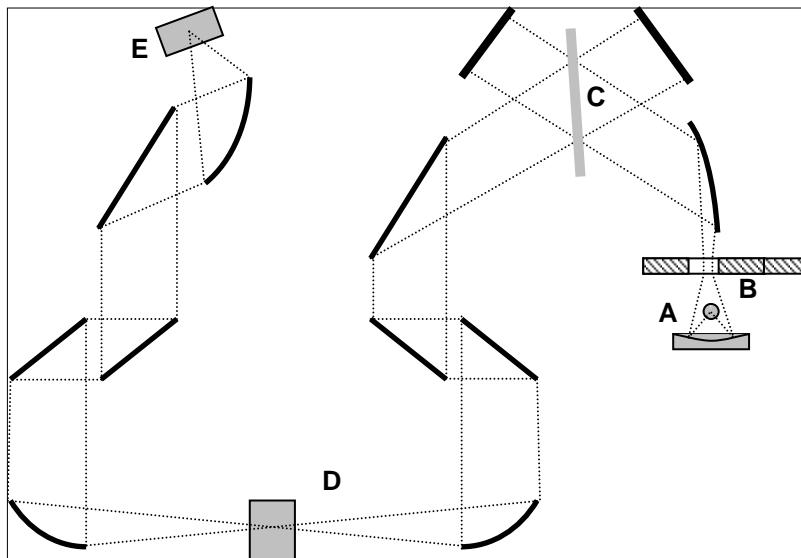


Figura 9. Esquema del diseño óptico del espectrómetro MPA de Bruker, para una configuración de medidas de Transmisiones en el compartimento de muestra. A: fuente; B: filtro; C: interferómetro; D: cubeta o vial de muestra; E: detector.

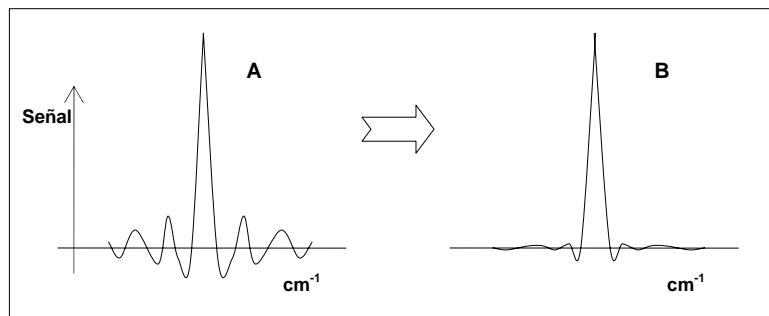


Figura 10. Efecto de la apodización en la función generada mediante la transformación de Fourier. A: función original generada por FT; B: función obtenida tras la apodización.

Un espectrómetro FT-MIR típico tiene un *beam splitter* de Ge/KBr con una resolución máxima de trabajo del orden de 1 cm^{-1} y un detector de sulfato de triglicina deutera (DTGS). Éste es un detector térmico, que convierte en una señal eléctrica el cambio de temperatura que sufre el elemento sensible al incidir sobre él la radiación IR. Funciona a temperatura cercana a la ambiente. Tiene tiempos de respuesta $< 1 \text{ ms}$, permitiendo trabajar perfectamente con tiempos de barrido de 1 s para una resolución de 4

cm^{-1} . Ha sido el detector utilizado en la mayoría de los trabajos presentados en esta Tesis. En cuanto al *beam splitter*, el Ge/KBr es el más común, teniendo una ventana espectral amplia que cubre toda la zona del MIR (4000-400 cm^{-1}).

Región	Intervalo cm^{-1}	Fuente	<i>Beam splitter</i>	Detector
NIR	15000-4000	Tungsteno-halógeno	CaF ₂ , cuarzo	DTGS
				PbS
				InGaAs
				InSb
MIR	7000-400	Cerámica (Nerst)	KBr, ZnSe	DTGS
		Nicromo		LiTa
		SiC (Globar)		MCT
				InSb
FIR	400-20	Cerámica	Mylar, CsI	DTGS
		Nicromo		Si
		Lámpara de mercurio		

Tabla 1. Principales tipos de fuentes de radiación, *beam splitters* y detectores utilizados en los espectrómetros FT-IR.

En cuanto a los espectrómetros FT-NIR, el *beam splitter* suele ser de cuarzo o de CaF₂, con detector fotoconductor de PbS o de arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), cuya conductividad varía cuando incide radiación electromagnética sobre él (Schuermeyer, 1999). En el trabajo presentado en esta Tesis se ha utilizado una configuración basada en un *beam splitter* de cuarzo y un detector InGaAs.

2.2. Materiales de la celda de medida

Los materiales utilizados habitualmente para las celdas de medida por Transmisión en el IR aparecen en la Tabla 2. En el caso del MIR suelen emplearse celdas con ventanas de KBr y NaCl que permiten aplicaciones en la zona de la huella dactilar. Otros materiales como el ZnSe y CaF₂ ofrecen una mayor resistencia pero limitan las posibilidades de trabajo en la zona de menores números de onda. Se utiliza un tipo de material u otro en función de

las características químicas de la muestra y la zona del IR que se pretende utilizar en el análisis.

Las disoluciones acuosas son incompatibles con las celdas de cristales higroscópicos o solubles en agua, como el NaCl o KBr. Los ácidos fuertes son especialmente incompatibles con el ZnSe, puesto que reaccionan formando seleniuro de hidrógeno - compuesto muy tóxico- y provocan la destrucción física de la celda. Las ventanas de las celdas que se han utilizado en los trabajos de FT-MIR que componen esta Tesis han sido de NaCl, CaF₂ y ZnSe.

Material	Intervalo cm ⁻¹	n	%	k	Propiedades químicas
CaF ₂	66000-1200	1.40	2.8	158	<ul style="list-style-type: none"> • Insol. en H₂O, resiste ácidos y bases • Soluble en sales de amonio
BaF ₂	50000-900	1.45	3.3	82	<ul style="list-style-type: none"> • Baja solubilidad en H₂O • Sol. en ácidos y NH₄Cl
Ge	5000-600	4.01	36	550	<ul style="list-style-type: none"> • Insol. en H₂O • Sol. en H₂SO₄ caliente y agua regia
NaCl	28000-700	1.52	4.5	15	<ul style="list-style-type: none"> • Higroscópico • Ligeramente soluble en alcohol y NH₃
ZnSe	20000-500	2.43	17	150	• Sol. en ácidos fuertes
KBr	33000-400	1.54	4.5	7	<ul style="list-style-type: none"> • Sol. en H₂O, alcohol y glicerina • Higroscópico
CsI	33000-150	1.74	7.3	20	• Sol. en H ₂ O y alcohol. Higroscópico
Diamante	45000-10	2.40	17	7000	• Insol. en H ₂ O, ácidos y bases

Tabla 2. Características de algunos materiales utilizados habitualmente en la construcción de las celdas de medida en el IR (Guide for Infrared Analysis, Bruker Optics). n: Índice de refracción a 2000 cm⁻¹, %: Pérdida de Reflectancia por superficie en porcentaje, k: Dureza Knoop.

Por lo que respecta a las medidas de Reflectancia total atenuada (ATR) el tipo de material utilizado para el elemento óptico ha sido ZnSe y el diamante. Éste destaca entre

todos los materiales por su extraordinaria resistencia química y dureza, lo que le dota de una gran utilidad en la construcción de elementos ópticos y accesorios, alguno de los cuales se verán con detalle más tarde.

2.3. Modos de medida

La Espectroscopia IR permite la obtención de espectros de una gran variedad de materiales. En ocasiones es necesario obtener el espectro del material en su forma original, ya sea líquido, sólido o gas, simple o complejo, químicamente inerte o muy reactivo. Existen varias opciones para conseguir espectros útiles de una muestra en su forma original. Podemos considerar los siguientes modos de medida:

- i) Medidas por Transmisión.
- ii) Medidas por Reflectancia.
- iii) Medidas por Fotoacústica.

A continuación expondremos brevemente las características de las medidas por Transmision y Reflectancia, que se han utilizado en los trabajos que forman parte de esta Tesis, y las implicaciones que éstas tienen en la configuración de los equipos FT-IR.

2.3.1. Medidas por Transmisión

En las medidas por Transmisión, el haz de radiación IR atraviesa la muestra y alcanza el detector. Parte de la radiación es absorbida por la muestra, de tal modo que el detector recibe una intensidad de radiación menor que la inicial (ver ec. 8). Para la obtención de los espectros de esta forma a partir de la muestra directa, los sólidos se dispersan en un líquido (*fluorolube*, aceite de *Nujol*) que se coloca entre las dos ventanas de la celda. Otra opción consiste en fabricar un disco o pastilla de KBr mediante una prensa. En tal caso, unos pocos mg de muestra sólida se mezclan de manera homogénea con unos 350 mg de KBr perfectamente seco. Esta mezcla se introduce en un molde adecuado, se coloca en una prensa y es sometida a una presión de ~12000 psi durante 1-2 min. Así se consigue un disco

que se coloca en un portamuestras. La obtención de espectros de gases, al ser muy baja su concentración, requiere celdas con paso óptico mucho mayor, de varios centímetros. Para el análisis de gases a nivel de traza, se utilizan celdas de múltiples reflexiones, que aumentan considerablemente el paso óptico sin aumentar el tamaño de la celda y, por tanto, reducen el volumen de muestra requerido para obtener medidas adecuadas.

Celdas de líquidos

Para obtener un espectro de un líquido por medidas de Transmitancia se dispone de varias opciones. Con líquidos no volátiles puede extenderse una gota sobre una película de un polímero inerte como el PTFE o el polietileno. También se puede colocar una gota entre dos ventanas de un material adecuado. Las celdas de líquidos pueden ser de espaciado fijo (distancia entre las ventanas que define el camino óptico) o desmontable. Este tipo de celdas se llenan manualmente con una jeringa. Sin embargo, en la metodología de análisis cuantitativo en la que se enmarca esta Tesis, se utilizan habitualmente micro-celdas de flujo (Figura 11).

En éstas, el camino óptico es determinado por un espaciador de Pb o PTFE. La disolución entra por la parte inferior de la celda y sale por la superior con ayuda de una bomba peristáltica o dispositivo similar. Como veremos más adelante, permite la realización de medidas en modo continuo o en modo *batch* sin que se requiera manipular la celda. Este tipo de celdas de flujo pueden rellenarse y limpiarse en línea, de tal manera que se reducen los posibles errores derivados del efecto memoria, difíciles de eliminar con celdas de llenado manual, se aumenta la repetibilidad y se evita la manipulación de las disoluciones, muchas veces tóxicas (Garrigues, 2000a).

2.3.2. Medidas por Reflectancia

Las medidas por Reflectancia se clasifican en dos modos: de reflexión interna y de reflexión externa (Spraggs, 2000b). Las técnicas de reflexión interna se basan en la formación de una onda evanescente en el límite entre dos superficies con diferente índice de refracción (n). Si el haz de radiación incide en el material con un ángulo mayor que un valor crítico, la radiación electromagnética no puede atravesar el medio de menor índice de refracción. Así pues, el haz se refleja totalmente en la cara interna del cristal (ZnSe, Ge, diamante). Sin embargo, la onda evanescente creada penetra ligeramente en el otro medio, típicamente unos pocos μm , interaccionando con la muestra y dando lugar a la absorción por ésta de la radiación. El haz se puede reflejar varias veces en las caras internas del cristal (y por ende penetrando de forma repetida en la muestra), aumentando así la sensibilidad de la medida (Figura 12). Este tipo de espectro se denomina de Reflectancia total atenuada (ATR). El índice de refracción del material del cristal determina la penetración de la onda evanescente en la muestra: a mayor n menor penetración y, consecuentemente, la absorción es menor, obteniéndose espectros menos intensos. Un cristal de Ge con $n= 4.0$ producirá espectros ATR más débiles que un cristal de ZnSe con $n= 2.3$. Por otra parte, la profundidad de la onda evanescente es proporcional a la λ del haz incidente, lo que se traduce en un aumento de la absorción respecto a un espectro de Transmisión para números de onda menores considerando un mismo paso óptico aparente.

En general, se utilizan dispositivos ATR horizontales en los que la muestra líquida o sólida se coloca sobre el cristal, generalmente de ZnSe (Figura 13). Estos accesorios se acoplan en los equipos FT-IR de manera sencilla. Para las muestras líquidas, basta colocar una cantidad suficiente para que moje completamente el cristal de la celda, prestando especial atención a que no se formen burbujas sobre la superficie del mismo, lo que afectaría enormemente a la repetibilidad de las medidas. Si la muestra es sólida, hay que garantizar que el contacto entre muestra y cristal sea completo. Esto se consigue ejerciendo sobre la muestra una presión controlada y disponiendo de un tamaño de partícula pequeño y lo más uniforme posible.

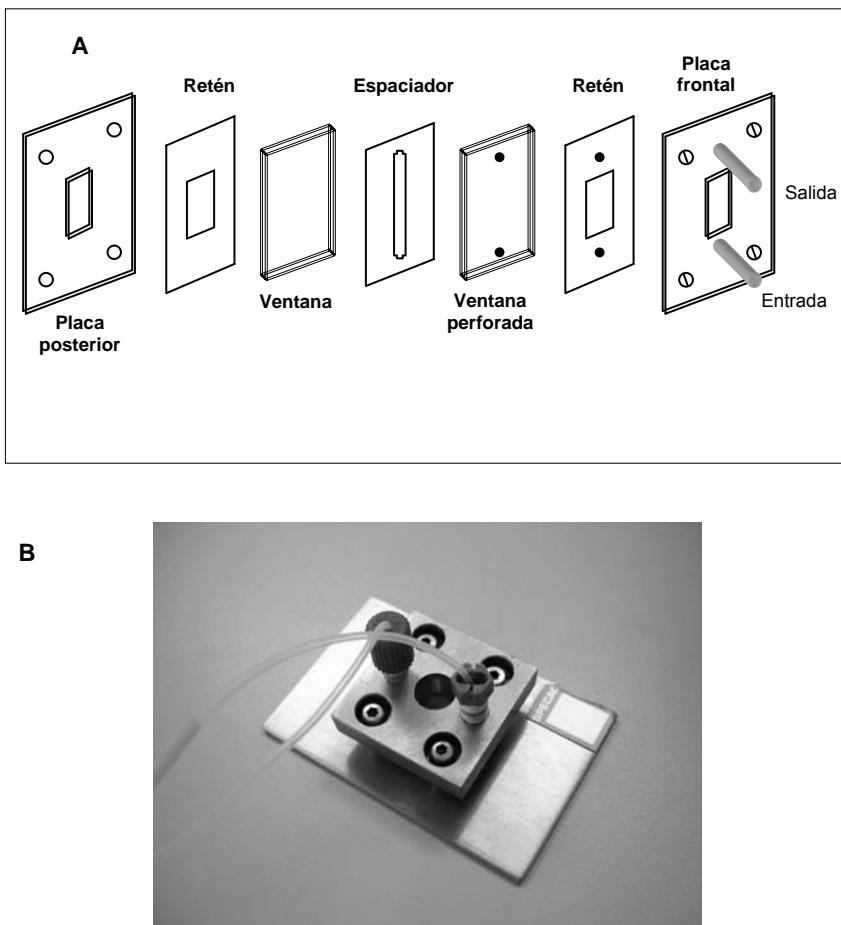


Figura 11. Celdas de flujo desmontables. A: partes de una celda de flujo. B: celda de microflujo Graseby Specac lista para su uso.

Una variante de la técnica ATR es la que utiliza un cristal de diamante. De esta manera se pueden producir grandes presiones sobre el cristal, lo que facilita especialmente el análisis de sólidos al asegurar un contacto más efectivo y reproducible. En el caso de los líquidos o disoluciones basta con depositar un pequeño volumen sobre el cristal sin preocuparse por su reactividad química. Por otra parte, existe la variante de celdas ATR de flujo, que trataremos más adelante, ya que se ha utilizado en un trabajo de la presente Tesis. Para este tipo de medidas también se pueden utilizar sondas ATR que se introducen directamente en la muestra y combinan prismas y fibra óptica.

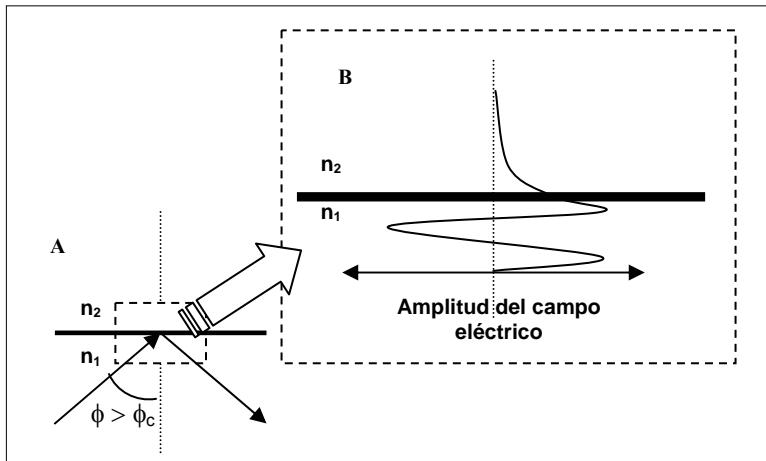


Figura 12. Esquema descriptivo de la reflexión total interna. A: reflexión total, ángulo de incidencia $\phi > \phi_c$, siendo ϕ_c el ángulo crítico; $n_1 > n_2$, siendo n_1 el índice de refracción del cristal; B: Onda evanescente formada en el límite entre los dos medios. La línea horizontal gruesa indica la interfase de separación entre los dos medios.

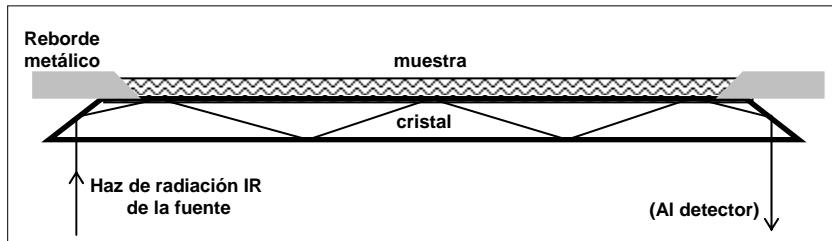


Figura 13. Esquema de un accesorio ATR horizontal con la configuración de cubeta para líquidos.

La Reflectancia externa de superficie y difusa tiene una consideración diferente a la Reflectancia interna. Es necesario un tratamiento matemático (*transformación Kramers-Kronig*) para obtener el espectro de absorbancia. Se utilizan estas técnicas para el análisis de superficies y sólidos en forma de polvo.

3. Aspectos operativos de los métodos de análisis cuantitativo.

3.1. Tipos de operaciones analíticas y características de los métodos

Como indica su título, esta Tesis se centra el desarrollo de métodos de análisis FT-IR. Por tanto, es necesario señalar los aspectos más importantes de lo que se entiende como método de análisis, haciendo especial hincapié en el diseño de los montajes experimentales y su acoplamiento con los equipos de medida. Definiremos ahora los conceptos básicos que nos ayudarán a introducir este tema.

Un método de análisis cuantitativo comprende una serie de operaciones analíticas individuales. Entre éstas encontramos el tratamiento previo y dilución de la muestra, la mezcla con reactivos, la adición de un estándar, el proceso de medida, etc. Así se debe distinguir entre estas operaciones y los métodos de análisis como conjunto de aquéllas. Cada una de estas operaciones puede realizarse, aunque no siempre, de dos maneras diferentes: de forma discontinua y de forma continua. En general, nos referiremos al proceso de medida como discontinuo o continuo, aunque también podamos hablar de métodos de análisis discontinuos y continuos.

Según este criterio, las medidas instrumentales pueden realizarse en modo discontinuo o en modo continuo. En el modo discontinuo, se mide la señal analítica de una muestra discreta, y la información se obtiene de manera puntual. En el caso de las medidas en modo continuo, el instrumento registra la señal analítica continuamente con el tiempo, pudiéndose monitorizar la respuesta. Sobre este punto profundizaremos en la sección 3.1.2. Generalizando para cualquier operación analítica, ésta es discontinua (o en *batch*) cuando se produce un cambio químico o físico de manera brusca, como pueda ser el tomar un volumen de muestra con una pipeta, introducirlo en un matraz y completar el volumen con disolvente. Cada paso se realiza de manera discreta, es decir, a saltos. En cambio, una operación realizada en continuo supone un cambio progresivo, como ocurre en la inyección continua de muestra en una corriente de portador en un sistema de flujo. El que un método

de análisis utilice medidas en modo discontinuo o continuo dependerá de las ventajas e inconvenientes que tenga cada tipo de medida, en el contexto del problema analítico a resolver.

Los objetivos y logros de esta Tesis, como veremos más adelante, se centran tanto en el tratamiento previo de la muestra como en el proceso de medida. Por tanto, describiremos a continuación las técnicas físico-químicas de extracción de la muestra que se han empleado en algunos de los métodos desarrollados en esta Tesis. Después, explicaremos las características del proceso de medida desde el punto de vista de los métodos discontinuos y continuos. Finalmente, introduciremos el concepto de multiconmutación, que ha tenido un papel central en el desarrollo de varios de los métodos de análisis aquí presentados.

3.1.1. Tratamiento de la muestra: técnicas de extracción

Tres de los artículos que forman parte de esta Tesis están relacionados con técnicas de extracción. En uno de ellos, la extracción se realiza en línea y presenta peculiaridades que comentaremos en el resumen de resultados; sin embargo ese trabajo se enmarca dentro de los métodos de análisis en continuo sin que el proceso de extracción requiera dispositivos adicionales. Es en los trabajos con extracción en fase sólida (SPE) y de extracción presurizada con disolvente (PSE) donde se utilizan técnicas y equipos específicos de extracción que trataremos a continuación.

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida se refiere a la separación de algún constituyente químico de una muestra líquida fluyente en estado de no-equilibrio a través de la retención en un sólido y la posterior recuperación de los constituyentes seleccionados mediante la elución con un disolvente adecuado (Wells, 2003). Esta técnica de extracción apareció como alternativa a la extracción líquido-líquido (LLE), que es una técnica de equilibrio. En la

práctica, existe una gran variedad de adsorbentes que retienen un gran número de analitos orgánicos, como puedan ser pesticidas, drogas o hidrocarburos.

En la Figura 14 se expone un esquema general de la metodología básica de la SPE. Cabe destacar que todos los procesos pueden realizarse en línea. En primer lugar, se acondiciona la columna pasando un volumen determinado de un disolvente adecuado, que activa la fase sólida y permite que ésta retenga el analito. Después se hace circular la muestra a través de la fase sólida con un caudal adecuado para que se retenga cuantitativamente el analito. A continuación se puede realizar un lavado para eliminar compuestos no deseados y finalmente se eluye el analito con el disolvente oportuno.

En general, se dispone de columnas o cartuchos llenados con la fase sólida - dispositivos que han sido utilizados en esta Tesis- con un tamaño de partícula entre 50 y 60 μm , dispuesta entre fritados de material inerte. También se pueden utilizar discos filtrantes que contienen la fase sólida, adecuados para volúmenes muy pequeños de muestra, y barras magnéticas recubiertas de fase sólida, que se introducen directamente en la muestra y retienen el analito mientras agitan el líquido.

Una de las principales ventajas de la SPE es que los procesos de retención y elución pueden realizarse en línea. De esta manera se evitan engorrosas manipulaciones de la muestra que, en el caso de la LLE, son inevitables dado el carácter de no-equilibrio de la técnica. En general, las ventajas de la SPE frente a la LLE son las siguientes:

- Evita la formación de emulsiones.
- Disminuye el consumo de disolventes.
- Retención y elución en línea: posibilidad de automatización sencilla.
- Posibilidad de realizar una elución selectiva y secuencial.
- Elevada preconcentración del analito.

Esta última característica de la SPE la hace especialmente útil cuando se emplea conjuntamente con la espectrometría FTIR para llevar a cabo la cuantificación de analitos en

muestras con niveles de concentración muy bajos, del orden de ppm, que habitualmente se encuentran fuera de la sensibilidad de las técnicas vibracionales cuando se llevan a cabo medidas directas. Es éste el caso de la determinación de pesticidas en aguas (*methidathion* y *tricyclazole*) que forma parte de la presente Tesis.

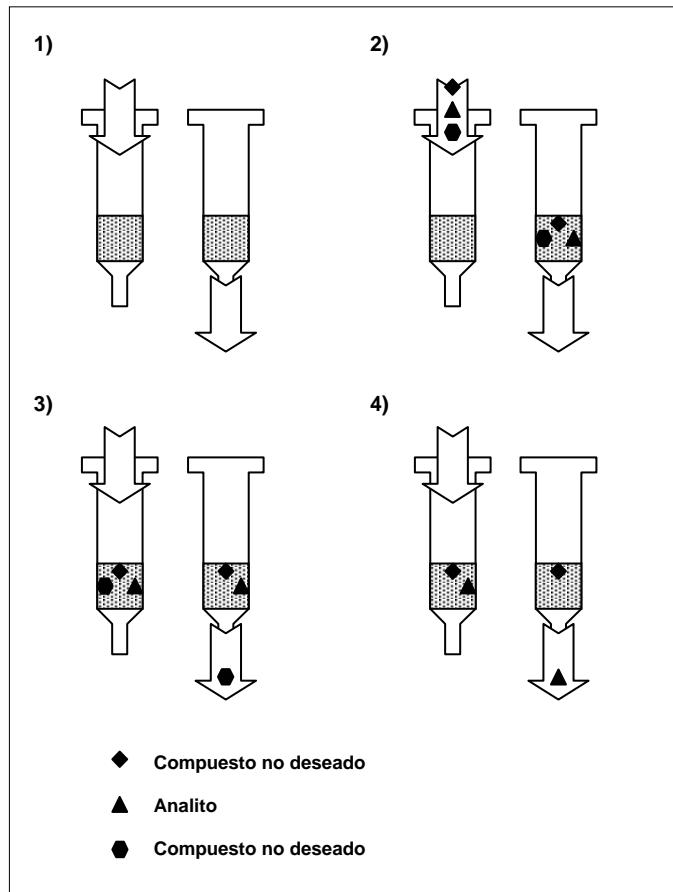


Figura 14. Etapas de la SPE. 1) Acondicionamiento de la fase sólida. 2) Retención. 3) Lavado. 4) Elución.

De entre los distintos tipos de fases sólidas de las que se puede disponer (de tipo polar, apolar, de intercambio iónico, etc...) en los trabajos incluidos en esta Tesis se han utilizado básicamente las de tipo C₈ y C₁₈.

Extracción presurizada con disolvente (PSE)

Esta técnica, que se conoce también como ASE (*accelerated solvent extraction*), PFE (*pressurized fluid extraction*) y PLE (*pressurized liquid extraction*), utiliza disolventes a elevada temperatura (~ 100 °C) y presión (~ 1500 psi) para extraer cuantitativamente los analitos de la matriz en la que se encuentran. Esta técnica, que fue desarrollada como alternativa a la extracción con fluidos supercríticos (SFE), ha demostrado en los últimos años una gran utilidad, pasando a formar parte de un buen número de los métodos estándar que propone la *Environmental Protection Agency* (EPA) (Kou, 2003).

La elevada presión y temperatura afectan al disolvente, a la muestra y a sus interacciones. La temperatura de ebullición del disolvente se incrementa bajo alta presión, por lo que la extracción se puede llevar a cabo a temperaturas más elevadas. Esto se traduce en un aumento de la solubilidad del analito y de la velocidad de transferencia de masa, además de debilitar la unión matriz-soluto debida a las interacciones de *van der Waals*, enlaces de hidrógeno y atracciones dipolo-dipolo. La viscosidad y tensión superficial del disolvente se reducen al incrementar la temperatura, lo que facilita la penetración de éste al interior de la matriz. El efecto de la elevada presión también contribuye a tal resultado, mejorando la extracción del analito que se encuentra retenido en los poros del material de la matriz (Kou, 2003).

Un equipo PSE consta básicamente de un depósito de disolvente, una bomba, una celda de extracción, un horno, un vial colector y un depósito de nitrógeno (Figura 15). La celda de extracción es un tubo de acero inoxidable de paredes gruesas, que resiste las elevadas temperaturas y presiones desarrolladas en el proceso (Figura 16). Estas celdas se llenan y limpian manualmente y de forma sencilla. El equipo PSE utilizado en esta Tesis tiene un carrusel de 6 celdas que permite realizar la extracción simultánea de 6 muestras, lo que es muy adecuado para el análisis de rutina o cuando se tiene que procesar un elevado número de muestras.

La celda se rellena con la muestra mezclada con un material inerte (*Ottawa sand* o similar) para evitar una posible compactación de la muestra que pudiera obturar la salida.

Todo el sistema está automatizado. Una vez que se colocan las celdas llenas de muestra en el carrusel, éstas quedan herméticamente selladas mediante mecanismos mecánicos. El disolvente se inyecta hasta conseguir la presión seleccionada, siendo necesario un lapso de tiempo de precalentamiento, típicamente de unos 5 -10 min, en el que las celdas son calentadas hasta que alcanzan a temperatura seleccionada.

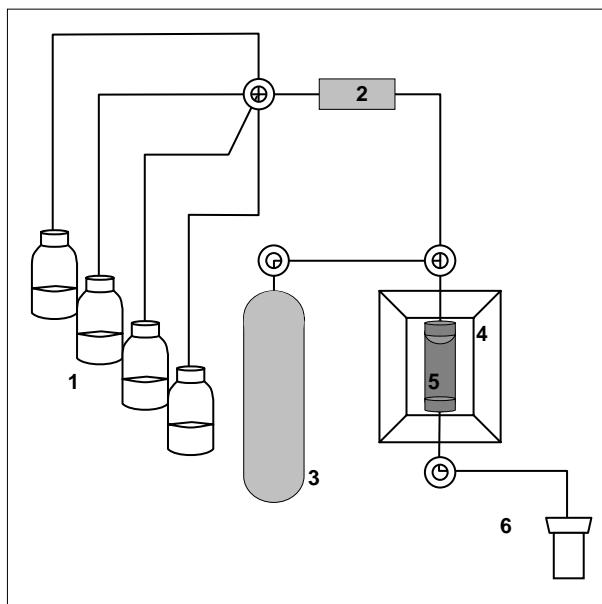


Figura 15. Esquema de un equipo PSE: 1, depósitos de disolvente; 2, bomba; 3, depósito de N₂; 4, horno; 5, celda de extracción; 6, vial colector.

La extracción puede ser: i) estática, en la que se inyecta el disolvente, se mantiene en la celda durante el tiempo programado y después se vacía la celda recogiendo el extracto en un vial mediante una corriente de N₂, repitiendo este proceso cuantas veces se programe o, ii) dinámica, en la que en cada ciclo se añade más disolvente fresco, sin vaciar la celda hasta el final del proceso de extracción. En el trabajo realizado sobre la determinación de grasa en leche en polvo se ha utilizado extracción estática.

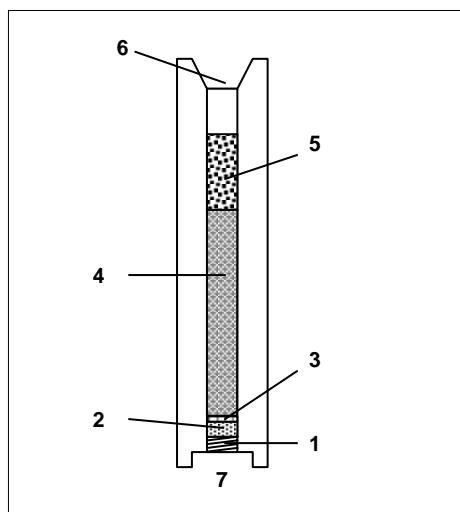


Figura 16. Celda de un equipo PSE preparada para la extracción. 1, rosca; 2, fritado metálico; 3, filtro de papel; 4, muestra mezclada con material inerte; 5, material inerte; 6, boquilla de entrada; 7, boquilla de salida.

3.2. Métodos de análisis: modos de medida y diseño de montajes experimentales

Como ya hemos comentado, un método de análisis comprende una serie de operaciones. Estas operaciones pueden llevarse a cabo manualmente o mediante montajes experimentales (que en lo sucesivo denominaremos sistemas). Estos sistemas reproducen todo lo que realizaría un operador humano, como diluir una muestra, de manera discreta o en modo continuo, tanto fuera de línea (*off-line*) como en línea (*on-line*). El significado de estos conceptos aplicados a un método de análisis no siempre es evidente.

Puesto que la clasificación de los métodos y sistemas sobrepasa el propósito de esta introducción, no profundizaremos más en las diferencias entre ellos a nivel conceptual, aunque se debe tener en cuenta que una cosa es obtener medidas en modo discontinuo o en continuo y otra es realizar una dilución o una extracción fuera de línea o en línea. Con el fin de una mayor claridad, en adelante hablaremos de métodos discontinuos cuando las medidas sean en modo discontinuo, y de métodos continuos cuando las medidas sean en modo continuo. Respecto al proceso de medida debemos tener en cuenta que en esta Tesis

las medidas se han realizado siempre sobre disoluciones o muestras líquidas y que a esta situación nos referiremos en lo sucesivo.

3.2.1. Medidas en modo discontinuo

Como se ha indicado, si las medidas se realizan en modo *batch*, se obtienen señales puntuales. En el caso de que se emplee la espectrometría FTIR (aunque puede generalizarse al empleo de otras técnicas instrumentales) la medida de una disolución en *batch* debe ser invariable con el tiempo (es decir, mientras se registra el espectro) de tal modo que el resultado final consista en un único espectro que sea promedio de un número determinado de *scans* obtenidos consecutivamente de la misma disolución. El espectro obtenido se utiliza para cuantificar el analito en la muestra mediante la comparación con un calibrado preparado en las mismas condiciones.

Esta estrategia de análisis es la que inicialmente requiere una menor complejidad técnica. En este modo de medida, el tipo de transporte de la muestra hasta la celda de medida es el que permite mejorar la eficiencia analítica o *throughput*. El transporte puede ser manual, mediante dispositivos accionados por un operador humano o mediante equipos robotizados. Estos últimos son los que permiten la automatización de los métodos en *batch* (Fifield, 2000). Las operaciones necesarias para llevar a cabo la medida en uno de estos métodos en *batch* pueden ser tan simples como rellenar manualmente un vial o colocar una gota de muestra en un cristal de ATR, y tan complejas como las que se realizan automáticamente en los autoanalizadores clínicos.

Los métodos con medidas FTIR en *batch* que implican disoluciones suelen utilizar micro-celdas de flujo (Figura 17), de manera que una bomba peristáltica o dispositivo equivalente introduce la muestra en la celda. Si la medida se realiza con el flujo parado (*stopped-flow*) es posible acumular un elevado número de barridos por espectro y, de esa manera, aumentar la relación señal/ruido, mejorando la precisión.



Figura 17. Celda ATR horizontal de flujo de Graseby-Specac. La disolución circula por un espacio mínimo entre el cristal de ZnSe y la placa metálica superior.

Cuando se utiliza el modo de *stopped flow*, el proceso de medida es el mismo que si se realizara el relleno de la celda manualmente, pero de una forma más práctica y eficaz. Básicamente el proceso consiste en introducir disolvente fresco manteniendo el flujo, y tras un tiempo necesario para llenar la celda, se detiene el flujo con el fin de obtener el *background* del disolvente. A continuación se introduce la muestra hasta que ésta desplaza completamente al disolvente de la celda, se detiene el flujo y se mide. Este proceso se puede repetir en un tiempo razonable tantas veces como requiera el análisis. Además, la velocidad de transporte se puede aumentar incrementando el flujo. Esta estrategia de transporte de la muestra hasta el instrumento FTIR permite reducir el consumo de muestra y disolvente, además de minimizar las contaminaciones cruzadas al llevar a cabo la limpieza en línea de la celda y evitar la manipulación por parte del operador de las muestras y disolventes, muchas veces tóxicos. La aspiración a través de la celda favorece un menor consumo y supone un menor efecto memoria. Además, la utilización de micro-celdas supone un menor volumen de muestra y disolvente consumido y de residuos generados durante el análisis.

Métodos con medidas en modo discontinuo son los que se han utilizado en los trabajos de determinación de grasa en leches en polvo, en el de ATR con celda de diamante y en el de determinación de tensioactivos en detergentes por ATR-multiconmutación en *stopped-flow*.

3.2.2. Medidas en continuo

En los métodos que utilizan medidas en modo continuo, la concentración del analito se mide sin interrumpir un flujo de líquido (o gas). Existen muchos tipos de métodos continuos de análisis; los dos más importantes son los FIA, *flow injection analysis*, y SIA, *sequential injection analysis*. Las diferencias entre ambos son diversas y no profundizaremos más en éstas, puesto que en esta Tesis se han utilizado métodos FIA o variantes más o menos cercanas a la idea del FIA.

Según la definición de Růžička y Hansen (Růžička, 1981) un método FIA está basado en la inyección de una muestra líquida en una corriente de flujo no segmentado de un líquido adecuado. La muestra inyectada forma una zona, que es transportada hacia un detector que registra continuamente la absorbancia, potencial de electrodo, o cualquier otro parámetro físico, mientras se modifica continuamente como resultado del paso del material de la muestra a través de la celda de flujo. La técnica se basa en una combinación de inyección de muestra, dispersión controlada y cronometraje. En una revisión más moderna, Fang define el FIA como una técnica no cromatográfica de análisis cuantitativo en flujo, llevada a cabo mediante la manipulación reproducible de las zonas de muestra y reactivos en una corriente de flujo bajo condiciones de no equilibrio termodinámico (Fang, 1993). Esta definición referida al equilibrio nos lleva a tratar, de manera más general, los métodos de análisis en flujo (FA). Este tipo, que engloba todos los métodos continuos, implica el uso de un portador o *carrier* que lleva la muestra hasta el detector (Figura 18).

A las ventajas de los métodos de *stopped-flow* frente a los métodos en *batch* manuales cabe añadir para los de análisis en flujo una mayor versatilidad, tiempos de transporte reducidos y un consumo minimizado de muestra y reactivos.

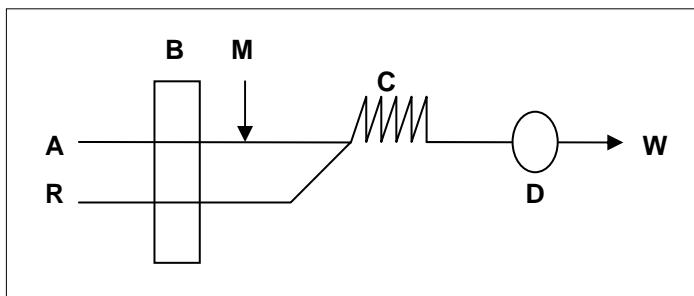


Figura 18. Esquema del montaje FA más simple. B: Bomba peristáltica; A: disolvente portador o *carrier*; R: reactivo (puede no ser necesario); M: inyector de la muestra; C: *coil* de reacción o mezcla; D: detector; W: desechos.

3.2.3. Multiconmutación

Como ya hemos mencionado en la sección anterior, un sistema de análisis en flujo configurado con una válvula -entendiendo configuración como la disposición física de los elementos del montaje experimental- tiene dos estados posibles en los que el flujo se conduce por un camino u otro (comutación) dependiendo del proceso que requiera en cada momento el método de análisis (inserción de muestra o patrón, mezcla con reactivos, etc...). En la Figura 19 se describe de manera simple un sistema de este tipo.

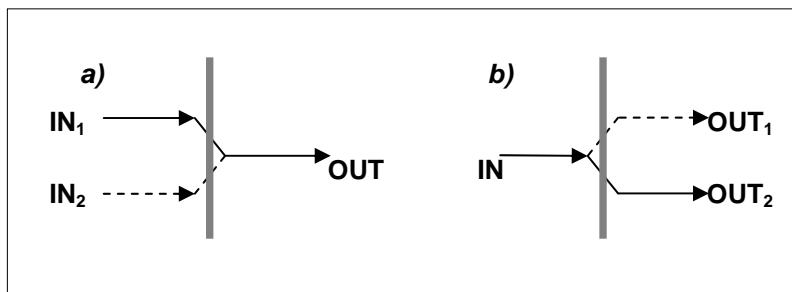


Figura 19. Representación de las configuraciones posibles para sistemas con una única válvula (comutación): a) sistema con dos entradas alternativas (IN_1 , IN_2) y una salida (OUT); b) sistema con una entrada (IN) y dos salidas alternativas (OUT_1 , OUT_2). Las entradas o salidas pueden ser individuales pero no simultáneas.

En el caso de los sistemas de análisis en flujo convencionales el cambio de estado es puntual, esto es, cada válvula es accionada una sola vez en cada etapa del proceso analítico. Esta característica limita las posibilidades operativas de estos sistemas, porque no se puede

reconfigurar el sistema sin modificarlo físicamente, o lo que es lo mismo, hay que quitar o añadir elementos o cambiar la conectividad entre ellos. Sin embargo, el uso de válvulas controladas electrónicamente mediante un *software* específico, con tiempos de respuesta muy pequeños (ms) y con gran precisión, permite la reconfiguración del sistema en tiempo real.

Si cada válvula origina dos estados diferentes, n válvulas dan lugar a 2^n estados, propiedad del sistema que se denomina *multiconmutación* (Rocha, 2002). Ésta ha sido definida como una red analítica que implica la actuación sobre la muestra de n dispositivos activos (o n operaciones con un único dispositivo), originando 2^n estados. La multiconmutación es una propiedad inherente a los sistemas de análisis en flujo que presentan muchos estados. La aplicación del concepto de multiconmutación a los métodos de análisis se ha desarrollado principalmente en Brasil, de la mano de los profesores F. P. B. Rocha y B. F. Reis de la Universidad de São Paulo (Rocha, 2002).

La diferencia entre un sistema de análisis en flujo y uno con multiconmutación es muchas veces muy sutil, y no se refiere tanto a la utilización de varias válvulas como a la capacidad del sistema para realizar gran cantidad de procesos propios de los métodos analíticos -como puedan ser: diluciones, adiciones de patrón o reactivos- sin necesidad de desmontar el sistema para reconfigurarlo de nuevo manualmente. Por esta razón, un sistema que disponga de muchas válvulas puede que no implique multiconmutación mientras que otro con una única válvula sí puede hacerlo, cuando ésta se utilice para realizar varias operaciones diferentes.

Consideremos a modo de ejemplo el sistema descrito en la Figura 19. Existen dos estados posibles: un estado en el que la entrada de flujo se produce por la vía IN₁ y un estado en el que la entrada de flujo se produce por la vía IN₂. En un sistema de análisis en flujo convencional, la activación de la válvula mantiene uno de los estados (p. ej, la entrada IN₁ abierta) durante un tiempo dilatado; en cambio en un sistema con multiconmutación se puede cambiar de estado rápidamente: podemos activar la válvula durante dos segundos,

desactivarla durante medio segundo, repetir el proceso cuantas veces sea necesario y cambiar los tiempos de activación de la válvula sin tocar el sistema.

De esta manera, una muestra puede ser sometida a diversas operaciones, como puedan ser el mezclado con un reactivo o un estándar o una dilución con disolvente, siendo la válvula solenoide de tres vías (Figura 20) el dispositivo fundamental más utilizado con este fin, aunque también se puede disponer de otros elementos válidos como son las microbombas y válvulas de otros tipos.

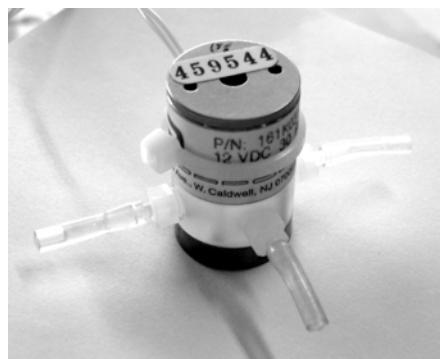


Figura 20. Válvula solenoide de 3 vías.

En la válvula de tres vías, que es la que se ha utilizado en esta Tesis, el flujo es conducido por una salida u otra dependiendo de si existe o no paso de corriente eléctrica a través de un solenoide (Figura 21). Éste actúa atrayendo un pistón que cierra una de las salidas mientras abre la otra. Cuando hay paso de corriente se dice que la válvula se encuentra *energizada*, y si no lo hay se dice que está *desenergizada*.

La válvula solenoide se controla desde un PC mediante el *software* adecuado, habitualmente programado en lenguaje Basic. El PC se conecta a una placa electrónica que contiene los elementos necesarios para convertir la intensidad y voltaje de la corriente en los adecuados para que se activen las válvulas solenoides conectadas a la misma al recibir la señal eléctrica procedente del PC (Figura 22). La conexión entre el PC y la placa se realiza a través de un puerto, p. ej. el de la impresora. A la válvula *desenergizada* le corresponde el

valor de **bit 0**, y a la válvula *energizada*, el valor de **bit 1**. En el Apéndice I se trata con mayor profundidad el *software* utilizado en los trabajos de multiconmutación desarrollados en esta Tesis.

Como se ha mencionado anteriormente, las válvulas solenoides de tres vías tienen tiempos de respuesta de ms, lo que permite la modificación del estado del sistema en tiempo real. En cuanto a la precisión en su funcionamiento, se pueden programar tiempos de inserción tan pequeños como 0.1 s sin encontrar problemas de repetibilidad, tiempos que suponen, considerando la posibilidad de utilizar caudales muy bajos, volúmenes de inserción del orden de μL .

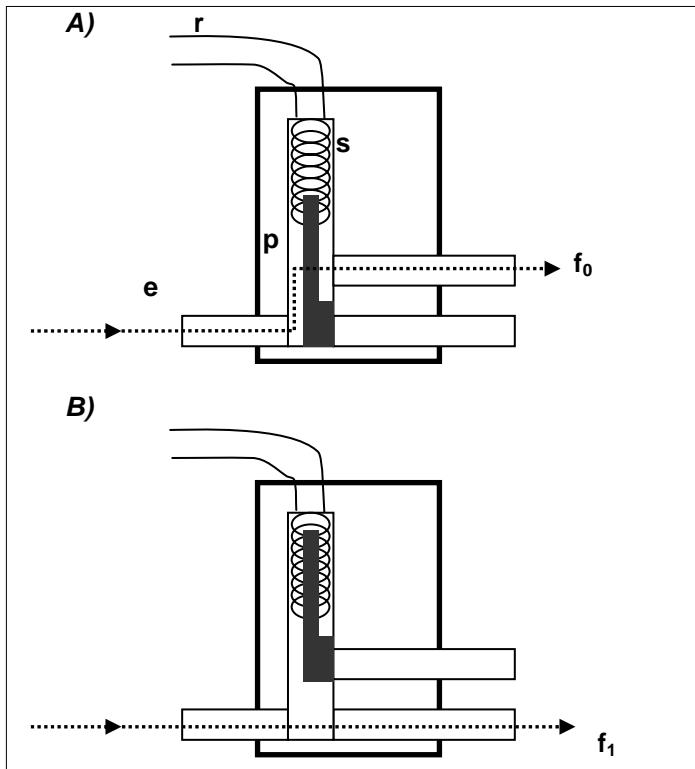


Figura 21. Esquema del funcionamiento de la válvula solenoide de 3 vías configurada como una entrada fija y dos posibles salidas. A) Válvula *desenergizada* o de **bit 0**, donde **r** es la entrada de corriente; **s** el solenoide; **p** el pistón de cierre; **e** la entrada del flujo; **f₀** la salida para **bit 0**. B) Válvula *energizada* o de **bit 1**, siendo **f₁** la salida del flujo en este estado.

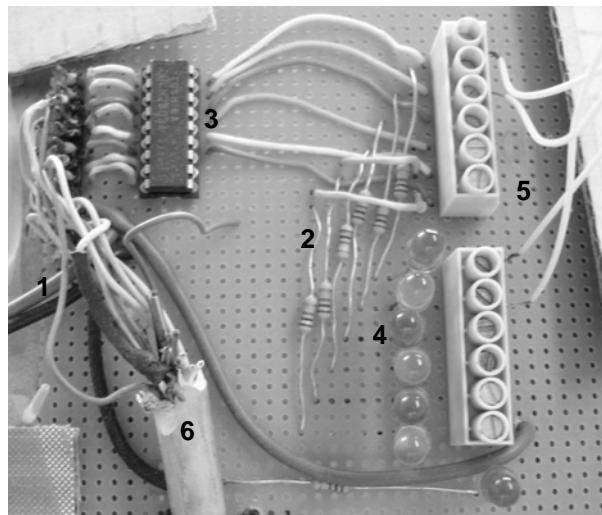


Figura 22. Placa de un sistema de multiconmutación que permite controlar hasta seis válvulas solenoideas. 1: entrada de corriente de 12 V proveniente de la fuente de alimentación; 2: resistencias; 3: chip; 4: leds indicadores; 5: conexión de las válvulas (dos en este caso); 6: cable conectado al puerto de impresora.

A continuación veremos el fundamento de las operaciones que permiten llevar a cabo los sistemas con multiconmutación. En la Figura 23 se describe el esquema de un sistema que permite la dilución en línea de la muestra con una única válvula solenoide. Si activamos la válvula (**bit 1**) durante un tiempo determinado (t_m), la muestra es insertada en el sistema y su volumen será proporcional a éste. Como en el estado en el que la válvula se encuentra *desenergizada* (**bit 0**) es el portador el que circula por el sistema, el volumen de muestra será insertado entre dos volúmenes de portador. Estos pequeños volúmenes se denominan *slugs*. Si se repite el proceso de inserción de *slugs* de muestra entre *slugs* de portador, se consigue la mezcla de la muestra con éste. La causa de la mezcla es la dispersión axial. Ésta se produce a lo largo de todo el sistema y su efecto es garantizado por el *coil* de longitud adecuada para conseguir una mezcla completa. El resultado de este proceso en tandem es la dilución de la muestra con el *carrier*. Sin embargo, la concentración de la muestra será variable a lo largo del sistema en un tiempo determinado, lo que se refleja en el registro de la señal frente al tiempo.

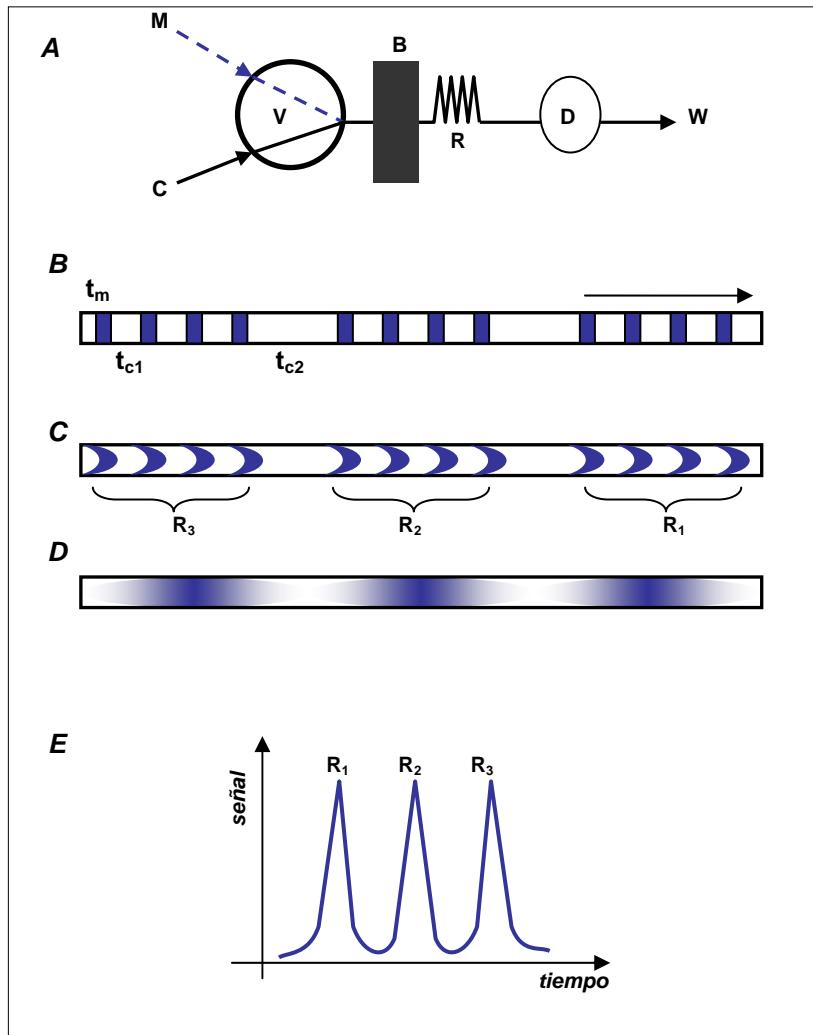


Figura 23. Dilución en línea mediante un sistema con multicommutación. A) Montaje: M, muestra; C, carrier; V, válvula solenoide de tres vías; B, bomba peristáltica; R, coil; D, detector; W, desechos. B) Esquema de los tiempos de inserción de muestra t_m (azul) y carrier t_{c1} ; t_{c2} se refiere al tiempo de carrier entre cada una de las tres réplicas, consistiendo cada réplica en un número igual de *slugs* con idénticos tiempos de inserción. La flecha indica la dirección del flujo. C) Perfil de *slugs* correspondiente a las tres réplicas. D) Representación de la distribución de la muestra cuando la mezcla es completa para cada réplica. E) Registro de la señal frente al tiempo correspondiente a las tres réplicas.

El mezclado será más eficaz cuanto mayor sea el número de *slugs* (**n**) y cuanto más pequeños sean éstos, puesto que existen **2n-1** superficies de contacto entre los *slugs* que facilitarán la mezcla. La ventaja respecto a otros sistemas de flujo sin multicommutación

reside en que el mezclado se inicia desde el primer paso, sin que afecte a la eficiencia del análisis (Rocha, 2002). Esta estrategia de dilución en línea se ha utilizado en los tres trabajos de multiconmutación incluidos en la presente Tesis. Con este principio de mezcla en tandem se puede plantear un calibrado externo o una adición estándar en línea utilizando dos válvulas de tres vías, con una única disolución *stock* de patrón, muestra original y *carrier*. Las ventajas en cuanto al ahorro de tiempo, manipulaciones y contaminación, además de la sensible mejora de la repetibilidad y reproducibilidad son evidentes.

3.3. Acoplamiento con las técnicas vibracionales

Como ya hemos visto anteriormente, las técnicas vibracionales de FT-MIR y FT-NIR presentan algunos problemas a la hora de la obtención de las medidas, en función de las características físicas de la muestra utilizada y la forma de transportar ésta al espectrómetro de FT. Veremos a continuación cuáles son estos problemas y cómo pueden solucionarse.

En el caso más simple de medidas por Transmision, que es el de los trabajos de esta Tesis que han empleado medidas en *stopped-flow*, los inconvenientes se refieren a:

- i) la integridad del camino óptico, es decir, que la celda se llene y no haya burbujas cuando se realice la medida en flujo parado y,
- ii) las distorsiones del espectro causadas por las diferencias en el índice de refracción de las disoluciones que atraviesan la celda.

Ambos problemas se solucionan apropiadamente teniendo la precaución de llenar la celda desde la parte inferior y seleccionando el material de las ventanas de la celda y el *carrier*.

En el caso de las medidas por Transmisión en la región del NIR, además de los problemas citados arriba hay que tener especial cuidado con los cambios de temperatura. Las bandas de absorción pueden aumentar o disminuir de intensidad de manera

considerable en función de la temperatura (Kemeny, 1992). Los equipos FT-NIR suelen incluir un portamuestras termostatizado con objeto de evitar las variaciones de temperatura entre muestras y patrones cuando se realizan las medidas. Si el sistema es de flujo y se realizan medidas en continuo, es recomendable termostatizar todo el sistema o, en su defecto, asegurarse de que no se producen cambios de temperatura a lo largo de éste.

Respecto de los métodos con medidas en continuo por Transmisión, si bien el acoplamiento con la espectrometría FTIR no resulta excesivamente complejo, no está exento de limitaciones que exigen tomar una serie de precauciones. Primero, por la baja sensibilidad de la técnica en sí misma. Cada punto del registro de la señal frente al tiempo debe ser obtenido como promedio de varios *scans*. Una mayor resolución temporal implica un menor número de *scans* acumulados, con lo que la relación señal/ruido empeora. En segundo lugar, por el efecto negativo que produce cualquier burbuja que atraviese la microcelda de flujo. Estos problemas se minimizan escogiendo bandas de absorción del analito que sean muy intensas y corregidas con una línea base adecuada, y utilizando caudales que no produzcan sobrepresiones en el sistema. En la práctica, es difícil aplicar ambas soluciones satisfactoriamente. Es en este aspecto en el que debe incidir el diseño y puesta a punto de los métodos de análisis en flujo como los que han sido desarrollados en esta Tesis.

Por otra parte, las medidas por ATR en modo discontinuo sufren de los mismos problemas de sensibilidad que las medidas por Transmisión. Además, en este caso hay que utilizar disolventes que no sean muy volátiles o controlar su evaporación para que no varíe la concentración de analito en la superficie del cristal mientras se están realizando las medidas. Este problema se solventa con el uso de celdas ATR de flujo y con la medida en modo *stopped-flow* o, en el caso de los accesorios ATR de diamante, mediante anillos metálicos que mantienen la integridad de la gota de líquido analizado gracias a la tensión superficial de éste. También hay que controlar los cambios de temperatura por la variación de intensidad de las bandas de absorción.

Respecto a los dispositivos utilizados para conseguir el flujo de líquido, ya sea en métodos de *stopped-flow* como en los de FIA y multiconmutación, en la presente Tesis se han

utilizado bombas peristálticas como la que puede verse en la Figura 24. Proporcionan caudales aproximadamente constantes en un amplio intervalo de valores, típicamente de 0.1 a 10 mL min⁻¹. Se pueden utilizar para impulsar el líquido o para succionarlo, siendo preferida la segunda modalidad pues reduce la presencia de burbujas en el sistema y requiere un menor volumen de disolución en el caso de realizar las medidas en modo *stopped-flow*. La bomba actúa mediante la presión que ejercen unos cilindros rotatorios sobre un tubo elástico; este movimiento “peristáltico” produce la aspiración o impulsión del líquido a través del tubo. Con disoluciones acuosas pueden utilizarse tubos de PVC. Si el portador es un disolvente orgánico como el cloroformo, hay que tener la precaución de utilizar tubos especiales (Viton), pues los tubos de PVC son atacados por el disolvente.



Figura 24. Bomba peristáltica Minipuls 2 de Gilson.

El acoplamiento de las técnicas FT-MIR y FT-NIR con sistemas en flujo permite la realización de adiciones estándar y extracciones en línea. Una adición estándar en línea se consigue adicionando pequeños volúmenes de disolución patrón a un flujo de muestra constante. De esta manera se reduce considerablemente el tiempo de análisis. Por otra parte, la extracción en línea se lleva a cabo haciendo circular cíclicamente a través de la muestra un volumen determinado del disolvente adecuado. Si la disolución pasa por la celda de medida, puede seguirse el proceso de extracción registrando la señal correspondiente al analito. Así se evita la manipulación *off-line* de la muestra que suele ser causa de contaminaciones y errores.

Desde el trabajo pionero de Curran y Collier en el que se utilizaba un espectrómetro dispersivo acoplado a un sistema FIA para la determinación de fenil isocianato a 2270 cm⁻¹ utilizando CCl₄ como *carrier* (Curran, 1985), el empleo del análisis en flujo y la espectrometría IR como técnica de detección ha ido en aumento. En el mismo año en que apareció el trabajo mencionado, Morgan *et al* publicaron un artículo sobre la determinación del octil sulfocianato utilizando una mezcla de etanol y agua como portador (Morgan, 1985).

El primer trabajo en el que se recurrió a un equipo FTIR acoplado a un sistema FIA se centraba en el estudio cualitativo de la descomposición del óxido de alildiidopropilamina en un capilar, con la peculiaridad de que el portador era un fluido supercrítico (Olesik, 1986). Un par de años después, Miller *et al* determinaron succinilcolina en disoluciones acuosas de productos farmacéuticos (Miller, 1988). El trabajo de Guzmán *et al* sobre mezclas sintéticas de etanol, acetona y tetrahidrofurano, en el que se introducía la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) como estrategia de calibración, abrió nuevas posibilidades al acoplamiento FIA-FTIR aplicado al análisis multicomponente (Guzmán, 1991).

El primer trabajo conocido en el que se aplicó el FIA-FTIR al análisis de muestras reales proponía la determinación de o-xileno en xilol utilizando hexano como *carrier* (de la Guardia, 1992). Este mismo grupo de investigación de la Universidad de Valencia continuó ampliando con éxito las aplicaciones de la técnica FIA-FTIR para la determinación de diversos analitos en matrices muy variadas –dedicación que se mantiene a día de hoy-, como disolventes (Garrigues, 1992), gasolina (de la Guardia, 1993; Gallignani, 1993; Gallignani, 1994a; Gallignani, 1994b), especialidades farmacéuticas (Garrigues, 1993a; Garrigues, 1993b; Bouhsain, 1996), bebidas alcohólicas (Gallignani, 1994c; Gallignani, 1994d) y refrescos (Daughbouche, 1997; Bouhsain, 1999).

Por otra parte, desde mediados de los años 90 un grupo de investigación perteneciente a la Universidad de Viena ha promovido el desarrollo de nuevas aplicaciones y variantes del FIA-FTIR, principalmente orientado hacia problemas de carácter bioquímico,

como la determinación enzimática de sacarosa (Lendl, 1995), el uso de un láser de cascada como fuente de radiación en el MIR (Lendl, 2000), la cuantificación de iones metálicos en muestras acuosas (Pérez-Ponce, 2000), el uso de sensores en flujo (Lendl, 1999), aplicaciones clínicas (Rosemberg, 1994; Lendl, 1998; Krieg, 1996), medida de actividades enzimáticas (Lendl, 1998; Krieg, 1996; Vonach, 1998; Schindler, 1999; Schindler, 1997; Schindler, 1998; Schindler, 1998b), determinación de azúcares (Schindler, 1998; Schindler, 1998b; Le Thannh, 2000; Ayora-Cañada, 2000; Schindler, 1998c; Lendl, 1997; Kellner, 1997; Schindler, 1998d) y el acoplamiento HPLC-FTIR (Vonach, 1998b; Vonach, 1997), entre otros.

Un ejemplo ilustrativo de las posibilidades que plantea el acoplamiento del análisis en flujo con la espectrometría FTIR como técnica de detección es el trabajo de Vonach *et al* sobre la determinación directa de fosfato en bebidas. Dos alícuotas de la muestra se mezclan con dos tampones de pH diferente y se obtienen los espectros correspondientes. La diferencia de los espectros obtenidos a los dos pH permite la cuantificación del fosfato en la muestra (Vonach, 1997b).

El empleo de fases vapor para su análisis por espectrometría IR ha supuesto también un importante desarrollo del análisis FIA-FTIR. Ejemplos de aplicaciones con generación de fase gas (FIA-VPG-FTIR) son la determinación de etanol en cloroformo comercial (López-Anreus, 1995) y la generación de hidruros (FIA-HG-FTIR) (Gallignani, 2002), que demuestran la gran versatilidad de la espectrometría FTIR.

En los dos últimos años han sido publicados diversos trabajos orientados hacia el acoplamiento FA-FTIR y otras estrategias encaminadas hacia la automatización del análisis por espectrometría FTIR, tanto en fase gas como en fase líquida. En el trabajo de Coelho *et al* (Coelho, 2006), se determina el nitrógeno en formulaciones de proteínas hidrolizadas mediante la técnica VG-FTIR. Otro trabajo interesante es el de Cankur *et al* (Cankur, 2005), en el que los autores desarrollan un nuevo método para la determinación de Pb mediante FIA-HG-FTIR. Gallignani *et al* han logrado la determinación de etanol en bebidas alcohólicas mediante FIA-FTIR. En este caso, el método implica una extracción en línea líquido-líquido con cloroformo, empleando una celda del tipo sandwich con una membrana de PTFE

(Gallignani, 2005). Wei y Yang (Wei, 2005) proponen un método para la detección de compuestos orgánicos volátiles en disolución acuosa que requiere la separación de éstos en una fibra hueca porosa de polipropileno, en contracorriente. En el trabajo de Al-Alawi *et al* se propone un método automatizado para la determinación de ácidos grasos libres y humedad en aceites (Al-Alawi, 2006). Por otra parte, se ha continuado con la línea de investigación de nuestro grupo relativa al desarrollo de métodos de análisis automatizados. Ejemplos de este esfuerzo son los trabajos publicados sobre la determinación de buprofezin en formulaciones de pesticidas (Armenta, 2005a), en el que se utiliza acetonitrilo como disolvente, y sobre la determinación de diuron (Armenta, 2005b), con cloroformo como disolvente.

En el caso del desarrollo de métodos ATR-FTIR, recientemente han sido publicados algunos artículos como el de Lucena *et al* (Lucena, 2006), en el que se propone un método SIA-ATR-FTIR para la monitorización de los niveles de surfactante y grasa en los baños desengrasantes utilizados en la industria metalúrgica.

Así pues, la búsqueda de métodos analíticos basados en la espectrometría FTIR por transmisión y ATR-FTIR, acoplados con sistemas de flujo o en línea que pueden permitir una automatización sencilla, sigue siendo necesaria en el campo del análisis cuantitativo.

4. El papel de la espectrometría vibracional en el control de calidad

El proceso de fabricación de un producto está sujeto a la posibilidad de errores o modificaciones fraudulentas de su composición. Por este motivo, se hace necesario comprobar antes de su comercialización la calidad del producto fabricado. Y es en este punto donde se recurre a métodos de análisis químico que tienen como fin determinar si el producto cumple con las especificaciones técnicas correspondientes.

Las características deseables en un método de análisis cuyo objetivo sea el control de calidad son las siguientes:

1. Sensibilidad y precisión conforme los requisitos del producto.
2. Rapidez.
3. Bajo coste.
4. Fácil automatización.
5. Mínimo consumo de muestra y generación de residuos.

La espectrometría FTIR es una técnica de análisis que presenta ventajas y desventajas respecto de su uso en el control de calidad frente a otras técnicas. Por un lado, es una técnica poco sensible, lo que la convierte en poco adecuada para el análisis de muestras con contenidos de analito a nivel de traza. Sin embargo, no suele ser la situación de los principios activos de gran número de productos. Ejemplos de este hecho son los analitos determinados en los trabajos de esta Tesis: tensioactivos en formulaciones de productos de limpieza, un pesticida en una formulación fitosanitaria, benceno en gasolina, un principio activo en una especialidad farmacéutica, grasa en leche en polvo. Todos estos analitos se encuentran en concentraciones del orden de porcentaje, de manera que la escasa sensibilidad de la técnica vibracional no representa un problema. Incluso esta baja sensibilidad no es un obstáculo insalvable a la hora de determinar analitos como pesticidas en aguas (*methidathion, tricyclazole*), puesto que se puede preconcentrar el analito fácilmente, como hemos demostrado en los trabajos correspondientes.

La precisión de los resultados obtenidos por la espectrometría FTIR puede ser perfectamente aceptable en este campo de aplicación. En cuanto a la rapidez en el análisis, ya se ha comentado que un *scan* puede obtenerse en 1 s, lo que supone aproximadamente 0.5 min para un espectro típico de 8 cm⁻¹ de resolución obtenido acumulando 25 *scans*. Si comparamos estos valores con el tiempo necesario para obtener un cromatograma (del orden de 5-10 min), la etapa de medida resulta muy rápida en un método FTIR. Por otra parte, un equipo FTIR resulta económico puesto que apenas tiene mantenimiento en comparación con un equipo de HPLC.

En cuanto a la automatización, los sistemas de análisis en continuo, especialmente los que explotan la multiconmutación, pueden ser acoplados con la espectrometría FTIR y permiten desarrollar procesos automatizados de manera muy sencilla, aunque esta ventaja no es exclusiva de esta técnica. Estas mismas estrategias de análisis en flujo consiguen reducir el consumo de muestra y reactivos -y consecuentemente, minimizan la generación de residuos- cuando no los eliminan completamente, como son los casos de análisis directo de muestras mediante ATR y NIR (en vial), que presentan la potencialidad de ser técnicas no destructivas.

No obstante, la espectrometría FTIR aplicada al control de calidad tiene una ventaja insoslayable: la naturaleza del fenómeno vibracional de la absorción de la radiación que proporciona una gran cantidad de información sobre las características químicas de la muestra, característica de la que carecen la mayor parte de las técnicas de análisis que pueden aplicarse al control de calidad. Esta ventaja se utiliza en la predicción de propiedades de productos de la industria petroquímica, por ejemplo (Macho, 2002).

5. Análisis medioambientalmente sostenible

La tendencia hacia el desarrollo de procesos y actitudes compatibles con el respeto al medio ambiente en el ámbito de la Química Analítica ha sido constante en los últimos años, dentro del concepto denominado “química verde” o *Green Chemistry*. Con esta denominación se abarca una serie de prácticas a llevar a cabo en los procesos físico-químicos en general, que la EPA resume en 12 principios básicos (EPA, principles):

1. Minimizar residuos.
2. Diseñar compuestos y productos seguros para el medio ambiente.
3. Diseñar síntesis químicas menos peligrosas.
4. Utilizar materias primas renovables.
5. Utilizar catalizadores y no reactivos estequiométricos.
6. Impedir la formación de derivados.
7. Minimizar el gasto de reactivos.
8. Utilizar disolventes inocuos y condiciones de reacción más suaves.
9. Incrementar la eficiencia energética.
10. Diseñar productos y compuestos químicos degradables tras su uso.
11. Análisis en tiempo real para evitar contaminaciones.
12. Minimizar el potencial de provocar accidentes de los procesos químicos.

En este ámbito también se emplea el término “medioambientalmente sostenible” aplicado al análisis químico, en el sentido de que la práctica del proceso químico o físico sea asumible por el entorno sin sufrir perjuicios insalvables. En cualquier caso, ambos términos están estrechamente relacionados, siendo más radical el de *Green Chemistry*. Podemos decir que el método de análisis ideal debería ser limpio, sin producir desechos ni consumir reactivos o disolventes tóxicos o nocivos. En la práctica, resulta muy difícil cumplir siquiera una única recomendación de la EPA. Existen técnicas que permiten el análisis directo o no destructivo, pero que requieren gran energía o producen radiaciones ionizantes mientras que otras utilizan grandes cantidades de disolventes y generan muchos residuos. La

generación de residuos en el análisis químico tiene mayor importancia de lo que pudiera parecer en un principio. Los procesos más específicos, como el análisis químico, producen mayor cantidad de residuos proporcionalmente, que las industrias tradicionalmente consideradas más contaminantes (Tabla 4).

Industria	Residuos (toneladas)	Ratio kg subproductos/kg producto
Petroquímica	10^6 - 10^8	<0.1
Productos químicos	10^4 - 10^6	1-5
Química fina	10^2 - 10^4	5-50
Farmacéutica	10 - 10^3	25-100

Tabla 4. Residuos generados en las actividades de la industria química (Sheldon, 1997).

El principal desafío de la espectrometría FTIR en el campo de la *Green Chemistry* es la reducción o eliminación de los disolventes tradicionalmente empleados en las medidas por Transmision. Éstos son disolventes orgánicos, con frecuencia tóxicos y nocivos para el medio ambiente. Destacan el disulfuro de carbono CS₂, el cloroformo CHCl₃, diclorometano CH₂Cl₂ y el tetracloruro de carbono CCl₄. Los halocarbonados se encuentran entre los compuestos orgánicos que contribuyen a la degradación de la capa de ozono, por lo que el Convenio de Viena para la Protección de la Capa de Ozono y el Protocolo de Montreal los incluyen dentro de las sustancias cuyo consumo tiene que eliminarse o ser reducido hasta niveles mínimos (Protocolo Montreal, 2000).

A la dificultad de encontrar un disolvente adecuado para una sustancia determinada se añade por tanto la necesidad de evitar el uso de sustancias peligrosas para el medio ambiente, incluido el analista. En el caso del CCl₄ y CS₂, su gran toxicidad recomienda su eliminación de los métodos de análisis FTIR. Disolventes menos peligrosos como el CHCl₂ y CHCl₃ deberían ser utilizados en cantidades mínimas. Esto se puede conseguir mediante la aplicación de las estrategias de análisis en continuo ya mencionadas y

el reciclaje de los disolventes. Por otra parte, el uso de las técnicas FTIR que permiten el análisis directo de muestras acuosas por medidas ATR resulta especialmente compatible con la idea de análisis medioambientalmente sostenible.

6. Antecedentes de la Tesis

La espectrometría FTIR ha experimentado un importante desarrollo en los últimos años. En la Figura 25 se puede observar la tendencia entre los años 1992-2005 para el número de artículos publicados sobre esta técnica de análisis. La búsqueda se ha realizado mediante la base de datos ERL WebSpirs 5, introduciendo en cada caso como criterio de búsqueda ((FTIR in AB)) and (PY: ANAB= *año*). Esta búsqueda, aunque no sea completa ni muy precisa, es representativa del volumen total de trabajos que utilizan la espectrometría vibracional por Transformada de Fourier como técnica de análisis cuantitativo. En este sentido, puede ser útil para conocer el estado actual y las perspectivas de desarrollo de estas técnicas durante los próximos años, en el campo del análisis químico.

El número de artículos publicados que aparecen utilizando “FTIR” como criterio de búsqueda pasó de 149 trabajos en el año 1992, a un máximo en el año 1999 (231 trabajos), principalmente debido a la comercialización de nuevos equipos FTIR más económicos. A partir de ese año, la producción parece haber disminuido de manera importante, posiblemente por los problemas intrínsecos de la espectrometría FTIR como técnica de análisis, es decir, las dificultades de encontrar disolventes adecuados y su baja sensibilidad. Es en este punto donde se hace evidente la importancia de los trabajos presentados en la presente Tesis, que tiene entre sus objetivos la ampliación de las aplicaciones de las técnicas vibracionales en el análisis cuantitativo. En este sentido cabe destacar la contribución de nuestro grupo de investigación, que en el periodo (1996-2005) ha publicado más de 51 trabajos en este campo.

En el caso de los métodos FT-NIR, el número de trabajos publicados pasó de 6 en 1997 a 9 en 2005, que hacen un total de 59 trabajos encontrados en este periodo bajo el criterio de búsqueda ((FT-NIR in AB)) and (PY:ANAB= *año*). Sin embargo, el número de trabajos que aparecen bajo el criterio de búsqueda ((NIR in AB)) and (PY:ANAB= *año*) es de 1345, siendo 20 veces mayor que el obtenido con el otro criterio de búsqueda,

probablemente debido a que el uso de equipos de Transformada de Fourier no representa grandes ventajas en la mayoría de aplicaciones en la región del NIR.

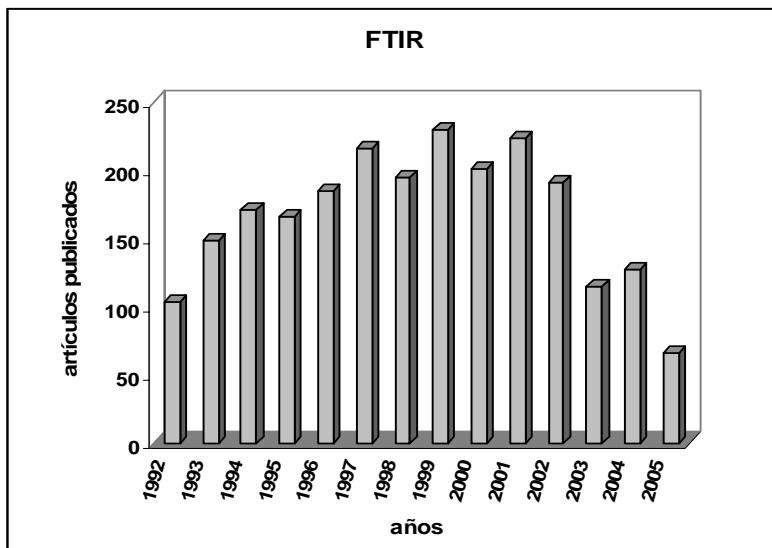


Figura 25. Evolución del número de artículos publicados, según los datos obtenidos de la base de datos WebSpirs, utilizando en el criterio de búsqueda (*Concept*): FTIR.

Finalmente, sólo aparecen 42 trabajos en el periodo 1992-2005 para el criterio de búsqueda ((ATR-FTIR in AB) and (PY:ANAB= año)), frente a un total de 419 trabajos sobre técnicas de ATR en general, que responde a la búsqueda ((ATR in AB) and (PY:ANAB= año)).

Como se deduce de estos datos, existe un vacío importante en cuanto a aplicaciones FT-NIR y ATR-FTIR en el análisis químico. En este contexto se enmarcan los trabajos que forman parte de esta Tesis Doctoral.

Capítulo II

Objetivos

II. Objetivos

La Espectrometría FTIR, tradicionalmente empleada en el análisis cualitativo, se ha convertido en una técnica de enorme utilidad en el análisis cuantitativo debido al empleo de celdas de líquidos, al acoplamiento de análisis en flujo y el empleo de mezclas de disolventes -lo cual ha ampliado el número de especies solubles-, la determinación simultánea de varios componentes y la generación de fases vapor. A este desarrollo ha contribuido en buena medida nuestro grupo de investigación dentro del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València.

El desarrollo de métodos de análisis "limpios" o medioambientalmente sostenibles también ha sido una preocupación en este grupo de investigación, con la puesta a punto de metodologías analíticas que reducen el empleo de reactivos o los eliminan completamente.

El presente proyecto de Tesis supone aunar ambas líneas de actuación: mejorando y ampliando las aplicaciones analíticas de la Espectrometría vibracional en el análisis cuantitativo, y contribuyendo a reducir los riesgos y efectos nocivos que ésta genera como consecuencia de su mayor utilización, mediante el desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles. Por otra parte, la necesidad de métodos de análisis rápidos y de bajo coste aplicables al control de calidad de productos industriales sugiere la puesta a punto o adaptación de los métodos FTIR ya existentes con la finalidad de su utilización en el análisis de rutina.

El objetivo principal del proyecto de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de métodos de análisis por espectrometría vibracional (FT-MIR y FT-NIR) orientados hacia el control de calidad, esencialmente de un único analito para cada tipo de producto, que impliquen un consumo mínimo de disolventes nocivos, que resulten rápidos y que puedan automatizarse fácilmente. Este objetivo se pretende lograr a través de:

i) La reducción de disolvente consumido, mediante:

- a) Análisis directos por técnicas de reflectancia (ATR) que eviten la manipulación de la muestra.
- b) La utilización de sistemas de extracción/preconcentración en línea.
- c) El uso de estrategias de análisis como el análisis en flujo y la multiconmutación.

ii) El empleo de fases acuosas en sustitución de los disolventes orgánicos tradicionales de tipo clorado y el análisis directo de muestras acuosas por ATR.

iii) La búsqueda de disolventes alternativos.

iv) Desarrollo de estrategias para el tratamiento en línea de las muestras.

Esta Tesis se divide en cuatro partes, de acuerdo con las características de los trabajos realizados y que se han incluido en esta memoria:

1. Análisis directo por ATR-FT-MIR con celda de diamante: determinación de nitriloacetato sódico en detergentes líquidos de pH elevado.

2. Métodos de análisis por espectrometría vibracional empleando multiconmutación:

- 2.1. Determinación de α -olefinsulfonato sódico en detergentes líquidos por ATR-FT-MIR.
- 2.2. Determinación FT-MIR de benceno en gasolina.
- 2.3. Determinación FT-NIR de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias.

3. Métodos FT-MIR con extracción previa del analito:

- 3.1. Determinación de methidathion y tricyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y posterior elución en línea.
- 3.2. Determinación de grasa en leche en polvo, empleando la extracción PSE.

4. Método de análisis FT-MIR con extracción en línea: determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas con extracción en línea.

Capítulo III

Resumen

III. Resumen de los trabajos y discusión de resultados

En esta sección trataremos cada uno de los cinco artículos ya publicados y los dos artículos pendientes de publicación que forman la parte central de esta Tesis.

1. Análisis directo por ATR-FTIR con celda de diamante: determinación de NTA en detergentes

INTRODUCCIÓN

La comercialización de accesorios ATR de diamante ha supuesto un paso importante en el análisis directo de muestras por espectrometría FTIR (Coates, 2000). Esta técnica FTIR-ATR con celda de diamante se ha aplicado con éxito a diversos tipos de analitos en matrices varias, como puedan ser la determinación de glucosa y ácido poli beta-hidroxibutírico en *Escherichia coli* (Jarute, 2004), pesticidas en aguas (Columé, 2004), discriminación espectroscópica de bacterias (Winder, 2004), determinación de alcaloides en productos vegetales (Schulz, 2004), glucosa en micromuestras evaporadas (Diessel, 2004), estudio de intermedios metabólicos (Nakanishi, 2003), y la determinación de carbohidratos, alcoholes y ácidos carboxílicos en vino, tras su separación mediante HPLC (Edelmann, 2003). Sin embargo, todos estos tipos de muestras, aun siendo muy diversos, no representan medios agresivos para las celdas ATR clásicas.

La idea germen de nuestro trabajo era conseguir la determinación de un principio activo en formulaciones de detergentes industriales con pH elevados (~11) cuya medida fuese incompatible con las celdas ATR de ZnSe, de manera que la principal ventaja del ATR de diamante –su extraordinaria resistencia química- fuese plenamente explotada. El analito es el nitrilotriacetato sódico (NTA), una sustancia empleada como agente quelante en

productos de limpieza industrial (Knepper, 2003). Esta sal está considerada como potencialmente cancerígena y es altamente nociva para los organismos acuáticos. El principal interés en el control de esta sustancia en las formulaciones analizadas se debe tanto a su papel activo en la limpieza como a su toxicidad.

Los métodos para la determinación del NTA encontrados en las bases de datos incluyen la polarografía (Esser, 2000) y la electroforesis capilar (Owens, 2000), pero en estos trabajos sólo se determina en forma de quelantes totales. Para la determinación directa se han propuesto métodos como la voltametría de redisolución anódica (Voulgaropoulos, 1992; Schoen, 1997) y la cromatografía líquida HPLC (Geshke, 1997). No obstante, estos métodos resultan poco prácticos para el análisis aplicado al control de calidad, por su bajo rendimiento analítico (frecuencia de análisis) y la complejidad de las técnicas y procedimientos experimentales. Por tanto, se consideró el desarrollo de un método ATR con celda de diamante-FTIR para el análisis directo de las formulaciones de limpieza industrial, lo más simple y práctico que fuese posible.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

Explicaremos en primer lugar cómo se pone a punto un método de análisis por espectrometría vibracional o la estrategia general de trabajo y después pasaremos a comentar los resultados de este artículo en concreto.

El primer paso en el desarrollo del método consiste en la obtención de los espectros FTIR de las muestras disponibles y de un patrón del analito que se quiere determinar. Por comparación entre el espectro correspondiente al patrón y los espectros de las muestras se puede inferir qué bandas son susceptibles de ser utilizadas para la determinación cuantitativa. La absorbancia de la banda en cuestión ha de ser proporcional a la concentración del analito en la muestra.

En el caso de la espectrometría FTIR, la elección del disolvente y del material de la celda o cristal ATR es un paso previo al estudio de las condiciones experimentales. Por un

lado, la absorción debida al disolvente da como resultado un *background* con mucho ruido en las regiones en las que aquél es menos transparente a la radiación. De esta manera, las regiones con un *background* muy elevado no pueden utilizarse para la cuantificación del analito. Por otra parte, el disolvente deberá ser compatible con el material de la celda o del cristal ATR. Si la determinación del analito se hace directamente sobre la muestra sin pretratamiento ni extracción de ningún tipo, entonces el disolvente deberá ser el mismo en la muestra y en los patrones. También es necesario comprobar el pH de todo lo que se va a medir y así verificar su compatibilidad con el material de la celda o del cristal ATR.

Si la determinación del analito no es directa, entonces deben seleccionarse las condiciones que aseguren la extracción cuantitativa del analito o, en su defecto, garanticen la repetibilidad de la extracción parcial para su utilización con fines cuantitativos mediante la corrección correspondiente. Esto se consigue mediante la realización de estudios de extracción con el objetivo de crear un protocolo que permita la determinación cuantitativa del analito en el extracto (tipo de disolvente, volumen o masa de disolvente, tiempo de extracción).

Una vez que todos los estudios preliminares han permitido disponer de muestras (o los extractos equivalentes) y patrones preparados en el disolvente adecuado, se debe deducir qué bandas del espectro de la muestra son debidas al analito, y cuáles entre ellas son las más adecuadas para la cuantificación del mismo. Se estudian, por tanto, los parámetros que definen el criterio de medida que se va a utilizar como variable analítica (área o altura de banda, línea base). Dependiendo de la exactitud y precisión que tenga que cumplir el método y las características espectrales del disolvente utilizado, se selecciona el criterio de medida más adecuado. En general se selecciona un criterio para el que el coeficiente de correlación R^2 sea mayor o igual a 0.999, con el fin de asegurar una buena correlación entre la variable medida (y) y la concentración de analito (x) a través de una ecuación del tipo $y = ax + b$. En el caso de que existan interferencias de alguna clase, debe seleccionarse un criterio de medida que minimice los efectos de éstas en los resultados, cuando no los elimine completamente. En ese caso se pueden utilizar muestras de

concentración conocida con el fin de ajustar el criterio de medida a los resultados más exactos y precisos.

Una vez seleccionado el criterio de medida es necesario escoger los parámetros correspondientes al proceso de adquisición de los espectros FTIR. Los parámetros ópticos (apertura, ganancia) suelen fijarse de antemano en función de las características de la celda de medida que se va a utilizar.

Los parámetros más importantes para cuya selección es necesaria la realización de los estudios correspondientes son: i) el número de *scans* acumulados por espectro y ii) la resolución nominal. Aunque puede aplicarse un diseño experimental multivariante para ello, la práctica habitual consiste en fijar uno de los dos parámetros, es decir, resolución o número de *scans*, y ver cómo varía la precisión y la relación señal/ruido al variar el otro parámetro. Se debe seleccionar un valor del parámetro que dé como resultado una relación señal/ruido y precisión máximas, a la vez que requiera un tiempo de medida que sea lo más pequeño posible. Con frecuencia, la tendencia de la variación no es coincidente para la relación señal/ruido, la precisión y el tiempo de medida y por tanto se debe seleccionar un valor del parámetro que represente un compromiso entre todas las características deseables de la medida (es decir, que sea precisa, sensible y rápida). Habitualmente, un mayor número de *scans* acumulados mejora la precisión y la relación señal/ruido, pero incrementa el tiempo de medida. Por el contrario, una mayor resolución nominal implica un mayor tiempo de medida, mientras que una menor resolución permite obtener un espectro más rápidamente pero se pierde información. En el caso de bandas muy anchas, puede ser útil disminuir la resolución para aumentar la rapidez del análisis. Sin embargo, si las bandas son muy estrechas, serán necesarias resoluciones mayores para resolverlas y por tanto el tiempo de análisis se incrementará. Qué resolución y número de *scans* son los más adecuados se decide en función de las características del método que se pretende desarrollar.

Llegados a este punto, debe realizarse el análisis de las muestras en las condiciones seleccionadas, determinando el analito por interpolación directa en la curva de calibrado obtenida para los patrones, medidos como las muestras. En el caso de que sea necesario realizar una adición estándar, la concentración de analito se obtiene por extrapolación en la

curva correspondiente. Ésta se obtiene midiendo los patrones preparados por adición de cantidades crecientes de analito a diversas alícuotas de la muestra. Si los resultados obtenidos por la modalidad de análisis pertinente (directa o por adición estándar) concuerdan con los obtenidos mediante un método de referencia, o con los valores reales si son muestras de concentración perfectamente conocida, entonces se considera viable la aplicación del método desarrollado. A veces puede ser necesaria la realización de estudios de interferencias en los que se investiga el efecto que tiene la presencia de interferentes en la determinación del analito.

Finalmente, la exactitud del método se comprueba mediante estudios de recuperación, en los que se analizan muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito. Si la cantidad de analito encontrado en cada muestra adicionada es aproximadamente igual al 100 % del analito realmente adicionado, entonces se considera que el método es exacto y se da por válida su aplicación.

En este trabajo se presenta un método para la determinación directa del agente complejante nitrilotriacetato sódico (NTA) en detergentes líquidos alcalinos. Las medidas se llevan a cabo en modo discontinuo en la región del MIR ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$), empleando un accesorio ATR de diamante. En este dispositivo, se coloca una gota de muestra o patrón sobre el cristal de diamante y se registra el espectro correspondiente.

La muestra es acuosa y por tanto los patrones también lo son, realizándose la determinación directa del NTA gracias a que el espectro ATR-FTIR del agua, al contrario que el espectro FTIR obtenido por Transmisión, presenta un *background* adecuado en la zona en que aparece la banda de absorción del grupo carbonilo del NTA (entre 1604.5 y 1546.6 cm^{-1}).

Asimismo, en este trabajo se utiliza un cristal ATR de diamante porque las muestras son muy alcalinas y cualquier otro material disponible (Ge, ZnSe) resultaría atacado con la consecuencia de la destrucción de los elementos ópticos del accesorio ATR.

Como es habitual en el desarrollo de un nuevo método de análisis por espectrometría FTIR, se realizó un estudio preliminar de los espectros correspondientes de una muestra de cada formulación disponible y de un patrón de NTA (Figura 26). Cada formulación presenta una composición diferente, oscilando la concentración de NTA entre el 6.2 y el 9.25 % (m/m). De la formulación F1 se disponía de dos muestras reales procedentes de la fábrica (*batch*), tres de F2, dos de F3, dos de F4 y tres de F5. Además, de cada formulación se preparó una muestra de referencia a escala de laboratorio (por ello denominada muestra de laboratorio).

En la Figura 26 puede observarse la similitud entre los espectros de las diferentes muestras acuosas y el espectro del patrón acuoso de NTA. La banda más evidente del NTA se corresponde con la absorción del grupo carboxilato alrededor de 1600 cm^{-1} . Se encuentra en una región del espectro ATR-FTIR en la que el *background* del agua es pequeño y por tanto se dedujo que podría utilizarse esta banda como punto de partida para el desarrollo del método de análisis.

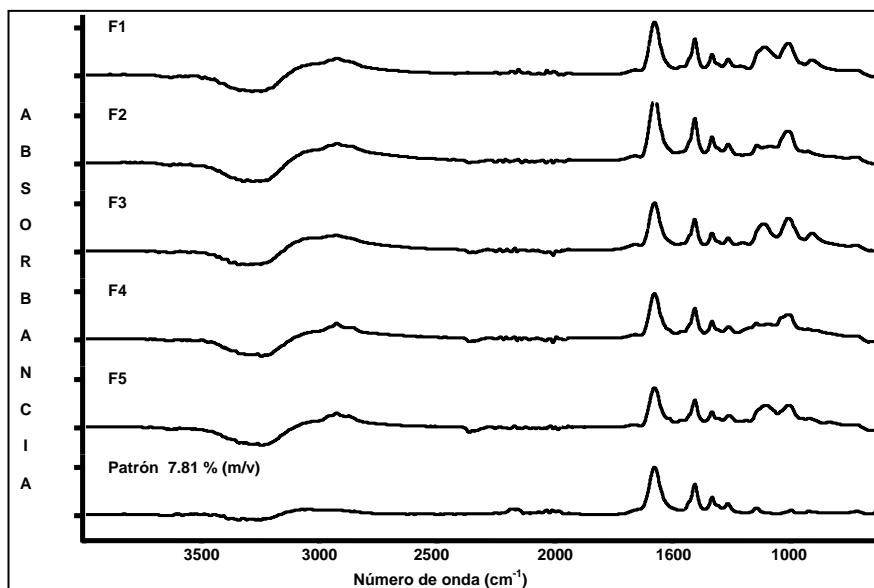


Figura 26. Espectros ATR-FTIR de las diferentes formulaciones (F1, F2, F3, F4, F5) de detergente líquido y de un patrón de NTA al 7.81 % (m/v). Condiciones de medida: 50 scans acumulados, 8 cm^{-1} de resolución nominal.

Las condiciones experimentales de medida que se estudian en este trabajo son: i) el número de *scans* acumulados, ii) la resolución nominal, iii) el tiempo de residencia de la gota sobre el cristal ATR con y sin anillo protector.

Respecto al número de *scans* acumulados, el estudio para muestras y patrones indicó que con 50 *scans* se obtenían resultados que representaban un buen compromiso entre precisión y relación señal/ruido y por tanto fue seleccionado como el más adecuado. La precisión obtenida con 50 *scans* acumulados era menor del 0.4 % y la medida requería 23.5 s de tiempo para una resolución nominal de 8 cm⁻¹.

Por otra parte, el estudio del efecto de la resolución nominal en la sensibilidad y precisión de las medidas nos condujo a la conclusión de que 8 cm⁻¹ era la resolución más adecuada en este caso. Resoluciones mayores alargaban considerablemente el proceso de medida y resoluciones menores provocaban importantes distorsiones en los espectros.

La determinación directa de disoluciones por la técnica ATR de diamante -FTIR requiere depositar una gota de la disolución de la que se pretende obtener el espectro sobre el cristal de diamante. Esta gota está en contacto con el aire y por tanto puede sufrir una evaporación parcial durante el tiempo que se necesita para obtener el espectro. La tasa de evaporación depende fundamentalmente de: i) la volatilidad del disolvente, ii) la superficie de la gota, iii) la temperatura. Si se produce evaporación significativa, entonces la concentración del analito aumenta en la disolución y la absorción debida a éste aumentará de intensidad. Si este proceso afecta en proporción diferente a muestras y patrones y si se ve modificado de manera importante por las condiciones ambientales en el momento de la obtención de los espectros, el efecto producido será una pérdida de exactitud y precisión del método. Así pues, resulta necesario un estudio previo de la variación de la banda correspondiente al analito en función del tiempo de medida, para asegurarse de que durante la obtención del espectro -en el proceso de análisis- no se vayan a producir variaciones significativas de la concentración de analito.

En el caso que aquí nos ocupa, tanto las muestras como los patrones eran acuosos y cabía esperar poca evaporación en las condiciones ambientales en las que se realizaban las medidas. Sin embargo, la naturaleza de las muestras –detergentes líquidos- implicaba la presencia de tensioactivos. Estas sustancias tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial de las disoluciones, por lo que una gota que las contenga tenderá a extenderse sobre el cristal aumentando la superficie y por ende, la evaporación.

Para evitar este problema, el accesorio ATR empleado dispone de un anillo metálico que se coloca sobre la celda y en el que se deposita la gota a medir, de tal modo que ésta no puede extenderse más allá del límite del anillo. Sin embargo, el uso del anillo acarrea un grave inconveniente: se debe limpiar perfectamente antes de ser utilizado para una muestra diferente. Mientras que el cristal se limpia rápidamente con agua desionizada y papel –puesto que el diamante no se raya-, la limpieza del anillo requiere mucho más tiempo, alargando el análisis. Por tanto es preferible no utilizar el anillo mientras sea posible. Para evitar sorpresas y asegurar la robustez de la medida directa sin anillo, se realizó el estudio del efecto del tiempo que está la gota sobre el cristal frente a la señal correspondiente al analito.

Este estudio demostró, tanto para muestras como para patrones, que tiempos de residencia sobre el cristal ATR por debajo de 1 min no suponían variaciones significativas de la señal por evaporación del líquido. Puesto que los 50 *scans* acumulados suponían tan solo 23.5 s de medida, se decidió finalmente realizar las medidas sin ningún accesorio protector (anillo metálico).

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales más adecuadas a través de los estudios ya comentados, se pasó a la selección del criterio de medida. Para ello se evaluaron diferentes criterios de medida para la determinación directa del NTA en las muestras (alturas y áreas de pico corregidas con diferentes líneas base). Aunque tanto la precisión como la correlación obtenidas para cada uno de los criterios evaluados fueron excelentes, fue necesario recurrir al análisis de las muestras de referencia (muestras de laboratorio) para seleccionar el criterio de medida que evitaba el efecto de las interferencias

producidas por los otros componentes de las formulaciones. El criterio de medida seleccionado fue el área de pico entre 1604.5 y 1546.6 cm⁻¹, corregida con una línea base establecida entre 1743.3 y 1365.3 cm⁻¹.

Por otra parte, se descubrió que la protonación del grupo carboxilato afectaba drásticamente a la posición e intensidad de la banda de absorción ATR-FTIR correspondiente. La Figura 27 muestra el efecto de la protonación del carboxilato en el área de pico seleccionada. Sin embargo, todas las muestras analizadas y patrones se encontraban dentro del intervalo de pH entre 11 y 12, zona en la que no se producía ninguna variación en el área de pico seleccionada, lo que permitió la determinación directa del NTA en las muestras sin realizar ajustes de pH.

Llegados a este punto se analizaron todas las muestras disponibles, tanto las de referencia como las muestras *batch* procedentes de la fábrica. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en este análisis directo. Como se puede observar, el error es menor del 1 % para las formulaciones F1, F2 y F4. Para la formulación F3 se obtiene un error algo mayor (1.8 %), pero incluso en el caso de F5, con un error del -3.6 %, es posible la aplicación del método desarrollado, pues el error entra dentro del nivel de exactitud exigible en un control de calidad de este tipo de producto. El CV varía entre el 0.5 y 2 %. La exactitud del método desarrollado se verificó mediante estudios de recuperación, encontrándose valores en torno al 100 % en todos los casos.

Se evaluó el análisis por adición estándar para la formulación F5, que presentaba un blanco de Youden claramente no nulo que sugería la presencia de efecto matriz en esta formulación. Mediante la adición estándar se obtuvo un error del 1.9 % respecto del contenido de la muestra de referencia preparada en el laboratorio. Por tanto, se recomienda finalmente la aplicación del análisis por adición estándar a la formulación F5, mientras que para las otras formulaciones se recomienda el análisis directo.

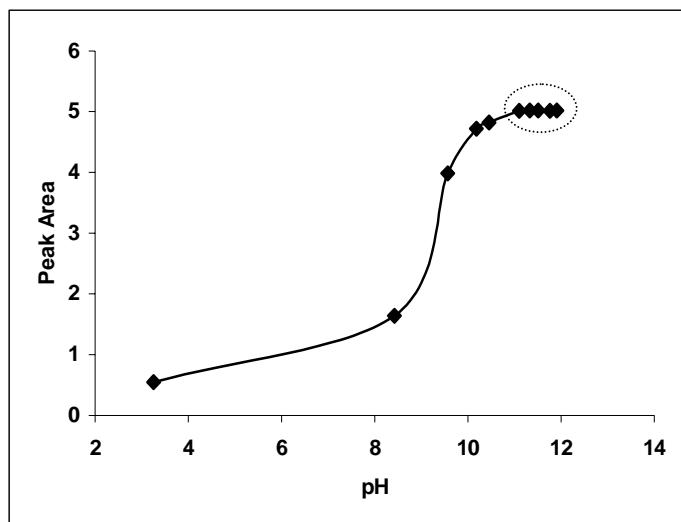


Figura 27. Efecto del pH en los valores de área de pico entre 1604.5 y 1546.6 cm⁻¹ (corregidos con una línea base establecida entre 1743.3 y 1365.4 cm⁻¹) para un patrón al 10% de NTA (m/v). Condiciones de medida: 50 scans acumulados, 8 cm⁻¹ de resolución nominal. Se indica con una elipse el conjunto de los valores correspondientes a las muestras analizadas en este trabajo.

Muestra	% NTA (m/m)		Error %
	Valor de referencia	ATR-FTIR	
F1 batch 1	7.95	7.90 ± 0.03	-0.7
F1 batch 2	7.95	8.124 ± 0.014	2.2
F1 laboratorio	7.95	7.95 ± 0.03	0.0
F2 batch 1	9.25	9.37 ± 0.03	1.3
F2 batch 2	9.25	9.38 ± 0.05	1.4
F2 batch 3	9.25	9.45 ± 0.03	2.1
F2 laboratorio	9.25	9.332 ± 0.013	0.9
F3 batch 1	7.07	7.24 ± 0.03	2.4
F3 batch 2	7.07	7.30 ± 0.02	3.2
F3 laboratorio	7.07	7.20 ± 0.05	1.8
F4 batch1	6.80	6.99 ± 0.08	2.8
F4 batch2	6.80	6.800 ± 0.004	0.0
F4 laboratorio	6.80	6.867 ± 0.015	1.0
F5 batch 1	6.22	6.087 ± 0.017	-2.1
F5 batch 2	6.22	5.990 ± 0.018	-3.7
F5 batch 3	6.22	6.08 ± 0.03	-2.1
F5 laboratorio	6.22	5.994 ± 0.012	-3.6

Tabla 5. Resultados obtenidos mediante el método desarrollado para muestras de detergentes líquidos comerciales (Fn batch) y para las muestras de control preparadas en el laboratorio (Fn laboratorio).

CONCLUSIONES

Este trabajo presenta un nuevo método de análisis directo por ATR-FTIR con celda de diamante de NTA en detergentes líquidos fuertemente alcalinos. El desarrollo del método ha implicado una serie de estudios de los parámetros FTIR y de las características analíticas más importantes. El método desarrollado presenta una excelente frecuencia de análisis de 50 determinaciones independientes por hora y cada medida requiere tan sólo 0.2 mL de muestra o patrón.

2. Desarrollo de métodos de análisis por espectrometría vibracional con multiconmutación

En este área se han realizado tres trabajos. En cada uno de ellos se explota una característica diferente de la multiconmutación acoplada a la espectrometría vibracional por medidas de Transmisión (FT-MIR, FT-NIR) y Reflectancia (ATR-FTIR).

2.1. Determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico: sistemas con multiconmutación y medidas en modo *stopped-flow*

INTRODUCCIÓN

Como hemos comentado en la sección 1.1, las técnicas de ATR permiten la medida directa de muestras acuosas, siempre que sean compatibles con el material de la celda. En este caso, disponíamos de una celda ATR horizontal con un cristal de ZnSe. Por tanto, el pH de las muestras a medir no podía ser muy diferente de 7, debido a que la degradación del cristal se produce a pH más elevados.

Esta técnica había sido aplicada con resultados prometedores al control de calidad de materias primas y productos industriales (Garrigues, 2000b; Mossoba, 2001). Aprovechando que se nos había presentado un problema analítico –determinación en detergentes industriales de pH neutro del surfactante aniónico α -olefinsulfonato sódico- se investigó las posibilidades del empleo del MIR para la cuantificación del principio activo en las muestras acuosas.

Por otro lado, el acoplamiento FTIR- FA estaba proporcionando nuevas perspectivas al análisis FTIR (Cadet, 2000; Garrigues, 2000a), aun implicando el consumo de cantidades relativamente elevadas de muestra y disolventes. La experiencia previa en el desarrollo de sistemas con multiconmutación (Ventura-Gayete, 2004) sugería un

acoplamiento entre ésta y la espectrometría ATR-FTIR, que hasta entonces no tenía ningún antecedente, en vista a realizar el proceso de medida en *stopped-flow* e incrementar así la sensibilidad del método (Araújo, 1995). Así pues, se procedió a desarrollar un método ATR-FTIR con multiconmutación y medidas en *stopped-flow* para la determinación de α -olefinsulfonato sódico en detergentes acuosos.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo sobre la determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico (AOS) en muestras de detergentes líquidos de uso industrial, las medidas se realizan en *stopped-flow* utilizando un sistema con multiconmutación, en vistas a la posible automatización del método. En este caso se aprovecha la estrategia de multiconmutación como vía para evitar la manipulación de la celda ATR para su limpieza y llenado.

De manera previa al diseño del sistema con multiconmutación se estudiaron los parámetros propios de la espectrometría ATR-FTIR. En primer lugar se estudiaron las características de los espectros ATR-FTIR tanto de las muestras como de los patrones acuosos con el objetivo de evaluar la viabilidad del método que se pretendía desarrollar. Las muestras y patrones se introducían por succión en la celda ATR de flujo mediante una bomba peristáltica y los espectros se obtenían en modo *stopped-flow*, es decir, con el flujo detenido. En la Figura 28 se muestran los espectros de una muestra y varios patrones de AOS en la regiónpectral de interés, pues fuera de esta zona no se observaba una correspondencia clara entre las bandas del AOS y las de la muestra. La banda alrededor de 1040 cm^{-1} era la única que permitía la determinación directa del AOS sin que hubiese interferencias importantes.

En consecuencia, se evaluaron de forma exhaustiva diferentes criterios de medida basados en la banda a 1040 cm^{-1} . Finalmente se optó por utilizar el área de pico entre 1049.1 y 1034.6 cm^{-1} corregida con una línea base establecida entre 1020.2 y 995.1 cm^{-1} . Este criterio de medida era el que proporcionaba los resultados más exactos y precisos.

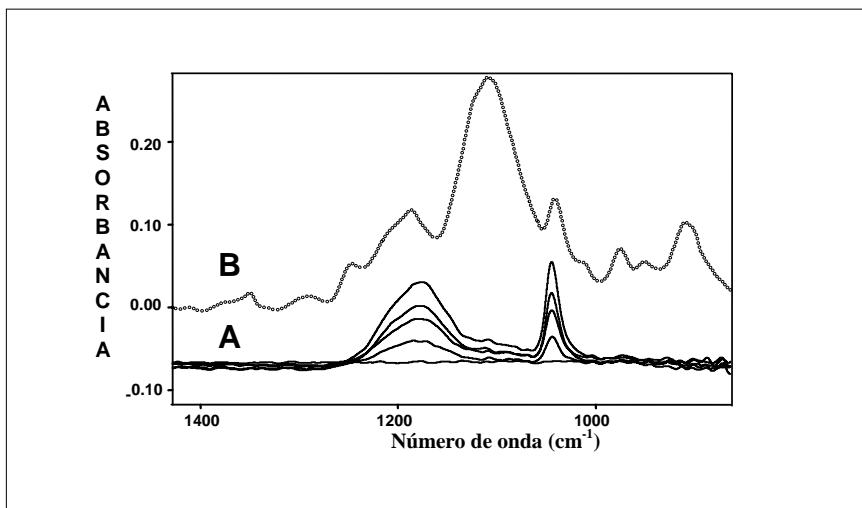


Figura 28. Región del espectro ATR-FTIR en el que aparecen las bandas más significativas del AOS. **A:** espectros de los patrones de AOS en agua; **B:** espectro de una formulación de detergente líquido. Los espectros de los patrones están desplazados sobre el eje y para una mayor claridad. Las condiciones de medida son: 100 scans acumulados, 8 cm^{-1} de resolución nominal.

A continuación se seleccionaron los parámetros i) número de *scans* acumulados por espectro y ii) la resolución nominal, buscando un compromiso entre sensibilidad, precisión y rapidez de las medidas. De esta manera se seleccionaron 100 *scans* acumulados y una resolución nominal de 8 cm^{-1} como parámetros más adecuados para la determinación del AOS en detergentes en modo *stopped-flow*.

Una vez seleccionadas las condiciones de medida más adecuadas, se pasó al diseño de un sistema con multiconmutación que permitiera la obtención de los espectros en modo *stopped-flow* a la vez que se facilitara y acelerara el proceso de limpieza de la celda. Tras diversos ensayos, se construyó un montaje con 4 válvulas solenoides controladas desde un PC mediante un programa en Qbasic creado *ad hoc*. Un esquema de este montaje se puede ver en la Figura 29.

La válvula V₃ tiene como misión insertar burbujas de aire en el sistema que facilitan la limpieza de la celda. A través de la válvula V₂ se puede insertar un patrón o una disolución de limpieza, según el tipo de muestra que se vaya a medir (como veremos más

tarde, el sistema puesto a punto permitía la obtención de los espectros ART-FTIR en modo *stopped-flow* de diferentes tipos de muestras y no sólo de detergentes líquidos). La muestra se introduce en la celda ATR de flujo mediante la válvula V₁. Para realizar las medidas en modo *stopped-flow*, el flujo a través de la celda se detiene accionando la válvula V₄, que desvía el *carrier* hacia un *by-pass*. La bomba está situada al final del sistema precisamente para lograr el *by-pass* del *carrier* y evitar la presencia de burbujas en la celda cuando se miden las muestras o patrones.

Una vez diseñado el sistema, se seleccionaron los parámetros propios de la multiconmutación, que fueron: i) caudal, ii) tiempo de muestreo (*sampling time*) y iii) tiempo de limpieza (*cleaning time*).

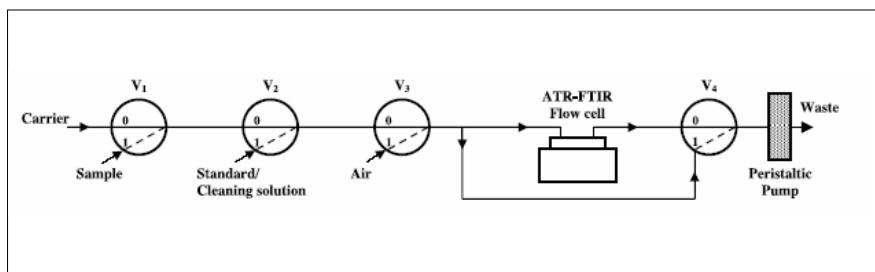


Figura 29. Montaje de multiconmutación empleado en la determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico.

El caudal fue fijado en 1.92 mL min⁻¹ para evitar la formación de espuma y realizar el análisis en el menor tiempo posible. El tiempo de muestreo se refiere al tiempo que se acciona la válvula V₁, durante el que la muestra es transportada hacia la celda de flujo. El que la celda se llene completamente de muestra y ésta desplace al *carrier* preexistente en ésta dependerá del tiempo de muestreo programado. En consecuencia, la señal observada (área de pico entre 1049.1 y 1034.6 cm⁻¹ corregida con una línea base establecida entre 1020.2 y 995.1 cm⁻¹) debe alcanzar un valor constante para un determinado tiempo. Como se observa en la Figura 30, son suficientes 30 s de tiempo de muestreo para conseguir una señal máxima, y por tanto este valor fue seleccionado para el procedimiento experimental recomendado en este nuevo método de análisis.

Por otra parte, el sistema debía funcionar de tal manera que no existiese efecto memoria o contaminaciones entre muestras diferentes analizadas sucesivamente. Para asegurar la limpieza total de la celda se estudió el tiempo que debía estar circulando el *carrier* a través del sistema entre la obtención de los espectros de cada una de las muestras en modo *stopped-flow*. Se observó que 50 s era suficiente para conseguir una limpieza eficiente, así que se seleccionó este valor para el procedimiento experimental recomendado.

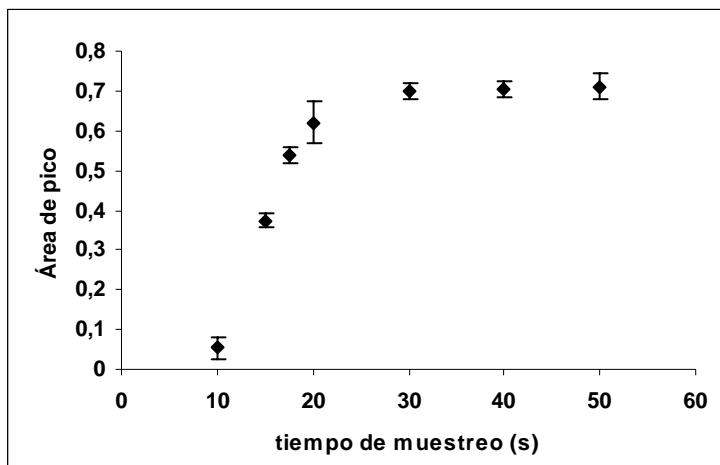


Figura 30. Efecto del tiempo de muestreo en el área de pico entre 1049.1 y 1034.6 cm⁻¹ corregida con una línea base establecida entre 1020.2 y 995.1 cm⁻¹ de una muestra de detergente líquido contenido un 8.52 % (m/m) de AOS. Las condiciones de medida son: 100 scans acumulados, 8 cm⁻¹ de resolución nominal. Los resultados están expresados como la media ± s (desviación estándar) de tres réplicas independientes.

Una vez seleccionadas todas las condiciones experimentales relativas al sistema con multiconmutación diseñado, se pasó a la validación del método propuesto. Se analizaron con este fin muestras de concentración conocida que permitieron verificar la aplicabilidad del método, al encontrarse los errores obtenidos por debajo de un 5 %. Las concentraciones de las muestras analizadas estaban dentro del intervalo 7.5-9.5 % (m/m) de AOS. La exactitud del método se evaluó mediante los correspondientes estudios de recuperación, que dieron como resultado valores próximos al 100 % en todos los casos. Así pues, se dio por válido el método desarrollado. Las características analíticas se resumen en la Tabla 6. En esta tabla se compara el método con multiconmutación desarrollado y el método

equivalente en modo manual (no en *stopped-flow*, puesto que no se utiliza celda de flujo). Como puede verse, la eficiencia aumenta considerablemente para el método con multiconmutación.

Parámetro	Método Multiconmutación	Método Manual
Frecuencia de análisis h ⁻¹	23	15
Volumen muestra mL / 100 determinaciones	96	100
Residuos mL h ⁻¹	115	250
LOD % (m/m)	1.2	-
CV %	1.3	-

Tabla 6. Características analíticas más importantes del método desarrollado para la determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico en detergentes líquidos de uso industrial.

De modo paralelo al desarrollo del método de análisis del AOS en detergentes líquidos se evaluó la aplicabilidad del sistema acoplado multiconmutación- celda ATR de flujo para la obtención de espectros en *stopped-flow* de muestras de composición muy diferente: cerveza, disolución acuosa de leche en polvo, zumo de naranja y aceite de oliva. El sistema de limpieza en línea de la muestra que se puso a punto, basado en la inserción alternativa de burbujas de aire, *carrier* y disolución limpiadora posibilitó en el caso más extremo –muestra más difícil de limpiar- la medida de 12 muestras de aceite de oliva diferentes en una hora generando tan sólo 458 mL de residuos. Por tanto se demostró la utilidad del sistema con multiconmutación orientado hacia la obtención de espectros ATR-FTIR en modo *stopped-flow* de muestras difíciles de limpiar.

CONCLUSIONES

El método desarrollado para la determinación de AOS en detergentes líquidos permite el análisis de 23 muestras en una hora, con una precisión y exactitud adecuadas para el control de calidad de las formulaciones. Por otra parte, el sistema con

multiconmutación se puede aprovechar para la obtención de los espectros de muestras diversas de una manera cómoda y limpia.

2.2. Determinación FTIR de benceno en gasolina: uso de la multiconmutación como estrategia alternativa al FIA

INTRODUCCIÓN

El benceno se encuentra entre los múltiples compuestos que permanecen en los productos intermedios obtenidos durante el proceso de preparación de las gasolinas, de manera que en éstas suele encontrarse en cantidades del orden del porcentaje, si no se evita de algún modo. Es cancerígeno y por tanto la legislación específica establecía unos valores de contenido de benceno en la gasolina menores del 5% (actualmente < 1 % en la UE). Antecedentes del uso de la espectrometría FTIR para la determinación del benceno son los basados en la dilución en línea con hexano (Gallignani, 1993), el uso de derivadas (Gallignani, 1994b) y la generación de fase vapor (López-Anreus, 1996).

La posibilidad de utilizar un sistema con multiconmutación para lograr una mejora de las características analíticas de los métodos de análisis en flujo (Reis, 1999) y el hecho de no existir antecedente alguno de acoplamiento multiconmutación-FTIR, nos condujo hacia la puesta en práctica de un nueva aproximación a este problema analítico, con la realización de las medidas en continuo y aprovechando el potencial que ofrece la multiconmutación para llevar a cabo una dilución de la muestra o una adición estándar en continuo (*on-line*).

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo se diseña y aplica a muestras reales un nuevo método de análisis FTIR con multiconmutación con medidas en continuo para la determinación de benceno en gasolina. Se compara este método con el antecedente FIA más próximo (Gallignani, 1993).

Puesto que el método que se pretendía desarrollar era una adaptación de un método FIA preexistente, no fue necesario seleccionar las condiciones ni el criterio de medida más allá de lo que la propia multiconmutación requería. Como disolvente se utilizó hexano, que es bastante transparente en la regiónpectral de interés ($900\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). El material de las ventanas de la celda de medida debía ser un haluro alcalino (NaCl), que absorbe poco en esa zona. Al ser éste muy higroscópico, se tuvo que habilitar un desecador para guardar la celda cada vez que se terminaba una serie de medidas. A pesar de tomar estas precauciones, se observó un deterioro de las ventanas de NaCl al finalizar la investigación. En la Figura 31 se muestran los espectros de una muestra de gasolina y de un patrón de benceno en hexano. Como puede verse, el benceno tiene una banda bien definida a 675 cm^{-1} que se identifica claramente en la muestra de gasolina. El criterio de medida, extraído del método FIA preexistente, fue el de altura de pico a 675 cm^{-1} corregida con una línea base establecida entre 712 y 650 cm^{-1} .

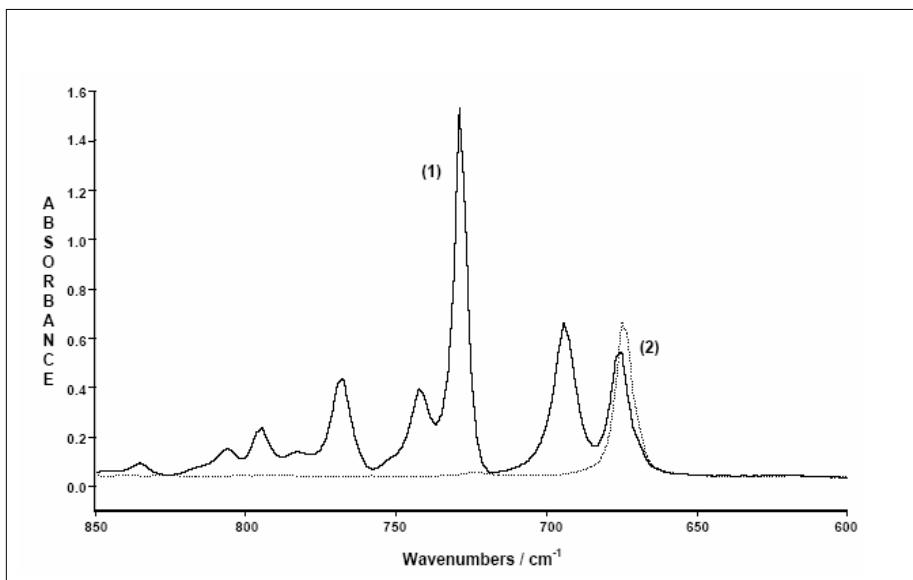


Figura 31. Espectros FTIR correspondientes a (1) una muestra de gasolina conteniendo un 2.74 % (v/v) de benceno y (2) un patrón del 3.75 % (v/v) de benceno en hexano.

Por tanto, se prosiguió con la etapa del diseño y montaje de un sistema con muticonmutación que permitiera la determinación de benceno en gasolina de forma más

eficiente que la conseguida con en el método FIA preexistente utilizado como punto de partida (Gallignani, 1993). Con este fin se dispuso un montaje con 3 válvulas solenoides que permitía tanto la dilución de la muestra como la realización de adiciones estándar en línea. La Figura 32 muestra el esquema del sistema con multiconmutación diseñado.

La muestra se introduce a través de la válvula V_1 , mientras que el benceno es introducido a través de la válvula V_2 . La disposición de las tres válvulas en la forma descrita en la Figura 32 permite la realización de la dilución en línea de la muestra y la adición estándar también en línea, mediante la inserción alternada de *slugs* de muestra y *carrier* y de muestra, *carrier* y patrón, respectivamente. La función del *coil* es garantizar el perfecto mezclado de los *slugs* antes de alcanzar la celda de medida.

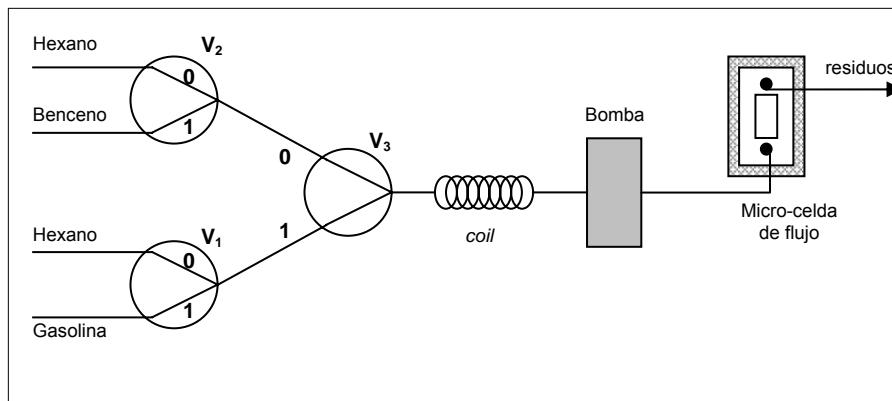


Figura 32. Montaje experimental empleado para la determinación de benceno mediante espectrometría FTIR con multiconmutación. V_1 , V_2 y V_3 son las válvulas solenoides de tres vías. La vía abierta al activar cada válvula está indicada con un 1 (bit 1), y la vía abierta cuando la válvula está desactivada se indica con un 0 (bit 0). El *coil* tiene una longitud de 239 cm, con un diámetro interno de 0.5 mm.

Los parámetros propios de la multiconmutación estudiados en este trabajo fueron: i) el diámetro interno de los tubos del montaje, ii) la longitud del *coil*, iii) el caudal, iv) el tiempo de inserción de muestra, de benceno y de *carrier* (para realizar el calibrado externo y las adiciones estándar). En este caso las medidas se realizan en continuo y, por tanto, el estudio de estos parámetros tiene un sentido diferente que en el caso del trabajo sobre la determinación de AOS en detergentes líquidos en modo *stopped-flow*. En el trabajo que ahora nos ocupa se investigó cómo es afectado el registro de la señal (altura de pico a 675 cm^{-1}

corregida con una línea base establecida entre 712 y 650 cm⁻¹) frente al tiempo cuando se varían los parámetros del caudal, tiempos de inserción, etc. Los estudios correspondientes indicaron que los mejores resultados en cuanto a la precisión y sensibilidad de las medidas en continuo se obtenían para un diámetro interno del *coil* de 0.5 mm con una longitud de 239 cm y un caudal de 3.2 mL min⁻¹. Así pues el montaje recomendado se dispuso con tales características.

A continuación se seleccionaron los parámetros de tiempo de inserción de muestra mediante los estudios correspondientes. Como se observa en la Figura 33, son suficientes 12.5 s de inserción de gasolina a través de la válvula V₁ para conseguir una señal máxima. Este tiempo de inserción se corresponde con un volumen de 666.7 µL de muestra. Por otra parte, se evaluó el efecto del tiempo de inserción de hexano, con el fin de asegurar una correcta separación entre los picos del registro de la señal frente al tiempo. En este caso, se observó que 30.0 s de hexano permitían una separación suficiente entre los picos correspondientes a cada réplica de muestra o patrón. De esta manera se fijaron ambos parámetros con el fin de aplicar el método al análisis de muestras de gasolina y comparar los resultados con el método FIA preexistente utilizado como referencia.

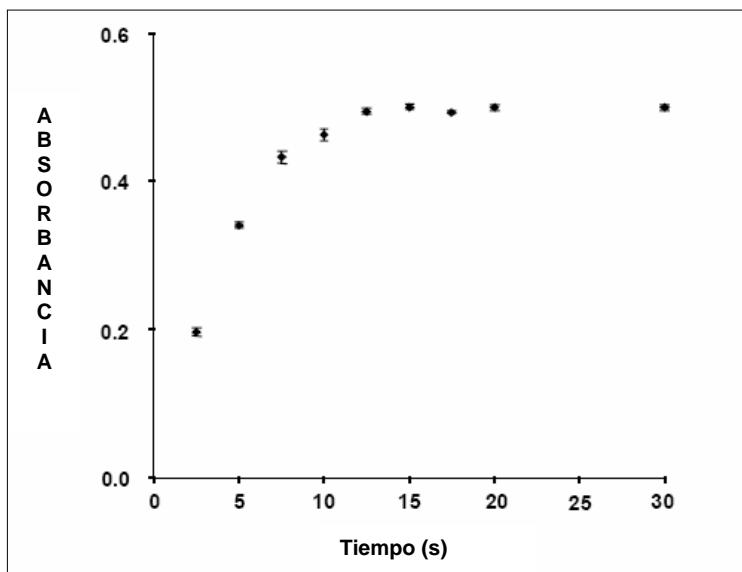


Figura 33. Efecto del tiempo de aspiración de una muestra de gasolina conteniendo un 2.74 % de benceno (v/v) a través de la válvula solenoide V₁, para un tiempo de aspiración de 30 s de *carrier* (hexano) entre cada réplica. Se indica el valor medio ± s para tres réplicas independientes.

Una vez desarrollado el nuevo método de análisis FTIR con multiconmutación del benceno en gasolina, se analizaron por este método y por el método de referencia (Gallignani, 1993) todas las muestras de las que se disponía, tanto por determinación directa como por adición estándar. La comparación de las pendientes de las rectas de regresión demostró en ambos casos la ausencia de efecto matriz.

La regresión de los resultados obtenidos por el método desarrollado y el método FIA proporcionan una recta $y = (0.1 \pm 0.2) + (0.98 \pm 0.08)x$, con $R = 0.967$. El test de t apareado indica que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre ambos métodos para un nivel de confianza del 95 %. El test F demuestra que la precisión obtenida con ambos métodos también es estadísticamente comparable. Así se verificó la validez del método de análisis por espectrometría FTIR en continuo con multiconmutación desarrollado en este trabajo.

La Tabla 7 incluye las características analíticas más importantes de este nuevo método y el método FIA utilizado como referencia.

El nuevo método mejora considerablemente el límite de detección respecto del método FIA. Por otra parte, permite el análisis de casi el doble de muestras en el mismo tiempo. También reduce el consumo de muestra y hexano. En el trabajo se comparan también los métodos encontrados en la bibliografía, encontrándose una sensible mejoría respecto de aquéllos.

El método FTIR desarrollado permite 81 determinaciones por hora, frente a las 45 determinaciones posibles en el caso del método FIA-FTIR de referencia. Además se generan tan sólo 105.6 mL de residuos por hora de trabajo frente a los 219.0 mL generados con el método de referencia. La mejora es todavía mayor para el consumo de muestra, pasando de 50.0 mL necesarios para 100 análisis en el caso del método de referencia frente a los 7.9 mL del nuevo método desarrollado.

Características	Método FIA Calibrado externo	Adición estándezar	Método multiconmutación	
	Calibrado externo		Adición estándezar	
% (v/v) LOD ^a	0.01	-	0.004	-
% RSD ^b	1.4	1.4	1.2	1.2
% intervalo de linealidad	0.1-0.6	-	0.91-3.75	-
Criterio de medida	Altura 675 cm ⁻¹ Línea base 712-650 cm ⁻¹	ídem	ídem	ídem
Regresión	$Y = (0.076 \pm 0.001)x - (0.0042 \pm 0.0005)$	$Y = (0.0720 \pm 0.0008)x - (0.0016 \pm 0.0003)$	$Y = (0.0410 \pm 0.0006)x - (0.006 \pm 0.002)$	$Y = (0.0416 \pm 0.0009)x - (0.032 \pm 0.002)$
R	0.9998	0.9997	0.998	0.9998
mL gasolina ^c	50.0	50.0	7.9	11.0
mL hexano ^c	471.4	471.4	117.9	192.5
mL residuos ^d	219.0	250.3	105.6	158.7
Frecuencia de análisis h ⁻¹	45	45	81	81

Tabla 7. Características analíticas del método desarrollado y el método FIA utilizado como referencia.^a Límite de detección para k= 3.^b Desviación estándar relativa para un disolución patrón.^c Consumo de muestra y *carrier* para 100 análisis.^d Residuos generados para 1 hora de trabajo.

CONCLUSIONES

La adaptación del método FIA-FTIR preexistente, mediante el diseño y puesta a punto de un sistema con multiconmutación, ha supuesto una mejora importante en la eficiencia y comodidad del análisis. Así pues, se ha dado un paso más en la automatización del proceso de determinación del benceno en gasolina por espectrometría FTIR.

2.3. Determinación de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias: aplicación de la multiconmutación acoplada a la espectrometría FT-NIR

INTRODUCCIÓN

El análisis con fines de control de calidad de formulaciones de productos fitosanitarios ha sido una preocupación constante en los últimos años en el grupo de investigación en el que se inscribe esta Tesis (Armenta, 2005c). La Unión Europea consumió 19384 toneladas de pesticidas en 1999 (Eurostat, 2002), lo que justifica la puesta a punto de nuevos métodos de análisis a nivel industrial, rápidos y de automatización sencilla.

Nos encontramos con un acaricida -hexythiazox- cuya disolución en acetonitrilo presentaba un espectro en el NIR que sugería su determinación por espectrometría FT-NIR directa. El hexythiazox es empleado en el tratamiento de los cítricos y por tanto su utilización es común en nuestro país. Este producto suele presentarse como único principio activo en las formulaciones que lo contienen (Liñán, 2000), lo que simplifica en gran medida su tratamiento como problema analítico. Por lo tanto, resultaba atractiva la posibilidad de desarrollar un método de análisis para el control de calidad de formulaciones que lo incluyeran.

Los métodos de análisis utilizados previamente para la determinación del hexythiazox se orientaban hacia el análisis a nivel de traza y no resultaban apropiados para el control de calidad, ya que exigen un tratamiento de las muestras que implica una elevada dilución, con el consiguiente consumo de disolvente. Entre éstos se encuentran métodos de cromatografía líquida-UV (Gilberto, 1991; Kaihara, 2000), espectrometría de masas (MS) con ionización por electrospray (Hetherton, 2004; Garrido-Frenich, 2004; Ortelli, 2004; Sannino, 2004) o ionización química (Valenzuela, 2001; Blasco, 2002; Blasco, 2002b; Blasco, 2004), MS con sonda directa (McGhie, 1990) y voltametría (Gu, 2003).

En este punto se decidió aprovechar la estrategia de multiconmutación-FTIR en el diseño de un método de análisis específico, pero en esta ocasión realizando medidas en continuo en la región del NIR, acoplamiento para el que no existía precedente alguno en la bibliografía disponible.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo de multiconmutación se expone un nuevo método FT-NIR para la determinación de hexythiazox en formulaciones de pesticidas que utiliza un montaje muy sencillo con dos válvulas solenoides. Así se consigue realizar la dilución en línea de la muestra y la adición estándar utilizando sólo una disolución patrón.

El proceso seguido para poner a punto el nuevo método fue el siguiente: en primer lugar se desarrolló un método FT-NIR en modo *batch* o discontinuo seleccionando los parámetros adecuados en cuanto a condiciones experimentales y de medida. Este método se validó mediante el método cromatográfico utilizado como referencia. Finalmente, el método en modo *batch* fue adaptado al modo continuo con una estrategia de multiconmutación, diseñando un sistema de flujo y seleccionando los parámetros experimentales más adecuados. Este método también se validó mediante el método de referencia. Veremos a continuación cómo se llevó a cabo todo este proceso de desarrollo del nuevo método de análisis.

Los ensayos preliminares realizados mostraban que el hexythiazox era soluble en acetonitrilo, disolvente adecuado para el análisis FT-NIR debido a su gran transparencia en esta región del IR. Por otra parte, se comprobó que el acetonitrilo extraía fácilmente el hexythiazox de los pesticidas en polvo de los que disponíamos. Por tanto se decidió utilizar el acetonitrilo como agente extractante. En la Figura 34 se muestran los espectros de un extracto de muestra y un patrón de hexythiazox en acetonitrilo. Como puede observarse con claridad, el hexythiazox presenta una banda bien definida hacia 4850 cm^{-1} , perfectamente identificable en el extracto de muestra. Esto sugería la posibilidad de desarrollar un método FT-NIR en modo *batch* para la determinación del hexythiazox en formulaciones de

pesticidas en polvo y por tanto se pudo continuar con la selección de los parámetros experimentales.

La medida en modo *batch* con el equipo FT-NIR se llevaba a cabo introduciendo el extracto de la muestra o el patrón en un vial de cuarzo. Debido a al efecto de la temperatura en los espectros FT-NIR, se fijaba la temperatura del porta-vial del equipo a 30º C. Las medidas se realizaban un par de minutos después de introducir el vial en el equipo, para asegurar el equilibrio térmico.

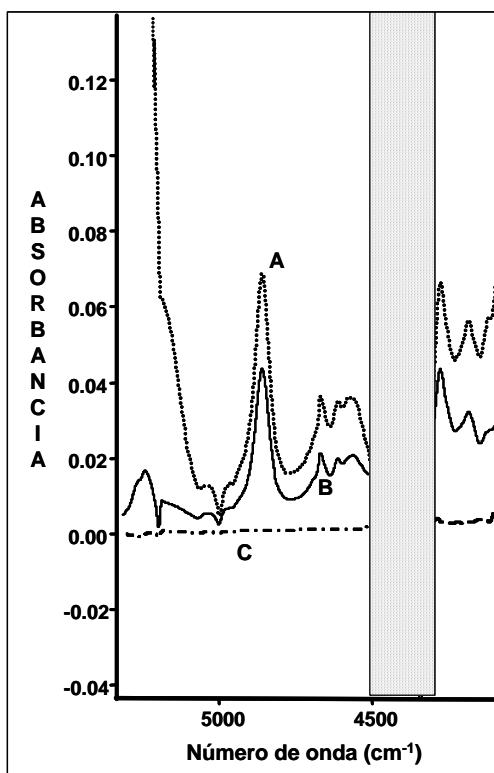


Figura 34. Espectros FT-NIR de un extracto en acetonitrilo de una muestra en forma de polvo mojable (A), un patrón contenido en 6.8 mg mL^{-1} de hexythiazox en acetonitrilo (B), y (C) un blanco de acetonitrilo. La regiónpectral oculta se debe al elevado background del disolvente. Las condiciones de medida son: 15 scans acumulados, 8 cm^{-1} de resolución nominal.

Una vez solucionado el problema de la temperatura, se prosiguió con la selección de los parámetros correspondientes a las condiciones experimentales y de medida en modo *batch*. En primer lugar se evaluaron diferentes criterios de medida en función de la precisión

y sensibilidad, seleccionando el área de pico entre 4948.6 y 4767.3 cm⁻¹ corregida con una línea base horizontal establecida a 4765 cm⁻¹ como criterio de medida más adecuado para la determinación del hexythiazox en las formulaciones utilizadas.

La siguiente etapa en el desarrollo del método FT-NIR en modo *batch* consistió en la selección de las condiciones de extracción (efecto de masa de muestra y de acetonitrilo). En la Figura 35 se muestra el efecto de la masa de acetonitrilo en la extracción del hexythiazox. Como puede observarse, para una masa de 0.1 g de muestra es suficiente 1.0 g de acetonitrilo para conseguir la extracción completa del hexythiazox. Por otra parte, se comprobó que una agitación ligera bastaba para que la extracción fuese completa. Así pues, se mantuvieron en lo sucesivo estas condiciones de extracción.

Por otra parte, se realizaron los estudios correspondientes para la selección del número de *scans* acumulados por espectro y la resolución nominal. Se seleccionaron como más adecuados 15 *scans* acumulados y 8 cm⁻¹ de resolución nominal.

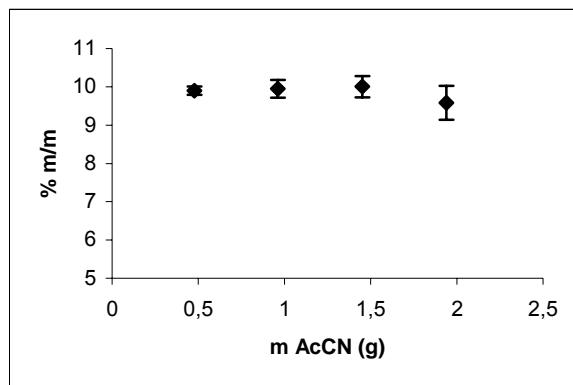


Figura 35. Efecto en la extracción del hexythiazox de la masa de acetonitrilo (AcCN) añadido a 0.1 g de muestra conteniendo un 10 % (m/m) del analito. Los valores se corresponden con la media ± s de tres medidas independientes.

Una vez llegados a este punto, el nuevo método FT-NIR en modo *batch* desarrollado se aplicó al análisis de muestras. Se compararon los resultados obtenidos mediante este método con los obtenidos mediante el método HPLC de referencia, y se

verificó que ambos eran comparables. Los estudios de recuperación mostraron la exactitud del método al encontrar valores próximos al 100 % de recuperación en todos los casos. Por lo tanto se decidió adaptar el método en modo *batch* al modo en continuo mediante el uso de estrategias de multiconmutación.

El sistema que se empleó para la determinación del hexythiazox por FT-NIR con multiconmutación se describe en la Figura 36. Dos válvulas solenoides se utilizan para introducir el *carrier* y la muestra (V_1) y el patrón (V_2). El *coil* tiene como función asegurar el perfecto mezclado entre los *slugs* insertados en el sistema.

Con este sistema se intentaba conseguir la dilución en línea de la muestra para determinar su contenido en hexythiazox mediante interpolación entre dos puntos, uno correspondiente a un patrón de concentración mayor que el valor esperado para la muestra y otro punto por debajo de este valor; como variable dependiente podría utilizarse la altura del pico obtenido en el registro continuo de la señal. A su vez, estos dos puntos se obtendrían por dilución en línea de una única disolución patrón original. De esta manera se pretendía reducir el tiempo de análisis, factor muy importante en un método que pretende aplicarse al control de calidad.

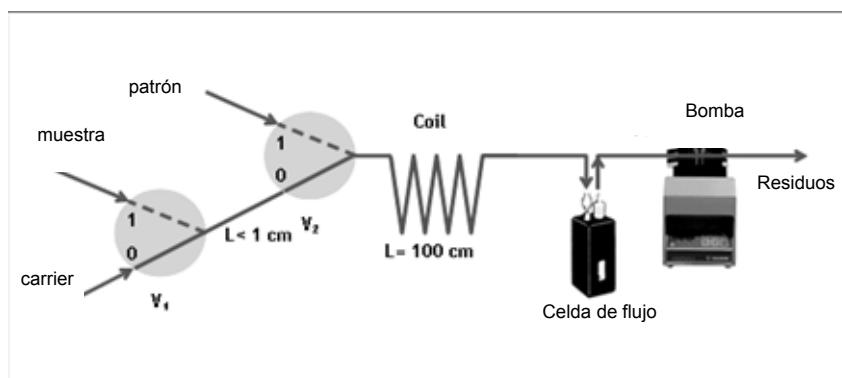


Figura 36. Montaje empleado para la determinación del hexythiazox por FT-NIR con multiconmutación. La bomba peristáltica aspira las disoluciones a través de la celda de flujo. Todas las líneas son de PTFE y de 0.8 mm de diámetro interno. La vía abierta al activar cada válvula está indicada con un 1 (bit 1), y la vía abierta cuando la válvula está desactivada se indica con un 0 (bit 0).

La otra posibilidad era realizar una adición estándar en línea, mediante la inserción consecutiva y repetida de pequeños *slugs* de muestra, patrón y acetonitrilo. A pesar de que se investigó la adición estándar en el método FT-NIR en modo *batch* y se llegó a la conclusión de que no era necesaria, se pensó que la adición estándar podría ser útil en el caso del método en continuo, al minimizar los posibles efectos de los cambios de temperatura en la señal medida. Como veremos a continuación, se probaron ambas opciones.

Una vez diseñado el sistema se estudiaron los parámetros experimentales propios de la multicommutación y medidas en continuo, que fueron: i) el número de *scans* acumulados por cada punto del registro continuo de la señal (área de pico entre 4948.6 y 4767.3 cm⁻¹ corregida con una línea base a un punto establecida a 4765 cm⁻¹) frente al tiempo, ii) el caudal, iii) la longitud del coil, iv) el número de ciclos de inserción alternada de 0.5 s de muestra y 0.5 s de carrier, v) el tiempo de inserción de acetonitrilo entre cada réplica.

En el caso del número de *scans* y caudal se decidió fijar ambos parámetros conjuntamente, puesto que son interdependientes. Si el caudal aumenta, entonces es necesario un mayor número de puntos en el registro de la señal frente al tiempo para mantener la misma información, lo que implica acumular un menor número de *scans* por punto. Las condiciones experimentales de 4 *scans* acumulados y un caudal de 1 mL min⁻¹ fueron seleccionadas para la determinación del hexythiazox en el método continuo debido a las adecuadas sensibilidad y repetibilidad, ambas referidas a la altura de pico del registro continuo, obtenidas en tales condiciones.

Por otra parte, se encontró que era necesario un *coil* de 100 cm para asegurar el mezclado completo de los *slugs* de muestra, patrón y carrier insertados. El número de ciclos de inserción de muestra (tiempo de inserción 0.5 s) y de *carrier* (tiempo de inserción 0.5 s) que garantizaba una señal máxima se seleccionó mediante el estudio correspondiente, encontrándose el valor de 30 ciclos como el más adecuado. En cuanto al tiempo de inserción

de acetonitrilo necesario para obtener una buena separación entre las diferentes réplicas, se comprobó que 45 s era el tiempo más adecuado.

Una vez seleccionados todos los parámetros experimentales, se aplicó el método desarrollado al análisis de las muestras, por la modalidad de interpolación entre dos puntos y por la modalidad de adición estándar. En la Figura 37 se muestra un ejemplo del registro obtenido de un análisis por adición estándar. Con el fin de validar el método se compararon los resultados obtenidos por ambas modalidades con los obtenidos mediante el método en modo *batch* y por el método HPLC de referencia. Los resultados fueron satisfactorios, indicando la validez del nuevo método FT-NIR con multiconmutación.

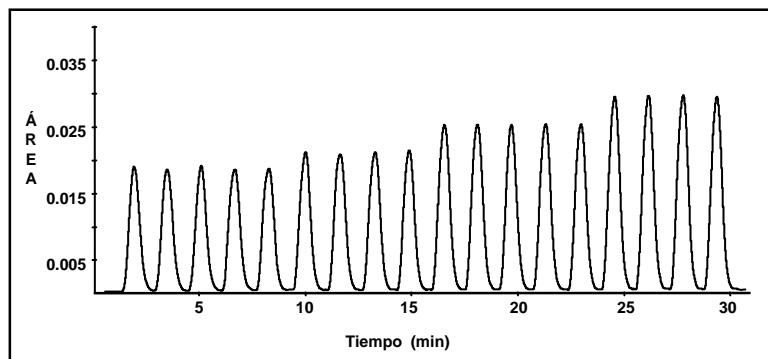


Figura 37. Registro de la señal frente al tiempo correspondiente a una adición estándar realizada mediante el método FT-NIR con multiconmutación desarrollado. La recta de calibrado es y (altura de pico)= $0.01782 + 0.00358 C$, con $R^2 = 0.998$, siendo C la concentración añadida de hexythiazox en mg mL^{-1} .

La Tabla 8 resume las características analíticas más importantes del método desarrollado. Como era previsible, es especialmente destacable la mejora conseguida en la eficiencia del análisis, pasando de 7 determinaciones por hora en el caso del método de referencia a 30 determinaciones en el caso del método FT-NIR en modo *batch* y 52 en el caso del método FT-NIR con multiconmutación. El volumen de residuos generado también se reduce enormemente para los dos nuevos métodos FT-NIR desarrollados en este trabajo, pasando de un total de 800 mL para el método HPLC a tan sólo 100 mL en los métodos FT-NIR.

Sólo en el aspecto de la sensibilidad no pueden competir los métodos FT-NIR desarrollados con el método de referencia; en éste el límite de detección es del orden de mil veces menor que para los métodos FT-NIR. Sin embargo, como ya hemos comentado, en el caso que nos ocupa, el analito se encuentra en concentraciones del orden del tanto por cien en la muestra, y en consecuencia la limitada sensibilidad de la técnica no representa ningún problema.

Parámetro	NIR-batch Calibrado externo	NIR- multiconmutación Calibrado externo	HPLC referencia
% (v/v) LOD ^a	0.2 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹	0.14 µg mL ⁻¹
% RSD ^b	0.2	0.8	0.05
mL residuos ^c	100	100	800
Frecuencia de análisis h ⁻¹	30	52	7

Tabla 8. Resumen de las principales características analíticas del método desarrollado y el método de referencia.

^a Límite de detección para k=3.

^b Desviación estándar relativa de una disolución patrón para n= 3.

^c Residuos para 100 análisis.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han puesto a punto dos métodos de análisis por espectrometría vibracional FT-NIR para la determinación de hexythiazox en formulaciones de pesticidas en forma de polvo mojable, uno de ellos con medidas en modo *batch* y el otro con medidas en continuo utilizando la multiconmutación como estrategia. El trabajo muestra el proceso de desarrollo del método en modo *batch* y su posterior adaptación al modo continuo. La comparación con el método HPLC de referencia ha permitido verificar la validez de los métodos FT-NIR desarrollados y, por otro lado, ha puesto de manifiesto las ventajas del uso de la multiconmutación como estrategia experimental.

3. Desarrollo de métodos de análisis FT-MIR con extracción previa del analito

En esta sección se han incluido dos trabajos en los que se lleva a cabo la extracción del analito previamente a su determinación. En el primero se aprovecha la extracción en fase sólida (SPE) para preconcentrar en línea el analito (methidathion o tricyclazole) y realizar a continuación la elución y determinación en línea por espectrometría FTIR. El segundo trabajo hace uso de la extracción presurizada con disolvente (PSE) para lograr la extracción rápida y sencilla de la grasa de la leche en polvo, y posteriormente su determinación por espectrometría FTIR.

3.1. Determinación de methidathion y tricyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y elución en línea

INTRODUCCIÓN

La espectrometría FTIR ha sido aplicada en los últimos años a la determinación de pesticidas en formulaciones fitosanitarias, con fines de control de calidad (Armenta, 2004). Sin embargo, los problemas asociados a esta técnica vibracional, como son la baja sensibilidad y el reducido número de disolventes disponibles, se ha traducido en una ausencia evidente de métodos FTIR para el análisis de pesticidas a nivel de traza. Se ha de tener en cuenta que la mayoría de los pesticidas controlados en aguas están presentes en niveles de mg L^{-1} ó $\mu\text{g L}^{-1}$ y por tanto exigen la utilización de técnicas muy sensibles. Por otra parte, es necesaria una separación previa de los analitos para incrementar la selectividad; además esta etapa puede aprovecharse para preconcentrar el analito aumentando así la sensibilidad del análisis. Así pues, la adaptación de la espectrometría FTIR al análisis en este contexto debe realizarse a través de: i) la mejora de la sensibilidad y ii) la puesta a punto de procedimientos de preconcentración sencillos y cómodos que impliquen el empleo de disolventes adecuados.

La extracción en fase sólida (SPE) es una alternativa a la extracción líquido-líquido que tradicionalmente ha sido empleada para la preconcentración de analitos. Su utilización acoplada a la espectrometría FTIR permite ampliar las posibilidades de esta técnica de análisis, especialmente en lo que se refiere a la mejora de la sensibilidad. Por otra parte, la espectrometría FTIR empleando el modo de medida en continuo presenta ventajas en cuanto a la frecuencia de análisis y a la manipulación de las muestras. A pesar de ello, un método con medidas en continuo no siempre es más práctico y rápido que un método en modo *batch*; por lo tanto, es preciso evaluar en cada caso la conveniencia de utilizar una u otra estrategia.

El methidathion es un insecticida organofosforado no sistémico ampliamente utilizado en el tratamiento de frutales pero que resulta altamente tóxico para los organismos acuáticos (Extoxnet, htm). Por su parte, el tricyclazole es un fungicida sistémico utilizado en el cultivo del arroz (Kawai, 1989). Ambos pesticidas son muy utilizados hoy en día en nuestro país; además, a partir de nuestros estudios previos se había demostrado que sus características espectrales en el IR los convertían en buenos candidatos para llevar a cabo su determinación en muestras acuosas a bajos niveles de concentración.

La mayoría de los métodos desarrollados recientemente para el análisis de pesticidas en aguas están orientados hacia el análisis multicomponente, sobre todo los que utilizan técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas (Petrovic, 2003). De hecho, tan sólo hay unos pocos precedentes directos sobre la determinación en línea de pesticidas por espectrometría FTIR (Daghbouche, 1995; Daghbouche, 1997). Por tanto, cabe preguntarse si las desventajas propias de la espectrometría FTIR en este campo de aplicación justifican la ausencia de métodos propuestos. En este sentido, en este trabajo se desarrollan paso a paso dos métodos FTIR similares, uno para la determinación de methidathion y otro para el tricyclazole, a nivel de mg L⁻¹ en aguas, estudiando en profundidad los parámetros propios de la preconcentración en fase sólida, y comparando la elución y determinación en línea con la elución y determinación en *batch* de cada analito.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo se proponen dos métodos de análisis, uno para la determinación de methidathion y otro para la determinación de tricyclazole en aguas, mediante el empleo de la extracción en fase sólida, la elución en línea y medidas por espectrometría FTIR en modo continuo. Ensayos previos habían mostrado que el methidathion en solución acuosa era fuertemente retenido por una fase sólida del tipo C18, mientras que el tricyclazole lo era por la fase C8. Además, ambos analitos podían eluirse fácilmente empleando cloroformo. En este sentido, uno de los objetivos del trabajo era comprobar el comportamiento de dos analitos químicamente diferentes y de dos fases sólidas de diferente polaridad en un método SPE en línea.

En una primera etapa se seleccionaron los parámetros correspondientes a las medidas en *batch* (criterios de medida, resolución, número de *scans*), para pasar después al estudio de los parámetros referentes a la extracción en fase sólida en línea. Finalmente se compararon los resultados obtenidos mediante el procedimiento que utiliza la elución y medida en *batch* de los extractos con los resultados obtenidos mediante elución y medida en continuo.

Como se ha indicado, se estudiaron las características espectrales en el IR medio de ambos pesticidas. Como puede verse en la Figura 38, el methidathion en disolución de cloroformo presenta una banda de absorción intensa debido al grupo carbonilo (1696 cm^{-1}), entre otras. Sin embargo, la presencia de agua interfiere en la zona cerca de 1600 cm^{-1} , desaconsejando su uso para la determinación del analito. La banda a 1022 cm^{-1} correspondiente al grupo éter resultó ser la más adecuada para la determinación del methidathion. Se evaluaron diversos criterios de medida, seleccionando finalmente el área de pico entre 1038 y 996 cm^{-1} corregida con una línea base establecida entre 1105 y 884 cm^{-1} . Por otra parte, el tricyclazole (Figura 39) presenta sólo una banda susceptible de ser utilizada para su cuantificación, a 1495.1 cm^{-1} . El estudio de diferentes criterios de medida condujo a seleccionar el área de pico entre 1511 y 1482 cm^{-1} corregida con una línea base

establecida entre 1526 y 1534 cm⁻¹ como criterio más adecuado para la cuantificación de tricyclazole.

La selección de los parámetros resolución nominal y número de *scans* acumulados por espectro se llevó a cabo mediante los estudios correspondientes, siendo 8 cm⁻¹ y 50 *scans* los valores seleccionados para ambos analitos. Por otra parte, resultó ser necesario el secado de los cartuchos SPE con una corriente de nitrógeno durante hora y media para evitar la interferencia del agua en la etapa de medida después de la elución.

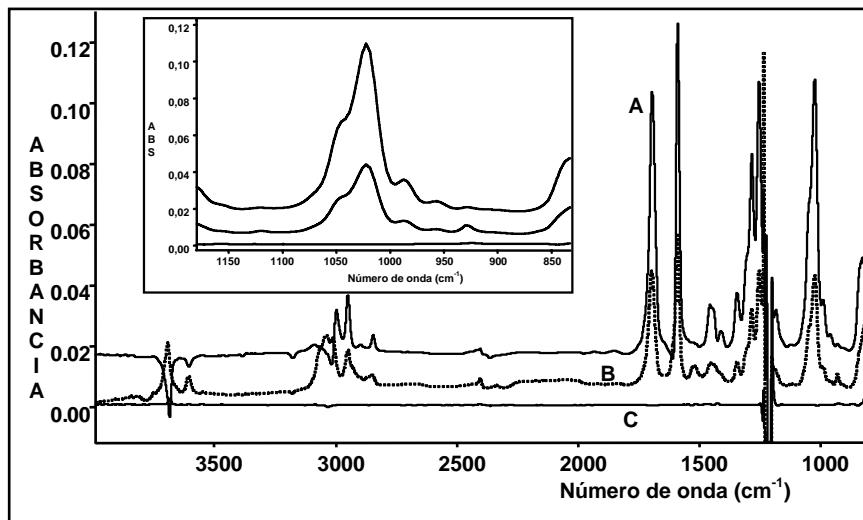


Figura 38. Espectros FTIR de A) un patrón de 0.63 mg g⁻¹ de methidathion en cloroformo, B) eluato obtenido tras la preconcentración en un cartucho de C18 de 100 mL de una muestra acuosa conteniendo 7.95 mg L⁻¹ de methidathion eluido con 2 mL de cloroformo y C) blanco de cloroformo. Condiciones de medida: 50 *scans* acumulados y 8 cm⁻¹ de resolución nominal. *Inset:* detalle de la región espectral utilizada para la cuantificación del methidathion.

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas para la medida en el IR medio se estudiaron los parámetros propios del proceso de extracción y preconcentración en fase sólida. Se seleccionaron los valores de masa de fase sólida (C18 para el methidathion y C8 para el tricyclazole), efecto de la fuerza iónica, masa de analito retenida y caudal de muestreo, empleando para ello disoluciones acuosas conteniendo los pesticidas considerados.

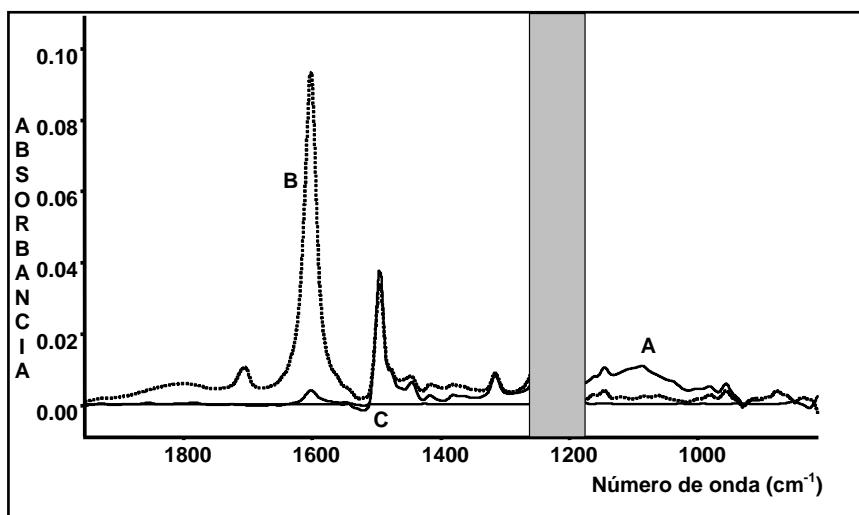


Figura 39. Espectros FTIR de A) un patrón de 0.65 mg g^{-1} de tricyclazole en cloroformo, B) eluato obtenido de la preconcentración en un cartucho de C8 de 100 mL de una muestra de agua conteniendo 6.09 mg L^{-1} de tricyclazole eluído con 2 mL de cloroformo y C) blanco de cloroformo. Las condiciones de medida son las mismas que en la Figura 40.

El procedimiento de retención en línea, para ambos analitos, consiste en hacer pasar con un caudal determinado un volumen de la muestra a través de un cartucho cargado con la fase sólida correspondiente. Para ello se utiliza una bomba peristáltica de modo que la carga de la muestra acuosa se realiza con caudal constante. La elución en *batch* se realiza haciendo pasar un volumen de 2 mL de cloroformo a través del cartucho, previamente secado con una corriente de nitrógeno, mediante una jeringa. La masa de C18 seleccionada fue de 100 mg , mientras que de C8 fue 200 mg . Para ambos analitos se verificó que la fuerza iónica de la muestra no afectaba a la retención del analito, utilizando muestras a las que se había adicionado cloruro sódico o nitrato potásico a niveles entre $0.5\text{-}7 \text{ \% (m/m)}$. El valor de saturación encontrado fue de 2.94 mg de methidathion por 100 mg de C18 y 2.3 mg de tricyclazole por cada 200 mg de C8. Para ambos analitos se fijó un volumen de muestra para preconcentrar igual a 100 mL . En cuanto al caudal de muestreo, se seleccionó un caudal de 10 mL min^{-1} en el caso del methidathion y de 2.1 mL min^{-1} en el caso del tricyclazole.

Por el procedimiento desarrollado basado en la retención en fase sólida y elución y medida en *batch*, se analizaron una serie de muestras acuosas contaminadas con methidathion a niveles de 3.15-8.28 mg L⁻¹, siendo los resultados plenamente satisfactorios. También se realizó un estudio similar para el tricyclazole, obteniendo resultados válidos. A continuación se decidió poner a punto un procedimiento de elución y medida en línea para ambos analitos con la finalidad de comprobar si mejoraban las características analíticas.

En la Figura 40 se presenta el montaje experimental utilizado para la elución y medida en línea de los pesticidas. Consta de una bomba peristáltica que impulsa el disolvente y de dos válvulas direccionales de tres vías que posibilitan que el cloroformo circule directamente hacia la celda de medida o que atraviese el cartucho en el que está concentrado el correspondiente pesticida. Para obtener el background se hace pasar el disolvente por el by-pass entre las válvulas 1 y 2 hacia la celda de medida. De esta manera se llena el *loop* de 2 mL. Una vez registrado el background se invierte el sentido de la bomba y se coloca la válvula 2 en la posición que conduce el flujo hacia el cartucho, llenándose éste con el disolvente contenido en el *loop*. Finalmente se invierte el sentido del flujo de nuevo y se cambia de posición la válvula 1, de manera que por la parte inferior del cartucho eluye el analito hacia la celda FTIR mientras que por la parte superior entra disolvente fresco.

En estas condiciones se registran de manera continua los espectros FTIR, procesándolos con el criterio de medida de cada analito que previamente se había establecido en los procedimientos en *batch*.

Como se ha señalado, el cartucho se llena desde la parte inferior para que así se desplace el aire presente en los intersticios de la fase sólida, minimizando la presencia de burbujas en el eluato durante la etapa de medida en función del tiempo. Para ambos pesticidas se seleccionó un caudal de llenado de 0.43 mL min⁻¹ como el más adecuado, y las medidas en continuo se realizaron acumulando 10 *scans* por espectro, como compromiso entre una buena relación señal-ruido y una adecuada resolución temporal.

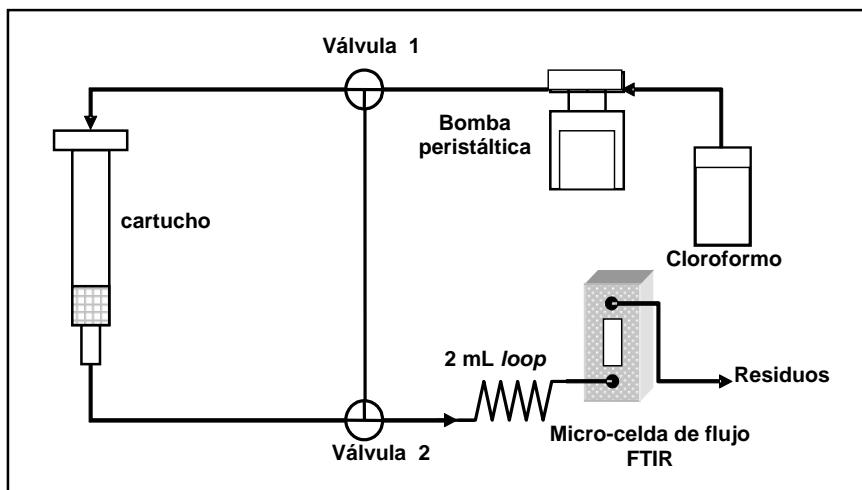


Figura 40. Montaje experimental utilizado en la elución y determinación en línea de methidathion y de tricyclazole.

Se estudió el caudal de elución para ambos analitos, encontrando un caudal de 0.66 mL min⁻¹ como el más adecuado para la elución del methidathion y un valor de 0.75 mL min⁻¹ para la elución del tricyclazole. Estas diferencias se producen probablemente por la diferente masa de fase sólida utilizada en cada caso (100 mg de C18 y 200 mg de C8, respectivamente) y en la naturaleza de las interacciones analito-fase sólida, debido a las diferencias de polaridad existentes entre los analitos y las fases utilizadas.

Finalmente se analizaron varias muestras según los procedimientos desarrollados para ambos analitos con elución y medida en línea. En el caso del methidathion, el límite de detección conseguido fue de 0.3 mg L⁻¹, superior a los límites máximos tolerados por la legislación española (Real Decreto, 1986), mientras que para el tricyclazole fue de 0.1 mg L⁻¹. Tanto para el methidathion como para el tricyclazole se utilizó como variable dependiente del calibrado el área de pico de elución correspondiente al registro de la señal frente al tiempo. Una muestra conteniendo 7.67 mg L⁻¹ de methidathion, dio como resultado 7.5 ± 0.7 mg L⁻¹, y otra muestra conteniendo 7.70 mg L⁻¹, dio un contenido de 8.0 ± 0.7 mg L⁻¹. Así se obtuvieron errores relativos del -2.2 y del 3.9 % respectivamente. Por otra parte, una muestra con 6.09 mg L⁻¹ de tricyclazole dio como resultado 6.1 ± 0.3 mg L⁻¹ que supone un error del 0.2 %. Estos resultados indicaron que los métodos, aun siendo muy mejorables, son

válidos para muestras con importantes contenidos de estos pesticidas pero que, a pesar de ello, no podrían ser analizadas de forma directa por espectrometría FTIR (por ejemplo, mediante medida de reflectancia total atenuada).

Puesto que el principal objetivo de este trabajo era la evaluación de las posibilidades del acoplamiento SPE-espectrometría FTIR para el análisis de pesticidas a nivel de traza y los problemas asociados a su aplicación y adaptación al análisis en línea, se compararon las características analíticas de los métodos en *batch* y en línea desarrollados en el trabajo. En la Tabla 9 se resumen estas características. Y, aunque los procedimientos en línea permiten reducir la manipulación de las muestras, evitan la contaminación cruzada y reducen la exposición a los reactivos tóxicos por parte del analista, en este caso resultan menos prácticos que los procedimientos en *batch*. Considerando que el volumen de residuos generados y el tiempo de análisis se incrementan notablemente, resulta más ventajoso el uso de los métodos en *batch*.

Por otra parte, la utilización de la espectrometría FTIR acoplada a la SPE no representa en este campo de aplicación ninguna alternativa a los métodos clásicos cromatográficos. Las limitaciones derivadas de la baja sensibilidad de la técnica, las dificultades que presentarían muestras reales con abundante contenido de materia orgánica (en términos de interferencias espectrales) y las limitaciones para determinar varios analitos al mismo tiempo, justifican la carencia observada de métodos FTIR en este tipo de análisis.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han propuesto dos métodos de análisis para la determinación en aguas de methidathion y de tricyclazole mediante la preconcentración en fase sólida, elución y medida en línea por espectrometría FTIR. Se han evaluado los parámetros experimentales y se han analizado muestras sintéticas. Aunque los resultados han sido satisfactorios en términos de exactitud y precisión, la elución y medida en línea resulta incómoda y poco práctica frente a la elución y medida en modo *batch*. Por otra parte, las limitaciones

intrínsecas a la técnica FTIR sugieren un uso muy específico de los métodos desarrollados en el campo del control de calidad.

Parámetro	Método FT-IR <i>batch</i>		Método FT-IR en línea	
	Methidathion	Tricyclazole	Methidathion	Tricyclazole
Calibrado	$Y = (0.024 \pm 0.007) + (3.592 \pm 0.013)C_M$ (mg g ⁻¹)	$Y = (0.062 \pm 0.012) + (2.34 \pm 0.03)C_T$ (mg g ⁻¹)	$Y = (0.18 \pm 0.07) + (0.393 \pm 0.010)C_M$ (mg L ⁻¹)	$Y = (0.09 \pm 0.04) + (4.88 \pm 0.08)C_T$ (mg L ⁻¹)
R ²	0.9997	0.997	0.992	0.997
^a RSD %	0.04	0.15	2.8	3.3
^b LOD	0.07	0.2	0.3	0.1
Frecuencia de análisis h ⁻¹	12	12	6	5
^c Residuos mL	200	200	700	700

Tabla 9. Características analíticas para los métodos FTIR en *batch* y en línea desarrollados en este trabajo.

^a Desviación estándar relativa para n=3.

^b Límite de detección para k=10, en mg L⁻¹.

^c Volumen calculado para 100 réplicas.

3.2. Determinación de grasa en leche en polvo con extracción presurizada con disolvente

INTRODUCCIÓN

El contenido de grasa tiene un importante papel en los aspectos nutricionales de la leche y, consecuentemente, en su calidad. El efecto del consumo de grasas se ha relacionado con las enfermedades coronarias. Por otra parte, la posibilidad de la adulteración de los alimentos con grasas de naturaleza diferente a la esperada requiere métodos de análisis para su prevención y control. Los métodos tradicionales para la determinación de grasa en leche

se basan en i) extracción y medida gravimétrica, ii) otros ensayos físicos, iii) turbidimetría, iv) espectrometría.

Los métodos clásicos gravimétricos como el de Röse-Gottlieb o el Mojonnier son complicados y requieren mucho tiempo, con un consumo de reactivos importante y una generación de residuos elevada, ya que requieren una hidrólisis para separar la grasa del resto de componentes y de posteriores extracciones sucesivas con disolventes orgánicos. Modificaciones de los métodos gravimétricos son los que incluyen extracción con fluidos supercríticos (LaCroix, 2003), extracción asistida con microondas (Ruiz-Jiménez, 2004) y extracción acelerada o presurizada con disolvente (Dionex, 2000; Richardson, 2001). Estos últimos métodos eliminan la etapa previa de hidrólisis y acortan el tiempo de análisis.

La espectrometría FTIR se ha aplicado a la determinación de grasas y aceites en diversas matrices (Daghbouche, 1997b). Esta técnica instrumental ofrece ventajas respecto a la gravimetría puesto que reduce extraordinariamente el tiempo de análisis y lo simplifica. Por otra parte, la extracción presurizada con disolvente (PSE, ASE) representa una buena alternativa a las técnicas clásicas de extracción, como la de Soxhlet, que requieren tiempos de extracción de varias horas. En el caso de los métodos PSE, los tiempos de extracción típicos son del orden de 15 min. Las ventajas en estas aplicaciones son evidentes, por tanto, en términos de velocidad de análisis. Métodos ASE o PSE se han aplicado con éxito a la determinación de lípidos en carne (Toschi, 2003), oxiesteroles en alimentos derivados del huevo (Boselli, 2001), gestágenos en grasa de hígado (Hooijverink, 2003) y otros como pesticidas en piensos (Chen, 2003), mostrando la gran versatilidad de esta técnica.

El objetivo de este trabajo es mostrar las ventajas del acoplamiento de la PSE con la espectrometría FTIR para la determinación de grasa en leches en polvo, con el fin de aumentar la velocidad de análisis y reducir los residuos generados, en relación con los métodos gravimétricos clásicos. También se investiga la posibilidad de discriminar diferentes tipos de grasas según su origen a través del estudio de su espectro FTIR.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolla un método PSE-FTIR para la determinación de grasa en leche en polvo. Además se aplica a otros tipos de muestras para comprobar si es posible llevar a cabo una diferenciación en función de la naturaleza de la grasa presente. Con el fin de evaluar la versatilidad del procedimiento propuesto, se incluye el estudio del contenido de grasa en chocolates con diferente porcentaje de cacao, a través de la determinación de la grasa mediante un método PSE-FTIR específico.

En primer lugar se estudian los parámetros relativos al procedimiento de la extracción, esto es, la masa de muestra, tipo de disolvente, el número de ciclos de extracción y la duración de los mismos. Como extractante se utiliza una mezcla de hexano, diclorometano y metanol en proporción 3:2:1 en volumen, mezcla que permite la extracción selectiva de la grasa sin recurrir a la hidrólisis previa, debido a la naturaleza apolar-polar de los disolventes. Se seleccionó una masa de muestra de 1.75 g y 3 ciclos de extracción de 1 min como las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el proceso, siguiendo el criterio de compromiso entre rapidez, cuantitatividad y precisión del análisis.

Una vez asegurada la extracción total de la grasa de las muestras de leche en polvo, se pasó a fijar las condiciones de medida en el IR mediante los estudios correspondientes. En la Figura 41 se muestra el espectro FTIR de un extracto, obtenido empleando una mezcla de hexano, diclorometano y metanol en proporción 3:2:1 como extractante y como disolvente de medida en el IR medio. Como puede observarse, aparece una banda intensa a 1750 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del enlace éster. Por otra parte, el disolvente absorbe fuertemente en la región de las tensiones alifáticas ($2850\text{-}3025\text{ cm}^{-1}$) y por tanto esta región queda excluida para su empleo en la determinación de grasa. Se aprecia una interferencia importante en la región alrededor de 1640 cm^{-1} , correspondiente a la absorción del grupo amida de las proteínas extraídas junto a la grasa que, como se verá más tarde, sea posiblemente la causa de los errores encontrados en la determinación de la grasa en leches en polvo desnatadas. Se evaluaron diferentes criterios de medida como altura o área de pico, corregidas con distintas líneas base. Finalmente se seleccionó el área de pico entre 1774.2 y

1712.5 cm⁻¹ corregida con una línea base establecida entre 1805.0 y 1581.3 cm⁻¹. Esta selección de la línea base permite reducir en gran parte el efecto interferente de la banda amida, aunque no pudo eliminarse por completo.

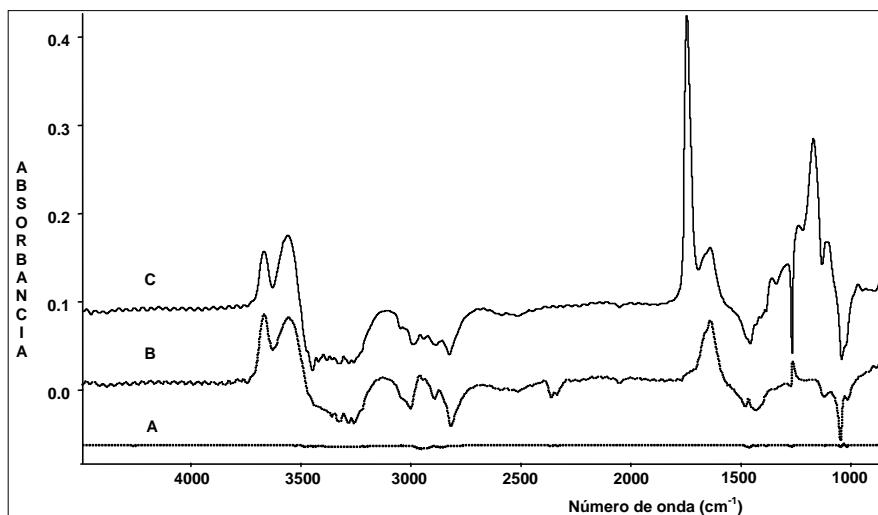


Figura 41. Espectros FTIR de extractos obtenidos mediante PSE correspondientes a: A) blanco de disolvente (mezcla de hexano, díclorometano y metanol en proporción 3:2:1, B) 2.00 g de una muestra de leche desnatada en polvo con < 1 % (m/m) de materia grasa y C) 1.75 g de una muestra de leche entera en polvo con un 26.48 % (m/m) de materia grasa. Las condiciones de medida son 50 scans acumulados, resolución nominal de 8 cm⁻¹.

A continuación se aplicó el método desarrollado a diferentes tipos de alimentos sólidos, como leches en polvo enteras y desnatadas, leches infantiles en polvo, salmón liofilizado, avellanas, nueces, piel de pollo y tocino de cerdo. El objetivo del estudio de este conjunto amplio de muestras era la clasificación rápida de las grasas a través de la comparación de los espectros FTIR correspondientes. En este sentido se observaron diferencias notables entre las grasas de diferente origen (animal o vegetal). Las regiones espectrales utilizadas en la comparación son aquellas que presentan más información, es decir, entre 1797.6 y 1511.6 cm⁻¹, entre 1399.3 y 1282.9 cm⁻¹, entre 1227.1 y 1072 cm⁻¹ y entre 1003.0 y 847.9 cm⁻¹. La fuerte absorción del disolvente impide el uso de las regiones entre 1400 y 1500 cm⁻¹, 1300 y 1225 cm⁻¹ y entre 1070 y 1000 cm⁻¹.

Con el fin de estudiar si existen diferencias entre los espectros FTIR del extracto graso procedente de distintos alimentos se procedió al análisis de diferentes muestras de naturaleza variada. Tomando como referencia el espectro de la fracción grasa de la leche en polvo se creó una biblioteca de espectros y, tomando los espectros del resto de muestras, se sometieron a un proceso de identificación con el fin de establecer el índice de correspondencia y evaluar si un programa genérico de gestión de biblioteca de espectros, habitual en los paquetes de *software* que acompañan a la instrumentación actual, permitía la clasificación de los espectros en función del origen de la grasa y de ese modo discernir entre diferentes clases de la misma.

La clasificación realizada con la biblioteca de espectros mostró que los espectros con menor similitud con los de las leches enteras eran los de las leches desnatadas, posiblemente debido a la menor cantidad de grasa y a la interferencia espectral que supone en estas condiciones la presencia la banda amida. El extracto de tocino de cerdo presentó una similitud con los otros espectros por debajo del 99 % de correspondencia. Sin embargo, el espectro de grasa de pollo sí presentó correspondencias por encima del 99 % para un total de 17 espectros de muestras diferentes. Esto supone que este tipo de grasa resulta difícil de discriminar del resto de grasas estudiadas. El extracto de salmón tampoco presentó similitudes mayores del 99 % con ningún otro espectro. Por el contrario, los espectros FTIR del extracto de la avellana y de la nuez presentan grandes similitudes entre ellos y el de la avellana todavía presenta correspondencias superiores al 99 % con ocho espectros de extractos de diferente origen. Así pues, queda constatado el hecho de que la discriminación de las grasas es posible sin recurrir a métodos quíométricos complejos, en primera aproximación, aunque se observan problemas de identificación entre extractos que tienen características espectrales muy similares.

Se analizó un conjunto de muestras de leche en polvo por el método propuesto basado en la extracción presurizada con disolvente y medida FTIR. El calibrado se construyó a partir del extracto graso obtenido de muestras de leche. Las mismas muestras también fueron analizadas por un método de referencia gravimétrico basado en la extracción sólido-líquido convencional. Finalmente también se consideró la determinación gravimétrica de la

grasa a partir del extracto obtenido mediante el mismo procedimiento PSE empleado para la determinación FTIR. En la Tabla 10 aparecen los resultados obtenidos y como puede verse, para las muestras de leche entera los resultados son satisfactorios mientras que en el caso de la leche desnatada el método propuesto presenta errores elevados, posiblemente debido a interferencias de tipopectral como consecuencia de la baja señal de la grasa.

Muestra	PSE-FTIR	Método de referencia gravimétrico	PSE gravimétrico	% Diferencia (FTIR-PSE gravimétrico)	% Diferencia (FTIR-método referencia)
1	27.48 ± 0.06	27.48 ± 0.03	27.27	0.78	0.00
2	26.49 ± 0.09	26.08 ± 0.11	25.81	2.64	1.59
3	26.69 ± 0.05	26.40 ± 0.04	26.11	2.19	1.10
4	0.36 ± 0.03	0.86 ± 0.02	0.36	-0.19	-58.58
5	0.000 ± 0.019	0.77 ± 0.03	0.22	-100.23	-100.10
6	0.411 ± 0.003	0.613 ± 0.009	0.56	-26.07	-32.96

Tabla 10. Resultados obtenidos para la determinación de materia grasa en leches en polvo enteras (1-3) y en desnatadas (4-6), mediante el método PSE-FTIR desarrollado, el método de referencia gravimétrico y el método PSE gravimétrico.

El método desarrollado tiene un límite de detección del 0.004 % (m/m). Las principales ventajas que presenta son el incremento considerable de la frecuencia de análisis (12 h^{-1} frente a 4 h^{-1}) al eliminar las extracciones sucesivas y las lentes extracción y determinación gravimétricas típicas de los métodos de referencia. Además reduce el volumen de residuos generados (12 mL frente a 131.25 mL por cada réplica) y minimiza la manipulación de la muestra y de disolventes tóxicos por parte del operador.

Empleando el calibrado obtenido a partir de la grasa de la leche se procedió a determinar el contenido de grasa en los alimentos estudiados en la clasificación espectral ya comentada, además de en distintos tipos de quesos. Los resultados no fueron satisfactorios

en términos de exactitud, debido fundamentalmente a dos razones: i) el calibrado utilizado no es válido por ser representativo sólo de la grasa de leche y ii) las condiciones de extracción no están optimizadas y por tanto pueden extraerse otras sustancias que dan lugar a interferencias de tipo espectral. Por tanto se concluyó que cada tipo de muestra necesitaba métodos específicos de análisis, conclusión un tanto previsible considerando la naturaleza de la grasa de cada alimento, así como el estado en el que se encuentran, que supone en ocasiones la necesidad de tratamientos específicos que permiten liberar la grasa de la matriz y su posterior extracción con el disolvente adecuado. Finalmente se trató de evaluar la capacidad del acoplamiento PSE-FTIR para resolver un problema, el de la correlación entre porcentaje de cacao y contenido en materia grasa de los chocolates. Para ello se desarrolló un procedimiento específico para el análisis de chocolates, basado en métodos PSE gravimétricos preexistentes, adaptándolos a la cuantificación por espectrometría FTIR. Se analizaron 10 muestras diferentes encontrando una relación lineal entre las variables contenido de cacao y contenido de grasa. El calibrado utilizado para la determinación FTIR fue preparado a partir de extractos de chocolate de 99 % de contenido en cacao. Sin embargo también se encontraron diferencias importantes entre los resultados obtenidos mediante la extracción PSE y determinación gravimétrica (de referencia) y los obtenidos por espectrometría FTIR.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un método PSE-FTIR para la determinación de grasa en leches en polvo, siendo comparado con el método de referencia gravimétrico. Los resultados obtenidos para leches enteras son adecuados en términos de exactitud y precisión, no siendo así para las leches desnatadas. Los errores encontrados en éstas se deben probablemente al tipo de calibración utilizado. El método resulta claramente ventajoso frente al método de referencia si se aplica a leche en polvo entera, al reducir el volumen de residuos generados y aumentando considerablemente la frecuencia de análisis. Por otra parte, se han estudiado las similitudes y diferencias entre extractos de grasa de diverso origen con el fin de disponer de una estrategia rápida para la discriminación de las grasas. Cuando el método propuesto para el análisis de leche se ha aplicado a otros tipos de

alimentos los resultados obtenidos por medida FTIR difieren de los encontrados por determinación gravimétrica a pesar de que la estrategia de extracción es idéntica. Esto hace suponer que la causa de los errores encontrados se debe, fundamentalmente, a la estrategia de calibración empleada. Un estudio final que relaciona el contenido de grasa y el contenido de cacao en chocolates completa el trabajo mostrando las posibilidades de la espectrometría IR para su aplicación en el campo del análisis de control de calidad en alimentos.

4. Tratamiento en línea de la muestra: determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas

INTRODUCCIÓN

Una de las líneas de investigación seguidas en nuestro grupo se ha orientado hacia la determinación de principios activos en especialidades farmacéuticas. Disponíamos de especialidades en presentación de pastillas con succinato de doxilamina en su composición, sustancia antihistamínica y sedante utilizada en productos de amplio consumo entre la población, como es el caso de la especialidad farmacéutica comercializada bajo la denominación de Dormidina. No existía ningún método FTIR para la determinación de este fármaco y los estudios previos sugerían una determinación sencilla en el MIR aprovechando su solubilidad en cloroformo, disolvente muy transparente en esta región del IR.

Por otro lado, la disminución o eliminación de los disolventes clorados en el análisis por espectrometría FTIR es una exigencia del trabajo en nuestro grupo que se enmarca dentro de las directrices establecidas por el Protocolo de Montreal. En este sentido, los métodos de análisis en flujo FTIR (Curran, 1985; de la Guardia, 1992; Daghbouche, 1997; Bouhsain, 1999) suponen un menor consumo de disolvente que los métodos en modo *batch*, entre otros rasgos ventajosos. En los últimos años se han introducido métodos de análisis FTIR en flujo para la determinación de principios activos de compuestos farmacéuticos, como es el caso del octil succinato (Morgan, 1985), ibuprofeno (Garrigues, 1993b), dimenhidrinato (Bouhsain, 1995), ketoprofeno (Sánchez-Dasí, 1998), paracetamol (Ramos, 1995; Bouhsain, 1996; Ramos, 1998) y cafeína y ácido acetilsalicílico (Garrigues, 1993a). La experiencia previa de extracción en línea (Bouhsain, 1999) nos sugirió la puesta a punto de un método de extracción y análisis en línea que utilizara una cantidad mínima de cloroformo con el fin de aplicarlo al análisis de fármacos. De esta manera se superarían los inconvenientes -complejidad técnica, lentitud, difícil automatización- de los métodos preexistentes para la determinación del succinato de doxilamina, a saber, cromatográficos

(Hansen, 1985; Argekar, 1999; Argekar, 1999b), MS (Josephs, 1995), con electroforesis capilar (Tang, 2000) y con espectrometría UV en medio micelar (Monferrer-Pons, 1996).

Como se verá, el procedimiento desarrollado no sólo permite el tratamiento en línea de la muestra, sino que también ofrece la posibilidad de llevar a cabo una adición en línea de un estándar. Se propone también la co-adición de espectros en el tiempo como estrategia para la obtención de señales estables sin necesidad de esperar a que se alcance el estado estacionario, teniendo en cuenta la dilución y homogeneización de las disoluciones dentro del sistema.

RESUMEN Y DISCUSIÓN

En este trabajo se propone un nuevo método de análisis FTIR para la determinación del principio activo succinato de doxilamina en preparados farmacéuticos. La peculiaridad del método reside en la extracción en línea del analito, proceso del que se realiza un seguimiento en continuo. En primer lugar se desarrolla el método FTIR en modo *batch* y a continuación se adapta al modo continuo incluyendo la extracción en línea del succinato de doxilamina. A continuación consideraremos brevemente los aspectos más importantes del desarrollo del método FTIR propuesto en este trabajo.

Los ensayos preliminares mostraron que el succinato de doxilamina presentaba unas bandas características, fácilmente identificables en los espectros de extractos en cloroformo de la especialidad farmacéutica. En la Figura 42 se muestran los espectros de un extracto de muestra y de un patrón de succinato de doxilamina. Como puede verse, aparece una banda intensa hacia 1720 cm^{-1} , correspondiente al pico del grupo carboxilo de la molécula de succinato, mientras que hacia $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ aparecen las bandas de deformación de los enlaces de la doxilamina y del succinato. Con el fin de seleccionar el criterio de medida más adecuado para la determinación del succinato de doxilamina se realizó el estudio correspondiente, encontrando como mejores condiciones de las ensayadas el valor de la suma de área entre 1710 y 1730 cm^{-1} más el área entre 1462 y 1485 cm^{-1} , corregidas con una línea base establecida entre 1800 y 2000 cm^{-1} .

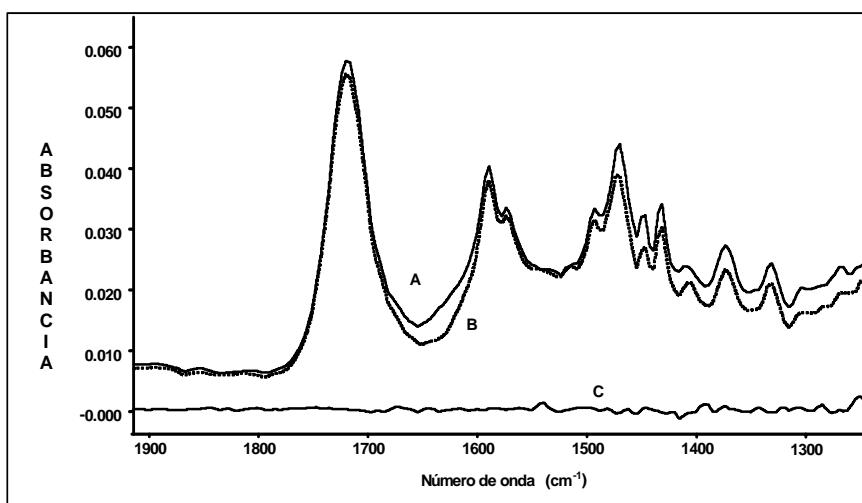


Figura 42. Espectros FTIR de: A) un patrón de succinato de doxilamina de 4.24 mg mL^{-1} preparado en una mezcla al 13 % (v/v) de etanol en cloroformo, B) un extracto de una muestra en la misma mezcla, correspondiente a 4.51 mg mL^{-1} de succinato de doxilamina y C) blanco del disolvente. Las condiciones de medida son 10 scans acumulados, 8 cm^{-1} de resolución nominal.

A continuación se estudiaron las condiciones de extracción (en modo *batch*), a saber, la composición del disolvente, el tiempo y el tipo de agitación (mecánica o por ultrasonidos). Pruebas realizadas previamente indicaron que, a pesar de la aceptable solubilidad del succinato de doxilamina en cloroformo, la extracción no era completa si se empleaba sólo este disolvente ($77.9 \pm 1.4\%$ de extracción para 5 réplicas de una muestra). Según estos resultados, el cloroformo por sí solo no es capaz de extraer todo el succinato de doxilamina, que permanece retenido en la matriz, más polar.

En este punto se decidió evaluar el efecto de la polaridad del disolvente en el rendimiento de la extracción. Para ello se ensayaron diferentes mezclas de etanol en cloroformo. De esta manera se consiguió aumentar el rendimiento de la extracción hasta alcanzar valores próximos al 100 %, para la mezcla al 13 % (v/v) de etanol en cloroformo. El hecho de que un aumento de la polaridad facilite la extracción se debe probablemente a la naturaleza polar/apolar del par iónico que es el succinato de doxilamina.

Por otra parte, el estudio del efecto de la agitación sobre el rendimiento de la extracción mostró que era innecesario cualquier tipo de agitación para conseguir la extracción completa del analito empleando la mezcla al 13 % (v/v) de etanol en cloroformo. Este hecho sugirió la posibilidad de adaptar posteriormente el método FTIR en modo *batch* al modo con extracción en línea.

Para establecer condiciones de medida más adecuadas se estudió el efecto de la resolución nominal y del número de *scans* acumulados por cada espectro. Ambos estudios se llevaron a cabo tanto para un patrón como para una muestra tratada con cloroformo conteniendo un 13 % de etanol. Se seleccionó finalmente una resolución de 8 cm⁻¹ y 10 *scans* acumulados al ofrecer estas condiciones el mejor compromiso entre sensibilidad, precisión y rapidez en la medida.

Finalmente se aplicó el método FTIR en modo *batch* al análisis de muestras y se compararon los resultados obtenidos con los del método de referencia. Ambos métodos resultaron ser comparables. Por otro lado, los estudios de recuperación realizados demostraron la exactitud del método FTIR, al encontrarse recuperaciones alrededor del 100 % en todos los casos. En consecuencia, se decidió dar un paso más y adaptar el método desarrollado para lograr la extracción y determinación en línea del succinato de doxilamina, con el objetivo de reducir el tiempo de análisis y la manipulación de las muestras.

En la figura 43 se muestra el esquema del montaje experimental diseñado para la extracción y determinación en línea del succinato de doxilamina. Veremos a continuación el funcionamiento de este sistema.

El cartucho contenido 50 mg de la muestra se inserta en el bucle de extracción y, manteniendo la válvula de inyección en posición de carga y la válvula direccional de 3 vías en posición abierta, se carga el bucle del disolvente de extracción con la mezcla de 2.6 mL de etanol en cloroformo al 13 % (v/v). A continuación se inserta el disolvente en el cartucho conectando la válvula direccional de 3 vías y dejándola cerrada, mientras la válvula de 6 vías se coloca en posición de carga del cartucho, registrando el *background* del disolvente en

ese momento. Después se coloca nuevamente la válvula de 6 vías en posición de extracción (equivalente a la de carga del bucle de disolvente) y se registran los espectros en modo continuo en función del tiempo en el intervalo de 4000 a 600 cm⁻¹ obteniendo el registro de la señal frente al tiempo correspondiente al área de los espectros comprendida entre 1730 y 1710 cm⁻¹, corregida con una línea base establecida entre 2000 y 1800 cm⁻¹.

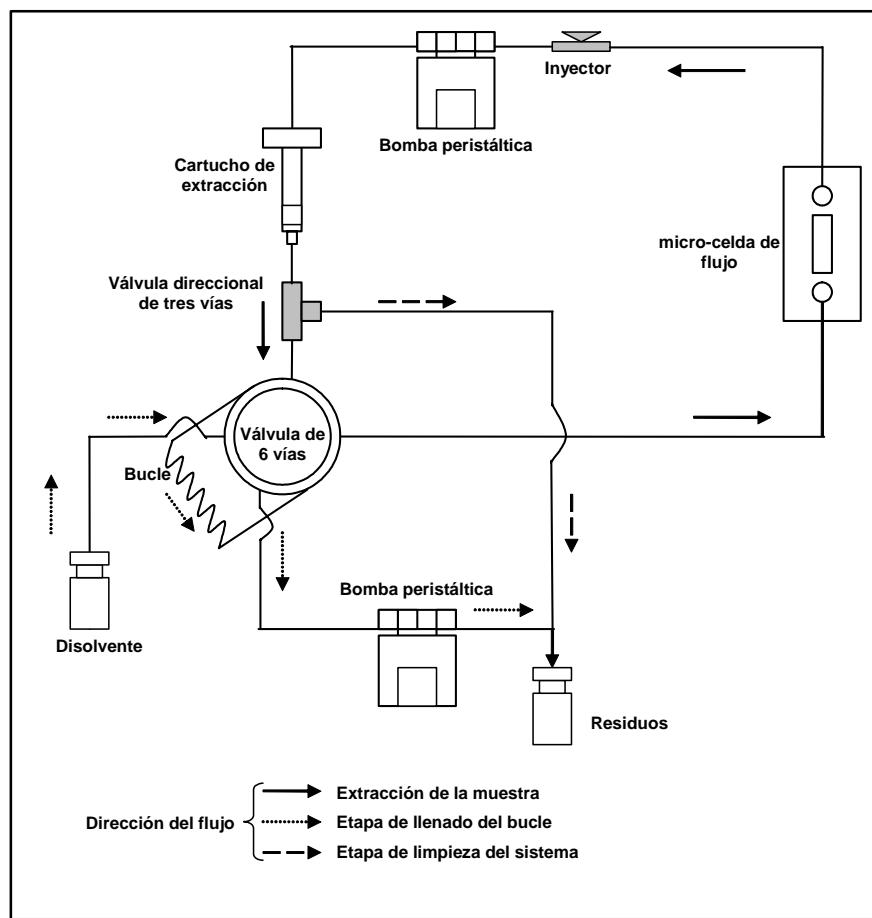


Figura 43. Esquema del montaje para la extracción y determinación en línea de succinato de doxilamina.

En este sistema, el disolvente recircula a través de la celda de flujo y la muestra mientras se lleva a cabo la extracción. Por tanto es posible verificar la consecución completa de la extracción en continuo. El calibrado externo se puede preparar mediante inyecciones

sucesivas de 25 μL de una disolución patrón de 50 mg mL^{-1} de succinato de doxilamina en el mismo montaje descrito para la extracción en continuo pero con el cartucho vacío.

El tratamiento en línea de la muestra supone que el analito sea extraído a medida que el disolvente atraviesa el sistema. Como ya se ha indicado, la variación de la concentración se verifica a partir del registro continuo de los espectros FTIR. Conforme el disolvente recircula por el circuito cerrado atravesando el cartucho que contiene la muestra, la señal registrada se aproxima a un valor constante, valor que se supone correspondiente al estado estacionario. En tal estado estacionario, no sólo se ha extraído la totalidad del analito y por tanto se encuentra éste en disolución, sino que también su concentración a lo largo del sistema se hace constante. La primera fracción que atraviesa la muestra extrae el analito en gran proporción y por tanto la concentración de la disolución es máxima en el frente del disolvente. Las siguientes fracciones contienen cada vez una menor proporción de analito, por lo que la concentración en un diferencial de volumen es cada vez más pequeña. Cuando todo el volumen ha atravesado el sistema, vuelve a aumentar la concentración detectada por el espectrómetro y así sucesivamente, dando como resultado una curva de tipo sinusoidal cuya amplitud va disminuyendo con el tiempo a medida que la disolución se homogeniza. Esta homogenización depende fundamentalmente del caudal de recirculación utilizado y de las características físicas del montaje experimental (diámetro y longitud de los tubos) y es la que va a determinar el tiempo necesario para que se alcance el estado estacionario. En la Figura 44 se muestra un ejemplo del registro de la señal frente al tiempo para la extracción en continuo de una muestra, en el que se señala el periodo de recirculación (tiempo en el que el disolvente atraviesa el sistema todo el volumen de disolución).

Se realizaron los estudios correspondientes del efecto del caudal de recirculación (8.5 mL min^{-1}) y del número de *scans* acumulados (4) por cada punto del *chemigrama*, con el objeto de llevar a cabo el análisis con la mayor rapidez y precisión posibles. El periodo de recirculación resultó ser de 0.3 min en estas condiciones, lo que permitía alcanzar el estado estacionario en pocos minutos gracias a la homogeneización que sufre la disolución mientras circula por el sistema.

En este punto se decidió aplicar la estrategia de co-adición de espectros para reducir todavía más el tiempo de análisis. A partir del registro en función del tiempo es posible co-adicionar un número de espectros consecutivos para obtener un espectro promedio que, entre otros detalles, se caracterizará por tener una mejor relación señal/ruido debido a la disminución de este último. En la Figura 44 se describe este proceso.

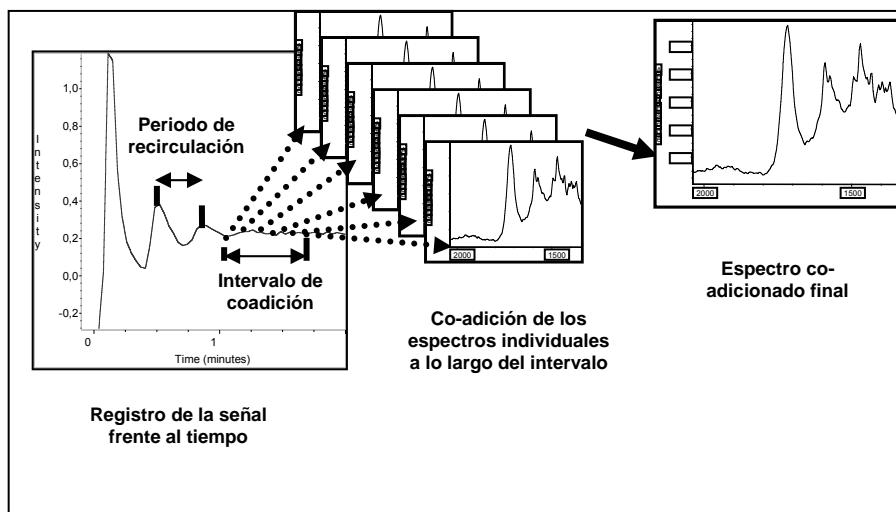


Figura 44. Registro de la señal frente al tiempo para la extracción en continuo de una muestra donde se indica el periodo de recirculación y se describe el proceso de co-adición de espectros FTIR.

La co-adición de espectros resulta evidente cuando tenemos una señal constante, como sería el caso de encontrarse en el estado estacionario; sin embargo cuando tenemos una señal variable, como es el caso del proceso de extracción/homogeneización en línea que se propone en este trabajo, al promediar un mayor o menor número de espectros FTIR del registro se pueden obtener espectros promedio totalmente diferentes en cuanto a intensidades de las bandas de absorción. Con el fin de seleccionar las condiciones de co-adición que permitían llevar a cabo el análisis con mayor rapidez y exactitud, se procedió a la realización de los estudios del tiempo inicial e intervalo de co-adición correspondientes. Estos resultados se muestran en la Figura 45. Se encontró que fijando un tiempo de co-adición igual a 9 veces el espaciado de datos del registro continuo de los espectros FTIR, se logran diferencias menores de un 1 % respecto de la concentración medida en el estado

estacionario a tiempos superiores a 1.7 min. Así pues se recomendó este intervalo de co-adición para la determinación del succinato de doxilamina en línea.

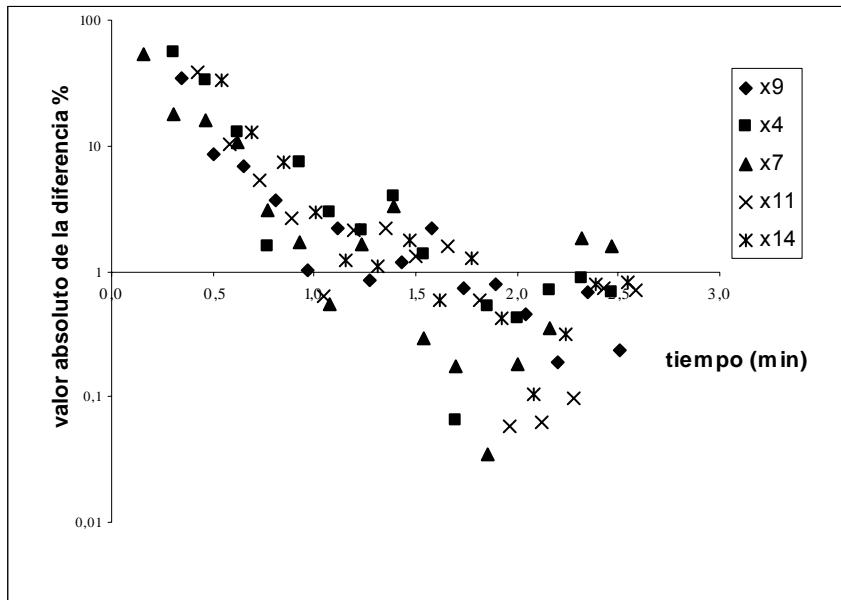


Figura 45. Valor absoluto de la diferencia relativa obtenida al comparar el área medida bajo diferentes condiciones de co-adición con la correspondiente al estado estacionario en función del inicio de la co-adición. Como origen de tiempos se ha considerado el inicio de la extracción. x4, x7, x9, x11 y x14 corresponden a cada intervalo de co-adición equivalente al número de veces del espaciado de los datos experimentales del registro continuo, que son respectivamente el 44, 78, 100, 122 y 156 % del periodo de recirculación del disolvente en el circuito de extracción. Nota: el eje de ordenadas está representado en escala logarítmica.

Finalmente se aplicó el método FTIR con extracción en línea al análisis de muestras y se compararon los resultados con el método FTIR en modo *batch* y el método de referencia. En la Tabla 11 se resumen estos resultados.

Se encontró que el uso de la adición estándar en el método con extracción en línea mejoraba los resultados respecto de los obtenidos mediante calibrado externo en línea. Se dedujo que esta mejora se debía a que la adición estándar permite compensar los posibles efectos negativos producidos por el arrastre de excipientes durante el proceso de extracción en línea. En la adición estándar se inyectan sucesivamente alícuotas de 25 µL de disolución

patrón en la disolución mientras ésta recircula a través del sistema. En la Figura 46 se muestra un ejemplo de adición estándar en línea.

Método	Succinato de doxilamina (mg/tableta)
FTIR batch	24.8 ± 0.5
FTIR en línea calibrado externo	23.6 ± 0.4
FTIR en línea adición estándar	25.19 ± 0.05
UV-vis de referencia	25.2 ± 0.7

Tabla 11. Resultados medios obtenidos con los métodos FTIR en *batch* y en línea desarrollados y por el método espectrofotométrico utilizado como referencia.

Por tanto, se consideró recomendable el uso de la adición estándar para la determinación del succinato de doxilamina mediante el método FTIR con extracción en línea, no siendo necesaria en el caso del método FTIR en modo *batch*. El nuevo método FTIR con extracción en línea desarrollado en este trabajo permite el análisis de 10 muestras en una hora y consume 2.6 mL de la mezcla de etanol y cloroformo al 13 % por cada réplica realizada.

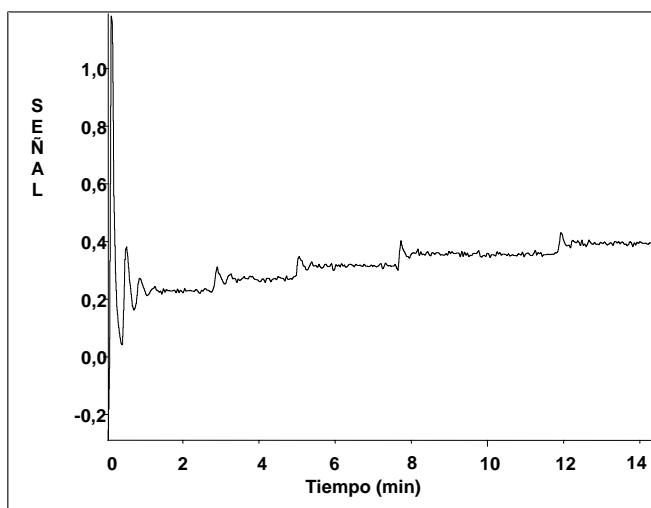


Figura 46. Registro de la señal frente al tiempo (área entre 1700 y 1730 cm⁻¹) corregida con una línea base establecida entre 2000 y 1800 cm⁻¹) obtenida para la determinación de succinato de doxilamina mediante adición estándar.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto a punto en primer lugar un método de análisis FTIR en modo *batch* para la determinación del fármaco succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas. En segundo lugar, y a partir del método en *batch*, se ha desarrollado un método FTIR con extracción en línea. Con ello se ha conseguido una reducción del consumo de disolvente clorado y se ha minimizado la manipulación de la muestra. La aplicación de la co-adición de espectros ha permitido reducir el tiempo de análisis y mejorar la precisión.



Capítulo IV

Resultados

IV. Resultados

1. Análisis directo por ATR-FTIR con celda de diamante: determinación de NTA en detergentes

**Attenuated total reflectance infrared determination of sodium
nitrilotriacetate in alkaline liquid detergents**

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues

Talanta 70 (2006) 870–875



Available online at www.sciencedirect.com



Talanta 70 (2006) 870–875

Talanta

www.elsevier.com/locate/talanta

Attenuated total reflectance infrared determination of sodium nitrilotriacetate in alkaline liquid detergents

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues*

Department of Analytical Chemistry, Universitat de València, Edifici Jeroni Müoz, 50 Doctor Moliner St., 46100 Burjassot, València, Spain

Received 22 September 2005; received in revised form 20 January 2006; accepted 7 February 2006

Available online 23 March 2006

Abstract

An attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) method has been developed for the direct determination of the chelating agent sodium nitrilotriacetate (NTA) in high pH cleaning formulations. Aqueous samples and standards were placed directly on the diamond ATR cell without any pre-treatment and FTIR spectra were recorded between 4000 and 600 cm⁻¹. Measurement conditions were evaluated. Results obtained for five different commercial formulations containing from 6.22 to 9.25% (w/w) of NTA were in good agreement with the manufacturer's declared content (differences between 3.2 and -3.7%). Recovery studies evidenced the accuracy of the developed method, having found values between 98.4 and 102.4%. The developed procedure provides an excellent throughput of 50 independent determinations per hour, and each measurement required only less than 0.2 ml of sample or standard.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diamond ATR-FTIR; Detergents; Sodium nitrilotriacetate; Quantitative analysis

1. Introduction

Quality control of industrial products requires faster, simpler and cheaper methods day by day. Frequently, the objective of the analysis is the verification of a correct manufacturing process, concerning the proportions of the chemicals which constitute the product or information about its homogeneity. So, it is necessary to develop robust analytical techniques applicable for a big number of samples of different types, from aqueous to organic nature and working from the mildest conditions to the most corrosive ones.

Detergents commercialized for hand use are normally neutral or slightly acid in order to protect human skin. However, a lot of household and industrial cleaning formulations have a high pH, being highly corrosive for skin and for laboratory instrumentation [1].

Classical attenuated total reflectance (ATR) cells coupled with Fourier transform infrared (FTIR) spectrometers allow to obtain the infrared spectra of aqueous samples. However, these cells usually employ ZnSe, ZnS or KRS-5 crystals, which were

attacked by strong acid, alkaline solutions or oxidizing agents. Ge is also a typical material for ATR crystals more resistant than those previously indicated but it has high reflection losses due to its refractive index. Diamond ATR cells have a thin polished diamond mounted on the surface of a ZnSe crystal (or other similar materials), protecting it from scratching and from corrosion by chemicals. So, with this material it is possible to obtain ATR-FTIR spectra of strong acid, alkaline or oxidizing solutions or abrasive liquids without damaging the ATR cell [2]. In recent years, ATR-FTIR applications with diamond cells have been expanded, with applications such as the on-line determination of glucose and poly (beta-hydroxybutyric acid) in *Escherichia coli* [3], pesticide screening in aqueous samples [4], bacteria spectroscopic discrimination [5], determination of alkaloids in poppy products [6], glucose determination in dried-down nanolitre samples [7], study of metabolic intermediates [8], and the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wine, coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) [9], but none of these applications involves the use of aggressive media and thus the main reason for the use of diamond ATR is absent.

Sodium nitrilotriacetate (NTA) is a chelating agent widely used in detergent formulations for avoiding the precipitation of salts during the washing process [10]. It is highly nocive

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 31 58; fax: +34 96 354 48 38.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

for the aquatic environment and it has been suggested as a possible carcinogen in mammals [11]. Methods for its determination as a total chelons concentration include polarography [12] or capillary electrophoresis [13]. For its direct determination differential-pulse anodic stripping voltammetry [14,15] and HPLC [16] have been proposed. All that methods are time-consuming and laborious, difficult to be coupled on-line and not very appropriate for quality control purposes when a rapid response is required.

The objective of this work is to develop a simple and fast ATR-FTIR method for the direct quantification of NTA in high pH commercial liquid detergents, showing the usefulness of ATR-FTIR measurements in the field of quality control and to evaluate the usefulness of its hypothetic automation in a flow procedure using diamond probe fibers.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Bruker (Bremen, Germany) FT-IR spectrometer, model Tensor 27, equipped with a MIR source, a Ge/KBr beamsplitter and a temperature-stabilized lanthanum doped deuterated triglycine sulfate (DLATGS) detector was employed for obtaining FTIR spectra of aqueous standards and samples between 4000 and 600 cm⁻¹, using a three reflection DuraSamplIR™ Diamond ATR system from Smiths Detection (Warrington, UK).

The OPUS (Version 4.2) software from Bruker was used for controlling spectrometer and for the acquisition of data.

Omnic (Version 6.1) software, used for processing individual spectra, and TQ Analyst software, used for carrying out validation studies, are both from Nicolet (Madison, WI, USA).

A vortex mixer from Velp Scientifica (Milano, Italy) was used for homogenization of samples and standards.

2.2. Reagents and samples

NTA technical grade (92%) was supplied from BASF (Ludwigshafen, Germany) and aqueous standards from 2.56 to 19.60% (w/v) were prepared by dilution with nanopure water, obtained from a Milli-Q water purifier system (Millipore, Bedford, MA).

Samples of five different commercial liquid detergent formulations were obtained from Sanmarino Consorcio (Quart, Valencia, Spain). Table 1 summarizes the main ingredients and pH of those formulations. A series of laboratory samples were prepared at reduced scale, in the same way than commercial ones to be used as reference samples.

2.3. Proposed ATR-FTIR procedure

A drop of sample or standard was placed onto the surface of the diamond-ATR cell of the FTIR spectrometer. ATR-FTIR spectra were recorded between 4000 and 600 cm⁻¹ with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating 50 scans per spectrum. In these conditions an acquisition time of 23.5 s was required for each measurement. The surface of the diamond cell

Table 1
Chemical composition of the commercial liquid detergent formulations analysed in this work

Formulation	pH	Major components
F1	11.4	NTA, methyl ammonium alkyl sulfate, tri phosphate
F2	11.8	NTA, alpha-olefin sulfonate, tri phosphate, hydroxide
F3	11.5	NTA, tri phosphate, tripolyphosphate
F4	11.6	NTA, alpha-olefin sulfonate, alkyl sulfonate, polyglycoether, metasilicate
F5	11.0	NTA, polyglycoether, alpha-olefin sulfonate, tri phosphate

Ingredients are listed by relative percentage (w/w) respect to the corresponding technical raw material. The main ingredient for all formulations was distilled water.

was cleaned with water and dried with soft paper between measurement of different samples or standards. The measurement of the water reference spectrum was acquired in the same conditions.

As measurement criterion it was selected the peak area values between 1604.5 and 1546.6 cm⁻¹, corrected with a two-point baseline established between 1743.3 and 1365.4 cm⁻¹.

NTA concentration was obtained by interpolating peak area values of samples in a calibration line established from six standard aqueous solutions containing between 0.00 and 19.60% (w/v) and measured in the same experimental conditions.

3. Results and discussion

3.1. ATR-FTIR spectra of NTA and samples

Fig. 1 shows the ATR-FTIR spectra of NTA standards ranging from 2.56 to 19.60% (w/v) in front of the water blank. As can be seen, the main NTA bands appeared in the fingerprint region. The strongest bands of the NTA at 1576 and at 1405.1 cm⁻¹ correspond to the asymmetric and symmetric stretching of the carboxylate group, respectively. A series of small bands appeared at 1332.2 cm⁻¹, 1265 cm⁻¹ (C—N stretching) and 1143.9 cm⁻¹ (C—O stretching) [17]. High background values are evident at 2000 cm⁻¹, due to the diamond absorption. However, in the fin-

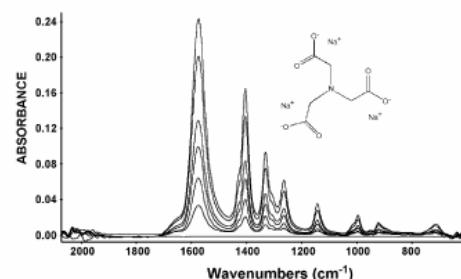


Fig. 1. ATR-FTIR spectra of NTA standards in water, ranging from 2.57 to 19.60% (w/v). Measurement conditions: 8 cm⁻¹ of nominal resolution, 50 accumulated scans per spectrum, water background spectrum was used.

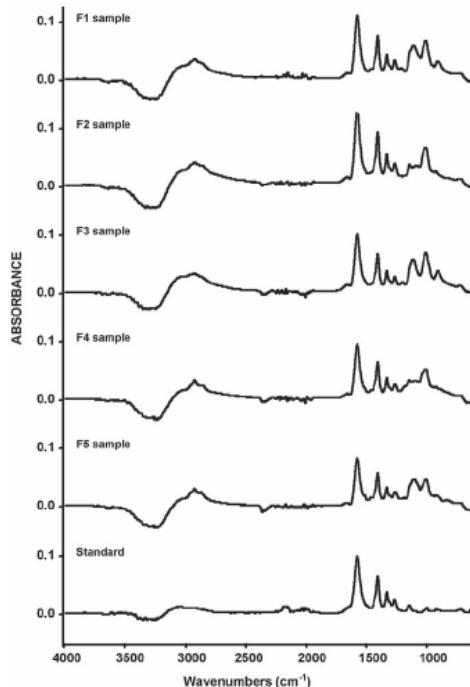


Fig. 2. ATR-FTIR spectra of a 7.81% (w/v) NTA standard and different commercial liquid detergent formulations. Measurement conditions: 8 cm^{-1} of nominal resolution, 50 accumulated scans per spectrum, background from water.

gerprint region, the water baseline is stable, allowing to use this zone for NTA determination.

Fig. 2 shows the spectra of the five commercial formulations investigated in this work compared with a 7.81% (w/v) NTA standard. All formulations have clear differences with NTA spectrum, except for the most intense bands at 1576 and 1405.1 cm^{-1} , which seems not be affected by other ingredients present in the products. So, it was reasonable the use of these two bands for the quantification of NTA in liquid detergent formulations. The ATR-FTIR absorbance spectra of the principal ingredients of each formulation were recorded (spectra not shown) for evaluating the possible spectral interferences in the NTA determination. Finally, the two carboxylate stretching bands were selected for carrying out future studies due to the absence of significant band overlapping.

3.2. Study and selection of the experimental measurement conditions

The effect of both, the number of scans and the nominal resolution, on the absorbance values of samples and standards were

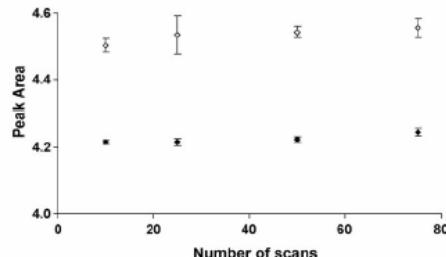


Fig. 3. Effect of the number of accumulated scans per spectrum on the absorbance peak area between 1604.5 and 1546.6 cm^{-1} (corrected with a baseline established between 1743.3 and 1365.4 cm^{-1}), for a 7.81% (w/v) NTA standard (●) and for the F1 reference sample (○). Results are expressed as mean value \pm standard deviation for three independent replicates. Nominal resolution was 8 cm^{-1} .

studied in terms of sensitivity and precision. Fig. 3 shows the effect of accumulated scans on peak area values obtained for sample F1 and a 7.81% (w/v) NTA standard for a fixed nominal resolution of 8 cm^{-1} . As can be seen, the mean absorbance values were not affected by the number of accumulated scans but this parameter affects the repeatability, especially for sample measurement. A value of 50 scans was selected, that provide a good signal-to-noise ratio, a precision better than 0.4% and an acquisition time of 23.5 s.

The nominal resolution had a clear and critical influence on the peak average area and precision, as can be seen in Fig. 4, specially for low resolution values. The use of a spectral resolution of 2 cm^{-1} provides the highest peak area signal but the spectral noise found in these conditions provides a loss of spectral repeatability. Absolute signal values obtained for 8 and 16 cm^{-1} are similar but the use of the last one had a lack of spectral information. Sampling throughput also is affected by the nominal resolution and, in this sense, as a compromise between sensitivity, precision and measurement frequency a nominal resolution of 8 cm^{-1} was selected for subsequent studies.

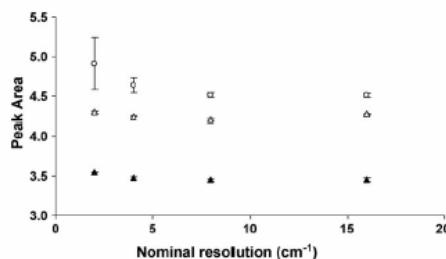


Fig. 4. Effect of the nominal resolution on the peak area, for a 7.81% (w/v) NTA standard (Δ), reference sample F5 (▲) and for sample F1 (○). Results are expressed as mean value \pm standard deviation obtained from three independent replicates. Number of scans 50 and peak area values calculated as indicated in Fig. 3.

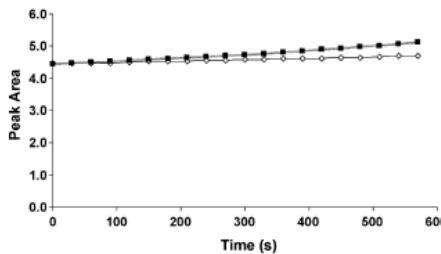


Fig. 5. Effect of the residence time of the liquid sample in the diamond ATR cell on the peak area values, for sample F1, using metallic ring (○) and without it (■). Each measurement was obtained accumulating 25 scans with a nominal resolution of 8 cm^{-1} . Peak area measurement conditions as indicated in Fig. 3.

One of the most important limitations in ATR-FTIR spectrometry is the difficulty of cleaning the ZnSe crystal surface, for ensuring the absence of cross contamination. Diamond-ATR cells allow us to make easier this process. In this sense, scratching of cell surface is avoided due to the diamond hardness.

On the other hand, as the cell surface is plain and the liquid to analyse has a reduced surface tension, it spreads over it, becoming a liquid microfilm, with the subsequent increased evaporation of solvent and changes in the analyte concentration, which is the case of working with liquid detergents usually. Diamond-ATR accessories include a metallic ring to minimize this effect. However, its use complicates the cleaning process. So, it was studied the variations of the peak area as a function of the sample residence time, comparing both approaches (with ring and without ring) for standards and samples. Fig. 5 shows the results of this study. The increase of absorbance, due to the loss of water from the cell surface, is small when using the metallic ring, whereas the increase is notable if the ring is not used due to the evaporation of the solvent. For a measuring time smaller than 100 s, there are no significant differences between both approaches. So, as 50 scans were accumulated in less than 50 s for a nominal resolution of 8 cm^{-1} , it was decided not to use the ring in order to reduce sampling time and facilitate the cleaning step between measurements.

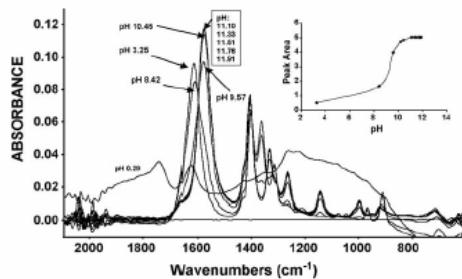


Fig. 6. Effect of pH on peak area values for a 10% (w/v) NTA standard. Each measurement was obtained accumulating 50 scans with a nominal resolution of 8 cm^{-1} . (Inset) Plot of the peak area values between 1604.5 and 1546.6 cm^{-1} (corrected with a baseline established between 1743.3 and 1365.4 cm^{-1}) vs. pH.

3.3. Selection of measurement criteria

Different measurement criteria (peak area, peak height and baseline correction) were evaluated for the direct determination of NTA in detergent formulations using an external calibration. Table 2 shows the main analytical features obtained for different measurement criteria. As can be seen, it has been obtained an excellent correlation for all NTA calibrations ($R^2 \geq 0.9997$), using both, peak height or peak area, corrected with different baselines. The best sensitivity was obtained for the peak area between 1643.3 and 1491.3 cm^{-1} corrected with a baseline established between 1805.3 and 1365.6 cm^{-1} . In all cases the repeatability was better than 0.5% and limits of detection between 0.015 and 0.037% (w/v) were obtained, which are adequate for the determination of NTA in this type of samples. However, it was necessary to carry out validation studies with reference samples, in order to select the adequate criterion which avoids interferences from the presence of other ingredients in the liquid detergent formulations.

It was selected the peak area between 1604.5 and 1546.6 cm^{-1} , corrected with a baseline established between 1743.3 and 1365.3 cm^{-1} , as the measurement condition that provides the lowest errors in the analysis of reference samples.

On the other hand, it must be noticed that the protonation of the carboxylate groups present in NTA has a dramatic effect on the peak area, as can be seen in Fig. 6. It is due to the shift

Table 2
Analytical features of the ATR-FTIR determination of NTA using different bands and measurement modes

Measurement mode	Wavenumber (cm^{-1})	Baseline correction	Calibration curve $y = a + bC_{\text{NTA}}\text{ % (w/v)}$	R.S.D. ^a (%)		LOD ^b % (w/v)	
				$a \pm s_a$	$b \pm s_b$		
Height	1406	1743.3–1365.6	-0.0008 ± 0.0002	0.00721 ± 0.00002	0.9997	0.42	0.020
Height	1574	1743.3–1365.6	0.0010 ± 0.0004	0.01171 ± 0.00004	0.9998	0.32	0.017
Area	1604.5–1546.6	1743.3–1465.8	0.044 ± 0.017	0.5186 ± 0.0017	0.9997	0.45	0.032
Area	1438.8–1377.1	1743.3–1365.4	-0.021 ± 0.006	0.2278 ± 0.0006	0.9998	0.24	0.023
Area	1643.3–1491.3	1805.3–1365.6	0.06 ± 0.03	0.713 ± 0.003	0.9997	0.26	0.037
Area	1604.5–1546.6	1743.3–1365.3	0.044 ± 0.017	0.5250 ± 0.0017	0.9997	0.33	0.015

^a Relative standard deviation for a standard solution containing 7.81% (w/v) ($n=3$).

^b Limit of detection established from the standard deviation of 10 blank measurements ($k=3$, a probability level of 99.6%).

of carboxylate bands and that of baseline points. However, in the 11.0–12.0 pH value, that corresponding with the studied samples, the peak area value is constant. So it is unnecessary to do any sample treatment nor to match the pH of standards which is approximately 11.1 for the concentration range assayed.

3.4. Analysis of samples by external calibration and recovery studies

Table 3 summarizes the results obtained for the determination of NTA in commercial liquid detergent formulations, also including reference samples prepared at laboratory scale, to verify the absence of errors. Accuracy error was under 1% for the formulations F1, F2 and F4 as compared with the manufacturer data. For formulation F3 it was found a 1.84% error. However, the determination of NTA in formulation F5 had a relative error of –3.6%. As quality control required a 5% tolerance for this product, it was concluded that the developed method was suitable for our purpose. Moreover, it is observed that there was a small variation coefficient (CV) between samples of the same formulation.

The precision obtained, expressed as the variation coefficient was between 0.5 and 2%.

The accuracy of the ATR–FTIR determination of NTA was also evaluated through recovery studies. **Table 4** summarizes the results obtained for all reference samples spiked at 70–200 mg level. For this study, in order to avoid the formation of instable

Table 3
Analysis of commercial liquid detergent formulations by ATR–FTIR using external calibration

Sample ^a	% NTA (w/w) ^b		Error (%)
	Reference value	ATR–FTIR	
F1 batch 1	7.95	7.90 ± 0.03	–0.7
F1 batch 2	7.95	8.12 ± 0.01	2.2
F1 laboratory	7.95	7.95 ± 0.03	0.0
F2 batch 1	9.25	9.37 ± 0.03	1.3
F2 batch 2	9.25	9.38 ± 0.05	1.4
F2 batch 3	9.25	9.45 ± 0.03	2.1
F2 laboratory	9.25	9.33 ± 0.01	0.9
F3 batch 1	7.07	7.24 ± 0.03	2.4
F3 batch 2	7.07	7.30 ± 0.02	3.2
F3 laboratory	7.07	7.20 ± 0.05	1.8
F4 batch 1	6.80	6.99 ± 0.08	2.8
F4 batch 2	6.80	6.80 ± 0.004	0.0
F4 laboratory	6.80	6.87 ± 0.02	1.0
F5 batch 1	6.22	6.09 ± 0.02	–2.1
F5 batch 2	6.22	5.99 ± 0.02	–3.7
F5 batch 3	6.22	6.08 ± 0.03	–2.1
F5 laboratory	6.22	5.99 ± 0.01	–3.6

Measurement conditions: peak area between 1604.5 and 1546.6 cm^{–1} (baseline 1743.3–1365.3 cm^{–1}).

^a Reference samples were prepared at laboratory scale, in front of commercial samples which were prepared at industrial scale.

^b Percentage in (w/w) was obtained from the concentration in terms of (w/v) obtained by interpolating sample peak area in the calibration line also considering the sample density. Results are expressed as mean value ± standard deviation of three independent replicates.

Table 4
Recovery studies for samples diluted and spiked with different amounts of NTA

Sample	NTA mass added (mg)	Individual recovery (% ± s)	Mean recovery (% ± s)
F1 laboratory	72.4	101.8 ± 0.1	101.8 ± 0.6
	136.5	102.4 ± 0.6	
	183.4	101.2 ± 0.2	
F2 laboratory	114.3	100.2 ± 0.2	99.7 ± 0.4
	169.2	99.5 ± 0.2	
	223.1	99.5 ± 0.3	
F3 laboratory	89.1	101.1 ± 0.4	101.4 ± 0.7
	125.7	102.2 ± 0.1	
	173.6	101.0 ± 0.4	
F4 laboratory	87.4	102.04 ± 0.06	102.0 ± 1.0
	123.1	102.03 ± 0.08	
	157.7	100.4 ± 0.2	
F5 laboratory	71.2	101.8 ± 0.3	99.7 ± 1.8
	120.6	98.8 ± 0.2	
	162.9	98.4 ± 0.3	

Results are expressed as mean value ± standard deviation for three independent replicates. Measurement conditions: as indicated in **Table 3**.

emulsions or the precipitation of some ingredients, samples were diluted before the addition of NTA. As can be seen, all recoveries were near to 100%, showing the accuracy of the ATR–FTIR developed method.

In addition, there were prepared some different spiked samples from commercial formulations (F1, F2) by adding very small amounts of analyte being obtained recoveries around 100% (results not shown).

3.5. Analysis of samples by standard addition

The standard addition method was tested in order to investigate possible matrix effects, specially for formulation F5 which has a Youden blank clearly different to 0. In this study, we added different quantities of NTA to a previously diluted aliquot of sample and recorded the FTIR spectra in the selected conditions.

From peak area values, we established a relation between the corrected signal and the added NTA, taking into consideration the density of sample and standard added. For sample F5 the equation obtained for the standard addition was corrected signal = (0.0339 ± 0.0005) + (0.511 ± 0.005)C, being C the NTA added, with an $R^2 = 0.9989$. The content obtained by this standard addition approach was 6.34 ± 0.14% (w/w) (reference value of 6.22 (w/w)), being the relative error of 1.9% instead –3.6% obtained for external calibration.

In conclusion, for the analysis of sample F5 could be recommended the use of the standard addition method instead the external calibration in order to avoid the matrix effects and obtain accurate results.

4. Conclusion

The developed method, based on the direct measurement of alkaline samples by using diamond ATR, provides accurate

and precise results in the analysis of commercial cleaning formulations using an external calibration and has an excellent throughput of 50 replicates h^{-1} , with a sample consumption of less than 0.2 mL per three independent replicates. These features are in good agreement with the quality control analysis exigencies, being remarkably the low LOD achieved of 0.015% (w/w), adequate for its use in the analysis of cleaning formulations. Automation of the developed method would be possible through the use of diamond-ATR probes, inserted directly in the product.

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) and Universitat de Valencia (Project UV-AE-20050203).

References

- [1] U. Zoller, G. Broze (Eds.), *Handbook of Detergents: Properties*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.
- [2] J. Coates, J. Sanders, *Spectrosc. Eu.* 12 (2000) 12.
- [3] G. Janute, A. Kainz, G. Schroll, J.R. Baena, B. Lendl, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6353.
- [4] A. Colume, J. Diewok, B. Lendl, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 835.
- [5] C.L. Winder, R. Goodacre, *Analyst* 129 (2004) 1118.
- [6] H. Schulz, M. Baranska, R. Quilitzsch, W. Schuetze, *Analyst* 129 (2004) 917.
- [7] E. Diessel, S. Willmann, P. Kamphaus, R. Kurte, U. Damm, H.M. Heise, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 442.
- [8] K. Nakanishi, A. Hashimoto, T. Pan, M. Kanou, T. Kameoka, *Appl. Spectrosc.* 57 (2003) 1510.
- [9] A. Edelmann, J. Diewok, J. Rodriguez-Baena, B. Lendl, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 92.
- [10] T.P. Knepper, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 708.
- [11] <http://www.cdc.gov/niosh/ipsneng/neng1239.html>.
- [12] S. Esser, B.W. Wenclawiak, H. Gabelmann, *Fresen. J. Anal. Chem.* 368 (2000) 250.
- [13] G. Owens, V.K. Ferguson, M.J. McLaughlin, I. Singleton, R.J. Reid, F.A. Smith, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 885.
- [14] A. Voulgaropoulos, N. Tzivanakis, *Electroanalysis* 4 (1992) 647.
- [15] P. Schoen, K.H. Bauer, V. Wiskamp, *Fresen. J. Anal. Chem.* 358 (1997) 699.
- [16] R. Geske, M. Zehringer, *Fresen. J. Anal. Chem.* 357 (1997) 773.
- [17] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, London, 1991.

2. Desarrollo de métodos de análisis por espectrometría vibracional con multiconmutación

2.1. Determinación ATR-FTIR de α -olefinsulfonato sódico: sistemas con multiconmutación y medidas en modo *stopped-flow*

Multicommunication ATR-FTIR: determination of sodium alpha-olefin sulfonate in detergent formulations

Josep Francesc Ventura-Gayete, Boaventura F. Reis, Salvador Garrigues, Ángel Morales-Rubio, Miguel de la Guardia

Microchemical Journal 78 (2004) 47– 54



Multicommutation ATR-FTIR: determination of sodium alpha-olefin sulfonate in detergent formulations

Josep Francesc Ventura-Gayete^a, Boaventura F. Reis^b, Salvador Garrigues^a,
Ángel Morales-Rubio^a, Miguel de la Guardia^{a,*}

^aDepartamento de Química Analítica, Research Building, Universitat de València, 50 Dr. Moliner St., 46100 Burjassot, València, Spain

^bCentro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Avenida Centenário 303, Piracicaba 13400-970, SP, Brazil

Accepted 11 March 2004

Available online 10 May 2004

Abstract

The mechanization of attenuated total reflectance measurements (ATR) in Fourier Transform Infrared spectrometry (FTIR) through the use of multicommutation has been evaluated in order to reduce the sample consumption and waste generation also avoiding risks of cells breaking. A new multicommutation ATR-FTIR procedure has been proposed for the determination of sodium alpha-olefin sulfonate (AOS) in liquid detergent formulations. The main advantages of this method are the low consumption of sample (96 ml per 100 determinations) and the analytical throughput (23 h⁻¹ versus 15 h⁻¹ for the manual mode). Results obtained for reference samples containing 7.52% to 9.52% (w/w) of AOS are in the 0.5% (w/w) error range, with a mean precision of 0.3% RSD. Recovery studies evidence the accuracy of the method, with average values around 100%. It was evaluated the possibilities of ATR-FTIR analysis of different types of liquid samples like beer, orange juice, milk and olive oil, showing the great versatility and applications of this approach to improve sample introduction and cell cleaning.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multicommutation; Detergent analysis; Sodium alpha-olefin sulfonate determination; Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy

1. Introduction

Since the middle of nineties, multicommutation has become a powerful tool in flow analysis, presenting great advantages with its versatility, easiness of automation, and the possibility of minimizing reagents and sample consumption and waste generation. This flow analysis strategy, developed in Brazil, allows the modification of the system directly in a real-time scale, versus classical flow analysis which needs manifold reconfiguration in most of cases [1]. On the other hand, it has been evidenced that multicommutation reduces sample handling, and it is useful for carrying out on-line dilutions [2].

Sensitivity of flow analytical procedures can be improved by increasing residence times, and thus, in this sense, multicommutation provides the potentiation of the stopped-flow approach [3].

In recent years, different procedures based on multicommutation have been developed. Typical techniques improved by using multicommutation are UV-Vis spectrometry [4,5], turbidimetry [6], potentiometry [7], fluorimetry [8] and atomic fluorescence [9]. Until now, no references of multicommutation coupled with vibrational techniques appear in the bibliography.

Nowadays, Fourier Transform Infrared spectrometry (FTIR) combined with flow-analysis presents interesting applications that are increasing [10,11], but in general involves the use of relatively high volumes of samples and standards and provides big volumes of wastes.

Attenuated Total Reflectance (ATR) has been applied to a wide variety of samples in control analysis of raw materials and industrial products [12,13]. The use of ATR cells in FTIR spectrometry allows the direct measurement of aqueous samples.

The use of multicommutation coupled with ATR-FTIR spectrometry could improve the speed of analysis and provide a secure filling and cleaning of the flow-cell with

* Corresponding author. Tel./fax: +34-96-3544838.

E-mail address: miguel.delaguardia@uv.es (M. de la Guardia).

minimum sample handling, sample consumption and waste generation. The main objective of this work has been the development of a simple and fully mechanized procedure for direct ATR-FTIR determination of sodium alpha-olefin sulfonate (AOS), an anionic surfactant widely used in liquid detergent formulations. Moreover, strategies for obtaining ATR-FTIR spectra of different types of samples with the flow system developed are evaluated and compared with the manual mode features.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Magna FT-IR 750 spectrometer from Nicolet (Madison, WI, USA), equipped with a DTGS temperature-stabilised detector, a KBr beam splitter and a benchmark out-of-compartment overhead attenuated total reflectance accessory with a flow-through top-plate fitted with 45° ZnSe 6 reflection crystal from Graseby Specac (Orpington, UK), was used to collect the ATR-FTIR spectra of the different samples analysed. The whole spectra, between 4000 and 600 cm^{-1} , were obtained with an interferometer mirror velocity of 0.6329 cm s^{-1} .

Acquisition and processing of spectra were carried out with the Omnic 1.2 software from Nicolet. A Gilson Minipuls 2 peristaltic pump (Villiers-le Bel, France) with polyvinyl chloride tubes of 0.15-cm i.d. was used to aspirate samples and standards through the ATR flow cell. Flow lines were made of polyethylene (PTFE) tubing (i.d.=0.8 mm).

Four NResearch 161K031 three-way solenoid valves (Stow, MA, USA) and a PC 486 microcomputer connected by the parallel port to a Toshiba ULN2803A chip were

employed for the multicommutation experiments (see Fig. 1 for details of the experimental setup).

2.2. Reagents and samples

Sodium alpha-olefin sulfonate (AOS) technical grade reagent was obtained from Guinama (Valencia, Spain) and standard solutions up to 14.5% (w/w) were prepared in deionized water.

Liquid detergent samples were obtained from Sanmarino Consorcio (Quart, Spain) and the other samples assayed were obtained from the local market and processed without any pretreatment except in the case of beer which was filtered through paper before measurement in order to eliminate the CO_2 gas bubbles.

Reagents employed for cleaning the system after sample measurements were deionized water and an aqueous solution of a commercial detergent from Sanmarino Consorcio (Quart, Spain).

2.3. Flow system setup and recommended procedure for detergent analysis

Fig. 1 shows the experimental setup employed for multicommutation ATR-FTIR determination of AOS in detergents and for the transport of different types of samples in order to obtain the ATR-FTIR spectra. Valve 1 (V_1) was used for introducing alternatively samples and carrier; V_2 was used for introducing standards, or cleaning solutions in the case of milk and oil samples. Insertion of air bubbles was made by using V_3 , which was used to improve the cell cleaning for some samples, but was unnecessary in the case of detergent analysis. V_4 was used to control the flow during the spectra acquisition time for both, samples and standards,

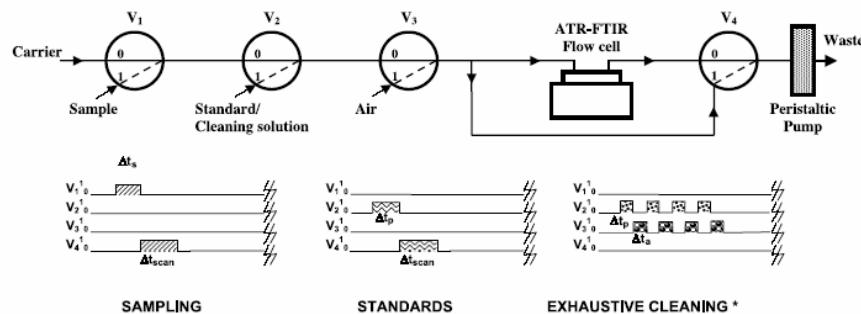


Fig. 1. Multicommutation manifold employed for the determination of AOS by ATR-FTIR spectrometry and sampling pattern. Note: V_1 , V_2 , V_3 and V_4 are three-way solenoid valves. The peristaltic pump was employed for sample aspiration using a flow rate of 1.92 ml min^{-1} . Deionized water was used as carrier stream. Switching on or off the valves permits us to select the aspiration pathways in each valve for 0-bit or 1-bit positions. The manifold was used also for the obtention of ATR-FTIR spectra of beer, orange juice, milk and olive oil samples. In that case, a cleaning detergent solution was introduced through the 1-bit V_2 position. In the bottom of the figure, indicated is the sampling pattern for both samples and standards; in the case of AOS determination, Δt_s being the sample aspiration time, Δt_p the standard aspiration time, Δt_c the carrier aspiration time and Δt_{scan} the scanning time. (*) The V_1 (milk, olive oil, orange juice samples), V_2 (cleaning solution) and V_3 valves were combined as better cleaning efficiency obtained for each sample, by varying the switching on/off pattern.

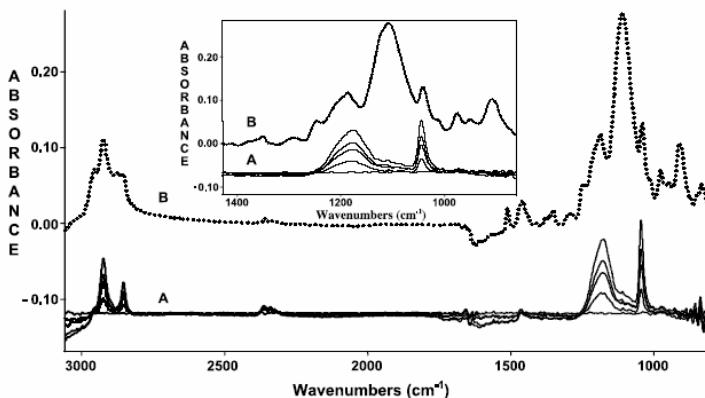


Fig. 2. ATR-FTIR spectra of sulfonate standards (A) and a detergent formulation (B). Inset: Measurement region in which determinations were made. Spectra of the standards were displaced in the y axis in both cases. Instrumental conditions: 100 scans per spectrum for background and samples, 8 cm^{-1} nominal resolution, background from water.

or cleaning solutions. When V_4 was switched off, solutions went directly to waste, and when it was switched on, the sample passed through the ATR flow cell by aspiration and in that moment the flow cell was filled with the corresponding solution and the ATR-FTIR spectra were recorded in the stopped-flow mode. In that way, it was unnecessary to switch off the peristaltic pump during the spectrum acquisition.

In order to fill completely the flow cell with the sample, V_1 was switched on (bit 1) during 30 s. After that V_4 was switched on during the time required for obtaining the ATR-FTIR spectrum (76 s) in the stopped-flow mode using a background of the cell filled with water and V_1 returned to switch-off position (bit 0).

For cleaning the flow cell, V_4 and V_1 valves were switched off, passing water through the cell by aspiration during 50 s. Then the system was ready for the next determination.

The sampling pattern for standards in the stopped-flow mode was the same but in this case the operative valves were V_2 and V_4 .

Fig. 1 indicates the programmed time for sampling pattern being indicated by V_j^i , the i identification of valve and the position j , being $j=0$ and $j=1$ for valve switched off and on, respectively. So Δt_s corresponds to the aspiration time for sample, Δt_p the aspiration time for standards or cleaning solution and Δt_c the flow cell cleaning time. Δt_a corresponds to the air bubble insertion time and Δt_{scan} the scanning time.

The carrier solution flow rate was fixed at 1.92 ml min^{-1} , taking into consideration that the 161K031 solenoid valve support ca 30 psi.

All the software employed and electronic interface for valve control were developed in our laboratory, which can be supplied on request, and the sequence of electronic pulses was generated by the software written in QuickBasic 4.5 which controls the multicommutation system.

2.4. Recommended procedure for data acquisition of different types of samples

The procedure developed for obtaining the ATR-FTIR spectra of different liquid samples (beer, milk powder solution, orange juice and olive oil) varies depending on the type of sample. For beer, cleaning the flow cell with water is enough to recover the background baseline. The orange juice, olive oil and milk powder samples required additional cleaning cycles with a detergent. Additionally, bubbles of air were introduced by switching on valve V_3 to improve the cleaning efficiency. The flow rate was in all cases 1.92 ml min^{-1} .

Table 1
Selected experimental conditions for multicommutation ATR-FTIR determination of sodium alpha-olefin sulfonate (AOS)

Parameter	Value
Number of scans (background and sample)	100
Nominal resolution (cm^{-1})	8
Background mode	water
Measurement mode	Stopped-flow
Zero filling level	2
Apodization	Happ–Genzel
Flow rate (ml min^{-1})	1.92
Sampling time (s)	30
Cleaning time (s)	50

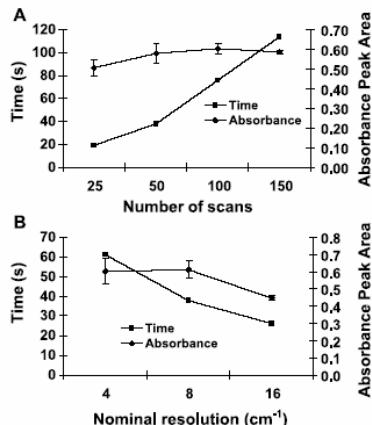


Fig. 3. Effect of instrumental conditions on the absorbance of AOS. (A) Effect of the accumulated scans per spectrum. (B) Effect of the nominal resolution. In both cases, a 7.52% (w/w) AOS formulation was measured using a nominal resolution of 8 cm^{-1} for data in A and 50 accumulated scans in B. All the values correspond to the average \pm standard deviation of three replicates, the measurement criterium absorbance peak area ($1049.1\text{--}1034.6\text{ cm}^{-1}$) being corrected with a two-point baseline (1020.2–995.1).

except for olive oil sampling, in which the viscosity of sample reduces the flow rate to 0.9 ml min^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. ATR-FTIR spectra of the AOS detergent

Fig. 2 shows the stopped-flow ATR-FTIR spectra obtained for a typical detergent sample formulation and

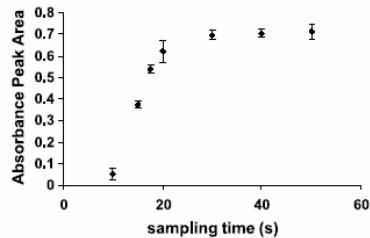


Fig. 4. Effect of the sampling time on the absorbance peak area of a liquid detergent sample containing 8.52% (w/w) of AOS, measured using a nominal resolution of 8 cm^{-1} and 100 accumulated scans. All the values correspond to the average \pm standard deviation of three replicates, the measurement criterium absorbance peak area ($1049.1\text{--}1034.6\text{ cm}^{-1}$) being corrected with a two-point baseline (1020.2–995.1).

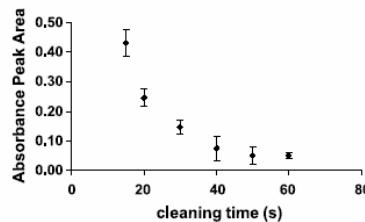


Fig. 5. Effect of the cleaning time on the absorbance peak area obtained for the AOS band after measuring a sample containing 8.52% (w/w) AOS using water as a cleaning carrier. Measurement conditions: the same as in Fig. 4.

AOS standards ranging from 0% to 14.5% (w/w). As can be seen, at 1040 cm^{-1} a characteristic sharp band for the analyte can be identified in both standards and sample. So, it is possible to determine directly AOS by the using this band.

An exhaustive study of the measurement conditions including the use of different baselines and measurement criteria was carried out (results not shown). The selected conditions were based on peak area between 1049.1 and 1034.6 cm^{-1} with a two-point baseline established between 1020.2 and 995.1 cm^{-1} which provides precise and accurate values for the determination of AOS in samples considered.

3.2. ATR-FTIR measurement conditions

Table 1 summarizes the selected conditions used for the multicommutation ATR-FTIR determination of AOS which corresponds to typical 100 accumulated scans (for background and samples) obtained at a resolution of 8 cm^{-1} in the stopped-flow mode and involve a 30 s sampling time between 50 s cleaning steps. The aforementioned conditions were taken in order to obtain an adequate signal-to-noise ratio in as short as possible measurement time.

Table 2

Analytical features of the ATR-FTIR determination of sodium alpha-olefin sulfonate in liquid detergent formulations by both a manual procedure and a multicommutation approach

Parameter	Multicommutation	Manual
Throughput (h^{-1})	23	15
Sample volume (ml for 100 determinations)	96	100
Waste (ml h^{-1})	115	250
Calibration curve	$y = (0.0769 \pm 0.0011) C$ (%) – (0.007 \pm 0.010)	–
R^2	0.996	–
LOD [% (w/w)] ^a	1.2	–
Variation coefficient (%) ^b	1.3	–

^a LOD % (w/w) calculated as $3 S_b/\text{slope}$.

^b Established for 4 independent measurements of a standard containing 7.48% (w/w) AOS.

Table 3

Determination of sodium alpha-olefin sulfonate in liquid detergent formulations by multicommutation ATR-FTIR.

Sample	% (w/w) by ATR-FTIR	Standard deviation (s) [% (w/w)] ^a	Real content [% (w/w)] ^b
M1	7.9	0.3	7.52
M2	8.5	0.2	8.52
M3	9.5	0.3	9.52
Added amount (g) ^c	% Recovery	Standard deviation (s) [% (w/w)]	
0.1035	99	4	
0.2369	102.7	1.1	
0.5578	101.9	0.5	
0.6012	102.7	1.8	

^a Standard deviation of 3 independent analysis.

^b Data provided by the manufacturer.

^c Recovery data were found for 10 g aliquot of sample M2 spiked with known amounts of analyte.

Fig. 3A shows the variation of absorbance of a sample (corresponding to the area between 1049.1 and 1034.6 cm^{-1} with a baseline established between 1020.2 and 995.1 cm^{-1}) as a function of the number of accumulated scans per spectrum, being also indicated the time employed to carry out this measurements. The finally selected value of 100 scans was tried in order to obtain a good compromise between sensitivity, precision and scanning time.

Fig. 3B shows the results of the study of the influence of nominal resolution on the absorbance measurements. A nominal resolution of 8 cm^{-1} provides the best sensitivity and an adequate precision in a reasonable acquisition time.

3.3. Multicommutation parameters

The multicommutation flow-system employed required the selection of few parameters as the carrier flow rate, sampling time and cleaning time. The flow rate was fixed at 1.92 ml min^{-1} in order to reduce analysis time and for avoiding the formation of foam during sample transport.

Fig. 4 shows the effect of the sampling time on the analytical signal. It can be seen that a constant absorbance value is reached for a sampling time of 30 s. So, 30 s was selected to the complete filling of the ATR flow-through cell and assure the absence of air bubbles.

After data acquisition, the sample must be removed from the ATR cell and it must be cleaned to avoid memory effects. So, a cleaning step by using the water carrier flow was necessary.

Fig. 5 shows the effect of the cleaning time on the absorbance measurements made at the typical band of AOS and, as it can be seen, 50 s is enough to remove totally the sample or standard solution between measurements, obtaining the blank signal of the water carrier.

3.4. Analytical features

Table 2 summarizes the analytical features of the multicommutation ATR-FTIR determination of AOS. The analytical throughput is slightly increased, 23 h^{-1} , versus the 15 h^{-1} found by a the manual procedure. However, the most important advantage of the multicommutation developed procedure versus the classical one is the on-line filling and cleaning of the expensive ATR flow-cell, which gets off the possible breaking or surface attach/degradation by

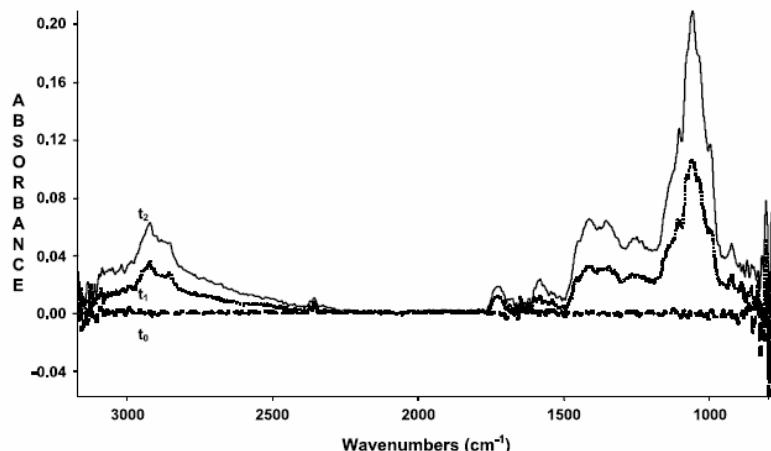


Fig. 6. Effect of the sampling time on the spectrum recorder of an orange juice sample obtained by multicommutation ATR-FTIR. Spectra were established by accumulating 50 scans and using a 8 cm^{-1} nominal resolution. Sampling time $t_0=0$ s; $t_1=20$ s and $t_2=30$ s.

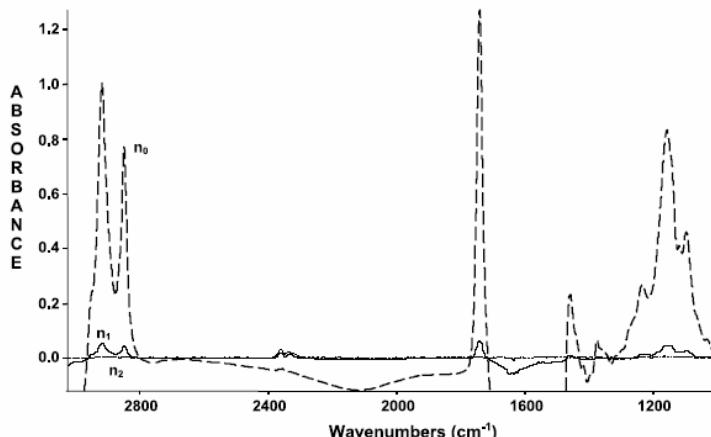


Fig. 7. Effect of cleaning cycles on the spectrum recorder of an olive oil sample obtained by multicommutation ATR-FTIR. Spectra were established accumulating 50 scans and using a 8 cm^{-1} nominal resolution. Cleaning cycles $n_0=0$; $n_1=10$ and $n_2=150$.

handling and cleaning it. So, sample consumption is only slightly lower than that obtained in batch measurements, but waste generation is drastically reduced to less than 50% of that obtained in manual.

The calibration curve was $Y=(0.0769 \pm 0.0011)C - (0.007 \pm 0.010)$, Y being the area between 1049.1 and 1034.6 cm^{-1} , with a baseline established between 1020.2 and 995.1 cm^{-1} , C the concentration of AOS in % (w/w). The limit of detection obtained, 1.2% (w/w), is enough for the analysis of liquid detergent formulations and, due to the use of the stopped-flow mode, does not reduce the analytical sensitivity obtained in batch.

3.5. Sample analysis and recovery studies

Table 3 shows the results obtained for the determination of AOS by the developed procedure in the industrial reference samples obtained from Sanmarino Consorcio (Quart, Spain). For the three samples, the content found is in the $\pm 5\%$ error range. So, the accuracy of the method is

appropriate for the quality control of detergent formulations. Excellent precision values were obtained, in all cases, with relative standard deviation values of three independent determinations of the order of 0.3% (w/w).

A recovery study was developed in order to assess the accuracy of the multicommutation ATR-FTIR determination of AOS. Aliquots of 10 g sample containing 8.52% (w/w) were spiked with different known amounts of AOS, from 0.1035 to 0.6012 g. Recovery values obtained varied from 99% to 102.7% with a good precision for four independent analysis, confirming once again the appropriate characteristics of the method of multicommutation ATR-FTIR.

3.6. Application of multicommutation ATR-FTIR to different types of samples

In order to test the applicability of the use of multicommutation ATR-FTIR for the analysis of different types of samples, the aforementioned strategy employed for AOS determination in liquid detergent formulations was applied to

Table 4

Selected experimental conditions for the analysis of different types of samples through multicommutation ATR-FTIR

Sample	Sampling time (s)	Cleaning time (s)	Throughput (h^{-1})	Volume of sample (ml)	Volume of waste (ml)	Cleaning cycles
Beer	30	40	33	96	224	0
Milk powder ^a	50	40	28	160	288	5
Orange juice	30	60	28	96	256	10
Olive oil	60	190	12	90	458	150

The experimental conditions correspond to the obtention of reproducible data for the samples considered and the recovery of the baseline after cleaning the system. Volume of samples and wastes were calculated for 100 determinations. Cleaning cycles to remove milk, orange juice and olive oil samples were based on the sequential aspiration of detergent solution during 1 s and water during 1 s, air bubbles during 1 s and detergent solution during 1 s, and detergent solution during 0.5 s and air bubbles during 0.5 s, respectively.

^a Sample was a 10% (w/w) solution of milk powder in deionized water.

obtain ATR-FTIR spectra of different samples, from beer to olive oil.

The purpose of this study was to evaluate the experimental conditions required to completely fill and clean the ATR cell and to obtain sensitive and reproducible spectra from each type of sample, as well as to evaluate the sampling throughput, the sample volume required and the waste generated.

Fig. 6 shows, as an example, the effect of the sampling time on the signals found for an orange juice sample accumulating 50 scans and using 8 cm^{-1} ; as can be seen, 30 s provided a clear enhancement of the measurements as compared with 20 s.

On the other hand, the complete cleaning of the cell after measurements requires the use of several cleaning cycles using water, or water and a detergent solution including air bubbles, to remove superficially adsorbed compounds.

Fig. 7 shows the effect of 10 and 150 cleaning cycles on the total removal of an olive oil sample from the ATR cell.

In short, **Table 4** shows the selected experimental conditions found for the ATR-FTIR analysis of the different samples assayed and, as can be seen, this approach provides sampling throughput from 12 to 33 h^{-1} , with a sample consumption between 90 and 160 ml for 100 determinations and a waste volume generated from 224 to 458 ml, the olive oil analysis being the most complicate procedure which involves 150 cleaning cycles and thus a reduced analytical productivity and a high volume of waste.

However, it must be noticed that the aforementioned conditions offer a great enhancement in both productivity and sample consumption, as well as waste generation, as compared with the classical approach based on the use of in-batch measurements, and open the possibility to improve the analysis of these types of products by partial least squares (PLS)-ATR-FTIR, which are based on the spectra acquisition and process of big series of untreated samples.

Tables 5a and 5b provide the timing valve courses used to obtain ATR-FTIR data from the different types of samples

Table 5a

Scheme of the electronic pulses and the corresponding times used in the multicommutation ATR-FTIR obtention of data from detergent formulations and beer samples

Sample	Valve	1st step	2nd step	3rd step
Detergent	V ₁	1 (30 s)	0 (76 s)	0 (50 s)
	V ₂	0 (30 s)	0 (76 s)	0 (50 s)
	V ₃	0 (30 s)	0 (76 s)	0 (50 s)
	V ₄	0 (30 s)	1 (76 s)	0 (50 s)
Beer	V ₁	1 (30 s)	0 (38 s)	0 (40 s)
	V ₂	0 (30 s)	0 (38 s)	0 (40 s)
	V ₃	0 (30 s)	0 (38 s)	0 (40 s)
	V ₄	0 (30 s)	1 (38 s)	0 (40 s)

1st step corresponds to sampling, 2nd step corresponds to scanning and 3rd step corresponds to the cleaning of the flow-cell. Electronic pulses are indicated as bit 1 (switching on) and bit 0 (switching off). In the case of detergent analysis, standards were introduced through V₂ valve using the same electronic pulses and times than for sample.

Table 5b

Scheme of the electronic pulses and the corresponding times used in the multicommutation ATR-FTIR obtention of data from different types of samples

Sample	Valve	1st step	2nd step	3rd step: cleaning cycles	4th step
Milk	V ₁	1 (50 s)	0 (38 s)	0 (1 s)	0 (30 s)
	V ₂	0 (50 s)	0 (38 s)	1 (1 s)	0 (30 s)
	V ₃	0 (50 s)	0 (38 s)	0 (1 s)	0 (30 s)
	V ₄	0 (50 s)	1 (38 s)	0 (1 s)	0 (30 s)
Orange juice	V ₁	1 (30 s)	0 (38 s)	0 (1 s)	0 (40 s)
	V ₂	0 (30 s)	0 (38 s)	0 (1 s)	1 (1 s)
	V ₃	0 (30 s)	0 (38 s)	1 (1 s)	0 (1 s)
	V ₄	0 (30 s)	1 (38 s)	0 (1 s)	0 (40 s)
Olive oil	V ₁	1 (60 s)	0 (38 s)	0 (0.5 s)	0 (0.5 s)
	V ₂	0 (60 s)	0 (38 s)	1 (0.5 s)	0 (0.5 s)
	V ₃	0 (60 s)	0 (38 s)	0 (0.5 s)	1 (0.5 s)
	V ₄	0 (60 s)	1 (38 s)	0 (0.5 s)	0 (40 s)

1st step corresponds to sampling, 2nd step corresponds to scanning and 3rd step corresponds to the sample removing from the flow-cell during a fixed number of cycles using alternatively a detergent solution and air bubbles or water. 4th step corresponds to the final cleaning of the cell after carrying out the precedent cleaning cycles. Electronic pulses are indicated as bit 1 (switching on) and bit 0 (switching off).

assayed being considered; in **Table 5a**, those samples which do not require a specific cleaning procedure, beer and detergent ones; and **Table 5b**, those samples for which it has been necessary to carry out some cleaning cycles consisting in the alternated insertion of both detergent and water or air bubbles in order to achieve the complete cleaning of the cell.

4. Conclusion

Studies carried out evidenced that multicommutation provides an excellent way for the fully mechanized analysis of different samples by ATR-FTIR, offering a less expensive, flexible and environmentally friendly tool for both direct determination based on PLS treatment of FTIR data and classical approaches involving the determination of specific components through the use of absorbance data selected wave number bands.

In all the cases, multicommutation improves the sampling throughput and reduces the sample consumption and waste generation.

For AOS determination in liquid detergent formulations, appropriate analytical features were found for quality control analysis.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Project N° AGL2002-00729 and from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, ref. PHB2002-0054-PC.

References

- [1] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.F.L.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.
- [2] R.A.S. Lapa, J.F.L.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 223.
- [3] A.N. Araujo, J.F.L.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 447.
- [4] C.K. Pires, P.B. Martelli, B.F. Reis, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 2457.
- [5] B.F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 392 (1999) 265.
- [6] J.A. Vieira, I.M. Raimundo Jr., B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 75.
- [7] A.P.S. Paim, C.M.N.V. Almeida, B.F. Reis, R.A.S. Lapa, E.A.G. Zagatto, J.L.F. Costa-Lima, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 1221.
- [8] G. de Armas, M. Miro, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá, Anal. Chim. Acta 455 (2002) 149.
- [9] B.F. Reis, E. Ródenas-Torralba, J. Sancenón-Buleo, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 437.
- [10] F. Cadet, M. de la Guardia, in: R.A. Meyers (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Chichester, 2000, p. 10879.
- [11] S. Garrigues, M. de la Guardia, in: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (Eds.), Handbook of Vibrational Spectroscopy, Wiley, Chichester, 2002.
- [12] M.M. Mossoba, M. Adam, T. Lee, J. AOAC Int. 84 (2001) 1144.
- [13] J.M. Garrigues, M. Akssira, F.J. Rambla, S. Garrigues, M. de la Guardia, Talanta 51 (2000) 247.

2.2. Determinación FTIR de benceno en gasolina: uso de la multiconmutación como estrategia alternativa al FIA

Multicommutation Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline

Eva Ródenas-Torralba, Josep Ventura-Gayete, Ángel Morales-Rubio, Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta 512 (2004) 215–221



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 512 (2004) 215–221

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Multicommunication Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline

Eva Ródenas-Torralba, Josep Ventura-Gayete, Ángel Morales-Rubio,
Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia*

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

Received 9 September 2003; received in revised form 20 February 2004; accepted 23 February 2004

Available online 14 April 2004

Abstract

A fully mechanized method to determine benzene in motor gasolines has been developed based on the use of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and multicommunication. The flow network comprised a set of three-way solenoid valves and was controlled by means of a microcomputer furnished with an electronic interface and running by a software written in QUICK BASIC 4.5. The flow network and control software were designed to implement the multicommunication approach providing facilities to handle sample and reagent solutions, so that, sample dilution, external calibration and standard addition could be easily performed on-line. The method permits the direct determination of benzene without any pre-treatment of samples, with a limit of detection of 0.004% (v/v) and a variation coefficient of 1.2% (for 10 independent analysis of a gasoline sample containing 3% (v/v) benzene). Advantageous features of the method were a linear response ranging until to 3.75% (v/v), a solvent consumption of 1.2 ml per determination and an analytical throughput of 81 samples per hour. So, the described method is a fast and sustainable alternative to the previous methods for benzene determination in gasolines.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multicommunication; Fourier transform infrared spectrometry; Gasoline; Benzene; Green chemistry

1. Introduction

From the pioneering studies on flow injection infrared spectrometry (FI-IR) [1–6] it was evident that the mechanization of IR measurements involved the main advantages of FI techniques but specially it enhanced the quantitative application of IR by simplifying the filling and cleaning of the cells also improving the laboratory productivity. On the other hand, the use of Fourier transform infrared instrumentation (FT-IR), offered an excellent multi-wave number and thus multicomponent detector in FI [6–9]. So, the use of FI and FT-IR demonstrated to be a synergistic combination [10,11].

Benzene is present in gasoline at percentage levels and it can affect the quality of air in the cities due to the carcinogenic nature of this compound. So, the environmental laws in different countries established maximum tolerated levels of benzene in blended gasoline, which is commonly accepted to be under 5% (v/v).

It was demonstrated in previous works that FT-IR offers an alternative way for the determination of benzene in gasoline, based on the use of a 1:10 off-line dilution of samples with hexane and absorbance [9] or first order derivative measurements [7], or directly by using the vapor-phase generation approach [12].

In recent years, multicommunication and binary sampling based strategies have been well established in order to improve the characteristics of the traditional FI procedures [13] in terms of: (1) a fully mechanization of the analytical processes, (2) a drastic reduction of reagents consumption and waste generation, and (3) an enhancement of the analytical productivity, based on the improvement of the sampling throughput and all that without sacrificing the sensitivity and precision inherent to the FI procedures.

So, nowadays different procedures have been performed through the use of multicommunication in UV-Vis spectrometry [14,15] potentiometry [16,17], fluorometry [18], and atomic fluorescence [19,20] being evidenced in a compared study between traditional FI, sequential injection analysis (SIA) and multicommunication [21] that this latter strat-

* Corresponding author. Tel.: +34-96-3544838; fax: +34-96-3544838.
E-mail address: miguel.delaguardia@uv.es (M. de la Guardia).

egy is the most sustainable and environmentally friendly alternative.

However, till now there is no precedent on the use of multicommutation in vibrational spectrometry and so, the main objective of the present work has been the development of a simple and fully mechanized procedure for FT-IR determination of benzene in gasolines, trying to do the direct analysis of samples and to reduce the number of solutions to be managed as minimum as possible, at the same time than to evaluate the improvement offered by multicommutation as compared with the classical FI strategy.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Magna IR 750 spectrometer from Nicolet (Madison, WI, USA) equipped with a DTGS temperature-stabilised detector with KBr beamsplitter and precise digital signal processing (DSP) was used to carry out the IR measurements using a NaCl windows micro-flow cell.

A Gilson Minipuls 3 peristaltic pump Model M312 (Villiers-le Bel, France) with fluorinated elastomer Viton® tubes (Iso-Versinic) of 0.15 cm i.d. and a six-way injection valve were used to introduce samples and standards diluted in hexane in the conventional FI mode.

Reaction coils and flow lines were made of polyethylene (PTFE) tubing (i.d. = 0.5 mm). Three NResearch 161T031 three-way solenoid valves and a 486 microcomputer equipped with a PCL 711S Advantech electronic interface, were employed for the multicommutation experiments.

2.2. Reagents

Analytical reagent grade benzene from Panreac (Barcelona, Spain) and hexane from Probus (Barcelona, Spain) were employed for the preparation of standard solutions. A 10% (v/v) benzene stock solution was used to inject different volumes in FI and multicommutation modes.

2.3. Samples

Thirteen gasoline samples were analysed using multicommutation procedure for the determination of benzene. These samples were obtained from the British Petroleum factory (Castellón, Spain). Data obtained by multicommutation were compared with those found by measurements in the classical FI mode.

To determine benzene, gasoline samples were diluted 1 + 9 with hexane in the FI procedure, using a 0.5 ml injection loop, while there was unnecessary any previous pre-treatment by multicommutation analysis.

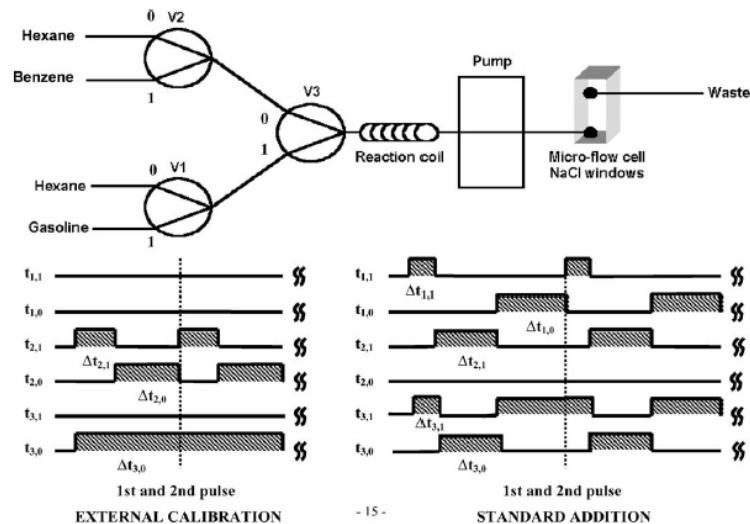


Fig. 1. Multicommutation manifold employed for the determination of benzene by FT-IR spectrometry. V_1 , V_2 , and V_3 are the three-way solenoid valves. A PTFE reaction coil of 0.5 mm i.d. and 239 cm length was used. The peristaltic pump is employed for solutions aspiration using a flow rate of 3.2 ml min^{-1} . Benzene corresponds to a 10% (v/v) standard solution. Gasoline indicates the samples. Hexane is the carrier stream. Switching on or off the valves permits us to select the aspiration pathways in each valve for 0 bit or 1 bit positions. In the bottom the insertion profiles corresponding to direct determination through external calibration and standard addition analysis are depicted. t_{ij} indicates the programmed time for valve i in position j ($j = 0$ or $j = 1$ for switching off and on, respectively each valve, Δt_{ij} being the aspiration time for each one of the solutions considered).

2.4. Flow system and software design

The home made electronic interface developed to drive the solenoid valves in multicommutation mode FT-IR measurements offers the possibility to simultaneously drive seven three-way valves, with a power battery of 12 V. However, for the studies included in the present work, only three solenoid valves were operated. As it can be seen in Fig. 1 in which is depicted in the experimental set up, V_1 was employed for the introduction of samples or hexane, V_2 was used for introducing benzene or hexane and V_3 for switching on/off the selection of V_1 and V_2 controlled solutions, respectively, through the analytical pathway.

Table 1 shows the scheme of the programmed electric pulses in order to do both, direct determination through external calibration and the standard addition analysis.

Table 1
Scheme of the electric pulses and their corresponding times employed for multicommutation FT-IR determination of benzene

First step	Second step	Third step
External calibration		
V_2 on ^a 0.1 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off ^b 0.1 s	V_3 off 1.0 s	
V_2 on 0.2 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off 0.2 s	V_3 off 1.0 s	
V_2 on 0.3 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off 0.3 s	V_3 off 1.0 s	
V_2 on 0.4 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off 0.4 s	V_3 off 1.0 s	
V_2 on 0.5 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off 0.5 s	V_3 off 1.0 s	
V_2 on 0.6 s	V_3 off 1.0 s	
V_3 off 0.6 s	V_3 off 1.0 s	
Sample analysis		
V_1 on 12.5 s	V_1 off 30.0 s	
V_3 on 12.5 s	V_3 on 30.0 s	
Standard addition		
V_1 on 12.5 s	V_2 on 0.0 s	V_1 off 30.0 s
V_3 on 12.5 s	V_3 off 0.0 s	V_3 on 30.0 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.2 s	V_1 off 0.8 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.2 s	V_3 on 0.8 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.4 s	V_1 off 0.6 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.4 s	V_3 on 0.6 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.5 s	V_1 off 0.5 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.5 s	V_3 on 0.5 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.7 s	V_1 off 0.3 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.7 s	V_3 on 0.3 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.8 s	V_1 off 0.2 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.8 s	V_3 on 0.2 s
V_1 on 0.2 s	V_2 on 0.9 s	V_1 off 0.1 s
V_3 on 0.2 s	V_3 off 0.9 s	V_3 on 0.1 s

These steps were programmed in QUICKBASIC 4.5 and correspond to the first pulse program.

^a On corresponds to 1 bit position.

^b Off corresponds to 0 bit position, as indicated in Fig. 1.

When using external calibration valve V_3 selects samples (when switched on) or benzene standard solution (when switched off). On the other hand, samples were aspirated through V_1 and a 10% (v/v) benzene standard was aspirated through valve V_2 being used hexane for on-line dilution of the standards in order to obtain a series of solutions equivalent to 0.91, 1.67, 2.31, 2.86, 3.33, and 3.75% (v/v) in the flow cell for aspiration times of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 s of V_2 in bit 1 position, respectively.

For standard addition analysis short pulses of valve V_3 provides the mixing between samples (selected through valve V_1) and standard (selected through valve V_2) and thus it is possible to obtain a calibration line with seven triplicate points in approximately 15 min and using a single standard stock solution and untreated samples.

2.5. Flow injection analysis-reference procedure

Dilute gasoline samples 1 + 9 with hexane and inject 500 μ l inside a single line FI manifold, measuring the area of the FI recordings obtained from measurements of absorbance peak heights at 675 cm^{-1} corrected with a baseline established between 712 and 650 cm^{-1} . Interpolate area values obtained for samples in the regression line found by injecting 500 μ l of benzene in hexane standard solutions containing from 0.1 to 0.6% (v/v).

Data obtained by external calibration were compared with those found by off-line standard addition, by adding to 2 ml aliquots of gasoline, different volumes of a 10% (v/v) benzene standard (from 0.1 to 0.5 ml) and diluting to 10 ml with hexane.

2.6. Multicommutation analysis-developed procedure

The flow network and control software were designed to implement the binary sampling approach and the sampling step was carried out following the valves on-/off-time course indicated in Fig. 1. Under these conditions, the reaction coil was loaded with a string comprising sample plugs in tandem with plugs of carrier solution. This sampling strategy was employed to attain two beneficial conditions: (1) an on-line dilution of the untreated sample and the insertion on-line of external standards or (2) the fast standard addition calibration using a single 10% (v/v) stock benzene solution. Table 1 indicates the scheme of the electric pulses to do both, external calibration and standard addition analysis.

3. Results and discussion

3.1. FT-IR spectra of benzene in gasoline

Fig. 2 shows the absorbance spectra obtained for a gasoline sample (solid line) and benzene in hexane standard (dotted line). Hexane provides a low background in the 850–600 cm^{-1} wave number range.

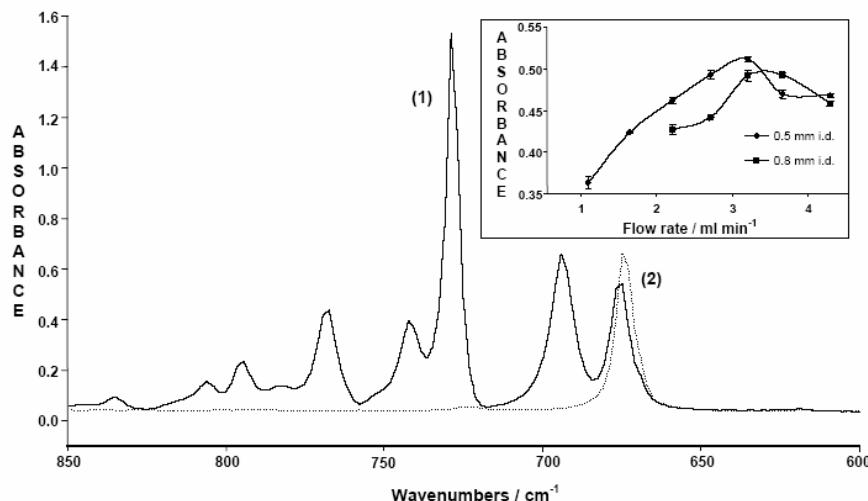


Fig. 2. Absorbance spectra corresponding to a gasoline sample containing 2.74% (v/v) benzene (1) and a 3.75% (v/v) benzene standard (2) both obtained using a 0.108 mm spacer. (Inset) Effect of the carrier flow-rate on the area of the multicommutation FT-IR peaks of a sample containing 2.74% (v/v) benzene, obtained by aspiration during 12.5 s and using 0.5 and 0.8 mm i.d. PTFE coil of 239 cm length.

Benzene has a well defined band at 675 cm^{-1} that is well resolved in real gasoline samples and, because of that, this band was employed in previous works for the determination of benzene in gasoline [9].

3.2. Effect of multicommutation parameters

It was evaluated the effect of the injected sample volume and carrier flow-rate on the sensitivity and reproducibility of the FT-IR transient peaks. Additionally, the effect of the reaction coil length and the effect of the nominal resolution were evaluated.

In the reference FI mode [9], a coil was unnecessary, because the off-line dilution of samples assures the acquisition of sample data in the dynamic range of the method. On the contrary, on using multicommutation, the discrete insertion of small volumes of sample and hexane makes necessary to manage the dilution of benzene and gasoline by controlling the time of contact between all aspirated solutions. Absorbance values similar to those found for the FI mode were obtained in the multicommutation mode when reaching the steady state.

As can be seen in the inset of Fig. 2, the peak area of a sample containing 2.74% (v/v) benzene increases on increasing the flow rate till to reach a maximum value and then decreases as the flow rate increases over 3.2 ml min^{-1} both, using mixing coils of 0.5 and 0.8 mm i.d., being found the best sensitivity for using the narrowest of the coils. So, a carrier of 3.2 ml min^{-1} and an internal diameter of the coil of 0.5 mm were selected.

It was evaluated the effect of the aspiration time of both sample and hexane.

Fig. 3a shows the signals obtained, for a fixed hexane aspiration time of 30.0 s, as a function of the use of different gasoline sampling times from 2.5 to 30.0 s. In these conditions, the steady state can be reached for a sampling time of 12.5 s, which corresponds to a sample volume of $666.7\text{ }\mu\text{l}$.

In order to reduce the solvent consumption it was evaluated the use of different aspiration times for hexane, from 10.0 to 35.0 s, to obtain an adequate separation of sample peaks. As can be seen in Fig. 3b, signals were sufficiently separated for an hexane aspiration time of 30.0 s being also found that the aspiration of hexane does not affect the analytical sensitivity for benzene determination.

The best experimental conditions were fixed as 12.5 s aspiration of gasoline samples followed by 30.0 s hexane aspiration.

In order to search for the best mixture between samples and benzene, it was evaluated different lengths of the reaction coil, from 130 to 349 cm, using a PTFE tube with 0.5 mm internal diameter. Moreover, this coil was employed to protect the valves in front of overpressure effects due to the on-line dilution of samples, based on the fact that these valves can support only 30 p.s.i. The highest sensitivity, in terms of peak height, was obtained with the coil length of 239 being also obtained for this coil the narrowest peaks.

It was studied the use of two nominal resolution conditions, 4 and 8 cm^{-1} , for obtaining the FT-IR spectra in the multicommutation mode using in both cases an aspiration time of 12.5 s of a sample with 2.74% (v/v) benzene. It was

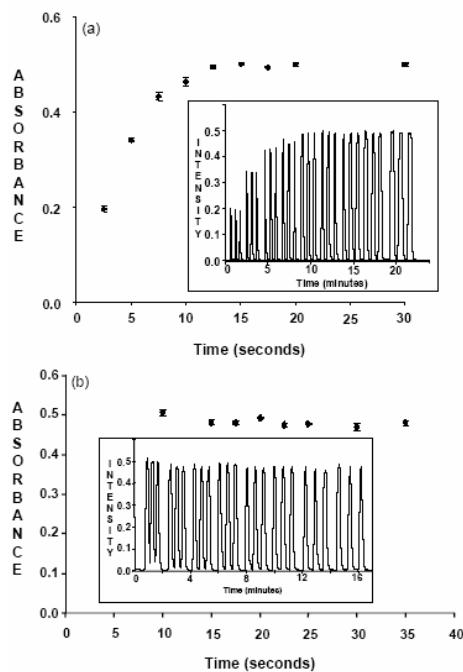


Fig. 3. Effect of the aspiration time through V_1 valve: (a) for the aspiration of a sample containing 2.74% benzene (v/v) using an hexane aspiration time of 30 s; (b) for the aspiration of hexane, using a fixed 12.5 s aspiration time for a gasoline sample. (Insets) Transient signals found in each case.

obtained an absorbance of 0.44 ± 0.01 for 4 cm^{-1} , while the absorbance for 8 cm^{-1} was 0.371 ± 0.008 .

3.3. Analytical features of the FI and multicommutation modes

As can be seen in Fig. 3, highly reproducible multicommutation recordings can be obtained for FT-IR determination of benzene in gasolines.

Table 2 summarizes the main figures of merit of the previously proposed FT-IR methods and those obtained by multicommutation FT-IR. In order to establish an appropriate comparison, data found by classical FI were also established in the same working session than those concerning multicommutation.

The developed procedure provides a limit of detection of 0.004% (v/v) ($\text{fork} = 3$, at a probability level of 99.6%) being this value comparable with that obtained by first order derivative measurement of previously diluted samples [7] but clearly better than that obtained by the rest of the procedures.

The precision of measurements (evaluated from the relative standard deviation of 10 independent measurements) was of the same order than values found for classical FI approaches and clearly better than that obtained by vapor phase [12].

So, on comparing the characteristics of the multicommutation FT-IR with those found previously, it can be concluded that the new approach enhances the limit of detection and provides a comparable precision than that found by FI measurements. However, from data reported in Table 2 it can be concluded that the sensitivity of multicommutation FT-IR was lower than that found in the FI mode.

The main advantages of using multicommutation in FT-IR determination of benzene concern the strong reduction of reagent consumption and waste generation, thus providing an environmentally friendly alternative that avoids the accumulation of toxic residues in the laboratory.

On the other hand, it was obtained an enhancement of the productivity of the laboratory being obtained a sampling frequency of 81 measurements per hour, which is better than that found by the rest of methodologies.

As Table 2 indicates, a sample volume of $79\text{ }\mu\text{l}$ and an hexane volume of $1179\text{ }\mu\text{l}$ was enough to obtain a sensitive FT-IR signal in commercial gasoline analysis, being produced a waste of 105.6 ml h^{-1} (for 81 injections throughput) in the multicommutation mode, which is clearly lower than the $500\text{ }\mu\text{l}$ sample consume and $4714\text{ }\mu\text{l}$ reagent required for the conventional FI mode measurement which also involves a waste generation of 219.0 ml h^{-1} for only 45 injections throughput in the best conditions and using an instrumentation better than that employed in the previous study [9].

Another advantage of the multicommutation-FT-IR procedure is the simplicity of the philosophy of this fully mechanized strategy which permits the direct determination on untreated samples and using a simple concentrate stock standard solution for making calibration.

An additional conclusion which can be taken from data in Table 2 is the absence of matrix effects in the FT-IR determination of benzene. On comparing FT-IR measurements by both, liquid and vapor phase, it can be concluded that vapor phase offers the most sustainable alternative in terms of sample reagents consumption and waste generation but it is a relatively slow technique (35 h^{-1} sampling frequency) and creates problems in sample representativity due to the use of $1\text{ }\mu\text{l}$ of sample.

3.4. Analysis of benzene in a set of commercially available gasoline samples

Thirteen gasoline samples obtained from the British Petroleum factory (Castellón, Spain) were analysed by multicommutation-FT-IR spectrometry. The results found are summarised in Table 3, including values found by a FI-FT-IR reference procedure and it was confirmed the presence of benzene in a concentration level from 2.37 to 3.5% (v/v).

Table 2

Analytical features of the FT-IR determination of benzene using previously proposed procedures [7,9,12] and by the recommended method

Features	FI-FT-IR [9] External calibration	FI derivative [7]	Vapor phase [12]	Classical FI		Multicommutation	
				External calibration	Standard addition	External calibration	Standard addition
% (v/v) LOD ^a	0.02	0.005	0.02–0.08	0.01	—	0.004	—
% R.S.D. ^b	1	1.0	3	1.4	1.4	1.2	1.2
% (v/v) Linear range	0.02–0.8	0.05–0.8	0.5–5	0.1–0.6	—	0.91–3.75	—
Measurement criteria	Height 675 cm ⁻¹ , Baseline 712–650 cm ⁻¹	Area 672–678 cm ⁻¹ , from first order derivative spectra	Area 671–675 cm ⁻¹ , Baseline 706–634 cm ⁻¹	Height 675 cm ⁻¹ , Baseline 712–650 cm ⁻¹	Height 675 cm ⁻¹ , Baseline 712–650 cm ⁻¹		
Regression line	$y = 0.769x + 0.001$	$y = 2.335x + 0.004$	$y = 0.0607x + 0.0047$	$y = (0.076 \pm 0.001)x - (0.0042 \pm 0.0005)$	$y = (0.0720 \pm 0.0008)x + (0.0016 \pm 0.0003)$	$y = (0.0410 \pm 0.0006)x - (0.006 \pm 0.002)$	$y = (0.0416 \pm 0.0009)x + (0.032 \pm 0.002)$
Correlation coefficient (R)	0.9998	0.9993	0.9999	0.9998	0.9997	0.998	0.9998
Gasoline (ml) ^c	30	30	0.1	50.0	50.0	7.9	11.0
Hexane (ml) ^c	380	307.2	0	471.4	471.4	117.9	192.5
Waste (ml) ^d	319.2	354.3	0.035	219.0	250.3	105.6	158.7
Throughput (h ⁻¹)	12	25	35	45	45	81	81

In order to obtain a correct comparison of sensitivity and LOD, classical FI features were established, once again, using the same instrumentation employed for multicommutation. Calibration lines were established with four standards plus a blank.

^a % (v/v) LOD: limit of detection for $k=3$.

^b % R.S.D.: relative standard deviation of a standard solution.

^c Sample and reagent consumption corresponding to 100 analysis.

^d Waste generated were established for 1 h working session.

Table 3
FT-IR determination of benzene in gasolines by using both, conventional FI and multicommutation

Sample	FI	Multicommutation
1	2.70 ± 0.09	2.71 ± 0.06
2	2.65 ± 0.02	2.68 ± 0.03
3	3.32 ± 0.05	3.3 ± 0.1
4	2.39 ± 0.09	2.37 ± 0.04
5	3.02 ± 0.02	3.05 ± 0.03
6	3.1 ± 0.1	2.98 ± 0.03
7	2.8 ± 0.1	2.78 ± 0.06
8	2.75 ± 0.03	2.8 ± 0.3
9	2.98 ± 0.03	3.1 ± 0.1
10	2.74 ± 0.09	2.78 ± 0.03
11	3.10 ± 0.01	3.094 ± 0.006
12	2.59 ± 0.03	2.48 ± 0.09
13	2.60 ± 0.04	2.68 ± 0.04

Area values of the transient FT-IR signals were established for the 675 cm^{-1} band with a baseline fixed between 712 and 650 cm^{-1} .

The regression between data obtained by the developed procedure (y), and those obtained by conventional FI measurements (x) provided an equation $y = (0.1 \pm 0.2) + (0.98 \pm 0.08)x$ with a regression coefficient $R = 0.967$, being the Student's t tabulated (2.064) for both, the slope and the intercept higher than the corresponding t calculated values (0.25 for the slope and 0.5 for the intercept), for a probability level of 95% and 11 freedom degrees, thus evidencing the good comparability of both approaches, when the same operator was working on using the same instrument, and this fact contributes to the validation of the proposed methodology.

By comparing the results in Table 3, using the F -test a critical F value was 2.687, while calculated F was 0.975, which verified that no significant differences did occur between the precision obtained by the two procedures.

On the other hand, the paired t -test revealed as well no significant differences at the 95% confidence level between the values obtained by the two methods (critical $t = 2.179$ and calculated $t = -0.264$).

4. Conclusions

Multicommutation offers a sustainable and environmentally friendly alternative to previously proposed methods for FT-IR determination of benzene in gasoline, reducing the sample consumption as compared with classical FI approaches and the reagent consumption, also providing a reduced volume of waste. However, compared with the vapor-phase FT-IR the amount of reagents and wastes of the multicommutation approach are higher than those reported but the LOD is at least five times lower than that found by vapor phase and multicommutation is free from unrepresentativity problems arising from the use of $1\text{ }\mu\text{l}$ samples of gasolines in vapor-phase analysis. Additionally,

multicommutation permitted us to do the direct analysis of untreated samples and the use of a single stock standard solution of benzene for on-line generation of the calibration standards.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Project No AGL2002-00729. Eva Ródenas Torralba acknowledges the research grant "V SEGLES" (Universitat de València) to carry out Ph.D studies.

References

- [1] O.J. Curran, W.G. Collier, *Anal. Chim. Acta* 177 (1985) 259.
- [2] D.K. Morgan, N.D. Danielson, J.E. Katon, *Anal. Lett.* 18 (1985) 1979.
- [3] S.V. Olesik, S.B. French, M. Novotny, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2256.
- [4] B.E. Miller, N.D. Danielson, J.E. Katon, *Appl. Spectrosc.* 42 (1988) 401.
- [5] M. Guzmán, J. Ruzicka, G.D. Christian, P. Shelley, *Vib. Spectrosc.* 2 (1991) 1.
- [6] M. de la Guardia, S. Garrigues, M. Gallignani, J.L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 53.
- [7] M. Gallignani, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analyst* 119 (1994) 653.
- [8] M. Gallignani, S. Garrigues, M. de la Guardia, J.L. Burguera, M. Burguera, *Talanta* 41 (1994) 739.
- [9] M. Gallignani, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 267.
- [10] F. Cadet, M. de la Guardia, in: R.A. Meyers (Ed.), *Quantitative Analysis Infrared in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, Chichester, 2000, p. 10879.
- [11] S. Garrigues, M. de la Guardia, *Flow-injection analysis-Fourier transform infrared spectrometry (FIA/FT-IR)*, in: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Wiley, Chichester, 2002.
- [12] E. López-Aureus, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 157.
- [13] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- [14] P.B. Martelli, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, M. Korn, H. Bergamin Fo, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A. Araujo, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 397.
- [15] F.R.P. Rocha, P.B. Martelli, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 11.
- [16] P.B. Martelli, B.F. Reis, M. Korn, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 165.
- [17] E.P. Borges, P.B. Martelli, B.F. Reis, *Mikrochim. Acta* 135 (2000) 179.
- [18] R.A. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 223.
- [19] B.F. Reis, E. Ródenas-Torralba, J. Sancenón-Buleo, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 537.
- [20] B.F. Reis, E. Ródenas-Torralba, J. Sancenón-Buleo, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta* 60 (2003) 809.
- [21] B.F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 265.

2.3. Determinación de hexythiazox en formulaciones fitosanitarias: aplicación de la multiconmutación acoplada a la espectrometría FT-NIR

Multicommunication-NIR determination of Hexythiazox in pesticide formulations

Josep F. Ventura-Gayete, Sergio Armenta, Salvador Garrigues, Ángel Morales-Rubio, Miguel de la Guardia
Talanta 68 (2006) 1700–1706



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Talanta 68 (2006) 1700–1706

Talanta

www.elsevier.com/locate/talanta

Multicommunication-NIR determination of Hexythiazox in pesticide formulations

Josep F. Ventura-Gayete, Sergio Armenta, Salvador Garrigues,
Ángel Morales-Rubio, Miguel de la Guardia*

Department of Analytical Chemistry, Universitat de València, Edifici Jeroni Muñoz,
50 Doctor Moliner St., 46100 Burjassot, València, Spain

Received 20 April 2005; received in revised form 1 August 2005; accepted 10 August 2005

Available online 15 September 2005

Abstract

A multicommutated flow-system was designed in order to increase analytical throughput and for controlling thermal effects on the NIR spectra for determination of Hexythiazox in pesticide formulations. An on-line standard addition was carried out showing the versatility and repeatability of multicommunication for the on-line mixing and dilution of solutions. Results obtained for commercial samples were statistically comparable with those obtained by an HPLC-reference method. Multicommunication-NIR allows the analysis of 52 samples per hour, in front of the 30 samples per hour analyzed by the NIR-batch procedure and the 7 samples per hour analyzed by HPLC-reference method.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multicommunication; NIR; Pesticides; Hexythiazox

1. Introduction

Hexythiazox (*trans*-5-(4-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxothiazolidine-3-carboxamide) is a selective ovicide/miticide acaricide which is widely used in the treatment of some pests. It is applied at any stages of plant growth from budding to fruiting, inhibiting chitin synthesis in tetranychid acari and *Phyllocoptes citrella* [1]. Spanish legislation specifies 1.00 mg kg⁻¹ as a maximum tolerated limit in citrus [2]. However, there are not concluding studies about chronic and cancer dietary risk assessment in humans [3].

Methods for the determination of Hexythiazox at trace level include liquid chromatography with UV [4] or diode array detector [5], but basically with tandem mass spectrometry (MS), using electrospray ionization [6–9] or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [10–13]. Other techniques employed to Hexythiazox determination were voltammetry with hanging mercury electrode [14] and direct insertion probe MS [15].

These aforementioned techniques are adequate for pesticide analysis at trace levels but for routine control analysis of com-

mercial formulations, in which the active ingredient is at the percentage level it is unnecessary the tremendous dilution involved in chromatographic procedures, also requiring an important consumption of solvents.

In the last years, vibrational techniques have been applied to the quality control of pesticides in commercial products [16] and different approaches have been proposed for FT-IR and FT-Raman spectrometric analysis. But it is noticeable that none method based on measurements in the near infrared region has been found in the literature.

Consumption of pesticides in the European Union reached 19,384 tonnes in 1999 [17] and the quality control of such volume of products requires methods as fast and automatable as possible. In this sense, a series of procedures based on the use of flow analysis (FA) FTIR have been proposed for the determination of single compounds and mixture of pesticides in commercial formulations [18–20].

Multicommunication is a flow analysis strategy widely developed in the 1990s, which combines the easiness of the adaptation of batch procedures to the flow ones with the versatility with regard to manifold real-time reconfiguration and has been coupled with different analytical techniques [21]. Multicommunication has been adapted to FTIR measurement in the mid IR for the determination of surfactants in detergent formulations [22].

* Corresponding author.

E-mail address: miguel.delaguardia@uv.es (M. de la Guardia).

and benzene in gasolines [23], but there are no precedents on its use with NIR spectrometry.

In short, the main objective of this work is the development of a fast, simple and easily automatable method for the determination of Hexythiazox in agrochemical formulations by NIR spectrometry, showing the potential of multicommutation in the way of the enhancement of the analytical throughput and the insurance of a control over the negative effects caused by those factors affecting reproducibility of NIR measurements, as it can be temperature or the presence of suspended particles and bubbles [24].

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Bruker MPA (Bremen, Germany) FT-NIR spectrometer, equipped with a quartz beamsplitter, an air cooled NIR source, an InGaAs detector and a 5 mm path length quartz micro flow cell was used for transmittance multicommutation-NIR measurements. Glass vials of 1 mL volume and 6.5 mm i.d. were used for batch measurements. The OPUS 4.2 software was used for controlling spectrometer and for the acquisition of data. The

measurements in the continuous mode were carried out with the OPUS Chromatography utility.

Two NResearch 161K031 three-way solenoid valves (Stow, MA, USA) and a PC 486 microcomputer connected by the parallel port to a Toshiba ULN2803 chip were employed in the NIR-multicommutation procedure (see Fig. 1 for manifold details and sampling pattern).

The program which controls the multicommutation set-up by switching on/off the solenoid valves was made using Quickbasic 4.5 software.

Processing of individual spectra and transient recordings (chemigram) was carried out with Omnic 6.1 software from Nicolet (Madison, WI, USA).

A Gilson Minipuls 2 peristaltic pump (Villiers-le Bel, France) with a $1.20 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1}$ polyvinyl chloride Tygon tube was employed in the multicommutation set-up to aspirate the carrier, standard and sample solutions. Flow lines were made of PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter.

A Vibromatic shaker and an Ultrasons water bath from J.P. Selecta (Barcelona, Spain) were used for mechanical and ultrasound assisted extraction assays.

A Dionex P680 High Performance Liquid Chromatograph (Sunny Vale, CA, USA), equipped with a C-18 reverse phase

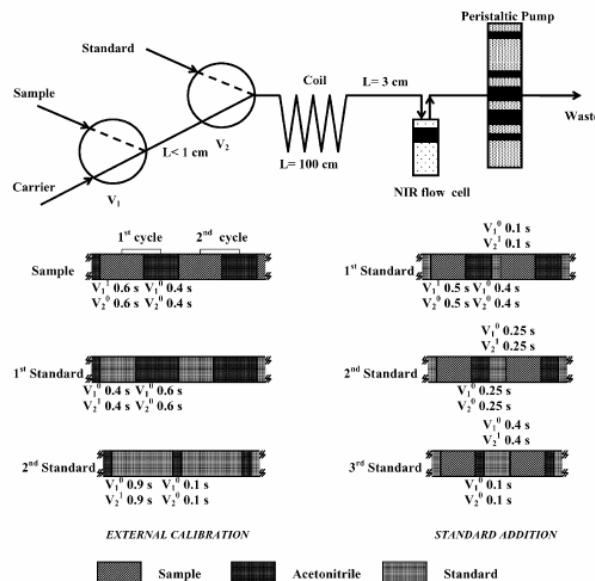


Fig. 1. Manifold employed for the determination of Hexythiazox by multicommutation-NIR spectrometry and the sampling pattern used for external and standard addition calibrations. Note: V_1 and V_2 are three-way solenoid valves. Peristaltic pump aspirates sample or standard solutions and acetonitrile carrier with a 1 mL min^{-1} flow-rate. The reaction coil was made with PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter. Standard corresponds to a 7.93 mg mL^{-1} solution of Hexythiazox in acetonitrile. Sample is the extract obtained from a 1:10 (w/w) mixture of wettable powder sample and acetonitrile. Different solutions pass through valves by switching on (bit 1)/off (bit 0) them. Sampling pattern is exemplified for external calibration and standard addition, showing the first two cycles of aspiration for each replicate. V_i^j indicate the i value in the j position ($j=1$ switched on, $j=0$ switched off).

(Kromasil) column (250 mm × 4.6 mm i.d. and 5 mm particle diameter) and an UVD 170U variable wavelength UV-vis detector, was employed in the HPLC method used as reference for determining Hexythiazox in agrochemical formulations.

2.2. Reagents and samples

Hexythiazox Pestanal® grade 99.9%, supplied from Riedel-de Haen was used to prepare standard solutions in the 3.5–18.7 mg mL⁻¹ range.

Acetonitrile HPLC, gradient grade, from Scharlau (Barcelona, Spain) was employed as a solvent to prepare standard and sample solutions.

Wettable powder commercial formulations of pesticides containing Hexythiazox were obtained from Spanish market. Representative portions from laboratory samples were taken and stored in glass containers after their homogenization by mechanical shaking.

2.3. Reference procedure

A HPLC-UV procedure has been developed in our laboratory and used as a reference method for Hexythiazox determination in pesticide formulations.

0.1 g (± 0.0001) of the wettable powder sample were accurately weighed inside a 10 mL glass vial and diluted with 1 g of acetonitrile. After a short mechanical shaking for ensuring the total extraction of the analyte from the solid matrix, the liquid was filtered. Thirty milligrams of the filtered sample solution were weighed in a glass vial and diluted with 8 g of acetonitrile. Twenty microlitres of this solution were injected in a 90:10 (v/v) acetonitrile/water mobile phase, after filtration through a 0.22 μm nylon filter, working in the isocratic mode and with 1 mL min⁻¹ carrier flow rate. Hexythiazox was determined from peak area measurements at a retention time of 6.75 min from the chromatogram obtained at 210 nm. Data from samples were interpolated in an external calibration curve obtained from five acetonitrile standard solutions of Hexythiazox (ranging from 13.16 to 55.89 $\mu\text{g mL}^{-1}$) measured in the same conditions than samples.

2.4. NIR-batch procedure

0.1 g (± 0.0001) of wettable powder samples were accurately weighed inside a 10 mL glass vial and diluted with 1 g of acetonitrile. After a short mechanical shaking, the liquid was filtered and placed inside a hermetically-capped glass vial of 1 mL internal volume and 6.5 mm i.d. The vial was introduced in a thermostatized sample holder at 30 °C and the NIR spectra between 12,000 and 4000 cm⁻¹ were acquired after 2 min for reaching thermal equilibrium with the measured sample compartment, with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and 15 accumulated scans per spectrum. The background single beam from the acetonitrile was obtained in the same conditions. For Hexythiazox measurement, it was selected the peak area values between 4948.6 and 4767.3 cm⁻¹ corrected with a one-point horizontal baseline established at 4765 cm⁻¹. Hexythiazox concentration was

obtained by interpolating peak area values of samples in a calibration line established from standard solutions ranged between 4.65 and 22.43 mg mL⁻¹ measured in the same experimental conditions.

2.5. Multicommutation-NIR and recommended procedure

Fig. 1 shows the manifold employed in the multicommutation-NIR procedure and the sampling pattern for sample and standard solutions. Valve V₁ allows the aspiration of acetonitrile (carrier) when it is switched off (bit 0) or the aspiration of the sample solution when it is switched on (bit 1). Valve V₂ introduces the standard solution (bit 1, switched on) or those, which come from valve V₁ (carrier or sample when V₂ is switched off). Switching on/off both valves with different sampling times provides the on-line mixing of all three solutions in variable ratios, allowing to get external calibration or standard addition with an unique standard solution and in the dilution range needed for each sample. The carrier solution flow rate was fixed at 1.00 mL min⁻¹ taking into consideration that the 161K031 solenoid valve support ca. 30 psi. The programmed time for sampling pattern is indicated in Fig. 1 by V_{i,j}^j notation, being i the identification of valve and j that of its position, being valves identified as j=0 and 1 for valve switched off and on, respectively.

Two strategies were suitable for multicommutation determination of Hexythiazox: external calibration and standard addition. For external calibration, each sample was aspirated by V₁ during 0.6 s and followed by 0.4 s of acetonitrile, repeating the sequence to 30 cycles, and each standard peak was obtained aspirating n s of the standard stock solution of 7.93 mg mL⁻¹ through V₂ and (1-n)s of acetonitrile through V₁. n was varied from 0.4 to 0.9 to provide a calibration line in the 3.17–7.13 mg mL⁻¹ concentration range.

3. Results and discussion

3.1. NIR spectra of Hexythiazox

Fig. 2 shows the typical NIR spectrum of a standard of Hexythiazox in acetonitrile and the spectrum of the acetonitrile extract of a commercial sample containing 10% (w/w) of Hexythiazox, using acetonitrile as a blank, obtained in the conditions specified in the NIR-batch developed procedure. As can be seen, Hexythiazox has a well-defined peak at 4859 cm⁻¹. It corresponds to the amide I and amide II bands [25]. The low solvent background between 5000 and 4500 cm⁻¹ allows using this band for the determination of Hexythiazox in samples. On the other hand, the band at 4664 cm⁻¹ is unsuitable for quantitative purposes because of the strong solvent absorbance between 4500 and 4250 cm⁻¹. No other useful bands appear in the NIR spectra between 12,000 and 4000 cm⁻¹ using a standard solution of Hexythiazox in acetonitrile.

It was evaluated the use of different measurement conditions including peak area or peak height with different baseline corrections in order to obtain an adequate sensitivity, precision and

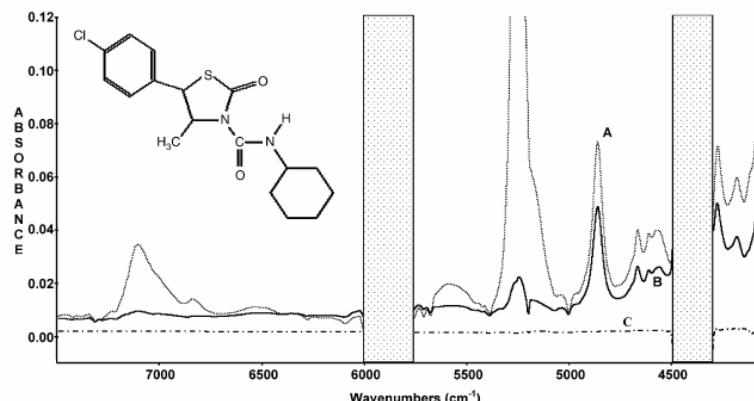


Fig. 2. NIR spectra of the acetonitrile extract (A) of a wettable powder sample, a standard (B) containing 6.8 mg mL^{-1} of Hexythiazox in acetonitrile and (C) acetonitrile blank. Hidden spectral regions are due to the high solvent background. Inset: Structural formula of Hexythiazox. Instrumental conditions: 8 cm^{-1} nominal resolution and 15 accumulated scans per spectrum.

accuracy. The peak area between 4948.6 and 4767.3 cm⁻¹ corrected with a one-point baseline established at 4765 cm⁻¹ was selected as measurement criterion for subsequent studies.

3.2. NIR-batch measurement conditions

A series of studies was carried out in order to select the experimental and instrumental conditions for NIR-batch measurements. Samples, standards and acetonitrile blank were put inside cylindrical glass vials of 6.5 mm i.d. and hermetically capped. As temperature has a great influence on the NIR spectra of Hexythiazox, it was necessary to wait for thermal equilibrium within filled glass vial and the thermostatically spectrometer vial holder before spectra acquisition. The temperature fixed for batch measurements was 30 °C, due to the difficulties to control external temperature, which was over 22 °C and sometimes over 25 °C. Two minutes were enough for reaching equilibrium. Vials were rotated before each measurement to consider the heterogeneity in the width of the glass vial walls, in order to minimize intravial and interbatch variability of data, due to the variable optical path through those.

A nominal resolution of 8 cm⁻¹ and 15 accumulated scans per spectrum were selected for spectra acquisition in the batch mode, also using a scanner velocity of 10 Hz, a zero filling factor of 2 and a Blackman–Harris 3-term apodization function for the spectra. These conditions of resolution and scan number (results not shown) were a good compromise between signal-to-noise ratio, sensitivity and acquisition time.

3.3. Hexythiazox extraction conditions

Preliminary studies on the effect of sample and solvent mass demonstrated that quantitative extraction of Hexythiazox from a

sample containing 10.5%, w/w, was reached for 1.0 g of acetonitrile and 0.1 g of the wettable powder (WP) sample. Additional studies were carried out in order to evaluate the effect of additional ultrasonic or mechanical shaking time in Hexythiazox extraction from a mixture of acetonitrile and WP sample in the aforementioned quantities. From these experiences, it can conclude that it is obtained a total extraction of Hexythiazox from pesticide samples without requiring additional shaking. So, in subsequent studies, extraction was carried out by a slightly manual shaking, for ensuring a correct mixing between solid and liquid phases.

3.4. Analytical features for NIR-batch procedure

Table 1 summarizes the main features of the NIR-batch determination of Hexythiazox, by using external calibration and standard addition, and by the reference HPLC method. The content of Hexythiazox obtained by the three methods was statistically comparable for a probability level of 95% and with a precision level suitable for quality control exigencies. A calculated $t = 1.50$ was obtained for the comparison of NIR-batch external calibration data and HPLC mean results.

Table 1
Comparison of results obtained for Hexythiazox determination by both NIR-batch procedures and by HPLC-reference method

Method	% Hexythiazox (w/w) $\pm s^a$	Calibration line slope $\pm s^b$
HPLC-reference	10.6 ± 0.1	
NIR-batch external calibration	10.47 ± 0.03	0.294 ± 0.003
NIR-batch standard addition	10.6 ± 0.3	0.301 ± 0.006

^a Standard deviation for three independent analysis.

^b Standard deviation of calibration slope.

which is lower than the theoretical $t_{(95\%)} = 2.365$. On the other hand, the Cochran test indicates that NIR-batch standard addition and HPLC results were comparable ($t_{\text{calculated}} = 0.31$, $t_{(95\%)} = 2.120$). The absence of matrix effects was proved by comparing the slope of standard addition and external calibration curves.

Results from recovery studies were in the $102.3 \pm 0.9\%$ range for the determination of Hexythiazox at three spiked levels (4.2, 8.3 and 12.4 mg) to a sample extract containing 11.15 mg mL^{-1} of the analyte, showing once again the accuracy of the developed method and the lack of systematic errors.

3.5. Selection of the multicommutation-NIR parameters

In order to increase the sampling throughput and to provide a way for the automatization of the measurement step using FT-NIR spectroscopy it was evaluated the use of multicommutation with NIR. The set-up described in the Section 2 was employed and the on-line spectra recording was made using the OPUS-Chrom application.

It was studied the effect of accumulated scans and the flow rate on the width and height of the transient peaks obtained by measuring, as a function of the time, area between 4948.6 and 4767.3 cm^{-1} , corrected with a baseline established at 4765 cm^{-1} , for the 30 s injection of sample solution in the continuous mode, using acetonitrile as a carrier. It is reasonable to use a reduced number of accumulated scans as the flow rate increases, for the maintenance of a good signal-to-time resolution. So, each flow rate value required a fixed number of accumulated scans. Fig. 3 shows the effect of the pair flow-rate/accumulated scans on the aforementioned chemigram peaks features. As can be seen, four accumulated scans provides the highest peak height and repeatability with a medium peak width. It must be noticed that for 2 accumulated scans it was used a flow of 1.56 mL min^{-1} , for 3 scans 1.26 mL min^{-1} , for 4 scans 1.00 mL min^{-1} and for 5 scans 0.73 mL min^{-1} .

So, four accumulated scans and a flow rate of 1.00 mL min^{-1} was selected as a fixed condition for subsequent studies.

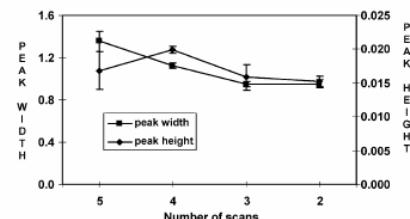


Fig. 3. Effect of the number of accumulated scans on the transient peak height and width of Hexythiazox NIR signals, for 30 cycles of aspiration per each replicate (0.5 s for the sample solution containing 7.5 mg mL^{-1} of Hexythiazox, and 0.5 s for carrier), with a coil length of 100 cm and a nominal resolution of 8 cm^{-1} . All the values correspond to the average \pm standard deviation of three replicates, and the chemigram was obtained from the area between 4948.6 and 4767.3 cm^{-1} corrected with a baseline established at 4765 cm^{-1} .

The perfect mixing of sample and standard solutions with carrier for carrying out external calibration, on-line sample dilution or standard addition, depends on the coil length and the number of insertion cycles. In this sense, a study of the effect of coil lengths from 50 to 200 cm was studied. Results obtained evidenced that a 100 cm length coil provides excellent repeatability and reduced peak width. In order to reach the steady state for the mixing phenomena, different number of cycles of 0.5 s from a sample containing 7.5 mg mL^{-1} Hexythiazox and 0.5 s of carrier (dilution 1:1) were passed through a 100 cm coil. Working in these conditions 30 s were enough for reaching the steady state (see Fig. 4A). Finally, it was studied the effect of time between successive samplings on the chemigram features. Sensitivity was constant for a time over 45 s between successive replicates of 30 cycles each one (0.5 s of sample and 0.5 s of carrier), which is the minimum time required to return the chemigram baseline to zero (results not shown). So, a coil of 100 cm length, 30 cycles of sampling and 45 s between replicates were selected as fixed conditions for the multicommutation-NIR determination of Hexythiazox.

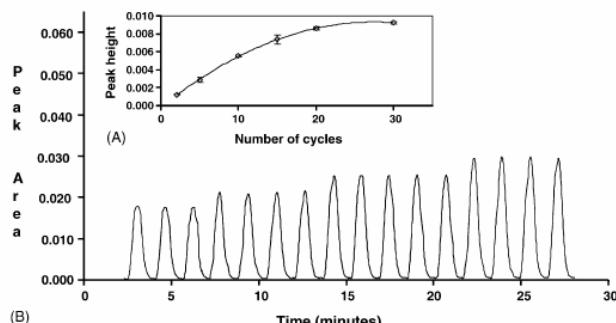


Fig. 4. (A) Effect of the number of aspiration cycles per replicate on the NIR signals found for Hexythiazox and (B) standard addition recordings found by multicommutation-NIR for Hexythiazox determination (see Fig. 1 for sampling pattern used). Experimental conditions: 4 accumulated scans, 8 cm^{-1} nominal resolution, 100 cm coil length, 1 mL min^{-1} flow-rate, aspiration cycle of 0.5 s sample and 0.5 s acetonitrile (for (B), 30 aspiration cycles and 45 s between replicates).

3.6. Multicommutation-NIR analysis of samples and on-line standard addition

The main trouble found in the NIR-batch method, developed for Hexythiazox determination, was the critical influence of temperature on the measurements. Changes in room temperature were inevitable during the development of this work, as a consequence of the spatial distribution of instruments used. So, repeatability data between days was really poor. For this reason, the multicommutation-NIR determination could improve the control over the background baseline and provide a high analytical throughput based on the use of a reduced number of standards. Data found using three replicates of two different standards, one with a concentration over the expected value for samples and the other one under the sample theoretical concentrations, sample content by interpolating sample peak height value between those obtained for the two different concentration level (3.17 and 7.13 mg mL⁻¹) peaks of standard. This strategy is suitable for quality control, where it is required a high sample measurement throughput.

Two samples were analyzed and results were calculated in the aforementioned conditions, obtaining a content of Hexythiazox of 10.7 ± 0.4 and 11.6 ± 0.1% (w/w), respectively. These values are in good agreement with those obtained by the HPLC-reference method, which were 10.5 ± 0.2 and 11.2 ± 0.3% (w/w) respectively and were statistically comparable at the 95% probability level ($t_{(95\%, 4)} = 2.776$, $t_{\text{calculated}} = 1.11$ and 1.78 for samples 1 and 2, respectively). The variation coefficients for each sample analyzed by multicommutation-NIR were 4.2 and 1.0%, respectively, which are adequate for quality control purposes.

On the other hand, multicommutation has the advantage of preparing on-line dilutions with high precision. So, it is possible to carry out standard addition in the same way than external calibration, by aspirating sample, standard and carrier in different ratios, for constant sample aspiration and total aspiration times. The use of the standard addition method could minimize the temperature effects on the NIR measurements, in spite of the absence of a matrix as indicated in Section 3.4. Fig. 4B shows the typical transient peaks obtained for Hexythiazox analysis by on-line standard addition, that corresponds to a calibration line of $\text{Signal} = 0.01782 + 0.00358C$, C being the Hexythiazox concentration added in mg mL⁻¹, with an $r^2 = 0.998$. Results obtained using standard addition were statistically comparable

Table 2
Comparison of results obtained for Hexythiazox determination by both multicommutation approaches and by HPLC-reference method

Method	% Hexythiazox (w/w) ± s ^a	Calibration line slope ± s ^b
HPLC-reference	10.5 ± 0.2	
NIR-multicommutation external calibration	10.7 ± 0.4	0.00362 ± 0.00003
NIR-multicommutation standard addition	10.6 ± 0.5	0.00358 ± 0.00004

^a Standard deviation for three independent analysis.

^b Standard deviation of calibration slope.

Table 3
Summary of the main analytical features of the NIR developed methods and HPLC-reference method used

Parameter	NIR-batch external calibration	NIR-multicommutation external calibration	HPLC-reference
LOD ^a	0.2 mg mL ⁻¹	0.1 mg mL ⁻¹	0.14 µg mL ⁻¹
% R.S.D. ^b	0.2	0.8	0.05
Throughput (h ⁻¹)	30	52	7
Waste ^c (mL)	100	100	800

^a LOD: limit of detection for $k=3$, in mg mL⁻¹ for both NIR methods and for $\mu\text{g mL}^{-1}$ HPLC-reference method.

^b % R.S.D.: relative standard deviation of a standard solution for $n=3$.

^c Waste is calculated for 100 analysis and only for the measurement process.

with those obtained by the HPLC-reference method, as can be seen in Table 2. Standard addition and HPLC Hexythiazox values obtained for sample 3 were statistically comparable based on the use of the Cochran test ($t_{\text{calculated}} = 0.89$, $t_{(95\%, 20)} = 2.086$).

Main features of NIR developed method compared with the HPLC reference method are summarized in Table 3. As can be seen, waste generation is reduced using both NIR methods, and the analytical throughput is increased in NIR methods in front of the HPLC-reference procedure.

4. Conclusion

NIR spectrometry offers a good alternative for pesticide analysis in commercial formulations in front of the use of HPLC methods, which are highly sensitive for residue analysis but involve high dilutions and low time-efficiency, which are unjustified for the concentration levels of samples. In the scope of quality control, multicommutation offers a fast and robust methodology for Hexythiazox determination in pesticide formulations providing the real-time control of the measurement process.

For the quantification of Hexythiazox by multicommutation-NIR, it was selected a calibration concentration range between 3.17 and 7.13 mg mL⁻¹, which correspond to the analysis of samples containing from 6 to 15%, w/w, being obtained a limit of detection of 0.1 mg mL⁻¹ for a sample mass of 0.1 g.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Project GV04B/247 and Grups 03-118) and Universitat de Valencia (Project UV-AE-20050203) and S. Armenta the FPU Grant of the MECD (Ref. AP2002-1874).

References

- [1] C. Llilán, Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales, Ediciones Agronómicas S.L., Madrid, 2000.
- [2] Boletín Oficial del Estado (BOE) 151, Madrid, 2003, p. 24398.
- [3] <http://www.epa.gov/EPA-PEST>.
- [4] G. Gilberto, R. Laffi, Lab-2000 (1991) 38.

- [5] A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsunura, Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Togogai, *J. Health Sci.* 46 (2000) 336.
- [6] C.L. Hetherton, M.D. Sykes, R.J. Fussell, D.M. Goodall, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2443.
- [7] A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, T. López-López, S. Cortés-Aguado, I. Martínez-Salvador, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 199.
- [8] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 33.
- [9] A. Sammio, L. Bolzoni, M. Bandini, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 161.
- [10] C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 231.
- [11] C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 201.
- [12] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, J. Manes, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 109.
- [13] A. Valenzuela, Y. Picó, G. Font, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 901.
- [14] H.N. Gu, Z.Y. Yang, J.P. Li, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 57.
- [15] T.K. McGlue, P.T. Holland, C.P. Malcolm, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 19 (1990) 267.
- [16] S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 772.
- [17] The Use of Plant Protection Products in the European Union, Eurostat, European Commission, 2002.
- [18] A.R. Casella, S. Garrigues, M. de la Guardia, R.C. de Campos, *Talanta* 54 (2001) 1087.
- [19] S. Armenta, G. Quintás, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 81.
- [20] G. Quintás, S. Armenta, A. Morales-Noé, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 11.
- [21] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.F.L.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119.
- [22] J.F. Ventura-Gayete, B.F. Reis, S. Garrigues, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Microchem. J.* 78 (2004) 47.
- [23] E. Rödema-Tornalba, J.F. Ventura-Gayete, A. Morales-Rubio, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 215.
- [24] G.J. Kemeny, In: D.A. Burns, E.W. Cinerzac, M. Dellens (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, New York, 1992, p. 53.
- [25] J.S. Shenk, et al., In: D.A. Burns, E.W. Cinerzac, M. Dellens, (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, New York, 1992, p. 383.

3. Desarrollo de métodos de análisis FT-MIR con extracción previa del analito

3.1. Determinación de methidathion y tricyclazole en aguas con preconcentración mediante SPE y elución en línea

On-line Fourier-Transform infrared determination of methidathion and tricyclazole in water samples after solid phase extraction

Josep F. Ventura-Gayete, M. Khanmohammadi, Salvador Garrigues and Miguel de la Guardia

Enviado para publicación

ON-LINE FOURIER-TRANSFORM INFRARED DETERMINATION OF METHIDATHION AND TRICYCLAZOLE IN WATER SAMPLES AFTER SOLID PHASE EXTRACTION

Josep F. Ventura-Gayete†, M. Khanmohammadi§, Salvador Garrigues‡ and Miguel de la Guardia‡ *

†Departamento de Química Analítica, Research Building, Universitat de València, 50 Dr. Moliner St., 46100 Burjassot, València, Spain.

§Department of Chemistry, Faculty of Science. Iman Khomeini International University, Qazvin, Iran.

* Corresponding author. E-mail: miguel.delaguardia@uv.es

Abstract

The potential of the application of the FTIR spectrometry coupled with solid phase extraction has been evaluated through the development of a method for the determination of methidathion and a method for the determination of tricyclazole, both in water samples, by FTIR spectrometry after on-line solid phase preconcentration. The experimental parameters for the preconcentration, elution and on-line determination of each analyte were evaluated by the corresponding studies. In the preconcentration step, 100 mL of spiked water were passed through a cartridge containing the corresponding mass of the C18 or C8 solid phase. For the elution and FTIR determination of methidathion or tricyclazole 2 mL of chloroform are enough to obtain a quantitative recovery of the pesticide. The elution step could be monitored on-line with FTIR spectrometry. The transient signal recordings for samples were interpolated in a calibration line prepared in the same conditions. The two methods were applied for spiked water samples at the mg L⁻¹ level. Although the results were in good agreement with the real content in both methods developed, the disadvantages of the on-line elution and determination as the low throughput (5-6 h⁻¹) and residue generation (700 mL per 100 determinations) avoids its application as an alternative to chromatographic methods in this analytical field.

Keywords: methidathion, tricyclazole, FTIR, on-line solid phase preconcentration.

1. Introduction

In recent years, Fourier Transform infrared spectrometry (FTIR) has been applied to the analysis of pesticides in commercial formulations by using different approaches, from the simple batch strategies [1] to the most elaborated flow-analysis methods [2,3] including multicommutated-flow systems [4].

However, in the field of environmental pollution control analysis the classical handicaps associated to the FTIR, as the low sensitivity and the reduced number of solvents suitable to be used, caused an evident lack of methods proposed for the determination of pesticide residues based on this technique, in front of the commonly used chromatography-based methods.

Most of the pesticides monitored in environmental samples are present at the mg L⁻¹ or µg L⁻¹ level, enforcing the use of high sensitivity techniques. On the other hand, a previous separation step is often necessary to increase the selectivity of the determination as well as to increase the sensitivity through the preconcentration of the analyte.

So, the efforts for the adaptation of the FTIR spectrometry to environmental analysis must be orientated to: i) improve the limit of detection and ii) to simplify the preconcentration steps.

Solid phase extraction (SPE) is a fast and simple alternative to the traditional liquid-liquid extraction [5] in order to improve the preconcentration factors and to avoid the use of large volumes of organic solvents. Because of that the hyphenation between SPE and FTIR offers a lot of possibilities, to improve the analysis of organic contaminants in water [6, 7] and food samples [8] by vibrational spectrometry.

On the other hand, the FTIR spectrometry is often coupled with on-line systems in which the continuous measurement leads to important advantages in terms of improvement of throughput and manipulation of samples. However, in some cases an off-line method could be more convenient and faster than an on-line method. So, it is necessary to evaluate the advantages and disadvantages of both off-line and on-line analytical strategies, in a specific laboratory context.

Methidathion is a non-systemic organophosphorous insecticide and acaricide which inhibes certain enzymes in the insects and mites by contact or stomach action. Methidathion is widely used for the treatment of some fruits and it is highly toxic to aquatic organisms [9]. It is available in different presentations as a wettable powder, ultra-low volume liquid and emulsifiable concentrate. Tricyclazole

(5-Methyl-1, 2, 4-triazole(3, 4-b)benzothiazole) is a systemic fungicide widely used for the treatment of some crops, specially rice [10]. The mechanism of its action is the inhibition of two fungal hydroxynaphthalene reductases of the melanin synthesis pathway which causes the degradation of the fungi cell wall and the loss of the pathogenicity [11]. Both pesticides are widely used at present day in our country.

Most of the methods developed recently for the determination of pesticides in water have been orientated to the multicomponent analysis, due to the fast evolution of chromatographic techniques coupled with Mass Spectrometry (MS) [12].

There are no precedents on the determination of methidathion or tricyclazole residues in water by vibrational spectrometry. In fact, in our knowledge there is only a direct precedent for the on-line determination of a pesticide by FTIR spectrometry [13]. So, we asked if the disadvantages of the use of FTIR spectrometry in this analytical field justified the lack of this type of analytical methods.

In this sense, the aim of this work has been the development, step by step, of two different FTIR methods, one of them for the determination of methidathion and the other for the determination of tricyclazole in water samples at the mg L⁻¹ level, studying in depth the parameters affecting the preconcentration step, both comparing the in-batch elution and determination with the on-line elution and determination for both pesticides, in order to provide an integrated approach to do this kind of analysis.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Tensor 27 FTIR spectrometer from Bruker (Bremen, Germany), equipped with a RT-DLaTGS detector and a KBr beam splitter was used to collect the whole FTIR spectra between 4000 and 800 cm⁻¹, with a scanning velocity of 10 kHz. Acquisition of spectra was made by OPUS 4.2 software from Bruker. The measurements in the continuous mode were carried out with the OPUS Chrom utility.

Processing of FTIR spectra was carried out with the Omnic 6.1a software from Nicolet (Madison, WI, USA).

For FTIR measurements a micro-flow cell (Specac-Graseby, Orpington, UK), with a ZnSe windows and an optical pathlength of 0.3 mm was employed. A Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villiers-le Bel, France) with a 1.85 mm i. d. polyvinyl chloride (Tygon) tubes was employed in the sampling setup and a Viton tube of 1 mm i.d. was used in the elution step for filling the loop with chloroform and for the elution of the pesticide (methidathion or tricyclazole) from the corresponding column. Flow lines were made of PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter in both sampling and on-line elution manifolds.

2.2. Reagents and samples

C18 SPE BondElut[®] cartridges from Varian (Middelburg, The Netherlands) containing 100 mg of solid phase were used for the preconcentration of methidathion, and C8 SPE BondElut[®] cartridges containing 200 mg of solid phase were used for the preconcentration of tricyclazole.

Chloroform HPLC grade and methanol Multisolvant[®] from Scharlau (Barcelona, Spain) were used in the elution step and FTIR determination of methidathion and tricyclazole and for the conditioning of the C18 and C8 cartridges, respectively.

Nanopure water was used to prepare standards and spiked samples and it was obtained from a Milli-Q water purifier system of Millipore (Bedford, MA, USA).

Spiked water samples were prepared dissolving directly the mass of solid methidathion technical standard (with a purity of 96.9 % (w/w)) (Artemis 2000, Artana, Castellón, Spain), or dissolving solid tricyclazole technical standard of 75 % (w/w) (Artemis 2000) in the adequate amount of nanopure water.

2.3. General procedure

2.3.1. Previous conditioning of the columns

In the method for the determination of methidathion, each column was filled with 100 mg of the C18 solid phase. Two mL of methanol were passed through the column followed by 15 mL of nanopure water, before to be used for sample preconcentration.

In the method for the determination of tricyclazole, each cartridge was filled with 200 mg of C8. Two mL of methanol were passed through the C8 column followed by 15 mL of nanopure water, and then the sample was loaded.

It must be avoided that the columns became dry since the methanol was passed through them, in order to assure the correct activation of the corresponding solid phase.

2.3.2. Retention experiments

The columns, previously conditioned, were connected for laboratory experiments, as it is shown in figure 1A. For the retention of methidathion 100 mL of samples or standards were passed through the cartridges with a flow rate of 10 mL min^{-1} . Then, the cartridges were dried with a N_2 stream during 90 min opening the corresponding valve. For the retention of tricyclazole, the C8 cartridges were previously conditioned and 100 mL of the sample were passed through each cartridge with a flow rate of 2.1 mL min^{-1} . Then, the cartridges were dried with a N_2 stream opening the corresponding valve. The drying of the columns was strictly necessary due to the well known strong infrared absorption of water in the infrared region, which interferes in the determination of both tricyclazole and methidathion.

For in-field experiments, columns previously activated can be directly connected to the peristaltic pump and employed for sampling filtered aqueous samples.

2.3.3. Batch elution and batch FTIR determination procedure

Two mL of chloroform were passed through the corresponding C18 or C8 cartridge and methidathion or tricyclazole were eluted by the solvent by pumping with a plastic syringe. Each eluate was introduced in the FTIR micro-flow cell and the FTIR spectra between 4000 and 800 cm^{-1} were collected in the stopped-flow mode with a nominal resolution of 8 cm^{-1} and accumulating 50 scans per spectrum, using a background of the cell filled with chloroform obtained in the same instrumental conditions.

For methidathion measurement it was selected the peak area values between 1038 and 996 cm^{-1} corrected with a two points baseline established between 1105 and 884 cm^{-1} . Methidathion concentration was obtained by interpolating peak area values of samples in a calibration line established from standard solutions in chloroform for 0.032 to 1.129 mg g^{-1} , measured in the same experimental conditions than samples.

For tricyclazole measurement it was selected the peak area values between 1511 and 1482 cm⁻¹ corrected with a baseline established between 1526 and 1434 cm⁻¹. Tricyclazole content in samples was obtained by interpolating peak area values of samples in an external calibration line established from standard solutions ranged between 0.056 and 0.975 mg g⁻¹ measured in the same experimental conditions than samples.

Table 1 resumes the principal FTIR parameters selected for the determination of both pesticides.

2.3.4. On-line elution-FTIR determination procedure

Each cartridge loaded with methidathion or tricyclazole was placed in the manifold as indicated in figure 1B. The 2 mL loop was filled with chloroform, taking care that no bubbles were present in the flow system. Then valves V1 and V2 were turned in the corresponding way and the pump flow was inverted. The chloroform contained in the loop was introduced in the cartridge by the bottom aperture, at a flow rate of 0.43 mL min⁻¹. When the loop was empty, the pump was stopped, inverted and switched on again with a flow rate of 0.66 mL min⁻¹ for the determination of methidathion, or at a flow rate of 0.75 mL min⁻¹ for the determination of tricyclazole. The corresponding eluate passed through the FTIR microflow cell and the transient signal was continuously collected.

In the case of the determination of methidathion, the concentration in the sample was calculated interpolating the peak area of the transient signals eluted (obtained in the same wavenumber ranges than in the batch mode) in a calibration line ranged from 3.84 to 11.51 mg L⁻¹ obtained from water methidathion standards preconcentrated in C18 cartridges and eluted in the same conditions than samples.

In the case of the determination of tricyclazole, the concentration in the sample was calculated interpolating the peak area of the transient signals eluted in a calibration line ranged from 0.00 to 6.09 mg L⁻¹ tricyclazole in water standards, preconcentrated in C8 cartridges by the same procedure used for samples in the same experimental conditions.

3. Results and discussion

3.1. FTIR spectra of methidathion and tricyclazole

3.1.1. FTIR spectrum of methidathion

Figure 2a shows the FTIR spectra of a methidathion standard in chloroform, the eluate from a cartridge loaded with an aqueous dissolution of methidathion and eluted with chloroform, and the chloroform blank. As can be seen, the main features of methidathion absorption in the mid-infrared region were the band at 1693 cm^{-1} , corresponding to the carbonyl absorption, and other present at $1589, 1252, 1280\text{ cm}^{-1}$ together with the ether characteristic group absorption at 1022 cm^{-1} [14]. All those bands were present in both, standard and eluate spectra, and thus were susceptible to be used for methidathion determination.

Table 2 summarizes different measurement criteria as peak area or peak height, different baselines, and different bands tested to determine methidathion. It can be seen that in all cases linear calibration lines were obtained. On the other hand, the use of peak area values provides at least one order of magnitude better sensitivity than peak height values. However, the carbonyl and the 1589 cm^{-1} bands were not adequate due to the strong water absorption around 1600 cm^{-1} , which can not be eliminated quantitatively even drying the cartridges for many hours.

Finally, the peak area between 1038 and 996 cm^{-1} corrected with a baseline established between 1105 and 884 cm^{-1} (see inset Figure 2a) was selected for the determination of methidathion as a good compromise between sensitivity, repeatability and limit of detection.

3.1.2. FTIR spectrum of tricyclazole

Figure 2b shows the FTIR spectra of a tricyclazole standard, the eluate from a C8 cartridge loaded with tricyclazole, both prepared in chloroform, and the chloroform blank. As can be seen, the main absorption bands of tricyclazole in the mid-infrared fingerprint region were the band at 1495.1 cm^{-1} , corresponding to the C-H absorption [14], and other fainter at 1315.3 cm^{-1} . The absorption bands present at 1600 cm^{-1} and at higher wavenumbers are due to the presence of water in the dried column which elutes together with the analyte. The region around 1200 cm^{-1} is darkened because of the strong absorption of chloroform. The band at 1495.1 cm^{-1} was present in both standard and eluate spectra, and it was susceptible to be used for tricyclazole determination.

Two measurement modes, peak area and peak height, both corrected with different baselines, were tested in order to find the most adequate conditions for tricyclazole determination. The peak area between 1511 and 1482 cm⁻¹ corrected with a baseline established between 1526 and 1434 cm⁻¹ was selected for the determination of tricyclazole in order to obtain sensitive and reproducible data.

3.1.3. Selection of the in-batch measurement parameters

The effect of the number of accumulated scans per spectrum and the effect of the nominal resolution on the peak area selected were evaluated for both methidathion and tricyclazole using the corresponding standards prepared in chloroform. The results indicated that the accumulation of a great number of scans increases the measurement precision. However, the acquisition time increases with the number of scans and thus, it was necessary to select a compromise value between measurement time and precision. So, it was selected 50 accumulated scans for carrying out the subsequent studies for both experimental procedures.

About the effect of the nominal resolution in the peak area, it was found a strong decrease in the IR signals for both methidathion and tricyclazole on increasing the nominal resolution, and so, it was selected a nominal resolution of 8 cm⁻¹ as a measurement condition for the two different in-batch determinations of methidathion and tricyclazole.

On the other hand it is clear from spectra recordings in Figure 2 that the correct drying of the C18 and C8 cartridges loaded with methidathion and tricyclazole respectively was strictly necessary to avoid important errors in the quantification of the corresponding pesticide. For this reason it is recommended to dry the loaded cartridges during a minimum time of 90 min.

3.2. Effect of the experimental parameters for the retention of methidathion and tricyclazole

3.2.1. Mass of solid phase

Previous studies evidenced a strong retention of methidathion at the mg L⁻¹ level by the C18 phase from water samples. So, it was decided to use C18 as the unique solid phase in the subsequent assays. Table 2 shows the effect of the amount of C18 in the cartridge on the recovery of methidathion, using a fixed volume of chloroform (2 mL) for elution. The increase in the C18 mass produced a decrease in the recovery of methidathion. However it was confirmed that this behaviour affects the elution process and

not the retention one, which is approximately the same in the 100-500 mg range assayed. For a column loaded with 100 mg of C18, 2 mL of chloroform were enough for eluting 96 % of methidathion, but not in the case of using 500 mg C18. So, it was selected 100 mg of C18 for ensuring the elution of methidathion with only 2 mL of chloroform.

On the other hand, preliminary studies evidenced a strong retention of tricyclazole by the C8 solid phase at the mg L⁻¹ level from water samples. So, it was decided to use C8 as the unique solid phase in the subsequent essays for the determination of tricyclazole. The recovery of tricyclazole reaches a maximum for 200 mg of C8 mass (results not shown). For a column loaded with 200 mg C8, 2 mL of chloroform were enough for eluting all the tricyclazole, but for 500 mg of C8, it was necessary a high volume of solvent for a quantitative elution of tricyclazole. So, it was selected 200 mg of C8 for ensuring the elution of tricyclazole with only 2 mL of chloroform.

3.2.2. Effect of salt addition

The effect of the ionic strength in the retention of methidathion on C18 columns was studied using samples with 0.00-6.05 % (w/w) of added NaCl and other samples with 0.00-6.04 % (w/w) of NaNO₃. Results evidenced that the saline concentration did not affect the retention of methidathion in the C18 column in all cases. So, the addition of salt to samples seems unnecessary for achieving the complete retention of methidathion from samples at mg L⁻¹ level.

The retention of tricyclazole on C8 columns is not affected by the ionic strength of sample, as it was studied using samples with 1.01-7.08 % (w/v) NaCl. So, the addition of salt to samples is unnecessary for achieving the complete retention of tricyclazole using 200 mg of solid phase and a sampling volume of 100 mL.

3.2.3. Effect of the mass of analyte

Different volumes from a water sample containing 7.59 mg L⁻¹ of methidathion were passed through cartridges containing 100 mg of C18 at a flow rate of 10 mL min⁻¹ and eluted in all cases with 2 mL of chloroform. As can be seen in Figure 3, the recovery of methidathion strongly depends on the amount of pesticide loaded in the cartridge which must be equal or lower than 2.94 mg to guarantee the quantitative retention of the pesticide in 100 mg of solid phase. So, it can be established a mass of 2.94 mg of methidathion per 100 mg of C18 as the saturation value. On the other hand it was confirmed a

linear correlation between absorbance and the volume of sample loaded for the range between 0 and 400 mL of a sample containing 7.59 mg L⁻¹ of methidathion with an equation Y(peak area)= (0.00894 ± 0.00008)V(mL) – (0.01 ± 0.02), R²= 0.9991. In order to decrease sampling time, it was decided to use 100 mL of samples for practical purposes.

The saturation of 200 mg of C8 was achieved for 2.3 mg of tricyclazole (0.012 mg tricyclazole / mg C8). In order to decrease sampling time, it was decided to preconcentrate only 100 mL of samples.

The calibration line was obtained for tricyclazole standards prepared in chloroform in the 0.00-0.97 mg g⁻¹ concentration range using peak area measurements corrected with the baseline indicated previously.

3.2.4. Effect of the sampling flow rate

Sampling flow rate in SPE is a critical parameter since the physical interaction between the analyte to be preconcentrated requires the diffusion of the sample into the solid phase. So, the extraction of methidathion could be affected by the flow rate in the experimental conditions we used. Different sampling flow rates (from 1.6 to 10 mL min⁻¹) were assayed for the preconcentration of 100 mL aliquots of a sample containing 7.95 mg L⁻¹ methidathion. The recovery of methidathion was constant in the aforementioned range. It can be concluded that this behaviour was due to the high affinity of methidathion for the unpolar C18 phase. So, it was selected a sampling flow rate of 10 mL min⁻¹ for carrying out the preconcentration in order to reduce the sampling time, although the precision was better with small flow rates.

The analysis of samples spiked with methidathion using the aforementioned experimental conditions in the recommended FTIR batch procedure shown quantitative recovery for methidathion concentrations in the 3.15-8.28 mg L⁻¹ range. On the other hand, the repeated use of the same cartridges for 10 times in the preconcentration step did not result in a decrease of methidathion recovery nor in a cross sample contamination if the previous conditioning was carried out properly.

Different sampling flow rates from 0.2 to 2.1 mL min⁻¹ were used to preconcentrate 100 mL aliquots of a sample containing 5.81 mg L⁻¹ tricyclazole. The recovery of tricyclazole was constant in this range. It can be concluded that this behaviour was due to the high affinity of tricyclazole for the unpolar C8 phase. So, it was selected a sampling flow rate of 2.1 mL min⁻¹ for carrying out the preconcentration with the shortest sampling time, although the precision of measurements increased on reducing the sampling

flow rate. It is noticeable the great difference in the range of flow-rates which guarantees the complete retention for methidathion and that for tricyclazole. In this sense, methidathion is easily separated from water with C18 with minimum experimental requirements, whereas the retention of tricyclazole with C8 is more sensitive to the experimental conditions due to the differences in the chemical structure of both pesticides and their interaction with each solid phase.

The analysis of samples spiked with tricyclazole using the aforementioned experimental conditions in the recommended FTIR batch mode provided recovery values around 100 %.

3.3. Flow system characteristics and effect of the on-line elution parameters

Figure 1B shows the manifold employed for the on-line elution and FTIR on-line determination of methidathion from C18 cartridges and that of tricyclazole from C8 cartridges, all of them loaded in the corresponding selected experimental conditions. To carry out the on-line elution, a fixed volume of solvent, measured in a loop, was introduced from the bottom of the column at a very slow flow-rate, and then eluted through the FTIR micro-flow cell and the transient signal, corresponding to the peak area values between 1038 and 996 cm⁻¹ corrected with a baseline established between 1105 and 884 cm⁻¹ in the case of the determination of methidathion, and the peak area values between 1511 and 1482 cm⁻¹ corrected with a baseline established between 1526 and 1434 cm⁻¹ in the case of the determination of tricyclazole, was recorded. In this way, the formation of bubbles in the system was minimized, because the air present in the interstices of the solid phase was displaced by the solvent raising on. Additionally, the first point of the transient signal recording corresponded to pure chloroform thus providing a good baseline and the elution peak was clearly depicted from the beginning to the end of the continuous record.

The area of the corresponding elution peaks was used for the determination of both analytes. On comparing the proposed batch approach with the continuous elution with fresh solvent, it can be concluded that the selected conditions reduce strongly signal instability and bubble formation.

Previous studies evidenced that 10 accumulated scans per spectrum was the best condition for the acquisition of the transient signals for both pesticides. The accumulation of a big number of scans resulted in a loss of information and the use of a reduced number of scans accumulated resulted in a bad signal-to-noise ratio.

To avoid the bubbles formation in the flow system, it was necessary to introduce the chloroform from the bottom of the column, slowly to displace the air from the solid phase. Some tests were done to select an adequate filling flow-rate, and it was finally selected a flow-rate of 0.43 mL min^{-1} , thus consuming 4.7 min in that filling process, for the determination of methidathion and for the determination of tricyclazole, as the effect of the different selected mass of solid phase in the column did not affect the filling process.

On the other hand, the elution flow-rate was critical to obtain an appropriate sensitivity and repeatability. It was found that an elution flow-rate of 0.66 mL min^{-1} produced the narrowest and sufficiently high peaks for the methidathion determination. So it was selected as a fixed experimental condition for the on-line determination of methidathion. Surprisingly, for tricyclazole determination it was found that an elution flow-rate of 0.75 mL min^{-1} gave the best results (see Figure 4). This difference is not obvious because the different mass of solid phase present in the case of the determination of methidathion and in the determination of tricyclazole could compensate the effect of the different polarity of the solid phase in both determinations.

3.4. Analytical figures of merit of the on-line elution-FTIR determination

Figure 5 shows the transient signals corresponding to the on-line calibration used for methidathion determination. Diagram peak height and peak area were tested to establish the calibration line. The calibration line obtained using the peak area provided a LOD of 0.3 mg L^{-1} , which is of the same order than the limit value accepted by the Spanish law in fresh waters which corresponds to 0.1 mg L^{-1} [15]. Two different samples were analysed by the recommended on-line SPE preconcentration FTIR method. Sample 1, which was spiked with methidathion to a concentration of 7.67 mg L^{-1} , gave a content of methidathion of $7.5 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$, and sample 2, which was spiked to 7.70 mg L^{-1} , gave a content of methidathion of $8.0 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$. So, we obtained relative errors of -2.2 and 3.9 % respectively, which were acceptable considering the variability inherent to the preconcentration step.

On the other hand, for the determination of tricyclazole the calibration line obtained using the elution peak area provided a LOD of 0.1 mg L^{-1} . A sample containing 6.09 mg L^{-1} tricyclazole was analysed by the recommended on-line elution-FTIR procedure being found a content of tricyclazole of $6.10 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$, for three independent replicates. So, provides a relative error of 0.2 % which is acceptable considering the variability inherent to the preconcentration step.

3.5. Critical comparison between FTIR in-batch and FTIR on-line determinations

On comparing the features of the on-line process with those found in batch it can be seen that the FIA procedure provides a reduced sensitivity and a LOD four times higher than that obtained in batch for the determination of methidathion (see Table 3). However, for the determination of tricyclazole the LOD is slightly improved by the on-line procedure, although this improvement does not justify the application of the on-line procedure. Additionally, the repeatability of the analytical measurements, the sampling throughput and the generation of waste were affected by the lack of reproducibility of the on-line elution process as compared by the batch methodology. So, for the FTIR determination of methidathion and for the FTIR determination of tricyclazole the batch strategy seems to be the best election and it must be noticed that, in this case, the corresponding LODs are around the tolerance value and pure chloroform solutions of methidathion or tricyclazole can be used for external calibration.

In that point, it can be asked what advantages offers the use of the FTIR spectrometry in front of the typical chromatographic methods for the determination of this kind of analytes in water samples. We concluded that this FTIR strategy, though potentially useful for concrete applications in this field, does not fulfil the requirements of the pesticide residue analysis, due to the hard limitations in terms of sensitivity, the difficulty of avoiding interferences and the lack of multicomponent facilities. Only it could be possible to apply our FTIR developed methods for the analysis of waste waters from industrial activities, in order to control the presence of small amounts of methidathion or tricyclazole in their corresponding manufacturing process steps.

4. Conclusions

Two different FTIR methods for the determination of methidathion and tricyclazole in the mg L⁻¹ concentration level have been developed to evaluate them as a possible alternative to the classical chromatographic ones. The use of C18 and C8 for SPE coupled with FTIR determination offers exciting possibilities for the separation of non-polar compounds from polluted waters and enhances the LOD values of the vibrational spectrometric methods till the level tolerated by the environmental legislation. Results obtained for spiked samples containing the analytes at the mg L⁻¹ level were in good agreement with the real concentration. However, the disadvantages intrinsic to this FTIR strategy reduce the application of the developed methods to specific control analysis in the pesticide industry.

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) and Universitat de València (Project UV-AE-20050203).

References

- [1] S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 257.
- [2] M. Gallignani, S. Garrigues, A. Martínez-Vado, M. de la Guardia, *Analyst* 118 (1993) 1043.
- [3] A. R. Cassella, S. Garrigues, R. C. de Campos, M. de la Guardia, *Talanta* 54 (2001) 1087.
- [4] J. F. Ventura-Gayete, S. Armenta, S. Garrigues, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta*, in press.
- [5] S. Mitra, (Ed), Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, in: Chemical Analysis vol 162, J. D. Winefordner (ed), Wiley-Interscience, 2003.
- [6] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 203.
- [7] A. Colume, J. Diewok, B. Lendl, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 835.
- [8] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. T. Vidal, M. de la Guardia, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1086.
- [9] <http://extoxnet.orst.edu/pips/methidat.htm>
- [10] M. J. Kawai, *Pesticide. Sci.* 14 (1989) 407.
- [11] M. J. Butler, R. B. Gardiner, A. W. Day, *Biological Control* 32 (2005) 326.
- [12] M. Petrovic, S. González, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685.
- [13] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 203.
- [14] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, London, 1991.
- [15] Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.

Legend of figures

Figure 1. Manifold employed for SPE-FTIR determination of methidathion or tricyclazole in waters. 1A. Set-up used for the preconcentration of the analytes. Note: four samples or standards were aspirated with the peristaltic pump and passed through the activated C18 or C8 cartridges. When the selected volume of sample was passed through the column, the valves V were opened and the nitrogen stream dried the cartridges during ca.90 min.

1-B. Flow-system employed for the on-line elution and FTIR determination of methidathion or tricyclazole. Note: the loop was filled with chloroform with the peristaltic pump, and the chloroform background was collected using the bypass from valves V1 and V2. Then valves V2 and V1 were turned and the sense of the pump was inverted, being inserted the solvent in the cartridge with a flow rate of 0.43 mL min^{-1} . Valve V2 was turned and the pump inverted using a flow rate of 0.66 mL min^{-1} in the case of the determination of methidathion or 0.75 mL min^{-1} in the case of the determination of tricyclazole. The corresponding analyte was eluted from the cartridge and passed through the FTIR micro-flow cell. Finally, fresh chloroform was introduced continuously in the cartridge from the upper side for cleaning the cartridge and to recover the chloroform baseline.

Figure 2a. FTIR stopped-flow spectra of methidathion. A) a 0.63 mg g^{-1} standard of methidathion in chloroform, B) an eluate obtained from the preconcentration in a C18 cartridge of 100 mL of a water sample containing 7.95 mg L^{-1} of methidathion eluted with 2 mL of chloroform and C) a chloroform blank. Measurement conditions: 50 scans accumulated per spectrum and 8 cm^{-1} nominal resolution. Inset: spectral region selected for the quantification of Methidathion.

2b. FTIR stopped-flow spectra of tricyclazole. A) a 0.65 mg g^{-1} standard of tricylazol in chloroform, B) an eluate obtained from the preconcentration, in a C8 cartridge, of 100 mL of a water sample containing 6.09 mg L^{-1} of tricyclazole eluted with 2 mL of chloroform and C) a chloroform blank. Measurement conditions: the same than in 2a.

Note: the spectra were displaced on the Y-axis for a clear identification.

Figure 3. Effect of methidathion mass on its recovery from aqueous solutions. Experimental conditions: different volumes from 100 to 2000 mL of a 7.59 mg L^{-1} methidathion solution were preconcentrated in a SPE cartridge containing 100 mg C18 , with a loading flow rate of 10 mL min^{-1} . Measurement conditions as indicated in Figure 2.

Figure 4. Transient signal recordings obtained for the on-line elution of tricylazole at different flow rates. Note: samples were previously retained on C8 cartridges corresponding to 100 mL of 6.09 mg L⁻¹ solutions. The measurement conditions were: 10 accumulated scans per spectrum and 8 cm⁻¹ of nominal resolution. The recordings were obtained independently and graphically treated to eliminate the effect of some small bubbles on the shape of the fiagram peaks.

Figure 5. Typical transient signal recordings obtained for the elution of methidathion previously retained on C18 cartridges, corresponding to standards prepared in water with concentrations in the 0.00-11.51 mg L⁻¹ range. The elution flow rate was fixed at 0.66 mL min⁻¹. The recordings were obtained independently and graphically treated for eliminating the effect of small bubbles in the shape of the fiagram peaks.

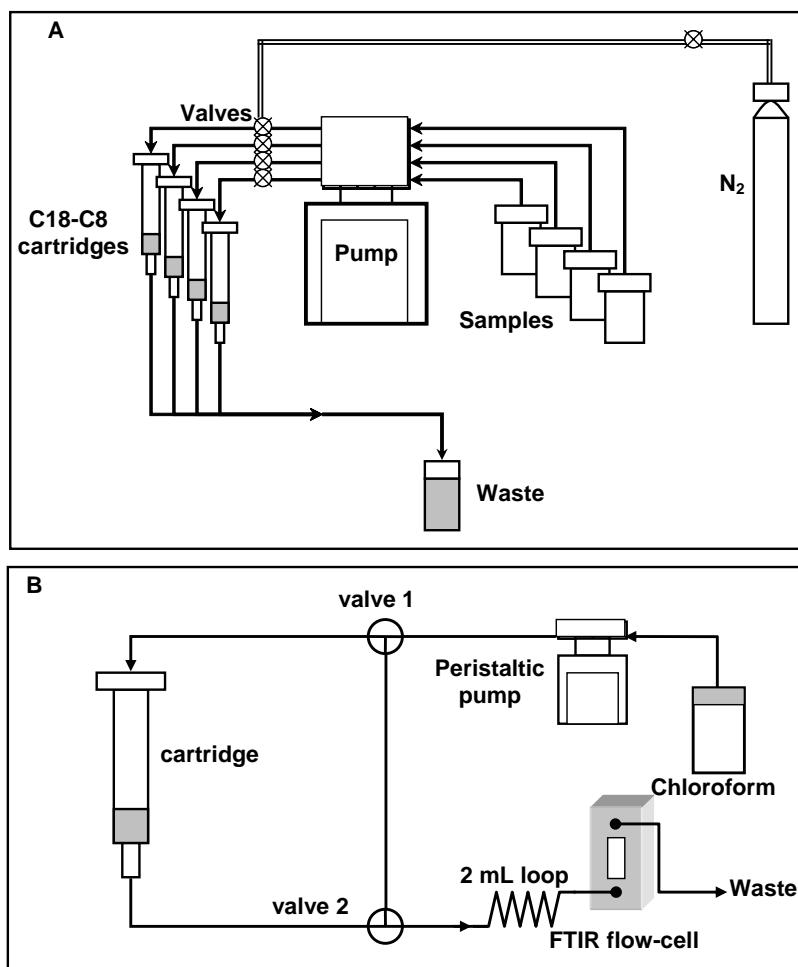


Figure 1.

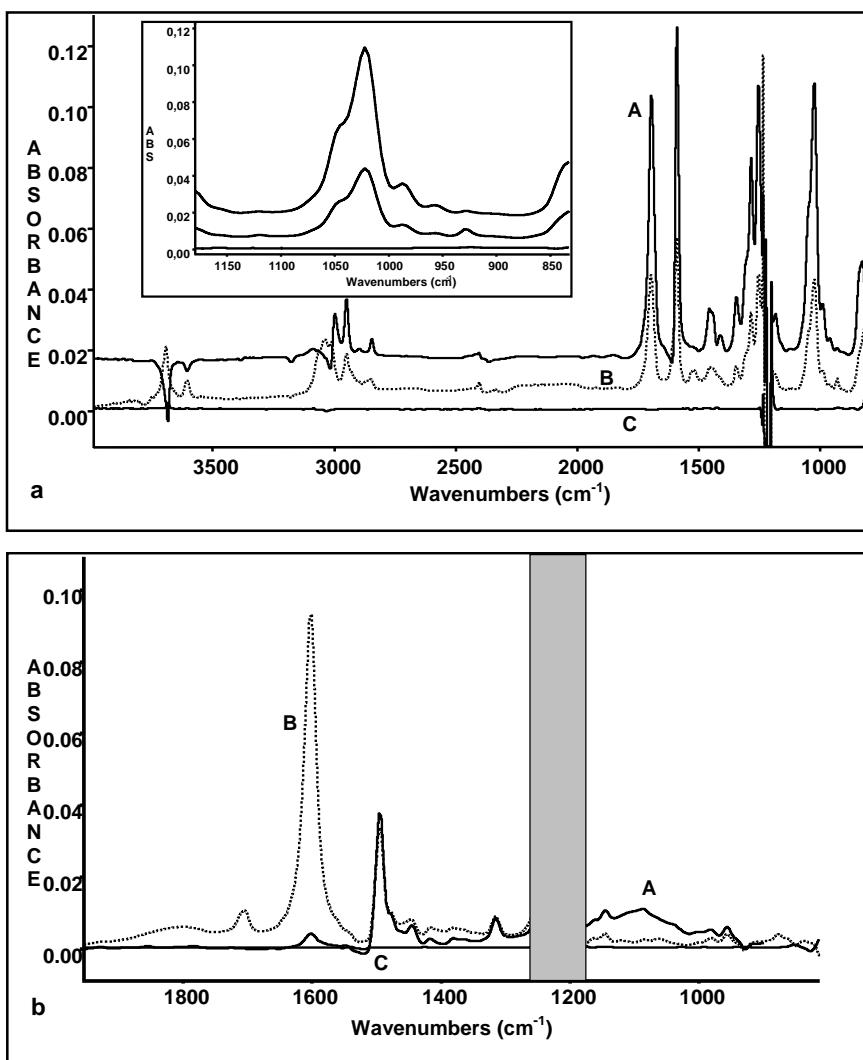


Figure 2.

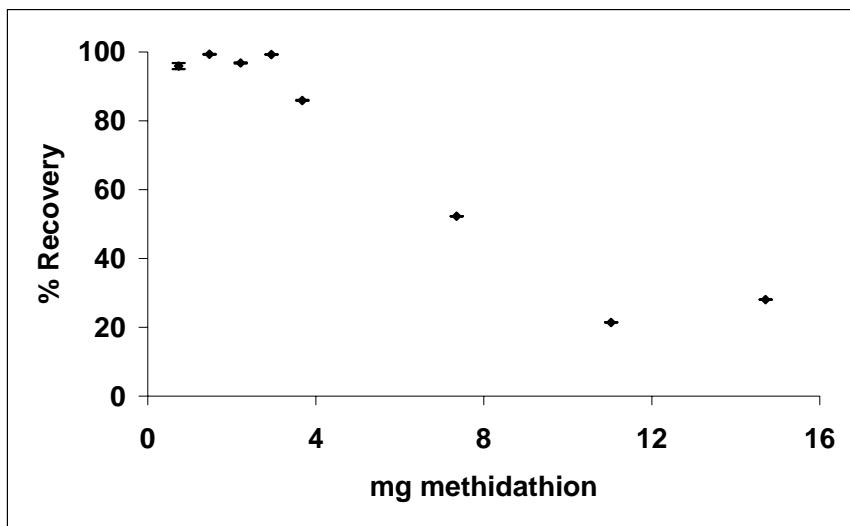


Figure 3.

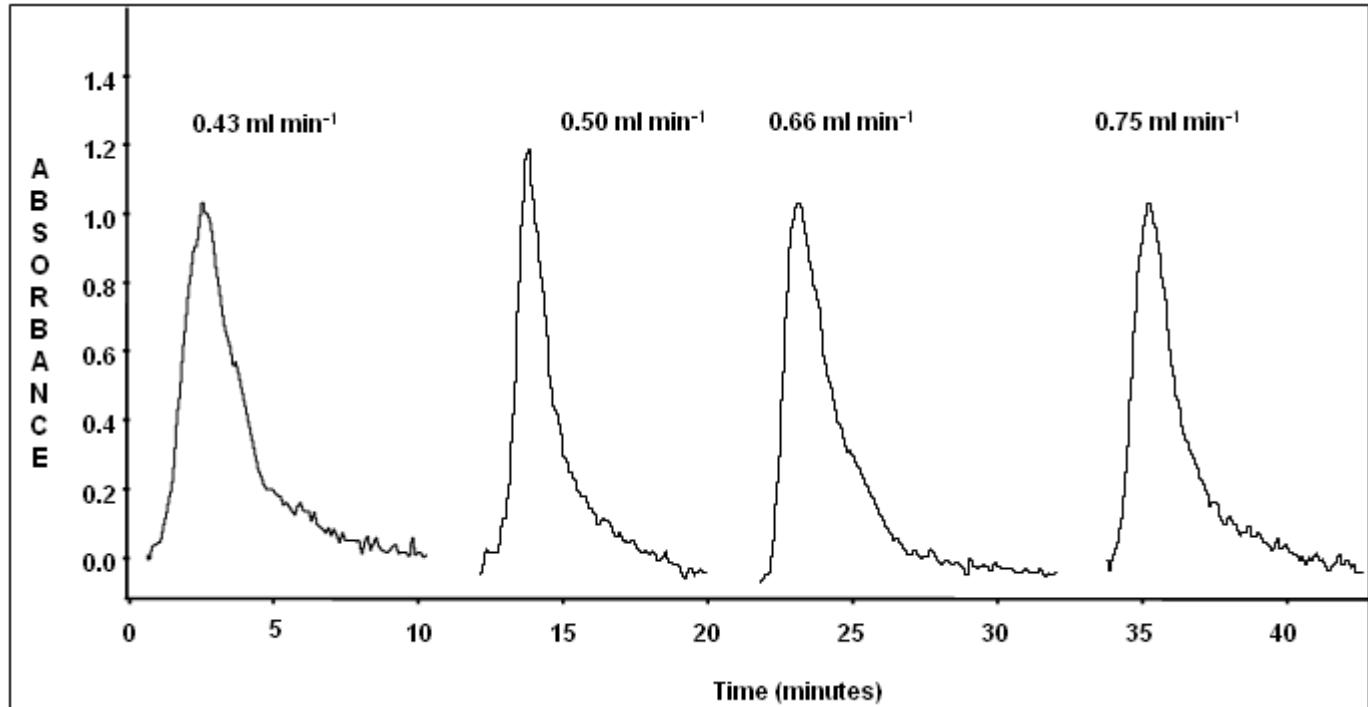


Figure 4.

Figure 5.

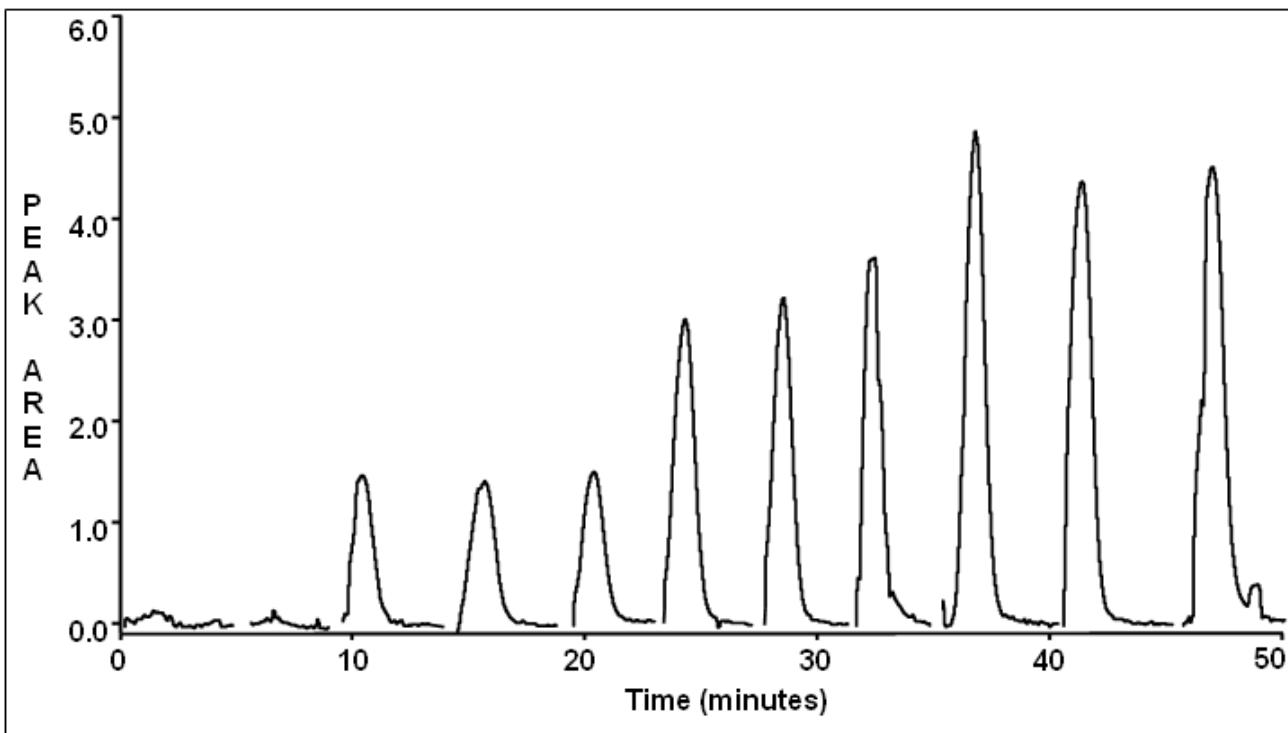


Table 1. FT-IR spectrometer measurement conditions used in the in-batch and on-line methods for the determination of methidathion and tricyclazole in water samples.

Spectrometer Parameter	Value
Aperture (mm)	6
Gain	8
Scanner velocity (kHz)	10
Number of scans per spectrum	in-batch= 50 on-line= 10
Resolution (cm ⁻¹)	8
Spectral window (cm ⁻¹)	4000-600
Apodization	Blackman-Harris 3-Term
Zero filling factor	2

Table 2. Analytical characteristics of the FTIR determination of methidathion using different bands and measurement criteria.

Selected region (cm^{-1})	Baseline (cm^{-1})	$y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b)C, \text{mg g}^{-1}$		R^2	*RSD %	*LOD mg L^{-1}
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$			
Peak Area: 1742-1658	1800-1500	0.020 ± 0.007	4.092 ± 0.013	0.9997	0.04	0.09
Peak Area: 1713.3-1674.3	1800-1500	0.017 ± 0.006	3.342 ± 0.012	0.9997	0.03	0.06
Peak Area: 1742-1658	1800-1382	0.037 ± 0.009	4.094 ± 0.017	0.9996	0.06	0.09
Peak Height: 1694	1800-1500	0.0008 ± 0.0003	0.1314 ± 0.0005	0.9996	0.02	0.03
Peak Area: 1038-996	1105-884	0.024 ± 0.007	3.592 ± 0.013	0.9997	0.04	0.07
Peak Area: 1100-940	1105-884	0.041 ± 0.011	5.89 ± 0.02	0.9997	0.06	0.10
Peak Height: 1022.3	1105-884	0.0009 ± 0.0003	0.1366 ± 0.0005	0.9997	0.07	0.04
Peak Area: 1269-1297	1325-1269	0.0034 ± 0.0011	0.8404 ± 0.0019	0.9998	0.29	0.14

* Relative standard deviation of three replicate analysis of a standard solution containing 0.63 mg g^{-1} .

^b Limit of detection calculated for n=10 and a probability level of 99.6 %.

Note: the standards were prepared in the $0.032\text{--}1.129 \text{ mg g}^{-1}$ concentration range. Measurement conditions: 50 scans accumulated per spectrum and 8 cm^{-1} nominal resolution.

Table 3. Analytical features for the FTIR developed methods for the determination of methidathion and tricyclazole by the in-batch and on-line procedures.

Feature	FT-IR batch determination		FT-IR on-line determination	
	methidathion	tricyclazole	methidathion	tricyclazole
Calibration line	$Y = (0.024 \pm 0.007) + (3.592 \pm 0.013)C_s (\text{mg g}^{-1})$	$Y = (0.062 \pm 0.012) + (2.34 \pm 0.03)C_r (\text{mg g}^{-1})$	$Y = (0.18 \pm 0.07) + (0.393 \pm 0.010)C_s (\text{mg L}^{-1})$	$Y = (0.09 \pm 0.04) + (4.88 \pm 0.08)C_r (\text{mg L}^{-1})$
R ²	0.9997	0.997	0.992	0.997
^a RSD %	0.04	0.15	2.83	3.3
^b LOD	0.07	0.2	0.3	0.1
Throughput h ⁻¹	12	12	6	5
^c Waste mL	200	200	700	700

^a Relative standard deviation of a standard solution for n=3.

^b Limit of detection for k=10, expressed in mg L⁻¹.

^c Volumes calculated for 100 replicates.

3.2. Determinación de grasa en leches en polvo con extracción presurizada con disolvente

Pressurized solvent extraction-Fourier Transform Infrared determination of fat

Josep F. Ventura-Gayete, Salvador Garrigues, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Enviado para publicación

PRESSURIZED SOLVENT EXTRACTION-FOURIER TRANSFORM INFRARED DETERMINATION OF FAT

Josep F. Ventura-Gayete, Salvador Garrigues, Agustín Pastor
and Miguel de la Guardia*

*Departamento de Química Analítica, Research Building, Universitat de València,
50 Dr. Moliner St.,
46100 Burjassot, València, Spain.*

* Corresponding author. E-mail: miguel.delaguardia@uv.es

Abstract

A new method for fast determination of fat content in dried milk samples has been developed using Pressurized Solvent Extraction (PSE) and mid-Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry. The proposed method improves analytical throughput (12 h^{-1}), reagents consumption (12 mL per replicate) and waste generation in front of classical gravimetric methods. Results obtained shows that FTIR method is applicable to whole dried milk samples (error lower than 2 %), but not to skimmed dried milk samples. Analysis of other kind of feed with PSE-FTIR method were carried out, and results demonstrated that extraction in the previously selected conditions for dried milk samples was not complete and FTIR determination is not reliable for these feed products.

Keywords: milk, FTIR, pressurized solvent extraction, feed.

1. Introduction

The fat content plays an important role in the nutritional characteristics of milk, and subsequently, in its quality. Moreover, the milk quality is commonly estimated as a factor of fat, lactose, protein, bacterial and somatic cells percentage, so these parameters are linked with the final price of the commercial product [1]. The effect of dietary intake of fats and oils in human health is controversial, and it has been suggested a linkage between coronary disease and some fatty acids intake. On the other hand, fat adulteration of foods is a common practice which requires specific control methods.

The traditional methods for the determination of fat in milk are based in i) gravimetry, ii) other physical assays, iii) turbidimetry, and iv) spectrometry.

The classical reference gravimetric methods used for fat determination in milk as Röse-Gottlieb or Mojonnier methods are time-spending and tedious, with high reagent consumption and waste generation because it is necessary to carry out some series of successive extractions with organic solvents. For example, the AOAC recommended modified Mojonnier method requires the dissolution of casein with NH₄OH, addition of ethanol and ethyl ether, shaking, addition of petroleum ether and centrifugation for the first extraction, the same except ammonium hydroxide for the second extraction and only extraction with ethers for the third extraction. Finally, ether extracts are put together and dried to constant weight [2].

Modifications of gravimetric methods for fat determination in feed include supercritical fluid extraction [3], ultrasound-assisted extraction [4], and accelerated or pressurized solvent extraction [5, 6], which involve long-time stages inherent to the extraction methodology, but eliminates the tiresome hydrolysis stage.

Babcock reference method consists in the milk-acid reaction with H₂SO₄ and separating the fat by centrifugation, measuring total fat content in a graduated Babcock or alternative test bottle [7]. This method implies a strict control of temperature and it lacks chemical information about the fat which is being determined.

The turbidimetric reference method is based in the light dispersion caused by fat globules after elimination of casein micelles with EDTA [8].

The AOAC mid-IR spectroscopic method for the determination of fat, lactose, protein and total solids is based on the specific absorption of the corresponding characteristic functional groups. The milk sample is measured directly in the IR-cell and fat content is calculated by means the absorbance of the CH (fat B) peak at 2873 cm⁻¹ and the carbonyl peak (fat A) at 1747 cm⁻¹, using partial least squares (PLS) calibration for quantification [9].

The method proposed by Priego-Capote *et al* uses focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to the trans-fatty acids determination by FTIR-ATR measurements. This method is based in the AOCS Recommended Practice Cd 14d-96. The volume of solvent (n-hexane) used for the extraction is 125 mL, and the mass of sample is 4 g. The extraction is complete for 7-12 cycles, depending on the type of sample analyzed (bakery products). After extraction, solvent is evaporated and the traces are removed with a nitrogen stream. Trans-fatty acids content is determined using the peak at 966 cm⁻¹ [10].

Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) has been applied to the determination of oils and greases in diverse matrices. This technique offers advantages as the high signal-to-noise ratio, the multiplex and reduced scan time, improving the limited yield of dispersive instruments. So, several methods for oil determination in soil and water samples take advantage of FTIR, differing in what extraction technique is used. Daghbouche *et al* [11] had determined oils and greases in water samples by FTIR spectrometry, using liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) and microwave assisted extraction (MWAE). The absorbance spectra for the extracts were measured and the total peak area from 3058-2780 cm⁻¹ was taken as the analytical parameter. The baseline was measured from 3200-2700 cm⁻¹.

In recent years, Pressurized Solvent Extraction (PSE) or Accelerated Solvent Extraction (ASE) based strategies had been developed for reducing time and solvent consumption typical of traditional extraction techniques as the Soxhlet. In these approaches, the extraction is improved using high temperature which increases the dynamical interchange of the analyte between matrix (solid or semisolid) and the organic solvent phase. High pressure ensures the maintenance of solvent in the liquid state at working temperature (typically 50-200 °C). PSE and ASE were applied to a wide variety of samples and analytes, including the determination of total lipids in poultry meat [12], oxysterols in egg-containing food [13], gestagens in kidney fat [14], PCB's in fat containing matrices [15], oils in contaminated soil [16], and several others as chlorinated pesticides in animal feed [17] or organotin, organolead and organomercury in soil [18], showing the enormous versatility of this extraction technique.

The objective of this work is to show the advantages of coupling PSE extraction with FTIR determination of total fat in dried milk samples, resulting in an improvement in analytical frequency and a reduction in waste generation and reagents consumption. Moreover, the FTIR discrimination of fats from different feed is investigated, analyzing a wide variety of feed from dried milk to fish tissue and nuts. Spectral characteristics of fat from diverse origin were pointed out. The developed PSE -FTIR method requires small solvent volumes and is completed in a few minutes, allowing a fast, accurate and environmentally friendly determination of fat in whole dried milk.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A fast-PSE from Applied Separations (Allentown, PA, USA), with nitrogen as a purge gas and a pump flow rate of 100 mL min⁻¹, furnished with 11 mL stainless extraction vessels and collection vials of 60 mL, was used for the extraction stage.

A Tensor 27 FTIR spectrometer from Bruker (Bremen, Germany), equipped with a RT-DLaTGS detector and a KBr beam splitter was used to collect the whole FTIR spectra between 4500 and 800 cm⁻¹, with a scanning velocity of 10 kHz. Acquisition of spectra was made by OPUS 4.2 software from Bruker.

Processing of spectra was carried out with the Omnic 6.1a software from Nicolet.

2.2. Reagents and samples

Hexane (fraction from petroleum) Multisolvent[®] from Scharlau (Barcelona, Spain), dichloromethane p. a. (>99%) from Fluka (Buchs, Switzerland) and methanol from Panreac (Barcelona, Spain) were used for preparing the 3:2:1 extraction mixing.

Petroleum ether (40-60°C fraction) and diethyl ether (BHT stabilized) from Scharlau (Barcelona, Spain) were used in the reference method for extracting fat from dried milk samples and for the determination of fat in chocolate. A series of commercial samples were analysed by the proposed method. Non-manufactured hazelnuts and walnuts were homogenized in a mortar for obtaining samples. Liofilized salmon, bacon and chicken were supplied by our laboratory samples service, and samples were prepared by homogenizing tissues in a mortar. Chocolate samples were from Spanish market, with the cacao content in the 43-99 % (w/w) range.

Fat standards from 0.1 % to 4.7 % (w/w) were prepared by weighing a stock fat obtained from a pool of whole milk samples extracted by the reference method and diluting with the adequate extraction mixing solvent.

Chocolate fat standards from 2.11 % to 12.0 % (w/w) were prepared by weighing a stock fat obtained from a pure chocolate sample (99 % w/w) extracted by the PSE gravimetric method and diluting with the adequate volume of petroleum ether.

2.3. Recommended PSE-FTIR procedure for fat determination in dried milk

Weigh accurately 1.7500 g of sample and mix in a mortar with approximately 5.0 g of Ottawa sand as a dispersing agent. Place the disk filters in the 11 mL internal volume stainless extraction vessels and fill them with the sample mixture. Fill one of these extraction vessels only with Ottawa sand in order to obtain the blank. Refill the vessels with sand to complete internal volume and cap with glass wool. Weigh accurately the empty 60 mL collection vials with a precision of 0.1 mg. Then run the extraction programme, completing 3 static cycles consisting in: a) 2 min vessels preheating at 80 °C and 50 bar of pressure, b) filling the vessels with the extraction solvent; c) 1 min static maintenance of solvent at 80 °C and 100 bar of pressure; d) discharge of the extracts with a nitrogen stream during 2 min. At the end of the PSE programme, remove extraction vessels and collection vials and substitute them by sand-filled vessels and new collection vials. Then run a static cycle with the same conditions as before in order to clean and to get ready the PSE system for the next extraction set. On the other hand, weigh the collection vials containing the extracts with a precision of 0.1 mg, and after that introduce each extract in the FTIR spectrometer with the aid of a peristaltic pump, and collect the FTIR spectra between 4500 and 800 cm⁻¹ in the stopped-flow mode, with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating 50 scans per spectrum. Weigh the collection vials after FTIR measuring for carrying out the gravimetric determination if it is necessary. Fat content is obtained by interpolation of the peak area between 1774.2 and 1712.5 cm⁻¹ with a baseline established between 1805.0 and 1581.3 cm⁻¹ in a calibration line obtained for fat standards in the 0.13-10.26 % (w/w) range in the same conditions than samples. FTIR spectrometer parameters are summarized in Table 1.

2.4. Reference method for the determination of fat in dried milk

Weigh 1.0000 g of whole dried milk sample or 1.5000 g of skimmed dried milk sample in a beaker, add 10 mL of water and shake until full homogenization, warming if necessary. Add 1.25 mL of a 30 % (v/v) NH₄OH solution and heat in a water bath at 60-70°C during 15 min, shaking occasionally. Let cool and pour in the extraction flask. Add 10 mL of ethanol (96 %), mixing gently but completely keeping the flask opened. Add 25 mL of diethyl ether (BHT stabilized), close the extraction flask and shake vigorously, inverting the flask some times, during 1 min. Open the flask carefully and add 25 mL of

petroleum ether; close the flask, shake and invert during 30 seconds. Let the flask rest until the top liquid layer is completely clear and separated from the aqueous phase. Then separate the phases by decantation. The organic phase is decanted into an erlenmeyer flask, and the aqueous phase is extracted two times more in the same way as the first extraction, repeating the operation previously described but using only 15 mL of each solvent. The corresponding organic phases are transferred to the erlenmeyer flask. Then eliminate most of the solvent by distillation or evaporation. When there is no noticed any solvent odour, heat the flask at 102 ± 0.2 °C during 30-60 min. Let cool at room temperature and weigh with a precision of 0.1 mg to constant weight. Then add 15-25 mL of petroleum ether. Heat slightly and shake until all the fat dissolves. Let rest the non-fat residues at the bottom of the flask and decant it. Heat the flask during 1 h in the oven and proceed as before. Fat content is obtained by difference between the first constant weight (total) and the final constant weight (non-fat residues).

2.5. Recommended PSE procedure for fat determination in chocolate

Weigh 1.0000 g of sample and mix in a mortar with approximately 2.0 g of Ottawa sand as a dispersing agent. Pack carefully this mixture with filter paper. Place disk filters in the 11 mL internal volume stainless extraction vessels and fill them with the sample packs. Fill one of these extraction vessels only with Ottawa sand packed with filter paper in order to obtain the blank. Refill the vessels with sand to complete internal volume and cap with glass wool. Weigh accurately the 60 mL collection vials previously with a precision of 0.0001 g. Then run the extraction programme, completing 3 static cycles consisting in: a) 2 min vessels preheating at 100 °C and 50 bar of pressure, b) filling the vessels with petroleum ether; c) 3 min static maintenance of solvent at 125 °C and 100 bar of pressure; d) discharge of the extract with a nitrogen stream during 2 min. At the end of the PSE programme, remove the extraction vessels and collection vials and substitute them by sand-filled vessels and new collection vials. Then run a static cycle with the same conditions as before in order to clean and to get ready the PSE system for the next extraction sample set.

For the gravimetric determination of fat in chocolate, evaporate the solvent from the extracts with a nitrogen stream. Then heat at 102°C in an oven for 30 min. Weigh with 0.1 mg precision until constant weight.

For the FTIR determination, introduce each extract in the FTIR spectrometer with the aid of a peristaltic pump, and collect FTIR spectra between 4500 and 800 cm⁻¹ in the stopped-flow mode, with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating 50 scans per spectrum.

3. Results and discussion

3.1. PSE parameters

Previous assays showed that fat from dried milk could be extracted quantitatively by PSE with a mixture of hexane, dichloromethane and methanol in a proportion of 3:2:1 in volume. So, the different PSE parameters affecting the process were evaluated. Figure 1 shows the effect of the dried milk sample mass in the percentage of total fat contained in the sample. As can be seen, the adequate mass is between 1.00 and 1.75 g. For masses below 1.00 g the percentage of fat obtained is lower than the maximum because the error is due to the incomplete transference of sample from mortar to the extraction vessel. For masses over 1.75 g, fat extraction is not completed in the experimental conditions used. On the other hand, the highest fat percentage-precision ratio was achieved for a mass of 1.75 g of sample, so it was selected for subsequent studies.

On the other hand, it was evaluated the effect of the number of 1 minute static extraction cycles in the fat extraction. In a static cycle, solvent is maintained in the vessel with the sample at a fixed temperature and pressure, during a fixed time. So, it is necessary to repeat these cycles in order to obtain the complete extraction of the analyte. As can be seen in Figure 2, most extraction occurs in the first static cycle (about 90 percent). In the second cycle is extracted about the 10 % of the fat and it is extracted the 1 % in the third cycle. So, only three cycles are needed for achieving the complete extraction of the fat and subsequently three static cycles were programmed in the recommended procedure.

3.2. FTIR spectra of fats

Figure 3 shows the absorbance FTIR spectra of extracts from whole dried milk and skimmed dried milk extracted with the solvent mixture of hexane: dichloromethane: methanol in a volume proportion of 3:2:1. Whole milk has a characteristic strong band at 1750 cm^{-1} which corresponds with the carbonyl group from the ester linkage of fatty acids [19]. Solvent absorption in the $\nu_{(\text{CH})}$ region ($2850\text{-}3025\text{ cm}^{-1}$) avoids the use of this region for our quantification purposes. However, the fingerprint region is mostly not affected by solvent absorption, except the cis and trans bonds regions at 1000 cm^{-1} approximately.

There are some differences between whole and skimmed milk extracts. For skimmed milk, the typical fatty acids band at 1750 cm^{-1} appears only as a muscle in the broad amide band at 1640 cm^{-1} which corresponds to the proteins extracted together the fat. This feature is consequent with the absorbance in

the fingerprint region due to the fat CH bonds, and so, with the low fat content in the sample (< 1% w/w), but it complicates the final quantification of fat in skimmed milk. It was evaluated a set of measurement conditions as peak area or absorbance and different baselines for quantification. The selected conditions were finally the peak area between 1774.2 and 1712.5 cm⁻¹ with a baseline established between 1805.0 and 1581.3 cm⁻¹. The baseline selected allows us to compensate the amide band spectral interference from proteins extracted with fat by the PSE programme. No significant advantages were obtained using the first derivative spectra, and the lack of sensitivity suggests using direct spectra. So, these conditions were selected for the determination of fat in dried milk.

On the other hand, a set of diverse fat containing solid samples, consisting in whole, skimmed dried milk, several infant dried milks, liofilized salmon, hazelnuts, walnuts, chicken hide and pig bacon was extracted with the aforementioned recommended procedure and the corresponding absorbance spectra were recorded. This set of spectra was used as a spectral library in order to compare the different extracts among them. Figure 4 shows the FTIR spectra of extracts from four different samples. The figure inset points out the region in which appears more spectral differences (1150-1075 cm⁻¹).

The regions selected for comparison purposes were 1797.59-1511.59 cm⁻¹, 1399.53-1282.90 cm⁻¹, 1227.14-1071.99 cm⁻¹ and 1003.03-847.88 cm⁻¹. This selection is due to the strong absorption of the solvent in the fingerprint region (1400-1500 cm⁻¹, 1300-1225 cm⁻¹ and 1070-1000 cm⁻¹), which causes high variability in the extract absorbance and avoids the use of this narrow regions in the classification with the spectral library.

Results shown that the whole dried milk (A) had a similarity higher than 99 % with 21 library spectra, and a similarity in the 99-90 % range with 10 another spectra, from 35 spectra contained in the library. The three skimmed dried milks recorded in the library were the least similar spectra with regard to the whole milk. On the other hand, the skimmed dried milk spectra were comparable at 99-90 % of similarity with themselves, whereas the rest of spectra had a similarity lower than 60 % with them.

31 spectra had a similarity in the 100-90 % range as compared with baby dried milk spectra. On the other hand, the spectrum of a pig bacon extract was mostly different from any spectra in the level over 99 %, and 31 spectra had a similarity in the 95-90 % range. That means that pig bacon spectrum had significant differences with most of the library spectra. However, a related type of extract which is from another animal source (chicken hide), had a similarity higher than 99 % with 17 library spectra, meaning that fat from this origin was poorly discriminated from that from another samples. Salmon extract

spectrum had a correlation higher than 95 % with 27 library spectra and with 3 baby dried milk spectra at 95-90 % level. A correlation higher than 99 % with 8 spectra was obtained for hazelnut, with 21 spectra in the 99-90 % range. Walnut shown a correlation higher than 99 % only with hazelnut and 27 spectra were in the 99-90 % similarity range.

So, the extracts FTIR spectra of feed samples from different origin shown significant differences in the fingerprint region, suggesting the possibility of discriminate the origin of a fat extracted by the PSE recommended procedure.

3.3. Determination of fats in milk

Three whole dried milk and three skimmed dried milk samples were analysed by the PSE-FTIR recommended method, by PSE extraction and gravimetry, and by the official gravimetric method. Results are summarized in Table 2. As can be seen, similar contents of fat were obtained for the whole milks by the three different methods. However, the skimmed milks were not quantified accurately with the proposed FTIR method. The calibration curve was prepared using fat from whole dried milk, extracted by PSE and purified as in the gravimetric method, and the type of fat contained in skimmed and whole milk could be different. For that reason, the calibration could not be applied for the quantification of skimmed milk fat. The use of first derivative spectra did not improve the results.

3.4. Analytical figures of merit

The developed method has a limit of detection of 0.004 % (w/w). The calibration line obtained for standards in the 0.13-4.7 % (w/w) range was $Y_{(\text{peak area})} = (0.1012 \pm 0.0004)C_F (\% \text{ w/w}) + (0.0029 \pm 0.0008)$, with $R^2=0.9994$. The main advantages of the proposed method were the improvement in analytical throughput and the reduction of reagents consumption and waste generation. The productivity was enhanced greatly, with a throughput of 12 h^{-1} for the PSE-FTIR method in front of a throughput of 4 h^{-1} for the gravimetric reference method. The PSE equipment allows extracting 6 samples simultaneously and automatically, whereas in the reference method each extraction has to be done manually. On the other hand, in the developed method the extract obtained in the FTIR method is introduced directly in the spectrometer and no additional manipulation is necessary, saving the evaporating or distilling time. On the other hand, the manipulation of sample is reduced, preserving it from crossing contaminations and protecting the analyst from solvent toxicity. Moreover, the volume of wastes generated in the case of the PSE-FTIR method is ten times lower than that generated by the reference method (12 mL in front of 131.25 mL per each replicate).

3.5. Determination of fat in feed

All feed samples used for the preparation of the spectral library were analyzed by the proposed FTIR method and the PSE gravimetric method. The results for non-milk products are summarized in Table 3. For most samples, FTIR method provides higher contents of fat. In this sense, FTIR method is not comparable with gravimetric method in the conditions fixed in this work, due to the following reasons: a) the original milk fat calibration is not applicable to these samples because the type of fat is different, b) there are some interferents extracted because the conditions are not optimized for these types of matrices.

So, specific methods for the determination of fat in different types of feed are necessary. The PSE parameters more critical are the solvent and temperature of extraction. These parameters are easily selected by the corresponding studies. On the other hand, the standards are easily prepared by mixing fat extracts from a pool of extracted samples by the PSE specific procedure. In that point we applied a PSE-FTIR modified method for the determination of fat in chocolate, in order to verify the correlation between fat content and pure cacao, as an example of the applicability of the FTIR approach for fat determination. In this method, petroleum ether was enough for the complete extraction of fat from chocolate and it was unnecessary the use of the ternary mixture. Figure 5 shows the FTIR spectra of a chocolate extracted sample, a chocolate fat standard and a petroleum ether blank. As can be seen, the FTIR spectrum of the chocolate fat presents the typical carbonyl absorption band at 1750 cm^{-1} and the fingerprint region around 1160 cm^{-1} . The measurement parameters were evaluated, being selected a nominal resolution of 8 cm^{-1} and 50 scans accumulated per spectra. On the other hand, different measurement modes as peak height or peak area corrected with different baselines were evaluated for the accurate and precise determination of fat in chocolate. Finally it was selected the peak area between 1211.1 and 1130.1 cm^{-1} corrected with a baseline established between 1531.2 and 914.1 cm^{-1} . The calibration line obtained in these conditions, for standards prepared from pure chocolate (99 %) in the 2.11-12.00 % (w/w), was $Y_{(\text{peak area})} = (2.271 \pm 0.002) C_F \% (\text{w/w}) - (0.055 \pm 0.014)$, with $R^2 = 0.99998$. The FTIR developed method was applied to ten different chocolate samples and the results showed significant differences with the PSE gravimetric method, probably due to the extraction of interferents. However, the correlation between cacao content and fat content is approximately linear (see Figure 6).

4. Conclusion

It has been evaluated the pressurized solvent extraction coupled with FTIR spectrometry for the determination of fat in dried milk. Indeed, the characterization of different types of samples with the aforementioned method has been investigated. The proposed method has been applied to some whole and skimmed dried milk samples. Results obtained for whole milk were consistent with those obtained with reference method, showing that the proposed method is accurate, precise and directly applicable to whole dried milk. Skimmed milk, however, was not correctly quantified at all with the proposed method. On the other hand, results obtained from other feed samples showed that there were some important errors in the PSE-FTIR determination of fat. The correlation between the cacao content and the fat content in chocolate has been investigated using a modified PSE-FTIR method. Results indicated a direct correlation between these parameters, but some differences between gravimetric and FTIR method results showed the necessity of studying in depth the reliability of the FTIR approach. The main goals of these PSE-FTIR methods are the improved analytical throughput and the reduced reagents consumption and waste generation in front of that corresponding to reference official methods. So, future efforts would be concentrated to develop new strategies based on the PSE-FTIR methodology.

5. References

- [1] Reglamento No. 2597/97 del Consejo, 18 de diciembre de 1997, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- [2] AOAC official method 989.05.
- [3] D. E. LaCroix, W. R. Wolf, J. AOAC Int. 86 (2003) 86.
- [4] J. Ruiz-Jiménez, M. D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 502 (2004) 75.
- [5] R. K. Richardson, J. AOAC Int. 84 (2001) 1522.
- [6] Dionex Application Note 340 (2000) 4-7.
- [7] AOAC official method 989.04.
- [8] AOAC official method 969.16.
- [9] AOAC official method 972.16.
- [10] F. Priego-Capote, J. Ruiz Jiménez, J. García-Olmo, M. D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 517 (2004) 13.
- [11] Y. Daghbouche, S. Garrigues, A. Morales-Rubio and M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 345 (1997) 161.
- [12] T. G. Toschi, A. Bendini, A. Ricci, G. Lercker, Food Chem. 83 (2003) 551.
- [13] E. Boselli, V. Velazco, M. F. Caboni, G. Lercker, Journal of Chromatography A 917 (2001) 239.

- [14] H. Hooijverink, E. O. van Bennekom, M. W. F. Nielsen, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 51.
- [15] E. Bjorklund, A. Muller, C. van Holst, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4050.
- [16] B. E. Richter, L. Covino, *LG-GC North America* 18 (2000) 1068.
- [17] S. Chen, M. Gfrerer, E. Lankmayr, X. Quan, F. Yang, *Chromatographia* 58 (2003) 631.
- [18] J. H. Juang, G. Ilgen, E. Matzner, *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 23.
- [19] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, London, 1991.

Legend of figures

Figure 1. Effect of sample mass in the extraction of fat obtained by PSE-FTIR method for a whole dried milk sample with a fat content of 26.48 %. The used PSE programme had 3 static cycles of 1 min at a temperature of 80 °C and 100 bar of pressure. The solvent used for the extraction was a mixture of hexane, dichloromethane and methanol in the proportions 3:2:1. The results are expressed as the mean value \pm s for three independent replicates.

Figure 2. Total fat accumulated in the extract in successive static extraction cycles expressed as percentage of total fat extracted in four cycles. The mass of sample was 1.7500 g and the PSE conditions were the same than in Figure 1.

Figure 3. FTIR spectra of extracts obtained by PSE corresponding to: A) solvent blank, B) 2.00 g of a skimmed dried milk sample with < 1 % (w/w) of fat, C) 1.75 g of a whole milk sample with 26.48 % (w/w) of fat. Measurements conditions were 50 scans accumulated per spectrum with a nominal resolution of 8 cm⁻¹. PSE programme was the same than in Figure 1.

Figure 4. FTIR spectra of extracts obtained by the PSE-FTIR proposed method, corresponding to: A) 1.75 g of an infant dried milk, B) 0.90 g of liofilized salmon, C) 0.82 g of untreated walnut, D) 0.84 g of chicken hide. Inset: fingerprint region. The spectra were obtained with 50 scans accumulated per spectrum and 8 cm⁻¹ of nominal resolution.

Figure 5. FTIR spectra obtained by the PSE-FTIR chocolate method, corresponding to: A) a standard containing 5.85 % (w/w) of chocolate fat in petroleum ether, B) a sample of chocolate containing 52 % of cacao and 30 % of fat, C) a blank. Measurement conditions: nominal resolution 8 cm⁻¹ and 50 accumulated scans per spectrum.

Figure 6. Dependence of the fat content obtained by the PSE-FTIR method proposed for the determination of fat in chocolate with the manufacturer's declared cacao content in percentage.

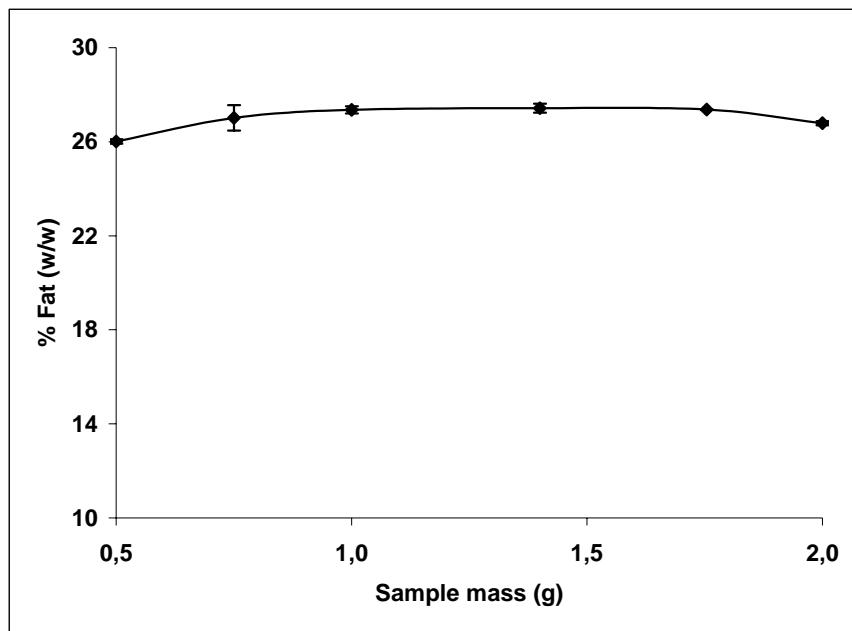


Figure 1.

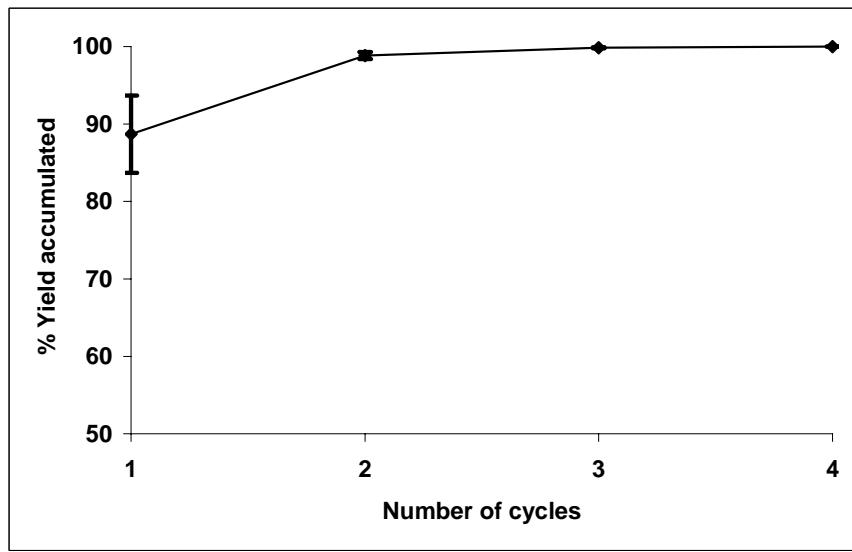


Figure 2.

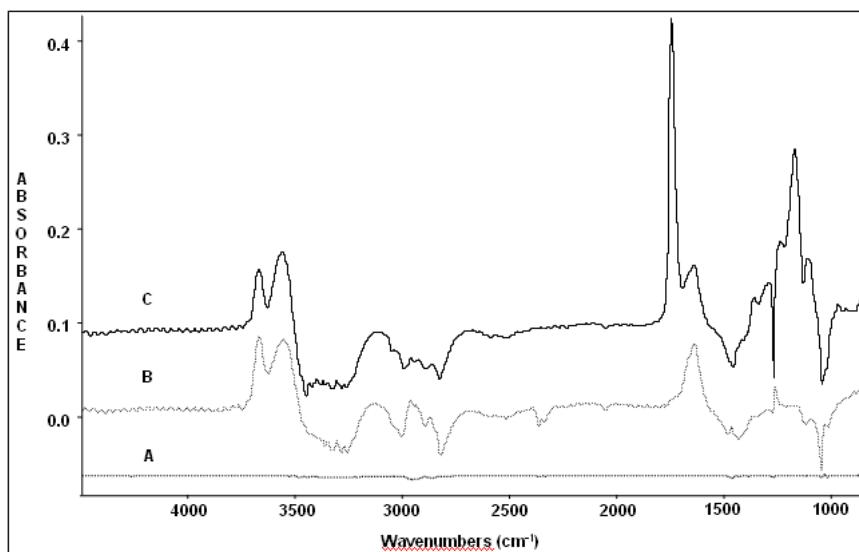


Figure 3.

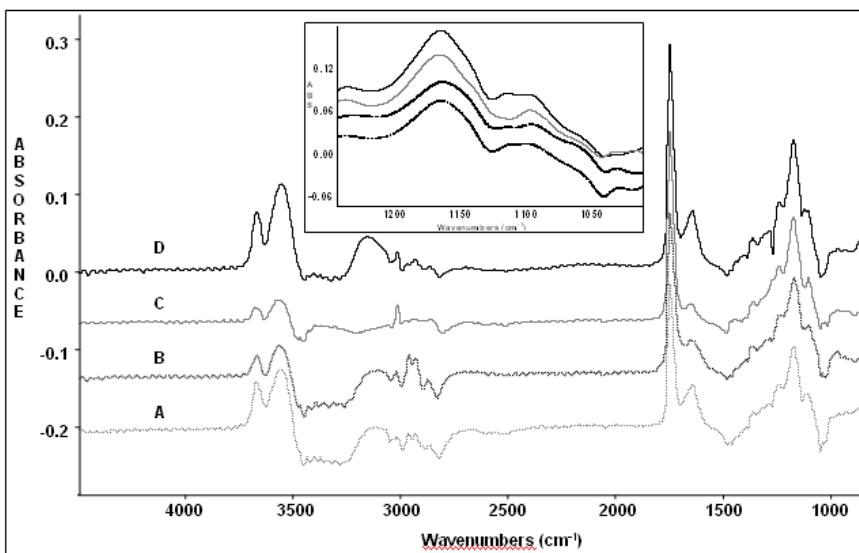


Figure 4.

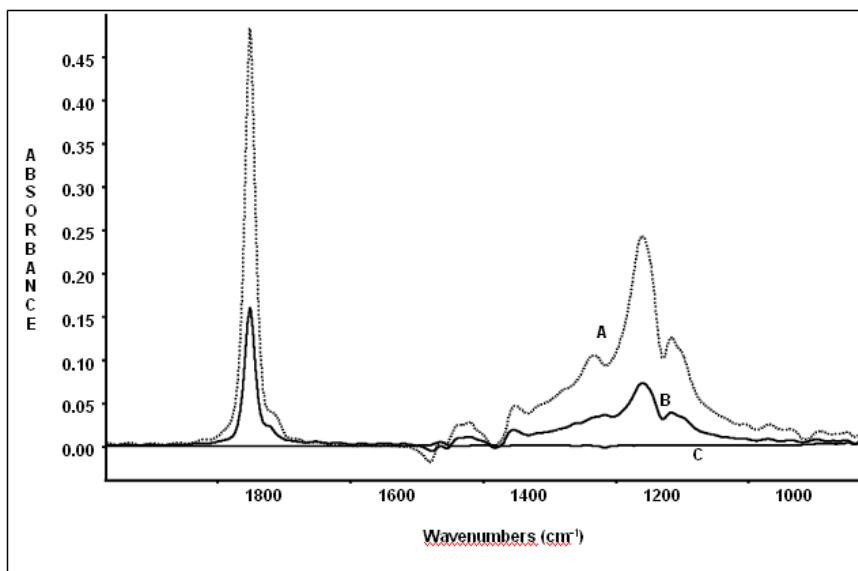


Figure 5.

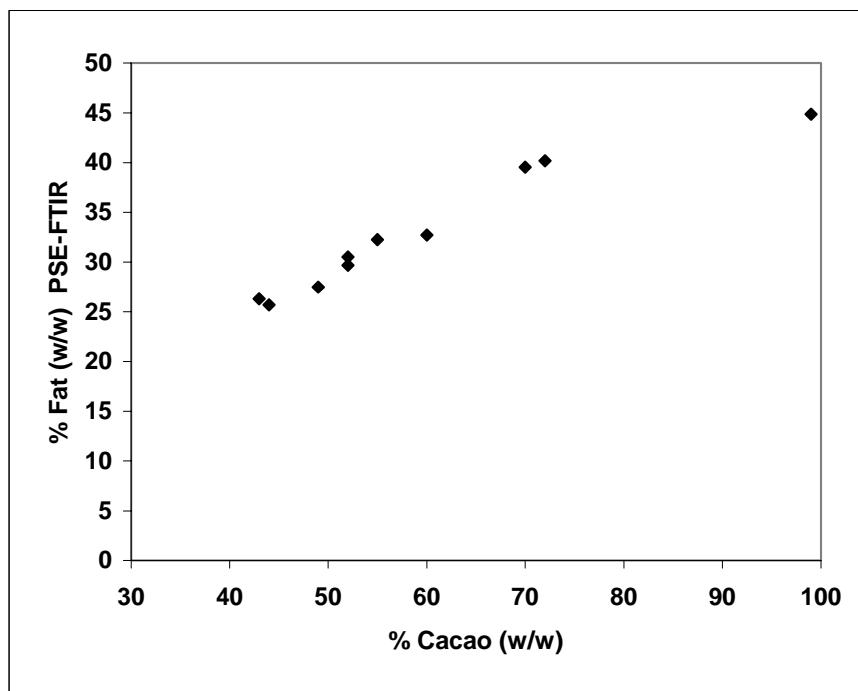


Figure 6.

Table 1. FTIR spectrometer instrumental parameters used in the spectra acquisition from PSE extracted feed.

Parameter	Selected condition
Detector	RT-DLaTGS
Beam splitter	KBr
Aperture setting (mm)	6
Scanner velocity (kHz)	10
Gain	Autogain
Apodization	Blackmann-Harris 3 terms
Resolution Phase	32.00
Phase correction mode	Mertz
Zero filling factor	2
Number of scans	50
Resolution (cm^{-1})	8

Table 2. Results obtained for the determination of fat in whole dried milk samples (1-3) and skimmed dried milk (4-6), by the PSE-FTIR proposed method, the PSE-gravimetric method and the reference gravimetric method. Percentages of error from PSE-FTIR method respect to PSE-gravimetric and reference methods are included.

Sample	PSE-FTIR	Reference gravimetric method	PSE gravimetric	% Difference (FTIR-PSE gravimetric)	% Difference (FTIR- reference method)
1	27.48 ± 0.06	27.48 ± 0.03	27.27	0.78	0.00
2	26.49 ± 0.09	26.08 ± 0.11	25.81	2.64	1.59
3	26.69 ± 0.05	26.40 ± 0.04	26.11	2.19	1.10
4	0.36 ± 0.03	0.86 ± 0.02	0.36	-0.19	-58.58
5	0.000 ± 0.019	0.77 ± 0.03	0.22	-100.23	-100.10
6	0.411 ± 0.003	0.613 ± 0.009	0.56	-26.07	-32.96

Table 3. Results obtained for the determination of fat in different feed using the PSE-FTIR developed method for dried milk and by the PSE gravimetric method.

Sample	PSE gravimetric % (w/w)	PSE-FTIR % (w/w)	Difference %
Liofilized salmon	33,6	31,4	-6,9
Nut	63,8	56,04	-13,8
Walnut	56,4	49,1	-15,1
Sheep cheese	37,1	40,8	9,0
Bacon	73,0	63,9	-14,2
Chicken	69,8	62,3	-12,1
Goat cheese	28,8	37,6	23,5
Soft cheese	16,3	25,6	36,3
Cured cheese	22,8	31,3	27,2

4. Tratamiento en línea de la muestra: determinación de succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas

On-line sample treatment and FT-IR determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues

Talanta 70 (2006) 1100–1106



On-line sample treatment and FT-IR determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals

Josep F. Ventura-Gayete, Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues *

Department of Analytical Chemistry, Research Building, University of Valencia, 50 Dr. Moliner St., 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 25 October 2005; received in revised form 29 January 2006; accepted 7 February 2006

Available online 20 March 2006

Abstract

A low solvent consumption method for Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals has been developed. The analyte was continuous and selectively extracted with a 13% (v/v) ethanol/chloroform solvent mixture, recirculating the solvent through the sample and monitoring the process by FT-IR. Doxylamine succinate was determined by on-line standard addition measuring the peak area in the regions 1730–1710 and 1485–1462 cm⁻¹ corrected with a two-point baseline established between 2000 and 1800 cm⁻¹. This new method implies low volumes of chloroformic solvent mixture, only 2.6 mL per sample, in front of classical batch FT-IR methods, improving analytical efficiency and reducing waste generation. The on-line extraction and standard addition determination of doxylamine succinate allowed a throughput of 10 h⁻¹.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: FT-IR; On-line treatment; Doxylamine succinate; Pharmaceuticals

1. Introduction

Halogenated compounds had been identified as ozone-layer depleting agents, and both their toxic properties for humans and environmental damage derived by their use, recommend a progressive reduction of their consumption restricted by recent laws developed in the frame of the Montreal Protocol [1].

Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) is an analytical technique that offers excellent possibilities for quantitative analysis, based on the selective signals obtained from the characteristic spectra, being widely employed in application laboratories [2]. Transmittance IR measurements in liquid phase require the use of solvents which present a low absorption in this spectral region, halogenated hydrocarbons and carbon disulfide (CS₂) being the main available solvents for these purposes [3].

The introduction of flow injection analysis strategies [4,5] has increased the potential of FT-IR spectrometry as a tool for quantitative analysis and the hyphenation with solid phase extraction [6] and the on-line sample extraction [7] allows us the determination of analytes at the levels of mg L⁻¹ and minimizes

the sample manipulation, also reducing the consumption of solvent.

On the other hand, useful methods in quality control must be as fast and low cost as possible, the on-line extraction being a good compromise between productive parameters and a reduced sample handling.

Most active principles in pharmaceuticals are determined by UV-vis spectrometry, which suffers from a lot of interferences, and HPLC, which are time consuming and require large amounts of organic solvents, and in front of these commonly employed methodologies. Excellent results could be obtained by flow analysis and FT-IR. Precedents on that are the determination of octyl succinate [8], ibuprofen [9], dimenhydrinate [10], ketoprofen [11], paracetamol [12–14] and caffeine and acetylsalicylic acid [15]. However, none of these previous studies involved the on-line sample treatment.

Doxylamine succinate (phenyl 2-pyridylmethyl-beta-N,N-dimethylaminoethyl ether succinate 1:1) is an antihistaminic drug widely used for treating nausea during pregnancy and it is present in counter-cold and sedative pharmaceuticals [16]. Some chromatographic methods have been proposed for its determination at trace levels [17–19] besides mass spectrometry [20], capillary electrophoresis [21] and UV spectrometry in micellar medium [22].

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543158; fax: +34 96 3544838.
E-mail address: salvador.garrigues@uv.es (S. Garrigues).

The aim of this study has been the development of a mechanized procedure for the determination of doxylamine succinate in pharmaceutical tablets, using FT-IR measurements after on-line sample extraction. The method uses a closed-flow system and involves the consumption of a minimum volume of chloroform per sample, thus contributing to the reduction of chlorinated solvent use and the development of a green analytical chemistry.

2. Experimental

2.1. Apparatus

The FT-IR measurements were carried out using a Nicolet Magna 750 spectrometer (Madison, WI, USA), equipped with a globar IR source, a stabilized temperature deuterated triglycine sulphate detector and a Ge/KBr beamsplitter, and using a microflow cell (Graseby-Specac, Orpington, UK) with ZnSe and CaF₂ windows and an optical pathlength of 0.11 mm.

FT-IR spectra and data treatment were recorded and processed with the Omnic v.2.1 software from Nicolet.

A UV-vis diode array spectrometer model HP8452A from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) was used for obtaining UV-vis spectra of samples. UV-vis absorbance spectra were recorded in the range between 190 and 280 nm, using a 10 mm quartz cell from Hellma (Jamaica, NY, USA).

A Medifugue centrifuge (Heraeus Sepatech, Germany) and a J.P. Selecta ultrasound water bath (Barcelona, Spain) were employed for the preparation of samples in the batch procedure. A Hamilton microsyringe of 50 µL was used for the injection of standards in the on-line standard addition.

2.2. Reagents

Chloroform stabilized with 150 ppm of amylene (Scharlau, Barcelona) and absolute ethanol Multisolvent grade from Scharlau, dried with anhydrous sodium sulphate r.g. (Baker, Deventer, Holland) were employed in order to obtain a 13% (v/v) ethanol:chloroform solvent mixture for sample treatment and FT-IR measurements.

HCl 0.1 M prepared from concentrated analytical grade HCl 36% (v/v) from Scharlab (Barcelona, Spain) and ultrapure deionized water, with a resistivity of 18.2 MΩ obtained from a Millipore MilliQ system (Molsheim, France) were used for the UV reference procedure.

Doxylamine succinate standard with a purity higher than 99% was acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dormidina™ samples produced by Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain) were obtained from Spanish market. Tablets containing 25 mg of doxylamine succinate were homogenized appropriately and kept out from light in a desiccator before their analysis.

2.3. On-line extraction manifold

Fig. 1 shows the manifold employed for the on-line extraction and FT-IR determination of doxylamine succinate in pharmaceu-

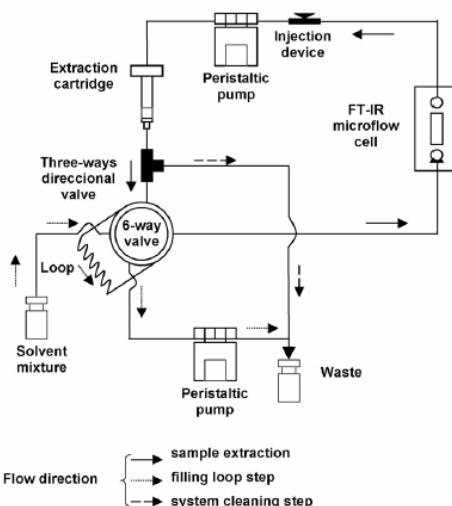


Fig. 1. Manifold employed in the on-line extraction and determination of doxylamine succinate.

ticals. The assembly consisted of a main circuit that includes a Gilson Minipuls 2 (Villiers-le Bel, France) peristaltic pump with a Viton (isoversinic) tube of 1.5 mm i.d. to impel the solvent, an interchangeable syringe cartridge for sample extraction, a glass injection device for standard introduction and a microflow FT-IR cell. The connection between elements was made with PTFE tubes with 0.8 mm i.d. A Rheodyne 5041 six-way valve (Cotati, CA, USA), equipped with a loop of 2.58 mL volume, was used for the introduction of the carrier and the extraction solvent inside the manifold. The solvent loop was filled using a second peristaltic pump equipped with a Viton tube of 3 mm i.d. A three-way directional valve was employed for cleaning the system between the analyses of different samples. For on-line standard addition discrete volumes of a doxylamine succinate stock solution were injected in the system using a 50 µL microsyringe through a home-made injector device with a silicone membrane (see Fig. 1 for set-up details).

2.4. Batch FT-IR procedure

Fifty milligrams of sample was accurately weighed inside a glass vial and 5 mL of a 13% (v/v) ethanol:chloroform mixture was added. The mixture was shaken for a few seconds and clarified by centrifugation at 3500 rpm for 5 min. The liquid phase was filtered through a 0.45 µm syringe membrane filter and introduced in the FT-IR measurement cell by aspiration with the peristaltic pump. The FT-IR spectrum was recorded between 4000 and 600 cm⁻¹ with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating 10 scans per spectrum versus a background of the cell filled with the same solvent. To calculate the doxylamine

succinate concentration in each sample, the sum of the peak areas between 1710–1730 and 1485–1462 cm⁻¹, both corrected with a two-point baseline established between 2000 and 1800 cm⁻¹, was interpolated in an external calibration of doxylamine succinate prepared by direct dissolution of standards in the 13% (v/v) ethanol:chloroform mixture and measured in the same way as the samples.

2.5. On-line FT-IR procedure

Fifty milligrams of sample was accurately weighed in a 3 mL internal volume cartridge and inserted in the manifold. The 2.58 mL loop was loaded with the 13% (v/v) ethanol:chloroform solution using the six-way valve, being opened the three-way directional valve. Then the solvent was injected into the sample extraction cartridge, closing the directional valve at this moment. Finally, the six-way valve was disposed in the initial position and the directional valve opened, being recirculated the extract obtained from solvent action through the solid sample contained in the cartridge. This extract containing doxylamine succinate, was recirculated with a flow rate of 8.5 mL min⁻¹ through the FT-IR spectrometer measurement cell and sample cartridge until the end of the extraction process, when the steady state was reached. After that the extract was conducted with the directional valve to the waste recipient. During the recirculation of the solvent mixture through the extraction cartridge the FT-IR spectra between 4000 and 600 cm⁻¹ are continuously recorded as a function of time, with a nominal resolution of 8 cm⁻¹ and accumulating four scans per spectrum, until a constant signal is obtained. The recirculation period was established from the chemigram obtained for peak area between 1730 and 1710 cm⁻¹ (corrected with an horizontal baseline at 1800 cm⁻¹).

The sample signal was measured from the final spectrum obtained by the co-addition of the spectra for a time interval of 0.038 min after 1.7 min of the beginning of the data acquisition. The sum of peak area between 1730–1710 and 1485–1462 cm⁻¹, both corrected with a two-point baseline established between 2000 and 1800 cm⁻¹, was employed for calculations.

So, on using the aforementioned set-up, it is possible to follow continuously the evolution of the extraction process, being the chemigram directly related with doxylamine succinate concentration. External calibration was obtained by injecting small volumes (25 μ L) of a 50 mg mL⁻¹ stock doxylamine succinate solution in the manifold through the glass injector silicon membrane and using the corresponding co-added spectra in the same measurement conditions as the sample.

On-line standard addition was carried out by injecting successive 25 μ L aliquots of the stock solution to the extracted sample solution after to reach the steady state of the extraction process. The content of doxylamine succinate in the sample was obtained by extrapolation from the standard addition line established from each addition.

2.6. UV-vis reference procedure

0.1500 g of sample was accurately weighed and 65 mL of HCl 0.1 M solution was added. The mixture was shaken for

10 min and transferred to a 100 mL volumetric flask and the volume completed with HCl 0.1 M. The suspension was filtered through a Whatman 42 paper and the first 20 mL of the solution discarded being used the rest. One milliliter of sample clear solution was diluted to a final volume of 10 mL with HCl 0.1 M. The UV-vis spectrum was recorded between 190 and 280 nm in front of a background of HCl 0.1 M. Finally, doxylamine succinate concentration was determined by interpolating the sample absorbance at 262 nm in a calibration line of standard solutions of doxylamine succinate directly prepared in HCl 0.1 M and measured in the same conditions as samples [23].

3. Results and discussion

3.1. FT-IR spectral characteristics of doxylamine succinate

Doxylamine succinate is highly soluble in water and has also a good solubility in ethanol and chloroform. Fig. 2 shows the FT-IR spectra corresponding to a doxylamine succinate standard and an extract of a sample, both prepared in a 13% (v/v) ethanol:chloroform mixture. The background was collected in the same conditions as the sample and standard, and corresponds to the microflow cell filled with the solvent mixture. As can be seen, the main bands present in the spectrum of doxylamine succinate standard were similar to the bands appearing in the extract of the sample, suggesting the use of these bands for the direct determination of doxylamine succinate directly extracted from the samples without any previous treatment. The most intense band appears at 1710 cm⁻¹ and corresponds to the succinate carboxylate group absorption. Other important bands are present at 1580, 1470, 1440, 1375 and 1340 cm⁻¹ that correspond to vibration modes of monosubstituted benzene, –CH₃ deformation asymmetric, C–OH in-plane bend and –CH₃ symmetric bending, respectively [24].

Different bands and modes of measurement were studied including peak area and peak height with different baseline corrections (see Table 1). Finally, the selected measurement criteria was the use of the sum of the peak area between 1710 and 1730 cm⁻¹ and the peak area between 1462 and 1485 cm⁻¹,

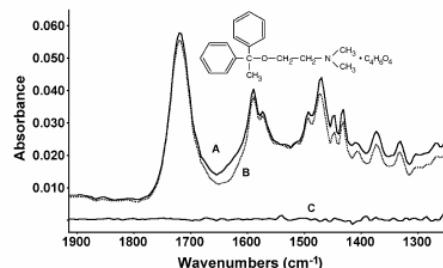


Fig. 2. FT-IR spectra of (A) 4.24 mg mL⁻¹ doxylamine succinate standard prepared in 13% (v/v) ethanol:chloroform mixture, (B) sample extract in the same solvent mixture corresponding to 4.51 mg mL⁻¹ of doxylamine succinate, and (C) solvent blank. Measurement conditions: 10 accumulated scans per spectrum, 8 cm⁻¹ nominal resolution, background of 13% (v/v) ethanol:chloroform.

Table 1

Calibration lines obtained for "in batch" FT-IR determination of doxylamine succinate using different criteria

Measurement criterion	Baseline (cm^{-1})	Calibration line, $y = (a \pm s_a)C (\text{mg mL}^{-1}) + (b \pm s_b)$	R^2
Peak height 1720 cm^{-1}	1800	$y = (0.01080 \pm 0.00003)C + (0.00017 \pm 0.00004)$	0.99991
Peak height 1720 cm^{-1}	1650	$y = (0.00908 \pm 0.00006)C + (0.00050 \pm 0.00011)$	0.9992
Peak area $1710\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$	1800	$y = (0.2288 \pm 0.0006)C - (0.0035 \pm 0.0010)$	0.99990
Peak area $1455\text{--}1488\text{ cm}^{-1}$	1800	$y = (0.325 \pm 0.002)C - (0.014 \pm 0.003)$	0.9994
Peak area $1580\text{--}1596\text{ cm}^{-1}$	1800	$y = (0.1302 \pm 0.0008)C - (0.0047 \pm 0.0013)$	0.9994
Peak area $1710\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$	1750	$y = (0.1621 \pm 0.0012)C - (0.003 \pm 0.002)$	0.9991
Peak area $1710\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$	1850	$y = (0.2209 \pm 0.0005)C - (0.0079 \pm 0.0009)$	0.9991
Peak area $1077\text{--}1110\text{ cm}^{-1}$	1850	$y = (0.1635 \pm 0.0017)C - (0.012 \pm 0.003)$	0.998
Peak area $1419\text{--}1439\text{ cm}^{-1}$	1800	$y = (0.1104 \pm 0.0012)C - (0.000 \pm 0.002)$	0.998
Peak area $1710\text{--}1730 + 1485\text{--}1462\text{ cm}^{-1}$	1800–2000	$y = (0.443 \pm 0.003)C - (0.001 \pm 0.003)$	0.9991

both corrected with a baseline established between 1800 and 2000 cm^{-1} which provided the best sensitivity.

3.2. Batch FT-IR determination of doxylamine succinate

Previously to the development of the on-line method it was necessary to study doxylamine succinate extraction process in order to design correctly the corresponding manifold in which the experimental conditions could be reachable.

Chloroform presents a relative high transparency in the middle IR region and because of that it was selected as a solvent for the extraction of doxylamine succinate from pharmaceuticals. Unfortunately, it was verified that the extraction was not complete. So, we evaluated the effect of incorporating ethanol to chloroform in order to increase the polarity of the extraction solvent. Increasing amounts of ethanol were considered for the extraction of doxylamine succinate being found that for a proportion of ethanol equal to or higher than 13% (v/v) the extraction was complete (see Fig. 3). So, a 13% mixture of ethanol:chloroform was selected for following experiments.

Studies about the effect of shaking time showed that mechanical or ultrasonic shaking is unnecessary for extracting doxylamine succinate completely from pharmaceuticals using the above-mentioned solvent mixture. So, on-line extraction is possible with minimum experimental requirements.

Nominal resolution and number of accumulated scans per spectrum were also evaluated, selecting those conditions which

Table 2

FT-IR spectrometer measurement conditions used in the batch and on-line methods for the determination of doxylamine succinate in pharmaceuticals

Spectrometer parameter	Value
Aperture (%)	100
Gain	8
Mirror velocity (cm s^{-1})	0.6329
Number of scans per spectrum	Batch = 10 On-line = 4 (chemigram data spacing = 0.038 min)
Resolution (cm^{-1})	8
Spectral window (cm^{-1})	4000–600
Apodization	Hann-Genzel
Zero filling factor	0

resulted as a compromise between a good precision and high signal-to-noise ratio with the minimum consumption of time (see Table 2).

In the selected conditions three samples of different batch of a pharmaceutical containing 25 mg doxylamine succinate per unit were analyzed. Results are shown in Table 3 and it can be seen they are statistically comparable with those obtained by using the reference UV-vis spectrometry procedure.

In order to evaluate the accuracy of the FT-IR procedure a recovery study was carried out, having found quantitative results for added amounts from 2.6 to 9.9 mg of doxylamine succinate.

Both, recovery studies and sample analysis, indicated that the extraction of the doxylamine succinate is complete and that FT-IR method provides comparable data to those obtained in the UV-vis region.

Table 3

Analysis of doxylamine succinate in pharmaceuticals and recovery studies by FT-IR in batch mode

Sample	UV-vis method (mg/tablet)	FT-IR batch method (mg/tablet)	Doxylamine succinate added (mg)	Recovery (%)
1	24.0 ± 0.3	24.3 ± 0.7	2.6	97.6 ± 0.2
2	23.6 ± 0.5	23.9 ± 0.7	5.1	100.4 ± 0.9
3	25.2 ± 0.7	24.8 ± 0.5	9.9	100.1 ± 0.2

Note: Results shown correspond to the average value \pm standard deviation of three independent analyses.

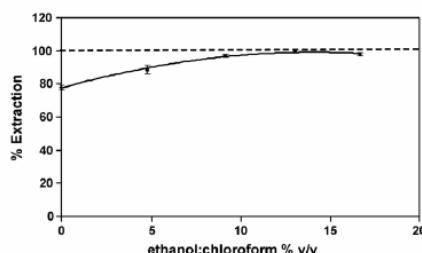


Fig. 3. Effect of the solvent composition in the batch extraction of doxylamine succinate from pharmaceuticals. Values indicated are the average of three independent analyses \pm standard deviation.

3.3. On-line extraction and FT-IR determination experimental conditions

A simple manifold was designed in agreement with the experimental conditions fixed in the batch method. However, parameters as solvent volume, recirculating flow and number of scans per spectrum for the continuous measurement are limited because of the specific features of on-line systems.

In the case of solvent volume, the lowest value was tried, but the limitation is due not only to the internal volume of cell and connecting tubes, but for the apparition of air bubbles which were formed when high flow rates were employed and which provide severe changes in the spectra. To avoid bubbles formation, the volume selected was a little bit greater than the minimum theoretical. So, in this manifold the volume used was 2.6 mL.

The number of scans per spectrum was limited because the correlation between spectrum and analyte concentration depends on the time as a consequence of the continuous extraction. A great number of scans accumulated per spectrum improves the signal-to-noise ratio but increases the data spacing of the chemigram since it is not possible to monitor the real situation of the analyte in the measurement cell as a function of time. So, when four scans were accumulated per spectrum a good compromise between precision and time resolution was achieved, this value being selected as adequate for the continuous measurement.

The selection of the extraction flow rate was limited by the time necessary to reach the steady state. A study of the recirculation time of solvent in the manifold evidenced that a flow rate of 8.5 mL min⁻¹ was suitable for obtaining a recirculation period of around 0.3 min, allowing to reach the steady state, or constant signal, in a few minutes (see Fig. 4). The continuous mixing of the solution in the extraction cartridge causes the

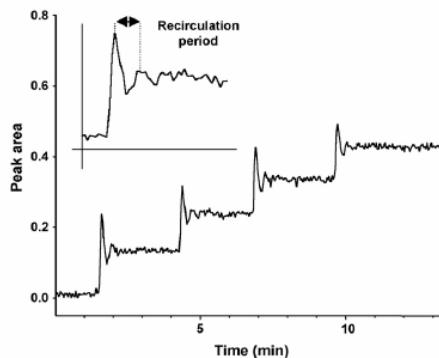


Fig. 4. Chemigram obtained from consecutive injections of a doxylamine succinate standard. Experimental conditions: 25 μ L of a 56.8 mg mL⁻¹ standard, 8 cm⁻¹ nominal resolution, four scans per spectrum, peak area values between 1730 and 1710 cm⁻¹ (baseline 2000–1800 cm⁻¹). Inset: Detail on recirculation period.

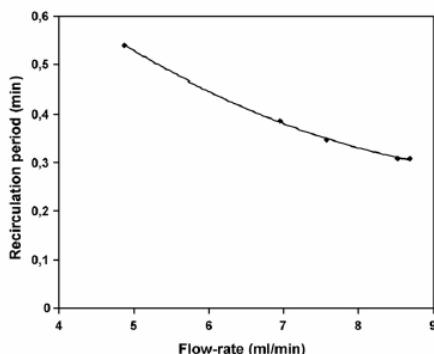


Fig. 5. Effect of the flow rate on the recirculation period. Experimental conditions: 50 μ L of 45 mg mL⁻¹ standard, 8 cm⁻¹ nominal resolution, four scans per spectrum, peak area values between 1730 and 1710 cm⁻¹ (baseline 2000–1800 cm⁻¹).

approximation of the signal to a constant value, corresponding to the steady state. From this time all the spectra recorded were similar.

Fig. 4 shows the evolution of the signal corresponding to the extraction of a sample and, after achieving the steady state, the injection of three volumes of a standard of doxylamine succinate. As it can be seen the extraction process is very fast and the shapes of the signals corresponding to the initial extraction and the standard additions are very similar. It indicates that the time required to reach the steady state corresponds, basically, to the homogenization of the solution inside the manifold.

So, it is possible to reduce the time required for the analysis if a co-addition of spectra, through a fixed time interval, is used to register the dynamic process. In this case, spectrum variation due to the non-uniform distribution of the analyte through the system is compensated along the time interval, because of its periodicity (see inset of Fig. 4). With this approach, the frequency analysis is improved drastically.

Fig. 5 shows that there is a strong reduction of the recirculation time, for a carrier flow increase from 5 to 8.5 mL min⁻¹. The use of a carrier flow higher than 8.5 mL min⁻¹ does not provide a significant variation of the recirculation time but generates air bubbles inside the system and overpressure problems.

The initial time and the amplitude of the interval considered to obtain the co-added spectrum can involve an important reduction of the waiting time required to do the consecutive injection of standards. In this sense we have carried out a study to evaluate the effect of these two variables (co-addition time interval and initial time) on the final spectrum as compared with the signal that corresponds with the spectra obtained in the steady state.

Taking into consideration that the data point interval in the continuous acquisition is 0.038 min we have considered different multiples of this value for the co-addition interval as 4, 7, 9, 11 and 14, which provide co-addition times from 0.152 to 0.532 min. For a carrier flow of 8.5 mL min⁻¹ an interval of

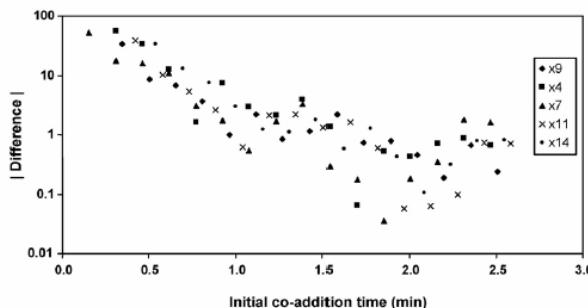


Fig. 6. Effect of the initial and interval time on the difference between absorbance peak measurements of the co-added spectra and data found in the steady state. Experimental conditions: 8 cm^{-1} nominal resolution, four scans per spectrum, peak area values between 1730 and 1710 cm^{-1} (baseline 2000 – 1800 cm^{-1}). Note: $\times 4$, $\times 7$, $\times 9$, $\times 11$ and $\times 14$ are the co-addition time intervals expressed as a function of data spacing, and are equivalent to 44, 78, 100, 122 and 156% of the solvent recirculation period for a carrier flow of 8.5 mL min^{-1} .

$\times 9$ times the data spacing corresponds to the time required to complete a recirculation cycle. The co-added spectrum has been obtained for the selected intervals at different initial times from the injection of the standard. The peak absorbance of the co-added spectra were compared with those corresponding to the steady state and the difference calculated as absolute value expressed in percent.

Fig. 6 shows that a co-addition time equal to nine times the data spacing provides results with differences, as compared with those obtained from steady state, lower than 1%. With these conditions, the analysis could be completed in only 1.7 min.

3.4. On-line analysis of commercial samples

Commercial samples were analyzed by the on-line developed method with external calibration using the aforementioned conditions. The calibration line obtained was $S_c = (0.312 \pm 0.004)C$ (mg) + (0.129 ± 0.009) , $R^2 = 0.998$, S_c being the product of the sum of peak areas and the total volume of the solvent in the closed-flow system, and C the mass of doxylamine succinate. Results obtained for the determination of doxylamine succinate by interpolation in this external calibration were not in good agreement with those obtained with batch FT-IR method. The reason of this deviation could be the dragging of excipients by the solvent mixture during the extraction process, causing critical changes in the baseline or in the characteristic doxylamine succinate peaks. So, it was necessary to avoid dragging by inserting a filter after the sample cartridge. However, with this configuration, it was not possible to work with high flow rates due to overpressure of the system that involves changes in the carrier flow. For this reason, standard addition was selected as an alternative strategy for the determination of the analyte in the on-line system.

Standard addition was carried out extracting the sample and injecting $25\text{ }\mu\text{L}$ aliquots of a doxylamine succinate stock solution in the system, operating at 8.5 mL min^{-1} . Each aliquot was injected when the steady state was reached after sample extraction or injection. On using the co-addition of spectra, it was

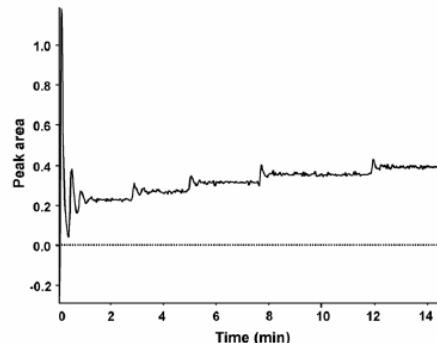


Fig. 7. Chemigram (area between 1710 and 1730 cm^{-1}) corrected with a baseline established at 1800 cm^{-1} obtained for the on-line determination of doxylamine succinate by standard addition. Four $25\text{ }\mu\text{L}$ aliquots of a stock solution (46.8 mg mL^{-1}) were injected in the system consecutively after the extraction of the analyte. Instrumental conditions: 8 cm^{-1} nominal resolution, four scans per spectrum, peak area values between 1730 and 1710 cm^{-1} (baseline 2000 – 1800 cm^{-1}).

unnecessary to wait for the steady state, carrying out measurements in 1.7 min after each consecutive injection (see Fig. 7).

Results obtained by standard addition were in good agreement with theoretical content of samples, thus recommended for its application in commercial sample analysis (Table 4). How-

Table 4
Analysis of a sample containing doxylamine succinate by FT-IR

Method	Doxylamine succinate (mg/tablet)
FT-IR batch	24.8 ± 0.5
FT-IR on-line external calibration	23.6 ± 0.4
FT-IR on-line standard addition	25.19 ± 0.05
UV-vis	25.2 ± 0.7

Results shown as mean value \pm standard deviation of three independent analyses.

ever, if dragging is avoided in future improvements of the on-line method, external calibration probably could be suitable and standard addition would be unnecessary.

4. Conclusions

An on-line method for doxylamine succinate determination in pharmaceuticals has been developed, evidencing the applicability of this strategy in routine analysis, through the design of a simple manifold which reduces sample manipulation and minimizes possible errors. The consumption of chloroform in the on-line method is four times higher than that required for the batch method using standard addition and two times higher than that employed on using external calibration. Analysis of commercial samples revealed that standard addition was required to obtain accurate results using the on-line extraction approach. Co-addition of spectra allowed us to decrease the time for reaching the constant values below 1.7 min per injection, with a final analysis frequency of 10 h⁻¹ in the case of analysis by the standard addition method.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitat i Investigacions de la Generalitat Valenciana (Project GV04B1247), Universitat de València (Project UV-AE-20050203) and Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2005-05604/BQU).

References

- [1] <http://www.unep.org/ozone/pdfs/Montreal-Protocol2000.pdf>.
- [2] F. Cadet, M. de la Guardia, in: R.A. Meyers (Ed.), *Infrared Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley & Sons, 2000, pp. 10879–10909.
- [3] B. Schrader (Ed.), *Infrared and Raman Spectroscopy. Methods and Applications*, VCH, 1995.
- [4] D.J. Curran, W.G. Collier, *Anal. Chim. Acta* 177 (1985) 259.
- [5] M. de la Guardia, S. Garrigues, M. Gallignani, J.L. Burguera, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 53.
- [6] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M.T. Vidal, M. de la Guardia, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1086.
- [7] Z. Boushain, J.M. Garrigues, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Vib. Spectrosc.* 21 (1999) 143.
- [8] D.K. Morgan, N.D. Danielson, J.E. Katon, *Anal. Lett.* 18 (1985) 259.
- [9] S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia, *Talanta* 40 (1993) 1799.
- [10] Z. Boushain, B.A. Hasan, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Química Analítica* 14 (1995) 96.
- [11] M.J. Sánchez-Dast, S. Garrigues, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 253.
- [12] Z. Boushain, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analyst* 121 (1996) 635.
- [13] M.L. Ramos, J.F. Tyson, D.J. Curran, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 107.
- [14] M.L. Ramos, J.F. Tyson, D.J. Curran, *Anal. Proc.* 32 (1995) 175.
- [15] S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia, *Talanta* 40 (1993) 89.
- [16] M.S. De Stahl, *Psicofarmacología esencial. Bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas*, Ed. Ariel Neurociencia, Barcelona, 1998.
- [17] A.P. Argekar, J.G. Sawant, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 2051.
- [18] A.P. Argekar, J.G. Sawant, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 945.
- [19] E.B. Hansen, H.C. Thompson, *LC Mag.* 3 (1985) 986.
- [20] J.L. Josephs, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 1270.
- [21] Y.F. Tang, H.L. Wu, S.M. Wu, S.H. Chen, H.S. Kou, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 366.
- [22] L. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, G. Ramis-Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Lett.* 29 (1996) 1399.
- [23] The United States Pharmacopoeia, XXIst ed., 1985, p. 362.
- [24] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, London, 1991.



Capítulo V

Conclusiones

V. Conclusiones

Como se ha demostrado a lo largo de esta memoria, la presente Tesis Doctoral ha supuesto la elaboración de diversos métodos de análisis cuantitativo por espectrometría vibracional. En el proceso de desarrollo de cada uno de los mismos se han estudiado los parámetros más importantes propios de este tipo de análisis, y se ha pretendido, en el conjunto de ellos, la utilización de cantidades mínimas de disolventes tóxicos o nocivos para el medio ambiente. En general, los métodos desarrollados resultan adecuados para el análisis de rutina, orientado hacia el control de calidad de productos.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los trabajos incluidos en esta Tesis muestran la potencialidad de la espectrometría vibracional por Transformada de Fourier en el ámbito del análisis de muestras de naturaleza muy diferente. En este sentido cabe esperar futuros avances en las aplicaciones de la espectrometría FTIR con fines de análisis cuantitativo. Las desventajas que presentan las técnicas vibracionales empleadas en esta Tesis han resultado ser superables mediante el uso de estrategias como el uso de accesorios ATR (en el caso de muestras acuosas) y la preconcentración en fase sólida.

En términos de nuevos métodos de análisis desarrollados, bien a partir de la modificación o adaptación mediante automatización de métodos preexistentes, bien de manera completamente original, se encuentran los logros que se detallan a continuación.

1. Por una parte, se han ampliado las aplicaciones de la espectrometría FTIR con medidas por ATR mediante la puesta a punto de un nuevo método de análisis directo ATR-FTIR para la determinación de nitrilotriacetato sódico en formulaciones de limpieza industrial. Este método supone una generación mínima de residuos pues no utiliza disolventes orgánicos, con un consumo de muestra de 0.2 mL por cada réplica. Además, el empleo de una celda ATR de diamante permite el análisis directo de muestras de pH muy alto que no podrían ser analizadas con los accesorios ATR clásicos que utilizan un cristal de

ZnSe y que puede ser atacado en estas condiciones. El método resulta aplicable al control de calidad de las formulaciones estudiadas por su sencillez y elevada frecuencia de análisis (50 h^{-1}), a pesar de ser un método en *batch*, y se sugiere su futura automatización mediante la inserción de una sonda ATR de diamante en la muestra problema.

2. Bajo un nuevo punto de vista, se han puesto a punto tres métodos basados en la espectrometría vibracional que utilizan la estrategia de la multiconmutación para dar solución a diferentes cuestiones analíticas.

En el primero de ellos, se ha conseguido un nuevo método de análisis ATR-FTIR completamente mecanizado para la determinación del surfactante α -olefinsulfonato sódico en formulaciones de detergentes líquidos. Con este método se consigue un aumento de la frecuencia de análisis respecto de las medidas en ATR horizontal convencional y además se logra la limpieza en línea de la celda ATR de flujo, evitando manipulaciones peligrosas del accesorio ATR. Las características del método lo hacen especialmente indicado para el análisis de control de calidad. Además se ha puesto de manifiesto la gran versatilidad del acoplamiento ATR-FTIR con multiconmutación para el análisis de diversos tipos de muestras.

En el segundo trabajo, se ha desarrollado y puesto a punto un método de análisis FTIR en flujo con multiconmutación a partir los estudios FIA preexistentes para la determinación de benceno en gasolina. En este caso se ha conseguido reducir notablemente el consumo de reactivos y la generación de residuos a través del aprovechamiento de las características de los sistemas con multiconmutación, mejorando el límite de detección y manteniendo una precisión comparable al método FIA. El método resulta perfectamente aplicable al análisis de control de calidad.

El tercer método corresponde al análisis en flujo FT-NIR con multiconmutación para la determinación del pesticida hexythiazox en formulaciones fitosanitarias. Se ha logrado un método alternativo a los habituales cromatográficos, orientado hacia el análisis de control de calidad, con un límite de detección de 0.1 mg mL^{-1} adecuado para el tipo de

muestras analizadas. Se ha demostrado la robustez y versatilidad de los sistemas acoplados FT-NIR con multiconmutación. El uso de esta estrategia evita errores producidos por cambios en las variables ambientales como pueda ser la temperatura. Además se ha aplicado la interpolación entre dos puntos correspondientes a una concentración superior y una concentración inferior a la esperada en la muestra, con el fin de mejorar la eficiencia del análisis de control de calidad.

3. Se ha investigado el acoplamiento de la espectrometría FTIR con la extracción en fase sólida para el análisis a nivel de traza, por un lado, y el acoplamiento con la extracción presurizada con disolvente para la determinación de materia grasa en leches en polvo, por otro.

En el primer caso se ha puesto de manifiesto la gran dificultad de la aplicación de métodos no cromatográficos en este campo, lo que tiene un especial sentido en el caso de la espectrometría IR debido a las limitaciones de sensibilidad intrínsecas de esta técnica. A pesar de ello, se ha logrado poner a punto dos métodos para la determinación a nivel de mg L⁻¹ de los pesticidas methidathion y tricyclazole en aguas. Se ha comprobado que la estrategia de elución y determinación en línea si bien supone la posibilidad de automatización del procedimiento, no supone ventajas adicionales en términos de sensibilidad, precisión y exactitud frente a la estrategia en *batch* cuando el operador dispone de un adecuado grado de destreza.

En el segundo trabajo, el desarrollo de un método PSE-FTIR ha permitido reducir considerablemente el tiempo de análisis y la generación de residuos en la determinación del contenido de materia grasa en leches en polvo. Sin embargo, se han encontrado errores importantes en su aplicación a leches en polvo desnatadas, debido a problemas de calibración e interferencias espectrales, a priori difícilmente subsanables. Además se ha investigado la utilidad de la espectrometría FTIR para la discriminación rápida de grasas de diferente origen. También se ha realizado un estudio de la relación entre el contenido de grasa y el contenido en cacao de chocolates, mediante un nuevo método PSE-FTIR.

4. Por lo que respecta al tratamiento en línea de las muestras, se ha desarrollado un nuevo método de análisis FTIR en línea para la determinación del fármaco succinato de doxilamina en especialidades farmacéuticas. Este método implica el uso de tan sólo 2.6 mL de una mezcla de etanol y cloroformo al 13 % (v/v) por cada réplica, mostrando su aplicabilidad al análisis de rutina, aun siendo necesario recurrir a la adición estándar. La extracción y determinación del analito se realizan en línea, explotando la co-adición de espectros como la estrategia más conveniente para reducir al mínimo el tiempo de análisis, logrando una frecuencia de análisis de 10 h⁻¹. En este caso se ha demostrado la gran mejora que supone la extracción en línea de la muestra, que reduce hasta en cuatro veces el consumo de disolvente respecto del método FTIR equivalente en modo *batch* y que implica una mínima manipulación de las muestras, reduciendo al máximo la exposición de los disolventes al operador o del entorno ambiental del laboratorio.

En términos generales, la presente Tesis ha supuesto el desarrollo de al menos 7 nuevos métodos de análisis aplicables al control de calidad, que implican consumos reducidos de disolventes y la disminución de los residuos generados en el análisis. Estos logros forman parte de los esfuerzos orientados hacia la preparación de métodos de análisis medioambientalmente sostenibles en los que se inscribe esta Tesis.

Gran parte de este mérito corresponde al uso de la multiconmutación acoplada con las técnicas del infrarrojo. Los aspectos prácticos de la multiconmutación, que se han demostrado aquí y que, a mi juicio, son los más importantes según mi propia experiencia, se pueden resumir en: i) versatilidad de la estrategia de análisis, ii) reducción de la manipulación de la muestra y iii) facilidad de diseño.

Respecto a la versatilidad, hemos mostrado tres estrategias que plantean la multiconmutación de manera diferente: en una de ellas tiene como principal función el reducir la manipulación del cristal ATR; en las otras dos se aprovecha su capacidad para conseguir la dilución y adición de un estándar en línea; en una se realizan las medidas en modo *stopped-flow*; en las otras dos la adquisición de espectros se lleva a cabo en modo continuo. Son ejemplos de la múltiple variedad de enfoques que permite la

multiconmutación a la hora de plantear un diseño experimental adecuado un problema analítico.

En referencia a la manipulación de la muestra, los sistemas con multiconmutación permiten una intervención mínima del analista: esto representa un aumento de la comodidad y, en consecuencia, supone la mejora de la eficiencia de un laboratorio de análisis, independientemente del incremento en la frecuencia de análisis que se logre gracias al método en sí mismo.

En tercer lugar, la experiencia ha demostrado que con unos conocimientos mínimos de programación y electrónica se pueden diseñar y construir sistemas que permiten llevar a cabo casi cualquier proceso típico de un método de análisis. Esta ventaja, quizá no suficientemente explotada hasta la fecha, en particular en el caso de la espectrometría vibracional, sugiere una enorme cantidad de aplicaciones casi inmediatas, que podrían ser de enorme utilidad en el análisis de campo y de rutina.

Finalmente, la técnica ATR-FTIR con celda de diamante ha resultado ser extraordinariamente práctica debido a la dureza y resistencia química de este material, a pesar de su fragilidad. La posibilidad de obtener el espectro de prácticamente cualquier sustancia líquida o sólida independientemente de su reactividad química la convierte en una técnica especialmente interesante. El análisis directo de las muestras que permite este tipo de celdas es quizá uno de los objetivos de la investigación en el campo de la espectrometría vibracional más buscados.

En conclusión, futuras investigaciones deberían explotar al máximo el potencial de la multiconmutación en la automatización de los métodos de análisis, por una parte, y aprovechar la gran versatilidad de las celdas ATR de diamante para el análisis directo de muestras muy corrosivas.

En definitiva, se ha demostrado la gran capacidad de las técnicas FTIR para resolver problemas analíticos comunes y el papel decisivo que en la actualidad debe tener en los laboratorios analíticos.

Capítulo VI

Apéndices

Apéndice I

Programación en Quickbasic 4.5 orientada hacia el control de sistemas con multiconmutación

El control de las válvulas solenoides de los sistemas con multiconmutación que forman parte de esta Tesis ha requerido el diseño de pequeños programas en lenguaje Quickbasic 4.5. Comentaremos brevemente la forma básica de estos programas.

El funcionamiento de la válvula solenoide se debe al paso de corriente eléctrica. Cuando ésta circula a través del solenoide, el pistón interno de la válvula se desplaza bloqueando una de las salidas del flujo. Si no hay paso de corriente eléctrica, el pistón se mantiene bloqueando la otra salida. La válvula recibe la corriente de una placa que le proporciona la intensidad y diferencia de potencial requerida para activarla. A su vez, a la placa le llega la señal (con una determinada diferencia de potencial e intensidad) procedente del PC desde el puerto apropiado, siendo la función de la placa transformar la señal recibida desde el PC en la adecuada para que se active la válvula. Dependiendo de si desde el PC se envía a la placa la señal correspondiente al valor bit 1 o al valor bit 0, la válvula se activa o no. El control de la válvula se logra, por tanto, mediante el envío de la señal desde el PC, y ello se hace con un programa en Quickbasic 4.5.

A modo de ejemplo se describe un pequeño programa de prueba diseñado para la realización de una adición estándar (correspondiente al trabajo de determinación FT-NIR de hexythiazox en formulaciones de pesticidas). En este sistema sólo se emplean dos válvulas solenoides, una para el *carrier* (acetonitrilo) y muestra (V1) y otra para la inserción de patrón (V2). El sistema se ha diseñado de tal manera que, cuando se activa la válvula V1 estando desactivada V2, se introduce acetonitrilo a través del sistema. Si está activada V2 se introduce únicamente patrón. La explicación de los comandos se ha resaltado entre corchetes (que no pertenecen al programa en sí). La versión definitiva es más compleja. En

lo que se refiere al control de las válvulas este programa de prueba contiene todos los elementos necesarios para realizar una adición estándar y resulta más sencillo de explicar, motivo por el que lo reproducimos aquí.

```
DIM SHARED v1, v2, v3, v4, porta,
```

[Define las variables comunes utilizadas en el programa, en este caso se han definido hasta cuatro válvulas (v1, v2, v3, v4) y la entrada de las válvulas (porta)]

```
porta = &H378: v1 = &H1: v2 = &H2: v3 = &H4: v4 = &H8  
v5 = &H10: v6 = &H20: v7 = &H40: v8 = &H80:
```

[Define la correspondencia de cada válvula con la entrada del puerto de la impresora &H378]

```
SCREEN 12
```

[Genera la pantalla]

```
inicio:
```

[Marca un punto en la secuencia de acciones que realiza el programa]

```
CLS
```

[Borra lo que hubiese anteriormente en la pantalla]

```
LINE ( 2, 2)-( 630, 450), 3, B  
LINE ( 4, 4)-( 626, 446), 3, B
```

[Genera dos rectángulos en la pantalla]

```
LOCATE 8, 4
```

```
PRINT "Adición estándar"
```

[Escribe el texto entre comillas a partir del punto 8,4 de la pantalla]

```
LOCATE 10, 4
```

```
INPUT "tiempo patrón(s)"; tpa
```

[Pide el valor de la variable tiempo patrón definida como tpa (en segundos). El volumen de patrón insertado será proporcional al tiempo tpa]

```
LOCATE 12, 4
```

```
INPUT "tiempo AcCN(s)"; tac
```

```
LOCATE 14, 4
```

[Pide el valor de la variable tiempo de acetonitrilo definida como tac (en segundos). El volumen de acetonitrilo insertado será proporcional al tiempo tac]

```
LOCATE 10, 4
```

```
PRINT " "
```

```
LOCATE 12, 4
```

```
PRINT " "
```

[Borra las líneas 10 y 14 sin necesidad de borrar el resto de la pantalla]

```
LOCATE 10, 4
```

```
PRINT tpa; "segundos de patrón"
```

```
LOCATE 12, 4
```

```
PRINT tac; "segundos de AcCN"
```

```
LOCATE 14, 4
```

```
PRINT "0.5 segundos de muestra"
```

```
LOCATE 16, 4
```

```
PRINT "30 ciclos establecidos"
```

[Escribe los valores de tiempo para las variables tpa, tac y señala el tiempo de muestra, que es constante en este caso, y el número de ciclos de inserción, también constante (30), que se ha seleccionado previamente con un estudio de la variable]

```
FOR nl = 1 TO 30
```

[Abre un bucle de acción que se repite 30 veces. Se corresponde con el número de ciclos que constituye cada punto de la adición estándar]

```
LOCATE 22, 4
```

```
PRINT nl; "...ciclo"
```

[Escribe en la pantalla el ciclo en el que se encuentra el sistema en cada momento, nl]

```
OUT porta, 0
```

[Deja todas las válvulas desactivadas (bit 0)]

```
p1x = TIMER  
WHILE (TIMER - p1x) < .5  
LOCATE 24, 4  
PRINT "Muestra!"  
LOCATE 25, 5  
PRINT .5 - (TIMER - p1x)  
WEND
```

[Escribe en la pantalla el tiempo que resta de inserción de la muestra]

```
LOCATE 24, 4  
PRINT " "  
LOCATE 25, 5  
PRINT " "
```

```
OUT porta, v1
```

[Activa sólo la válvula v1 (bit 1), por lo que se inserta acetonitrilo]

```
p1bx = TIMER  
WHILE (TIMER - p1bx) < tac  
LOCATE 24, 4  
PRINT "Acetonitrilo!"  
LOCATE 25, 5  
PRINT tac - (TIMER - p1bx)  
WEND
```

[Escribe en la pantalla el tiempo que queda de inserción del acetonitrilo, de manera que cuando termina se ha insertado un tiempo tac de acetonitrilo]

```
LOCATE 24, 4  
PRINT " "
```

```
LOCATE 25, 5
PRINT "
OUT porta, v2
```

[Activa sólo la válvula v2, es decir, se inserta sólo patrón porque v1 vuelve a estar inactivada]

```
pabx = TIMER
WHILE (TIMER - pabx) < tpa
LOCATE 24, 4
PRINT "Disolución patrón!"
LOCATE 25, 5
PRINT tpa - (TIMER - pabx)
WEND
```

[Escribe en la pantalla el tiempo que queda de inserción del patrón, de manera que cuando termina se ha insertado un tiempo tpa de patrón]

```
LOCATE 24, 4
PRINT "
LOCATE 25, 5
PRINT "
```

NEXT

[Completa el bucle anterior de manera que todo el proceso desde FOR nl= 1 TO 30 se realiza 30 veces en total, igual al número de ciclos de inserción]

```
OUT porta, 0
```

[Inactiva todas las válvulas]

BEEP

[Produce un sonido de aviso]

CLS

[Borra la pantalla]

```
aax = TIMER  
DO WHILE INKEY$ = ""
```

[Genera un cronómetro mediante el uso del reloj interno TIMER, cuyo tiempo inicial es aax. Está dentro de un bucle infinito que se termina cuando se presiona una tecla]

```
LOCATE 24, 4  
PRINT "tiempo desde último ciclo..."; TIMER - aax
```

[Escribe en la pantalla el tiempo transcurrido desde que se completó el último ciclo de inserción]

```
LOOP
```

[Cierra el bucle del cronómetro]

```
LOCATE 8, 10  
INPUT "Desea realizar otro punto de la adición estándar";  
ade$  
IF UCASE$(ade$) = "S" THEN GOTO inicio
```

[Pregunta si se realiza otro punto de la adición estándar. Si se teclea "S", entonces se vuelve al marcador inicio: y continúa el proceso desde ese sitio. Si se teclea cualquier otro carácter, el programa termina]

```
BEEP
```

```
END
```

[Finaliza el programa]

Apéndice II

Glosario de términos

procedentes del inglés

Background: Espectro de transmisión que se utiliza como referencia para fijar los valores absolutos de señal obtenidos en los espectros realizados posteriormente. En general se utiliza el espectro para la celda de medida llena de disolvente.

Batch: Proceso que se realiza de manera discontinua o discreta, en este caso referido a un método de análisis.

Beam splitter: Dispositivo divisor de un haz de radiación electromagnética, en este caso de radiación infrarroja, que forma parte de un interferómetro.

By-pass: Desviación de un flujo a través de un canal alternativo al principal.

Carrier: Especie utilizada como portador de la muestra en un sistema de flujo.

Coil: Tubo enrollado a través del que se produce una mezcla o reacción de los componentes insertados alternadamente en un sistema de flujo.

Scan: Cada uno de los barridos realizado a lo largo de todo el intervalo espectral que se promedia para obtener el espectro final.

Slug: Bolo de líquido, definido como cada una de las porciones individuales insertadas en un sistema de flujo.

Software: Programa informático.

Stopped-flow: Flujo parado, referido al proceso de medición en un sistema de flujo.

Zero-filling: Adición de ceros al interferograma, proceso que se realiza para completar los 2ⁿ puntos necesarios para la Transformada de Fourier y obtener el espectro en el dominio de la frecuencia.



Capítulo VII

Bibliografía

VII. Bibliografía

- Al-Alawi, 2006** Al-Alawi, A.; van de Voort, F. R.; Sedman, J.; Ghetler, A.; *Journal of Analytical Laboratory Automation* 11 (2006) 23.
- Allegheny, 2001** Allegheny Observatory, en *Encyclopedia of Astronomy and Astrophysics*, Nature Publishing Group, 2001.
- Araújo, 1995** Araújo, A. N.; Lima, J. F. L. C.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 447.
- Argekar, 1999** Argekar, A. P.; Sawant, J. G.; *Journal. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 2051.
- Argekar, 1999b** Argekar, A. P.; Sawant, J. G.; *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 945.
- Armenta, 2004** Armenta, S.; Quintás, G.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 257.
- Armenta, 2005a** Armenta, S.; Moros, J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Journal of Near Infrared Spectrosc.* 13 (2005) 161.
- Armenta, 2005b** Armenta, S.; Quintás, G.; Morales, A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Journal of Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5842.
- Armenta, 2005c** Armenta, A.; Quintás, G.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 772.
- Ayora-Cañada, 2000** Ayora-Cañada, M. J.; Lendl, B.; *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 41.
- Blasco, 2004** Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 231.
- Blasco, 2002** Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 201.
- Blasco, 2002b** Blasco, C.; Fernández, M.; Picó, Y.; Font, G.; Manes, J.; *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 109.
- Boselli, 2001** Boselli, E.; Velazco, V.; Caboni, M. F.; Lercker, G.; *Journal of Chromatography A* 917 (2001) 239.
- Bouhsain, 1995** Bouhsain, Z.; Hasan, B. A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Química Analítica* 14 (1995) 96.

- Bouhsain, 1996** Bouhsain, Z.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Analyst* 121 (1996) 635.
- Bouhsain, 1999** Bouhsain, Z.; Garrigues, J. M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Vib. Spectrosc.* 21 (1999) 143.
- Bugay, 2001** Bugay, D. E.; Findlay, W. P.; *Vibrational Spectroscopy*, en *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, L. Ohannesian (Ed.), 2001, 501-535.
- Cadet, 2000** Cadet, F; de la Guardia, M.; *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.) Wiley, Chichester, 2000, 10879.
- Cankur, 2005** Cankur, O.; Korkmaz, D.; Ataman, O. Y.; *Talanta* 66 (2005) 789.
- Chen, 2003** Chen, S.; Gfrerer, M.; Lankmayr, E.; Quan, X.; Yang, F.; *Chromatographia* 58 (2003) 631.
- Ciurczak, 2002** Ciurczak, E. W.; Drennen, J. K.; *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker, 2002.
- Coates, 2000** Coates, J.; *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 10815-10837.
- Coates, 2000b** Coates, J.; Sanders, J.; *Spectrosc. Eu.* 12 (2000), 12.
- Coblentz, 1905** Coblentz, W. W.; *The Physical Review* XX (1905) 337.
- Coelho, 2006** Coelho, N. M. M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Talanta* 68 (2006) 836.
- Colute, 2004** Colute, A.; Diewok, J.; Lendl, B.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 835.
- Curbelo, 2000** Curbelo, R.; *Fourier Transformation and Sampling Theory*, Academic Press, 1999, en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 632-636.
- Curran, 1985** Curran, D. J.; Collier, W. G.; *Anal. Chim. Acta* 177 (1985) 259.
- Daghbouche, 1995** Daghbouche, Y.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 203.

- Daghbouche, 1997** Daghbouche, Y. ; Garrigues, S. ; Vidal, M. T. ; de la Guardia, M. ; *Anal. Chem.* 69 (1997) 1086.
- Daghbouche, 1997b** Daghbouche, Y. ; Garrigues, S. ; Morales-Rubio, A. ; de la Guardia, M. ; *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 161.
- Davies, 1998** Davies, T.; *Analusis* 26 (1998) 7.
- de la Guardia, 1992** de la Guardia, M.; Garrigues, S.; Gallignani, M.; *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 53.
- de la Guardia, 1993** de la Guardia, M.; Gallignani, M.; Garrigues, S.; *Anal. Chim. Acta* 282 (1993) 543.
- Diessel, 2004** Diessel, E.; Willmann, S.; Kamphaus, P.; Kurte, R.; Damm, U.; Heise, H. M.; *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 442.
- Dionex, 2000** *Dionex Application Note* 340 (2000) 4.
- Edelmann, 2003** Edelmann, A.; Diewok, J.; Rodríguez-Baena, J.; Lendl, B.; *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 92.
- EPA, principles** <http://www.epa.gov/greenchemistry/principles.html>
- Esser, 2000** Esser, S.; Wenclawiak, B. W.; Gabelmann, H.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 368 (2000) 250.
- Eurostat, 2002** The Use of Plant Protection Products in the European Union, Eurostat, European Comission, 2002.
- Extoxnet, htm** <http://extoxnet.orst.edu/pips/methidat.htm>
- Fang, 1993** Fang, Z.; *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH, 1993.
- Fifield, 2000** Fifield, F. W.; Kealey, D.; *Principles and Practice of Analytical Chemistry 5th Edition*, Blackwell Science, 2000.
- Gallignani, 1993** Gallignani, M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 267.
- Gallignani, 1994a** Gallignani, M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; Burguera, M.; Burguera, J. L.; *Talanta* 41 (1994) 739.
- Gallignani, 1994b** Gallignani, M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Analyst* 119 (1994) 653.

- Gallignani, 1994c** Gallignani, M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 287 (1994) 275.
- Gallignani, 1994d** Gallignani, M.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Analyst* 119 (1994) 1773.
- Gallignani, 2002** Gallignani, M.; Ayala, E.; Brunetto, M.R.; Burguera, J.L.; Burguera, M.; *Analyst* 127 (2002) 1705.
- Gallignani, 2005** Gallignani, M.; Ayala, C.; del Rosario-Brunetto, M.; Burguera, J. L.; Burguera, M.; *Talanta* 68 (2005) 470.
- Garrido-Frenich, 2004** Garrido-Frenich, A.; Martínez-Vidal, J. L.; López-López, T.; Cortés-Aguado, S.; Martínez-Salvador, I.; *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 199.
- Garrigues, 1992** Garrigues, S.; Gallignani, M.; de la Guardia, M.; *Analyst* 117 (1992) 1849.
- Garrigues, 1993a** Garrigues, S.; Gallignani, M.; de la Guardia, M.; *Talanta* 40 (1993) 89.
- Garrigues, 1993b** Garrigues, S.; Gallignani, M.; de la Guardia, M.; *Talanta* 40 (1993) 1799.
- Garrigues, 2000a** Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Quantitative Analysis Infrared*, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 10879.
- Garrigues, 2000b** Garrigues, J. M.; Akssira, M.; Rambla, F. J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Talanta* 51 (2000) 247.
- Geshke, 1997** Geshke, R.; Zehringer, M.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 357 (1997) 773.
- Gilbert, 2000** Gilbert, A. S.; *Vibrational, Rotational and Raman Spectroscopy, Historical Perspective*, Academic Press, 1999, en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 2422-2432.
- Gilberto, 1991** Gilberto, G.; Laffi, R.; *Lab-2000* (1991) 38.
- Gu, 2003** Gu, H. N.; Yang, Z. Y.; Li, J. P.; *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 57.

- Guzmán, 1991** Guzmán, M.; Růžička, J.; Christian, G. D.; Shelley, P.; *J. Vib. Spectrosc.* 2 (1991) 1.
- Hansen, 1985** Hansen, E. B.; Thompson, H. C.; *Liquid Chrom. Mag.* 3 (1985) 986.
- Hetherton, 2004** Hetherton, C. L.; Sykes, M. D.; Fussell, R. J.; Goodall, D. M.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2443.
- Hollas, 2004** Hollas, J. M.; *Modern Spectroscopy 4th Edition*, John Wiley & Sons, 2004.
- Hooijverink, 2003** Hooijverink, H.; van Bennekom, E. O.; Nielsen, M. W. F.; *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 51.
- Jarute, 2004** Jarute, G.; Kainz, A.; Schroll, G.; Baena, J. R.; Lendl, B.; *Anal. Chem.* 76 (2004) 6353.
- Josephs, 1995** Josephs, J. L.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 1270.
- Kaihara, 2000** Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsunura, Y.; Nakamura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y.; *J. Health Sci.* 46 (2000) 336.
- Kawai, 1989** Kawai, M. J.; *Pesticide. Sci.* 14 (1989) 407.
- Kellner, 1997** Kellner, R.; Lendl, B.; Wells, I.; Worsfold, P.; *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 227.
- Kemeny, 1992** G.J. Kemeny, G. J.; *Handbook of Near-Infrared Analysis*, D.A. Burns, E.W. Ciurczak, M. Dellens (Eds.), New York, 1992.
- Kirchhoff, 1860** Kirchhoff, G.; Bunsen, R.; *Annalen der Physik und der Chemie* 110 (1860) 161.
- Knepper, 2003** Knepper, T. P.; *Trends in Anal. Chem.* 22 (2003) 708.
- Kou, 2003** Kou, D.; Mitra, S.; *Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices en Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, S. Mitra (Ed.), en Chemical Analysis vol. 162, J. Winefordner (Ed.), Wiley-Interscience, 2003, 139-182.
- Krieg, 1996** Krieg, P.; Lendl, B.; Vonach, R.; Kellner, R.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 356 (1996) 504.
- LaCroix, 2003** LaCroix, D. E. ; Wolf, W. R. ; *J. AOAC Int.* 86 (2003) 86.
- Lendl, 1995** Lendl, B., Kellner, R.; *Mikrochim. Acta*. 119 (1995) 73.

- Lendl, 1997** Lendl, B.; Schindler, R.; Frank, J.; Kellner, R.; Drott, J.; Laurett, T.; *Anal. Chem.* 69 (1997) 2877.
- Lendl, 1998** Lendl, B.; Krieg, P.; Kellner, R.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 360 (1998) 717.
- Lendl, 1999** Lendl, B.; Schindler, R.; *Vib. Spectrosc.* 16 (1999) 1.
- Lendl, 2000** Lendl, B.; Frank, L.; Schindler, R.; Muller, A.; Beck, M; Faist, J.; *Anal. Chem.* 72 (2000) 1645.
- Le Thanh, 2000** Le Thanh, H.; Lendl, B.; *Anal. Chim. Acta* 422 (2000) 63.
- Liñán, 2000** Liñán, C.; *Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, Ediciones Agrotécnicas SL, Madrid, 2000.
- López-Anreus, 1995** López-Anreus, E.; Garrigues, S., de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 28.
- López-Anreus, 1996** López-Anreus, E.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 157.
- Lucena, 2006** Lucena, R.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M.; *Analyst* 131 (2006) 415.
- Macho, 2002** Macho, S.; Larruchi, M. S.; *Trends in Anal. Chem.* 21 (2002) 799.
- McGhie, 1990** McGhie, T. K.; Holland, P. T.; Malcolm, C. P.; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 19 (1990) 267.
- Meadows, 2001** Meadows, J.; *Astrophysics to 1900*, en *Encyclopedia of Astronomy and Astrophysics*, Nature Publishing Group, 2001.
- Miller, 1988** Miller, B. E.; Danielson, N. D. ; Katon, J. E.; *App. Spectrosc.* 42 (1988) 401.
- Monferrer-Pons, 1996** Monferrer-Pons, L.; Esteve-Romero, J. S.; Ramis-Ramos, G.; García Álvarez-Coque, M. C.; *Anal. Lett.* 29 (1996) 1399.
- Morgan, 1985** Morgan, D. K.; Danielson, N. D.; Katon, J. E.; *Anal. Lett.* 18 (1985) 259.
- Mossoba, 2001** Mossoba, M. M.; Adam, M.; Lee, T.; *Journal of AOAC Int.* 84 (2001) 1144.
- Nakanishi, 2003** Nakanishi, K.; Hashimoto, A.; Pan, T.; Kanou, M.; Kameoka, T.; *Appl. Spectrosc.* 57 (2003) 1510.

- Olesik, 1986** Olesik, S. V.; French, S. B.; Novotny, M.; *Anal. Chem.* 58 (1986) 2256.
- Ortelli, 2004** Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C.; *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 33.
- Owens, 2000** Owens, G.; Ferguson, V. K.; McLaughlin, M. J.; Singleton, I.; Reid, R. J.; Smith, F. A.; *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 885.
- Pérez-Ponce, 2000** Pérez-Ponce, A.; Lendl, B.; *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 676.
- Petrovic, 2003** Petrovic, M.; González, S.; Barceló, D.; *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685.
- Protocolo Montreal, 2000** Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono, PNUMA, Secretaría del Ozono, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2000.
<http://www.unep.org/ozone/pdfs/Montreal-Protocol2000.pdf>
- Ramos, 1995** Ramos, M. L.; Tyson, J. F.; Curran, D. J.; *Anal. Proc.* 32 (1995) 175.
- Ramos, 1998** Ramos, M. L.; Tyson, J. F.; Curran, D. J.; *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 107.
- Real Decreto, 1986** Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.
- Reis, 1999** Reis, B. F.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 265.
- Richardson, 2001** Richardson, R. K.; *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1522.
- Rocha, 2002** Rocha, F. R. P.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. S; Santos, J. L. M.; *Analytica Chimica Acta* 468 (2002) 119.
- Rosemberg, 1994** Rosemberg, E.; Kellner, R.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 348 (1994) 530.
- Ruiz-Jiménez, 2004** Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M. D.; *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 75.
- Růžička, 1981** Růžička, J.; Hansen, E. H.; *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1981.

- Sánchez-Dasí, 1998** Sánchez- Dasí, M. J.; Garrigues, S.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M.; *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 253.
- Sannino, 2004** Sannino, A.; Bolzoni, L.; Bandini, M.; *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 161.
- Schindler, 1997** Schindler, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Analyst* 122 (1997) 531.
- Schindler, 1998** Schindler, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 35.
- Schindler, 1998b** Schindler, R.; Le Thanh, H.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Vib. Spectrosc.* 16 (1998) 127.
- Schindler, 1998c** Schindler, R.; Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 362 (1998) 130.
- Schindler, 1998d** Schindler, R. E.; Watkins, M.; Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, T.; Sara, R.; *Anal. Chem.* 70 (1998) 226.
- Schindler, 1999** Schindler, R.; Lendl, B.; *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 19.
- Schoen, 1997** Schoen, P.; Bauer, K. H.; Wiskamp, V.; *Fresenius's J. Anal. Chem.* 358 (1997) 699.
- Schuermeyer, 1999** Schuermeyer, F.; Pickenpaugh, T.; *Photoconductive sensors*, en *Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook CRC Netbase* 1999, CRC Press, 1999, 56.1.
- Schulz, 2004** Schulz, H.; Baranska, M.; Quilitzsch, R.; Schuetze, W.; *Analyst* 129 (2004) 917.
- Sheldon, 1997** Sheldon, R. A.; *J. of Chem.Tech. and Biotech.* 68 (1997) 381.
- Silverstein** Silverstein, R. M.; Webster, F.X.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th edition, J. Wiley, New York, 1998.
- Spraggs, 2000a** Spraggs, R. A.; *IR Spectrometers*, Academic Press, 1999, en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 1048-1057.
- Spraggs, 2000b** Spraggs, R. A.; *IR Spectroscopy Sample Preparation Methods*, Academic Press, 1999, en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 1058-1066.

- Steele, 2000** Steele, D.; *IR Spectroscopy, Theory*, Academic Press, 1999, en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 1066-1071.
- Tang, 2000** Tang, Y. F.; Wu, H. L.; Wu, S. M.; Chen, S. H.; Kou, H. S.; *Journal Microcol. Sep.* 12 (2000), 366.
- Toschi, 2003** Toschi, T. G.; Bendini, A.; Ricci, A.; Lercker, G.; *Food Chem.* 83 (2003) 551.
- Valenzuela, 2001** Valenzuela, A.; Picó, Y.; Font, G.; *Journal of AOAC Int.* 84 (2001) 901.
- Ventura-Gayete, 2004** Ventura-Gayete, J. F.; Ródenas-Torralba, E.; Morales-Rubio, A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Journal of AOAC Int.* 87 (2004) 1252.
- Vonach, 1997** Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Anal. Chem.* 69 (1997) 4286.
- Vonach, 1997b** Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Analyst* 122 (1997) 525.
- Vonach, 1998** Vonach, R.; Buschmann, J.; Falkowski, R.; Schindler, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *Appl. Spectrosc.* 52 (1998) 820.
- Vonach, 1998b** Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R.; *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 159.
- Voulgaropoulos, 1992** Voulgaropoulos, A.; Tzivanakis, N.; *Electroanalysis* 4 (1992) 647.
- Wei, 2005** Wei, Y. K.; Yang, J.; *Analytical Science* 21 (2005) 1195.
- Wells, 2003** Wells, M. J. M.; *Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids*, en *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, S. Mitra (Ed.), en Chemical Analysis vol. 162, J. Winefordner (Ed.), Wiley-Interscience, 2003, 37-138.
- Winder, 2004** Winder, C. L.; Goodacre, R.; *Analyst* 129 (2004) 1118.