

**CONSTRUCCIÓ DE SENSORS ELECTROQUÍMICS AMB
EL NOU IONÒFOR TETRONASINA I APLICACIÓ EN
ESTRATÈGIES ANALÍTIQUES AVANÇADES**

Memòria presentada per

Daniel Calvo Boluda

per optar al grau de doctor en Ciències Químiques



Bellaterra, juny de 2007

Manel del Valle Zafra, professor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona, certifico que aquesta tesi, que porta per títol *Construcció de sensors electroquímics amb el nou ionòfor tetronasina i aplicació en estratègies analítiques avançades*, ha estat realitzada en els laboratoris del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la meva direcció.

Bellaterra, 18 de juny de 2007

Manel del Valle Zafra

Grup de Sensors i Biosensors

Unitat de Química Analítica

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Cn. 08193 Bellaterra



Als meus pares,

ÍNDEX

Índex

ABREVIATURES I SÍMBOLS

RESUM

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. ELS SENSORS QUÍMICS	1
1.1.1. Els sensors potenciomètrics	3
1.1.2. ISE basats en portador mòbil neutre.....	5
1.1.3. Els antibiòtics ionofòrics.....	7
1.2. ESPECTROSCÒPIA ELECTROQUÍMICA D'IMPEDÀNCIES	8
1.3. MÀTRIX DE SENSORS.....	15
1.4. PROCESSAMENT MULTIVARIABLE	16
1.4.1. Preprocessament del senyal	17
1.4.2. Xarxes neuronals artificials (XNA)	18
1.4.3. Anàlisi en components principals (PCA).....	26
1.4.4. Regressió parcial per mínims quadrats (PLS).....	27
1.5. LA LENGUA ELECTRÒNICA (LE).....	27
1.5.1. L'LE com a eina d'anàlisi qualitativa.....	29
1.5.2. L'LE com a eina d'anàlisi quantitativa	30
1.6. ISE EN SISTEMES AUTOMATITZATS	30

1.6.1.	<i>La tècnica d'anàlisi per injecció de flux (FIA)</i>	31
1.6.2.	<i>La tècnica d'injecció seqüencial (SIA)</i>	32
1.7.	ISE EN SISTEMES VOLUMÈTRICS AUTOMATITZATS	34
1.8.	BIBLIOGRAFIA.....	36
2.	OBJECTIUS	45
3.	METODOLOGIA	49
3.1.	REACTIUS	49
3.2.	CONSTRUCCIÓ DELS ELÈCTRODES.....	51
3.2.1.	<i>Elèctrodes en disposició convencional</i>	53
3.2.2.	<i>Elèctrodes en disposició tubular</i>	54
3.3.	INSTRUMENTACIÓ	56
3.3.1.	<i>Mesures potenciomètriques</i>	56
3.3.2.	<i>Mesures impedimètriques</i>	56
3.3.3.	<i>Sistema SIA</i>	57
3.3.4.	<i>Sistemes de valoració automàtics</i>	59
3.4.	METODOLOGIA DE CàLCUL.....	60
3.4.1.	<i>Activitat</i>	60
3.4.2.	<i>Corbes de calibratge</i>	60
3.4.3.	<i>Ajust lineal de les corbes de calibratge</i>	62
3.4.4.	<i>Ajust no lineal de les corbes de calibratge</i>	62
3.4.5.	<i>Coefficient de selectivitat potenciomètrica</i>	63
3.4.6.	<i>Resposta dinàmica dels ISE</i>	65
3.4.7.	<i>Resposta dels ISE al pH</i>	66
3.5.	AJUST DE MODELS TEÒRICS D'IMPEDÀNCIA	67
3.6.	AJUST DE MODELS DE RESPOSTA MITJANÇANT XNA	68
3.6.1.	<i>Generació de la informació</i>	68
3.6.2.	<i>Preprocessament de les dades</i>	71
3.6.3.	<i>Construcció i validació del model de resposta</i>	72
3.7.	BIBLIOGRAFIA.....	73
4.	DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS	77
4.1.	INTRODUCCIÓ	77
4.2.	CARACTERITZACIÓ D'ISE SELECTIUS D'ÍO SODI	80
4.3.	CARACTERITZACIÓ D'ISE SELECTIUS D'ÍO CALCI	83

4.3.1.	<i>Caracterització potenciomètrica</i>	84
4.3.2.	<i>Model de resposta dels ISE de tetronasina</i>	90
4.3.3.	<i>Caracterització impedimètrica</i>	93
4.4.	CONSTRUCCIÓ D'UNA LE PER DETERMINAR CATIONS ALCALINOTERRIS	97
4.5.	CONSTRUCCIÓ D'UNA LE EMPRANT SENYALS TRANSITORIS	101
4.6.	VALORACIÓ MULTICOMPONENT DE MESCLES BINÀRIES DE CALCI I MAGNESI EMPRANT UNA LE POTENCIOMÈTRICA	108
4.7.	VALORACIÓ SIMULTÀNIA DE MESCLES TERNÀRIES D'IONS ALCALINOTERRIS EMPRANT UNA LE POTENCIOMÈTRICA.....	113
4.8.	BIBLIOGRAFIA.....	118
5.	CONCLUSIONS	121
6.	ARTICLES PUBLICATS	

ANNEXOS

Abreviaturas i símbols

Abreviatures i símbols

ϕ	angle de desfasament
ω	freqüència angular
α	velocitat d'aprenentatge
β	moment
a_i	activitat de l'ió i
BBTP	bis(bis(4-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil)fosfat
BCMDM	2-dodecil-2-metilmalonat de bis[metil(12-corona-4)]
C_i	concentració de l'ió i
DBC	dibenzo-18-corona-6
DBS	sebacat de dibutil
DCHC	cis-diciclohexà-18-corona-6
DOPP	fenilfosfonat de dioctil
DOS	sebacat de bis(2-etilhexil)
E_{cel}	potencial de la cel·la
E_{cel}°	potencial estàndard de la cel·la
E_{ind}	potencial de l'elèctrode indicador
E_{mem}	potencial de membrana
E_{ref}	potencial de l'elèctrode de referència
E_{ul}	potencial d'unió de líquids

EDTA	sal disòdica de l'àcid etilenediaminotetraacètic
EEl	espectroscòpia electroquímica d'impedàncies
FFT	transformada ràpida de Fourier
FIA	anàlisi per injecció de flux
FIM	mètode de les solucions mesclades
GD	algorisme del descens del gradient
ICP-OES	espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament
ISE	elèctrode selectiu d'ions
$K^+TpCIPB^-$	tetrakis-(4-clorofenil)borat de potassi
K^{pot}	coeficient de selectivitat potenciomètrica
LD	límit de detecció
LE	llengua electrònica
LM	algorisme Levenberg-Marquart
Na^+TFPB^-	tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borat de sodi
NE	nas electrònic
<i>o</i> NPOE	orto-nitrofenilòctil èter
PCA	anàlisi per components principals
<i>PCi</i>	component principal <i>i</i>
PCR	regressió per components principals
PLS	regressió parcial per mínims quadrats
PVC	clorur de polivinil
RB	algorisme de regularització bayesiana
RMSE	error quadràtic mitjà
SIA	anàlisi per injecció seqüencial
SSM	mètode de les solucions separades
TBCOO	ester de l'àcid octaetil 4-tert-butilcalix[8]arè
TBP	tributilfosfat
TH	ionòfor tetronasina en forma àcida
$TMDA^+NO_3^-$	nitrat de tridodecilmetilamoni
TNa	sal sòdica de l'ionòfor tetronasina
XNA	xarxa neuronal artificial
z_i	càrrega de l'ió principal <i>i</i>
Z	impedància
Z_i	component imaginari de la impedància
Z_r	component real de la impedància

RESUM

Resum

L'interès que hi ha per trobar elèctrodes selectius d'ions (ISE) de millors característiques i el fet que l'antibiòtic tetronasina presenta uns equilibris d'intercanvi iònic en solució molt ràpids ens va fer plantejar l'ús d'aquest antibiòtic com a element electroactiu en ISE. La primera part de la investigació realitzada va correspondre a la construcció i avaluació de la resposta d'ISE basats en l'antibiòtic tetronasina per la detecció de l'ió sodi. A priori, aquest ió va ser el primer candidat degut a que els equilibris més ràpids en dissolució es devien a aquest ió. Es va replantejar l'ió principal pels ISE basats en tetronasina després de fer un exhaustiu estudi d'interferències, obtenint una resposta pel l'ió calci de tres ordres de magnitud més gran que per l'ió sodi. El següent pas va ser construir elèctrodes selectius d'ió calci i caracteritzar-los. La formulació òptima de la membrana selectiva d'ió calci emprava un 1% d'ionòfor, 0.2% d'additiu aniònic, 66% oNPOE i 33% PVC. La caracterització per aquests sensors va mostrar una resposta anormalment alta, del doble del predit per la llei de Nernst per ions divalents (65 mV/dècada) a pH=5.0.

Per la caracterització dels sensors desenvolupats i l'estudi del mecanisme de resposta també es va utilitzar la tècnica de la espectroscòpia electroquímica d'impedàncies. L'estudi de les característiques resistives de les membranes en el rang entre 50 KHz - 0.05 Hz va confirmar l'elecció de la membrana selectiva òptima. El diagrama de Nyquist d'aquesta membrana en contacte amb una solució de CaCl_2 10^{-3}M mostrava un únic semicercle corresponent a la

resistència oferida per la membrana (resistivitat < 700 KΩ·cm) i a la capacitat de la doble capa electroquímica (98 pF). L'estudi de les propietats resistives de la membrana variant el pH, junt amb els previs estudis potenciomètrics van permetre assignar el mecanisme de resposta conegut com *apparently twice-Nernstian response* descrit a la bibliografia.

L'ISE de millors característiques es va utilitzar per construir diferents eines analítiques avançades. La primera aplicació proposada va ser la de construir una llengua electrònica (LE), utilitzant un sistema SIA, per determinar cations alcalinoterris gràcies a una matriu de sensors potenciomètrics. Aquesta LE tenia el propòsit de determinar Mg^{2+} , Ca^{2+} i Ba^{2+} en mostres aquoses mitjançant una matriu formada per 5 sensors potenciomètrics del tipus *all-solid-state*. La informació emprada per construir el model de resposta mitjançant xarxes neuronals artificials (XNA) van ser 5 lectures de potencial (una per sensor en l'estat d'equilibri). La LE construïda permetia la determinació de Mg^{2+} i Ca^{2+} en mostres reals, mentre que la determinació de l'ió Ba^{2+} era només semi-quantitativa.

La segona aplicació proposada (també basada en un sistema SIA) va ser la de determinar simultàniament ions alcalins i alcalinoterris mitjançant una LE. Per aquesta proposta es va utilitzar senyals molt més complexes que els potencials dels ISE al estat d'equilibri. Els registres temporals de potencial obtinguts al passar un esglaió de mostra van ser utilitzats per construir el model de resposta de la LE. La informació significativa per construir el model amb XNA es va extreure gràcies a la transformada ràpida de Fourier (FFT), emprant uns pocs coeficients de Fourier a l'entrada de la xarxa. La metodologia proposada permetia resoldre mesclades de Ca^{2+} , Na^{+} i K^{+} amb molta més precisió que no pas una LE clàssica.

Les últimes aplicacions assajades en la present tesi doctoral es basen també en el concepte de la LE, però aplicada en la detecció del punt d'equivalència de valoracions complexomètriques de varis anàlits simultàniament. En primer lloc es va provar de determinar els ions calci i magnesi de forma simultània mitjançant una matriu de 4 sensors potenciomètrics i el processament mitjançant XNA. El mètode proposat consistia en realitzar una valoració molt simple amb EDTA amb els volums fixats (5 addicions). La resposta de la matriu de sensors abans de començar la valoració i després de cada addició es van fer servir per construir el model de resposta. Es va provar la viabilitat d'aquesta metodologia en l'anàlisi simultani de calci i magnesi en mostres reals. Un cop vist els bons resultats d'aquesta nova estratègia es va aplicar el mateix concepte a la multideterminació de tres ions alcalinoterris. El procediment seguit va ser el mateix però aplicat a la determinació simultània de mesclades ternàries de Ca^{2+} , Mg^{2+} i Sr^{2+} . Els resultats obtinguts van mostrar una bona capacitat de predicció de les concentracions d'aquestes tres espècies en mostres aquoses.

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1. *Els sensors químics*

Un sensor es pot definir com un dispositiu analític que permet prendre mesures de paràmetres físics, químics o biològics, i que es caracteritza per la seva simplicitat, per tenir petites dimensions, un cost baix i per ser capaç de generar informació química en temps real. Una particularitat dels sensors és que integren la majoria de les etapes dels procediments analítics tradicionals reduint-les a dues: el reconeixement i la transducció. En el cas dels sensors químics l'element que es reconeix és un analit, pel qual són selectius.

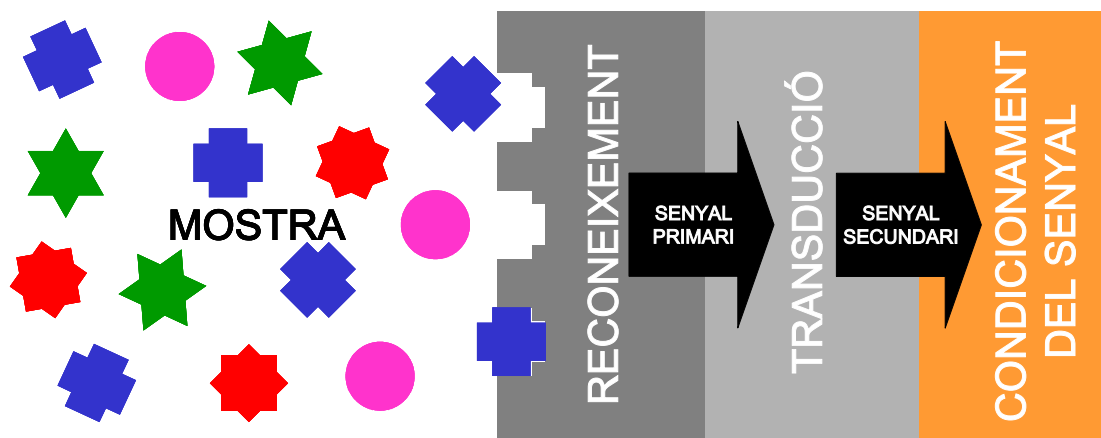


Figura 1.1. Esquema bàsic d'un sensor químic.

Idealment, els sensors químic (Figura 1.1) estan formats per dues parts ben diferenciades. La primera és l'element de reconeixement o receptor, que és el responsable de la interacció selectiva amb l'analit (senyal primari), i la segona és el transductor que tradueix aquest senyal primari en un senyal processable (senyal secundari). Segons el domini del senyal primari, els sensors químic es poden classificar en electroquímics, òptics, tèrmics o màssics.

Els sensors electroquímics tenen l'avantatge respecte de la resta de sensors químic que subministren directament un senyal del domini elèctric, que és fàcil de processar per mètodes electrònics, de manera que no necessita d'equips sofisticats, i utilitza instrumentació típica del laboratori (potenciòmetres i potenciostats). A més, els sensors electroquímics en molts casos es poden fabricar amb tècniques de producció en sèrie, per la qual cosa tenen un cost molt baix i es poden comercialitzar com a dispositius d'un sol ús.

Hi ha dues categories ben diferenciades de sensors electroquímics. En primer lloc tenim els sensors *potenciomètrics*, amb especial rellevància dels elèctrodes selectius d'ions (ISE com se'ls coneix per la seva nomenclatura anglesa, *ion-selective electrode*) i també dels transistors d'efecte de camp sensibles d'ions (ISFET també del angles, *ion-sensitive field-effect transistors*), que tenen una intensitat de corrent com a senyal secundari, tot i que l'origen és un potencial de membrana. L'altra categoria la formen els sensors *amperomètrics*, en la seva forma d'elèctrodes modificats químicament, que tenen com a senyal primari la intensitat d'una reacció electroquímica.

1.1.1. Els sensors potenciomètrics

Els sensors potenciomètrics tenen els seus fonaments en el potencial elèctric que es genera a la superfície d'un sòlid en estar en contacte amb una dissolució amb ions que poden interaccionar bescantant-se amb els de la superfície. L'activitat d'aquests ions en la solució, que ve a ser una concentració efectiva, està relacionada directament amb la magnitud d'aquest potencial.

La diferència de potencial mesurada en la tècnica potenciomètrica es dóna entre dos elèctrodes d'una cel·la galvànica (un elèctrode indicador i un de referència) sota condicions de corrent zero gràcies a l'alta impedància de l'element de mesura (potenciòmetre).

Equació 1.1:
$$E_{cel} = E_{ind} - E_{ref}$$

on E_{cel} és el potencial de la cel·la, E_{ind} el potencial de l'elèctrode indicador i E_{ref} , el de l'elèctrode de referència.

El potencial de l'elèctrode indicador depèn de les espècies presents a la dissolució i de la seva activitat, mentre que el potencial de l'elèctrode de referència es manté constant. L'equació de Nernst, que és l'equació bàsica de la tècnica potenciomètrica, ens permet relacionar el potencial de l'elèctrode indicador amb la quantitat de l'ió present a la solució.

Equació 1.2:
$$E_{cel} = E_{cel}^0 + (RT / z_i F) \cdot \ln a_i$$

on E_{cel}^0 és el potencial estàndard de la cel·la, R és la constant dels gasos ($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T és la temperatura (K), F és la constant de Faraday ($9.6446 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), z_i és la càrrega de l'ió implicat, i a_i és l'activitat de l'espècie que intervé en el procés.

Els ISE, que són el tipus fonamental de sensor potenciomètric, són sensors químics basats en un principi de transducció potenciomètrica i presenten resposta selectiva a una família d'ions amb propietats similars. Els elèctrodes selectius a ions basen el seu funcionament en una membrana selectiva que separa dues dissolucions i que només interacciona amb un únic ió. El mecanisme de reconeixement de les espècies es basa en una reacció d'equilibri a la superfície del sensor; per tant, aquesta superfície ha de tenir alguna substància que pugui reaccionar de manera reversible i selectiva amb l'analit. En posar en contacte aquesta superfície amb una solució que conté l'ió al qual l'ISE és

sensible, es produeix un bescanvi d'ions que provoquen una separació de càrregues al llarg de la interfície membrana–solució; aquesta fa que es creï un potencial interfacial anomenat *potencial de membrana*, entenent-se que s'estableix un equilibri entre l'ió i l'element de reconeixement. La quantitat d'ions a la dissolució determina la posició d'aquest equilibri i, per tant, la magnitud del potencial de membrana. La magnitud d'aquest potencial la descriu la equació següent:

$$\text{Equació 1.3: } E_{mem} = \frac{RT}{z_i F} \ln \left[\frac{a_{i(ext)}}{a_{i(int)}} \right],$$

on E_{mem} és el potencial de membrana i $a_{i(ext)}$ i $a_{i(int)}$ són les activitats de l'ió a cada cantó de la interfície.

Per tant, per a un elèctrode selectiu d'ions, tenint en compte el potencial de membrana i el potencial d'unió líquida (E_{ul}), el potencial de cel·la és el següent:

$$\text{Equació 1.4: } E_{cel} = E_{mem} - E_{ref} + E_{ul}.$$

Així doncs, si tenim en compte que $a_{i(int)}$, E_{ref} , i E_{ul} són constants, arriben a una equació en què el potencial de la cel·la tan sols depèn de l'activitat de l'ió en la dissolució:

$$\text{Equació 1.5: } E_{cel} = ct + (RT / z_i F) \cdot \ln a_{i(ext)}.$$

Aquesta última equació ve a ser l'equació bàsica de treball amb sensors potenciomètrics, tot i que, en presència d'altres ions, la selectivitat no ideal fa que en la resposta hi contribueixin ions secundaris o interferents, de manera que la resposta segueix ara l'equació de Nikolskii-Eisenmann [1], que té en compte que en la resposta dels ISE també hi contribueixen altres ions:

$$\text{Equació 1.6: } E_{cel} = ct + (RT / z_i F) \cdot \ln(a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j}),$$

on z_i i z_j són la càrrega de l'ió principal i de l'interferent, i a_i i a_j són l'activitat de l'ió principal i de l'interferent, respectivament.

La Figura 1.2 ens mostra la classificació que fa la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) dels elèctrodes selectius d'ions segons la naturalesa de la membrana selectiva [2].

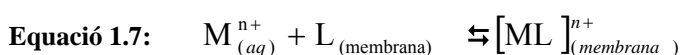
Elèctrodes selectius d'ions (ISE)					
PRIMARIS				COMPOSTOS	
membrana cristal·lina		membrana no cristal·lina			
membrana homogènia	membrana heterogènia	matriu rígida	portador mòbil	sensibles a gasos	d'enzim immobilitzat

Figura 1.2. Classificació IUPAC dels ISE segons el tipus de membrana que utilitzen.

Els elèctrodes de membrana cristal·lina són aquells que contenen ions mòbils i contraions fixos, en què destaca l'elèctrode de fluorur (membrana homogènia de monocristall de LaF_3). Dels elèctrodes selectius a ions amb membrana no cristal·lina destaca amb gairebé un segle d'història l'elèctrode de vidre sensible al pH (de matriu rígida) i els versàtils ISE de portador mòbil, també anomenats de membrana líquida, a causa del seu origen. En la versió moderna, aquests es basen en una matriu de suport de tipus polimèrica, que conté un bescanviador o portador iònic i un plastificant; segons el tipus de portador podem distingir entre portador neutre, portador carregat i parell iònic hidrofòbic [3]. En la present tesi es van utilitzar elèctrodes selectius d'ions del tipus membrana líquida polimèrica (clorur de polivinil, PVC) emprant com a portador mòbil antibiòtics ionofòrics i altres portadors neutres.

1.1.2. ISE basats en portador mòbil neutre

En el cas dels ISE de membrana líquida amb portador mòbil neutre, l'espècie responsable del reconeixement de l'ió és una molècula neutra, normalment un agent complexant, que es troba dissolta en una matriu orgànica. El procés de reconeixement de l'ió (M^{n+}) per part de l'ionòfor (L) utilitza els principis de substrat/receptor i es pot representar com:



L'ionòfor s'ordena en l'espai generant una cavitat polar en el seu si, amb àtoms electrodonadors o grups polars que interaccionen amb l'ió. El reconeixement es dona perquè ions massa grans estan impeditos per accedir a aquesta cavitat i ions massa petits no poden enllaçar amb la força adient als llocs de coordinació. Entre els compostos més

utilitzats per a aquest fi trobem èters corona, compostos macrocíclics i antibiòtics ionofòrics com la valinomicina [4] i la nonactina [5]. La pauta general és que, per a una bona resposta a cations, aquest tipus d'ionòfors tenen unes característiques comunes: tenen grups polars i apolars a la vegada, de manera que els grups polars són els responsables de la interacció amb l'analit mentre que els grups apolars permeten la solubilització de l'ionòfor en la matriu polimèrica; l'esfera de coordinació té entre 5 i 8 llocs de coordinació [6-8]; i l'ionòfor és prou gran perquè no prefereixi el medi aquós i suficientment petit per tenir mobilitat dins la membrana.

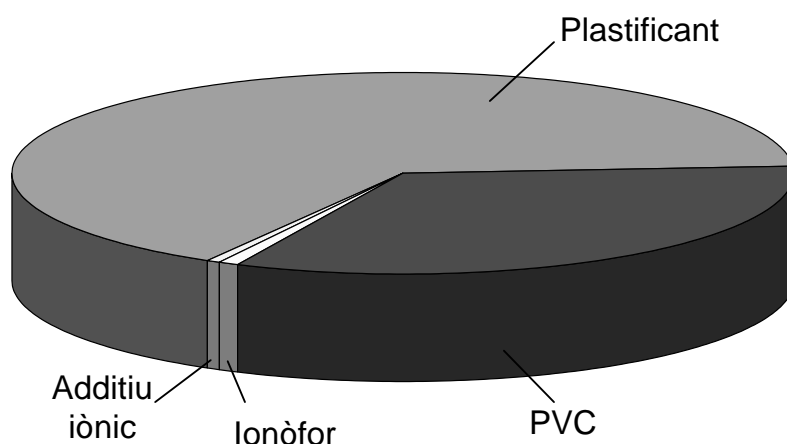


Figura 1.3. Composició típica de una membrana selectiva d'ions.

Les composicions típiques (Figura 1.3) dels components de la membrana són: un 66 % de plastificant, un 33 % de PVC, un 1% d'ionòfor i en certs casos, aproximadament, 0.5 % d'additius iònics per millorar les característiques de la resposta dels ISE [9].

Igual que hi ha composicions establertes per a alguns ions alcalins, com l'ús de valinomicina per a K^+ [10] o de nonactina per a NH_4^+ [5], no hi ha un ionòfor clar per a Na^+ i, per tant, aquest és un camp de recerca actiu en aquests moments [11]. Alguns dels ionòfors proposats per a aquest ús han estat compostos com els calixarens [12], el didecahidronaftil-16-corona-5 [13] i l'antibiòtic ionofòric monensina [14].

La cerca de nous ionòfors per a l'ió Ca^{2+} ha estat més agraïda que la dels ionòfors per a l'ió Na^+ , amb compostos com l'ETH1001 emprat per a la determinació del calci iònic en sèrum [15] i fosfonats [16] per la determinació de la duresa de l'aigua. Tot i això, la cerca d'ionòfors nous per a l'ió Ca^{2+} que millorin les característiques de resposta existents també segueix sent un camp de recerca obert [17].

1.1.3. Els antibiòtics ionofòrics

Molts dels ionòfors en el camp dels elèctrodes selectius d'ions tenen el seu origen en el camp biològic; el cas singular és el de l'antibiòtic ionofòric valinomicina. Els sistemes biològics poden discriminar molt bé entre els ions sodi i potassi, l'antibiòtic valinomicina és l'artífex de l'important canvi en les relacions de les concentracions de sodi i potassi intracel·lular i extracel·lular, ja que aconseguix augmentar en diversos ordres de magnitud la concentració de potassi dins la cèl·lula quan la concentració de sodi extracel·lular és molt més gran que la de potassi.

Així doncs, de la inspiració de l'acció d'alguns antibiòtics en els sistemes vius s'ha pogut importar la selectivitat d'aquests antibiòtics a les membranes potenciomètriques. Aquests antibiòtics presenten propietats comunes com ara la de tenir un pes molecular moderat i ser materials amb potent activitat biològica.

Altres antibiòtics ionofòrics que ja han estat introduïts en membranes potenciomètriques per a la determinació d'ions són la monensina [14] (per a la determinació d'ió Na^+) i la lasalocida [14] (per a l'ió Ba^{2+}).

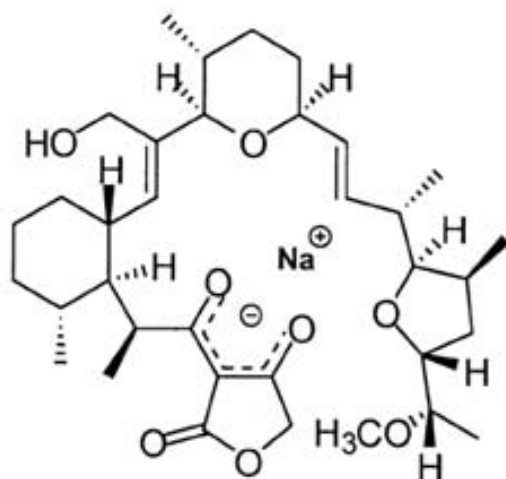


Figura 1.4. Estructura de la sal sòdica de l'ionòfor tetronasina.

En la present tesi s'han construït i caracteritzat elèctrodes selectius a ions basats en el nou antibiòtic ionofòric tetronasina, l'estructura del qual es mostra a la Figura 1.4. Aquest antibiòtic, també anomenat ICI139603, s'obté de la fermentació de cultius de

Streptomyces longisporus [18] i té especial interès dintre dels antibiòtics ionofòrics perquè conté un grup biosintètic poc freqüent, un àcid tetrònic acilat.

La tetronasina té descrits equilibris especialment ràpids per a l'ió Na^+ [19]; això la va convertir en un candidat per ser utilitzada com a element de reconeixement en ISE de Na^+ .

1.2. Espectroscòpia electroquímica d'impedàncies

L'espectroscòpia electroquímica d'impedàncies (EEI) és una tècnica que ens proporciona informació elèctrica d'un sistema electroquímic en el domini de la freqüència [20-22]. La tècnica de l'EEI té importants aplicacions en estudis de fenòmens de corrosió [23, 24], caracterització de mecanismes de reaccions electroquímiques [25] i caracterització de superfícies [24], a més de l'ús com a eina de diagnòstic o transducció en el camp dels sensors químics [26-29]. Un dels principals aspectes d'aquesta tècnica és que permet assignar un circuit elèctric equivalent al sistema que es pretén estudiar, de manera que es poden ajustar les corbes dels models teòrics als punts experimentals i obtenir els valors dels paràmetres elèctrics d'aquest circuit equivalent, aconseguint la caracterització elèctrica.

Els components elèctrics que apareixen en aquests circuits equivalents són resistències, condensadors i solenoides en casos més especials. La interpretació dels espectres es pot aconseguir d'una manera relativament senzilla mitjançant el model del circuit equivalent al sistema electroquímic i també amb els valors de resistència, capacitat o inductància dels seus components [30]. El que fa que aquesta tècnica esdevingui útil en l'assignació de mecanismes electroquímics és la possibilitat de relacionar els valors de la resistència o la capacitat a processos electroquímics simples com ara la transferència de càrrega, la doble capa electroquímica o la difusió.

La tècnica de l'EEI es basa en mesures discretes de la impedància del sistema electroquímic per a diferents freqüències. La impedància es pot definir com la resistència elèctrica al pas d'un corrent altern (CA).

Posem l'exemple que al nostre sistema electroquímic a estudiar hi apliquem un senyal de corrent altern d'excitació (E_t) de freqüència f :

Equació 1.8: $E_t = E_0 \cdot \text{Sin}(\omega \cdot t),$

on E_0 és l'amplitud de la senyal, ω és la freqüència angular que equival a $2\pi f$ i t és el temps.

A la sortida del sistema obtindríem una intensitat de corrent elèctric (I_t) també dependent del temps, de la mateixa freqüència però amb la amplitud de la intensitat i un angle de desfasament que depèn de la impedància del sistema electroquímic (vegeu la Figura 1.5):

Equació 1.9: $I_t = I_0 \cdot \text{Sin}(\omega \cdot t + \phi),$

on I_0 és l'amplitud de la intensitat, ω és la freqüència angular, t és el temps i ϕ és l'angle de desfasament.

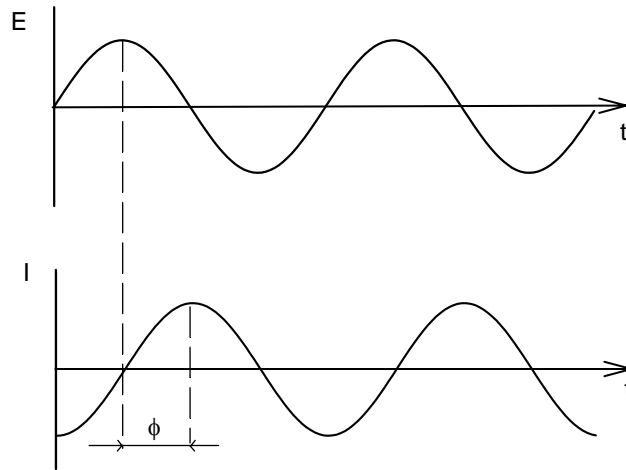


Figura 1.5. Senyal de CA d'excitació que es fa passar pel sistema electroquímic i la intensitat de corrent obtinguda.

Llavors, la impedància (Z) que correspon al sistema electroquímic i a la freqüència f aplicada és:

Equació 1.10: $Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \cdot \text{Sin}(\omega \cdot t)}{I_0 \cdot \text{Sin}(\omega \cdot t + \phi)} = Z_0 \cdot \frac{\text{Sin}(\omega \cdot t)}{\text{Sin}(\omega \cdot t + \phi)},$

on Z_0 és la resistència que surt del quocient entre l'amplitud del potencial i l'amplitud de la intensitat de corrent.

Així doncs, la impedància es pot expressar en termes de Z_0 i l'angle de desfasament ϕ . Però resulta més útil emprar els nombres complexos per operar amb les impedàncies, de

manera que tots aquells components que produeixen desfasament, com el condensador i el solenoide, tenen valor d'impedància imaginari i les resistències tenen valor d'impedància real. Els valors d'impedància que corresponen a cada element són els que es mostren a la taula següent:

Taula 1.1. Elements elèctrics i la seva impedància.

Component	Impedància
Resistència	$Z = R$
Condensador	$Z = 1 / j \cdot \omega \cdot C$
Solenoide	$Z = j \cdot \omega \cdot L$

on C és la capacitat del condensador i L és la inductància del solenoide.

La combinació de diferents elements elèctrics es processen d'igual manera que si fossin resistències, però en lloc de resistències, és una combinació d'impedàncies en sèrie, en paral·lel o una combinació de totes dues. No obstant, no s'ha d'oblidar que treballem en aritmètica complexa i que al final, qualsevol combinació d'elements elèctrics equival a un valor d'impedància, amb una part real (Z_r) i una part imaginària (Z_i), que no implica que cap magnitud sigui virtual, sinó que hi ha un desfasament entre la tensió aplicada i la intensitat resultant.

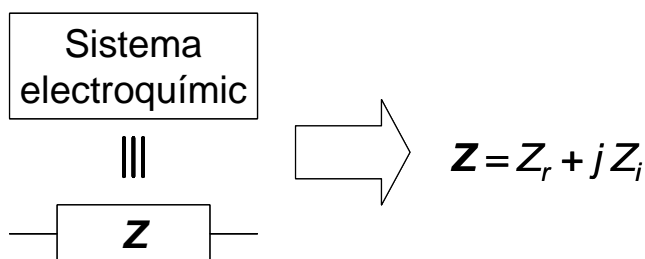


Figura 1.6. Esquematzació d'un sistema electroquímic.

En realitzar un espectre d'impedàncies es fa un escombratge de freqüències per aplicar el senyal d'excitació de CA i s'obté la intensitat per a cadascuna de les freqüències aplicades. A partir de l' E_i aplicada i la I_i obtinguda es determina l'angle de desfasament ϕ i el mòdul de la impedància $|Z|$ per a cada freqüència.

Un dels mètodes per representar els espectres d'impedància són els diagrames Bode on es representa el $\log|Z|/vs/\log(f)$ o $\phi/vs/\log(f)$. Tanmateix, el mètode de representació més usual dels espectres d'impedància es fa al pla complex, on es representa $-Z_i/vs/Z_r$. Aquest tipus de gràfic rep el nom de diagrama de Nyquist i la Figura 1.7 mostra l'espectre d'impedàncies d'un circuit RC en paral·lel segons aquest conveni.

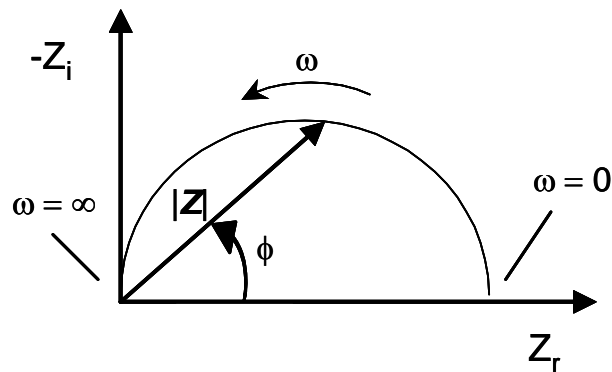


Figura 1.7. Diagrama de Nyquist en el pla complex amb el vector impedància.

El diagrama anterior ens mostra visualment les relacions que hi ha entre els components reals i imaginaris de la impedància i el mòdul de la impedància i l'angle de desfasament. A continuació es veuran alguns exemples de circuits elèctrics i els corresponents diagrames de Nyquist.

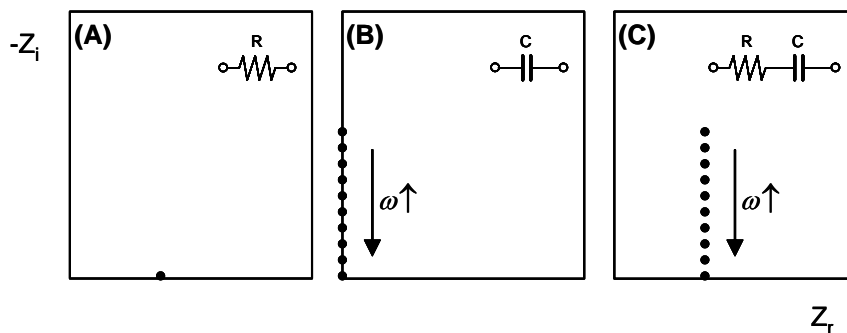


Figura 1.8. Diagrames de Nyquist d'una resistència, d'un element capacitiu i d'aquests dos elements en sèrie amb els circuits equivalents

Els circuits equivalents més simples que es poden analitzar mitjançant l'EEI es mostren a la Figura 1.8 amb el corresponent diagrama de Nyquist. Podem observar com al diagrama de Nyquist d'un circuit format per una sola resistència mostra un únic valor

d'impedància real (que correspon a la resistència R) amb impedància imaginària igual a zero per qualsevol rang de freqüències; com ja hem dit anteriorment els elements resistius no provoquen desfasament i, per tant, no s'ha d'observar una variació de la impedància imaginària. En canvi, un circuit equivalent format únicament per un condensador sí que provoca un desfasament que es pot observar en el diagrama de Nyquist com una variació del component imaginari mentre el component real resta constant i igual a zero. Finalment, en unir en sèrie aquests dos elements elèctrics es produeix un desplaçament en el component real de la impedància (de valor R) de l'espectre mostrat pel condensador.

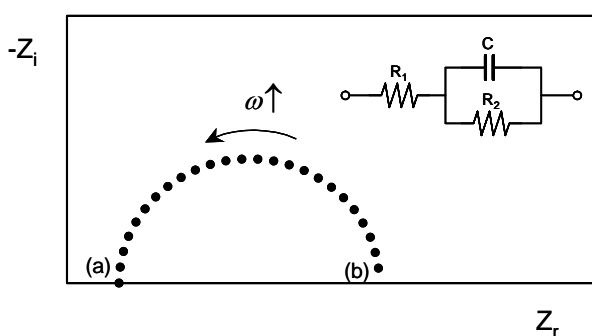


Figura 1.9. Diagrama de Nyquist amb un element capacitatiu i el seu corresponent circuit equivalent.

A la Figura 1.9 es mostra el diagrama Nyquist d'un circuit format per un condensador en paral·lel amb la resistència R_2 i en sèrie amb una altra resistència, l' R_1 . L'espectre d'impedàncies corresponent mostra un semicercle amb inici al punt (a) que correspon al valor de la resistència R_1 , i final al punt (b), que correspon a la suma de les resistències R_1 i R_2 . Les freqüències augmenten en moure's de dreta a esquerra en l'espectre, passant per una freqüència característica que correspon al màxim de component imaginari de la impedància, que està determinada per la capacitat del condensador C .

Aquest tipus de diagrama de Nyquist, almenys parcialment, sol aparèixer en la majoria d'espectres d'impedàncies de sistemes amb reacció electroquímica, on la resistència elèctrica que presenta l'electròlit correspon al valor de la resistència R_1 , el valor de la capacitat del condensador correspondria a la doble capa electroquímica formada a la interfície entre l'electrode i la solució i, per últim, el valor de la segona resistència correspon al procés de transferència de càrrega.

No tots els sistemes electroquímics són tan simples com això, ni molt menys; de vegades en sistemes electroquímics amb processos lents o impeditos, que poden formar una segona etapa cinètica o electroquímica mostren un espectre d'impedàncies amb dos semicercles (vegeu la Figura 1.10). En aquests casos en el circuit equivalent apareix un nou conjunt de condensador i resistència en paral·lel, en el qual el condensador té una freqüència característica més baixa que la de la doble capa electroquímica.

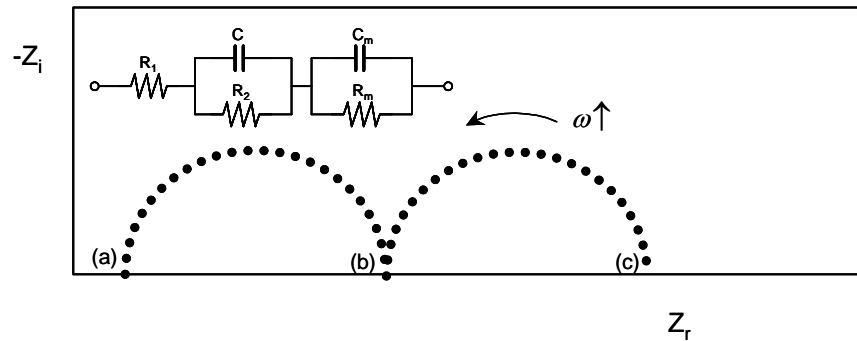


Figura 1.10. Diagrama de Nyquist amb dos elements capacitius i el seu corresponent circuit equivalent.

Si es comença a registrar l'espectre d'impedàncies a freqüències prou baixes, s'observen processos electroquímics cada cop més lents. En els diagrames de Nyquist a freqüències prou baixes s'observa idealment una recta de pendent unitat que correspon a la impedància pròpia de la difusió de les espècies. La difusió no és un procés purament resistiu o capacitatiu, de manera que es defineix un nou element elèctric, diferent dels clàssics, per modelitzar la impedància de la difusió. Aquest nou element s'anomena *impedància de Warburg* i el seu valor és:

$$\text{Equació 1.11: } Z_w = \sigma \cdot (\omega)^{-1/2} \cdot (1 - j),$$

on ω és la freqüència angular i σ és el coeficient de Warburg, constant per a un sistema electroquímic donat, que depèn de la temperatura, l'àrea de la superfície de l'elèctrode, els coeficients de difusió de les espècies i del nombre d'electrons que intervenen en el procés.

Així doncs, en un sistema electroquímic típic, com és el cas d'una reacció electroquímica reversible o el que s'ha observat amb els elèctrodes selectius a ions, es dona un circuit equivalent típic. Aquest està format per una resistència que representa la resistència elèctrica de l'electròlit (R_1) en sèrie amb el conjunt del condensador de la

doble capa electroquímica (C) en paral·lel amb la resistència de la transferència de càrrega (R_2) i la impedància Warburg (W), associada a la difusió de les espècies en el si de la membrana o en la dissolució. La Figura 1.11 mostra el diagrama de Nyquist i el circuit equivalent que correspon a la situació esmentada.

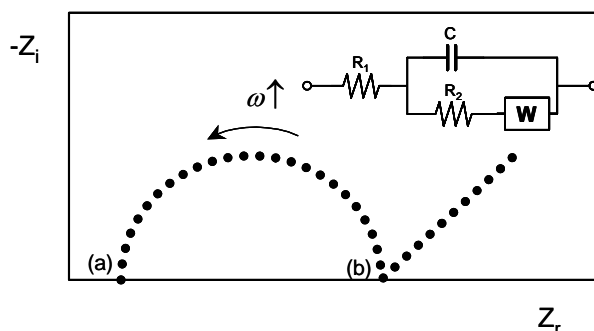


Figura 1.11. Diagrama de Nyquist amb un element capacitatiu i la impedància Warburg i el seu corresponent circuit equivalent.

D'igual manera, la difusió es dona en sistemes electroquímics amb processos lents o impeditos que tenen dos elements capacitius, i es mostra en el diagrama Nyquist un semicercle per a cada element capacitatiu seguit de la recta corresponent a la impedància Warburg.

No obstant, aquests elements bàsics no sempre són suficients per modelitzar l'espectre d'impedàncies de certs sistemes, tot i que són una aproximació prou útil en certs casos. Els condensadors mesurats en l'EEI moltes vegades no es comporten idealment, i de vegades s'observen diagrames de Nyquist deformats respecte del comportament teòric. Per aquest fet, s'introdueix un nou element anomenat element de fase constant (EFC) que serveix per modelitzar la impedància de les dobles capes electroquímiques. El valor d'impedància d'aquest nou element és:

$$\text{Equació 1.12: } Z_{EFC} = (j \cdot \omega)^{-\alpha} / C,$$

on C és la capacitat, ω és la freqüència angular i α és un exponent, que per a $\alpha = 1$ iguala el comportament d'un EFC amb el d'un condensador.

En el cas dels sensors potenciomètrics, l'EEI pot utilitzar-se com a eina de diagnòstic i caracterització de les membranes selectives utilitzades [31-33], ja que l'estudi a diferents freqüències discrimina cinèticament els processos que es puguin donar en el procés de reconeixement químic.

Les pautes bàsiques per tenir bones membranes són conegudes i passen per resistències baixes (equilibris ràpids i favorables) i capacitats altes (retenció dels elements electroactius en la fase membrana) [34, 35]. Els segons semicercles en els espectres d'impedància són característiques no desitjades, ja que indiquen processos interfacials impeditos cinèticament [36].

1.3. Matrius de sensors

Una tendència recent en el camp dels sensors és la d'emprar matrius de sensors en lloc d'un sensor individual. Aquesta manera de treballar amb matrius de sensors químics proporciona molta més informació, cosa que permet resoldre situacions i problemes que d'una altra manera no es podrien resoldre.

Segons com siguin els sensors que formen la matriu, podem classificar-la en els tipus següents:

Matriu de sensors redundants: són matrius formades per sensors del mateix tipus i proporcionen un senyal replicat. Gràcies a aquests replicats del senyal se'n té més precisió i robustesa. Les matrius redundants són útils per construir sistemes d'autodiagnosi, ja que si un sensor s'espatlla pot ser detectat fàcilment per anul·lar-ne la resposta.

Matriu de sensors selectius: estan formades per una sèrie de sensors selectius a diferents analits. Permeten la multideterminació d'espècies gràcies a l'adquisició multicanal del senyal, tot i que per a cada sensor cal un calibratge independent [37]. La principal virtut d'aquest tipus de matrius és que permeten una reducció important dels costos d'anàlisi gràcies a la minimització del volum de mostra, de reactius i dels temps d'anàlisi.

Matriu de sensors amb selectivitat creuada: són matrius que incorporen sensors de baixa selectivitat i que mostren una resposta creuada a un cert nombre analits [38]. Una aplicació per a aquest tipus de matrius pot ser la multideterminació d'analits,

la qual cosa fa necessari emprar alguna eina de calibratge multivariable. Tanmateix, l'aplicació més peculiar de les matrius de selectivitat creuada és la de reconèixer percepcions complexes com les olors o els gustos, que no es basen en concentracions concretes d'espècies. Aquestes matrius, a causa de les similituds amb els sistemes biològics anàlegs, reben el nom de *nas electrònic* (NE) [39-41] o *llengua electrònica* (LE) [38, 42] segons s'apliquin a mostres gasoses o líquides, respectivament. Uns bons sistemes tipus NE o LE presenten els mateixos avantatges que les matrius de sensors selectius, és a dir, permeten la multideterminació amb volums de mostra i reactius reduïts, però s'hi afegeix el fet que els sistemes amb selectivitat creuada solen ser molt més assequibles econòmicament, perquè l'alta selectivitat dels sensors comporta un cost més elevat.

Aquests sistemes d'anàlisi han inspirat el funcionament dels sistemes biològics, en concret dels sentits de l'olfacte i del gust. Aquesta aproximació es coneix amb el nom de *biomimètica* [42] i es basa a agafar idees procedents dels mecanismes observats en organismes vius per implementar-les en altres camps.

La IUPAC defineix la llengua electrònica [38] com “un sistema multisensor format per una matriu de sensors de baixa selectivitat que utilitza procediments matemàtics avançats per processar els senyals basats en el reconeixement de patrons i/o en l'anàlisi multivariable”.

1.4. Processament multivariable

Per al processament multivariable dels senyals obtinguts a partir de les matrius de sensors s'utilitzen eines quimiomètriques. La quimiometria és la ciència que tracta d'ajuntar els avantatges del processament mitjançant ordinadors i els senyals d'origen químic per treure'n el màxim profit. La quimiometria té dos objectius bàsics: el disseny d'experiments i el de proporcionar la màxima informació analítica a partir de dades químiques. En la present tesi doctoral ens centrarem en aquest segon aspecte.

1.4.1. Preprocessament del senyal

Per a una correcta modelització de les dades i per evitar arribar a conclusions errònies, és crucial fer una sèrie d'operacions prèvies a fi d'assegurar la qualitat dels senyals.

La primera premissa sempre ha de ser l'obtenció dels senyals evitant efectes aleatoris no desitjats, com és el cas del soroll. El preprocessament bàsic per evitar el soroll és el de replicar les mesures, ja que la mitjana de senyals replicats compensa els errors aleatoris, amb la qual cosa s'aconsegueix augmentar la relació senyal/soroll (S/N).

En molts casos cal fixar la importància relativa de cadascuna de les variables per aconseguir una correcta modelització amb eines quimiomètriques. Per fer-ho, algunes de les estratègies que es poden dur a terme són:

- Centrat: es refereixen totes les dades a la mitjana aritmètica d'aquestes.
- Estandardització: consisteix a aconseguir que les dades tinguin desviació estàndard igual a la unitat.
- Autoescalat: resulta d'aplicar el centrat i l'estandardització.

Quan el nombre de variables és tan elevat que fa impossible la modelització amb eines matemàtiques, s'ha de procedir a la compactació de les dades. Existeixen diferents eines a la bibliografia per aconseguir-ho, l'anàlisi per components principals (PCA, de *Principal Component Analysis*) és dels més freqüents [43, 44]. Altres alternatives emprades usualment són la descomposició per *wavelets* [45, 46], per polinomis de Legendre [47, 48] o per la transformada de Fourier [49].

La transformada de Fourier: la transformada discreta de Fourier (DFT, de *Discrete Fourier Transform*) és un tractament de senyals molt emprat en molts camps de la ciència, utilitzada generalment per fer anàlisi de freqüències. La transformada ràpida de Fourier (FFT, de *Fast Fourier Transform*) és l'algorisme emprat generalment per fer l'anàlisi de Fourier o la seva inversa (FFT^{-1}) ja que la DFT no és un algorisme prou ràpid com per fer les anàlisis en temps real.

En termes generals l'FFT, descompon el senyal original en una sèrie de coeficients que correspon cadascun a una certa freqüència. Als exemples de la Figura 1.12, podem veure dos senyals diferents, un de ràpid i un altre de lent; en fer l'anàlisi de Fourier de

cada senyal s'observa com el senyal lent té una contribució més important dels coeficients de freqüència baixa (a l'esquerra), mentre que l'anàlisi corresponent al senyal ràpid mostra una contribució important per coeficients de freqüència més elevada.

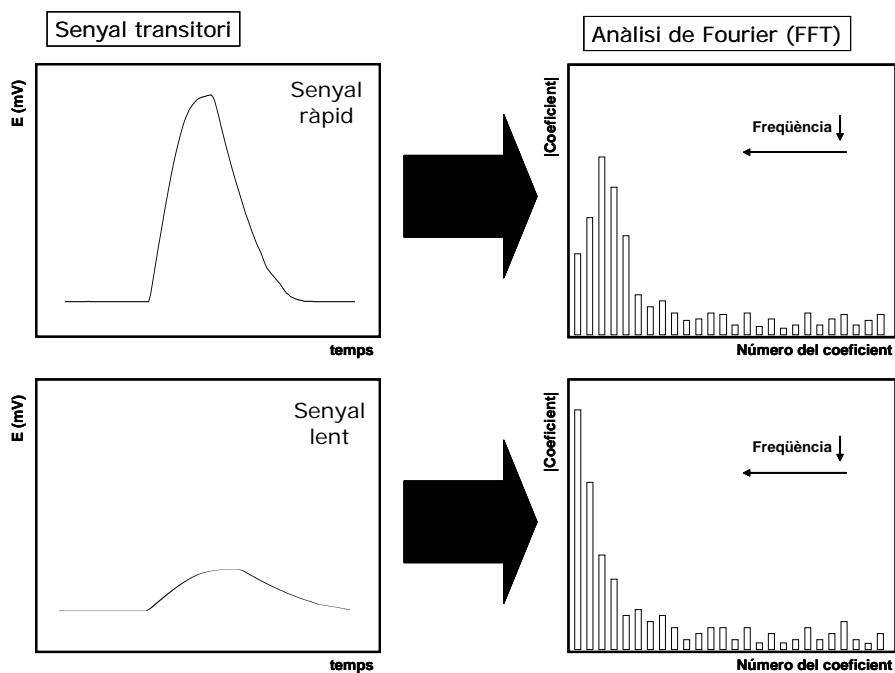


Figura 1.12. Exemples d'anàlisi de Fourier de dos senyals diferents

Els senyals sempre es poden reconstruir aplicant l' FFT^{-1} als coeficients de Fourier obtinguts, tot i que generalment es poden reconstruir els senyals originals amb força fidelitat emprant pocs coeficients. Així doncs, emprant un nombre reduït de coeficients podem efectuar una compactació de la informació de partida.

1.4.2. Xarxes neuronals artificials (XNA)

Les XNAs són sistemes de processament avançat bioinspirats en els sistemes de comunicació neuronals dels éssers vius. Així doncs, les XNA també són sistemes de processament biomimètics, i les llengües electròniques que les utilitzen, doblement biomimètiques.

Fonaments biològics: els animals disposen d'un sistema nerviós amb el qual recullen informació procedent dels sentits, l'emmagatzemen, la processen o la transmeten a altres parts que la poden interpretar per dur a terme alguna acció.

L'element unitari d'aquest sistema nerviós és la neurona. Les neurones són les cèl·lules encarregades de la distribució i el processament de la informació mitjançant una complexa xarxa 3D que formen en connectar-se les unes amb les altres (vegeu la representació d'una xarxa neuronal a la Figura 1.13). La informació arriba a la neurona gràcies a uns canals anomenats dendrites fins al cos cel·lular (soma) on es processen els senyals rebuts per generar una resposta de sortida que es distribueix a través de l'axó a altres cèl·lules. L'axó es ramifica per propagar la informació de sortida a diferents neurones i s'uneix a les dendrites d'aquestes neurones en les sinapsis. Gràcies a l'ajust de la conductivitat de les diferents sinapsis, que fa que els senyals es transmetin en menor o major intensitat, s'aconsegueix que la xarxa sigui capaç d'aprendre la resposta adequada a una sèrie d'estímuls.

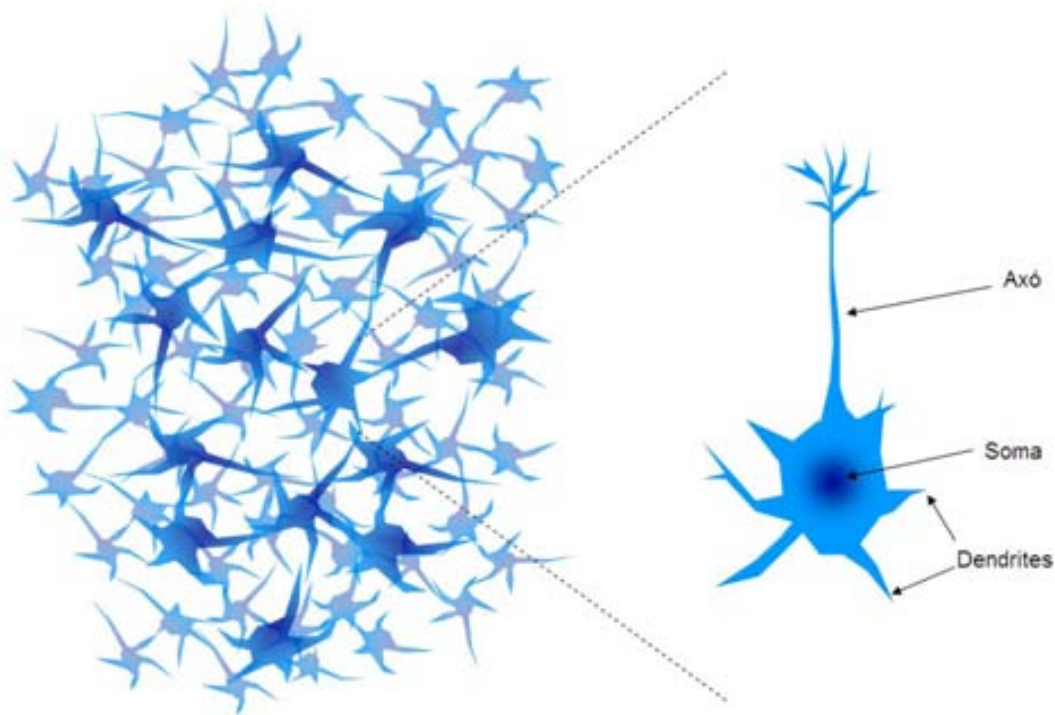


Figura 1.13. Representació d'una xarxa neuronal biològica i esquema de les parts d'una neurona biològica

El processament dut a terme per la neurona comporta la combinació de tots els senyals rebuts per les dendrites i, si aquest supera un valor límit, es dona l'activació de la

neurona i es produeix el senyal de sortida per l'axó. Aquest processament tan simple adquireix la categoria de *processament intel·ligent* quan la xarxa neuronal és prou gran. La intel·ligència pròpia dels éssers humans prové d'una xarxa immensa amb aproximadament 100,000 milions de neurones on cadascuna d'aquestes pot connectar-se amb unes altres 10,000 donant com a resultat unes 10^{14} connexions sinàptiques al cervell.

El perceptró: la unitat bàsica en les XNA és la neurona artificial o perceptró, que neix a meitats del segle XX [50, 51] de l'analogia directa de la neurona biològica com un mètode capaç de realitzar tasques de classificació.

El perceptró és un element de processament format per un conjunt d'entrades (x_i) i generalment una única sortida (a). El mecanisme de funcionament, esquematitzat a la Figura 1.14, és el següent: es procedeix a fer la suma ponderada de les entrades amb uns certs pesos ($w_{i,j}$) i se suma també un valor b corresponent al biaix que dona com a resultat un cert valor y . Igual que amb la neurona biològica, si aquest valor y no supera un cert valor llindar el perceptró segueix inactiu, i si l'aconsegueix superar llavors s'aplica la funció de transferència al valor y per obtenir la sortida a com a resultat.

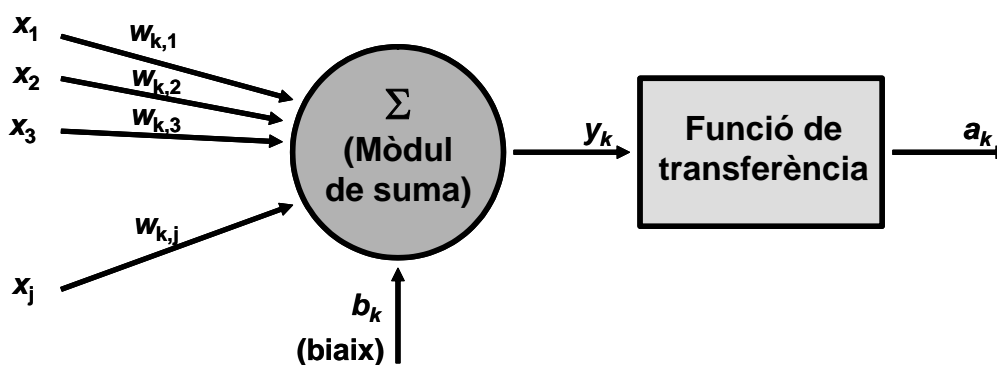


Figura 1.14. Esquema d'un perceptró.

El coneixement necessari per resoldre els problemes plantejats al perceptró s'emmagatzemen a la matriu de pesos; aquests s'ajusten per minimitzar una funció d'error que compara els valors obtinguts a la sortida amb els valors esperats per una sèrie de patrons.

XNA multicapa o perceptró multicapa: les dificultats del perceptró per resoldre problemes senzills de classificació no lineal, com ara la funció lògica XOR o problemes reals més complexos, va esdevenir en l'abandonament d'aquest model. No obstant, més tard es va aconseguir resoldre aquest tipus de problemes en connectar diverses capes successives de perceptrons [52].

Aquesta nova estratègia té més similituds al funcionament del cervell humà, on el processament de la informació es fa paral·lelament per diferents canals mitjançant la interconnexió de moltes neurones. En el cas de les XNA multicapa tenim una estructura formada per varies capes de perceptrons (Figura 1.15): una primera capa anomenada *capa d'entrada* que distribueix el conjunt d'entrades (x_i) a la següent capa de perceptrons sense alterar-les. A continuació, la informació es processa en una o més capes de neurones que s'anomenen *capes ocultes* connectades successivament. Finalment, arriben els senyals processats a l'última capa (*capa de sortida*) que lliura la informació útil a l'usuari. Per la disposició de les connexions sempre en un mateix sentit, aquest tipus de XNA s'anomena també *xarxes unidireccionals* o *feedforward*. Les XNA multicapa poden disposar de més d'una capa oculta, però s'ha demostrat que molts problemes químics es poden resoldre amb una única capa oculta, simplificant així el model [53].

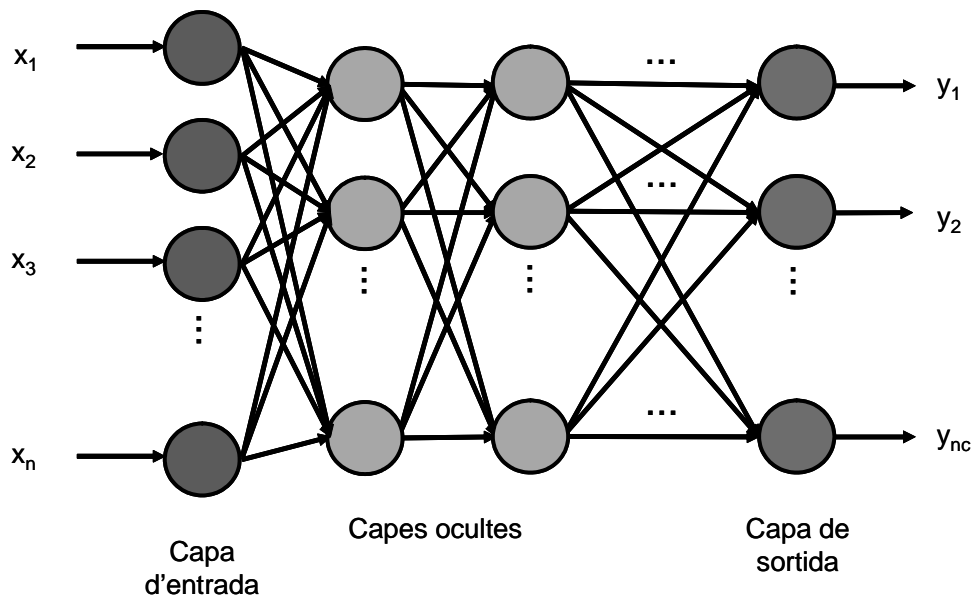


Figura 1.15. Esquema de la XNA multicapa o perceptró multicapa

La generació del model mitjançant les XNA s'obté de cercar la millor combinació de pesos de les connexions sinàptiques mitjançant interaccions successives amb les dades d'una sèrie de patrons destinats a l'entrenament de la xarxa. Un cop trobat el model òptim, aquest es pot emprar per a la predicció de mostres desconegudes.

Gràcies a l'ús de funcions de transferència contínues podem fer que les neurones responguin amb una sortida gradual i no limitar-les a la resposta binària d'uns i zeros pròpia del sistema biològic. Les condicions bàsiques per dur a terme l'aprenentatge impliquen emprar una funció matemàtica com a funció de transferència neuronal, que ha de ser monòtona, creixent dins de l'interval d'aplicació, i tenir la derivada contínua en l'interval [54]. En la Figura 1.16 es mostren les funcions de transferència més emprades en les neurones de les capes ocultes i de sortida.

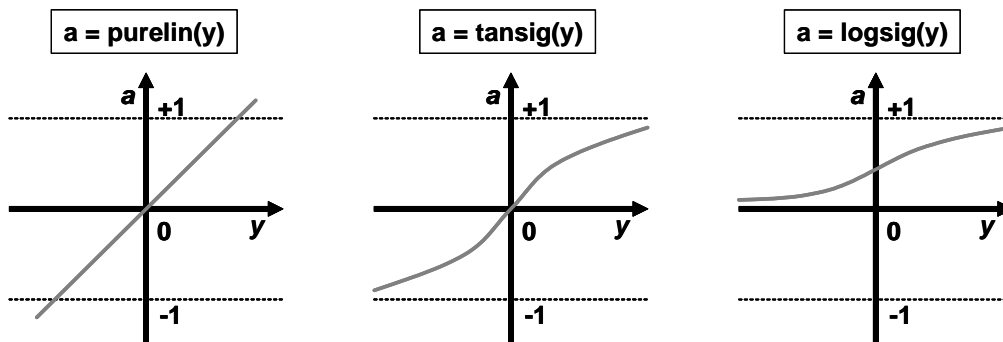


Figura 1.16. Funcions de transferència lineal (*purelin*), tan-sigmoïdal (*tansig*) i log-sigmoïdal (*logsig*)

XNAs amb retropropagació: l'aprenentatge en les xarxes neuronals és un procés més complicat que en el cas del perceptró, ja que s'ha de establir com els canvis entre els pesos sinàptics d'una capa fan que variïn els de la següent. Això s'aconsegueix gràcies a algorismes d'entrenament supervisats que vigilen que la modificació dels pesos es dugui a terme a fi que els senyals de sortida de la xarxa siguin el més semblants possible a la sortida desitjada.

Els mètodes més emprats són els algorismes de retropropagació o *backpropagation*, en els quals es calcula l'error com la diferència entre la sortida esperada (o_{pj}) i l'obtinguda (t_{pj}) per cada neurona j i per cada patró p . Llavors, s'utilitza aquest error per tal d'efectuar variacions en els pesos per minimitzar-lo. Una de les maneres més habituals de minimitzar l'error és emprar l'algorisme d'entrenament del descens de gradient

(GD), que és un procediment iteratiu en què la matriu dels pesos s'ajusta seguint la direcció del gradient d'una funció d'error (E_p) per minimitzar-la. La funció d'error emprada és la següent:

$$\text{Equació 1.13: } E_p = \frac{1}{2} \sum_j^n (t_{pj} - o_{pj})^2.$$

El valor del pes d'una connexió a l'estat ($t + 1$) està relacionat amb el valor del seu pes a l'estat t per l'equació següent:

$$\text{Equació 1.14: } w_{pj}(t+1) = \beta \cdot w_{pj}(t) + \alpha \cdot \delta_{pj} \cdot o_{pj},$$

on α és la velocitat d'aprenentatge (*learning rate*), β és el moment (*momentum*) i δ_{pj} la magnitud del canvi, essent el producte $\delta_{pj} \cdot o_{pj}$ la contribució del gradient. El paràmetre velocitat d'aprenentatge pren valors entre 0 i 1 i serveix per accelerar o frenar el descens cap al mínim global d'error del sistema. El moment també pot variar entre 0 i 1, i serveix per reduir la possibilitat que el sistema quedi atrapat en un mínim local.

Es pot derivar aquesta expressió i s'obté la magnitud dels canvis a fer als pesos amb la finalitat de disminuir l'error durant l'entrenament. Per a la capa de sortida:

$$\text{Equació 1.15: } \delta_{pj} = k \cdot o_{pj} \cdot (1 - o_{pj}) \cdot (t_{pj} - o_{pj})$$

i per a les capes ocultes:

$$\text{Equació 1.16: } \delta_{pj} = k \cdot o_{pj} \cdot (1 - o_{pj}) \cdot \sum_k \delta_{pk} \cdot w_{jk}.$$

Aquestes dues expressions es coneixen com la regla delta generalitzada i mostren de quina manera l'error depèn de les capes subsegüents. S'ajusten els pesos de la capa de sortida i es retropropaga aquest ajust a la capa anterior successivament fins a arribar a la capa d'entrada.

La retropropagació amb descens de gradient és un procediment amb el qual generalment s'obtenen bons ajustos, però té les seves limitacions. Els principals problemes que es poden trobar en emprar aquest mètode d'entrenament són una lenta velocitat d'aprenentatge i la possibilitat que el sistema caigui atrapat en un mínim local de la funció d'error. Aquests problemes es poden solucionar mitjançant altres tipus d'algorismes d'entrenament.

Un dels algorismes més eficients és el Levenberg-Marquardt (LM) [55], que és de l'ordre de 10 a 100 vegades més ràpid que el del GD. L'algorisme LM calcula la matriu

Hessiana (que conté les segones derivades dels errors respecte dels pesos) a partir de la matriu Jacobiana (matriu amb les primeres derivades dels errors respecte dels pesos), ja que aquesta última és més fàcil de calcular que la Hessiana. Gràcies a aquesta matriu Jacobiana els pesos es calculen d'aquesta manera:

$$\text{Equació 1.17: } w_{ij}(t+1) = w_{ij}(t) - [J^T \cdot J + \mu \cdot I]^{-1} \cdot J^T \cdot e,$$

on J és la matriu Jacobiana, μ és un paràmetre d'ajust, I és la matriu identitat i e és un vector dels errors de la xarxa. Interessa que μ sigui petit ja que amb valors grans l'algorisme esdevé semblant al del gradient descendent amb un nombre petit d'èpoques. Així doncs, si després de cada època μ disminueix, l'algorisme serà especialment útil.

Sobreentrenament: un problema molt comú que pot aparèixer en el moment de generar el model mitjançant XNA és el sobreentrenament. Aquest problema apareix quan l'error objectiu proposat per a les mostres de entrenament és molt baix i causa que noves mostres que no han participat en l'entrenament tinguin un error important. La Figura 1.17(B) exemplifica aquesta situació, en la qual la xarxa memoritza molt bé les mostres d'entrenament, però, en canvi, les prediccions de les mostres de validació s'allunyen força del model real.

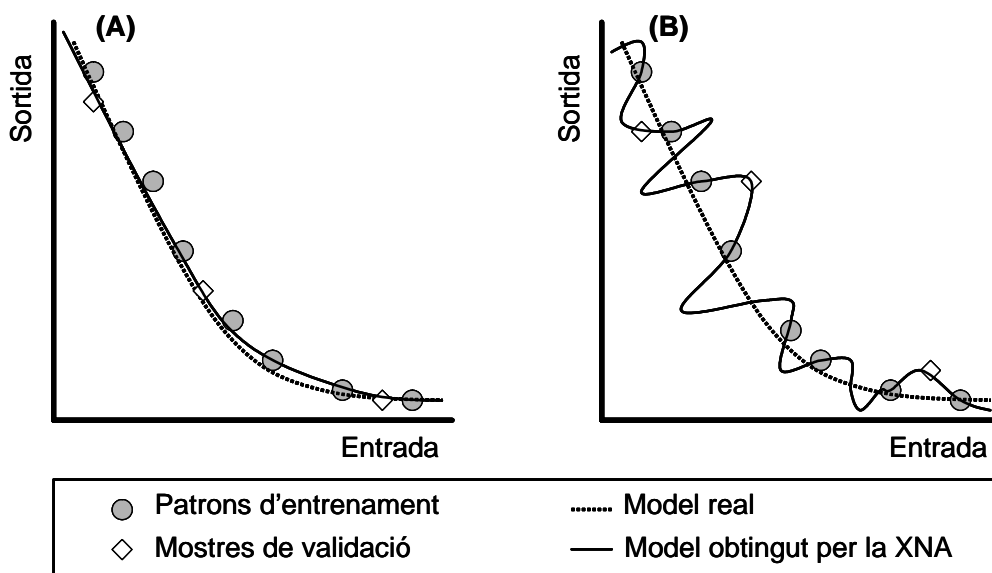


Figura 1.17. Exemple de XNA ben ajustada (A) i una que pateix sobreentrenament (B)

Hi ha dos mètodes per evitar el problema del sobreentrenament:

- **Aturada a temps:** la manera més simple d'evitar el sobreentrenament és aturar el procés d'entrenament abans que es produeixi aquest problema. Això s'aconsegueix en detectar la situació de sobreentrenament mitjançant un conjunt de mostres que no participen en la construcció de la xarxa; aquest conjunt de mostres s'anomena *conjunt de validació interna*. Així doncs, la totalitat de les mostres es divideixen en tres grups: un primer grup anomenat *conjunt d'entrenament* que serveix per construir el model mitjançant l'ajust dels pesos de l'XNA. El segon grup de validació interna que detecta el sobreentrenament i el tercer grup anomenat *conjunt de validació externa* que permet avaluar la capacitat de predicció de l'XNA gràcies a mostres que no han participat en el procés de construcció de la xarxa.

L'aturada a temps funciona de manera que la xarxa s'entrena i es monitoritza l'error de validació interna. Aquest error és indicatiu del grau de sobreentrenament, de manera que quan s'inverteix la tendència i comença a créixer, l'entrenament s'atura i es retornen els valors dels pesos d'interaccions anteriors que estaven en memòria temporal.

- **Regularització bayesiana (RB):** aquesta tècnica cerca la xarxa més simple que ajusta millor la funció que volem modelitzar, i arriba a predir amb més eficiència mostres que no han participat en l'entrenament. En comparació amb l'algorisme del descens del gradient, l'algorisme de RB no només considera l'error global de la xarxa sinó que també compta amb els valors dels pesos de la xarxa [56]. Llavors, la funció objectiu es modifica agregant la participació específica dels pesos de la xarxa, com es mostra en l'expressió següent:

Equació 1.18:
$$F = (1 - \gamma) \cdot E_p + \gamma \cdot E_w,$$

on F és la funció objectiu, E_p són els errors, E_w és la suma dels quadrats dels pesos i γ és un paràmetre que pondera E_p i E_w .

En minimitzar els valors dels pesos de la xarxa, se simplifica la xarxa, suavitzant-la, i s'aconsegueix evitar el sobreentrenament.

1.4.3. Anàlisi en components principals (PCA)

Un problema habitual en l'anàlisi multivariable és que el nombre de variables per construir el model de resposta és massa gran. L'anàlisi en components principals és una eina útil per reduir el nombre de variables tot preservant la informació significativa.

Aquest processament es basa en l'obtenció d' n components principals (PC_i) que siguin combinacions lineals de les n variables originals. L'obtenció dels components principals queda il·lustrada a la Figura 1.18, on podem veure la representació d'una sèrie de dades amb tres variables i que es poden representar en unes dues noves variables que expliquen el màxim de la variabilitat de les dades.

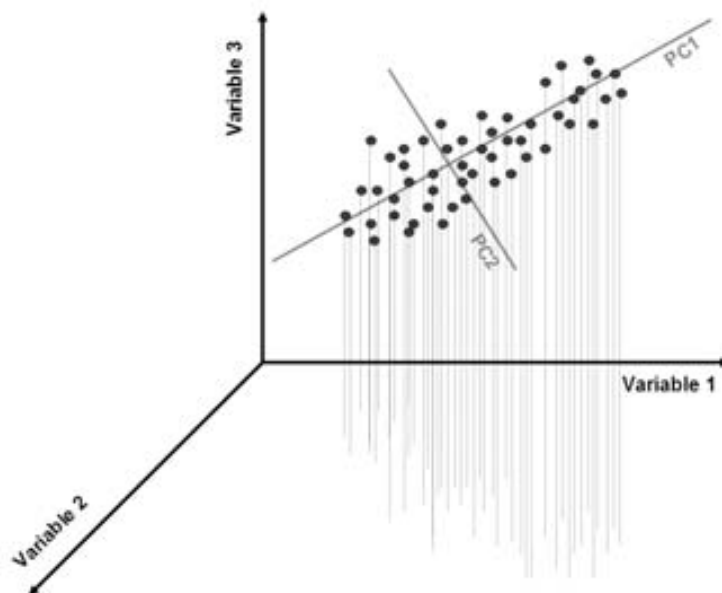


Figura 1.18. Representació d'un conjunt de dades originalment en tres variables i que es poden representar en només dos components principals

Els components principals es calculen de manera que el primer component principal ($PC1$) expliqui el màxim de variabilitat de les dades i que el següent component principal ($PC2$) sigui el següent que expliqui el màxim de variabilitat i així successivament. Els components principals tenen la particularitat de ser ortogonals, és a dir, que formen angles rectes entre ells.

Gràcies a la representació de les mostres en els eixos formats pels components principals es poden identificar mostres amb característiques similars per la seva

proximitat. D'aquesta manera el PCA pot ser útil per a la classificació de mostres, si l'acompanyem d'algun mètode de reconeixement de pautes [57].

1.4.4. Regressió parcial per mínims quadrats (PLS)

En principi, el problema del calibratge multivariable podria ser resolt per mètodes simples com el de regressió lineal multivariable (MLR, de *Multivariate Linear Regression*). No obstant, quan el nombre de variables és molt gran, l'MLR pot donar com a resultat models no aptes per a la predicció de noves mostres; per resoldre aquest problema, cal fer una compactació de la informació en unes noves variables que aconseguixin explicar la major part de la variació.

La idea de la regressió parcial per mínims quadrats (PLS, de *Partial Least Square*) és transformar les variables originals a unes poques variables per utilitzar-les per construir el model mitjançant una regressió multivariable més simple, però que preservi la informació significativa.

El PLS guarda força relació amb l'anàlisi per components principals, tot i que el mètode d'obtenció de les noves variables en difereix sensiblement. Mentre el PCA calcula les noves variables per explicar la màxima variació i visualitzar l'estructuració de les dades, les variables del PLS cerquen obtenir la millor capacitat de predicció en la regressió.

1.5. La llengua electrònica (LE)

Com s'ha comentat anteriorment, la llengua electrònica neix de la imitació del sentits biològics [58, 59] per desenvolupar sistemes d'anàlisi intel·ligent. Aquestes LE es construeixen emprant matrius de sensors amb selectivitat creuada o poc selectius i creant un model de resposta amb eines de calibratge multivariable (XNA, PLS...). Aquesta estratègia va ser proposada en primer lloc per a l'anàlisi de mesclures gasoses, i va donar lloc a l'antecedent més immediat de les LE, els nassos electrònics.

Antecedents, el nas electrònic: un NE es pot definir com un sistema d'anàlisi de mostres gasoses formada per una matriu de sensors amb selectivitat creuada o poc selectius i un processament matemàtic capaç de reconèixer olors [39, 41]. El primer NE construït va ser l'any 1982 [60] per discriminar diferents olors mitjançant un processament amb XNA; a partir d'aquí es van desenvolupar multitud de NE, especialment durant la dècada dels 1990.

Les aplicacions més freqüents d'aquests sistemes d'anàlisi són el control de qualitat de processos alimentaris [40, 61-63], mediambiental [64, 65], processos industrials [66], diagnòstic mèdic [67], desenvolupament de fragàncies [68, 69], toxicologia [70], etc.

La llengua electrònica: pocs anys després de l'aparició dels NE, va sorgir la versió d'aquests sistemes d'anàlisi aplicats a mostres líquides [71]: les llengües electròniques.

El sentit del gust humà funciona de la manera següent: la llengua està formada per multitud de cèl·lules gustatives que responen de manera poc selectiva als gustos essencials (dolç, salat, àcid, amarg i també el recentment acceptat *umami* propi del glutamat sòdic, característic dels menjars rics en proteïnes). Els senyals obtinguts es processen al cervell per elaborar una classificació i, finalment, a partir de l'experiència adquirim un coneixement que ens permet la correcta identificació de noves mostres.

Els primers intents d'imitació del sentit del gust va ser dut a terme en la dècada dels anys 1990 per Toko [72] amb la construcció del sensor de tast. El primer treball d'aplicació quantitativa que combina el processament amb XNA i matrius de sensors potenciomètrics va ser publicat per Van der Linden [73] i posteriorment apareix el concepte de la LE, proposada per Vlasov [74].

La metodologia per a la construcció d'una LE comporta: (a) escollir una matriu de sensors amb la selectivitat creuada adient per resoldre el problema escollit; (b) obtenir els senyals corresponents a un conjunt de mostres de representatiu amb el màxim d'informació dels analits i les interferències; (c) processar la informació obtinguda mitjançant una eina quimiomètrica que permetrà la predicció de característiques de noves mostres que no han participat en la construcció del model quimiomètric.

Els tipus de sensors que es poden emprar en les LE són de naturalesa molt diversa: els sensors potenciomètrics són dels més emprats [57, 74-79] gràcies a la gran versatilitat selectiva que ofereixen els centenars d'ionòfors que es coneixen [10, 80, 81]. Els

sensors voltamperomètrics també són força comuns especialment quan es tracta de detectar espècies amb propietats redox [82-86]. Altres tipus de sensors emprats són els de naturalesa impedimètrica [26, 87, 88], gravimètrica [89], òptica [90] i també biosensors [91].

L'aplicació més peculiar de les LE és l'anàlisi qualitativa, que es basa a detectar certes característiques de la mostra complexes relacionades molts cops amb la seva qualitat o el seu origen. Alguns exemples peculiars són LEs per identificar vins que han estat envellits en bótes [85], detectar l'addició d'additius prohibits [92] o classificar begudes comercials segons el seu contingut en suc de taronja natural [57].

L'altra aplicació important de les LE és la determinació de diferents analits en una mostra de manera simultània [93]. Una aplicació quantitativa curiosa és la duta a terme pel grup de Vlasov per quantificar l'edat de vins [94]. L'aplicació quantitativa serà l'emprada en la present tesi, i és amb la que el Grup de Sensors i Biosensors té més experiència [75, 77, 78, 82, 83, 91, 95].

A banda d'això, actualment també s'estan desenvolupant sistemes híbrids entre LE i NE per millorar prestacions d'anàlisi [96-99].

1.5.1. L'LE com a eina d'anàlisi qualitativa

L'anàlisi qualitativa està relacionada amb la solució de problemes d'identificació o classificació de mostres. L'eina quimiomètrica més emprada per aquesta aplicació és el PCA [57, 79, 100-102], tècnica que es basa en la compactació de les dades multidimensionals en pocs components principals, podent emprar els dos o tres primers components per visualitzar la distribució de les mostres en espais de 2 o 3 dimensions fàcilment interpretables.

Altres tècniques quimiomètriques per a la classificació són l'anàlisi per discriminant (DA, de *discriminant analysis*) [88], el SIMCA (de *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) [103], el PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) [104], els k-NN (k-veïns més pròxims, de *k-Nearest Neighbors*) [105], les XNA [106] i, més recentment, les SVM (les màquines de suport vectorial, de *Support Vector Machines*) [107].

1.5.2. L'LE com a eina d'anàlisi quantitativa

Menys habitual en les LE és l'anàlisi quantitativa, en què es pretén determinar de manera simultània diferents espècies en mostres més o menys complexes.

La dificultat de crear models de resposta no lineals, com correspon al sistema construït per una matriu de sensors potenciomètrics de resposta creuada, fa necessària la utilització d'eines de calibratge multivariable molt potents. Les eines de calibratge multivariable més emprades són les XNA [75, 83] i el PLS [91, 108], tot i que en el cas de matrius potenciomètriques s'ha demostrat la superioritat de modelització de les XNA [109]. Una altra tècnica per realitzar el calibratge multivariable és el PCR (*Principal Component Regression*) [110].

1.6. ISE en sistemes automatitzats

La construcció de models de resposta amb XNA precisa d'un gran nombre de mostres d'entrenament. Aquest fet fa que la combinació entre les LE i els sistemes automatitzats sigui molt beneficiosa [111]. També s'ha de tenir en compte l'objectiu últim de qualsevol tècnica analítica, que és la implantació final per fer anàlisis fidedignes al cost més assequible possible. Les tècniques automatitzades permeten reduir aquests costos perquè permeten obtenir freqüències de mostreig elevades, prescindir de personal especialitzat i un menor consum de reactius.

Altres virtuts dels sistemes automatitzats són la possibilitat de pendre mesures a temps reals o reduir el procés analític a la mínima expressió, simplificant etapes d'aquest procés, com la presa i la preparació de la mostra.

Els sistemes automatitzats poden classificar-se en dos tipus molt generals:

Sistemes automatitzats discontinus: són sistemes que fan feines rutinàries i prenen les mostres com a elements individuals. Aquest tipus de sistemes solen estar robotitzats, amb la qual cosa permet prescindir de personal especialitzat, tot i que generalment impliquen un elevat cost de posada en marxa.

Sistemes automatitzats continus: en aquests tipus de sistemes, la mostra es transporta des del punt d'injecció de la mostra a un sistema de detecció. N'hi ha de dos tipus: sistemes automatitzats segmentats i no segmentats. Els sistemes segmentats separen el flux general en segments mitjançant bombolles d'aire que impedeixen la contaminació entre mostra i mostra. Entre els sistemes continus no segmentats la variant actual més important és l'anàlisi per injecció de flux (FIA, de *Flow Injection Analysis*) i es basen en la injecció i el transport d'una porció de mostra en un corrent de solució portadora, cosa que proporciona al sistema una millor reproductibilitat i simplicitat [112]. L'evolució dels sistemes FIA ha portat a un nou tipus de sistema automatitzat molt més versàtil, el de l'anàlisi per injecció seqüencial (SIA, *Sequential Injection Analysis*).

Els camps d'aplicació d'aquestes tècniques és tan ampli com els camps de la química analítica, i els podem trobar en laboratoris clínics, de control de processos industrials, d'anàlisi de rutina, etc.

La tendència actual d'aquests sistemes automatitzats, a part de millorar-ne les prestacions d'anàlisi, és la miniaturització, un nou corrent d'investigació anomenat *lab-on-valve* [113]. També sistemes d'anàlisi de flux que necessiten volums de mostra de l'ordre dels microlitres són de plena actualitat. Són els anomenats *micro total analysis systems* (μ TAS) [114, 115].

1.6.1. La tècnica d'anàlisi per injecció de flux (FIA)

La tècnica FIA, introduïda el 1975 per Ruzicka i Hansen [116], neix de la necessitat de realitzar anàlisis amb més rapidesa i reproductibilitat.

Com s'ha comentat abans, aquests tipus de sistemes d'anàlisis es caracteritzen per transportar la mostra a través d'un flux continu. L'esquema bàsic (Figura 1.19) està format per un sistema d'impulsió unidireccional, un sistema d'injecció de mostra, un serpentí de retenció i un sistema de detecció.

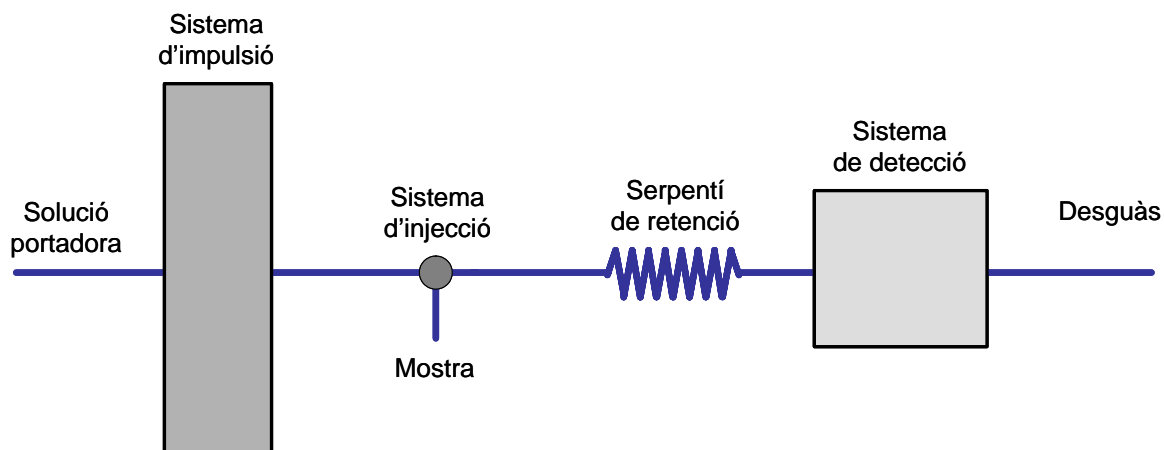


Figura 1.19. Elements bàsics d'un sistema d'anàlisi per injecció de flux (FIA)

El sistema d'impulsió generalment és una bomba peristàltica i la seva funció és la de transportar la mostra als diferents elements del sistema. El sistema d'injecció més emprat és una vàlvula que ens permet intercanviar entre dues posicions, en la primera es dona pas ininterromput de mostra per un bucle i quan es canvia a la segona posició, la solució de mostra continguda al bucle passa al corrent principal del sistema que porta al serpentí de retenció. La funció del serpentí és la de dispersar la mostra amb la solució portadora o qualsevol altre reactiu per tal d'aconseguir la correcta detecció de l'analit [117]. Finalment, la mostra arriba al detector proporcionant un senyal dinàmic en forma de pic que el podem relacionar amb la concentració de l'analit. Els detectors més habituals són els basats en tècniques espectroscòpiques (espectroscòpia ultravioleta-visible, d'infrarroig, atòmica, etc) i electroquímiques (potenciometria, amperometria, conductimetria...).

El gran avantatge de la tècnica FIA, junt amb la gran reproductibilitat, és l'alta freqüència d'anàlisi i pot arribar a més d'un centenar de mostres analitzades per hora.

1.6.2. La tècnica d'injecció seqüencial (SIA)

La tècnica d'injecció seqüencial neix l'any 1990 com una evolució del sistema FIA, en una proposta de Ruzicka [118]. Les innovacions respecte de la FIA són el canvi del

sistema d'impulsió unidireccional a bidireccional, l'addició d'una vàlvula multiporta que aporta molta versatilitat [119] i l'eliminació de la vàlvula d'injecció de mostra.

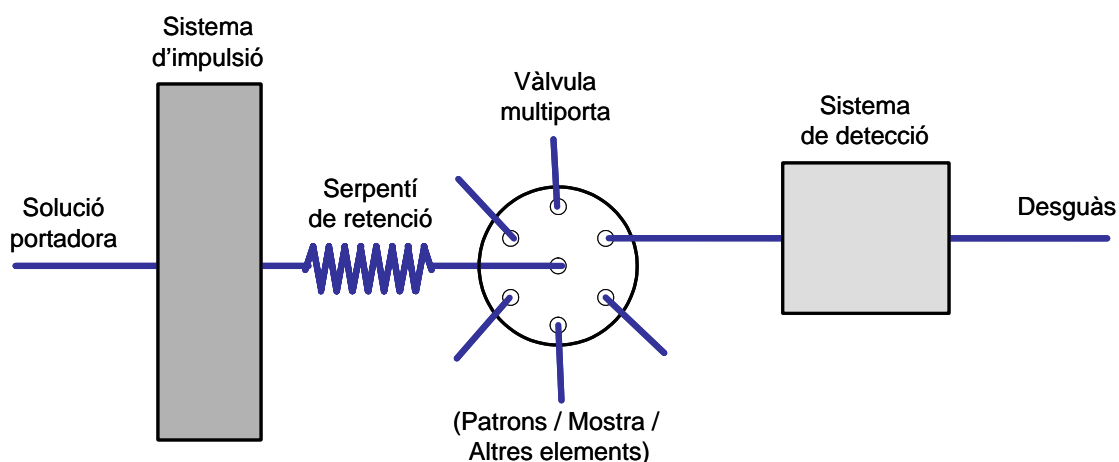


Figura 1.20. Elements bàsics d'un sistema d'injecció seqüencial d'anàlisi

Els elements bàsics d'un sistema SIA, esquematitzats a la Figura 1.20, són el sistema d'impulsió bidireccional, que està connectat al serpentí de retenció, la vàlvula multiporta i el sistema de detecció. En aquests sistemes, acostuma a ser habitual l'ús de xeringues automàtiques com a sistemes d'impulsió bidireccional, tot i que les bombes peristàltiques també poden fer aquesta funció. El serpentí de retenció té la doble funció de dispersar adequadament la mostra, i de reservar volums de mostra o reactius per al seu posterior ús. La vàlvula multiporta és usada normalment per connectar amb diferents accessoris o solucions; pot ser emprada com a sistema d'injecció de mostres, per agafar volums coneguts de diferents solucions patró o per connectar amb una cel·la de mescla; aquesta ens permet fer dilucions successives d'una solució patró per realitzar calibratges automàticament [120]. El detector pot ser de naturalesa espectroscòpica o electroquímica [121], d'igual manera que els emprats en la tècnica FIA.

Les grans virtuts de la tècnica SIA són l'elevada reproductibilitat i la versatilitat. La versatilitat la proporciona la vàlvula multiporta, amb la qual es poden fer multitud d'esquemes a fi de dur a terme la preparació de la mostra que s'estimi oportuna en cada cas [119]. Respecte del sistema FIA, un altre avantatge és el menor consum de reactius, tot i que la freqüència de mostreig dels sistemes SIA sol ser menor.

1.7. ISE en sistemes volumètrics automatitzats

Les valoracions són mètodes estequiomètrics que es basen en la determinació d'analits mitjançant una reacció amb una altra espècie. L'aparició dels sensors va proporcionar una millora substancial d'aquestes tècniques, a causa que permetien la detecció del punt d'equivalència amb més precisió i amb la possibilitat d'analitzar mostres en les quals amb els clàssics indicadors visuals no es podia observar el viratge de l'indicador (pel color de mostra, la terbolesa, etc.).

L'ús de sensors potenciomètrics per determinar el punt d'equivalència en valoracions és una pràctica habitual des de fa més de 50 anys. El potencial observat al llarg d'una valoració inicialment varia molt poc i quan ens apropem al volum d'equivalència es dona una variació de potencial molt gran i, finalment, s'obté una resposta per part dels ISE pràcticament constant. El volum d'equivalència correspon al punt d'inflexió de la corba de potencial vs el volum d'agent valorant. No obstant, l'estimació del volum d'equivalència es fa mitjançant la segona derivada d'aquesta corba. En fer la primera derivada de la corba abans mencionada, el volum d'equivalència esdevé el màxim de la funció i en calcular la segona derivada correspon al valor zero d'aquesta.

Existeixen altres metodologies per determinar el volum d'equivalència, com és el cas del mètode de Gran, que es basa en la linealització de la corba de valoració per obtenir el volum d'equivalència mitjançant una extrapolació [122].

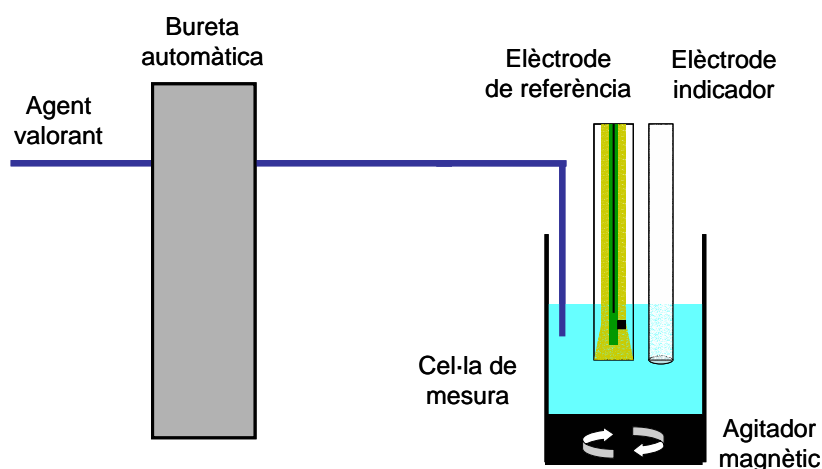


Figura 1.21. Elements bàsics per a sistemes automàtics de valoració potenciomètrica

Els elements necessaris per a l'automatització de valoracions potenciomètriques es troben a la Figura 1.21. Aquests sistemes necessiten d'una bureta automàtica connectada a un extrem al reservori d'agent valorant i a l'altre extrem a la cel·la de mesura es troba la mostra que cal analitzar. Es registra el potencial entre un elèctrode de referència i l'elèctrode indicador (ISE) després de realitzar una petita addició d'agent valorant. Tant el sistema de mesura com la bureta estan controlats mitjançant un ordinador.

L'evolució d'aquesta tècnica ha estat poc rellevant en tot aquest temps, degut en part per l'inconvenient que comporta la dificultat de determinar més d'una espècie simultàniament. Una possible solució per aconseguir la multideterminació ha estat la d'afegir agents complexants per tal de desplaçar un dels punts d'equivalència i poder-lo visualitzar millor; no obstant, l'eficiència d'aquest tipus de metodologies només ha estat demostrada per dos analits [123].

Més recentment, la combinació de valoracions potenciomètriques i eines de processament matemàtic ha aparegut com una nova metodologia per extreure informació sobre la composició de mostres complexes amb diversos analits [124-127]. Aquests procediments requereixen d'un procés previ d'entrenament, emprant patrons que generen la informació necessària per adquirir l'habilitat de predir propietats de noves mostres. El sistema de detecció utilitzat en aquests treballs és generalment l'elèctrode de pH, emprat per resoldre problemes de mesclades àcid-base emprant NaOH com a agent valorant [124-126] o mesclades de metalls quan es fan valoracions complexomètriques [128]. Altres treballs publicats són la determinació de sulfat i calci mitjançant la unió de tècniques volumètriques amb detecció potenciomètrica i XNA [129] i la determinació de mesclades d'àcids en suc de fruita gràcies també a les XNA i valoracions [130]. De la mateixa manera, altres tipus de sensors com els elèctrodes de pasta de carbó han estat emprats per detectar el punt d'equivalència en determinacions de mesclades de plata, mercuri i coure en valoracions amb tiocianat [127].

Una proposta innovadora no publicada fins ara és la d'ajuntar les matrius de sensors poc selectives més el processament quimiomètric (llengües electròniques) amb les tècniques volumètriques, amb la finalitat d'aconseguir la determinació de diversos analits. Aquesta tesi doctoral fa les primeres aportacions en aquest sentit, realitzant valoracions de mesclades de dues i tres substàncies.

1.8. Bibliografia

- [1] Diamond, D., *Principles of chemical and biological sensors*, John Wiley & Sons: New York, (1998).
- [2] Inczèdy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M., *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*, Blackwell Science: Oxford, (1998).
- [3] Ammann, D., *Ion-selective microelectrodes: principles, design and application*, Springer-Verlag: Berlin, (1986).
- [4] Anker, P.; Jenny, H. B.; Wuthier, U.; Asper, R.; Ammann, D.; Simon, W., Determination of $[K^+]$ in blood serum with a valinomycin-based silicone rubber membrane of universal applicability to body fluids, *Clinical Chemistry*, 29 (1983) 1447-1448.
- [5] Davies, O. G.; Moody, G. J.; Thomas, J. D. R., Optimisation of poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes for ammonium ions, *The Analyst*, 113 (1988) 497-500.
- [6] Wytttenbach, T.; Batka, J. J.; Gidden, J.; Bowers, M. T., Host/guest conformations of biological systems: valinomycin/alkali ions, *International Journal of Mass Spectrometry*, 193 (1999) 143-152.
- [7] Przybylski, P.; Huczynski, A.; Brzezinski, B., The structures of monensin A derivatives and its complexes with some monovalent cations studied by the AM1d, PM3 as well as PM5 semiempirical methods, *Journal of Molecular Structure*, 826 (2007) 156-164.
- [8] Ripoli, S.; Scarano, S.; Di Bari, L.; Salvadori, P., The solution structure of a lasalocid A metal complex in lipophilic solvents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (2005) 5181-5188.
- [9] Cattrall, R. W., *Chemical sensors*, Oxford University Press: Oxford, (1997).
- [10] Umezawa, Y.; Bühlmann, P.; Umezawa, K.; Tohda, K.; Amemiya, S., Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations, *Pure and Applied Chemistry*, 72 (2000) 1851-2082.
- [11] Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E., Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors, *Chemical Reviews*, 98 (1998) 1593-1688.
- [12] Giannetto, M.; Mori, G.; Notti, A.; Pappalardo, S.; Parisi, M. F., Discrimination between Butylammonium Isomers by Calix[5]arene-Based ISEs *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 4631-4635.
- [13] Shen, H.; Cardwell, T. J.; Cattrall, R. W., The application of a chemical sensor array detector in ion chromatography for the determination of Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} in water samples, *The Analyst*, 123 (1998) 2181-2184.
- [14] Suzuki, K.; Tohda, K.; Aruga, H.; Matsuzoe, M.; Inoue, H.; Shirai, T., Ion-selective electrodes based on natural carboxylic polyether antibiotics *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 1714-1721.

- [15] Anker, P.; Wieland, E.; Ammann, D.; Dohner, R. E.; Asper, R.; Simon, W., Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of total calcium in blood serum *Analytical Chemistry*, 53 (1981) 1970-1974.
- [16] Frend, A. J.; Moody, G. J.; Thomas, J. D. R.; Birch, B. J., Studies of calcium ion-selective electrodes in the presence of anionic surfactants, *The Analyst*, 108 (1983) 1072-1081.
- [17] Lee, M. H.; Yoo, C. L.; Lee, J. S.; Cho, I. S.; Kim, B. H.; Cha, G. S.; Nam, H., Tweezer-Type Neutral Carrier-Based Calcium-Selective Membrane Electrode with Drastically Reduced Anionic Interference, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 2603-2607.
- [18] Fonseca, T.; Lopes, N. P.; Gates, P. J.; Staunton, J., Fragmentation studies on tetronasin by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15 (2004) 325-335.
- [19] Martinek, T.; Riddell, F. G.; Rutherford, T. J.; Sareth, S.; Weller, C. T., The structure of the ionophoric antibiotic Na-tetronasin (M139603) in solution, *Chemical Communications*, 17 (1998) 1893-1894.
- [20] Macdonald, D. D., Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 1376-1388.
- [21] Park, S.-M.; Yoo, J.-S., Electrochemical Impedance Spectroscopy for Better Electrochemical Measurements, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 455A-461A.
- [22] MacDonald, J. R., *Impedance Spectroscopy*, Wiley: New York, (1987).
- [23] Bai, Z. Q.; Chen, C. F.; Lu, M. X.; Li, J. B., Analysis of EIS characteristics of CO₂ corrosion of well tube steels with corrosion scales, *Applied Surface Science*, 252 (2006) 7578-7584.
- [24] Mansfeld, F.; Han, L. T.; Lee, C. C.; Chen, C.; Zhang, G.; Xiao, H., Analysis of electrochemical impedance and noise data for polymer coated metals, *Corrosion Science*, 39 (1997) 255-279.
- [25] Armstrong, R. D.; Bell, M. F.; Metcalfe, A. A., *Specialist Periodical Reports - Electrochemistry*, The Chemical Society: London, (1978).
- [26] Cortina-Puig, M.; Munoz-Berbel, X.; Alonso-Lomillo, M. A.; Munoz-Pascual, F. J.; del Valle, M., EIS multianalyte sensing with an automated SIA system--An electronic tongue employing the impedimetric signal, *Talanta*, 72 (2007) 774-779.
- [27] Kell, D.; Darvey, C., *Biosensors. A practical approach*, IRL Press: Oxford, (1990); Vol. 5.
- [28] Pejčić, B.; De Marco, R., Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 6217-6229.
- [29] Bonanni, A.; Esplandiu, M. J.; Pividori, M. I.; Alegret, S.; Del Valle, M., Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (2006) 1195-1201.
- [30] Bott, A. W., A.C.Impedance Electrochemistry, *Current Separations*, 11 (1992) 61-65.

- [31] Lisowska-Oleksiak, A.; Lesinska, U.; Nowak, A. P.; Bochenska, M., Ionophores in polymeric membranes for selective ion recognition; impedance studies, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 2120-2128.
- [32] Armstrong, R. D.; Covington, A. K.; Proud, W. G., Solvent properties of PVC membranes *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 257 (1988) 155-160
- [33] Lindfors, T.; Bobacka, J.; Lewenstam, A.; Ivaska, A., Impedance spectroscopic study on single-piece all-solid-state calcium-selective electrode based on polyaniline, *The Analyst*, 121 (1996) 1823 - 1827.
- [34] Horvai, G.; Graf, E.; Toth, K.; Pungor, E.; Buck, R. P., Plasticized poly(vinyl chloride) properties and characteristics of valinomycin electrodes. 1. High-frequency resistances and dielectric properties *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 2735-2740.
- [35] Toth, K.; Graf, E.; Horvai, G.; Pungor, E.; Buck, R. P., Plasticized poly(vinyl chloride) properties and characteristics of valinomycin electrodes. 2. Low-frequency, surface-rate, and Warburg impedance characteristics *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 2741-2744.
- [36] Zhang, W.; Spichiger, U. E., An impedance study of Mg²⁺-selective membranes, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 2259-2266.
- [37] Ferguson, J. A.; Healey, B. G.; Bronk, K. S.; Barnard, S. M.; Walt, D. R., Simultaneous monitoring of pH, CO₂ and O₂ using an optical imaging fiber, *Analytica Chimica Acta*, 340 (1997) 123-131.
- [38] Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'Amico, A., Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 77 (2005) 1965-1983.
- [39] Gardner, J. W.; Bartlett, P. N., *Electronic Noses. Principles and Applications*, Oxford Univ. Press: Oxford, (1999).
- [40] Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey, G., Recent technological advances for the determination of food authenticity, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 344-353.
- [41] Persaud, K. C., Electronic gas and odour detectors that mimic chemoreception in animals, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11 (1992) 61-67.
- [42] Toko, K., *Biomimetic Sensor Technology*, Cambridge Univ. Press: Cambridge, (2000).
- [43] de Carvalho, R. M.; Mello, C.; Kubota, L. T., Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by differential pulse voltammetry using carbon fibre electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool, *Analytica Chimica Acta*, 420 (2000) 109-121.
- [44] Ciosek, P.; Sobanski, T.; Augustyniak, E.; Wroblewski, W., ISE-based sensor array system for classification of foodstuffs, *Measurement Science and Technology*, 17 (2006) 6-11.
- [45] Moreno-Baron, L.; Cartas, R.; Merkoci, A.; Alegret, S.; del Valle, M.; Leija, L.; Hernandez, P. R.; Munoz, R., Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic tongue, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113 (2006) 487-499.

- [46] Beltran, N. H.; Duarte-Mermoud, M. A.; Bustos, M. A.; Salah, S. A.; Loyola, E. A.; Pena-Neira, A. I.; Jalocha, J. W., Feature extraction and classification of Chilean wines, *Journal of Food Engineering*, 75 (2006) 1-10.
- [47] Simons, J.; Bos, M.; van der Linden, W. E., Data processing for amperometric signals, *The Analyst*, 120 (1995) 1009-1012.
- [48] Cortina, M.; Duran, A.; Alegret, S.; del Valle, M., A sequential injection electronic tongue employing the transient response from potentiometric sensors for anion multidetermination *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (2006) 1186-1194.
- [49] Gemperline, P. J., Rugged spectroscopic calibration for process control, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 39 (1997) 29-40.
- [50] Block, H. D., The Perceptron: A Model for Brain Functioning. I, *Reviews of Modern Physics*, 34 (1962) 123-135.
- [51] Block, H. D.; Knight, B. W.; Rosenblatt, F., Analysis of a Four-Layer Series-Coupled Perceptron. II, *Reviews of Modern Physics*, 34 (1962) 135-142.
- [52] Minsky, M.; Papert, S., *Perceptrons: An introduction to computational geometry*, MIT Press: Cambridge, MA, (1969).
- [53] Despagne, F.; Massart, D. L., Neural networks in multivariate calibration, *The Analyst*, 123 (1998) 157R–178R.
- [54] Smith, S. W., *Neural Networks (and more!)*, 2 ed.; California Technical Publishing: San Diego, CA, USA, (1997); Vol. 17, p 451-480.
- [55] Demuth, H.; Beale, M., *Neural Network Toolbox Users Guide*, Mathworks Inc.: Natick, MA, (2002).
- [56] Poppi, R. J.; Massart, D. L., The optimal brain surgeon for pruning neural network architecture applied to multivariate calibration, *Analytica Chimica Acta*, 375 (1998) 187-195.
- [57] Gallardo, J.; Alegret, S.; del Valle, M., Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis, *Talanta*, 66 (2005) 1303-1309.
- [58] Robertsson, L.; Iliev, B.; Palm, R.; Wide, P., Perception modeling for human-like artificial sensor systems, *International Journal of Human-Computer Studies*, 65 (2007) 446-459.
- [59] Anand, V.; Kataria, M.; Kukkar, V.; Saharan, V.; Choudhury, P. K., The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals, *Drug Discovery Today*, 12 (2007) 257-265.
- [60] Persaud, K.; Dodd, G., Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature*, 299 (1982) 352-355.
- [61] Panigrahi, S.; Balasubramanian, S.; Gu, H.; Logue, C. M.; Marchello, M., Design and development of a metal oxide based electronic nose for spoilage classification of beef, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119 (2006) 2-14.
- [62] Barie, N.; Bucking, M.; Rapp, M., A novel electronic nose based on miniaturized SAW sensor arrays coupled with SPME enhanced headspace-analysis and its use for rapid

determination of volatile organic compounds in food quality monitoring, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114 (2006) 482-488.

[63] Falasconi, M.; Pardo, M.; Sberveglieri, G.; Ricco, I.; Bresciani, A., The novel EOS835 electronic nose and data analysis for evaluating coffee ripening, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 110 (2005) 73-80.

[64] Catarina Bastos, A.; Magan, N., Potential of an electronic nose for the early detection and differentiation between *Streptomyces* in potable water, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 151-155.

[65] Nicolas, J.; Romain, A.-C.; Ledent, C., The electronic nose as a warning device of the odour emergence in a compost hall, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 95-99.

[66] Bhattacharyya, N.; Seth, S.; Tudu, B.; Tamuly, P.; Jana, A.; Ghosh, D.; Bandyopadhyay, R.; Bhuyan, M., Monitoring of black tea fermentation process using electronic nose, *Journal of Food Engineering*, 80 (2007) 1146-1156.

[67] Gardner, J. W.; Shin, H. W.; Hines, E. L., An electronic nose system to diagnose illness, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 70 (2000) 19-24.

[68] Penza, M.; Cassano, G.; Tortorella, F.; Zaccaria, G., Classification of food, beverages and perfumes by WO₃ thin-film sensors array and pattern recognition techniques, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 73 (2001) 76-87.

[69] Poprawski, J.; Boilot, P.; Tetelin, F., Counterfeiting and quantification using an electronic nose in the perfumed cleaner industry, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 156-160.

[70] Paolesse, R.; Alimelli, A.; Martinelli, E.; Natale, C. D.; D'Amico, A.; D'Egidio, M. G.; Aureli, G.; Ricelli, A.; Fanelli, C., Detection of fungal contamination of cereal grain samples by an electronic nose, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119 (2006) 425-430.

[71] Vlasov, Y.; Legin, A. V., Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from "electronic nose" to "electronic tongue", *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 361 (1998) 255-260.

[72] Toko, K., A taste sensor, *Measurement Science and Technology* 9(1998) 1919-1936.

[73] Bos, M.; Bos, A.; van der Linden, W. E., Processing of signals from an ion-selective electrode array by a neural network, *Analytica Chimica Acta*, 233 (1990) 31-39.

[74] Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A., Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44 (1997) 532-537.

[75] Cortina, M.; Gutes, A.; Alegret, S.; del Valle, M., Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions, *Talanta*, 66 (2005) 1197-1206.

[76] Gallardo, J.; Alegret, S.; de Román, M. A.; Muñoz, R.; Hernández, P. R.; Leija, L.; del Valle, M., Determination of Ammonium Ion Employing an Electronic Tongue Based on Potentiometric Sensors, *Analytical Letters*, 36 (2003) 2893-2908.

- [77] Gallardo, J.; Alegret, S.; del Valle, M., A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 101 (2004) 72-80.
- [78] Gallardo, J.; Alegret, S.; Muñoz, R.; De-Román, M.; Leija, L.; Hernández, P. R.; del Valle, M., An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 248-256.
- [79] Lvova, L.; Martinelli, E.; Mazzone, E.; Pede, A.; Paolesse, R.; Di Natale, C.; D'Amico, A., Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors, *Talanta*, 70 (2006) 833-839.
- [80] Umezawa, Y.; Umezawa, K.; Buhlmann, P.; Hamada, N.; Aoki, H.; Nakanishi, J.; Sato, M.; Xiao, K. P.; Nishimura, Y., Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part II. Inorganic Anions *Pure and Applied Chemistry*, 74 (2002) 923-994.
- [81] Umezawa, Y.; Buhlmann, P.; Umezawa, K.; Hamada, N., Potentiometric Coefficients of Ion-Selective Electrodes. Part III Organic Ions, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (2002) 995-1099.
- [82] Gutes, A.; Cespedes, F.; Alegret, S.; del Valle, M., Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 1668-1673.
- [83] Gutes, A.; Cespedes, F.; Alegret, S.; del Valle, M., Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part I. Voltammetric e-tongue for the determination of oxidizable compounds, *Talanta*, 66 (2005) 1187-1196.
- [84] Krantz-Rulcker, C.; Stenberg, M.; Winquist, F.; Lundstrom, I., Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review, *Analytica Chimica Acta*, 426 (2001) 217-226.
- [85] Apetrei, C.; Apetrei, I. M.; Nevares, I.; del Alamo, M.; Parra, V.; Rodriguez-Mendez, M. L.; De Saja, J. A., Using an e-tongue based on voltammetric electrodes to discriminate among red wines aged in oak barrels or aged using alternative methods: Correlation between electrochemical signals and analytical parameters, *Electrochimica Acta*, 52 (2007) 2588-2594.
- [86] Gutes, A.; Calvo, D.; Cespedes, F.; del Valle, M., Automatic sequential injection analysis electronic tongue with integrated reference electrode for the determination of ascorbic acid, uric acid and paracetamol, *Microchimica Acta*, 157 (2007) 1-6.
- [87] Pioggia, G.; Di Francesco, F.; Marchetti, A.; Ferro, M.; Ahluwalia, A., A composite sensor array impedentiometric electronic tongue: Part I. Characterization, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2618-2623.
- [88] Pioggia, G.; Di Francesco, F.; Marchetti, A.; Ferro, M.; Leardi, R.; Ahluwalia, A., A composite sensor array impedentiometric electronic tongue: Part II. Discrimination of basic tastes, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2624-2628.
- [89] Sehra, G.; Cole, M.; Gardner, J. W., Miniature taste sensing system based on dual SH-SAW sensor device: an electronic tongue, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 103 (2004) 233-239.

- [90] Lavigne, J.; Savoy, S.; Clevenger, M. B.; McDaniel, B.; Yoo, S.-J.; Anslyn, E. V.; McDevitt, J. T.; Shear, J.; Niekirk, D., Simultaneous Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array in Solution. Toward the Development of an "Electronic Tongue", *Journal of the American Chemical Society*, 120 (1998) 6429-6430.
- [91] Gutierrez, M.; Alegret, S.; del Valle, M., Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2171-2178.
- [92] Parra, V.; Arrieta, A. A.; Fernandez-Escudero, J.-A.; Rodriguez-Mendez, M. L.; De Saja, J. A., Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118 (2006) 448-453.
- [93] Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Clapham, D.; Seleznev, B.; Lord, K.; Vlasov, Y., Electronic tongue for pharmaceutical analytics: quantification of tastes and masking effects *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (2004) 36-45.
- [94] Rudnitskaya, A.; Delgado, I.; Legin, A.; Rocha, S. M.; Costa, A.-M.; Simoes, T., Prediction of the Port wine age using an electronic tongue, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87 (2007) 50-56.
- [95] Gutierrez, M.; Alegret, S.; Caceres, R.; Casadesus, J.; Marfa, O.; del Valle, M., Application of a potentiometric electronic tongue to fertigation strategy in greenhouse cultivation, *Computers and Electronics in Agriculture*, 57 (2007) 12-22.
- [96] Di Natale, C.; Paolesse, R.; Macagnano, A.; Mantini, A.; D'Amico, A.; Legin, A.; Lvova, L.; Rudnitskaya, A.; Vlasov, Y., Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 64 (2000) 15-21.
- [97] Buratti, S.; Benedetti, S.; Scampicchio, M.; Pangerod, E. C., Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue, *Analytica Chimica Acta*, 525 (2004) 133-139.
- [98] Buratti, S.; Ballabio, D.; Benedetti, S.; Cosio, M. S., Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models, *Food Chemistry*, 100 (2007) 211-218.
- [99] Cosio, M. S.; Ballabio, D.; Benedetti, S.; Gigliotti, C., Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue, *Food Chemistry*, 101 (2007) 485-491.
- [100] Ciosek, P.; Brzozka, Z.; Wroblewski, W., Electronic tongue for flow-through analysis of beverages, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118 (2006) 454-460.
- [101] Rudnitskaya, A.; Kirsanov, D.; Legin, A.; Beullens, K.; Lammertyn, J.; Nicolai, B. M.; Irudayaraj, J., Analysis of apples varieties - comparison of electronic tongue with different analytical techniques, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 23-28.
- [102] Moreno, L.; Merlos, A.; Abramova, N.; Jimenez, C.; Bratov, A., Multi-sensor array used as an "electronic tongue" for mineral water analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 130-134.

- [103] Soderstrom, C.; Winquist, F.; Krantz-Rulcker, C., Recognition of six microbial species with an electronic tongue, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 89 (2003) 248-255.
- [104] Apetrei, C.; Gutierrez, F.; Rodriguez-Mendez, M. L.; de Saja, J. A., Novel method based on carbon paste electrodes for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121 (2007) 567-575.
- [105] Hu, Q.; Yu, D.; Xie, Z., Neighborhood classifiers, *Expert Systems with Applications*, In Press, Corrected Proof.
- [106] Ciosek, P.; Wroblewski, W., The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes, *Talanta*, 69 (2006) 1156-1161.
- [107] Brudzewski, K.; Osowski, S.; Markiewicz, T.; Ulaczyk, J., Classification of gasoline with supplement of bio-products by means of an electronic nose and SVM neural network, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113 (2006) 135-141.
- [108] Beullens, K.; Kirsanov, D.; Irudayaraj, J.; Rudnitskaya, A.; Legin, A.; Nicolai, B. M.; Lammertyn, J., The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116 (2006) 107-115.
- [109] Baret, M.; Massart, D. L.; Fabry, P.; Conesa, F.; Eichner, C.; Menardo, C., Application of neural network calibrations to an halide ISE array, *Talanta*, 51 (2000) 863-877.
- [110] Lvova, L.; Kim, S. S.; Legin, A.; Vlasov, Y.; Yang, J. S.; Cha, G. S.; Nam, H., All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis, *Analytica Chimica Acta*, 468 (2002) 303-314.
- [111] Gutes, A.; Cespedes, F.; del Valle, M., Electronic tongues in flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, , in press (2007) doi:10.1016/j.aca.2007.03.039.
- [112] Cerda, V.; Estela, J. M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Becerra, E.; Altimira, P.; Sitjar, P., Flow techniques in water analysis, *Talanta*, 50 (1999) 695-705.
- [113] Wang, J.; Hansen, E. H., Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 225-231.
- [114] Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A., Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 3887-3907.
- [115] Ibanez-Garcia, N.; Mercader, M. B.; Mendes da Rocha, Z.; Seabra, C. A.; Gongora-Rubio, M. R.; Chamorro, J. A., Continuous Flow Analytical Microsystems Based on Low-Temperature Co-Fired Ceramic Technology. Integrated Potentiometric Detection Based on Solvent Polymeric Ion-Selective Electrodes, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 2985-2992.
- [116] Ruzicka, J.; Hansen, E. H., Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, 78 (1975) 145-157.
- [117] Hansen, E. H.; Miro, M., How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 18-26.
- [118] Ruzicka, J.; Marshall, G. D., Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Analytica Chimica Acta*, 237 (1990) 329-343.

- [119] Economou, A., Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24 (2005) 416-425.
- [120] McCormack, T.; van Staden, J. F., Use of a sequential injection technique to evaluate the effect of mixing chambers on zone penetration, *Analytica Chimica Acta*, 367 (1998) 111-121.
- [121] Perez-Olmos, R.; Soto, J. C.; Zarate, N.; Araujo, A. N.; Montenegro, M. C. B. S. M., Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review, *Analytica Chimica Acta*, 554 (2005) 1-16.
- [122] Gran, G., Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II, *The Analyst*, 77 (1952) 661-677.
- [123] Christiansen, T. F.; Busch, J. E.; Krogh, S. C., Successive determinations of calcium and magnesium in drinking water by complexometric, potentiometric digital titration to two equivalence points, *Analytical Chemistry*, 48 (1976) 1051-1056.
- [124] Shamsipur, M.; Hemmateenejad, B.; Akhond, M., Multicomponent acid-base titration by principal component-artificial neural network calibration, *Analytica Chimica Acta*, 461 (2002) 147-153.
- [125] Moisisio, T.; Heikonen, M., A simple method for the titration of multicomponent acid-base mixtures, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354 (1996) 271-277.
- [126] Ni, Y., Simultaneous determination of mixtures of acids by potentiometric titration, *Analytica Chimica Acta*, 367 (1998) 145-152.
- [127] Shamsipur, M.; Hemmateenejad, J.; Sharghi, H., Application of artificial neural network to simultaneous potentiometric determination of silver(I), mercury(II) and copper(II) ions by an unmodified carbon paste electrode, *Talanta*, 64 (2004) 590-596.
- [128] Ni, Y.; Peng, Z., Determination of mixed metal ions by complexometric titration and nonlinear partial least squares calibration, *Analytica Chimica Acta*, 304 (1995) 217-222.
- [129] Brodnjak-Vonina, D.; Dobnik, D.; Novi, M.; Zupan, J., Determination of concentrations at hydrolytic potentiometric titrations with models made by artificial neural networks, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 47 (1999) 79-88.
- [130] Zampronio, C. G.; Rohwedder, J. J. R.; Poppi, R. J., Artificial neural networks applied to potentiometric acid-base flow injection titrations, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 62 (2002) 17-24.

2. *OBJECTIUS*

2. Objectius

Els objectius de la present tesi doctoral es poden separar en dues parts ben diferenciades: la primera, que inclou la construcció i la caracterització d'elèctrodes selectius d'ions basats en l'ionòfor tetronasina i la segona en la qual es pretén utilitzar els sensors desenvolupats com a element sensible en la construcció d'eines avançades d'anàlisi com són les llengües electròniques.

L'objectiu primer del treball proposat va ser desenvolupar ISE basats en el nou antibiòtic ionofòric tetronasina i caracteritzar-ne la resposta. Per aconseguir aquest objectiu es va plantejar:

1. Construir elèctrodes selectius d'ions del tipus *all-solid-state* amb membranes de PVC que contenen l'antibiòtic ionofòric tetronasina com a element de reconeixement d'ions.

2. Avaluar la resposta potenciomètrica d'aquests ISE mitjançant paràmetres com la sensibilitat, el límit de detecció, els coeficients de selectivitat potenciomètrica, el temps de resposta i el rang de pH òptim de treball.
3. Determinar la composició de la membrana selectiva que ofereix millors característiques.
4. Contrastar la caracterització potenciomètrica amb una segona tècnica electroquímica, l'EEI, la qual cosa implicava la posada en marxa de la tècnica en els nostres laboratoris així com fixar la metodologia d'obtenció de les dades i el seu tractament posterior.
5. Determinar les millors condicions de fons iònic per al funcionament dels elèctrodes desenvolupats per a la seva aplicació en mostres reals.

Com es veurà al llarg del treball presentat, es va haver de replantejar l'ió principal dels ISE desenvolupats. L'ionòfor emprat va permetre obtenir sensors per Ca^{2+} de millors característiques que els primers sensors que es van preparar per determinar l'ió Na^+ . Atès el tipus especial de resposta superernstiana obtinguda, va caldre trobar una explicació que justificués aquesta observació.

Un cop obtingut un ISE basat en l'ionòfor tetronasina amb bones característiques de resposta es va procedir a implementar-lo en sistemes avançats d'anàlisi. L'objectiu de l'aplicació va ser construir llengües electròniques emprant matrius de sensors que incloguessin l'ISE desenvolupat junt amb altres per a la multideterminació de cations en mostres reals. Les propostes d'LE van ser les següents:

6. El primer sistema avançat d'anàlisi en què es pretén incloure un dels ISE desenvolupats és una LE per determinar mescles de cations alcalinoterris. Aquesta LE és fàcilment abordable gràcies a l'automatització mitjançant un sistema d'anàlisi seqüencial.

7. La segona LE proposada, també basada en un sistema SIA, pretén determinar ions alcalins i alcalinoterris simultàniament. En aquest cas es vol demostrar l'aplicabilitat d'emprar senyals dinàmics per construir el model de resposta.
8. A continuació es va plantejar d'emprar una LE que inclogués un ISE basat en tetronasina, per determinar simultàniament dos analits en valoracions complexomètriques.
9. L'última de les aplicacions assajades en la present tesi doctoral pretén ampliar l'anterior estudi per determinar la composició d'una mescla ternària d'ions alcalinoterris. Aquesta aplicació també precisa de la construcció d'una LE que inclogui una matriu de sensors potenciomètrics.

La construcció de cadascuna d'aquestes estratègies analítiques avançades d'anàlisi impliquen la mateixa seqüència de passos a seguir: en primer lloc, es construeix una matriu d'elèctrodes selectius d'ions del tipus *all-solid-state* i s'avalua la resposta potenciomètrica als ions que es volen determinar. Cal demostrar l'existència d'una certa resposta creuada per part de la matriu, premissa necessària en les LE per dur a terme la multideterminació. A continuació s'obté un model de resposta òptim mitjançant xarxes neuronals artificials emprant un conjunt prou significatiu de mostres destinades a l'entrenament de la xarxa. La capacitat de generalització del model es demostra aplicant-lo a mostres de validació externa que no han participat en el procés de construcció del model. Finalment, s'aplica la proposta de metodologia en l'anàlisi de mostres reals.

3. *METODOLOGIA*

3. Metodologia

3.1. *Reactius*

Les membranes polimèriques responsables de la resposta potenciomètrica dels ISE es van preparar dissolent l'ionòfor, un additiu iònic (en certs casos), el plastificant i la matriu polimèrica en un dissolvent volàtil, el tetrahidrofuran (THF). La matriu polimèrica emprada és el clorur de polivinil (PVC).

L'ionòfor protagonista de l'estudi és la sal sòdica de l'antibiòtic tetronasina (TNa), proporcionada pel professor Jim Staunton, de la Universitat de Cambridge (UK) un cop ha estat caracteritzat mitjançant espectroscòpia de masses [1]. L'antibiòtic tetronasina en la seva forma àcida (TH) es va obtenir a partir de la forma sòdica als nostres laboratoris per mitjà de procediments estàndards [2]. Altres ionòfors utilitzats van ser: la sal càlcica del bis(bis(4-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil)fosfat (BBTP) (Fluka), l'ionòfor de Ca^{2+} ETH1001 (Fluka), la sal sòdica de l'antibiòtic monensina (Acros), la sal sòdica de

la lasalocida A (Fluka), el 2-dodecil-2-metilmalonat de bis[metil(12-corona-4)] (BCMDM) (Dojindo Laboratories), la valinomicina (Fluka), el dibenzo-18-corona-6 (DBC) (Fluka), l'èster de l'àcid octaetil 4-tert-butilcalix[8]arè (TBCOO) (Acros), el cis-diciclohexà-18-corona-6 (DCHC) (Aldrich) i l'ionòfor de Mg^{2+} ETH4030 (Fluka).

Els additius iònics emprats (tots de Fluka) van ser el tetrakis-(4-clorofenil)borat de potassi ($K^+TpCIPB^-$), el tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borat de sodi (Na^+TFPB^-) i el nitrat de tridodecilmetilamoni ($TMDA^+NO_3^-$).

Els plastificants utilitzats (també tots proveïts per Fluka) van ser el sebacat de bis(2-etilhexil) (DOS), orto-nitrofenilòctil èter (*o*NPOE), sebacat de dibutil (DBS), fenilfosfonat de dioctil (DOPP) i tributilfosfat (TBP).

Per a la construcció dels cossos dels elèctrodes es va fer servir grafit amb mida de partícula menor de 50 μm (BDH Laboratory Supplies), resina Araldit M (Uneco) i enduredor HR (Uneco).

Per preparar les diferents solucions es va fer servir aigua bidestil·lada i reactius de qualitat proanàlisi o superior. La Taula 3.1 resumeix la resta de reactius emprats en aquesta tesi, així com el seu proveïdor.

Taula 3.1. Reactius emprats en aquesta tesi i els seus proveïdors.

Reactius	Font comercial	Reactius	Font comercial
Glicina	Panreac	Àcid cítric	Panreac
TRIS*	Merck	Imidazole	Fluka
LiOH	Merck	HCl	Panreac
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Riedel-de Haën	NaCl	Merck
BaCl ₂ ·2H ₂ O	Fluka	CsCl	Riedel-de Haën
RbCl	Fluka	LiCl	Fluka
NH ₄ Cl	Panreac	Acetat de calci	Fluka
KCl	Fluka	SrCl ₂ ·6H ₂ O	Fluka
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	Mg(OH) ₂	Fluka
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Panreac	CHCl ₃	Panreac
NH ₃	Panreac	EDTA**	Panreac

* Trishidroximetilaminometà; ** Sal disòdica de l'àcid etilenediaminatetraacètic

3.2. Construcció dels elèctrodes

Els ISE de la present tesis es van construir del tipus *all-solid-state* o de configuració no simètrica [3, 4]. Aquest tipus d'ISE es basa en un contacte òhmic directe entre el transductor i la membrana polimèrica, en lloc d'emprar la dissolució d'electròlit intern típic de la configuració simètrica.

Les membranes responsables de la resposta potenciomètrica s'obtenen de la deposició d'un còctel sensor que es prepara dissolent un additiu iònic (en certs casos), un ionòfor, un plastificant i la matriu polimèrica en tetrahidrofur. Aquest dissolvent orgànic ens permet dissoldre tots els components de la membrana i aconseguir una deposició senzilla gràcies a les característiques volàtils del tetrahidrofur. Un cop homogeneïtzat el còctel mitjançant un agitador orbital IKA-VIBRAX-VXR, es procedeix a la deposició, gota a gota, sobre el contacte òhmic del cos de l'elèctrode.

A les taules següents es poden veure les composicions de les membranes emprades al llarg del treball. A la Taula 3.2 es mostren les composicions de les membranes utilitzades per a la caracterització potenciomètrica i impedimètrica. Les composicions de les diferents matrius de sensors emprades per a la construcció de LE, es mostren a les següents taules.

Taula 3.2. Composició de les membranes emprades per a la caracterització dels ISE [5, 6]

ISE	PVC, (% pes)	Plastificant, (% pes)	Ionòfor, (% pes)	Additiu, (% molar) ^a
Sodi (A)	32.7	DOS, 66.0	TH, 1.0	Na ⁺ TFPB ⁻ , (18.6)
Sodi (B)	32.6	DOS, 66.2	TNa, 1.0	Na ⁺ TFPB ⁻ , (18.2)
Sodi (C)	33.4	DOS, 65.0	TH, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (75.8)
Sodi (D)	33.1	DOS, 65.4	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (73.4)
Sodi (E)	32.7	DOS, 66.3	Sense ionòfor	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (1.0 %pes)
Calci (A)	33.3	oNPOE, 65.5	TH, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (18.6)
Calci (B)	32.8	oNPOE, 66.1	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (17.9)
Calci (C)	33.1	oNPOE, 65.9	TNa, 1.0	---
Calci (D)	32.7	DOS, 66.2	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (19.2)
Calci (E)	32.8	oNPOE, 66.1	TNa, 1.0	TDDMA ⁺ NO ₃ ⁻ , (19.0)
Calci (F)	32.6	oNPOE, 66.4	---	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (1.0 %pes)
Calci (H)	32.5	oNPOE, 66.2	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (54.7)
Calci (I)	32.6	oNPOE, 65.9	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (79.8)

^a Fracció molar respecte de l'ionòfor.

Taula 3.3. Composició de les membranes emprades per a la construcció de la primera matriu de sensors [7]

ISE	PVC, (% pes)	Plastificant, (% pes)	Ionòfor, (% pes)	Additiu, (% molar) ^a	Referència
Calci I	33.3	oNPOE, (65.2%)	ETH1001, (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (50)	[8]
Calci II	30.5	DOPP, (64.5%)	BBTP, (5.0%)	---	[9]
Calci III	32.8	oNPOE, (66.1%)	TNa, (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (20)	[6]
Genèric I	32.2	oNPOE, (66.3%)	Monensina, (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (50)	[10]
Genèric II	27.0	DBS, (70.0%)	Lasalocida, (3.0%)	---	[10]

^a Fracció molar respecte de l'ionòfor.

Taula 3.4. Composició de les membranes emprades per a la construcció de la segona matriu de sensors [11]

ISE	PVC, (% pes)	Plastificant, (% pes)	Ionòfor, (% pes)	Additiu, (% pes)	Referència
Calci (1)	32.9	oNPOE, (66.0)	TNa, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.14)	[6]
Calci (2)	33.3	oNPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.36)	[8]
Sodi	21.8	oNPOE, (70.0)	BCMDM, (6.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (2.20)	[12]
Potasi	30.7	DOS, (67.6)	Valinomicina, (1.1)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.64)	[13]
Genèric	29.0	DOS, (67.0)	DBC, (4.0)	---	[12]

Taula 3.5. Composició de les membranes emprades per a la construcció de la tercera matriu de sensors [14]

ISE	PVC, (% pes)	Plastificant, (% pes)	Ionòfor, (% pes)	Additiu, (% pes)	Referència
Calci (I)	32.9	oNPOE, (66.0)	TNa, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.14)	[6]
Calci (II)	33.3	oNPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.36)	[8]
Calci (III)	30.0	DOPP, (65.0)	BBTP, (5.0)	---	[9]
Bari	27.0	DBS, (70.0)	Monensina, (3.0)	---	[10]
Estronci	38.9	TBP, (58.4)	TBCOO, (1.9)	Na ⁺ TFPB ⁻ , (0.78)	[15]
Genèric (I)	27.0	DBS, (70.0)	Lasalocida, (3.0)	---	[10]
Genèric (II)	29.0	DOS, (67.0)	DCHC, (4.0)	---	[16]
Genèric (III)	29.0	DOS, (67.0)	DBC, (4.0)	---	[12]

Taula 3.6. Composició de les membranes de la quarta matriu de sensors [17]

ISE	PVC, (% pes)	Plastificant, (% pes)	Ionòfor, (% pes)	Additiu, (% pes)	Referència
Calci (I)	32.9	oNPOE, (66.0)	TNa, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.14)	[6]
Calci (II)	33.3	oNPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.36)	[8]
Calci (III)	30.0	DOPP, (65.0)	BBTP, (5.0)	---	[9]
Magnesi	32.7	oNPOE, (65.6)	ETH4030, (1.0)	K ⁺ TpCIPB ⁻ , (0.65)	[18]
Estronci	38.9	TBP, (58.4)	TBCOO, (1.9)	Na ⁺ TFPB ⁻ , (0.78)	[15]
Bari	27.0	DBS, (70.0)	Monensina, (3.0)	---	[10]
Genèric (I)	29.0	DOS, (67.0)	DBC, (4.0)	---	[12]
Genèric (II)	27.0	DBS, (70.0)	Lasalocida, (3.0)	---	[10]

Segons les necessitats de cada cas, els cossos dels ISE es van preparar en dos tipus de disposició: la convencional per a mesures en *batch* o la tubular per a mesures en flux per sistemes automatitzats. A continuació es descriu el procés de fabricació dels diferents ISE.

3.2.1. Elèctrodes en disposició convencional

Els passos del procés de construcció dels ISE en disposició convencional o *batch* es troben esquematitzats a la Figura 3.1 Per a la construcció d'aquests ISE es va utilitzar tub de PVC de 8 mm de diàmetre exterior i 6 mm de diàmetre interior, tallat a 2 cm de llarg (A). El pas següent és encaixar un connector elèctric, on hem soldat una petita placa de coure al tub de PVC (B). Aquest connector ens facilitarà el contacte elèctric entre l'elèctrode i el sistema de mesura.

El transductor emprat és una pasta conductora epoxi-grafit [19], formada per 1 part de grafit i 1 part de la barreja epoxi (Araldit M i Enduridor HR en proporció en pes 1:0.4). Així doncs, hem d'omplir el buit entre la placa de coure i el tub de PVC amb la pasta conductora i deixar-ho unes 24 h a l'estufa de 40 °C per tal que curi la resina (C).

Posteriorment, la pasta conductora es mecanitza amb la finalitat de rebaixar 0.3 mm la superfície i polir-la (D). Sobre aquesta superfície conductora és on es dipositarà la membrana polimèrica (E); aquesta s'ha de fer de la manera més homogènia possible sobre la superfície de resina epoxi-grafit del cos de l'elèctrode. Es dipositen 3 gotes del còctel i es deixa que s'evapori el tetrahidrofur durant 30 minuts. A continuació es

torna a dipositar la mateixa quantitat i es deixa evaporar el dissolvent un altre cop. Aquesta operació es repeteix 6 cops més fins a aconseguir un gruix de membrana òptim. Acabat el procés de deposició es deixa un dia més a fi que les restes de dissolvent orgànic s'evaporin (F).

L'últim pas abans de procedir a la utilització de l'ISE és el condicionament (G). Cal deixar la membrana de l'ISE en contacte amb l'ió pel qual és selectiva durant 24 hores més. Les solucions de condicionament emprades per aquest tipus d'elèctrodes van ser de concentració 0.1 M.

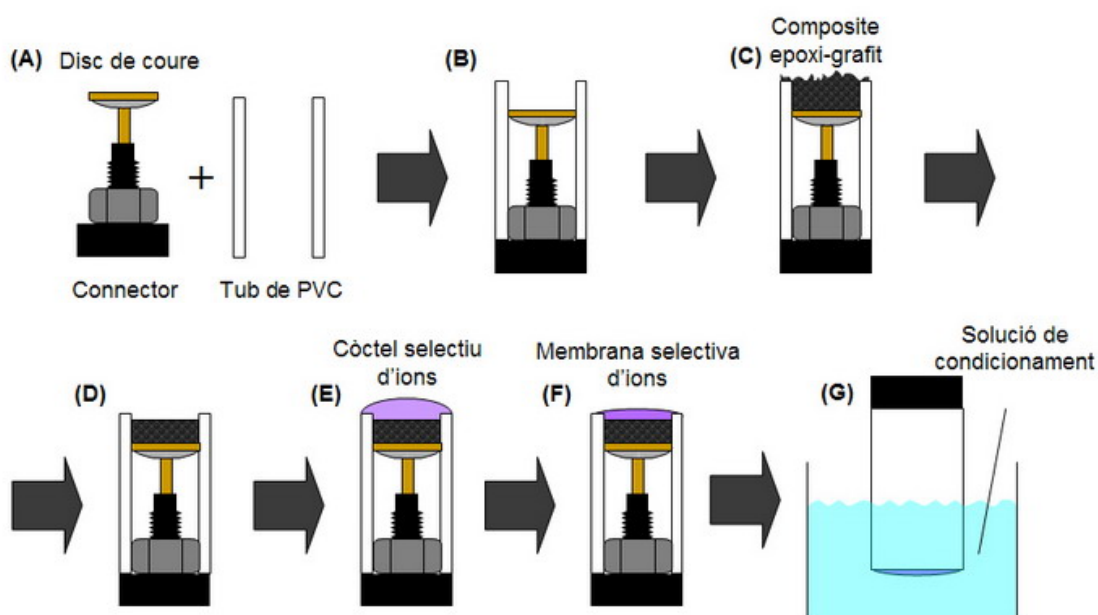


Figura 3.1. Esquema de construcció d'un ISE en disposició convencional o *batch*.

3.2.2. Elèctrodes en disposició tubular

Els passos del procés de construcció dels ISE en disposició tubular es troba esquematitzat a la Figura 3.2. L'esquema de construcció d'aquests ISE és força semblant als anteriors elèctrodes, però aquests han de permetre el pas d'un flux de mostra a través de l'elèctrode; per aquest fet es va utilitzar tub de metacrilat amb un petit forat de 2.5 mm de diàmetre per tal d'encaixar-hi el connector elèctric (A). El pas següent és encaixar el connector elèctric (B) per facilitar el contacte elèctric entre

l'elèctrode i el sistema de mesura. L'espai dins del tub de metacrilat s'omple de la mateixa pasta conductora descrita a l'apartat 3.2.1 i es deixa curar amb les mateixes condicions (C). Un cop curada la pasta epoxi-grafit, es poleix l'excés de pasta a totes dues cares del elèctrode i s'hi diposita una petita capa de pasta epoxi (Araldit M i Enduridor HR en proporció en pes 1:0.4) perquè faci d'aïllant elèctric i es deixa curar (en les mateixes condicions que la pasta conductora). Finalment, es fa un forat al centre de l'elèctrode d'1.5 mm de diàmetre (D). En aquests moments la peça està llesta per poder fer la deposició de la membrana polimèrica dins del forat del centre del elèctrode (E). Per a la formació de la membrana, una gota de còctel s'introdueix dins del forat practicat al cos de l'elèctrode i s'empeny amb un corrent d'aire fins que surt per l'altre orifici; aquest procés es repeteix un parell de vegades i es deixa que s'evapori el tetrahidrofuran durant 30 minuts. Aquesta operació es repeteix 4 cops més fins a aconseguir un gruix de membrana òptim. Acabat el procés de deposició es deixa un dia més amb la finalitat que les restes de dissolvent orgànic s'evaporin.

L'últim pas, un altre cop, és el condicionament (F). Cal deixar durant 24 hores la membrana de l'ISE en contacte amb l'ió pel qual és selectiva. Les solucions de condicionament emprades per aquest tipus d'elèctrodes van ser de concentració 0.01 M de l'ió principal.

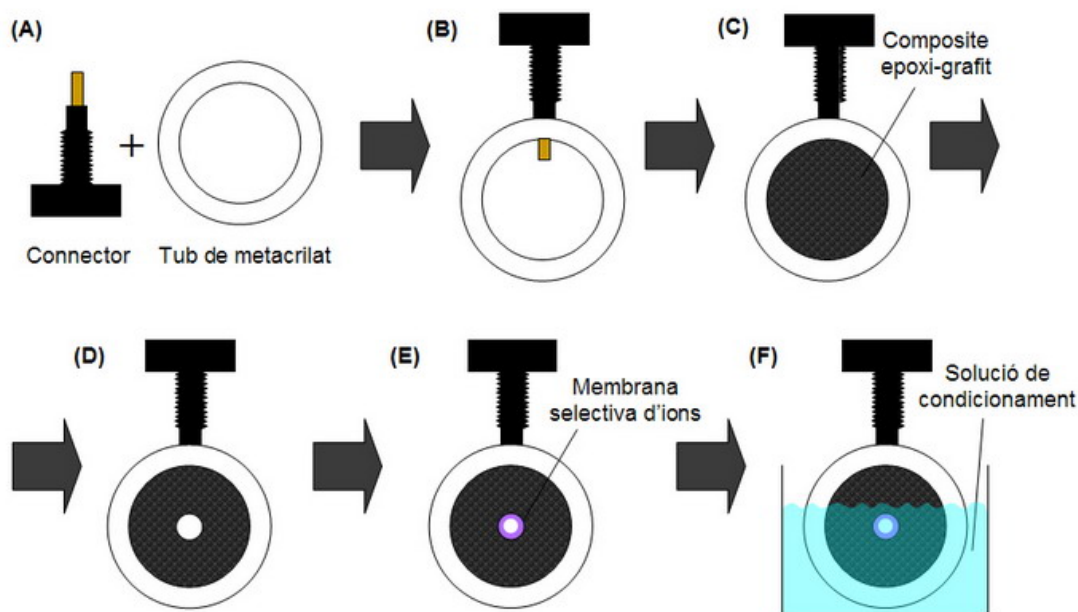


Figura 3.2. Esquema de construcció d'un ISE en disposició tubular.

3.3. Instrumentació

3.3.1. Mesures potenciomètriques

La tècnica bàsica emprada en la present investigació és la potencimetria, en la qual es fan lectures de diferències de potencial entre l'ISE objecte d'estudi i un elèctrode de referència. L'elèctrode de referència utilitzat és un elèctrode de doble unió Ag/AgCl (Thermoelectron 900200), amb una solució de KCl saturada amb AgCl com a referència interna, subministrada per la mateixa casa Thermoelectron. La referència externa utilitzada és una solució d'un electròlit inert de concentració aproximadament 0.01 M.

Les mesures de potencial, pel que fa a la caracterització potenciomètrica dels ISE desenvolupats, es van fer mitjançant un potenciòmetre Crison GLP22. Amb la finalitat d'avaluar la resposta de més d'un ISE a la vegada es va incorporar al sistema de mesura un commutador manual de sis canals.

Per a la preparació de diferents solucions amortidores de pH, així com per veure la resposta dels ISE enfront del pH, va caldre fer servir un pHmetre Crison 2002 amb un elèctrode combinat de pH Ingold model 10/402/3092 calibrat amb patrons de pH 7.00 i pH 4.00 subministrats per Crison.

3.3.2. Mesures impedimètriques

Per a les mesures d'impedància es va fer servir un sistema de mesurament d'impedància IM6e de BAS-Zahner (Alemanya) (Figura 3.3). La configuració emprada és la d'una cel·la de tres elèctrodes, amb ISE com a elèctrode de treball, un elèctrode de referència com l'emprat en les mesures potenciomètriques i un elèctrode d'anell de platí (Crison ref.52-67) com a elèctrode auxiliar. El software Thales va ser l'emprat per a l'adquisició de les dades i el software d'Autolab FRA, per al tractament de les dades i l'obtenció dels paràmetres elèctrics dels circuits equivalents.

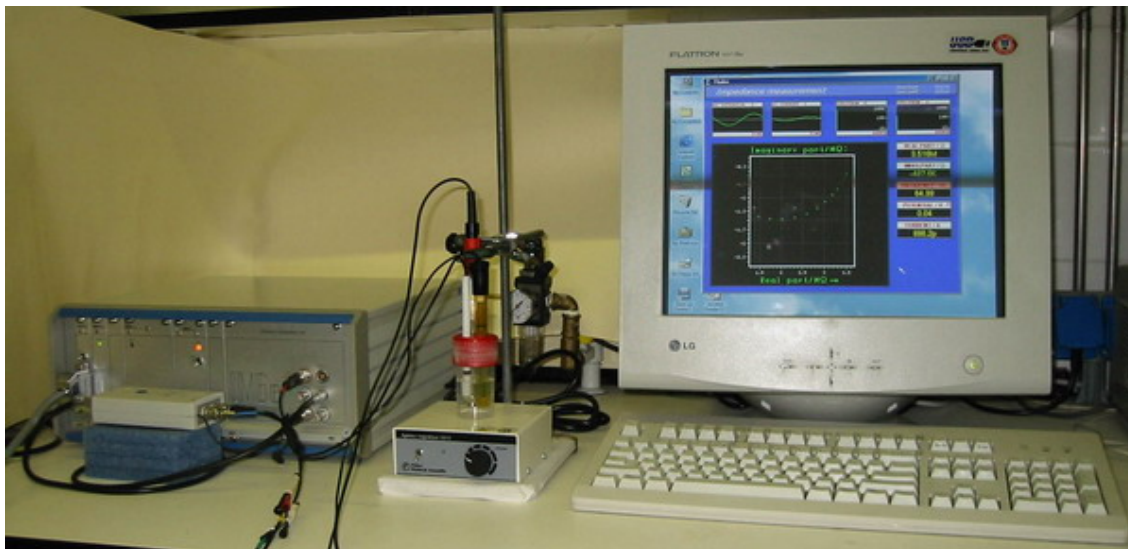


Figura 3.3. Sistema de mesura d'impedàncies IM6 de BAS-Zahner.

3.3.3. Sistema SIA

El sistema SIA utilitzat (Figura 3.4) està format per dues parts: un sistema de fluids i un sistema de mesura. El sistema de fluids està format per una vàlvula multiporta de distribució (1) connectada al sistema d'impulsió de fluids (2) mitjançant un serpentí de retenció (3). La bureta, que actua de sistema d'impulsió bidireccional, està connectada a un reservori de solució portadora (4). La vàlvula multiporta permet connectar el canal comú amb reservoris de solucions patró (5), una cel·la de mescla (6) o al sistema de mesura (format per la matriu de sensors (7) i l'elèctrode de referència (8)).

El sistema de distribució del sistema SIA, gran responsable de la versatilitat d'aquests tipus d'analitzadors, està format per una vàlvula multiporta (Hamilton MVP) amb capçal de sis vies (Ref HVXM R36760). El serpentí de retenció consisteix en un tub de tefló (Bioblock) amb un diàmetre intern d'1 mm, i amb un volum total una mica superior, de 5 ml. El sistema d'impulsió bidireccional utilitzat permet agafar i dispensar volums molt precisos mitjançant una microbureta automàtica Crison 2030 (Crison Instruments), amb una xeringa de 5 ml (Hamilton). Tant la microbureta com la vàlvula multiporta són controlats mitjançant un PC. La cel·la de mescla incorporada al sistema SIA ens permet, de manera automatitzada, preparar patrons mitjançant dilucions successives o per mescla de diferents solucions mares. Aquesta cel·la (construïda en

metacrilat) presenta un volum total 7 ml i homogeneïtza amb l'ajut d'un agitador magnètic. Totes les parts del sistema de fluids estan connectades amb connectors de cromatografia líquida de baixa pressió.

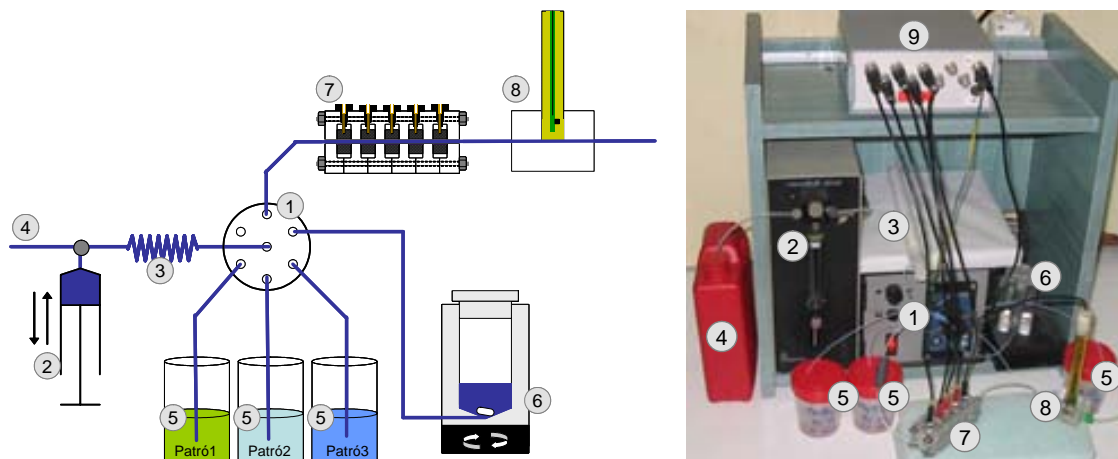


Figura 3.4. Esquema i fotografia del sistema SIA emprat.

El sistema de mesura utilitzat està format per la matriu de sensors (detector), l'elèctrode de referència, un potenciòmetre i un multiplexor. La matriu de sensors està formada per un nombre $n < 9$ d'ISE en disposició tubular i col·locats en paral·lel, mitjançant un esquema de cel·la tipus *sandvix* (Figura 3.5).



Figura 3.5. Fotografia de la cel·la tipus *sandvix* formada per 5 ISE tubulars.

Per a la construcció de la primera llengua electrònica d'aquesta tesi [7] es va utilitzar un potenciòmetre Crison 2002 i un multiplexor automàtic construït als nostres laboratoris

[4]. L'adquisició de les dades i el control del multiplexor es duia a terme mitjançant un ordinador.

En la segona llengua electrònica desenvolupada [11] es va utilitzar un nou sistema de mesura també construït als nostres laboratoris [20]. Aquest utilitzava un multipotenciòmetre (Figura 3.4(9)) connectat a una targeta de conversió analògica-digital PCL-812PG multifuntion I/O (Advantech) que estava controlat per un instrument virtual dissenyat amb Labview [20].

3.3.4. Sistemes de valoració automàtics

Els sistemes de valoració automàtics desenvolupats utilitzaven una matriu d'ISE en disposició convencional o *batch* junt amb un elèctrode de referència per pendre les mesures potenciomètriques.

El sistema emprat pel primer treball d'aquestes característiques presentat en aquesta tesi [14] estava basat en el primer sistema SIA desenvolupat [4, 7] (explicat a l'apartat 3.3.3). Aquest sistema utilitzava una microbureta Crison 2030 equipada amb una xeringa (Hamilton) de 10 ml, i controlada amb un programa de control escrit en QBasic desenvolupat als nostres laboratoris. El sistema de mesura era el mateix que el sistema SIA anteriorment esmentat (potenciòmetre Crison 2002 amb un multiplexor automàtic). La comunicació entre els aparells i l'ordinador es duia a terme mitjançant el protocol RS-232.

Per al segon treball basat en valoracions [17] es va utilitzar part de la instrumentació emprada en la segona llengua electrònica basada en un sistema SIA [11] (també a l'apartat 3.3.3). En aquest cas només es va fer servir la microbureta equipada amb una xeringa de 5 ml i el multipotenciòmetre, però l'adquisició de les dades es va fer mitjançant una targeta de conversió analògica-digital National Instruments NI6221 Multifunction. Tots els instruments estaven controlats gràcies a una nova versió de l'instrument virtual dissenyat [20] per controlar el sistema SIA.

3.4. Metodologia de càlcul

3.4.1. Activitat

Un dels inconvenients dels ISE, tot i ser un inconvenient salvable, és que no responen a la concentració de l'ió sinó a la seva activitat. L'activitat es pot entendre com la concentració efectiva de l'espècie que mesurem en dissolució i es pot relacionar amb la concentració mitjançant l'expressió següent:

Equació 3.1 $a_i = \gamma_i \cdot C_i,$

on C_i és la concentració de l'ió i en la solució i γ_i és el coeficient d'activitat, que està relacionat amb la força iònica (I) de la solució:

Equació 3.2 $\log \gamma_{\pm} = \frac{-A \cdot |z_+ \cdot z_-| \cdot \sqrt{I}}{1 + B \cdot \sqrt{I}} + C \cdot I,$

on A ($\propto T^{-3/2}$) és una constant que, per a solucions aquoses a 25 °C, val 0.5108. Els paràmetres B ($\propto T^{-1/2}$) i C es troben tabulats per a cada espècie iònica [21], z_+ i z_- són la càrrega del catió i l'anió de l'electròlit.

La força iònica d'una solució es calcula mitjançant l'expressió següent que té en compte tots els ions presents en la dissolució:

Equació 3.3 $I = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^i z_n^2 \cdot C_n,$

on z_n és la càrrega de l'ió n i C_n n'és la concentració. Afegint-hi un excés d'electròlits inerts, la contribució dels analits en la força iònica es fa menyspreable, la qual cosa fa que es puguin dissenyar condicions on l'ISE respongui a la concentració de l'analit.

3.4.2. Corbes de calibratge

La resposta d'un ISE està descrita per l'equació de Nernst (Equació 3.4), que relaciona la diferència de potencial entre l'electrode de referència i l'ISE amb l'activitat de l'ió

respecte del qual l'ISE és selectiu. Aquest potencial també es relaciona amb l'activitat d'altres ions interferents mitjançant l'equació de Nikolskii-Eisenman (Equació 3.5):

$$\text{Equació 3.4} \quad E = E^0 + (RT / z_i F) \cdot \ln a_i$$

$$\text{Equació 3.5} \quad E = E^0 + (RT / z_i F) \cdot \ln(a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j}),$$

on E^0 és la constant de l'elèctrode, R és la constant dels gasos ($8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T és la temperatura (K), F és la constant de Faraday ($9.6446\cdot 10^4 \cdot \text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), z_i i z_j són la càrrega de l'ió principal i l'interferent, i a_i i a_j són l'activitat de l'ió i l'interferent, respectivament.

Les corbes de calibratge en *batch* necessàries per a la caracterització dels elèctrodes es van fer afegint petits volums de patrons (de l'ordre dels μl) sobre un volum relativament gran d'aigua bidestil·lada també perfectament conegut. En particular, es feien addicions de 25 i 50 μl de patrons de l'ió principal, de concentracions 0.001, 0.01, 0.1 o 1 M. Aquestes addicions es realitzaven sobre 25 ml d'aigua bidestil·lada, d'una solució amortidora de pH o d'un fons iònic concret. Coneixent el volum inicial, el volum afegit, la concentració del patró i la força iònica del medi podem calcular l'activitat de l'ió principal després de cada addició.

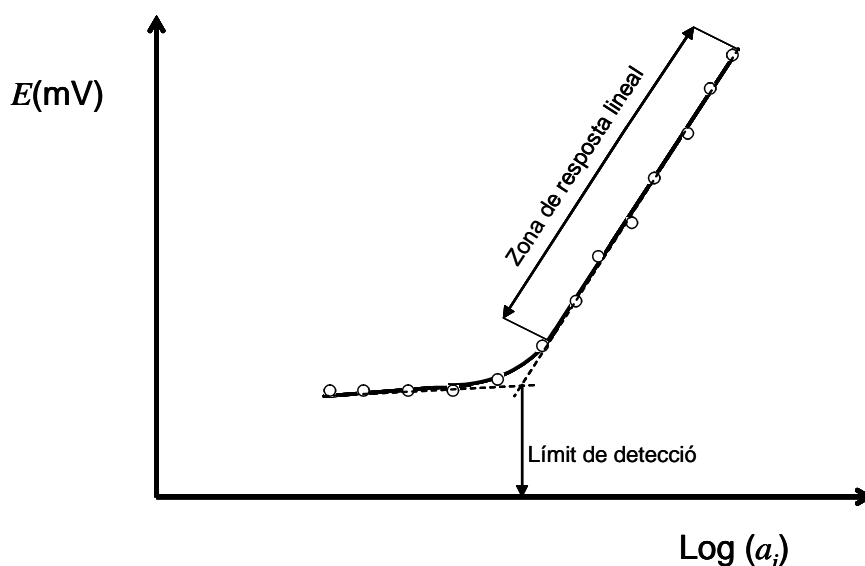


Figura 3.6. Típica corba de calibratge d'un ISE.

Els paràmetres que caracteritzen un elèctrode són la sensibilitat, el límit de detecció, els coeficients de selectivitat potenciomètrica, els temps de resposta i els temps de vida

[22]. Alguns d'aquests paràmetres els podem obtenir de l'ajust dels punts experimentals de les corbes de calibratge (Figura 3.6) a equacions tipus la de Nernst o la de Nikolskii-Eisenman.

3.4.3. Ajust lineal de les corbes de calibratge

A la pràctica, l'equació de Nernst que s'utilitza presenta una petita variació respecte a l'Equació 3.4, ja que engloba totes les constants i s'utilitza el logaritme decimal en lloc del logaritme natural:

Equació 3.6 $E = E^0 + s \cdot \log a_i$,

on s és la sensibilitat de l'elèctrode, que per a un catió monovalent a 25 °C ha de correspondre al valor teòric nernstià de 59.16 mV/dèc i per a un catió divalent a la mateixa temperatura 29.58 mV/dèc. Valors clarament superiors a aquests es denoten com una resposta supernernstiana, i els d'inferiors, com una de subnernstiana.

Així doncs, fent un ajust lineal per mínims quadrats de la zona lineal de resposta de l'ISE s'obté directament del pendent el valor de la sensibilitat.

3.4.4. Ajust no lineal de les corbes de calibratge

Una de les definicions més acceptades del límit de detecció (LD) ens diu que és l'activitat (o la concentració) de l'ió principal en el punt de la intersecció entre l'extrapolació de la zona lineal de resposta i la zona normalment horitzontal que correspon a les concentracions més baixes [23].

No obstant, al present treball de recerca es va fer servir una definició que deriva de la utilització de mètodes no lineals d'ajust. El paràmetre LD s'obté de l'ajust de la totalitat dels punts de la corba de calibratge a l'equació no lineal següent:

Equació 3.7 $E = A + B \cdot \log(a_i + C)$,

on B és la sensibilitat de l'ISE, a_i és l'activitat de l'ió principal calculada i C és el sumatori entre el LD i l'efecte de possibles interferències:

$$\text{Equació 3.8} \quad C = LD + \sum_j K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j}.$$

Així doncs, quan fem servir aigua bidestil·lada com a fons podem considerar que l'efecte de les interferències és nul i, per tant, obtenim el límit de detecció directament de l'ajust no lineal de la corba de calibratge, ja que correspon al valor del terme C .

3.4.5. Coeficient de selectivitat potenciomètrica

El coeficient de selectivitat potenciomètrica (K^{pot}) s'obté de mesures comparatives amb un ió interferent i per l'ajust no lineal de l'equació de Nicolskii-Eisenman. Normalment es fa servir el logaritme d'aquest coeficient, de manera que valors negatius indiquen la preferència per l'ió principal mentre que valors positius indiquen la preferència per l'ió interferent. En el present treball de recerca s'han utilitzat tres mètodes per trobar els coeficients de selectivitat potenciomètrica:

Mètode de les solucions separades (*Separate solutions method* [12], SSM): aquest mètode es basa a mesurar la diferència de potencial generada per solucions de l'ió principal i de l'ió interferent, de manera que:

$$\text{Equació 3.9} \quad \log K_{i,j}^{pot} = \frac{E_j - E_i}{s} + \log a_i - \frac{z_i}{z_j} \cdot \log a_j,$$

on E_j i E_i són els valors generats per la solució d'ió interferent i ió primari en mV, a_i i a_j són les activitats dels ions corresponents, z_i i z_j són les càrregues dels ions i s és la sensibilitat del elèctrode en mV/dèc.

Mètode de les solucions mesclades (*Fixed interference method* [12], FIM): en aquest mètode efectuem un calibratge de l'ió principal sobre una activitat fixa d'interferent, de manera que el límit de detecció sigui menyspreable enfront del producte de la constant de selectivitat potenciomètrica i l'activitat de l'ió interferent

(Equació 3.8). Així doncs, la constant de selectivitat potenciomètrica s'obté de l'expressió següent:

$$\text{Equació 3.10} \quad K_{i,j}^{pot} = a_i^* / (a_j)^{z_i/z_j},$$

on a_i^* és l'activitat de l'ió principal que s'obté de l'ajust no lineal de l'Equació 3.7 (terme C), a_j és l'activitat fixa de l'ió interferent i z_i i z_j són les càrregues de l'ió principal i l'interferent, respectivament.

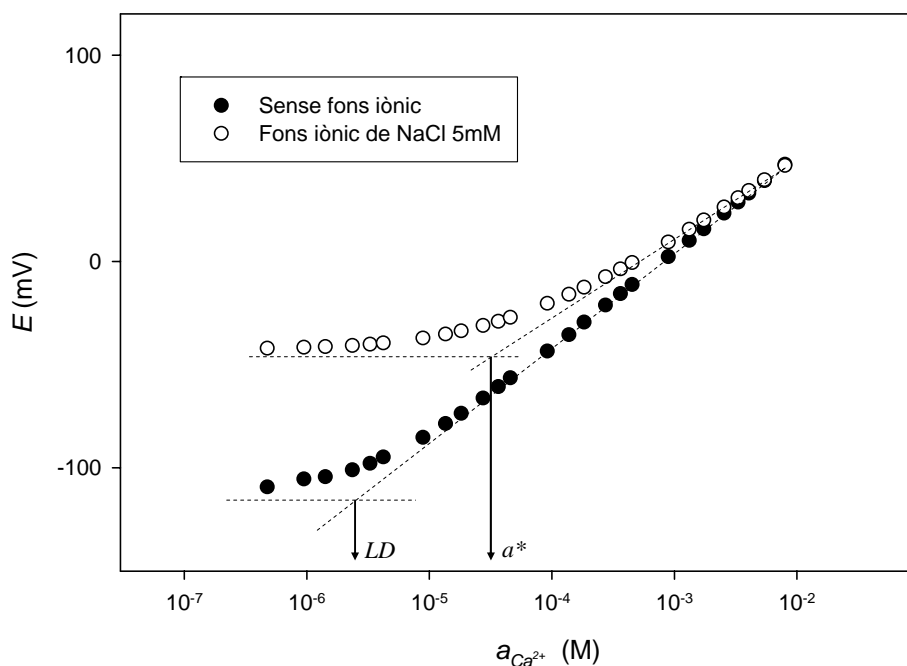


Figura 3.7. Calibratges superposats d'un ISE Calci(C) sobre un fons iònic i aigua bidestil·lada

A la Figura 3.7 es mostra un exemple d'aquest tipus de determinacions, on es pot veure que l'ió interferent (en aquest cas el sodi) causa un increment important de l'LD de l'elèctrode selectiu a ió calci.

Ajust de Nicolskii-Eisenman a un calibratge a dos ions: aquest mètode es basa en l'aplicació directa de l'equació de Nicolskii-Eisenman (Equació 3.5). Es tracta de realitzar un calibratge en el qual es varien simultàniament les concentracions de l'ió principal i l'ió interferent per fer posteriorment l'ajust de la corba en tres dimensions (E vs $a_{ió principal}$ vs $a_{ió interferent}$) a una expressió matemàtica tipus l'equació de Nicolskii-

Eisenman (Equació 3.11). Els coeficients de selectivitat potenciomètrica obtinguts per aquest mètode gaudeixen d'un significat molt més real i pràctic que els anteriors ja que no impliquen cap tipus d'aproximació i pressuposen la variació simultània d'ió principal i d'interferents (dos graus de llibertat).

$$\text{Equació 3.11} \quad E = A + B \cdot \log(a_i + C \cdot a_j^{z_i/z_j}).$$

A l'equació, A , B i C són els paràmetres que s'ajusten per regressió no lineal, sent C el coeficient de selectivitat potenciomètrica. a_i i a_j és l'activitat de l'ió principal i de l'ió interferent, respectivament. z_i i z_j és la càrrega de l'ió principal i la de l'interferent, respectivament.

Aquest tipus de calibratges que manualment implicarien un gran esforç són especialment fàcils de dur a terme gràcies a l'automatització dels sistemes SIA [4].

3.4.6. Resposta dinàmica dels ISE

En potenciomètria, un canvi bruscat de concentració provoca una variació exponencial del potencial de membrana amb el temps, de manera que a un cert temps el potencial resta constant (vegeu la Figura 3.8). Per a un salt de concentració concret de l'ió principal, el temps de resposta ($t_{R\%}$) es defineix com el temps que tarda l'ISE a aconseguir un percentatge de la resposta final. El potencial límit que normalment es fa servir és el que representa el 90 % del canvi que es produeix entre la situació inicial i un cop arribat a l'estat estacionari [22]. En el nostre cas avalüàvem els salts de concentració 10^{-5} i 10^{-3} M de l'ió principal, tot i que es van enregistrar també els salts corresponents a les concentracions 10^{-6} i 10^{-4} M.

Per tal de facilitar el treball es va utilitzar un PC amb comunicació al potenciòmetre i un programari de comunicació comercial (Crison) per prendre mesures de potencial cada segon. La corba potencial vers el temps s'ajusta a l'exponencial següent [24]:

$$\text{Equació 3.12} \quad Y = Y_0 - A_1(1 - e^{-B_1 \cdot x}),$$

on Y és el potencial generat per la cel·la ISE-elèctrode de referència, x és el temps i Y_0 , A_1 i B_1 són els paràmetres que s'ajusten. Així, el temps de resposta tal com l'hem definit es calcula a partir del paràmetre B_1 :

Equació 3.13 $t_{90\%} = -\ln(0.1)/B_1$

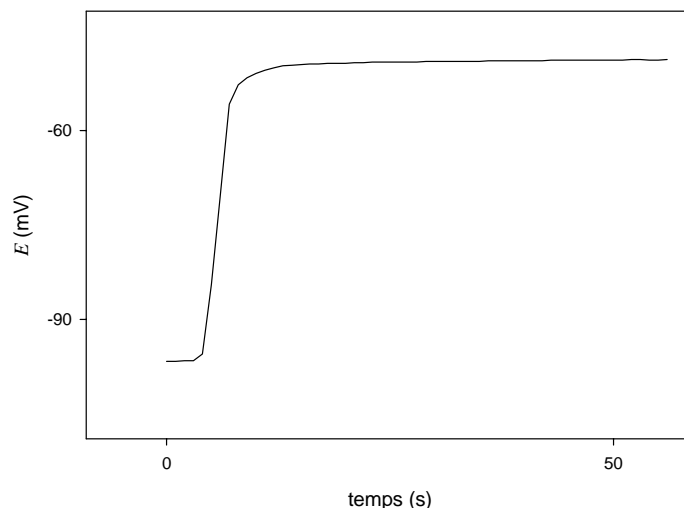


Figura 3.8. Transitoris exponencials típics per als elèctrodes selectius d'ions.

3.4.7. Resposta dels ISE al pH

La resposta al pH s'avalua mesurant la diferència de potencial entre l'ISE i l'elèctrode de referència en una solució de l'ió principal alhora que es va variant el pH. La representació corresponent $E/\text{vs}/\text{pH}$ es coneix com a diagrama de Reilley [25]. Per al cas dels sensors de calci, es parteix de la mescla de 25 ml d'aigua bidestil·lada, 25 ml de solució de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ i 50 μl de CaCl_2 1 M. Es fan petites addicions de HCl 1 M per passar de pH bàsic a pH àcid, de manera que aquest canvi sigui gradual i obtinguem punts de tot el rang.

3.5. Ajust de models teòrics d'impedància

Les mesures d'impedàncies ens subministren l'expressió complexa de la impedància d'un sistema electròdic per a cada freqüència. Les condicions de treball venien marcades segons la necessitat de lliurar-se del soroll, però generalment es treballava amb un senyal elèctric d'excitació d'amplitud de 10 a 50 mV i l'escombratge de freqüències de 50 kHz a 0.01 Hz.

Les corbes obtingudes en el diagrama Nyquist d'un únic semicercle s'ajustaven a la corba teòrica del sistema que equival a un circuit amb una resistència en sèrie amb un condensador i una resistència en paral·lel R(RC). Són d'interès les característiques de la membrana que corresponen als valors de capacitat del condensador i de la segona resistència, que s'obtenen per regressió no lineal en aritmètica complexa de la mesura experimental davant dels valors esperats per al circuit equivalent.

Per calcular les magnituds elèctriques específiques (resistivitat i permitivitat relativa) cal aplicar la relació de les magnituds elèctriques amb les característiques geomètriques, que són, per a la resistència:

$$\text{Equació 3.14} \quad R = \rho \cdot \frac{L}{A},$$

on ρ és la resistivitat, L és el gruix de la membrana i A és l'àrea de l'elèctrode.

I per a la capacitat:

$$\text{Equació 3.15} \quad C = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \frac{A}{d}$$

on ε_0 és la permitivitat del buit, ε_r és la permitivitat relativa i d és la distància entre les plaques del condensador.

3.6. Ajust de models de resposta mitjançant XNA

3.6.1. Generació de la informació

Per a la construcció de sistemes avançats d'anàlisi com les llengües electròniques mitjançant XNA, es van utilitzar programes escrits en MATLAB 6.5, emprant eines de l'entorn Neural Network Toolbox 4.0.

Una característica comuna de les eines quimiomètriques emprades per construir llengües electròniques, i en especial de les XNA, és la necessitat de gran quantitat d'informació per construir i validar el model de resposta. Aquesta informació obtinguda a partir d'un conjunt de mostres són el senyal proporcionat per les diferents matrius de sensors (potencials que corresponen a les entrades o *inputs* de l'XNA) i les concentracions de les espècies a determinar (sortides o *outputs* de l'XNA).

Les composicions dels diferents conjunts de mostres emprats en la present tesi es poden veure a la Figura 3.9, la Figura 3.10, la Figura 3.11 i la Figura 3.12. Els fons iònics emprats per preparar aquestes mostres van ser solució amortidora de pH 5 de cítric/citrat 5 mM per a les dues primeres LE mentre que per als estudis de valoracions combinades amb una LE s'aconseguia el fons iònic en afegir 5 ml d'una solució amortidora de pH concentrada sobre 25 ml de mostra. Per al treball en què es combina per primer cop una LE amb valoracions complexiomètriques [14] es va emprar una solució amortidora 0.21M de TRIS a pH 8.5 i es valoraven les mostres amb EDTA 8.75 mM. Per a l'altre treball de valoracions complexiomètriques [17] es va afegir solució amortidora 0.3 M $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ de pH 9.5 i es valorava amb EDTA 18 mM.

Per a les dues últimes aplicacions proposades es van preparar una sèrie de mostres replicades a fi de calcular l'LD del mètode i la precisió. L'LD es calcula com tres vegades la desviació estàndard dels replicats d'una mostra en blanc i la precisió com la desviació estàndard relativa dels replicats de mostres amb concentració intermèdia de cadascun dels ions estudiats.

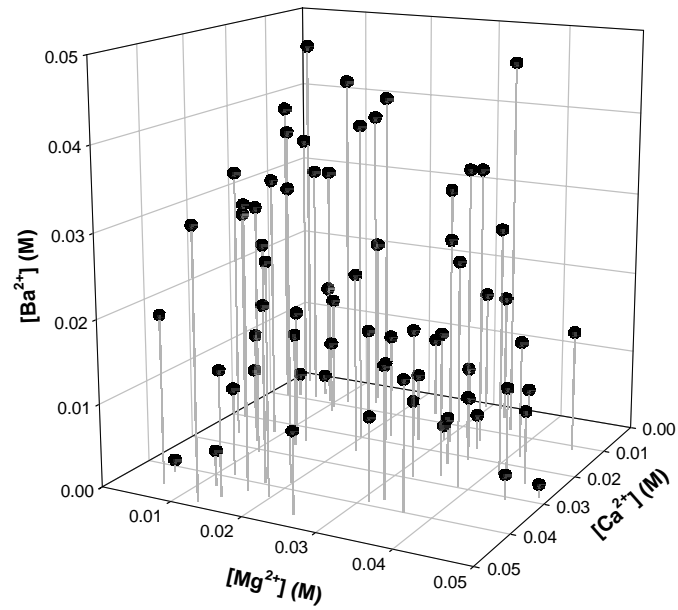


Figura 3.9. Conjunt de mostres emprades en el procés d'entrenament i test per a la primera LE construïda [7]

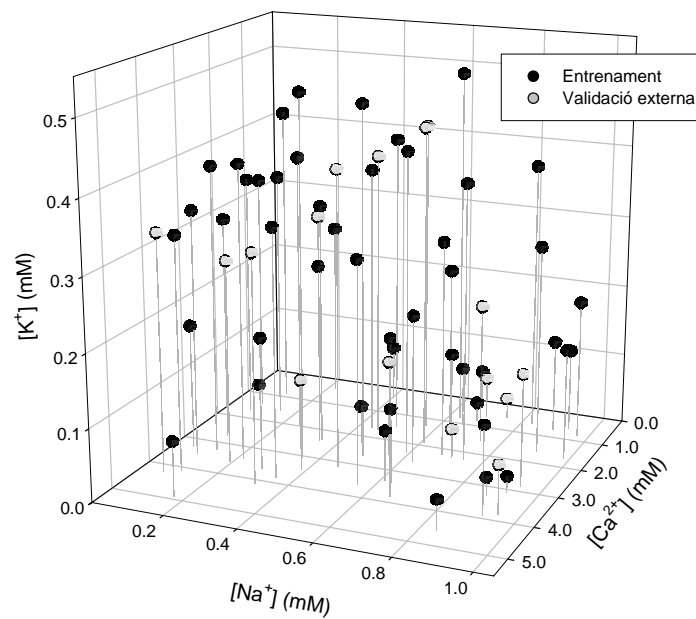


Figura 3.10. Conjunt de mostres emprades en l'entrenament i validació de la segona LE construïda [11]

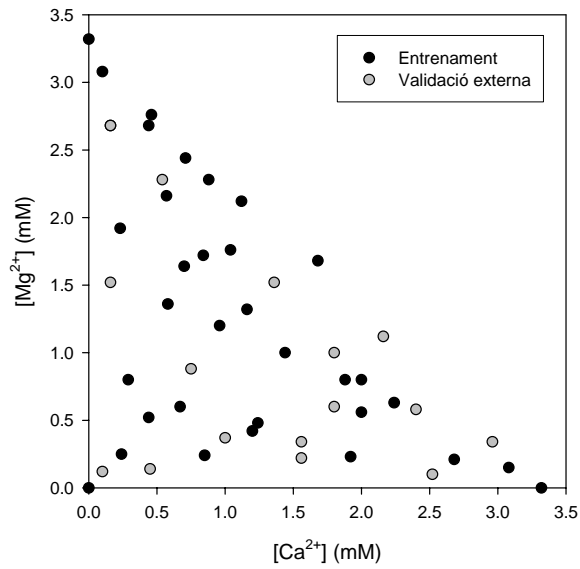


Figura 3.11. Conjunt de mostres d'entrenament i validació externa emprades per a la construcció de la tercera LE construïda [14]

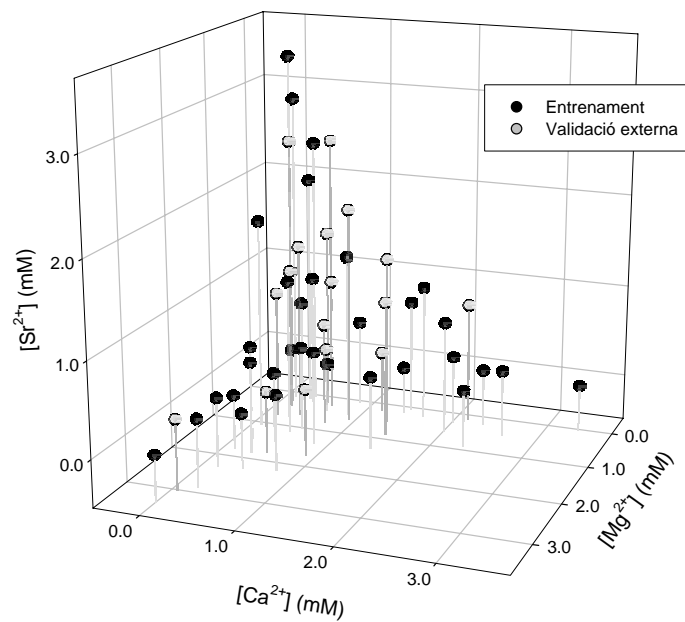


Figura 3.12. Conjunt de mostres emprades per a l'entrenament i validació de la tercera LE construïda [17]

3.6.2. Preprocessament de les dades

El conjunt de mostres emprades per construir el model es divideix en diferents subconjunts: (1) aproximadament la meitat de les mostres (mostres d'aprenentatge o *training*) s'utilitzen per generar el model de resposta; (B) una quarta part de les mostres (mostres de validació interna o *validation*) que serveix per detectar problemes de sobreentrenament de la xarxa; i (C) les mostres restants (mostres de validació externa o *testing*) serveixen per avaluar l'habilitat de predir noves concentracions. Les mostres es distribueixen aleatòriament entre aquests tres subconjunts, amb l'única precaució que les mostres amb màxims o mínims d'entrades o de sortides han de ser al subconjunt d'entrenament.

Aquestes proporcions, vàlides per a la major part d'algoritmes (descens del gradient o Levenberg-Marquardt), poden variar amb altres algoritmes d'entrenament. L'algoritme més emprat en aquesta tesi, el de regulació bayesiana [26], no necessita de les mostres de validació interna, de manera que la distribució queda tres quartes parts per a entrenament i una quarta part per a validació externa. Amb aquest algoritme d'entrenament també és típic d'emprar una distribució de dues terceres parts per entrenament i una tercera part per a validació externa quan el conjunt de mostres és relativament petit.

En el cas de tenir un nombre molt elevat d'entrades per a la XNA, com en el cas de l'article publicat a *Analytica Chimica Acta* en què es fan servir senyals transitoris per construir el model, cal una compactació prèvia dels senyals. En aquest estudi la compactació es va fer mitjançant l'obtenció dels coeficients de Fourier. Els transitoris originals, formats per 256 valors de potencial, es descomponen en els seus coeficients de Fourier i s'obtenen el mateix nombre de coeficients de Fourier complexos. Per escollir el nombre adient de coeficients es procedeix a reconstruir el senyal emprant un nombre reduït de coeficients i posant la resta de coeficients fins a completar els 256 a zero. El grau de reconstrucció del senyal s'obté de calcular el coeficient de correlació entre el transitori original i el transitori reconstruït. Finalment, es calculen els mòduls dels coeficients complexos escollits, que seran les entrades a la XNA.

Totes les entrades a la XNA (ja siguin potencials o mòduls de coeficients de Fourier) es normalitzen entre [-1, 1] per facilitar una correcta modelització [27].

3.6.3. Construcció i validació del model de resposta

Les xarxes neuronals emprades en la present tesi són totes del tipus unidireccional (*feed forward Neural Networks*), i utilitzen algorismes d'entrenament amb retropropagació (*Back Propagation*).

En el procés d'entrenament s'optimitzen els pesos sinàptics amb la finalitat de minimitzar l'error quadràtic mitjà (*Root Mean Square Error, RMSE*) entre els valors de concentració esperats i els obtinguts:

$$\text{Equació 3.16} \quad RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{m \cdot n - 1}},$$

on \hat{c}_{ij} és el valor de concentració predit pel model, c_{ij} és el valor esperat per cada una de les n mostres (i) i per cada m espècies (j) considerades.

Alguns paràmetres de la xarxa neuronal són definits a priori, com ara el nombre de neurones a la capa d'entrada que correspon al nombre de sensors (senyals obtinguts a partir de la matriu de sensors) i el nombre de neurones de la capa de sortida, ja que aquest està definit pel nombre d'espècies que es volen determinar. Altres paràmetres o característiques estan definits també gràcies a l'experiència prèvia del Grup de Sensors i Biosensors en XNA [4, 28]: la velocitat d'aprenentatge es va fixar a $\alpha = 0.1$, i el moment, a $\beta = 0.4$; la funció de transferència de les neurones de la capa d'entrada utilitzada va ser la *purelin*. També s'ha demostrat que arquitectures basades en una sola capa oculta són apropiades per resoldre casos com els plantejats en la present tesi.

Els paràmetres següents, no definits a priori, van ser optimitzats sistemàticament per obtenir el millor model d'XNA: el nombre de neurones de la capa oculta i les funcions de transferència de les neurones de la capa oculta (*tansig* o *logsig*) i de la capa de sortida (*tansig* o *purelin*). En el primer treball de llengües electròniques també es van assajar diferents algorismes d'entrenament, fixant el que millors resultats va donar (Regulació Bayesiana) per a la resta de treballs.

Un cop conegudes les millores condicions de l'XNA, es troben les concentracions dels diferents subconjunts de mostres mitjançant la xarxa optimitzada. A fi d'avaluar els resultats, s'empren rectes de comparació entre la concentració calculada per la LE i la concentració esperada. Un bon comportament dels sistemes ha de proporcionar

coeficients de correlació propers a la unitat i pendents i ordenades iguals a 1 i 0, respectivament.

3.7. Bibliografia

- [1] Fonseca, T.; Lopes, N. P.; Gates, P. J.; Staunton, J., Fragmentation studies on tetronasin by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15 (2004) 325-335.
- [2] Tohda, K.; Suzuki, K.; Inoue, T., Nearly complete separation of sodium ion with a liquid membrane incorporating carboxylic polyether antibiotic monensin, *Analytical Letters*, 22 (1989) 2167-2174.
- [3] Gallardo, J.; Alegret, S.; Muñoz, R.; Leija, L.; Hernandez, P. R.; del Valle, M., Use of an Electronic Tongue Based an All-solid-state Potentiometric Sensors for the Quantitation of Alkaline Ions, *Electroanalysis*, 17 (2004) 348-355.
- [4] Cortina, M.; Gutes, A.; Alegret, S.; del Valle, M., Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions, *Talanta*, 66 (2005) 1197-1206.
- [5] Calvo, D.; Bartroli, J.; del Valle, M., Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetronasin, *The Analyst*, (2007) to submit.
- [6] Calvo, D.; Bartroli, J.; del Valle, M., EIS study of potentiometric membranes selective to Ca^{2+} employing the new ionophoric antibiotic tetronasin, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 1569-1575.
- [7] Calvo, D.; Größl, M.; Cortina, M.; del Valle, M., Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water, *Electroanalysis*, 19 (2007) 644-651.
- [8] Lee, M. H.; Yoo, C. L.; Lee, J. S.; Cho, I. S.; Kim, B. H.; Cha, G. S.; Nam, H., Tweezer-Type Neutral Carrier-Based Calcium-Selective Membrane Electrode with Drastically Reduced Anionic Interference, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 2603-2607.
- [9] Morton, R. W.; Chung, J. K.; Miller, J. L.; Charlton, J. P.; Fager, R. S., Extended sensitivity for the calcium selective electrode, *Analytical Biochemistry*, 157 (1986) 345-352.
- [10] Suzuki, K.; Tohda, K.; Aruga, H.; Matsuzoe, M.; Inoue, H.; Shirai, T., Ion-selective electrodes based on natural carboxylic polyether antibiotics *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 1714-1721.
- [11] Calvo, D.; Duran, A.; del Valle, M., Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue: Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array, *Analytica Chimica Acta*, in press (2007) doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

- [12] Umezawa, Y.; Bühlmann, P.; Umezawa, K.; Tohda, K.; Amemiya, S., Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations, *Pure and Applied Chemistry*, 72 (2000) 1851–2082.
- [13] Jenny, H.-B.; Riess, C.; Ammann, D.; Magyar, B.; Asper, R.; Simon, W., Determination of K^+ in diluted and undiluted urine with ion-selective electrodes, *Microchimica Acta*, 74 (1980) 309-315.
- [14] Calvo, D.; Bartrolí, J.; del Valle, M., Multicomponent titration of calcium + magnesium mixtures employing a potentiometric electronic-tongue, *Analytical Letters*, 40 (2007) doi: 10.1080/00032710701380780.
- [15] Jain, A. K.; Gupta, V. K.; Raison, J. R., Strontium (II)-Selective Potentiometric Sensor Based on Ester Derivative of 4-tert-butylcalix(8)arene in PVC Matrix, *Sensors*, 4 (2004) 115-124.
- [16] Isildak, I.; Asan, A., Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all solid-state contact PVC membrane anion and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography, *Talanta*, 48 (1999) 967-978.
- [17] Calvo, D.; del Valle, M., Simultaneous titration of ternary alkaline-earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue, *Microchemical Journal*, in press (2007) doi:10.1016/j.microc.2007.04.005.
- [18] Müller, M.; Rouilly, M.; Rusterholz, B.; Maj-urawska, M.; Hu, Z.; Simon, W., Magnesium selective electrodes for blood serum studies and water hardness measurement, *Microchimica Acta*, 96 (1988) 283-290.
- [19] Cespedes, F.; Martinez-Fabregas, E.; Alegret, S., New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15 (1996) 296-304.
- [20] Durán, A.; Cortina, M.; Velasco, L.; Rodríguez, J. A.; Alegret, S.; del Valle, M., Virtual Instrument for an Automated Potentiometric e-Tongue Employing the SIA Technique, *Sensors*, 6 (2006) 19-29.
- [21] Meier, P. C., Two-parameter Debye-Hückel approximation for the evaluation of mean activity coefficients of 109 electrolytes, *Analytica Chimica Acta*, 136 (1982) 363-368
- [22] Buck, R. P.; Lindner, E., Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes, *Pure and Applied Chemistry*, 66 (1994) 2527-2536.
- [23] Inczèdy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M., *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*, Blackwell Science: Oxford, (1998).
- [24] Sánchez, J. Sensors potenciomètrics selectius a tensioactius aniònics. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, (2002).
- [25] Reilley, C. N.; Schmid, R. W., Chelometric Titrations with Potentiometric End Point Detection, *Analytical Chemistry*, 30 (1958) 947-953.
- [26] Demuth, H.; Beale, M., *Neural Network Toolbox Users Guide*, Mathworks Inc.: Natick, MA, (2002).

[27] Gallardo, J.; Alegret, S.; de Román, M. A.; Muñoz, R.; Hernández, P. R.; Leija, L.; del Valle, M., Determination of Ammonium Ion Employing an Electronic Tongue Based on Potentiometric Sensors, *Analytical Letters*, 36 (2003) 2893–2908,.

[28] Gallardo, J.; Alegret, S.; Muñoz, R.; De-Román, M.; Leija, L.; Hernández, P. R.; del Valle, M., An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 248-256.

4. DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

4. Discussió global dels resultats

4.1. Introducció

L'interès que hi ha per trobar elèctrodes selectius d'ions de millors característiques que les dels elèctrodes que es poden trobar comercialment i el fet que l'antibiòtic tetronasina presenta uns equilibris d'intercanvi iònic en solució molt ràpids ens va fer plantejar l'ús d'aquest antibiòtic ionofòric, no emprat fins ara en el camp dels sensors, com a element electroactiu en ISE.

La primera part de la investigació realitzada va correspondre a la construcció i l'avaluació de la resposta d'ISE basats en l'antibiòtic tetronasina per a la detecció de l'ió sodi. A priori, aquest ió va ser el primer candidat perquè estava documentat que els equilibris més ràpids en dissolució es devien a aquest ió [1]. Un cop fet un estudi exhaustiu d'interferències, es va haver de replantejar l'ió principal per als ISE basats en

tetronasina, i es va obtenir una resposta per a l'ió calci de tres ordres de magnitud més gran que per a l'ió sodi.

El pas següent va ser construir elèctrodes selectius d'ió calci i avaluar-los de manera completa, provant fins a vuit composicions de membranes diferents [2]. Per a aquesta caracterització també es va utilitzar la tècnica de l'espectroscòpia electroquímica d'impedàncies [3].

L'ISE de millors característiques es va utilitzar per construir diferents eines analítiques avançades. La primera aplicació proposada va ser la de construir una LE (utilitzant un sistema SIA) per determinar cations alcalinoterris emprant una matriu de sensors potenciomètrics amb resposta a aquest tipus d'ions [4]. La segona aplicació proposada (també basada en un sistema SIA) va ser la de determinar simultàniament ions alcalins i alcalinoterris mitjançant una LE [5]. Per a aquesta proposta es van utilitzar senyals molt més complexos que els potencials dels ISE a l'estat d'equilibri. Els registres temporals de potencial obtinguts en passar un esglaió de mostra van ser utilitzats per construir el model de resposta de l'LE.

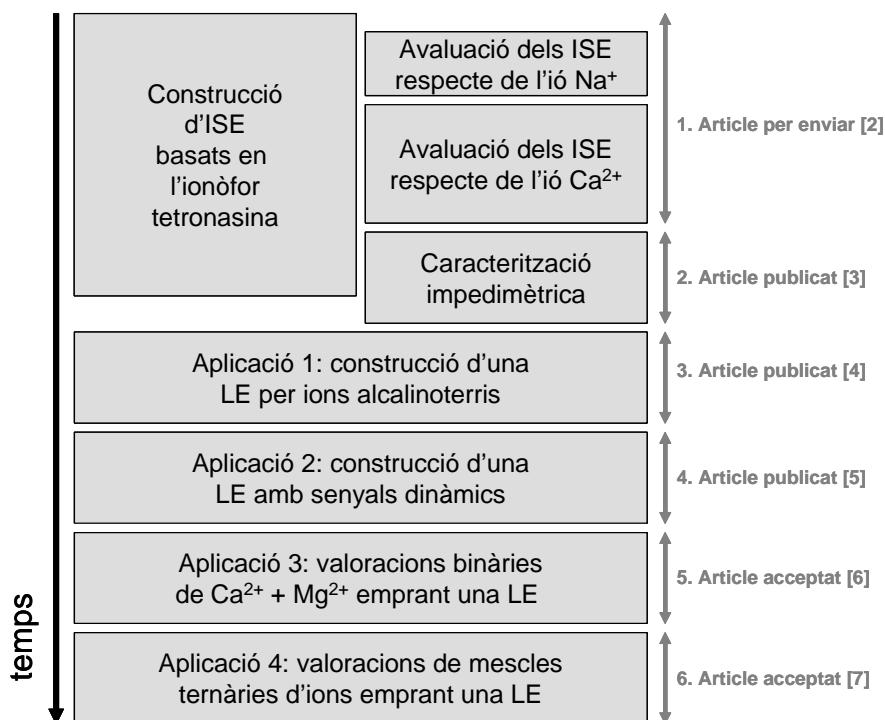


Figura 4.1. Esquema temporal del treball i de les publicacions realitzades.

Les últimes aplicacions assajades en la present tesi doctoral es basen també en el concepte de l'LE, però aplicada en la detecció del punt d'equivalència de valoracions complexomètriques de diversos analits simultàniament, una proposta també feta per primer cop en aquesta tesi doctoral. En primer lloc es va provar de determinar els ions calci i magnesi de manera simultània mitjançant una matriu de sensors potenciomètrics i el processament mitjançant xarxes neuronals artificials [6]. Un cop demostrada la viabilitat d'aquesta estratègia es va aplicar el mateix concepte a la multideterminació de tres ions alcalinoterris [7].

A la Figura 4.1 es pot observar l'esquema de treball realitzat en la present tesi doctoral al llarg del temps. Aquests treballs han possibilitat la redacció i la publicació de diversos articles en revistes internacionals de prestigi. La llista de publicacions generades es mostra a continuació:

1. **“Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetrone”**. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. Per enviar a la revista *The Analyst*.

2. **“EIS study of potentiometric membranes selective to Ca^{2+} employing the new ionophoric antibiotic tetrone”**. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 1569-1575.

3. **“Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water”**. Daniel Calvo, Michael Gröbl, Montserrat Cortina i Manel del Valle. *Electroanalysis*, 19 (2007) 644-651.

4. **“Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue. Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array”**. Daniel Calvo, Alejandro Durán i Manel del Valle. *Analytica Chimica Acta*, acceptat el novembre de 2006. doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

5. **“Multicomponent titration of calcium + magnesium mixtures employing a potentiometric electronic-tongue”**. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. *Analytical Letters*, 40 (2007) pp. doi: 10.1080/00032710701380780.

6. “Simultaneous titration of ternary alkaline-earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue”. Daniel Calvo i Manel del Valle. *Microchemical Journal*, acceptat el maig de 2007. doi:10.1016/j.microc.2007.04.005.

Les seccions següents resumeixen amb detall els resultats de més rellevància del treball realitzat.

4.2. Caracterització d'ISE selectius d'ió sodi

Avaluació de la resposta potenciomètrica: es van construir tres ISE en disposició convencional per cada un dels cinc tipus de membrana proposats (vegeu les composicions a la Taula 3.2). Als ISE obtinguts se'ls va realitzar cinc calibratges de NaCl al llarg de 15 dies. Les sensibilitats i LD d'un calibratge es poden observar visualment a la Figura 4.2, i la mitjana dels cinc calibratges a la Taula 4.1, així com la reproductibilitat corresponent a aquests valors.

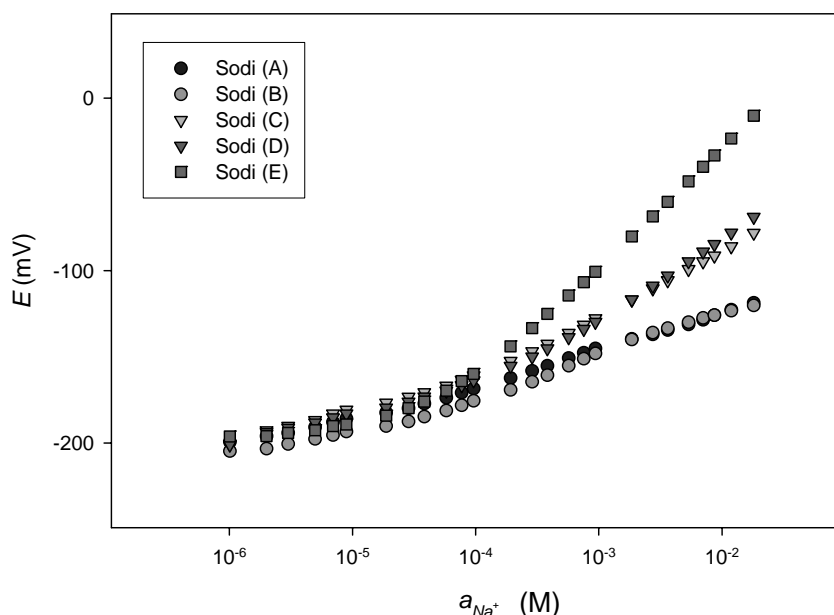


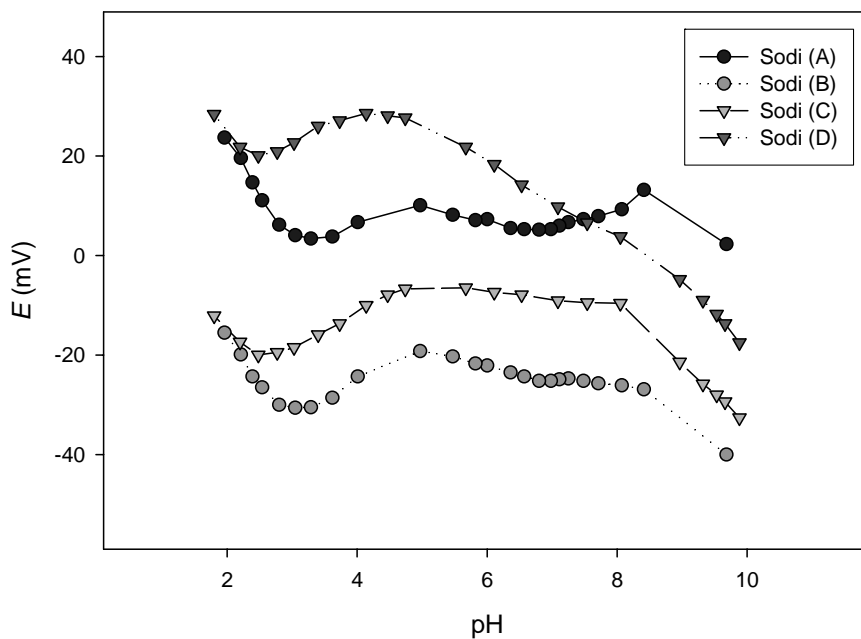
Figura 4.2. Calibratge de sodi dels electrodes selectius d'ió sodi desenvolupats.

Taula 4.1. Sensibilitat i LD dels elèctrodes selectius d'ió sodi.

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	Sensibilitat (rep)* mV/dèc	LD (rep)* M
Sodi (A)	TH/DOS/Na ⁺ TFPB ⁻	21.5 (9.1)	4.0·10 ⁻⁶ (1.4·10 ⁻⁴)
Sodi (B)	TNa/DOS/Na ⁺ TFPB ⁻	25.8 (7.1)	6.0·10 ⁻⁶ (1.4·10 ⁻⁴)
Sodi (C)	TH/DOS/K ⁺ TpCIPB ⁻	34.3 (7.8)	2.1·10 ⁻⁵ (1.2·10 ⁻⁵)
Sodi (D)	TNa/DOS/ K ⁺ TpCIPB ⁻	48.7 (5.5)	3.1·10 ⁻⁵ (1.0·10 ⁻⁵)
Sodi (E)	-- /DOS/ K ⁺ TpCIPB ⁻	69.4 (3.8)	2.3·10 ⁻⁵ (1.6·10 ⁻⁵)

* Entre parèntesis s'indica la reproductibilitat corresponent a cinc calibratges en 15 dies.

Es pot observar que només els ISE Sodi (E), que corresponen a la membrana blanc que no conté l'ionòfor, s'apropa la resposta nerstiana esperada per a un ió monovalent (59.16 mV/dèc). La resta d'ISE (amb l'ionòfor tetronasina) presenten sensibilitat força llunyana a l'esperada per a l'ió sodi. No obstant, en aquests s'observa una clara millora de la sensibilitat en passar d'una relació molar respecte del contingut d'ionòfor del 20 % d'additiu aniònic (ISE Sodi (A) i (B)) al 75 % (ISE Sodi (C) i (D)). La utilització de la sal sòdica de l'antibiòtic tetronasina (en els ISEs Sodi (B) i (D)) com a ionòfor dóna una resposta millor, tot i que respecte de la forma àcida (ISE Sodi (A) i (C)) és força semblant. Els LD obtinguts estan lleugerament per sobre dels LD esperats per aquest tipus d'ISE [8].

**Figura 4.3. Diagrames Reilly dels elèctrodes selectius d'ió sodi desenvolupats.**

La resposta dels ISE amb tetronasina per a sodi respecte del pH es mostra a la Figura 4.3 on es pot veure un comportament força similar exceptuant-ne l'ISE Sodi (C). L'interval de pH òptim de treball per a aquests tres ISE és de 4 a 8, per sota de pH 3 s'observa la resposta a l'ió H^+ .

Selectivitat respecte d'altres ions: es van determinar els coeficients de selectivitat potenciomètrica mitjançant el mètode SSM. A la Figura 4.4 es representa el logaritme del coeficient de selectivitat potenciomètrica de cada ió interferent i per a cadascuna de les membranes estudiades. Podem observar que l'ionòfor tetronasina proporciona poca selectivitat en favor de l'ió sodi; en canvi, té una clara preferència pels ions calci i bari. Dades d'aquesta mateixa natura havien estat apuntades prèviament en la determinació de constants d'estabilitat dels complexos formats per la tetronasina amb ions alcalins i alcalinoterris [9], on l'equilibri més desplaçat és justament amb l'ió Ca^{2+} .

L'increment d'additiu aniònic del 20 % (Sodi (A) i (B)) al 75 % (Sodi (C) i (D)) dins de la membrana es tradueix en una generalització de la resposta. La membrana sense ionòfor (Sodi (E)) té un comportament completament diferent de les membranes que incorporen l'antibiòtic tetronasina, i presenta resposta genèrica a tots els ions estudiats.

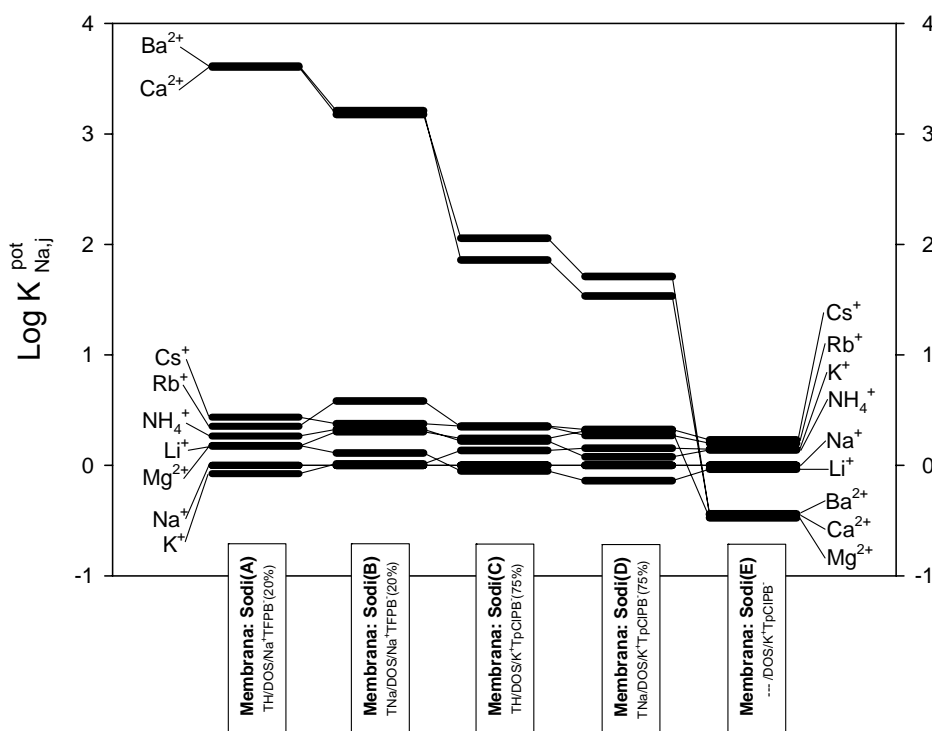


Figura 4.4. Constants de selectivitat potenciomètrica mitjançant el mètode SSM.

Resposta dinàmica: el canvi brusc d'una dècada de concentració de l'ió Na^+ no provoca en el potencial una transició exponencial en el temps per a les quatre membranes estudiades amb l'ionòfor tetronasina. Els transitoris observats són com els de la Figura 4.5, on sembla que s'observa la suma de dos exponencials amb tendències i velocitats clarament diferenciades, una primera de creixent molt ràpida i una altra de més lenta i de tendència decreixent.

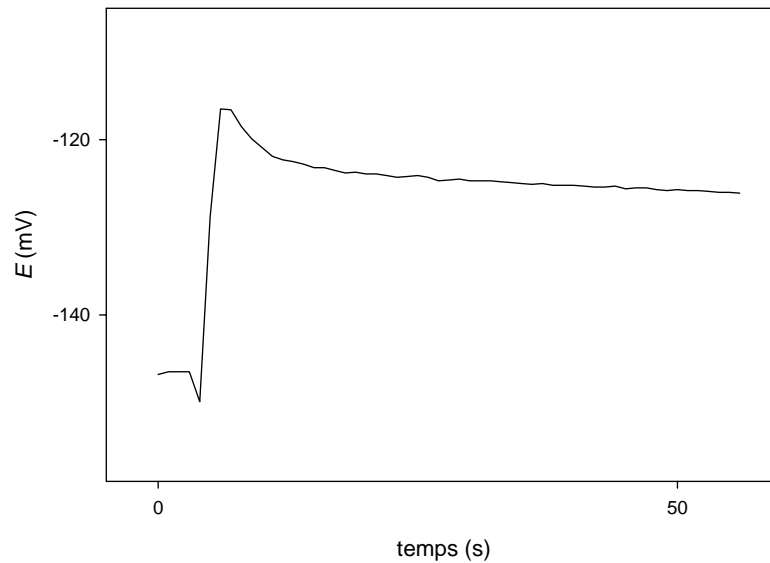


Figura 4.5. Transitori de potencial per un ISE amb l'ionòfor tetronasina per a un canvi brusc de una dècada de concentració de sodi.

Aquest tipus de comportament ja ha estat publicat per al cas particular d'ISE selectius d'ió Br^- en presència de l'interferent I^- [10]. És possible, doncs, que la membrana, després d'haver estat en contacte amb les solucions d'ions interferents de l'estudi anterior d'interferències, hagi quedat alterada i s'hagi condicionat amb un ió al qual és més selectiva i ara veu l'ió Na^+ com un interferent.

4.3. Caracterització d'ISE selectius d'ió calci

Vist que la selectivitat mostrada pels ions calci i bari és quatre ordres de magnitud més gran que per a la resta d'ions estudiats i que les membranes amb ionòfor tetronasina van

patir canvis importants en la dinàmica de resposta després d'estar en contacte amb solucions d'ions interferents, es va plantejar l'ús de l'antibiòtic tetronasina ara per construir elèctrodes selectius d'ió calci.

4.3.1. Caracterització potenciomètrica

Resposta potenciomètrica: també es van construir tres ISE convencionals per cada una de les vuit membranes estudiades (les composicions detallades de les quals es troben a la Taula 3.2). Visualment podem observar les sensibilitats i LD dels ISE per un calibratge a la Figura 4.6 o els valors calculats com la mitjana de vuit calibratges realitzats al llarg d'un mes a la Taula 4.2, junt amb les corresponents reproductibilitats.

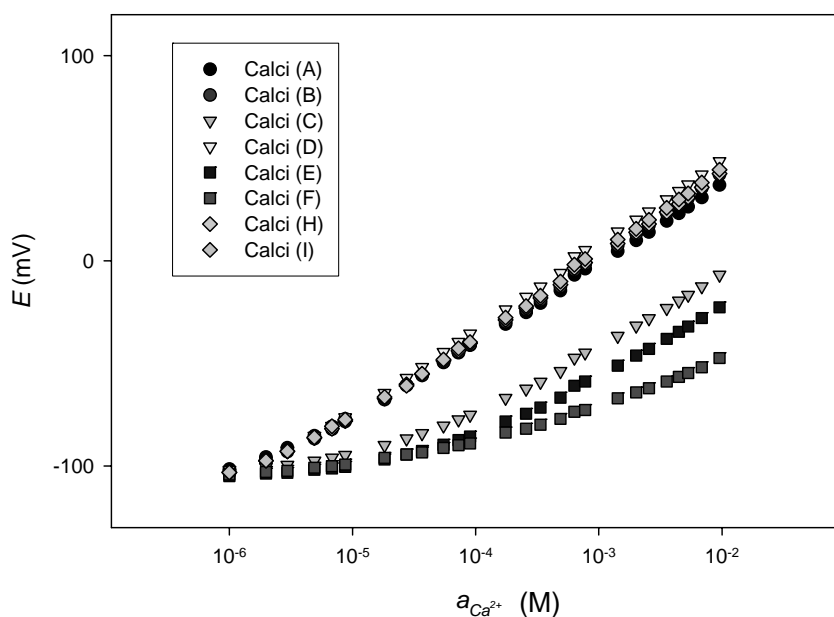


Figura 4.6. Calibratges de calci dels ISE desenvolupats.

En general, per als ISE basats en l'ionòfor tetronasina s'observa resposta supernernstiana ja que la sensibilitat teòrica per cations divalents és de 29.58 mV/dèc. Es pot veure que, en quant a la sensibilitat i l'LD, no hi ha diferències entre la utilització de l'ionòfor en forma àcida (Calci (A)) o de la sal sòdica de l'ionòfor (Calci (B)), el condicionament en la solució de $CaCl_2$ prepara la membrana per a una resposta correcta

per a l'ió Ca^{2+} . L'ús del plastificant oNPOE (Calci (B)) o de DOS (Calci (D)) tampoc no presenta moltes diferències en la sensibilitat a l'ió calci. Finalment, observem que tant amb un additiu catiònic (Calci (E)) com sense cap tipus d'additiu (Calci(C)), el límit de detecció és de l'ordre de 10^{-5}M , mentre que amb l'additiu aniònic és aproximadament un ordre de magnitud inferior, i disminueix en augmentar el contingut d'additiu aniònic.

Taula 4.2. Sensibilitat i LD dels elèctrodes selectius d'ió calci.

ISE	Membrana	Sensibilitat (rep)*	LD (rep)*
	ionòfor/plastificant/additiu	mV/dèc	M
Calci (A)	TH/oNPOE/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	47.5 (5.9)	$2.3 \cdot 10^{-6}$ ($2.6 \cdot 10^{-6}$)
Calci (B)	TNa/oNPOE/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	47.0 (5.8)	$3.7 \cdot 10^{-6}$ ($2.0 \cdot 10^{-6}$)
Calci (C)	TNa/oNPOE/ ---	45.5 (5.6)	$1.1 \cdot 10^{-5}$ ($4.0 \cdot 10^{-6}$)
Calci (D)	TNa/DOS/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	49.1 (5.9)	$3.0 \cdot 10^{-6}$ ($2.1 \cdot 10^{-6}$)
Calci (E)	TNa/oNPOE/ $\text{TDDMA}^+\text{NO}_3^-$	42.0 (2.8)	$1.7 \cdot 10^{-5}$ ($7.0 \cdot 10^{-6}$)
Calci (F)	--- /oNPOE/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	37.3 (3.0)	$4.4 \cdot 10^{-5}$ ($4.5 \cdot 10^{-5}$)
Calci (H)	TNa/oNPOE/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	40.6 (6.7)	$1.9 \cdot 10^{-6}$ ($1.4 \cdot 10^{-6}$)
Calci (I)	TNa/oNPOE/ $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	40.7 (6.9)	$9.7 \cdot 10^{-7}$ ($9.6 \cdot 10^{-7}$)

* Entre parèntesis s'indica la reproductibilitat corresponent a vuit calibratges en un mes.

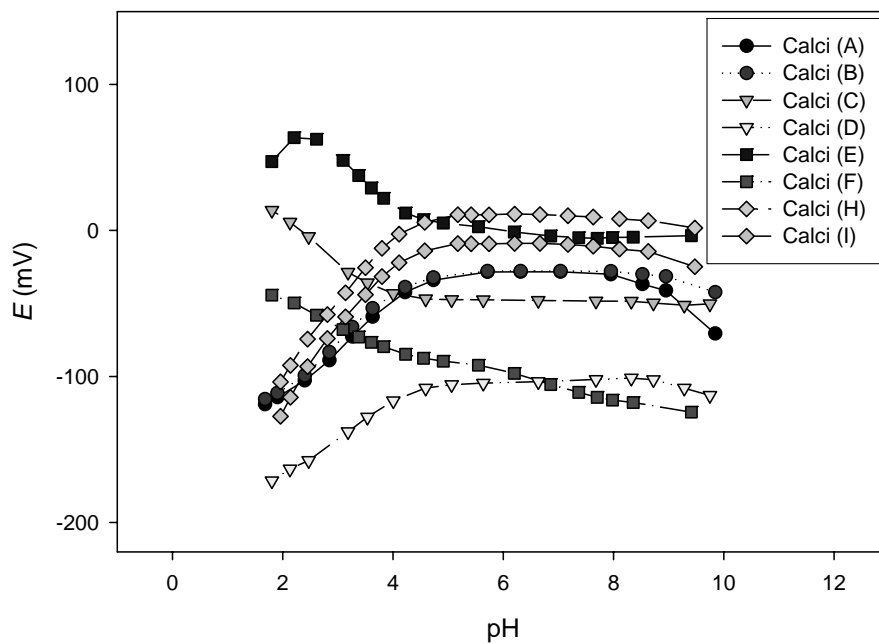


Figura 4.7. Diagrames Reilly dels ISE de calci desenvolupats.

En la resposta al pH (Figura 4.7) trobem tres comportaments diferenciats. D'una banda, les membranes que incorporen l'additiu aniònic (Calci (A), (B), (D), (H) i (I)) que tenen un rang de pH òptim de treball de 4 a 8, on la resposta al pH és pràcticament constant. La membrana que conté l'additiu catiònic (Calci (E)) i la que no té cap tipus d'additiu iònic (Calci (C)) tenen uns comportaments similars entre si, com en el cas anterior hi ha el rang de pH de 4 a 8 on la resposta al pH és estable, però per sota de pH 4 s'observa la resposta al catió H^+ . Per últim, tenim la membrana Calci (F), que no conté l'ionòfor tetronasina, la qual mostra una certa resposta al catió H^+ per tot l'interval de pH estudiat.

Selectivitat: els coeficients de selectivitat potenciomètrica de cations alcalins i alcalinoterris es van determinar mitjançant el mètode FIM. A la Figura 4.8 es mostra el logaritme d'aquests coeficients per cadascuna de les vuit membranes estudiades. Es pot observar el reconeixement per part de l'antibiòtic tetronasina de l'ió Ca^{2+} respecte dels cations alcalins i al catió Mg^{2+} . Això es dedueix dels resultats obtinguts per les membranes Calci (B) (amb ionòfor) i la membrana Calci (F) (sense ionòfor), ja que la separació dels coeficients de selectivitat potenciomètrica és superior a tres ordres de magnitud. Les diferències en quant a selectivitat entre l'ionòfor en forma sòdica (Calci (B)) i forma àcida (Calci (A)) són negligibles. La utilització del plastificant DOS (Calci (D)) mostra una petita pèrdua de selectivitat, fet que podíem esperar, ja que és sabut que el oNPOE millora la resposta a ions divalents [11].

L'efecte del tipus i de la proporció d'additiu incorporat a la membrana en la selectivitat es pot observar millor a les cinc primeres membranes de la Figura 4.8, en la qual podem veure que en augmentar el contingut d'additiu aniònic s'afavoreix la selectivitat en favor dels ions calci, bari i estronci. No obstant, aquesta millora és pràcticament completa amb un 20 % d'additiu aniònic, ja que la millora en passar al 50 % o al 75 % és menyspreable. Així doncs, es va proposar com a resultat de l'optimització de la composició de la membrana, la membrana Calci (B).

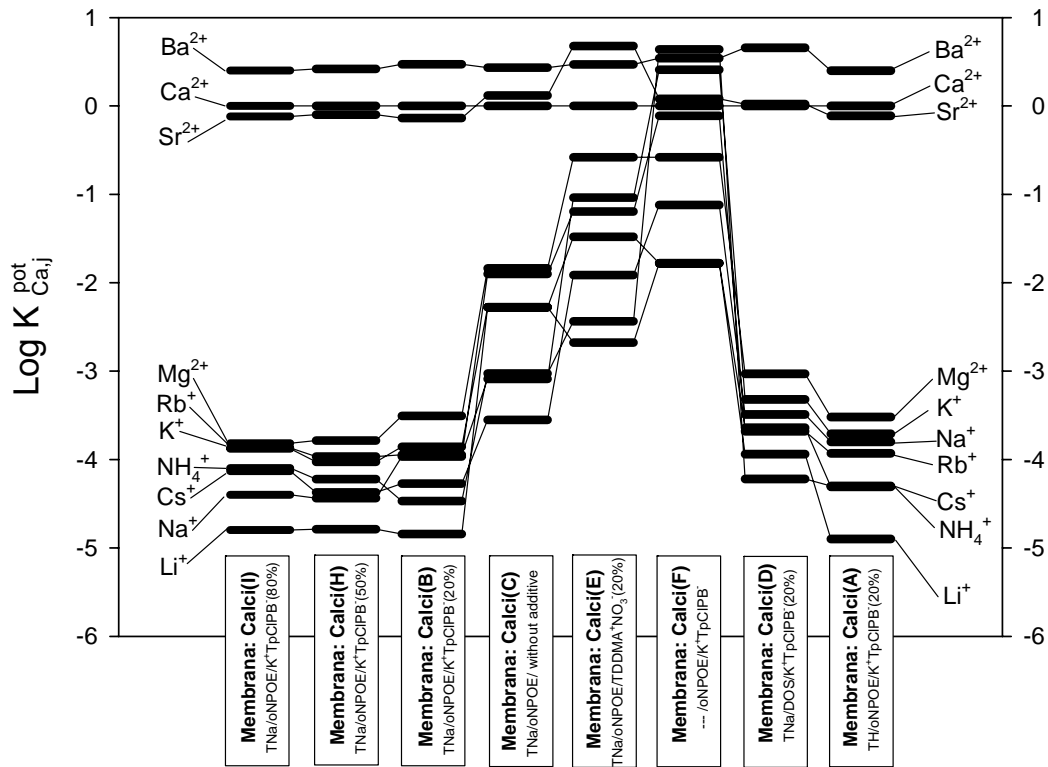


Figura 4.8. Constants de selectivitat potenciomètrica mitjançant el mètode FIM.

Taula 4.3. Coeficients de selectivitat potenciomètrica del ISE Calci (B).

ISE	$LogK_{Ca^{2+},j}^{pot}$								
	Ba ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Rb ⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺
Calci (B)	0.47	-3.97	-3.86	-4.47	-4.27	-4.84	-3.95	-3.51	-0.14

Els coeficients de selectivitat potenciomètrica de la membrana amb millors característiques de resposta per a l'ió calci es mostren a la Taula 4.3. Cal destacar que amb logaritmes del coeficient de selectivitat potenciomètrica inferiors a -3 es considera que pràcticament no presenta interferència. L'ISE només té com a interferents els cations Ba²⁺ i Sr²⁺, mentre que els cations Mg²⁺, Rb⁺, K⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Na⁺ i Li⁺ no interfereixen en la resposta del elèctrode selectius d'ió Ca²⁺. Els coeficients de selectivitat potenciomètrica obtinguts són comparables a altres ionòfors de calci (per exemple ETH1001 i ETH129) [12]. Aquest fet possibilita l'ús d'aquest ionòfor per preparar sensors per a la determinació de calci, ja que tant Ba²⁺ com Sr²⁺ són ions força estranys en mostres naturals, i es presenten junts únicament en el cas d'anàlisi de

ciments [13]. L'ió que menys interferència presenta, quasi negligible, és el Li^+ , el qual permet el seu ús com a fons salí per a ajustos de força iònica.

Resposta dinàmica: el temps de resposta per a les membranes estudiades és força ràpid, de menys de 12 segons en tots els casos, sent en la majoria menors de 5 segons. Aquesta resposta tan ràpida per part dels elèctrodes selectius d'ió calci estudiats podria ser deguda a l'estructura oberta amb la qual l'antibiòtic tetronasina coordina el metall. La coordinació al metall té lloc per cinc oxígens de la tetronasina i la sisena posició de coordinació la cobreix una molècula d'aigua [1]. El fet de tenir una posició de coordinació amb molta més mobilitat que la resta d'ionòfors fa que els processos de coordinació amb aquest compost siguin molt ràpids.

D'altra banda, els transitoris observats per canvis en esgló de concentració de Ca^{2+} tenen la típica forma exponencial, amb molt baixa constant de temps, comportament que ja es va mostrar a la Figura 3.8.

Optimització del fons iònic: per a l'aplicació d'aquests sensors selectius d'ió calci en sistemes automatitzats de flux o per analitzar mostres reals va caldre cercar les millors condicions de treball, sobretot pel que fa a la variable del pH.

Es van calibrar els ISE Calci (B), (C), (E), (H) i (I) a 7 pH diferents, de pH 3 a 9. Per als pH 9 i 8 es va utilitzar una solució 5 mM de TRIS com a medi amortidor del pH. Per als pH 7 i 6 el medi amortidor va ser l'imidazole a la mateixa concentració. Per als pHs 5 i 4 va caldre utilitzar l'amortidor de pH àcid cítric/citrat, tot i l'inconvenient d'haver d'ajustar el pH afegint l'hidròxid d'un catió interferent; en tot cas, es va escollir l'hidròxid de liti perquè la interferència del catió liti és la més baixa. Per amortir el pH a 3 es va utilitzar una solució també de concentració 5 mM de l'aminoàcid glicina. Les diferents corbes de calibratge obtingudes per l'ISE Calci (B) es poden observar simultàniament a la Figura 4.9.

Les característiques de la resposta potenciomètrica obtingudes a diferents pH estan resumides a la Figura 4.10. S'observa un màxim de sensibilitat que és el doble del que correspon segons Nernst a pH 5.0 en les membranes que contenen dins la seva formulació additiu aniònic (Calci (B), (H) i (I)).

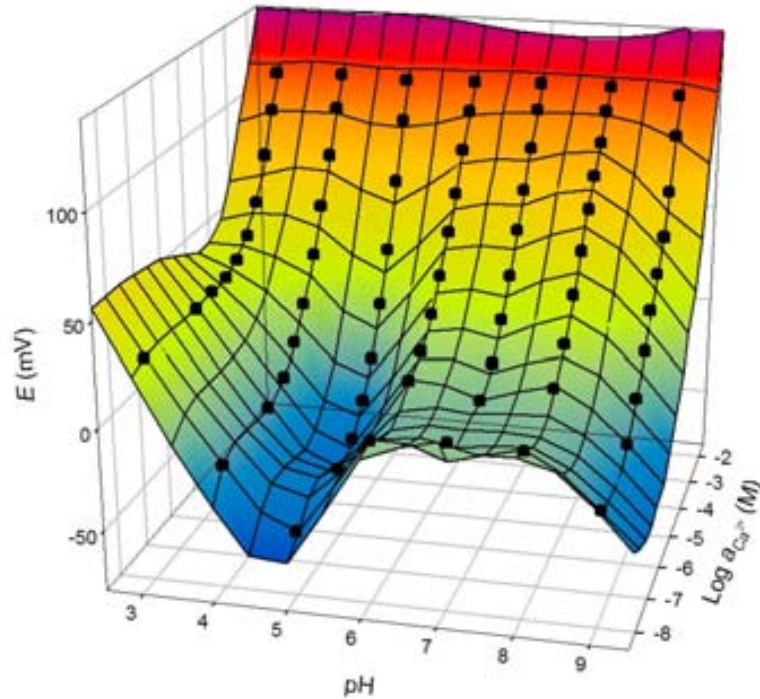


Figura 4.9. Corbes de calibratge de un ISE Calci (B) per a l'ió calci a diferents pH.

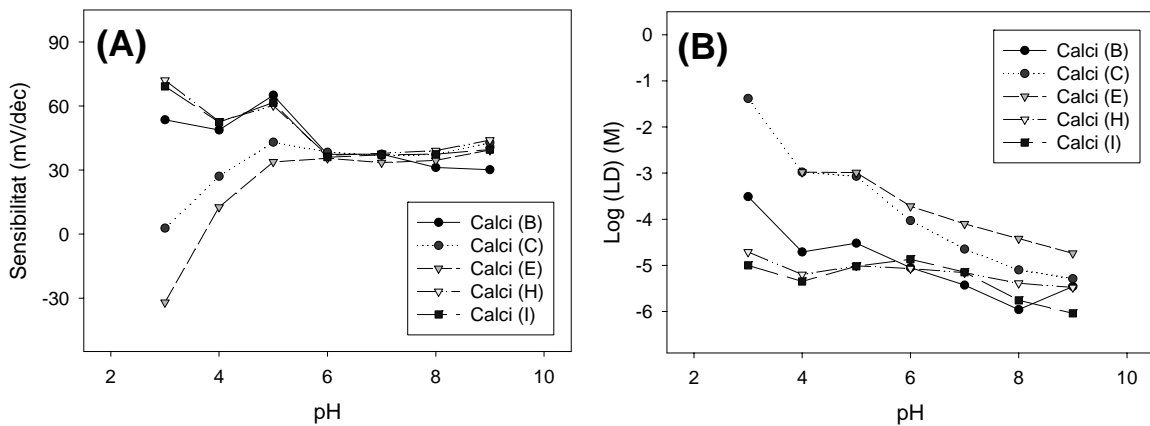


Figura 4.10. Sensibilitat (A) i LD (B) de 5 ISE a diferents pH.

La membrana sense additiu iònic (Calci (C)), així com la que conté l'additiu catiònic (Calci (E)) mostren un comportament semblant davant del pH, amb sensibilitats d'aproximadament 35 mV/déc per a Ca^{2+} per al rang de pH de 5.0 a 9.0 i reduint-se progressivament per sota del pH 5.0.

Així doncs, d'aquest estudi podem dir que els ISE basats en l'ionòfor tetronasina mostren una inusual sensibilitat, que correspon al doble de la teòrica segons la llei de Nernst, a pH 5.0, sempre que la membrana incorpori dins la seva formulació un additiu del tipus aniónic. Tot i que els millors límits de detecció no s'obtenen a pH 5.0, els d'aquest pH són suficients per a l'ús d'aquests ISE en la determinació de calci en moltes mostres naturals.

4.3.2. Model de resposta dels ISE de tetronasina

La cerca d'una explicació a aquest fenomen de sensibilitat supernernstiana poc freqüent en els sensors potenciomètrics selectius d'ions ens va dur a pensar en la possibilitat de l'existència d'algun complex de càrrega +1 amb l'ió Ca^{2+} implicat, com passa en el cas d'alguns sensors potenciomètrics selectius a Pb^{2+} i Hg^{2+} que responen al complex $[\text{MeOH}]^+$, en lloc de respondre a l'ió lliure [14-16].

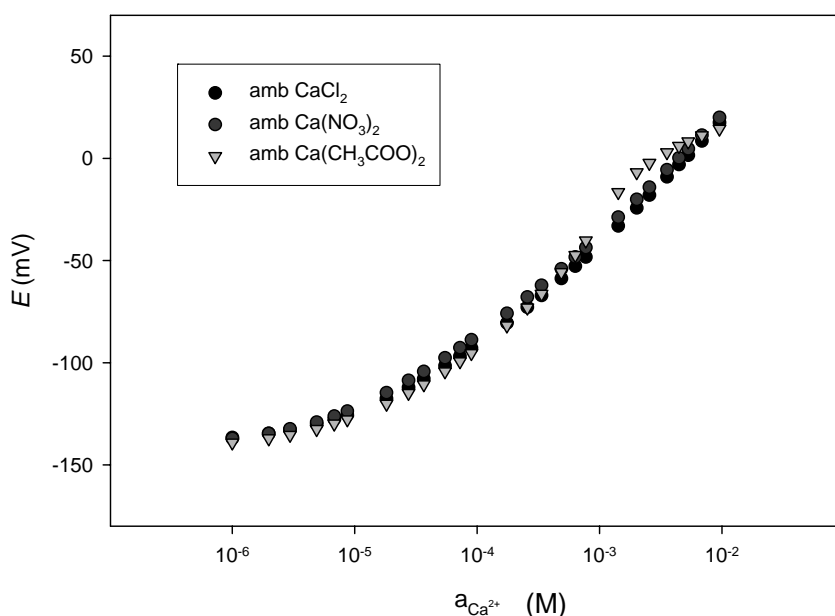


Figura 4.11. Corbes de calibratge d'un ISE Calci (B) realitzats amb diferents sals de calci.

En primer lloc, es va descartar la possibilitat que el responsable de la resposta doble nernstiana fos l'hidroxocomplex de calci $[\text{CaOH}]^+$, ja que aquesta s'observa a pH àcid,

on la formació del complex seria més desfavorable. A continuació, per descartar l'opció que el clorocomplex $[\text{CaCl}]^+$ fos el responsable de la resposta potenciomètrica, es van fer calibratges de calci amb patrons amb sals càlciques d'anions diferents. A la Figura 4.11 es mostren les corbes de calibratges obtingudes per diferents sals de calci; podem observar-hi la superposició gairebé perfecta de les corbes corresponents a les sals de Cl^- i NO_3^- , fet que invalida la hipòtesi de la formació d'un clorocomplex. La desviació observada emprant acetat de calci a concentracions més altes s'atribueix a la variació del pH per part de l'addició d'acetat.

La cerca bibliogràfica d'altres casos d'ISE amb resposta supernernstiana va mostrar una sèrie d'estudis en els quals apareixia aquesta peculiar característica deguda a petits canvis dins la membrana que tenen lloc paral·lelament al reconeixement de l'ió principal. Aquests canvis dins la membrana provoquen una variació en el potencial de membrana que és additiu al propi del reconeixement. Els casos de resposta supernernstiana estudiats es basen en l'aplicació de models teòrics establerts amb la finalitat de quantificar la resposta potenciomètrica i comparar-la amb els casos experimentals.

Actualment, els models teòrics es basen en tres teories que intenten explicar el mecanisme de funcionament dels elèctrodes selectius a ions basats en ionòfors. Segons la primera teoria, la teoria cinètica [17], la resposta s'origina en el transport dels ions a través de la membrana, de manera que la selectivitat ve donada per la diferent mobilitat dels ions dins la membrana. La segona teoria, també anomenada *model del potencial interfacial de fase* [18, 19], afirma que el potencial de membrana apareix en la interfase de la fase aquosa i de la fase orgànica a partir d'equilibris termodinàmics i l'equilibri d'electroneutralitat, assumint que els processos cinètics entre les fases són prou ràpids. Una tercera teoria [8] afirma que només són importants per a la generació del potencial de membrana els processos en la superfície de la membrana, emfatitzant que el potencial interfacial de fase és el resultat de la separació de càrrega a la interfase.

La teoria cinètica és la més acceptada, però el fet de desconèixer les mobilitats dels ions en molts dels casos porta a aplicar l'aproximació que les mobilitats són iguals per a diferents ions, de manera que la teoria cinètica esdevé el model del potencial interfacial de fase. Així doncs, de l'existència d'aquest potencial interfacial de fase resulta la resposta potenciomètrica dels ISE, que segueix la llei de Nernst.

Alguns autors [20], aplicant un model teòric basat en la teoria de potencial interfacial de fase, quantifiquen la resposta d'elèctrodes, i obtenen que en certs casos particulars es poden trobar respostes potenciomètriques que no segueixen la llei de Nernst, amb sensibilitats majors, menors i fins i tot invertides a les teòriques. Els mateixos autors han desenvolupat ISE basats en antibiòtics naturals amb grups àcids [21] (per exemple monensina i lasalocida) amb sensibilitats de 58 mV/dèc per a ions divalents (per exemple Ca^{2+} i Ba^{2+}); això correspon al doble de la sensibilitat teòrica segons la llei de Nernst, per la qual cosa a aquest tipus de fenòmens se'ls coneix com a resposta aparentment doble nernstiana (*Apparently twice-Nernstian Response*, ATNR).

Aquest model quantitatiu prediu que, en el cas de membranes amb ionòfors amb grups àcids i additiu aniònic, la sensibilitat és funció del pH de la solució. En disminuir el pH, la resposta passa de ser nernstiana a ser ATNR, i torna a disminuir a nernstiana un altre cop. El mateix model prediu per aquests ionòfors, si s'empren juntament amb additius catiònics que, a pH alt, la sensibilitat serà nernstiana per a l'ió principal, però que a pH baix hi haurà resposta nernstiana però en aquest cas per a l'ió H^+ .

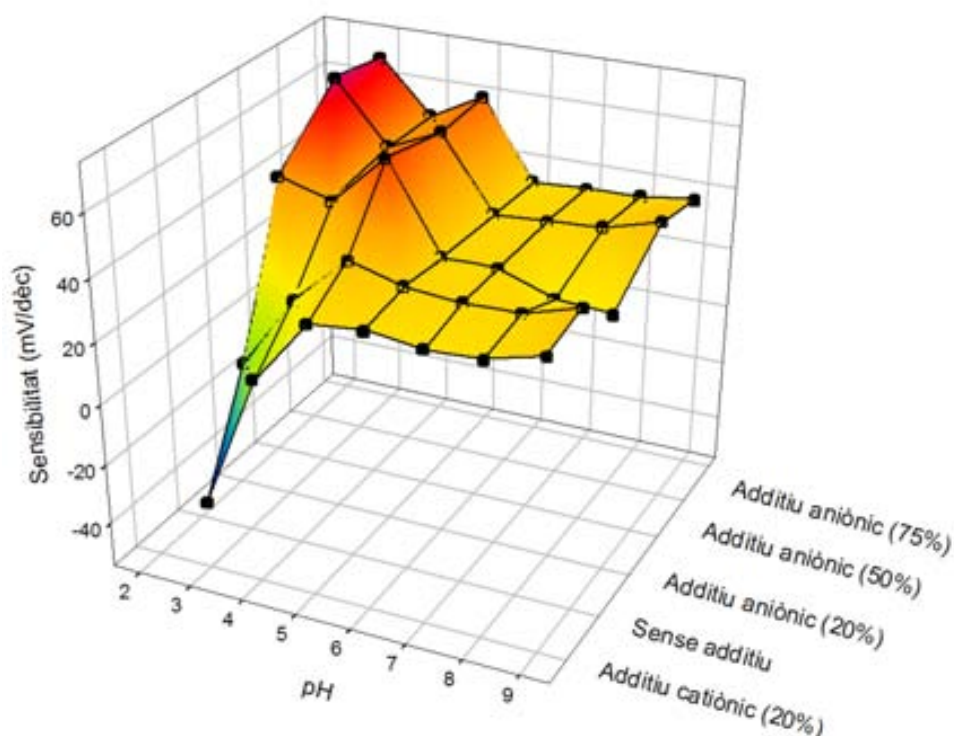


Figura 4.12. Sensibilitat dels ISE basats en l'ionòfor tetronasina a diferents pH i amb diferents continguts d'additius iònics.

Per comprovar si els nostres ISE funcionaven segons aquest mecanisme es va procedir a calibrar els ISE amb ionòfor tetronasina a diferents pH i amb formulacions amb diferents additius, a fi de veure l'efecte del pH i de l'additiu iònic en la sensibilitat de l'elèctrode. A la Figura 4.12 es mostra el resultat d'aquesta experiència, on podem comprovar que, com predeu el model, amb membranes que contenen additiu aniònic la sensibilitat és nernstiana (aproximadament, 35 mV/dèc) a pH bàsic (de 9 a 6) i a pH 5 esdevé ATNR (65 mV/dèc), per tornar a baixar la sensibilitat a pH 4.

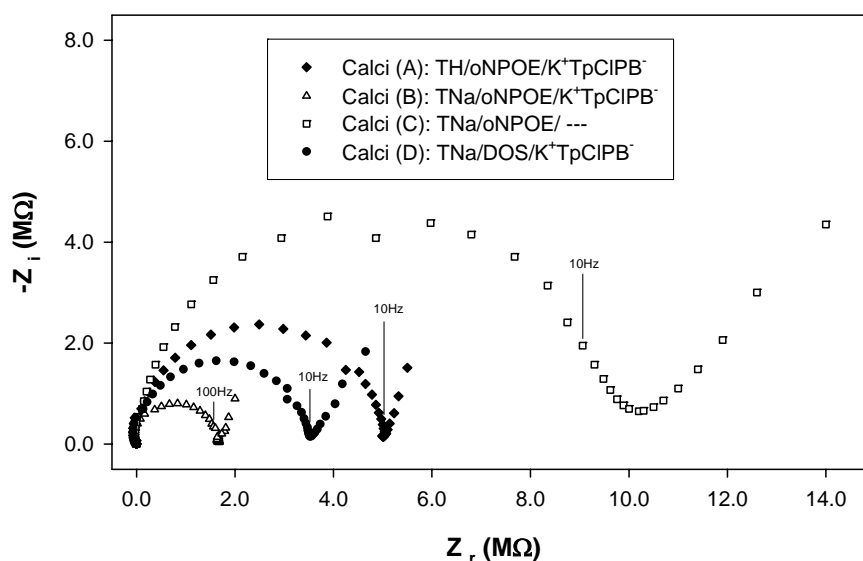
La predicció feta per les membranes amb additiu catiònic també es compleix. Podem observar com a pH alt (de 9 a 5), la resposta és nernstiana per a l'ió calci. No obstant, a pH inferiors, la resposta a l'ió calci és pràcticament nul·la. Si observem el diagrama Reilly d'aquesta membrana a la Figura 4.7 (Calci (E)) trobem el motiu d'aquesta pèrdua de sensibilitat a l'ió calci, ja que de pH 4 a pH 2 la membrana respon preferentment a l'ió H^+ .

4.3.3. Caracterització impedimètrica

Amb la finalitat de confirmar els resultats obtinguts anteriorment es va fer la caracterització de quatre membranes selectives d'ió calci mitjançant la tècnica EEI. Les membranes escollides van ser la Calci (A), per veure l'efecte de l'ionòfor en forma àcida o forma sòdica, la Calci (C), per veure l'efecte de l'additiu aniònic, la Calci (D) amb un diferent plastificant que la resta, per veure l'efecte del plastificant, i finalment la Calci (B) com a punt de referència de les altres tres membranes. El circuit equivalent en tots els casos està format per una resistència que representa la resistència elèctrica de l'electròlit en sèrie amb el conjunt del condensador de la doble capa electroquímica en paral·lel amb la resistència de la transferència de càrrega (R_{bulk}) i la impedància Warburg, i correspon al comportament esperat per un correcte funcionament de la membrana potenciomètrica [22-24]. A la Taula 4.4 es resumeixen les característiques impedimètriques de les membranes estudiades.

Taula 4.4. Característiques impedimètriques de les membranes estudiades

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	R_{bulk} ($M\Omega$)	C_{bulk} (pF)
Calci (A)	TH/oNPOE/ $K^+TpCIPB^-$	4.89	232.7
Calci (B)	TNa/oNPOE/ $K^+TpCIPB^-$	1.72	117.8
Calci (C)	TNa/oNPOE/ ---	9.88	152.8
Calci (D)	TNa/DOS/ $K^+TpCIPB^-$	3.59	99.4

**Figura 4.13. Espectres d'impedància de les quatre membranes en aigua bidestil·lada.**

Les membranes amb millor resposta potenciomètrica haurien de tenir menor resistència R_{bulk} [25]. Per comprovar això, es van realitzar els espectres d'impedància de les quatre membranes acabades de preparar i condicionades en contacte amb aigua bidestil·lada (Figura 4.13). Podem veure l'efecte de l'additiu en la resistència de la membrana, que passa d'una resistència aproximada de 10 $M\Omega$ a menys de 2 $M\Omega$ en afegir l'additiu aniónic. La utilització de l'antibiòtic tetronasina en forma de sal sòdica produeix una reducció d'aproximadament la meitat de la resistència de la membrana respecte de la membrana amb l'ionòfor en forma àcida. La utilització del plastificant DOS o el oNPOE és el factor que menys influeix en la resistència de la membrana, tot i que s'obtenen menors resistències amb el plastificant oNPOE. Com és sabut, aquest plastificant permet obtenir millors respostes per ions divalents que no pas el DOS [11].

La membrana Calci (B) és la que té menor resistència de membrana, fet que concorda amb els resultats vistos anteriorment amb la tècnica potenciomètrica. Els ISE Calci (B) tenien la millor resposta potenciomètrica d'aquestes quatre, amb sensibilitats de 47mV/dèc en aigua i 65 mV/dèc en medi tamponat a pH 5, límits de detecció de l'ordre de 10^{-6} M i la millor selectivitat per al calci.

Estudis realitzats a membranes d'elèctrodes selectius d'ions del mateix tipus basades en antibiòtics ionofòrics [25] mostren una dependència entre les característiques elèctriques de la membrana i el temps de contacte amb una solució. En el nostre cas, per un ISE Calci (B) la variació de la resistència elèctrica de la membrana és menyspreable tant a mesures curtes de temps (de l'ordre de pocs minuts) com a temps més llargs (de l'ordre de dies). Aquest fet ens confirma que el procés previ de condicionament de la membrana de 24 hores ha estat complet.

L'evolució de la resistència de la membrana en variar la concentració de CaCl_2 en la solució en contacte es va fer amb solucions de diferents valors de pH, per veure si es produïen canvis dins la membrana en variar el pH de la solució. La Figura 4.14 mostra l'evolució de la resistència elèctrica oferta per la membrana tipus Calci (B) variant la concentració de CaCl_2 a diferents valors de pH.

Veiem que a tots els pH estudiats s'observa una evolució semblant de la resistència de la membrana enfront de la concentració de CaCl_2 , disminuint la resistència en augmentar la concentració, tot i que a pH 5 aquesta tendència és més acusada. També es pot observar la tendència generalitzada que en disminuir el pH, la resistència de la membrana és menor, tot i que hi ha punts de la sèrie de pH 5 on la concentració de CaCl_2 és força elevada i trenquen aquesta tendència, i s'obtenen resistències més baixes que a pH 3. Sembla, doncs, que a pH 5 es donen condicions especials que provoquen aquests canvis de tendències en la resistència de la membrana, fet que concorda amb les observacions extretes de les mesures potenciomètriques.

Pel que fa a la variació de la capacitat de la membrana amb el pH i la concentració de CaCl_2 , podem dir que no s'observen canvis significatius, ja que aquesta estaria influïda bàsicament per la natura electrostàtica de la membrana, regulada a la seva vegada per la composició d'aquesta, la mateixa per a tota la sèrie d'experiències.

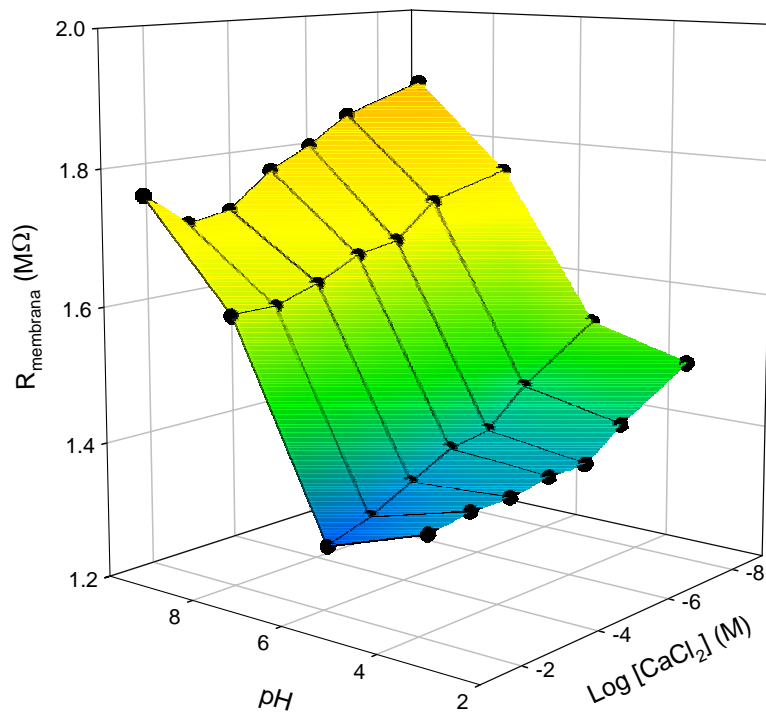


Figura 4.14. Variació de la resistència de la membrana amb el pH i la concentració de clorur de calci.

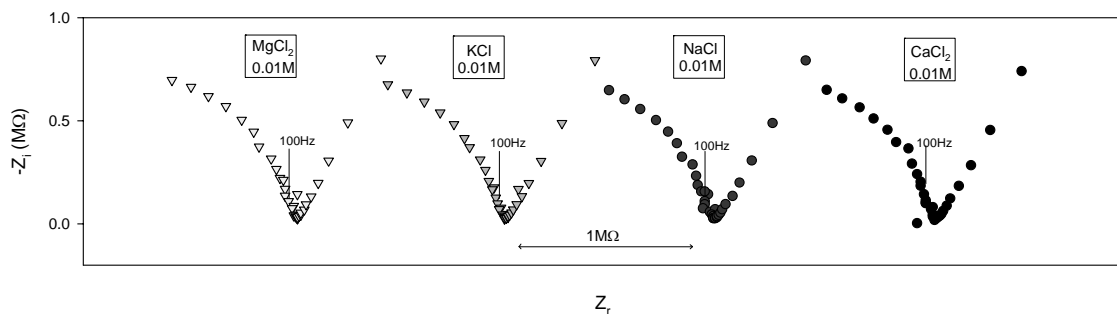


Figura 4.15. Fragments d'espectres d'impedàncies d'una membrana Calci (B) a la zona de freqüències baixes i en contacte amb solucions d'alguns ions interferents.

Una altra experiència realitzada va ser la de registrar espectres d'impedàncies a una membrana Calci (B) en contacte amb diferents solucions d'ions interferents. Els resultats d'aquesta experiència es mostren a la Figura 4.15, on podem veure fragments d'espectres d'impedància a fi de poder observar la zona de freqüències baixes. En aquesta zona es pot observar de vegades l'aparició d'un segon semicercle, característic de processos interfacials lents. Així doncs, la no-presència d'aquesta segona capacitat

confirma els baixos temps de resposta obtinguts i el bon comportament de la membrana, que no es troba impedida ni pel reconeixement de l'ió principal ni tampoc pels ions interferents.

4.4. Construcció d'una LE per determinar cations alcalinoterris

Un cop trobada la composició de la membrana sensora amb l'ionòfor tetronasina que oferia millors característiques es va procedir a incorporar el sensor desenvolupat en un sistema avançat d'anàlisi. El sistema d'anàlisi escollit va ser una LE per determinar simultàniament ions alcalinoterris (calci, magnesi i bari), funcional gràcies a la versatilitat d'un sistema en flux SIA.

Taula 4.5. Coeficients de selectivitat potenciomètrica calculats per la matriu d'ISE tubulars utilitzant com a fons iònic un tampó cítric/citrat 5 mM.

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	Ió principal	Ió interferent	$-LogK_{Ca^{2+},j}^{pot}$
Calci I	ETH1001 / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	1.86 ± 0.17
			Ba ²⁺	2.13 ± 0.25
Calci II	BBTP / DOPP / ---	Ca ²⁺	Mg ²⁺	2.42 ± 0.21
			Ba ²⁺	2.14 ± 0.21
Calci III	TNa / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	2.08 ± 0.15
			Ba ²⁺	0.92 ± 0.08
Genèric I	Monensina / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	0.57 ± 0.09
			Ba ²⁺	0.64 ± 0.12
Genèric II	Lasalocida / DBS / ---	Ca ²⁺	Mg ²⁺	0.52 ± 0.11
			Ba ²⁺	---

La prèvia caracterització de la matriu de sensors (la composició de les quals està especificada a la Taula 3.3) es va dur a terme amb el sistema SIA, que permetia la preparació automatitzada de les mescles d'ions. Això ens va permetre realitzar calibratges multidimensionals a dos ions per calcular els coeficients de selectivitat

potenciomètrica a partir de l'ajust directe de l'equació de Nikoskii-Eisenmann. Els coeficients obtinguts per aquest mètode es troben resumits a la Taula 4.5, on podem veure que hi ha una certa resposta creuada per part de tots els ISE als tres ions que es pretenen determinar.

A partir de mesures de la matriu de sensors per a cada una de les solucions preparades pel sistema SIA (vegeu-ne composicions a la Figura 3.9) es va ajustar el model de resposta mitjançant XNA. La xarxa emprada finalment utilitzava l'algoritme regularització bayesiana per al procés d'entrenament perquè la resta d'algoritmes estudiats presentaven seriosos problemes pràctics, com ara processos d'entrenament excessivament llargs (descens del gradient) o sobreentrenament de la xarxa que provocava una pobra capacitat de predicció (Levenberg-Marquardt).

L'elecció de la millor configuració de la XNA, en concret pel que fa al nombre de neurones en la capa oculta, queda il·lustrat a la Figura 4.16. Podem observar com la millor opció per minimitzar l'RMSE i que presenti un coeficient de correlació més pròxim a la unitat per a tots els ions és la que té tres neurones a la capa oculta. Així doncs, l'arquitectura òptima de la xarxa constava de tres capes de neurones, la capa d'entrada constituïda per cinc neurones (una per a cada ISE), la capa de sortida amb tres neurones (una per a cada analit a determinar) i la capa oculta amb tres neurones. Les funcions de transferència emprades van ser lineals per a les capes d'entrada i sortida, i sigmoïdal (*tansig*) per a la capa oculta.

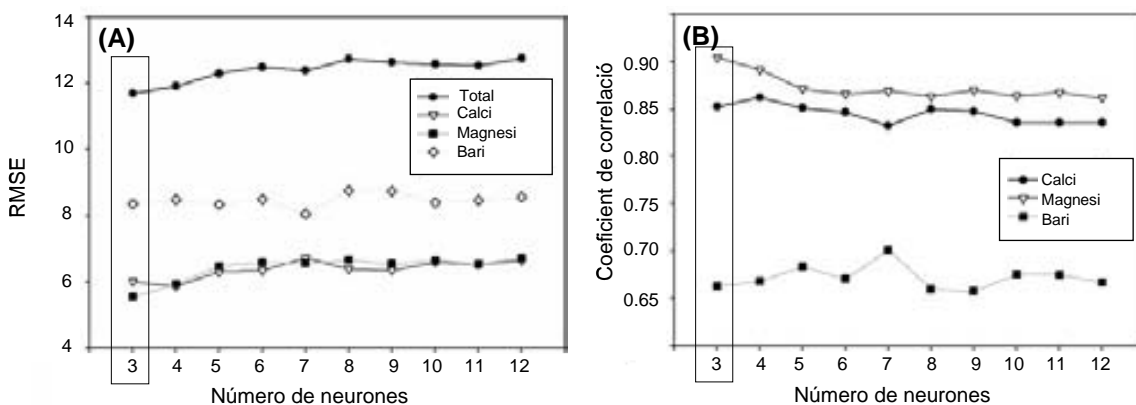


Figura 4.16. Elecció del nombre de neurones òptim de la XNA.

La modelització correcta de la xarxa es va avaluar mitjançant el subconjunt de mostres de validació externa. Les concentracions obtingudes per a cada un dels ions estudiats es

comparen amb les concentracions esperades a la Figura 4.17, i les regressions corresponents es mostren a la Taula 4.6. Podem observar una correcta predicció de les concentracions dels ions calci i magnesi, amb pendent i ordenada properes a la unitat i a zero, respectivament. Les correlacions obtingudes també són prou bones, tot i que per al cas de l'ió bari només és possible una determinació semiquantitativa.

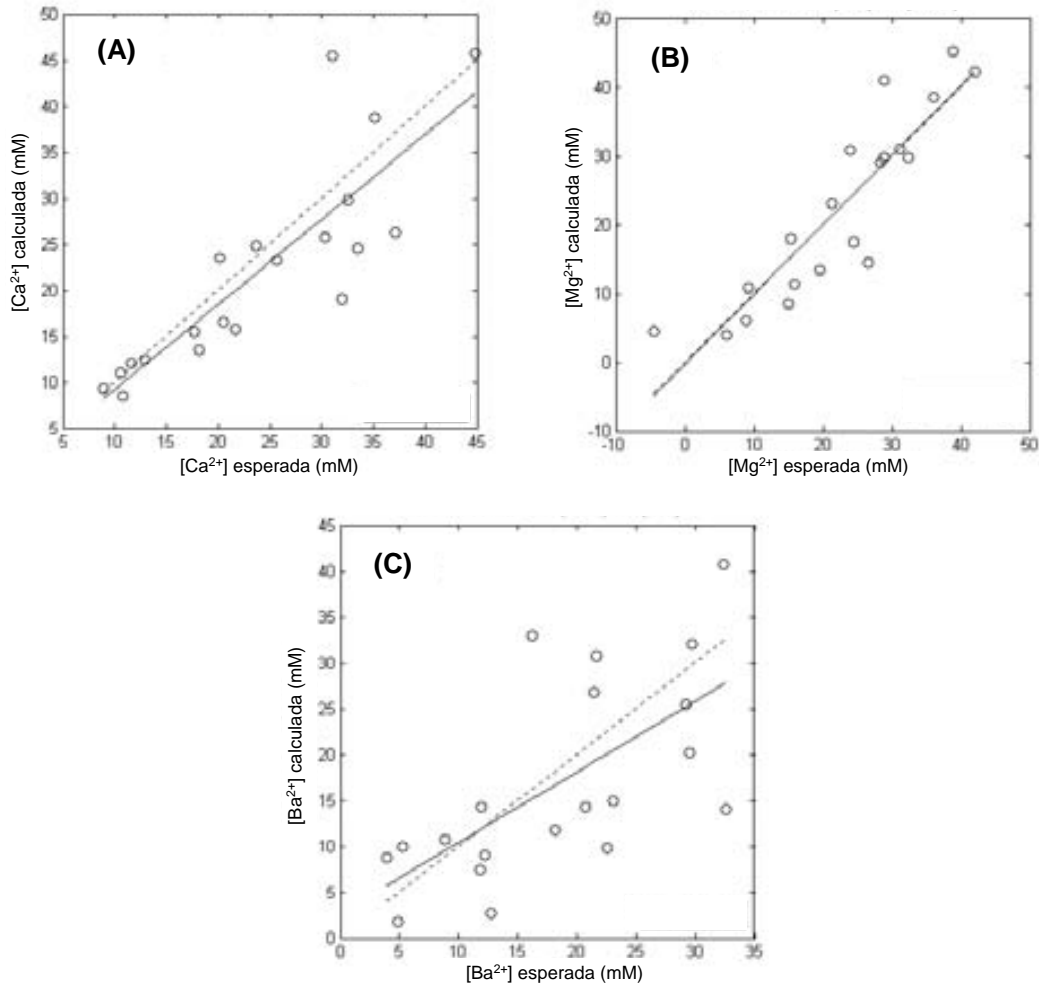


Figura 4.17. Gràfics de comparació entre les concentracions calculades i les esperades de calci (A), magnesi (B) i bari (C) per al conjunt de validació externa.

Un cop demostrada la capacitat predictiva de l'LE construïda, es va aplicar a mostres sintètiques que contenen els tres ions estudiats. Es van obtenir bons resultats per a tres mostres en la determinació de calci i magnesi simultàniament, tot i que només en un cas es va determinar correctament l'ió bari.



Figura 4.18. Fotografia de les mostres d'aigua analitzades.

Finalment, es va aplicar l'LE a la determinació de calci i magnesi a mostres reals. Difícilment les mostres naturals poden contenir alcalinoterris rars com l'estronci o el bari, així que es va aplicar només a la determinació de calci i magnesi en mostres d'aigües minerals. Les concentracions obtingudes (representades a la Figura 4.19) es van comparar amb les obtingudes per mètodes estàndards d'anàlisi de metalls, com l'espectroscòpia d'absorció atòmica. Podem observar a la figura que les línies de regressió (contínues) són pràcticament superposades amb les ideals (discontínues) cosa que demostra el bon comportament de l'LE desenvolupada per a la determinació d'ions calci i magnesi en mostres d'aigües minerals.

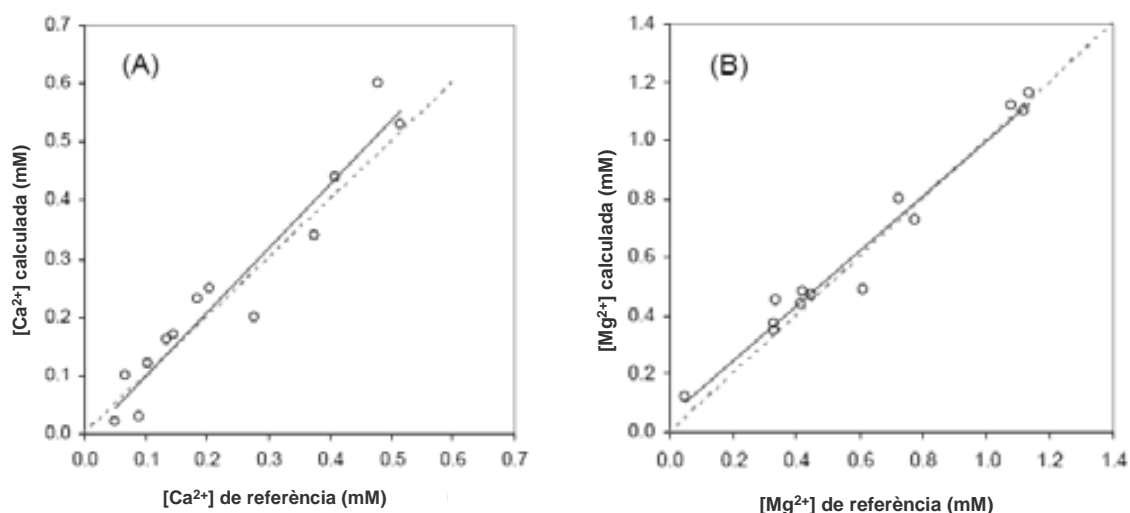


Figura 4.19. Comparació entre les concentracions obtingudes per l'LE i per mètodes de referència de calci (A) i magnesi (B) per a les mostres d'aigua mineral.

Taula 4.6. Regressions de comparació per als diferents conjunts de mostres.

Mostres d'entrenament ($n = 39$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.960	0.92 ± 0.19	1.89 ± 0.04
Mg ²⁺	0.904	0.79 ± 0.28	4.60 ± 0.06
Ba ²⁺	0.905	0.81 ± 0.23	3.88 ± 0.07
Mostres de test ($n = 20$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.854	0.92 ± 0.19	-0.04 ± 0.05
Mg ²⁺	0.898	1.01 ± 0.24	0.25 ± 0.28
Ba ²⁺	0.658	0.77 ± 0.32	2.68 ± 2.14
Mostres reals ($n = 13$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.930	1.09 ± 0.20	0.01 ± 0.06
Mg ²⁺	0.972	0.94 ± 0.11	0.06 ± 0.07

Intervals de confiança calculats amb el 95 % del nivell de confiança.

4.5. Construcció d'una LE emprant senyals transitoris

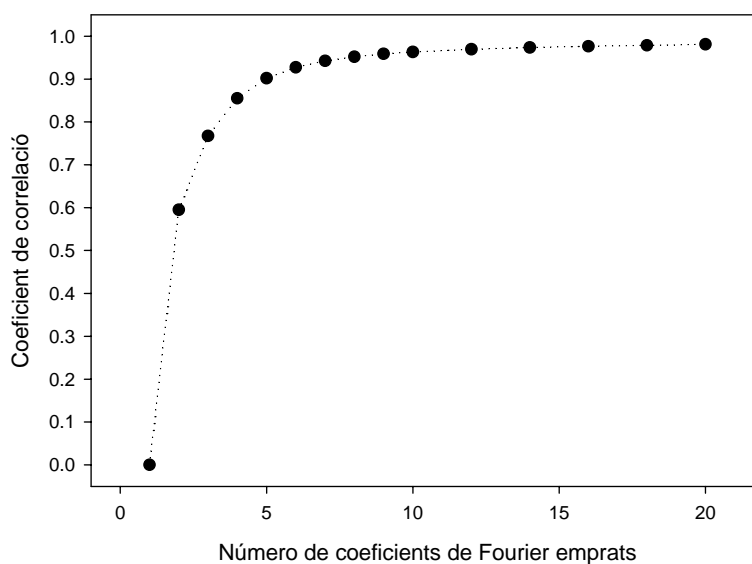
L'aplicació següent tenia com a propòsit emprar, com a informació de partida en llengües electròniques, senyals més complexos i, per tant, senyals que podien contenir més informació que els potencials dels ISE a l'estat d'equilibri. Amb aquesta intenció es va emprar un sistema SIA controlat per un instrument virtual [26] capaç de preparar el conjunt de mostres per construir l'LE i de registrar el senyal transitori corresponent a un pols de mostra.

La caracterització prèvia dels ISE es troba resumida a la Taula 4.7, on podem observar una breu descripció de les membranes i les sensibilitats observades de cada sensor respecte als tres ions estudiats. Cal destacar que s'observa una resposta creuada per la gran part dels ISEs, ja que tots responen als tres ions excepte l'ISE Potassi amb el qual no s'observa cap tipus de resposta per l'ió calci. Així doncs, es demostra l'existència de la necessària resposta creuada per part de la matriu de sensors per construir una llengua electrònica [27].

Taula 4.7. Descripció i caracterització de la matriu de sensors.

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	Sensibilitat (mV/dèc)		
		per Ca ²⁺	per Na ⁺	per K ⁺
Calci (1)	TNa / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	39.83	17.95	18.11
Calci (2)	ETH1001 / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	40.21	12.01	3.43
Sodi	BCMDM / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	17.81	54.34	41.07
Potassi	Valinomicina / DOS / K ⁺ TpCIPB ⁻	---	21.28	32.35
Genèric	DBC / DOS / ---	15.06	9.66	13.63

La resposta dinàmica dels sensors potenciomètrics depèn de diversos factors, incloent-hi la mateixa naturalesa del sensor i també de les particulars condicions de treball: se sap que la velocitat de resposta és més lenta a concentracions d'ió principal baixa i més ràpides amb concentracions altes; també que el perfil de resposta pot ser diferent si l'ió principal està en presència de interferents o no [28]; a més, hi ha precedents similars al cas anteriorment vist dels sensors basats en tetronasina, que canvien la típica forma exponencial de la resposta dinàmica per altres tipus de perfils quan està en contacte amb un ió interferent [10].

**Figura 4.20. Grau de reconstrucció d'un senyal transitori segons el nombre de coeficients de Fourier emprats.**

Els registres de potencial obtinguts per mostra ens proporcionaven una gran quantitat d'informació; es registraven 256 potencials per cinc ISE tubulars, de manera que la

informació total per mostra era de 1280 valors de potencial. Una XNA amb tantes neurones a la capa d'entrada resulta impossible d'entrenar, així que es va proposar compactar la informació per poder generar un model de resposta. La compactació es va fer mitjançant la descomposició dels senyals transitoris en els seus coeficients de Fourier. Arbitràriament, es va escollir un coeficient de correlació de 0.9 entre el senyal original i el senyal reconstruït amb un nombre reduït de coeficients de Fourier com el grau de compactació suficient del senyal. A la Figura 4.20 es mostra com evoluciona aquesta mesura de reconstrucció en funció dels coeficients emprats.

Així doncs, el senyal transitori es va compactar amb sis coeficients de Fourier. Els mòduls corresponents a aquests coeficients van ser les entrades a la xarxa neuronal, per tant, la informació total d'entrada a l'XNA es va reduir de 1280 a 30 dades per mostra (6 coeficients per 5 ISEs).

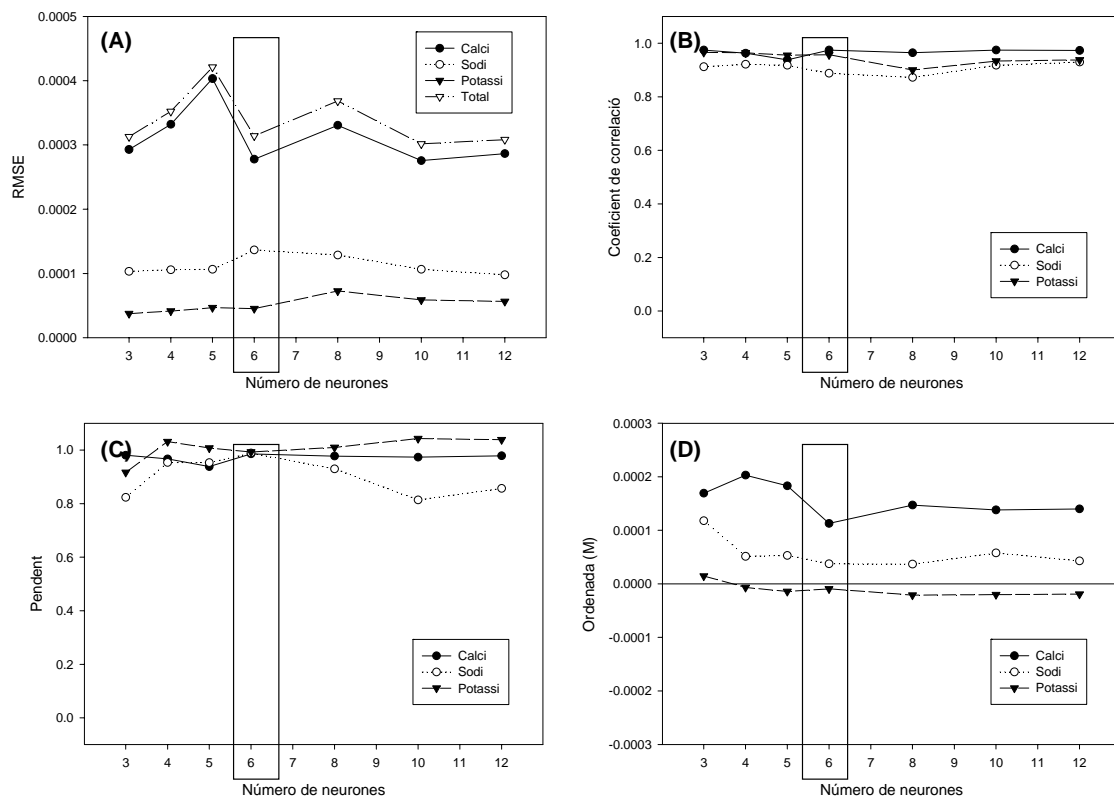


Figura 4.21. Elecció del nombre de neurones òptim de la capa oculta.

L'elecció del millor nombre de neurones en la capa oculta queda il·lustrat a la Figura 4.21. Podem observar com la millor opció és emprar 6 neurones a la capa oculta, amb la

qual cosa s'obté la millor combinació de mínims d'RMSE, correlació i pendent propers a la unitat i ordenada igual a zero.

El model de resposta de l'LE proposada va emprar una XNA entrenada amb l'algorisme regularització bayesiana i utilitzava una estructura optimitzada de 30 neurones a la capa d'entrada, sis neurones a la capa oculta i tres neurones a la capa de sortida (una per cada analit: calci, sodi i potassi). Les funcions de transferència amb les quals es van obtenir millors resultats van ser la *purelin* per a la capa d'entrada i la *tansig* per a les capes oculta i de sortida.

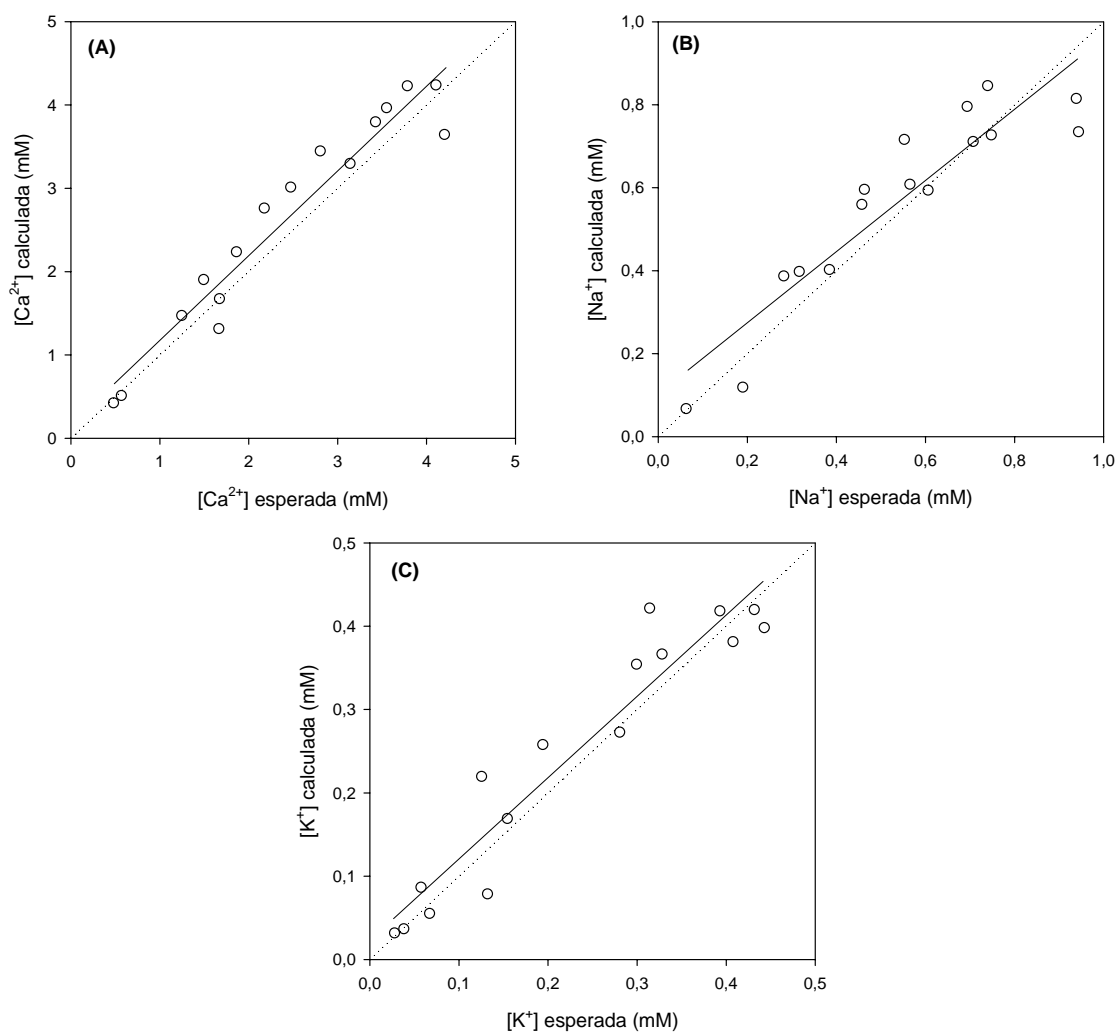


Figura 4.22. Resultats obtinguts en la determinació de calci (A), sodi (B) i potassi (C) per al conjunt de mostres de validació externa.

La correcta modelització de la xarxa queda palesa en observar els resultats obtinguts per al conjunt de mostres de validació externa (Figura 4.22) o en les corresponents

regressions (Taula 4.8). Per a tots tres ions estudiats observem bones correlacions entre les concentracions calculades per a l'LE i les esperades, així com pendents i ordenades de regressió prou properes als valors ideals.

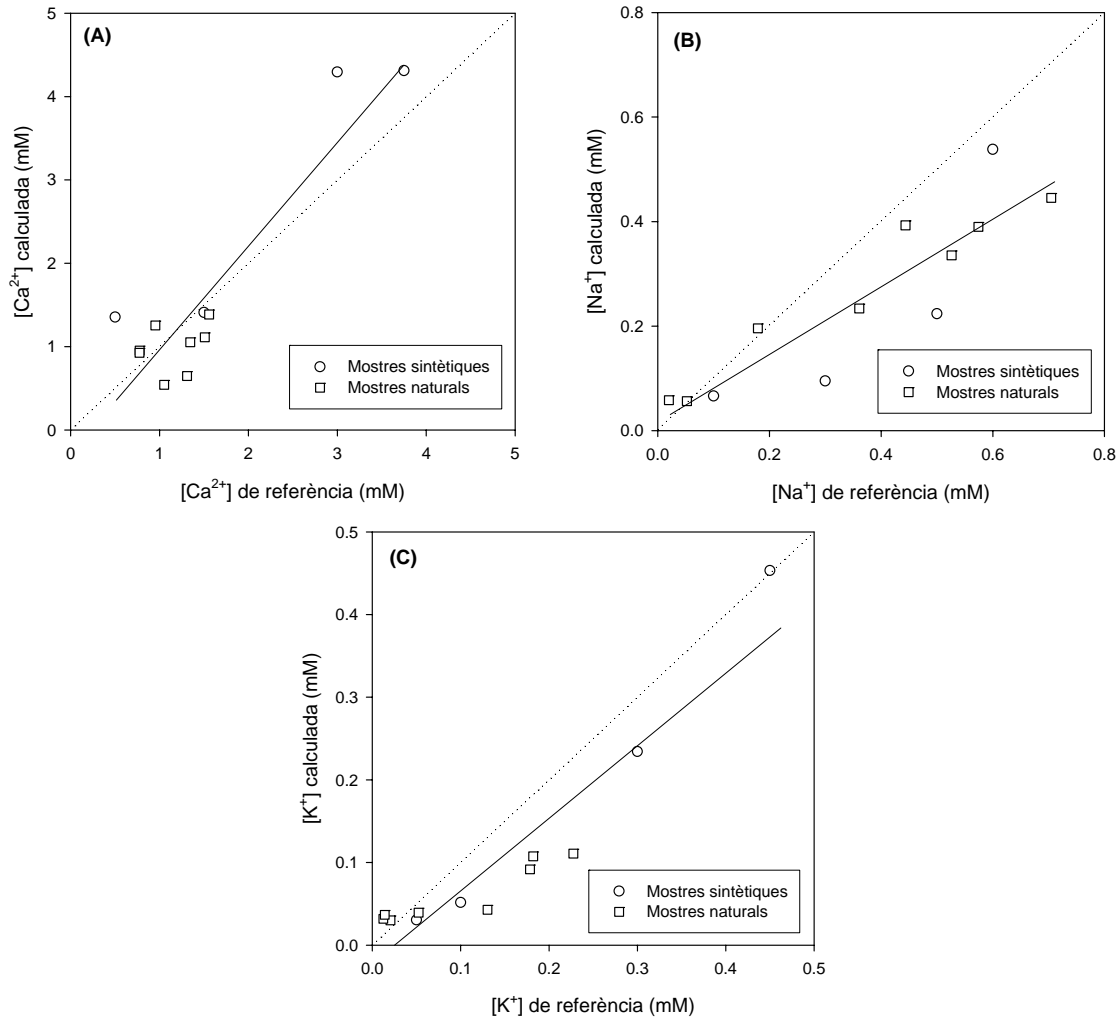


Figura 4.23. Resultats obtinguts en la determinació de calci (A), sodi (B) i potassi (C) per al conjunt de mostres reals.

L'aplicabilitat d'aquesta LE es va posar a prova analitzant mostres reals, en aquest cas amb quatre mostres sintètiques i vuit mostres d'aigua natural analitzades amb els mètodes instrumentals de referència (espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament, ICP-OES). Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4.23 i les regressions de comparació corresponents a la Taula 4.8. Es van obtenir bones correlacions entre mètodes per a tots tres ions determinats, i bons pendents i ordenades per a la determinació de calci i potassi, mentre que la determinació de sodi només es

podia dur a terme semiquantitativament, ja que el pendent obtingut era sensiblement inferior a l'ideal.

Taula 4.8. Regressions de comparació dels resultats obtinguts per l'LE proposada per als diferents conjunts de mostres.

Mostres d'entrenament ($n = 48$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.996	1.020 ± 0.037	-0.04 ± 0.09
Na ⁺	0.998	1.032 ± 0.048	-0.01 ± 0.06
K ⁺	0.996	1.011 ± 0.042	-0.003 ± 0.005
Mostres de test ($n = 16$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.965	1.026 ± 0.160	0.1 ± 0.4
Na ⁺	0.919	0.852 ± 0.209	0.1 ± 0.1
K ⁺	0.953	0.976 ± 0.178	0.02 ± 0.05
Mostres reals ($n = 12$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.909	1.236 ± 0.399	-0.3 ± 0.7
Na ⁺	0.897	0.644 ± 0.223	0.2 ± 0.1
K ⁺	0.934	0.870 ± 0.235	-0.02 ± 0.05

Intervals de confiança calculats amb el 95% de nivell de confiança

Amb la finalitat de veure les millores que aquest tipus d'LE proporcionava respecte a una LE clàssica com la presentada en la secció 4.4, basada en senyals estacionaris, es va construir la corresponent LE clàssica utilitzant els potencials finals dels cinc ISE emprats. Els resultats obtinguts per aquesta LE, mostrats a la Taula 4.9 per al conjunt de mostres de test, van demostrar que la resposta dinàmica dels sensors proporcionen informació extra capaç de discriminar millor la composició d'una mostra.

També es van construir una LE emprant les mateixes dades (els 30 mòduls per mostra) i realitzant el model de resposta amb una altra eina quimiomètrica, el PLS. Aquesta LE alternativa va donar pitjors resultats, com es pot observar en el resum de les regressions obtingudes per al conjunt de mostres de test de la Taula 4.10. Aquest fet es pot atribuir al fet que les XNA modelitzen millor els sistemes poc lineals [29] com els sensors potenciomètrics.

Taula 4.9. Regressions de comparació dels resultats obtinguts per l'LE clàssica.

Mostres de test ($n=16$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.967	0.937 ± 0.136	0.1 ± 0.4
Na ⁺	0.925	0.970 ± 0.219	0.0 ± 0.1
K ⁺	0.977	0.941 ± 0.114	0.02 ± 0.03
Mostres reals ($n=12$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.907	1.192 ± 0.304	-0.4 ± 0.6
Na ⁺	0.265	0.298 ± 0.490	0.1 ± 0.2
K ⁺	0.909	0.750 ± 0.228	0.02 ± 0.04

Intervals de confiança calculats amb el 95 % de nivell de confiança

Taula 4.10. Regressions de comparació dels resultats obtinguts per l'LE construïda amb PLS.

Mostres de test ($n=16$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.9428	0.851 ± 0.166	0.3 ± 0.4
Na ⁺	0.8908	0.880 ± 0.246	0.1 ± 0.1
K ⁺	0.9303	0.727 ± 0.158	0.07 ± 0.04
Mostres reals ($n=12$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.8403	1.194 ± 0.508	-0.6 ± 0.9
Na ⁺	0.9438	1.379 ± 0.323	-0.4 ± 0.1
K ⁺	0.9181	0.918 ± 0.276	0.06 ± 0.05

Intervals de confiança calculats amb el 95 % de nivell de confiança

4.6. Valoració multicomponent de mescles binàries de calci i magnesi emprant una LE potenciomètrica

A continuació es va proposar usar una LE com a element indicador en sistemes de valoració automàtics. Es pretén millorar les prestacions de la tècnica de valoració gràcies la multideterminació fàcilment abordable per les matrius de sensors i el processament matemàtic.

Taula 4.11. Descripció i caracterització de la matriu de sensors emprada.

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	Sensibilitat (mV/dèc)	
		per Ca ²⁺	per Mg ²⁺
Calci (I)	TNa / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	33.8	4.60
Calci (II)	ETH1001 / oNPOE / K ⁺ TpCIPB ⁻	29.9	28.9
Calci (III)	BBTP / DOPP / ---	30.6	8.03
Bari	Monensin / DBS / ---	11.3	5.85
Estronci	TBCOO / TBP / Na ⁺ TFPB ⁻	30.0	22.5
Genèric (I)	Lasalocida / DBS / ---	23.7	4.30
Genèric (II)	DCHC / DOS / ---	21.0	---
Genèric (III)	DBC / DOS / ---	6.30	---

Es van construir vuit ISE en disposició convencional (vegeu la descripció de les membranes selectives a la Taula 4.11) i se'n va caracteritzar la resposta enfront de calci i magnesi, demostrant així la necessària resposta creuada per part de la matriu de sensors per construir una llengua electrònica [27].

Podem veure a la Figura 4.24 com la multideterminació mitjançant una valoració complexomètrica de mescles calci+magnesi amb un sol indicador potenciomètric resulta visualment impossible. Gràcies a la informació creuada proporcionada per una matriu d'ISE i a un processament amb XNA, es va poder obtenir informació multianalític de mostres aquoses, fins i tot simplificant les corbes de valoració a només 6 punts (corresponents al de les lectures inicials i les posteriors a cinc addicions de l'agent valorant EDTA).

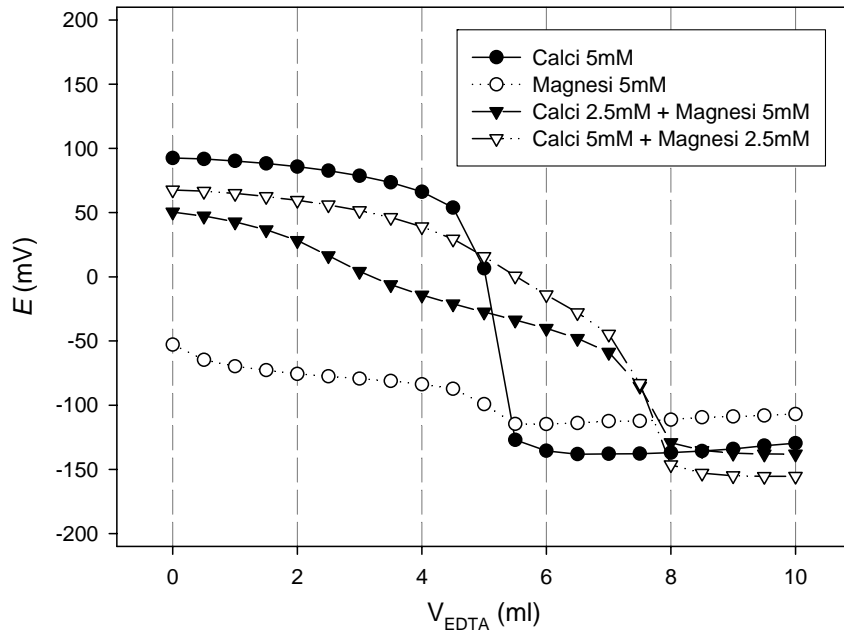


Figura 4.24. Corbes de valoració de diferents mescles de calci i magnesi emprant l'ISE Calci (I) com indicador potenciomètric (les línies discontinues indiquen els volums finalment emprats en la construcció de la LE).

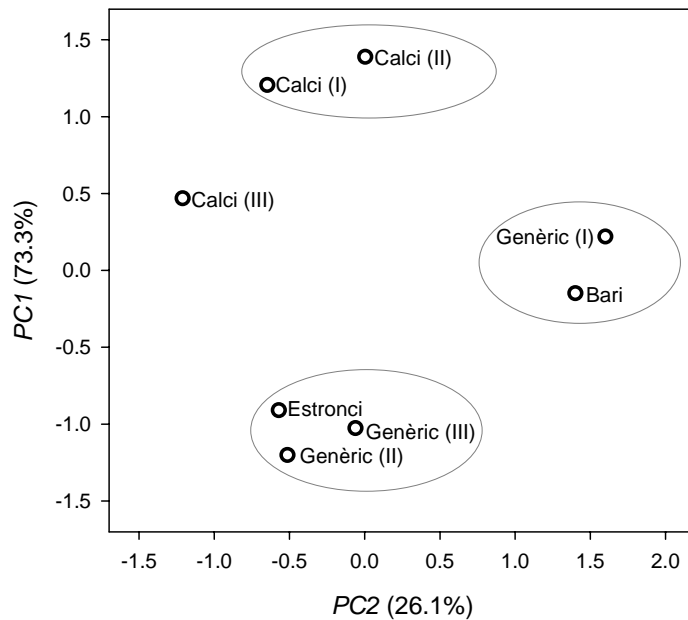


Figura 4.25. Anàlisi de components principals realitzat per simplificar l'LE.

Amb la finalitat de minimitzar els temps d'anàlisi i el nombre d'entrades a processar per l'XNA es va reduir el nombre d'ISE gràcies a un PCA (Figura 4.25). Aquesta anàlisi

aplicada a les dades proporcionades per a la valoració “Calci 2.5 mM + Magnesi 5 mM” de la Figura 4.24 va donar com a resultat que els ISE proposats inicialment s’agrupaven en quatre comportaments majoritaris. Es va escollir un ISE de cadascun d’aquests quatre comportaments per construir la matriu de sensors (els ISE escollits van ser el Calci (I), Calci (III), Bari i Estronci).

Gràcies a la informació proporcionada de les valoracions del conjunt de mostres d’entrenament es va procedir a l’optimització dels paràmetres de l’XNA mitjançant l’entrenament per l’algoritme de RB. L’arquitectura òptima de la xarxa emprava 24 neurones a la capa d’entrada (6 lectures de potencial x 4 ISE), 2 neurones a la capa de sortida (una per cada analit) i 12 neurones a la capa oculta corresponents al millor balanç entre el mínim RMSE, màxima correlació, pendent proper a la unitat i ordenada a zero dels resultats del conjunt de mostres de validació externa (Figura 4.26). Les funcions de transferència òptimes van ser la *tansig* per a la capa oculta i la *purelin* per a la capa de sortida.

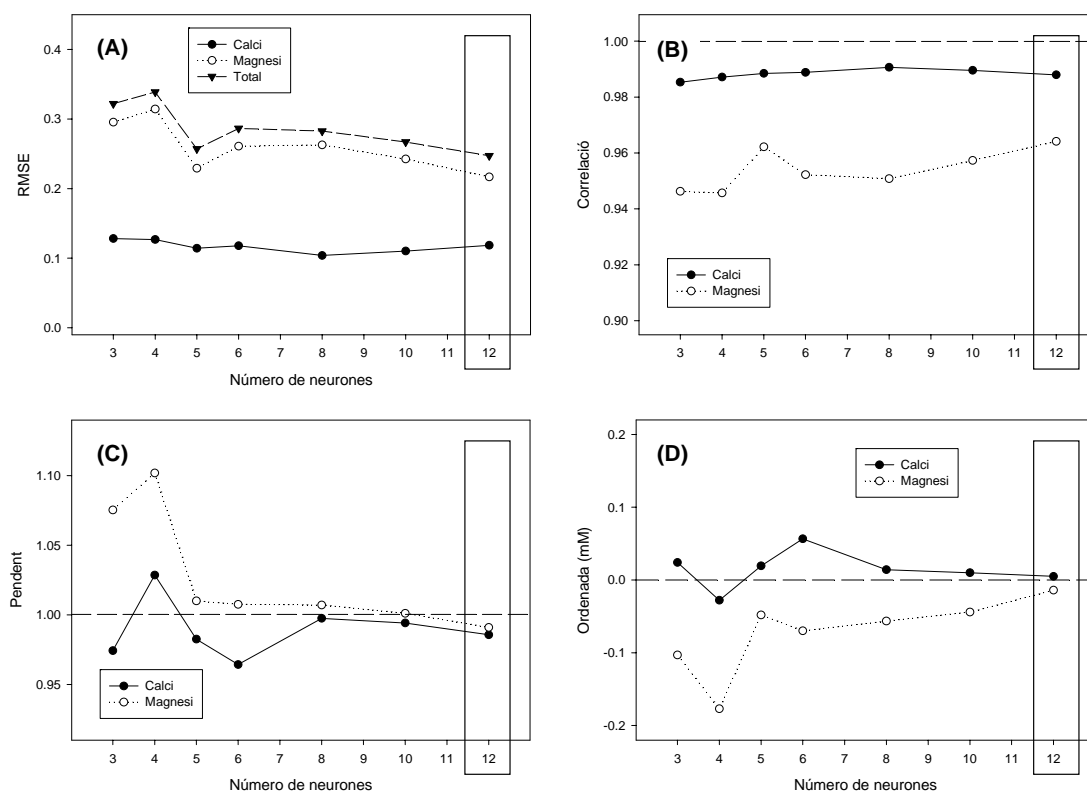


Figura 4.26. Elecció del nombre òptim de neurones a la capa oculta, emprant les funcions de transferència *tansig* i *purelin* per a les capes oculta i de sortida.

Els resultats obtinguts per les 16 mostres de validació externa estan representats a la Figura 4.27 i les regressions corresponents a la Taula 4.12. Podem observar com les correlacions entre les concentracions calculades i les esperades són força bones per a tots dos ions amb valors superiors a 0.94. Els valors del pendent i l'ordenada de les regressions de comparació també són satisfactoris.

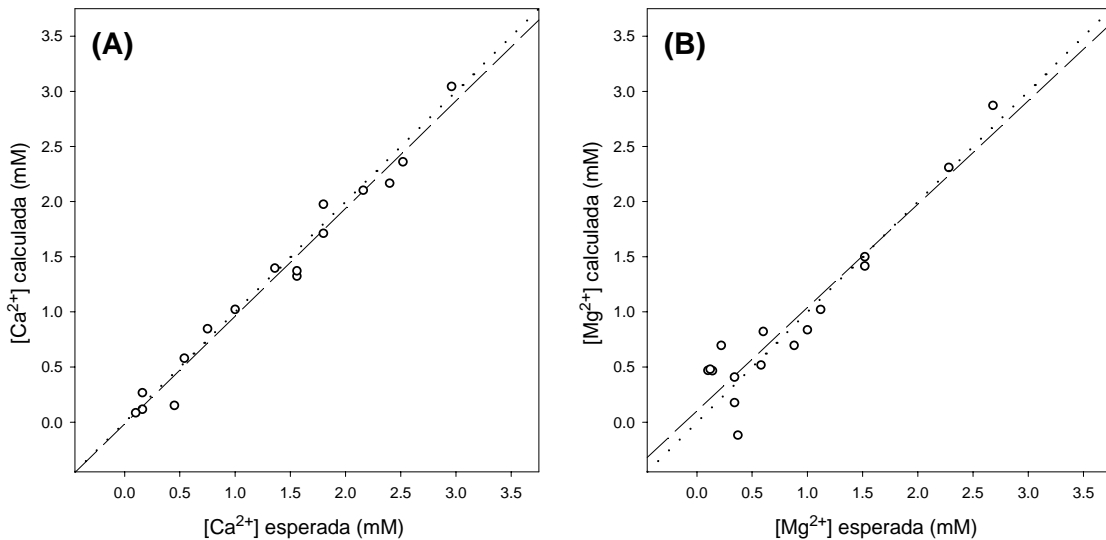


Figura 4.27. Gràfics de comparació entre les concentracions calculades i les esperades de calci (A) i magnesi (B) per al conjunt de mostres de validació externa.

Un cop trobades les millors condicions del sistema proposat es va voler determinar alguns paràmetres d'interès analític com ara l'LD i la precisió del mètode. Els LD calculats en absència d'interferents van ser de $0.161 \cdot 10^{-3}$ i $0.263 \cdot 10^{-3}$ M per al calci i el magnesi, respectivament. La precisió obtinguda, estimada com la repetitivitat, va ser de 3.20 i 2.76 % per al calci i el magnesi, respectivament.

Amb la finalitat de validar les millores obtingudes pel sistema d'anàlisi proposat, es van construir tres variants de sistemes d'anàlisi emprant les mateixes dades. La primera de les alternatives va ser la construir una LE tipus la de la secció 4.4, emprant només els potencials de la matriu de sensors abans d'afegir-hi l'agent valorant; els resultats obtinguts van ser més dolents, sobretot en quant a la determinació de magnesi, i es va obtenir una correlació per a les mostres de validació externa de 0.24, fet que indica que aquesta LE és incapaç de determinar magnesi correctament.

La segona variant assajada va ser la d'emprar només la informació corresponent a un únic ISE. Aquesta opció permetia la multideterminació dels dos analits en el conjunt de validació externa, però presentava un empitjorament notable en els pendents i les ordenades de comparació de mètodes i també en l'LD i en la precisió per l'ió magnesi. L'última proposta assajada emprava la mateixa matriu de dades, però l'ajust del model de resposta es realitzava amb una altra eina quimiomètrica, el PLS. Aquest nou model de resposta va resultar tenir poca habilitat de predicció per a la determinació de l'ió magnesi, i es van obtenir regressions de comparació amb pendent per sota de 0.62.

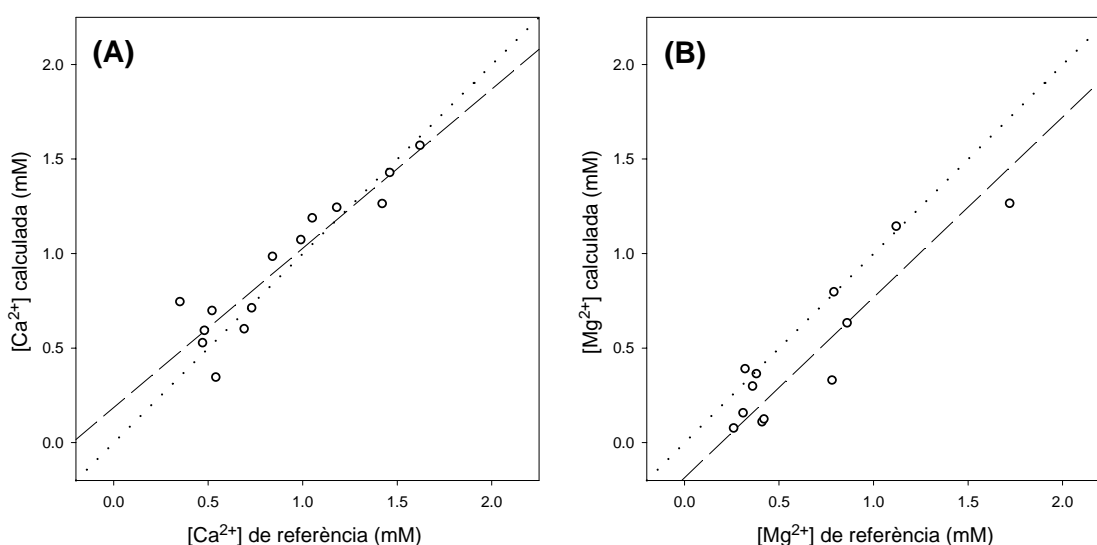


Figura 4.28. Gràfics de comparació entre les concentracions calculades i les de referència de calci (A) i magnesi (B) per al conjunt de mostres reals.

Finalment, el sistema d'anàlisi proposat es va aplicar a mostres reals per la multideterminació de calci i magnesi. Les mostres naturals escollides van ser aigües minerals comercials que es van analitzar amb mètodes de referència (ICP-OES) per tal de comparar els resultats. Els resultats de l'anàlisi realitzada a aquestes mostres mitjançant el sistema proposat es pot observar a la Figura 4.28 i les regressions de comparació, a la Taula 4.12. Es van obtenir bons resultats per a aquest conjunt de mostres reals, amb bons coeficients de correlació (superiors a 0.9) i amb paràmetres de la regressió força semblants als ideals.

Taula 4.12. Resum de les regressions de comparació dels resultats obtinguts pels diferents conjunts de mostres.

Mostres d'entrenament ($n = 34$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.99997	0.999 ± 0.003	0.001 ± 0.004
Mg ²⁺	0.99998	1.000 ± 0.002	0.001 ± 0.003
Mostres de test ($n = 16$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.9872	0.977 ± 0.087	-0.018 ± 0.139
Mg ²⁺	0.9411	0.937 ± 0.186	0.103 ± 0.214
Mostres reals ($n = 14$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.9243	0.843 ± 0.209	0.186 ± 0.202
Mg ²⁺	0.8901	0.954 ± 0.292	-0.184 ± 0.209

Intervals de confiança calculats amb el 95 % de nivell de confiança.

4.7. Valoració simultània de mesclures ternàries d'ions alcalinoterris emprant una LE potenciomètrica

Un cop demostrat que es podia emprar una LE per la multideterminació d'espècies en valoracions complexomètriques [6], es va proposar aplicar el mateix concepte a resoldre sistemes més complexos. L'aplicació proposada va ser la de determinar de manera simultània tres ions alcalinoterris mitjançant una valoració amb EDTA i detecció amb una LE. Els analits escollits van ser calci, magnesi i estronci.

Emprant la clàssica detecció potenciomètrica amb un ISE tan sols es pot determinar amb facilitat la concentració total d'espècies valorables, com es pot observar a la Figura 4.29. Per aquesta raó es construeix una matriu de sensors potenciomètrics amb resposta creuada als tres ions a determinar (vegeu les composicions de les membranes selectives a la Taula 3.6). Els vuit ISE construïts són del tipus convencional i van ser caracteritzats respecte de la resposta als ions calci, magnesi i estronci (Taula 4.13).

Taula 4.13. Descripció i caracterització de la matriu de sensors.

ISE	Membrana ionòfor/plastificant/additiu	Sensibilitat (mV/dèc)		
		per Ca^{2+}	per Mg^{2+}	per Sr^{2+}
Calci (I)	TNa / oNPOE / $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	37.64	---	29.39
Calci (II)	ETH1001 / oNPOE / $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	28.28	---	21.33
Calci (III)	BBTP / DOPP / ---	29.18	4.51	22.21
Magnesi	ETH4030 / oNPOE / $\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$	22.86	29.91	30.42
Estronci	TBCOO / TBP / Na^+TFPB^-	39.47	26.63	28.67
Bari	Monensin / DBS / ---	9.71	7.35	16.09
Genèric (I)	DBC / DOS / ---	10.84	---	11.03
Genèric (II)	Lasalocida / DBS / ---	25.98	9.62	30.62

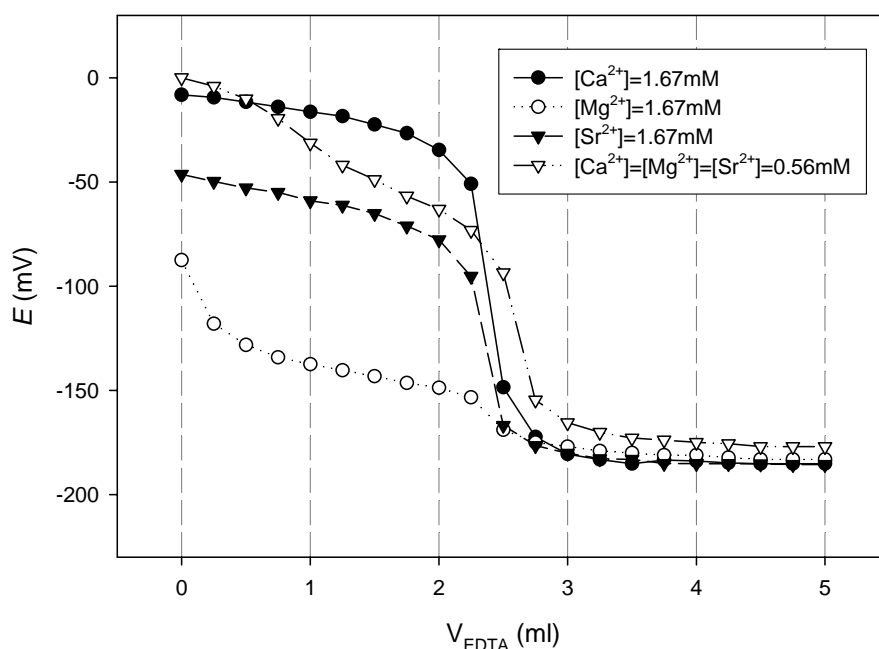


Figura 4.29. Corbes de valoració de diferents solucions de calci, magnesi i estronci emprant l'ISE Calci (II) com a indicador potenciomètric (les línies discontinües indiquen els volums finalment emprats en la construcció de l'IE).

El conjunt de mostres d'entrenament van ser valorades amb EDTA amb un protocol simplificat on només s'addicionen cinc increments de valorant d'1 ml. Els potencials obtinguts per la matriu de sensors per les diferents addicions van ser utilitzades com a informació primària del model de resposta. El procés d'entrenament es fa mitjançant l'ajust per XNA emprant l'algoritme regularització bayesiana. L'optimització dels

paràmetres de l'XNA emprada finalment va donar com a resultat una arquitectura de 48 neurones a la capa d'entrada (6 de potencials x 8 ISE), 6 a la capa oculta (Figura 4.30) i 3 a la capa de sortida (una per cada analit). Les funcions de transferència d'aquestes neurones van ser *purelin* per a les capes d'entrada i sortida i *tansig* per a la capa oculta.

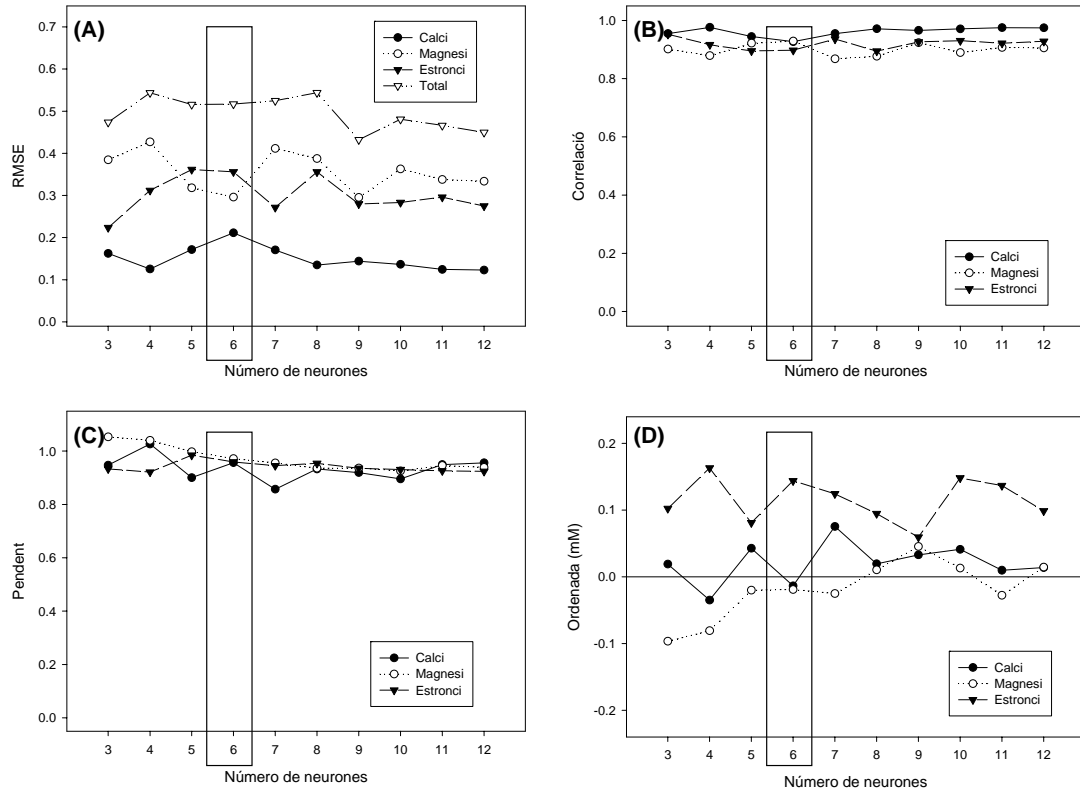


Figura 4.30. Elecció del nombre òptim de neurones a la capa oculta.

El bon ajust del model es pot comprovar a la Figura 4.31, en observar les concentracions calculades de tots tres ions contra els valors esperats per les mostres d'entrenament. Les regressions d'aquestes rectes comparatives, que es troben resumides a la Taula 4.14, mostren pràcticament el comportament ideal. La mateixa figura ens permet avaluar la capacitat de predicció del sistema amb les mostres de validació externa. Els resultats obtinguts per aquest conjunt de mostres amb el sistema proposat mostra una bona correlació pels tres ions estudiats i valors de pendent i ordenada que inclouen els ideals amb els seus intervals de confiança (Taula 4.14).

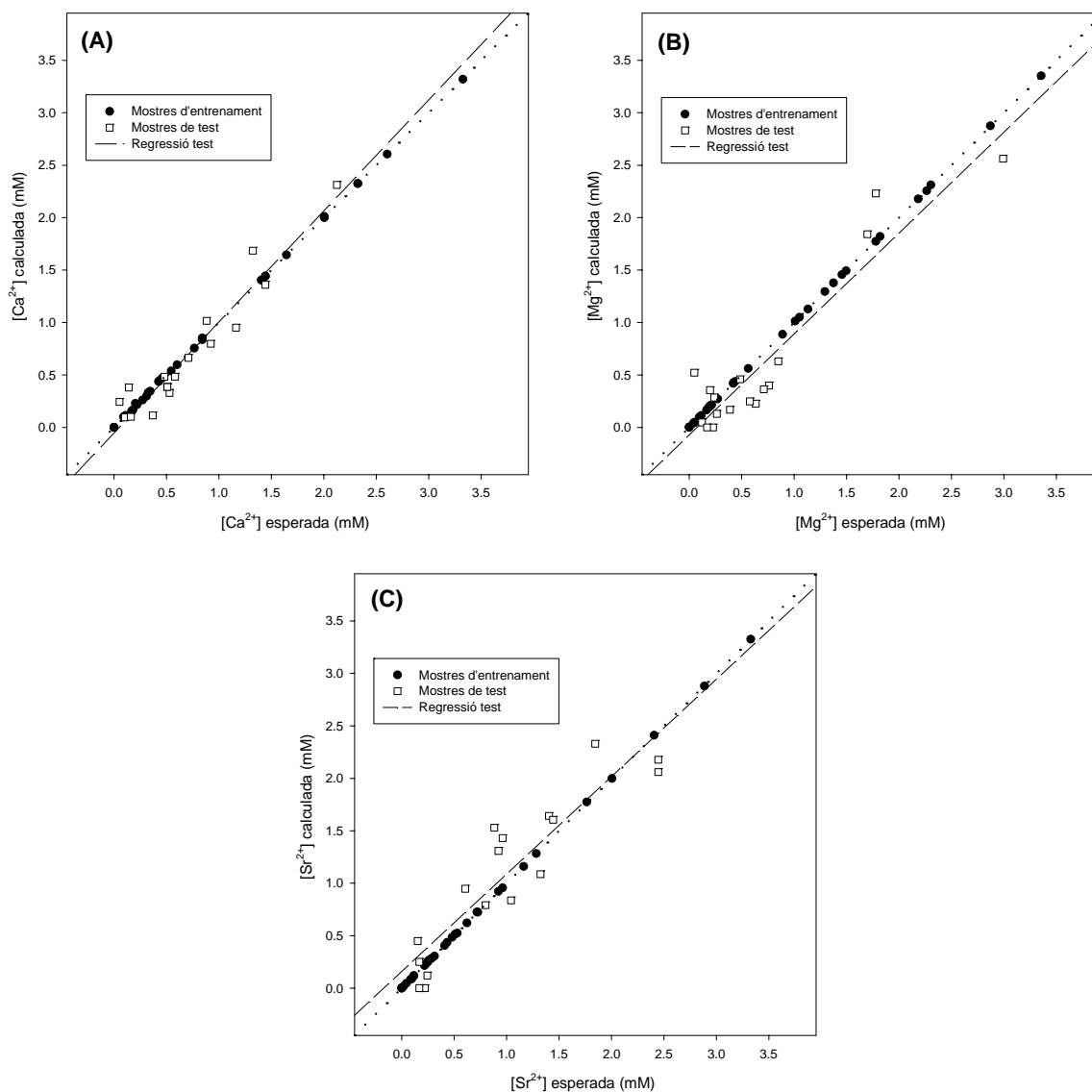


Figura 4.31. Gràfics de comparació entre les concentracions calculades i les esperades de calci (A), magnesi (B) i estronci (C) per a les diferents mostres utilitzades.

Un cop assegurada la bona capacitat de predicció del sistema proposat, es van voler determinar alguns paràmetres d'interès analític com ara l'LD i la precisió del mètode. Els LD calculats en absència d'interferents van ser de $0.070 \cdot 10^{-3}$, $0.094 \cdot 10^{-3}$ i $0.18 \cdot 10^{-3}$ M per al calci, el magnesi i l'estronci, respectivament. La precisió obtinguda, estimada com la repetitivitat, va ser de 4,8, 3,8 i 16 % per al calci, el magnesi i l'estronci, respectivament. L'inesperat valor alt de repetitivitat per al cas de l'estronci podria tenir la seva justificació en la pobra selectivitat de l'únic ISE selectiu a estronci.

Amb la finalitat de veure les millores obtingudes amb el nou sistema respecte de les LE clàssiques es va construir una LE emprant només els potencials de la matriu de sensors

abans d'afegir l'agent valorant. Un cop entrenada la nova LE se'n va avaluar la capacitat de predicció: es va veure una pèrdua evident en el cas de la determinació d'ió magnesi, amb uns paràmetres de comparació respecte de les concentracions esperades de correlació de 0.219, pendent de 0.336 i ordenada 0.768. La resta d'ions podien ser determinats amb l'LE clàssica, tot i que amb un cert deteriorament de la capacitat de predicció respecte de la situació anterior.

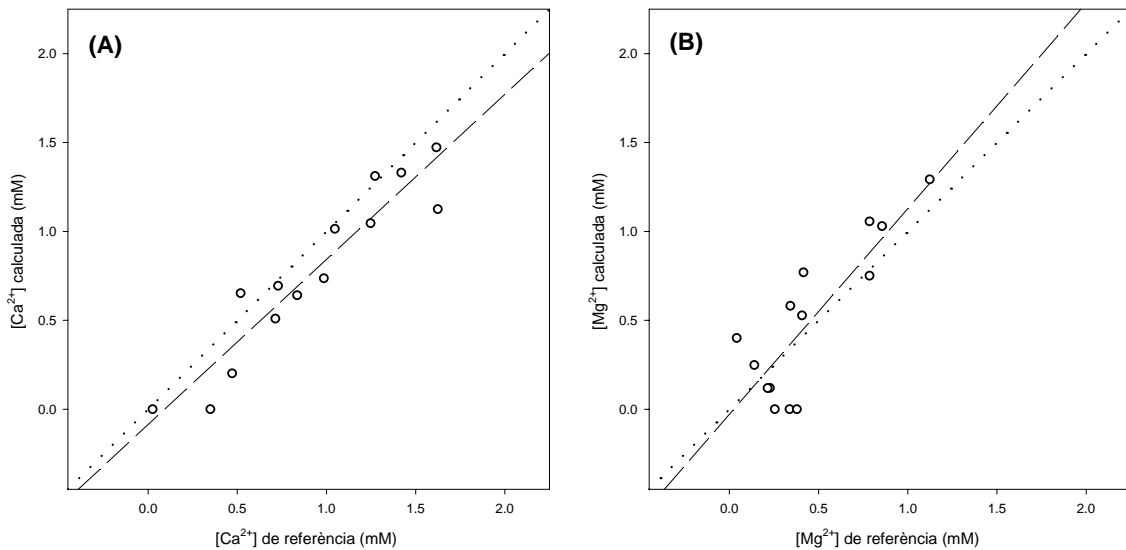


Figura 4.32. Gràfics de comparació entre les concentracions calculades i les de referència de calci (A) i magnesi (B) per al conjunt de mostres reals.

Finalment, un cop demostrat el potencial del mètode d'anàlisi proposat per a mostres sintètiques, es va posar a prova amb mostres reals. Per desgràcia, no es va disposar de mostres naturals que continguessin l'ió estronci, perquè aquesta espècie és molt poc freqüent. Així doncs, es van determinar els altres dos ions en mostres naturals d'aigües minerals. Les concentracions calculades es van comparar (Figura 4.32) amb mètodes estàndards d'anàlisi (ICP-OES) i es van calcular les rectes de regressió corresponents a aquestes rectes de comparació (Taula 4.14). Els resultats obtinguts mostren valors de correlació acceptables per a aquest conjunt de mostres reals. Els paràmetres comparatius amb els seus intervals de confiança inclouen els ideals (pendent 1 i ordenada 0), de manera que no hi ha diferències significatives entre el mètode proposat i els mètodes estàndards.

Taula 4.14. Resum de les regressions de comparació dels resultats obtinguts per als diferents conjunts de mostres.

Mostres d'entrenament ($n = 33$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.99996	0.999 ± 0.003	0.001 ± 0.004
Mg ²⁺	0.99999	0.999 ± 0.001	0.001 ± 0.002
Sr ²⁺	0.99999	0.999 ± 0.002	0.000 ± 0.002
Mostres de test ($n = 17$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.95948	1.059 ± 0.171	-0.053 ± 0.152
Mg ²⁺	0.93775	0.962 ± 0.196	-0.072 ± 0.203
Sr ²⁺	0.91154	0.929 ± 0.231	0.159 ± 0.285
Mostres reals ($n = 14$)			
	Correlació	Pendent	Ordenada (mM)
Ca ²⁺	0.94111	0.928 ± 0.210	-0.086 ± 0.216
Mg ²⁺	0.83275	1.156 ± 0.483	-0.029 ± 0.262

Intervals de confiança calculats amb el 95 % de nivell de confiança.

4.8. Bibliografia

- [1] Martinek, T.; Riddell, F. G.; Rutherford, T. J.; Sareth, S.; Weller, C. T., The structure of the ionophoric antibiotic Na-tetronasin (M139603) in solution, *Chemical Communications*, 17 (1998) 1893-1894.
- [2] Calvo, D.; Bartroli, J.; del Valle, M., Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetronasin, *The Analyst*, (2007) to submit.
- [3] Calvo, D.; Bartroli, J.; del Valle, M., EIS study of potentiometric membranes selective to Ca²⁺ employing the new ionophoric antibiotic tetronasin, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 1569-1575.
- [4] Calvo, D.; Gröbl, M.; Cortina, M.; del Valle, M., Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water, *Electroanalysis*, 19 (2007) 644-651.
- [5] Calvo, D.; Duran, A.; del Valle, M., Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue: Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array, *Analytica Chimica Acta*, in press (2007) doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

- [6] Calvo, D.; Bartrolí, J.; del Valle, M., Multicomponent titration of calcium + magnesium mixtures employing a potentiometric electronic-tongue, *Analytical Letters*, 40 (2007) doi: 10.1080/00032710701380780.
- [7] Calvo, D.; del Valle, M., Simultaneous titration of ternary alkaline-earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue, *Microchemical Journal*, in press (2007) doi:10.1016/j.microc.2007.04.005.
- [8] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E., Polymer Membrane Ion-Selective Electrodes-What are the Limits?, *Electroanalysis*, 11 (1999) 915-933.
- [9] Grandjean, J.; Laszlo, P., Solution structure and cation-binding abilities of two quasi-isomorphous antibiotic ionophores, M 139603 and tetronomycin, *Tetrahedron Letters*, 24 (1983) 3319-3322.
- [10] Lindner, E.; Toth, K.; Pungor, E., *Dynamic characteristics of ion-selective electrodes*, CRC Press, BocaRaton: FL, (1988).
- [11] Armstrong, R. D.; Horvai, G., Properties of PVC based membranes used in ion-selective electrodes, *Electrochimica Acta*, 35 (1990) 1-7.
- [12] Umezawa, Y.; Bühlmann, P.; Umezawa, K.; Tohda, K.; Amemiya, S., Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations, *Pure and Applied Chemistry*, 72 (2000) 1851-2082.
- [13] Burriel, F., *Química analítica cuantitativa*, Paraninfo: Madrid, (2001).
- [14] Hasse, W.; Ahlers, B.; Reinbold, J.; Cammann, K., PbOH⁺-selective membrane electrode based on crown ethers, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 19 (1994) 383-386.
- [15] Lindner, E.; Toth, K.; Pungor, E., Lead-selective neutral carrier based liquid membrane electrode *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 1127-1131.
- [16] Lu, J.; Tong, X.; He, X., A mercury ion-selective electrode based on a calixarene derivative containing the thiazole azo group, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 540 (2003) 111-117.
- [17] Yoshida, Y.; Matsui, M.; Maeda, K.; Kihara, S., Physicochemical understanding of the selectivity at an ion selective electrode of the liquid membrane type and relation between the selectivity and distribution ratios in the ion-pair extraction, *Analytica Chimica Acta*, 374 (1998) 269-281.
- [18] Bakker, E.; Nägele, M.; Schaller, U.; Pretsch, E., Applicability of the phase boundary potential model to the mechanistic understanding of solvent polymeric membrane-based ion-selective electrodes, *Electroanalysis*, 7 (1995) 817-822.
- [19] Bakker, E.; Buhlmann, P.; Pretsch, E., The phase-boundary potential model, *Talanta*, 63 (2004) 3-20.
- [20] Amemiya, S.; Buhlmann, P.; Odashima, K., A Generalized Model for Apparently "Non-Nernstian" Equilibrium Responses of Ionophore-Based Ion-Selective Electrodes. 1. Independent Complexation of the Ionophore with Primary and Secondary Ions, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 3329-3339.

- [21] Amemiya, S.; Buhlmann, P.; Umezawa, Y., A Phase Boundary Potential Model for Apparently "Twice-Nernstian" Responses of Liquid Membrane Ion-Selective Electrodes *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 445-454.
- [22] Lindfors, T.; Ivaska, A., Calcium-selective electrode based on polyaniline functionalized with bis[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]phosphate, *Analytica Chimica Acta*, 437 (2001) 171-182.
- [23] Armstrong, R. D.; Covington, A. K.; Proud, W. G., Solvent properties of PVC membranes *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 257 (1988) 155-160
- [24] Zhang, W.; Spichiger, U. E., An impedance study of Mg²⁺-selective membranes, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 2259-2266.
- [25] Horvai, G.; Graf, E.; Toth, K.; Pungor, E.; Buck, R. P., Plasticized poly(vinyl chloride) properties and characteristics of valinomycin electrodes. 1. High-frequency resistances and dielectric properties *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 2735-2740.
- [26] Durán, A.; Cortina, M.; Velasco, L.; Rodríguez, J. A.; Alegret, S.; del Valle, M., Virtual Instrument for an Automated Potentiometric e-Tongue Employing the SIA Technique, *Sensors*, 6 (2006) 19-29.
- [27] Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'Amico, A., Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 77 (2005) 1965-1983.
- [28] Macca, C., Response time of ion-selective electrodes: Current usage versus IUPAC recommendations, *Analytica Chimica Acta*, 512 (2004) 183-190.
- [29] Baret, M.; Massart, D. L.; Fabry, P.; Conesa, F.; Eichner, C.; Menardo, C., Application of neural network calibrations to an halide ISE array, *Talanta*, 51 (2000) 863-877.

5. CONCLUSIONS

5. Conclusions

Les conclusions, igual que els objectius de la tesi doctoral se separaren en dues parts: la primera amb les conclusions que es desprenen de la caracterització dels elèctrodes selectius d'ions desenvolupats i la segona, que fa referència als resultats obtinguts emprant els sensors desenvolupats en la construcció de les diferents llengües electròniques.

La caracterització dels ISE desenvolupats ha permès establir les conclusions següents:

1. L'ionòfor tetronasina és útil com a element de reconeixement en ISE, i en contra de l'esperat, per al reconeixement de l'ió calci.
2. *a)* Els elèctrodes selectius d'ió Na^+ construïts que incorporen l'antibiòtic tetronasina com a element de reconeixement i additius aniònics tenen resposta potenciomètrica a aquest ió, tot i que la sensibilitat observada és inferior a la teòrica i la selectivitat respecte a l'ió Na^+ no és prou bona.

- b)* Tots els elèctrodes selectius d'ió Ca^{2+} construïts amb el mateix ionòfor tetronasina tenen resposta preferencial a Ca^{2+} , ja incorporin additius aniònics, catiònics o no incorporin additius. En tots els casos s'observa una sensibilitat superior a la teòrica segons prediu la llei de Nernst.
- c)* El temps de resposta dels ISE que incorporen l'antibiòtic tetronasina és molt ràpid, de menys de 12 segons per assolir el 90 % de la resposta total. Aquest fet concorda amb l'estructura de la tetronasina coordinant un metall en solució, en la qual coordina el metall amb una estructura oberta per cinc punts de coordinació i completa l'esfera de coordinació una molècula d'aigua en un sisè punt.
3. *a)* Les composicions de la membrana selectiva per als ISE de Ca^{2+} amb millors característiques són les que incorporen l'additiu aniònic. Aquests ISEs tenen sensibilitats d'aproximadament 45 mV/dèc, límits de detecció d'aproximadament 10^{-6} M i coeficients de selectivitat que mostren una clara preferència de l'ISE per l'ió Ca^{2+} sobre els ions Mg^{2+} , Rb^+ , K^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Na^+ i Li^+ , que no presenten interferència. No obstant s'observen interferències importants per als ions Ba^{2+} i Sr^{2+} , ions de poca abundància en mostres naturals.
- b)* L'ús de l'antibiòtic tetronasina en forma sòdica o forma àcida no provoca diferències significatives en les característiques potenciomètriques.
- c)* Es van obtenir millors resultats amb el plastificant oNPOE que amb el plastificant DOS, que es tradueixen en una millor selectivitat respecte de l'ió Ca^{2+} .
4. *a)* Els resultats obtinguts mitjançant la tècnica potenciomètrica concorden amb la tècnica de l'espectroscòpia electroquímica d'impedàncies, en què es van obtenir els valors més petits de resistència de membrana per la que tenia millor resposta potenciomètrica. Les característiques impedimètriques de la membrana Calci (B) són una resistència de membrana d'1.72 M Ω i 117.8 pF de capacitat.

b) Els canvis de resistència de la membrana calci (B) en variar el pH, mostren que a pH 5 es donen condicions especials dins la membrana. Això coincideix amb la resposta doble nernstiana de l'ISE a aquest valor de pH.

c) Els espectres d'impedància realitzats a la membrana Calci (B) en contacte amb solucions d'ions interferents no mostren el segon semicercle típic de processos interfacials lents. Aquest fet confirma el bon comportament de la membrana.

5. a) Les millors condicions observades per l'ús d'aquests sensors s'esdevenen amb un amortidor de pH 5.0 cítric/citrat, en què els ISE amb additius aniònics tenen sensibilitat aparentment doble nernstiana. Aquesta resposta doble nernstiana concorda amb el model ATNR de la bibliografia.

b) El model de resposta ATNR dels ISE concorda amb els resultats obtinguts mitjançant la tècnica EEI per als diferents pH estudiats.

Les conclusions que s'extreuen de l'LE basada en un sistema SIA per determinar mescles de cations alcalinoterris són les següents:

6. a) La membrana selectiva de calci basada en l'ionòfor tetronasina s'ha emprat per a la construcció d'ISE en disposició tubular, s'aconsegueixen ISE de bones característiques per a la detecció en sistemes de flux.

b) S'ha construït una LE per la multideterminació de cations alcalinoterris en mostres aquoses mitjançant un sistema SIA. Aquest dispositiu permet determinar calci i magnesi, mentre que l'ió bari només es pot determinar semiquantitativament.

c) La xarxa neuronal artificial que millor resol el problema plantejat té 3 neurones a la capa oculta i s'entrena amb el algorisme regularització bayesiana. Les funcions de transferència òptims són la *purelin* per a la capa de sortida i la *tansig* per a la capa oculta.

d) L'LE construïda mostra una capacitat de predicció bona pel que fa a les concentracions de calci i magnesi en les mostres de validació externa, cosa que permet l'aplicació de l'LE en l'anàlisi d'aquests ions en mostres reals, com ara aigües minerals.

e) L'LE construïda mostra bones correlacions en la determinació de calci i magnesi en mostres reals quan es comparen els resultats amb mètodes de referència.

A partir de la construcció i 'avaluació de la segona LE proposada, també basada en un sistema SIA, que pretén determinar mesclades d'ions alcalins i alcalinoterris mitjançant senyals dinàmics, es van obtenir les conclusions següents:

7. a) S'ha comprovat que l'anàlisi de Fourier permet l'extracció significativa de senyals dinàmics potenciomètrics. Per senyals dinàmics procedents d'un esglaó de mostra s'han emprat 6 coeficients de Fourier, que han demostrat ser suficients per a la construcció d'un bon model de resposta.

b) L'LE proposada ha demostrat tenir millor capacitat de predicció que una altra de construïda mitjançant PLS. Aquest fet deixa de manifest com les XNA modelitzen millor el problema plantejat que no pas el PLS a causa de l'alt component no lineal present en la resposta dels sensors.

c) La XNA de millors característiques té 6 neurones a la capa oculta i s'entrena amb el algorisme regularització bayesiana. Les funcions de transferència òptimes són la *tansig* per a les capes de sortida i la capa oculta.

d) La utilització de senyals dinàmics potenciomètrics permet obtenir més informació sobre la composició de les mostres. Això queda palès en comparar els resultats obtinguts amb l'LE proposada i una LE que utilitza els potencials de l'estat d'equilibri de la matriu de sensors per resoldre el mateix problema.

e) L'LE construïda mostra bones correlacions en la determinació de calci i potassi en mostres reals quan es comparen els resultats amb mètodes de referència. L'ió sodi només es pot determinar semiquantitativament.

L'aplicació següent va ser la d'emprar una LE, que inclogués un ISE basat en tetronasina, per a la determinació del punt d'equivalència en valoracions complexomètriques de dos analits simultàniament. Es proposa per primera vegada l'ús d'una llengua electrònica com a sistema de detecció en valoracions potenciomètriques. Els volums d'equivalència que corresponen a la determinació de calci i magnesi s'obtenen a partir d'un model basat en XNA. D'aquesta experiència es van extreure aquestes conclusions:

8. a) L'XNA de millor capacitat de predicció té 12 neurones a la capa oculta i s'entrena amb el algorisme regularització bayesiana. Les funcions de transferència òptimes són la *tansig* per a la capa oculta i la *purelin* per a la capa de sortida.
- b) La informació obtinguda de la valoració complexomètrica proporciona informació útil per a la multideterminació d'espècies i permet resoldre casos que l'LE clàssica, la qual utilitza un únic potencial per ISE, és incapaç de solucionar.
- c) La metodologia proposada (amb XNAs) ha demostrat que té una capacitat millor de predicció que una de construïda mitjançant PLS. Les XNA modelitzen millor el problema plantejat que no pas el PLS.
- d) El mètode proposat, un cop comparat amb mètodes de referència, permet la determinació simultània de calci i magnesi en mostres d'aigües minerals mitjançant valoracions complexomètriques molt simples.

En l'última de les aplicacions plantejades en la present tesi s'amplia l'estudi anterior per determinar la composició d'una mescla ternària d'ions alcalinoterris. D'aquesta aplicació, que també precisa de la construcció d'una LE potenciomètrica, es van treure les conclusions següents:

9. a) L'XNA òptima té una arquitectura de 6 neurones a la capa oculta i s'entrena amb el algorisme regularització bayesiana. Les funcions de transferència que proporcionen millors resultats són la *tansig* per a la capa oculta i la *purelin* per a la capa de sortida.
- b) Una altra vegada, la informació obtinguda de la valoració complexiomètrica proporciona informació útil per a la multideterminació d'espècies i permet resoldre el cas plantejat que l'LE clàssica només pot resoldre parcialment.
- c) L'LE construïda, emprada com a detector del punt d'equivalència, permet la determinació simultània de calci, magnesi i estronci en mostres sintètiques.
- d) El mètode proposat ha demostrat la seva eficàcia en la determinació simultània de calci i magnesi en mostres d'aigües minerals.

6. *ARTICLES PUBLICATS*

6. Articles publicats

ARTICLE 1:

“EIS study of potentiometric membranes selective to Ca^{2+} employing the new ionophoric antibiotic tetronasin”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 1569-1575.

ARTICLE 2:

“Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water”. Daniel Calvo, Michael Größl, Montserrat Cortina i Manel del Valle. *Electroanalysis*, 19 (2007) 644-651.

ARTICLE 3:

“Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue. Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array”. Daniel Calvo, Alejandro Durán i Manel del Valle. *Analytica Chimica Acta*, acceptat novembre de 2007. doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

ARTICLE 4:

“Multicomponent titration of calcium + magnesium mixtures employing a potentiometric electronic-tongue”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. *Analytical Letters*, 40 (2007) pp. doi: 10.1080/00032710701380780.

ARTICLE 1:

“EIS study of potentiometric membranes selective to Ca²⁺ employing the new ionophoric antibiotic tetronasin”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle.
Electrochimica Acta, 51 (2006) 1569-1575.



EIS study of potentiometric membranes selective to Ca^{2+} employing the new ionophoric antibiotic tetronasin

D. Calvo, J. Bartrolí, M. del Valle *

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edificio Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 23 June 2004; received in revised form 16 November 2004; accepted 8 February 2005

Available online 13 September 2005

Abstract

Tetronasin is a recently discovered ionophoric antibiotic that, apart from its interaction with sodium ion, can be used to construct potentiometric sensors selective to calcium ion. The observed response is super-Nernstian and dependent on pH, as it is expected from a mixed hydrogen–calcium equilibrium, with optimal response conditions at pH 5.0 (sensitivity 65 mV/decade). The selectivity pattern to common inorganic cations is determined. The studies with primary ion and interferents, validate an optimal formulation of a PVC membrane for Ca^{2+} which employs 1% ionophore, 0.2% anionic sites, 66% *o*-nitrophenyloctylether and 33% PVC. The interaction with Ca^{2+} is studied through an evaluation of the mechanisms and responses of the constructed membranes by means of Electrochemical Impedance Spectroscopy. Results in the range 50 KHz–0.05 Hz indicate an electrochemical system not impeded by charge transfer or slow diffusion. The single semicircle observed on the corresponding Nyquist plots is translated into a bulk resistivity lower than 700 K Ω cm, with a geometric capacitance of 98 pF (for a 10^{-3} M CaCl_2 solution).

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ion selective electrode; Electrochemical impedance; Calcium; Potentiometric membrane; Tetronasin

1. Introduction

Tetronasin (CAS-75139-05-8) is a recently discovered ionophoric antibiotic that has not yet been commercialised [1]. Its properties, derived from a polyether with an acyl-tetronic acid structure, are related to the more common antibiotic monensin, which is widely used for veterinary use [2]. Fundamental studies on the behaviour of tetronasin in solution have shown its favourable and rapid interaction with Na^+ ion [3]. Additional studies suggest also interactions with Ca^{2+} ion [4]. Based on these findings, we have first investigated its potential use as ionophore in PVC membranes for Na^+ potentiometric sensing. Applications of ionophoric antibiotics in potentiometric sensors are well known, such as the use of valinomycin and nonactin for K^+ and NH_4^+ detection, respectively [5].

Ion selective electrodes (ISEs) for Na^+ based on tetronasin were then constructed and characterized. Unexpectedly, during the studies with potential interferent species, an extremely fast, reversible and stable response was observed when the sensors were in contact with Ca^{2+} ion in dynamic conditions. This response had several particularities, one of them was an abnormal high sensitivity. For calcium determination, this can be an added advantage, as the normal concentration range of this ion in biological samples is rather reduced.

This response has been justified from the expressions of the phase boundary potential model [6]. Its application, considers the acidic properties of the ionophore, which is the case for tetronasin, and also for monensin or lasalocid. The case of the latter two ionophores has been characterized in the literature [7], where sensitivities of double value than the Nernstian theory (apparently twice-Nernstian) as well as their variation with the pH of the employed media are justified.

The unexpected interaction with Ca^{2+} was further studied through an evaluation of the mechanisms and responses

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 18 36; fax: +34 93 581 23 79.
E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

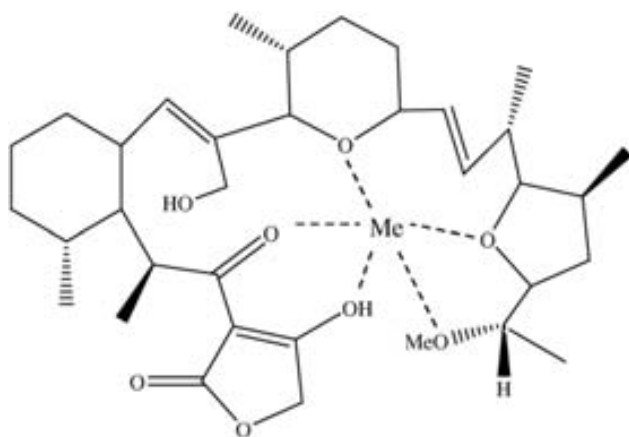


Fig. 1. Chemical structure of the metal–ionophore complex for tetronasin.

of the constructed membranes by means of electrochemical impedance spectroscopy (EIS). EIS has recently received focused attention in the field of analytical sciences [8]. This technique has become of compulsory use to describe electrochemical interfaces of any electrode system, and normally involves an intensive electrical characterization considering a wide range of frequencies. Apart from the characterization tool, it can also be used as transduction principle in the field of chemical sensors [9]. Several research groups in the field of electrochemical sensors such as those of Buck [10], Ivaska [11], Armstrong [12] or Camman [13] have used thoroughly the EIS technique in the characterization and optimisation of potentiometric sensors. Recently, extensive studies of formulations and response mechanisms of different potentiometric membranes have appeared in the literature, like the optimisation of Mg^{2+} potentiometric sensors [14] of fundamental studies of ion selective electrodes for anionic or cationic surfactants [15].

A response mechanism for the prepared calcium ISEs based on steady-state phase boundary potentials is suggested as the explanation, implying the formation of a 1:1 complex [3] between the deprotonated ionophore and the primary ion at the sample/membrane interface (see Fig. 1).

According to this model, the apparently twice-Nernstian responses are obtained because the concentration of the free primary ion in the membrane phase changes with the inverse of the primary ion activity in the pH-buffered sample solution. This is in contrast to conventional Nernstian responses with neutral carrier-based ISEs, for which the concentration of the primary ion in the bulk of the membrane phase is buffered with the ionophore and remains independent of the pH and characteristics of the sample matrix.

2. Experimental

2.1. Materials

The different solutions were prepared using doubly distilled water and reagents of proanalysis or higher quality.

The polymeric membranes responsible for the potentiometric response were formulated including the ionophore, an ionic additive, the plasticizer and the polymer in tetrahydrofuran (THF, from Merck). The studied ionophore was the sodium salt of the antibiotic tetronasin (TetronasinNa), provided by the University of Cambridge (UK) [2]. The antibiotic tetronasin in its acid form (TetronasinH) was prepared from the sodium salt by standard procedures. The used anionic sites additive was potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate ($K^+pCITPB^-$) (Fluka). The used plasticizers were bis-(2-ethylhexyl)sebacate, DOS and *o*-nitrophenyloctylether, *o*-NPOE (both from Fluka). The polymer used was poly(vinyl chloride) high molecular weight, PVC (Fluka).

The internal ohmic contact of the all-solid-state electrodes was prepared from graphite (BDH, UK) and epoxy resin Araldite M + HR Hardener (both from Uneco, Spain).

Other reagents used to prepare solutions or buffers were: glycine (Panreac), citric acid (Panreac), trishydroxymethylaminomethane (Merck), imidazole (Fluka), calcium chloride (Riedel-de Haën), sodium chloride (Merck), potassium chloride (Fluka) and magnesium chloride (Merck).

2.2. Construction of the electrodes

The ISEs of the present work were manufactured in all-solid-state configuration or non-symmetrical configuration as sketched on Fig. 2. This configuration uses a direct contact between the polymeric membrane and a solid contact. These electrodes were prepared using a PVC tube body (A) (6 mm i.d.) and a small copper disk soldered at the end of an electrical connector (B).

The inner contact is an epoxy-graphite conductive paste, formed from graphite (50%), epoxy resin (36%) and hardener (14%), deposited filling the cavity in the plastic body. Once cured, a flat base is formed at 0.3 mm depth (D). The ion selective membrane will be deposited on this surface.

The study used four membranes whose compositions are shown in Table 1, and used tetrahydrofuran as volatile diluent. For the formation of the membrane, 40 μ l of a diluted cocktail were deposited on the electrode base (E). Two further additions were performed after a waiting period of 30 min.

The last step for the construction of the ISEs is the selective-membrane conditioning in presence of the primary ion (F), which lasted for 24 h and employed a 10^{-1} M $CaCl_2$ solution.

2.3. Potentiometric measurements

The EMF measurements were carried out with a digital potentiometer (Crison GLP22, Barcelona, Spain). The reference electrode used was a double-junction Ag/AgCl electrode (Thermo Orion 900200), with a solution of $MgCl_2$ 0.01 M in its outer compartment.

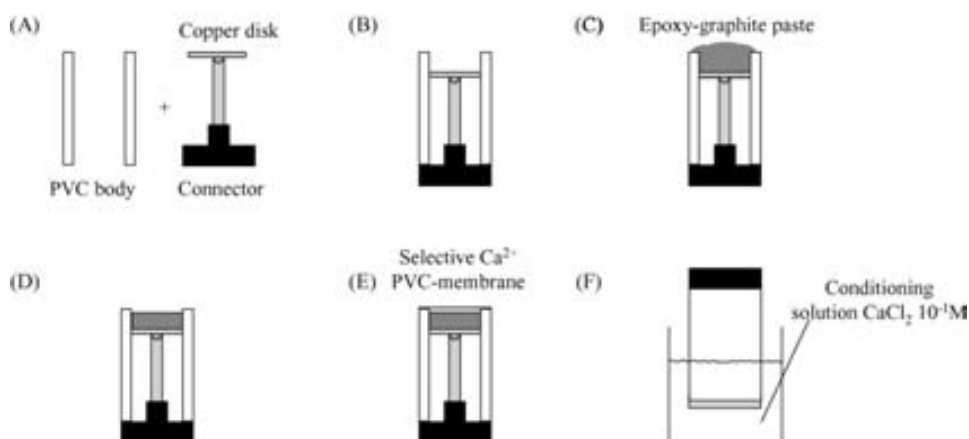


Fig. 2. Fabrication process of the PVC-membrane all-solid-state potentiometric sensors, based on the graphite–epoxy composite.

Potentiometric selectivity coefficients were determined according to the IUPAC recommended fixed interference method (FIM). In this method, we make a calibration of the primary ion over a constant background of interfering ion. The activity coefficients of ions in solution were calculated according to the Debye–Hückel formalism.

2.4. Impedance measurements

Impedance measurements were performed using an IM6e Impedance Measurement Unit IM6e (BAS-Zahner, Germany). Thales software was used for the acquisition of the data and the control of the experiments.

A three electrode cell was used to make the impedance measurements: it comprised a reference electrode (same as above), a ring-platinum electrode (Crison, Barcelona, Spain) and the constructed ISE as working electrode.

The working conditions varied according with the necessity to minimize noise, but we generally worked with a sine wave ac potential of amplitude 10–50 mV with open circuit potential applied (values ranging from –100 to +100 mV) and with a range of frequencies of 50 kHz–0.01 Hz.

The curves obtained in the Nyquist diagram were adjusted to a theoretical curve corresponding to an equivalent circuit of a resistance in series with a condenser and a resistance in parallel. Complex curve fitting was performed with the help of the software FRA (Autolab, Utrecht, the Netherlands). Potentiometric membranes were characterized once the capacitance of the equivalent condenser and the bulk membrane resistance were known.

3. Results and discussion

3.1. Potentiometric measurements

The ionophore tetronasin has not previously been used for the construction of potentiometric sensors. From existing information, we first supposed this ionophore had a preferred response towards sodium ion, so membranes were constructed with 1% tetronasin, 65% DOS, 0.2% anionic sites and 33.8% PVC, and conditioned with 10^{-1} M NaCl solution. During characterization, first tests carried out showed a lower slope than the theoretical one (ca. 35 mV/decade) and a poor selectivity over sodium ion, when a set of inorganic cations, monovalent and divalent was evaluated.

Surprisingly, the dynamic response of these ISE after being in contact with solutions of interfering ions was altered. The obtained curve transient appeared to be the sum of two processes, one fast exponential rise and the other slower exponential decay (Fig. 3a), instead of displaying the typical exponential rise in response to a concentration step change (Fig. 3b). This type of dynamic response of the selective electrodes to ions has been associated to a situation where the membrane of an ISE is placed in contact with the solution of an interfering ion [16]. Therefore, it seemed that our sodium ISE changed its selectivity pattern after the interference study, suggesting the used ionophore had a stronger equilibrium with another ion. This explanation could justify the change of behaviour in dynamic conditions towards a sodium step change before and after being in contact with other ions. Among the ions tested, calcium was thought to

Table 1
Membrane compositions for the electrodes employed in this study and measured bulk properties

Membrane	Ionophore (% wt)	$K^+pCITPB^-$ (molar ratio)	Plasticizer (% wt)	PVC (% wt)	R_{bulk} (M Ω)	C_{bulk} (pF)
A	TetronasinH, 1%	0.2	<i>o</i> -NPOE, 66%	33%	4.89	232.7
B	TetronasinNa, 1%	0.2	<i>o</i> -NPOE, 66%	33%	1.72	117.8
C	TetronasinNa, 1%	0.0	<i>o</i> -NPOE, 66%	33%	9.88	152.8
D	TetronasinNa, 1%	0.2	DOS, 66%	33%	3.59	99.4

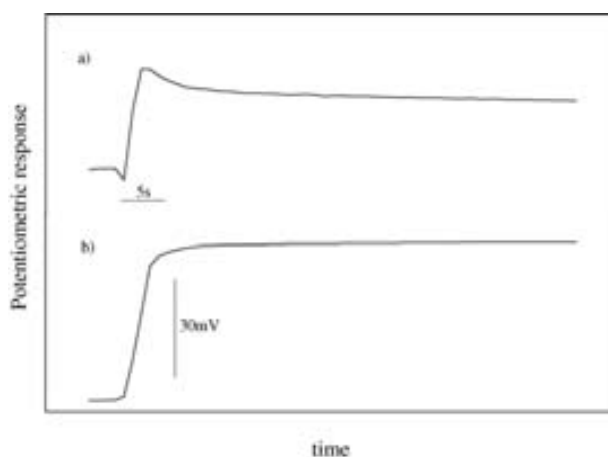


Fig. 3. Dynamic potentiometric response of electrodes using tetronasin. (a) Response corresponding to a concentration step change from 10^{-4} to 10^{-3} M Na^+ . Electrode based on membrane type D after contact with calcium solutions. (b) Response corresponding to a concentration step change from 10^{-4} to 10^{-3} M Ca^{2+} . Electrode based on membrane type B.

be the responsible for the observed changes, since recorded potential values to calcium ion were fast and much larger than those observed for sodium or the rest of ions.

In this way, the ionophore tetronasin is proposed as recognition element for calcium ion in potentiometric sensors. This fact is also coincident with suggestions drawn from the literature, where interactions of tetronasin with sodium, but also with calcium, are the strongest [4].

Four test membranes were formulated, as outlined on Table 1, in order to check the response towards calcium ion. One used the sodium salt of the ionophore, and the other its free, protonated form. In order to compare the response, a membrane without anionic sites additive was also included. In the three cases, the plasticizer used was *o*-NPOE, as it is known that it favours the response towards divalent ions in front of monovalent ones [17]. This was specifically checked by direct comparison with a fourth membrane employing the plasticizer DOS. The membranes tested incorporated anionic sites (borate salt) to favour the complexation equilibrium between the membrane phase and the aqueous solution.

Table 2 shows the results obtained for the four studied membranes. One can see that the slopes in the four studied membranes are bigger to the one than would correspond for the Nernst equation for a divalent ion (29.6 mV/decade at 25 °C). The detection limit for the three membranes A, B and D are near to 10^{-6} M, while for the membrane C (without

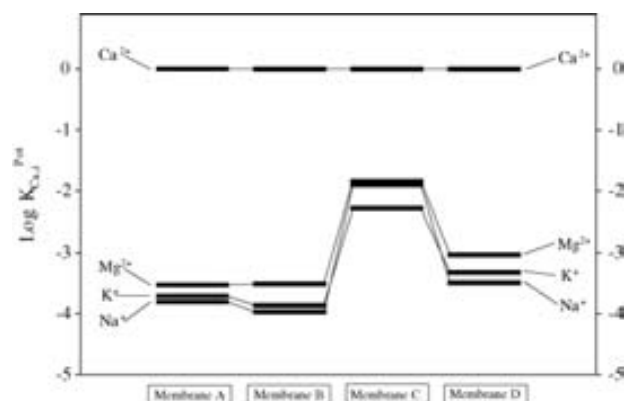


Fig. 4. Selectivity coefficients obtained for different membrane compositions employing tetronasin. Values corresponding to fixed interference method.

borate salt) the detection limit is approximately five times larger.

The time of response ($t_{90\%}$) for the four studied membranes is abnormally fast, less than 12 s for a step change of a decade of concentration of calcium (10^{-6} to 10^{-5} M).

The potentiometric selectivity coefficients obtained for the four membranes are also shown in Table 2, and visually on Fig. 4. The best results were obtained with the membrane type B, although the membrane type A had a similar selectivity pattern. Selectivity coefficients found are comparable with those of already accepted ionophores for calcium (viz., ETH1001 or ETH129) [18], specially if we consider that most of existing data correspond to the more favourable determination conditions of the separate solution method.

The potentiometric study for the optimisation of the buffered media, in a combined response to pH and primary ion, gave as results that the best sensitivity was at pH 5 (Fig. 5). The maximum sensitivity at pH 5 was 65 mV/decade that corresponds to twice the Nernstian value. This rare feature finds an explanation when quantifying the phase boundary potential model to membranes that contain acidic ionophores and anionic sites, and has been applied to close related ionophores like monensin or lasalocid [7]. This special response has been termed in the literature as “apparently twice-Nernstian response”.

3.2. Impedance measurements

The second part of the study employs the electrochemical impedance spectroscopy technique to clarify and try

Table 2

Response characteristics to calcium ion obtained for electrodes based on the ionophore tetronasin; between brackets, reproducibility values corresponding to eight calibration runs along 1 month

Membrane	Slope (mV/decade)	log (L.D.) (M)	log $K_{\text{Ca}^{2+}, \text{Na}^+}^{\text{pot}}$	log $K_{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}^{\text{pot}}$	log $K_{\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+}^{\text{pot}}$
A	47.1 (5.0)	-5.6 (0.3)	-3.8	-3.5	-3.7
B	46.2 (5.5)	-5.5 (0.2)	-4.0	-3.5	-3.9
C	45.5 (5.2)	-5.0 (0.2)	-1.9	-1.8	-2.3
D	49.1 (5.5)	-5.5 (0.2)	-3.5	-3.0	-3.3

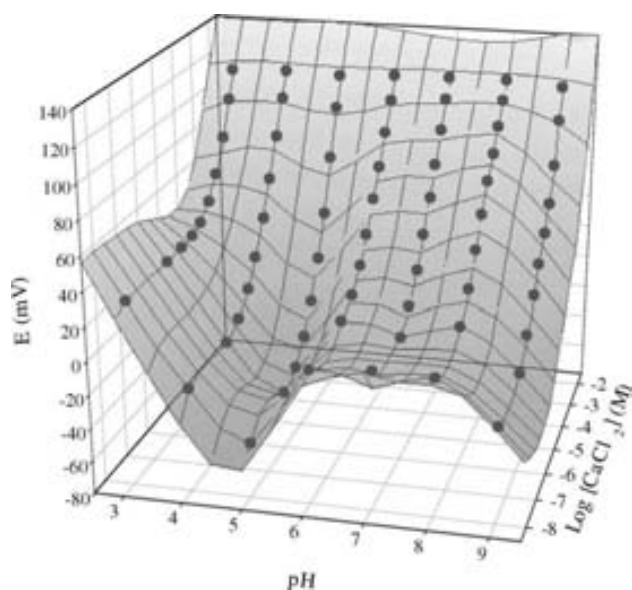


Fig. 5. Dependence of the potentiometric response vs. pH, for a type B membrane calibrated against calcium ion.

to justify the special response observed towards calcium ion.

3.2.1. Comparison of different membranes

Impedance spectra were carried out for the four membranes characterized above by potentiometric methods. Fig. 6 show the impedance spectra for the four membranes studied in doubly distilled water and the Table 1 shows capacitance values and bulk resistance found after fitting the points on the complex plane to its equivalent circuit. We selected these conditions for comparison purposes, corresponding to first measurements in water after conditioning in CaCl_2 solution.

The desired features for a correctly functioning potentiometric membrane are known to be a single semicircle in the Nyquist plot, that of the bulk membrane diffusion process [11,12,14]. In addition, the best characteristics mean reduced

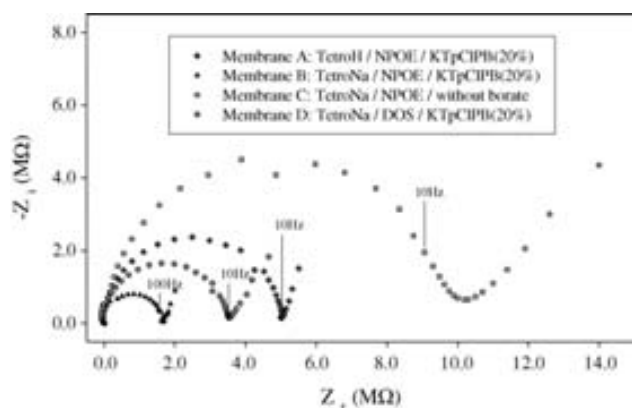


Fig. 6. Comparison of impedance spectra for different membrane compositions. Measurements start at 50 kHz (left) and end at 1 mHz (right). The bathing solution is doubly distilled water.

resistivities for a favoured interaction between electroactive material and the analyte; additionally, high capacitances will yield stable and durable membranes.

From the resistance values, the membrane B has the best characteristics for its use in potentiometric calcium ion determinations, as it offers the lowest resistance to charge transfer. These results are in agreement with the potentiometric results, since it was already seen that the membrane type B showed the best selectivity for calcium ion (Fig. 4).

The effect of the ionic additive in the bulk resistance can be noticed when comparing the impedance spectrum of the membrane type B (with borate salt) and the membrane type C (without borate salt). The addition of 20% (molar ratio to ionophore amount) ionic additive reduces the resistance from 9.88 to 1.72 $\text{M}\Omega$, justifying its inclusion in the final formulation. This result is also in agreement with the potentiometric response characteristics.

The use of the sodium salt of tetronasin (membrane B) or the acid form of tetronasin (membrane A) did not show any significant effects on the potentiometric readings, however, the ionophore form affects to the electrical properties of the membrane. The membranes with the acid form of ionophore have 4.88 $\text{M}\Omega$ of bulk resistance and 232.7 pF of capacitance while the membrane with the sodium salt of ionophore have a bulk resistance of 1.72 $\text{M}\Omega$ and 117.8 pF of capacitance.

As seen above, better potentiometric results were obtained with the plasticizer *o*-NPOE than with the plasticizer DOS, as it is expected for divalent ions. The electrical characteristics of these membranes are in concordance with the potentiometric results, a bulk resistance of 3.59 $\text{M}\Omega$ was obtained with the plasticizer DOS and 1.72 $\text{M}\Omega$ with the plasticizer *o*-NPOE.

3.2.2. Effect of the concentration of calcium of the solution

Fig. 7 shows the effect of the concentration of CaCl_2 on the bulk resistance of the membrane, as obtained during a calibration run with separate standards. One can see a decrease

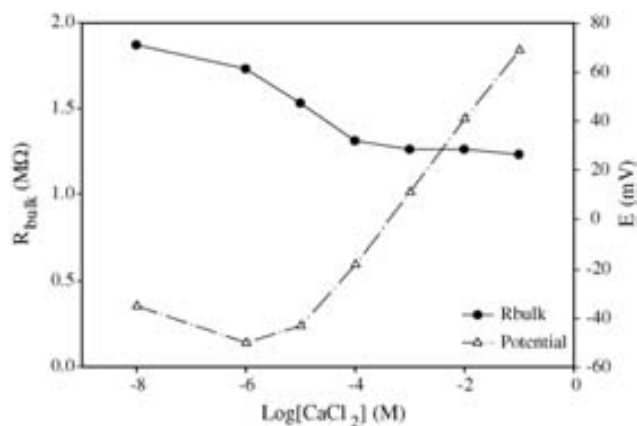


Fig. 7. Variation of bulk resistance membrane against the calcium concentration for membrane type B and potentiometric calibration measured curve on the same B membrane for calcium ion detection.

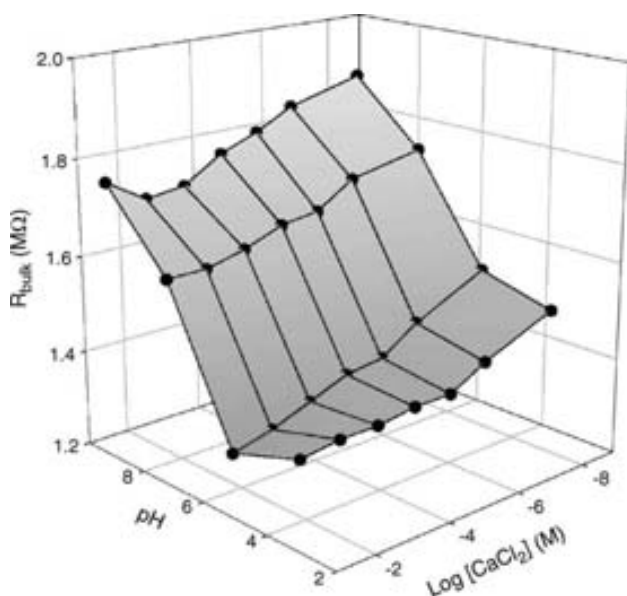


Fig. 8. Variation of the bulk membrane resistance vs. calcium concentration and pH for membrane type B. Impedance spectra were recorded from 50 kHz to 10 Hz and using a 50 mV amplitude sinusoidal signal.

of the bulk resistance when increasing the concentration of CaCl_2 . This reduction of bulk resistance is more pronounced among the concentrations 10^{-6} and 10^{-4} M, with a reduction of 25%, and coincident with the beginning of the potentiometric response, demonstrating a clear correlation between the two processes.

As reference point, the impedance spectra shown for a 10^{-3} M CaCl_2 solution permitted to calculate a specific resistivity of $700 \text{ k}\Omega \text{ cm}$ once the bulk resistance found is corrected for area and thickness; the corresponding geometric capacitance was 98 pF .

3.2.3. Effect of the pH and the concentration of calcium

The same previous experiment was carried out at different pHs, to see possible changes inside the membrane when varying the pH of the solution. Specific changes are needed if the super-Nernstian response is to be justified; for this purpose, a combined calcium/hydrogen ion mechanism is proposed, a model already known as “apparently twice-Nernstian” response.

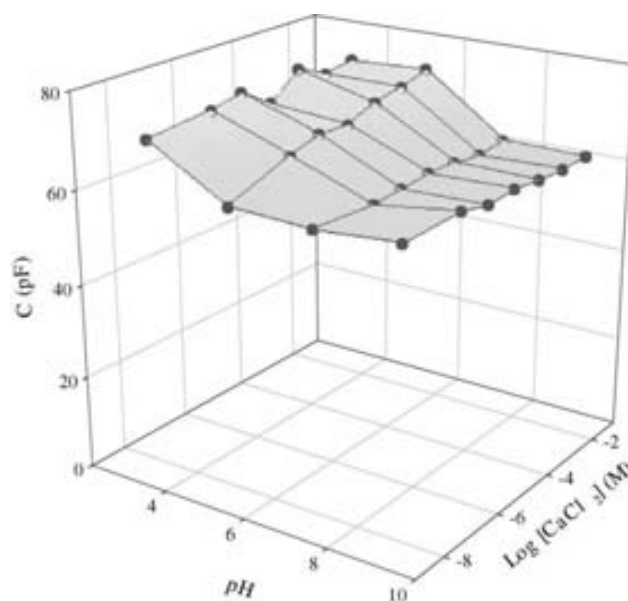


Fig. 9. Variation of the bulk membrane capacitance vs. calcium concentration and pH for membrane type B. Impedance spectra were recorded from 50 kHz to 10 Hz and using a 50 mV amplitude sinusoidal signal.

Fig. 8 show the evolution of the bulk resistance of the membrane when varying the concentration of CaCl_2 and the pH. One can see a similar evolution among different pH, when increasing the concentration of CaCl_2 , the bulk resistance decreases. However, at pH 5.0, this trend is much more pronounced. Another trend observed in Fig. 8 is that the lower pH, the lower bulk resistance of the membrane. The previous trend has the exception at pH 5.0 and high concentrations of CaCl_2 , where smaller resistances are observed than at pH 3.0. It seems that, at pH 5.0, special conditions are given that modify the variation trend for the bulk. These results are consistent with the “apparently twice-Nernstian” response mechanism and with the potentiometric results, where a specific pH value, related to the protonation equilibrium of the ionophore, is associated with a maximum sensitivity of response.

The capacitance values obtained by this same experiment are shown in Fig. 9. Significant changes were not observed in the capacitance of the membrane when varying the pH and the concentration of CaCl_2 .

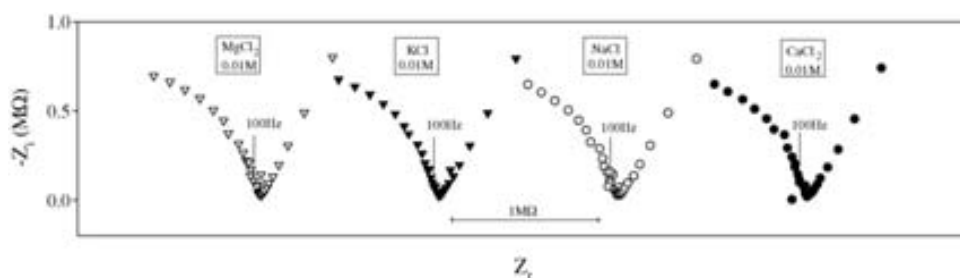


Fig. 10. Impedance plots obtained with a Ca^{2+} -selective membrane (membrane type B) varying the bathing solution. Spectra were recorded within a frequency range 10 kHz–10 mHz by using a 200 mV amplitude sinusoidal signal.

3.2.4. Effect of solutions with interfering ions

In all the measurements with calcium solutions, no second semicircle was shown in the Nyquist plot. This indicates a fast interfacial mechanism between the ionophore and the solution.

This point was examined carefully in experiences where the membrane type B was placed in contact with potentially interfering ions. Solutions used to carry out these spectra were solutions of interferents ions with the same concentration, 0.01 M. Fig. 10 shows inserts of four impedance spectra in the zone where the second semicircle can appear, demonstrating its absence.

Besides, changes were not observed in the bulk resistance of the membrane when putting in contact the membrane with solutions of interfering ions. This confirms the fast times of response of the ISE based on the ionophore tetronasin and the good response of the membrane for the detection of ion calcium and also fast equilibria with interfering ions.

4. Conclusions

In this work, good correlations are obtained between the potentiometric response of Ca^{2+} ISE based on the ionophoric antibiotic tetronasin and its electrochemical characteristics found from EIS spectra. All the recorded spectra for this ionophore displayed a single semicircle, thanks to its extremely fast ion exchange characteristics. Specially, the particular super-Nernstian response found also follows equivalent interpretations with emf measurements or with impedance analysis.

Directions to aid in getting an optimised formulation of the PVC membrane can be followed from the minimization of the bulk resistivity, either from the use of borate salt, form of the ionophore or nature of the plasticizer used.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge sample gifts of Tetronasin by Prof. Jim Staunton and Dr. Paul Gates, Cambridge, UK. Financial support for this work was provided by the Ministry of Science and Technology (MCyT, Madrid, Spain) through Project PPQ2001-1950, and by the Department of Universities and the Information Society (DURSI) from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] S.L. Less, P.F. Leadlay, C.J. Dutton, J. Staunton, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 3519.
- [2] T. Fonseca, N.P. Lopes, P.J. Gates, J. Staunton, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 325.
- [3] T. Martinek, F.G. Riddell, T.J. Rutherford, S. Sareth, C.T. Weller, *Chem. Commun.* 17 (1998) 1893.
- [4] J. Grandjean, P. Laszlo, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 3319.
- [5] D. Amman, *Ion-selective Microelectrodes. Principles, Design and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- [6] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Prestsch, *Electroanalysis* 11 (1999) 915.
- [7] S. Umeyama, P. Bühlmann, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* 70 (1998) 445.
- [8] S.M. Park, J.S. Yoo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 455A.
- [9] D.B. Kell, C.L. Davey, in: A.E.G. Cass (Ed.), *Biosensors: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990 (Chapter 5).
- [10] V. Cosofret, E. Lindner, R.P. Buck, R.P. Kusy, J.Q. Whitley, *Electroanalysis* 5 (1993) 725.
- [11] T. Lindfors, A. Ivaska, *Anal. Chim. Acta* 437 (2001) 171.
- [12] R.D. Armstrong, A.K. Covington, W.G. Proud, *J. Electroanal. Chem.* 257 (1988) 155.
- [13] A.L. Smirnova, S.S. Levitchev, V.L. Khitrova, A.L. Grekovich, Y.G. Vlasov, A. Schwake, K. Cammann, *Electroanalysis* 11 (1999) 763.
- [14] W. Zhang, U.E. Spichiger, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2259.
- [15] C. Gabrielli, P. Hemery, P. Letellier, M. Masare, H. Perrot, M.I. Rahmi, M. Turmine, *Electrochim. Acta* 47 (2002) 2117.
- [16] E. Lindner, K. Toth, E. Pungor, *Dynamic Characteristics of Ion-selective Electrodes*, CRC Press, Boca Raton, 1988 (Chapter 4).
- [17] R.D. Armstrong, G. Horvai, *Electrochim. Acta* 35 (1990) 1.
- [18] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1851.

ARTICLE 2:

“Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water”. Daniel Calvo, Michael Größl, Montserrat Cortina i Manel del Valle. *Electroanalysis*, 19 (2007) 644-651.

Full Paper

Automated SIA System Using an Array of Potentiometric Sensors for Determining Alkaline-Earth Ions in Water

Daniel Calvo, Michael Größl, Montserrat Cortina, Manuel del Valle*

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Spain

*e-mail: manel.delvalle@uab.es

Received: October 18, 2006

Accepted: December 20, 2006

Abstract

This work deals with the simultaneous determination of Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Ba^{2+} in water using a PVC-membrane potentiometric sensor array and multivariate calibration, in what is known as electronic tongue. The subsequent processing of the data was based on the use of a multilayer artificial neural network (ANN). The information needed for training or generation of the model was obtained with the aid of an automated analytical system based on the Sequential Injection Analysis (SIA) technique. The modeling ability was verified with an external set of standards, and next the determinations were performed in real samples of mineral waters, where close results for Mg^{2+} and Ca^{2+} were obtained to those obtained with reference methods. The determination of Ba^{2+} can be considered as semi-quantitative for synthetic samples – due to the absence of Ba^{2+} in mineral waters, its concentration in real samples was not measured.

Keywords: Potentiometric sensor array, Artificial neural networks, Sequential injection analysis, Calcium, Magnesium, Barium

DOI: 10.1002/elan.200603763

1. Introduction

The simultaneous determination of magnesium, calcium and barium ions in water samples is attempted with a recent approach in the sensor field, which is the electronic tongue (abbreviated e-tongue). An e-tongue can be defined as an analytic instrument which includes an array of sensors with cross-sensitivity pattern that is able to recognize quantitatively and qualitatively the composition of both simple and complex solutions [1, 2]. To do this, the employment of a chemometric data processing tool is mandatory. The sensing part can be an array of simple sensors with poor-selectivity features, for instance ion-selective electrodes (ISEs) [3, 4]; it can also be composed by sensors that generate complex readings, for instance in voltammetric measurements [5]. There is a large compilation in the literature [6–8] about selectivity features of ISEs. The variety of selectivities permits a lot of possibilities for constructing e-tongues aimed at different applications. As all the sensors respond to different analytes simultaneously in a cross-response pattern, a large amount of information is needed for the proper modeling of the system's response.

An important aspect in the e-tongue is the subsequent processing of the data in order to obtain coherent and useful results. This is achieved through the use of chemometric methods able to collect significant information obtained by the sensors, to select important features and to interpret results. For quantitative purposes, a useful choice is the use of Artificial Neural Networks (ANNs) [9–12] or Partial

Least Squares (PLS) [11, 13]. In order to achieve qualitative analysis and classification of samples, Discriminant Analysis (DA), Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) or PLS-DA are some of the used chemometric tools [14]. Principal Component Analysis (PCA) is also of current use to visualize the data structure obtained from sensor arrays [11]. A superior performance of ANNs with respect to PLS has been previously noticed [15] for the determination of Cl^-/Br^- mixtures using a potentiometric sensor array formed by four polycrystalline sensors.

Recently in our laboratory, we have started a research line dealing with the use of e-tongues, mainly for quantitative multidetermination applications [16]. In this line, soon we realized the high experimental effort involved in the generation of the departure information, i.e. appropriate mixed standards and their corresponding measured responses, needed for the building of the quantitative model, what normally forms the training process of an ANN. The proposed strategy to overcome this disadvantage has been the use of automated analytical systems to generate mixtures of analytes as standards, and to simultaneously acquire the complex responses to be processed by the chemometric modeling tools [17, 18], facilitating in this way the building of the response model.

Then, the acquisition of the large number of empirical information needed to train the system, ca. one hundred experimental points, is realized by the use of a Sequential Injection Analysis (SIA) system. Its operation, employing in-lab developed software, generates individual mixtures of

the three considered ions, which are brought to the sensor array and permits to perform the measurements. After the optimization of the ANN model, the modeling ability is checked with a subset of standards equally prepared. Finally, samples are processed in the same manner. The determination of alkaline-earth ions is performed in commercial mineral waters as the selected case study. The obtained results are compared to their equivalents obtained by standard analytical methodologies.

2. Experimental

The goal is to develop an advanced analytical system (e-tongue) based on the treatment of the multidimensional data generated by a sensor array of ion-selective electrodes in combination with an automated liquid handling system. The study demonstrates the use of an array of ISEs, with cross-response to alkaline earth ions, in conjunction with an SIA system in order to facilitate the training of ANNs and to enable the multidetermination of these species in real samples. The combination of three different concepts is needed for the objectives planned in this work: the sensor

array, the automation aspects and the chemometric tool used.

2.1. Sensor Array

The potentiometric sensor array was formed by 5 flow-through sensors of an all-solid-state type [18], as shown in the insert of Figure 1. These electrodes were prepared departing from an electrical connector inserted in a perspex tube body. The body was filled with an internal ohmic contact made from an epoxy-graphite composite, as normal transducer in our laboratories [19]. The polyvinylchloride (PVC) membranes were solvent cast, covering the inner wall of a hole made in the conductive composite. Once formed, the membranes were conditioned in a solution 0.01 M of their primary ion for 24 h. The compositions of the five used membranes are summarized in Table 1.

The ionophores employed were tetronasin (provided by the University of Cambridge, UK [23]), bis(bis(4-1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl)phosphate calcium salt (BBTP) (Fluka), ETH 1001 (Fluka), monensin (Acros) and lasalocid (Fluka). The used ionic additive was potassium tetrakis (4-

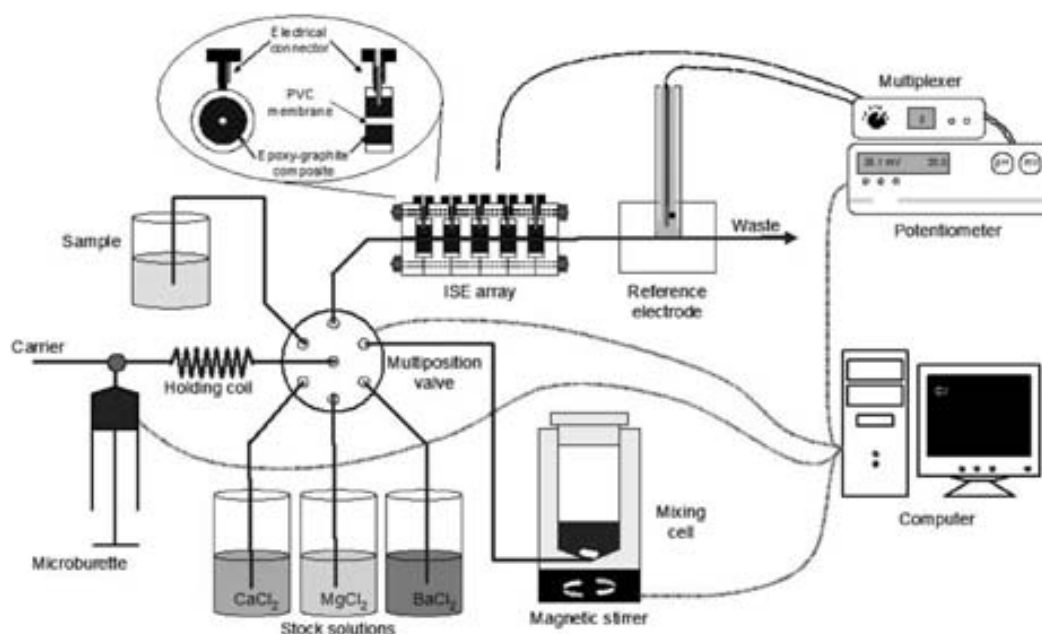


Fig. 1. The automated SIA e-tongue for the determination of alkaline-earth ions. The inset shows the design of the tubular flow-through potentiometric sensor used.

Table 1. Formulation of the potentiometric PVC membranes used in the automated e-tongue.

Sensor	PVC (wt%)	Plasticizer (wt%)	Ionophore (wt%)	Additive (mol%) [a]	Ref.
Calcium I	33.3	o-NPOE (65.2%)	ETH1001 (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (50%)	[20]
Calcium II	30.5	DOPP (64.5%)	BBTP (5.0%)	–	
Calcium III	32.8	o-NPOE (66.1%)	Tetronasin (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (20%)	[21]
Generic I	32.2	o-NPOE (66.3%)	Monensin (1.0%)	K ⁺ TpCIPB ⁻ (50%)	[22]
Generic II	27.0	DBS (70.0%)	Lasalocid (3.0%)	–	[22]

[a] relative to ionophore

chlorophenyl borate ($K^+TpCIPB^-$) (Fluka). The used plasticizers were dioctyl phenylphosphonate (DOPP) (Fluka), 2-nitrophenyloctylether (o-NPOE) (Fluka), and dibutyl sebacate (DBS) (Fluka). As a polymeric matrix, PVC (Fluka) was used and tetrahydrofuran (Merck) as a volatile solvent. In this way, from the five different sensors forming the array, three of these were rather selective towards calcium and the other two were of generic response to alkaline-earth ions.

The materials utilized in the construction of internal ohmic contact were: graphite with particle size of 50 μm (BDH Laboratory Supplies), resin Araldit M (Uneco) and hardener HR (Uneco).

In the preparation of the different solutions, bidistilled water and analytical grade reagents were used. The carrier solutions were prepared using citric acid (Panreac), adapting the pH using a 1M solution of lithium hydroxide (Fluka). For the characterization of the sensors, calcium chloride (Riedel-de Haen), magnesium chloride (Merck) and barium chloride (Fluka) were used.

2.2. Automated SIA System

The used SIA system (Figure 1) comprised two clearly distinct parts: a fluid system and a measurement system. The fluid system comprised a Crison 2030 automatic microburette (Crison Instruments), fitted with a syringe of 5 mL (Hamilton) and controlled entirely by a PC; a Hamilton MVP valve (Hamilton) with six ports (Ref HVXM R36760), also controlled by computer; a 7 mL Perspex mixing chamber with a conical base to aid emptying, used to homogenize the solutions; and a holding coil, formed by a PTFE tube (Bioblock) with an internal diameter of 1 mm and a total inner volume of 5 mL. The elements were connected together using low-pressure liquid chromatography connectors.

The general procedure of operation is easily illustrated following the manifold. The common port of the multiport valve was connected to the burette with the holding coil placed in between. The burette was connected to the carrier solution reservoir. The common port may access any of the other ports, which led to sample, standard solutions or reagents, mixing chamber and sensor array, by electrical rotation of the valve. In order to assure proper mixing of the solutions, a mixing chamber was used in our application, into which the volume of the holding coil could be injected. After that, the solution was propelled for detection towards the five tubular flow-through type sensors and the measurement was completed on-line.

The measurement system utilized the detection system (sensor array incorporated into the system in series), a Ag/AgCl double-junction reference electrode (ThermoElectron 900200), a Crison 2002 potentiometer and a multiplexer built in our laboratories, enabling up to eight electrodes to be controlled and which was itself controlled by computer, the latter picking up the signal of the potentiometer.

2.3. Chemometric Processing Tool

The subsequent processing of the data was based on the use of a multilayer artificial neural network, trained with backpropagation algorithms. ANN models were obtained by specific code written in MATLAB 6.5 environment and through use of its Neural Network Toolbox (v. 4.0).

2.4. Procedures

The ISEs were characterized constructing the calibration curve for each cation and using different buffer media. Based on our previous experience [21], calibration curves were tested using the 5 mM Citric/Citrate buffer at pHs 4.0 and 5.0.

Sensors were also characterized by multidimensional calibrations towards two ions (Figure 2). For every one of those, a model was fit according to Nikolskii–Eisenmann,

$$E = A + B \log(C_x + k_{x,y}^{\text{pot}} C_y^{Z_x/Z_y}) \quad (1)$$

(where Z_x and Z_y are the charges of the primary and interfering ions, at concentrations C_x and C_y , respectively), and the representation of the response's surface was calculated and shown graphically; this procedure permitted to obtain the potentiometric selectivity coefficient ($k_{x,y}^{\text{pot}}$), in this case with a great experimental significance, given the concentrations of the two ions are varied simultaneously.

For the calibration of the e-tongue, a set of 60 samples consisting of random mixtures of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} (Figure 3) was prepared by the SIA system. The studied concentrations ranges which the net was trained into were between 0–50 mM for the three cations. All potentiometric

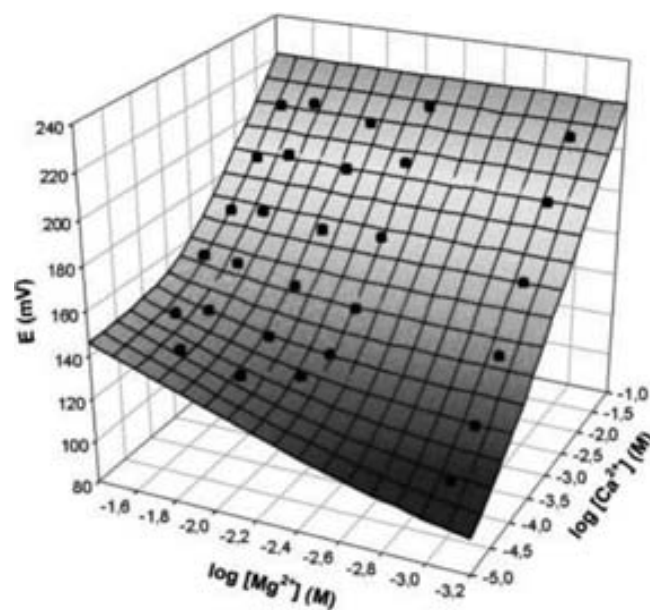


Fig. 2. 3D plot of an interference study with two degrees of freedom for one of the calcium sensors used.

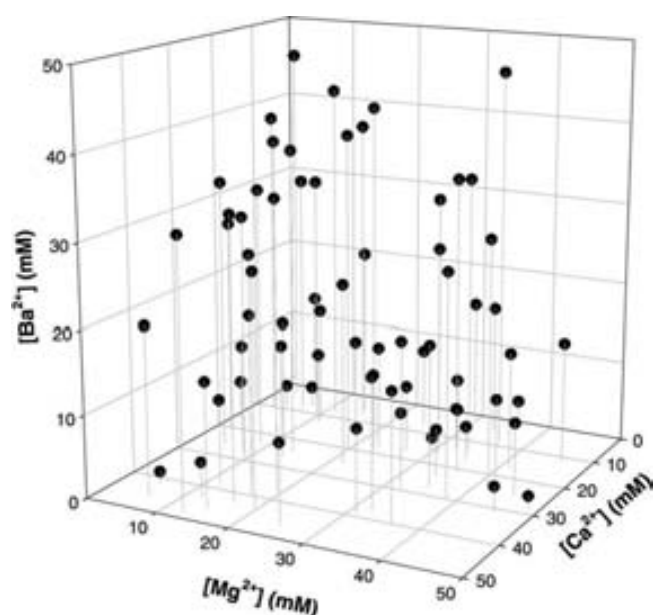


Fig. 3. Distribution of concentrations of the three ions (calcium, magnesium and barium) for the 60 training and test samples prepared automatically by the SIA system.

measurements were performed with equivalent ionic media (5mM Citric/Citrate buffer at optimized pH). The SIA system also performed the sample step and the measure of the steady state potential recording for the 5 ISEs array.

Once the initial information was generated, it was divided into three subsets for training, internal validation and external validation. The points for every subset are selected randomly, only the extreme values of the net are reserved for training. This precaution has to be made in order to avoid extrapolation when processing the external test set. In our case, the training set contained 30 points, the internal validation set 15 points, and the external validation set 14 points – 1 point was eliminated due to problems during the measurement. When using the Bayesian regularization algorithm for training, a internal validation set is not required and 39 points are used in the training set, 20 in the external validation set.

For the proper modeling with an ANN, we studied and optimized its topology, the training algorithm and the transfer functions used in each layer. ANNs used were trained employing backpropagation algorithms [24], viz. Gradient Descent with Momentum (GDM), Levenberg–Marquardt (LM) and Bayesian Regularization (BR) [25].

The initial data were normalized between $[-1, 1]$ to facilitate training. Architectures with a single hidden layer were always used, as our previous experience has proven them appropriate [16, 18]. The studied nets were formed by 5 input neurons (one per each ISE) and 3 neurons (one per each cation) in the output layer, as defined by input and output information. The number of neurons in the hidden layer was varied from 3 to 13, and different transfer functions were tested in these (sigmoidal and linear).

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Sensors

No significant differences were found from the calcium calibration curves of the ISEs Calcium I and Calcium II at different pHs. However, there was an improvement in the sensitivity for the rest of electrodes at pH 5.0; the Calcium III electrode increased 7 mV/dec its sensitivity and the Generic electrodes increased more than 12 mV/dec at this pH. Also, the detection limits were lower in almost every case at pH 5.0. Consequently, for the rest of the experimental work, a 5mM citric/citrate carrier solution at pH 5.0 was chosen.

The sensors employed in the final sensor array were characterized by multidimensional calibrations towards two ions. These 3D calibrations allow the study of interferences which was of high practical significance, obtaining the values of the potentiometric selectivity coefficients as contained in the Nikolskii–Eisenmann equation ($k_{x,y}^{pot}$) with two degrees of freedom. In this way, a more practical meaning was given to the potentiometric selectivity coefficient, in comparison to those obtained by classical calculation (fixed interference method or separate solutions method [26]) in which some species is kept constant.

Figure 2 shows the response of the Calcium I sensor, employing ETH1001 as ionophore, considering calcium as primary ion and magnesium as interferent. The stronger curvature of the graph with increasing concentration of the interferent can be observed clearly. The obtained potentiometric selectivity coefficients for this example and for all studied cases are summarized in the Table 2.

In conclusion, the responses obtained through multidimensional calibrations were rather satisfactory. The calcium-selective electrodes employing ETH1001 and BBTP showed the expected responses towards calcium also in the presence of magnesium and barium; the cross-selective generic electrodes showed acceptable responses to all three of the ions and therefore stronger interference effects. In the case of the Generic II employing a membrane based on lasalocid, the calculation of the potentiometric selectivity coefficient was only possible for the calibration

Table 2. Calculated potentiometric selectivity coefficients for the different used electrodes, using the Citric/Citrate buffer at pH 5.0 media.

ISE	Primary ion	Interfering ion	$\log K_{Ca^{2+}, X^{2+}}^{pot}$
Calcium I	Ca^{2+}	Mg^{2+}	-1.86 ± 0.17
		Ba^{2+}	-2.13 ± 0.25
Calcium II	Ca^{2+}	Mg^{2+}	-2.42 ± 0.21
		Ba^{2+}	-2.14 ± 0.21
Calcium III	Ca^{2+}	Mg^{2+}	-2.08 ± 0.15
		Ba^{2+}	-0.92 ± 0.08
Generic I	Ca^{2+}	Mg^{2+}	-0.57 ± 0.09
		Ba^{2+}	-0.64 ± 0.12
Generic II	Ca^{2+}	Mg^{2+}	-0.52 ± 0.11
		Ba^{2+}	–

for calcium with magnesium as interferent, in the other case Nernstian responses were not clearly obtained.

3.2. Building of the Response Model Employing ANNs

The ANN model used to describe the mixed response was formed by five neurons in the input layer, one for every sensor. The number of neurons in the output layer was also fixed a priori: it had to be three, one for every ion to be quantified (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+}).

As the first factor to consider, the data was normalized prior to training to values between 1 and -1 which simplifies the modeling, as demonstrated by studies carried out earlier [18]. Next, the parameters to obtain an optimal ANN model had to be considered. These included the actualization of the weights, the numbers of neurons in the hidden layer, the maximum number of iterative epochs, the training algorithm, and the transfer functions in the different layers.

The parameters for the actualization of the weights were, for the gradient algorithms, the learning rate factor (η) and the momentum (β). Considering preliminary studies [18], these parameters were fixed at $\eta = 0.1$ and $\beta = 0.4$.

The different training algorithms for the ANN with backpropagation were GDM, LM, and BR. The number of neurons in the hidden layer was varied between 3 and 12, keeping in mind that a high number of neurons in the hidden layer increased the risk of overfitting. The used transfer functions consisted of non-linear functions for the hidden layer (logsig or tansig) and a linear function for the output layer.

Once all possible combinations of the parameters (training algorithm, transfer function for the hidden layer and number of neurons in this) were studied systematically (resulting in more than 40 different configurations of the ANN), it could be clearly seen that the ANN best capable of modeling the presented data was the Bayesian regularization algorithm (BR) in combination with a tansig transfer function for the hidden layer formed by 3 neurons (Figure 4).

In the performed set of tests, the GDM algorithm was discarded, as the learning process was too slow. Similarly, Levenberg–Marquardt “early stopping” algorithm showed overfitting problems and poor prediction capacity. Analogously, the use of linear transfer functions in the hidden layer did not yield appropriate models.

In order to visualize the correct modeling, the obtained values were represented versus the expected ones for the external validation set, a separate set of measured standards not participating in the training process. These comparison graphs are represented on Figure 5, one for each ion considered. In these graphs, the dashed line represents the ideal values and the solid one the regression of the obtained vs. the expected values. If we had a perfect fit (outputs exactly equal to targets), the slope would be 1, and the ordinate would be 0. The obtained values for the linear regression of the compared data are summarized in table 3.

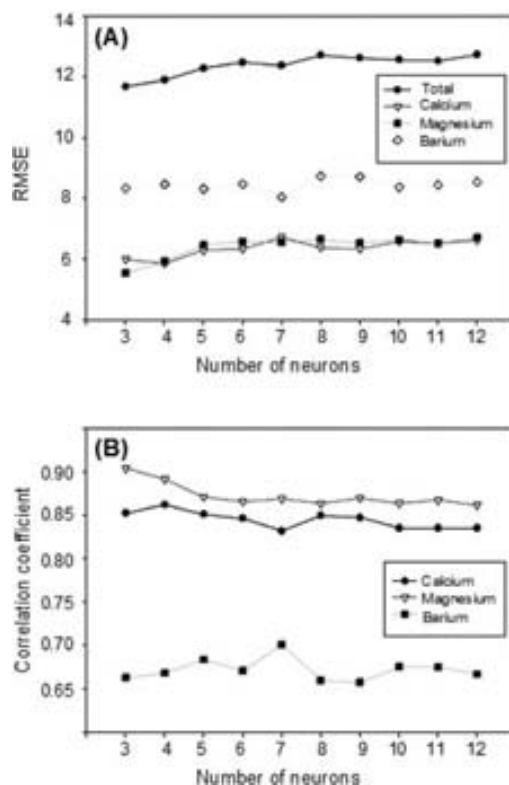


Fig. 4. Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model. A) RMSE values obtained for calcium, magnesium, barium and total RMSE. B) Correlation coefficients for the three studied ions.

As can be seen, the numbers were close for calcium and magnesium, with highly significant correlation values (r) which presumes a non-random relationship. The results for barium ion were not as good as the other two. Anyhow, although its determination is only semi-quantitative, its interfering presence was fully compensated for the other two considered ions.

To check if correlation existed for barium although the correlation coefficient was rather low, the t value for the correlation coefficient was calculated using Equation 2 and compared with the tabulated t value [27]:

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (2)$$

where r stands for the correlation coefficient and n for the number of points (20 in our case). This is the Snedecor test of correlation between predicted and expected values to statistically confirm a significant relationship, measured in normalized standard deviation values (t values). If the calculated t value is greater than the tabulated value, we can conclude that correlation does exist. The calculated value ($t_{\text{calculated}} = 3.60$) was greater than the tabulated one ($t_{95\%} = 2.09$) – therefore, the existence of correlation is confirmed

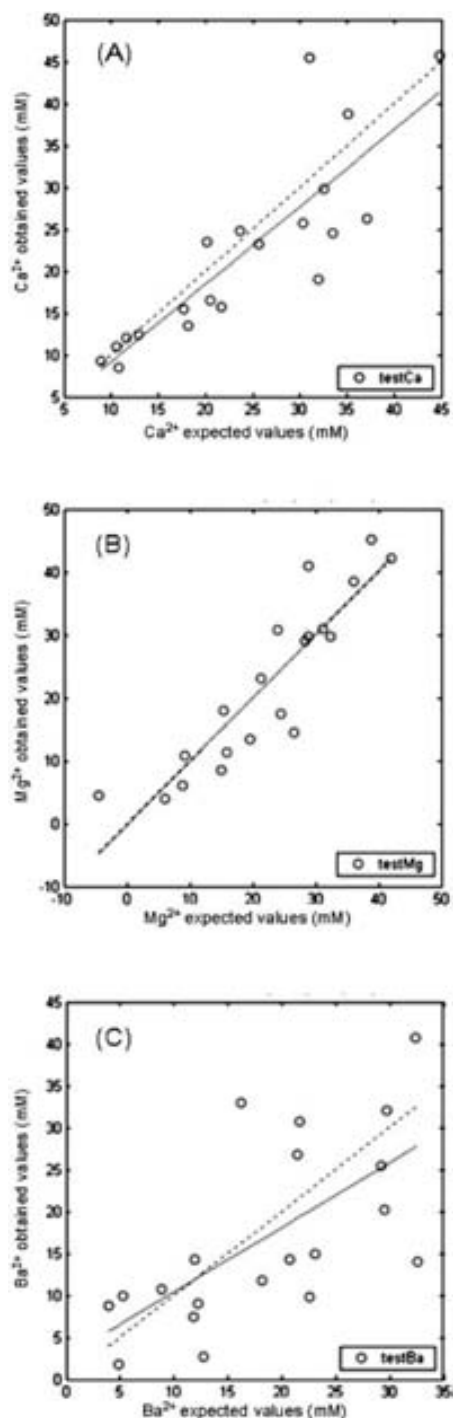


Fig. 5. Comparison graphs between expected and obtained concentration for calcium (A), magnesium (B), and barium (C) ions, pertaining to the external test set.

for barium ion, however the response model had a poor performance with the test samples.

In order to make sure that the obtained results did not correspond to a local minimum, a supplementary test was carried out, in which the initial values of the weights were selected randomly. In this way, the training of the ANN was reinitialized 5 times. The results were compared – if they are corresponding, the system did not get trapped in a local

Table 3. Summary of the regression lines obtained for each compared ion, obtained (Y) vs. expected (X) concentration (confidence intervals calculated at 95% confidence level).

	Comparison line	Correlation
Training		
Ca^{2+}	$Y = (0.92 \pm 0.19) \cdot X + (1.89 \pm 0.04)$	0.960
Mg^{2+}	$Y = (0.79 \pm 0.28) \cdot X + (4.60 \pm 0.06)$	0.904
Ba^{2+}	$Y = (0.81 \pm 0.23) \cdot X + (3.88 \pm 0.07)$	0.905
Test		
Ca^{2+}	$Y = (0.92 \pm 0.19) \cdot X + (-0.04 \pm 0.05)$	0.854
Mg^{2+}	$Y = (1.01 \pm 0.24) \cdot X + (0.25 \pm 0.28)$	0.898
Ba^{2+}	$Y = (0.77 \pm 0.32) \cdot X + (2.68 \pm 2.14)$	0.658
Real samples		
Ca^{2+}	$Y = (1.09 \pm 0.20) \cdot X + (0.01 \pm 0.06)$	0.930
Mg^{2+}	$Y = (0.94 \pm 0.11) \cdot X + (0.06 \pm 0.07)$	0.972

minimum. This was demonstrated by the reduced dispersion of replicate results, as the root mean square error (RMSE) for the three ions had an average value of 11.8164 with a 0.0096% RSD which suggests consistent model results. Additionally, when the obtained residuals were revised to check their distribution, comparable spreads of the RMSE and the residuals for the different fits could be observed.

Before any application, the model of the electronic tongue for the determination of alkaline-earth ions was tested with manually prepared samples. Therefore, 4 synthetic samples containing a specific concentration of each ion within the considered concentration range were prepared in the laboratory in a 5 mM citric/citrate buffer at pH 5,0 in order to assure similar conditions as during training, and were measured using the SIA system.

Once the information was gathered, it could be entered as an input to the optimal ANN already trained, in the same way as for the external validation set. The results for calcium and magnesium were rather good except for one outlier in the case of magnesium. In the case of barium, one very good value was obtained, but also a very bad one with a relative error of more than 50 percent. Finally, a Student's t test was performed with these data to check if there were significant differences between the obtained and expected values with a confidence level of 95% and 3 degrees of freedom. It could be confirmed that there were no significant differences for calcium and magnesium with $t_{exp} (\text{Ca}^{2+}: 0.40; \text{Mg}^{2+}: 2.85) < t_{tab} (3.18)$. As stated before, the model was not able to predict new barium samples.

3.3. Application to Mineral Water Samples

Once the viability for the determination of these ions in synthetic samples was proven, the analysis were performed in real samples of mineral waters, and the results were compared with reference values, obtained with standard analytical procedures (atomic absorption spectroscopy). The 13 samples (2 of them sparkling waters) had total hardness between 66–315 mg CaCO_3/L ; 1 of these samples can be classified as soft water (0–20 mg Ca/L), 6 as

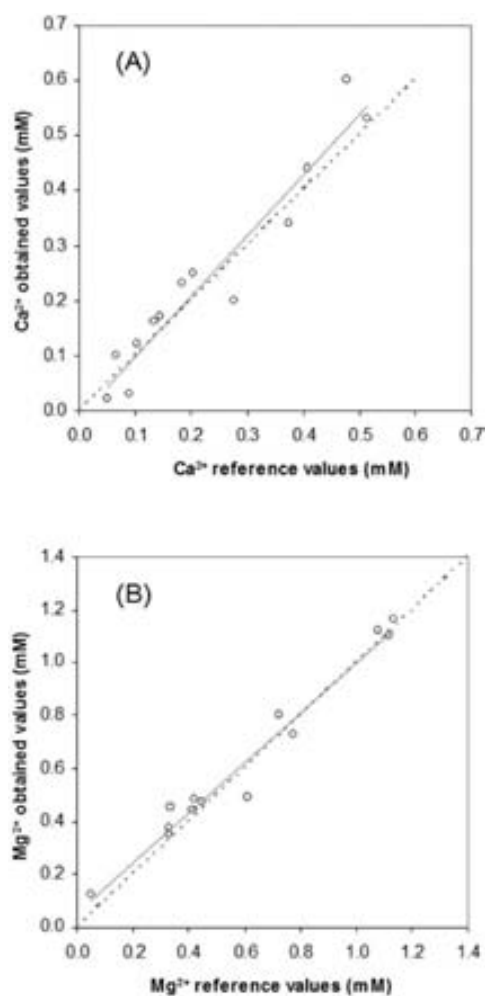


Fig. 6. Comparison between reference and obtained concentration values of calcium (A) and magnesium (B) for the final application employing mineral water samples.

moderately soft water (20–40 mg Ca/L), 2 as slightly hard water (40–60 mg Ca/L), 1 as moderately hard water (60–80 mg Ca/L) and 3 as hard water (80–120 mg Ca/L).

Since the mineral waters do not contain barium, only calcium and magnesium were further considered. After automatically measuring and interpolating in the ANN model, the obtained data were again plotted in order to check agreement of results, as shown in Figure 6. The dashed line represents the ideal values, and the solid one the regression of the obtained vs. the expected values. The two lines for each ion are clearly superimposed, proving the close-to-ideality results, both for calcium and magnesium ions. The linear regression of these data are shown on Table 3, again demonstrating a significant comparability, given the slopes are indistinguishable from 1 and the intercepts from 0.

Close results were then obtained for the considered ions (with 0.054 and 0.048 RMSE for Ca^{2+} and Mg^{2+} fittings respectively), in the mineral water samples.

4. Conclusions

An automated e-tongue was built by coupling an SIA system to an array of potentiometric sensors. This enabled the automated, simultaneous characterization of the sensors and also was able to generate automatically, and with a high degree of randomness, the information involved for the training of the ANN to model its response. The automation aspect permitted the reduction of the experimental effort required to generate the departure information, from weeks to hours.

The e-tongue, once optimally trained, was able to determine calcium and magnesium ions in mineral water samples, in a very simple and direct procedure, where the experimental complexity is shifted from the analytical techniques and principles to the data processing steps. Barium could be determined only semiquantitatively; perhaps by adding better responding barium sensors to the array could improve this point. Nevertheless, its presence could be fully corrected, as no interference of this ion was displayed.

This work may be considered a model application case, where the electronic tongue concept is used for an automated multidermination of close related species.

5. Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the MECED (Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134, and by the Generalitat de Catalunya. We thank Albert Gutes for his contribution in early SIA e-tongue systems.

6. References

- [1] M. Holmberg, M. Eriksson, C. Krantz-Rülcker, T. Artursson, F. Winquist, A. Lloyd-Spez, I. Lundström, *Sens. Actuators B* **2004**, *101*, 213.
- [2] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1965.
- [3] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De-Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 248.
- [4] J. Gallardo, S. Alegret, M. A. de Roman, R. Muñoz, P.R. Hernandez, L. Leija, M. del Valle, *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 2893.
- [5] F. Winquist, P. Wide, I. Lundström, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *357*, 21.
- [6] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1851.
- [7] Y. Umezawa, K. Umezawa, P. Bühlmann, N. Hamada, H. Aoki, J. Nakanishi, M. Sato, K. P. Xiao, Y. Nishimura, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 923.
- [8] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, N. Hamada, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 995.
- [9] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, *Sens. Actuators B* **1997**, *44*, 532.
- [10] M. Bos, A. Bos, W. E. van der Linden, *Anal. Chim. Acta* **1990**, *233*, 31.
- [11] V. Pravdová, M. Pravda, G. G. Guilbault, *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 2389.

- [12] W. H. Chan, A. W. M. Lee, D. W. J. Kwong, Y. Liang, K. Wang, *Analyst* **1997**, *122*, 657.
- [13] J. Mortensen, A. Legin, A. Ipatov, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, K. Hjuler, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *403*, 273.
- [14] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Sens. Actuators B* **2006**, *114*, 85.
- [15] M. Baret, D. L. Massart, P. Fabry, F. Conesa, C. Eichner, C. Menardo, *Talanta* **2000**, *51*, 863.
- [16] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De Román, L. Leija, P. R. Hernández, M. del Valle, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 248.
- [17] A. Gutés, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* **2005**, *66*, 1187.
- [18] M. Cortina, A. Gutés, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* **2005**, *66*, 1197.
- [19] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 296.
- [20] M. H. Lee, C. L. Yoo, J. S. Lee, I. Cho, B. H. Kim, G. S. Cha, H. Nam, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2603.
- [21] D. Calvo, J. Bartroli, M. del Valle, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 1569.
- [22] K. Suzuki, K. Tohda, H. Aruga, M. Matsuzoe, H. Inoue, T. Shirai, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1714.
- [23] T. Fonseca, N. P. Lopes, P. J. Gates, J. Staunton, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2004**, *15*, 325.
- [24] F. Despagne, D. L. Massart, *Analyst* **1998**, *123*, 157.
- [25] H. Demuth, M. Beale, *Neural Network Toolbox for use with MATLAB*, Mathworks Inc., Natick, MA **1992**.
- [26] R. P. Buck, E. Lindner, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2527.
- [27] J. C. Miller, J. N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, Harlow **2000**, ch. 5.

Wiley-VCH BUCH-SHOP

• • • • • Durchblick mit Wiley-VCH-Lehrbüchern • • • • •



H. Scheck / B. Scheck

Wirtschaftliches Grundwissen für Naturwissenschaftler und Ingenieure

„Eine schöne Einführung in die Verflechtungen von Wirtschaft, Recht und Technik“
(Rezension aus Amazon.de).

approx. 311 pp, pr, € 39.90
ISBN-10: 3-527-31671-X
ISBN-13: 978-3-527-31671-7



H. F. Ebel / C. Bliefert / W. Greulich

Schreiben und Publizieren in den Naturwissenschaften

Das Standardwerk auf den neuesten Stand gebracht - unentbehrlich für alle, die publizieren wollen oder müssen.

672 pp, cl, € 42.90
ISBN-10: 3-527-30802-4
ISBN-13: 978-3-527-30802-6

Online-Bestellung über: <http://www.wiley-vch.de>

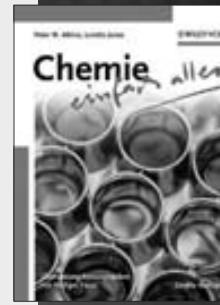
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA · Postfach 10 11 61 · D-69451 Weinheim
Tel: 49 (0) 6201/606-400 · Fax: 49 (0) 6201/606-184 · E-Mail: service@wiley-vch.de

P. W. Atkins / L. Jones

Chemie - einfach alles

Für die Vermittlung des gesamten Basiswissens in der Chemie ist dieser Titel einfach ein Allrounder. Mit Recht kann man dieses Werk als drei Lehrbücher in einem bezeichnen, das die Allgemeine und Anorganische, Organische und Physikalische Chemie abdeckt.

1107 pp, cl, € 65.00
ISBN-10: 3-527-31579-9
ISBN-13: 978-3-527-31579-6



H.-J. Quadbeck-Seeger

Das historische Periodensystem - Wer hat was entdeckt?

Die Entdeckung der Elemente zählt zu den größten Leistungen des Forschergeistes. Wer hat sie entdeckt, und wann? Dies zeigt das im Stil Andy Warhols gestaltete Periodensystem auf einen Blick.

Nonbook/Nonelectronic, € 99.50
ISBN-10: 3-527-31839-9
ISBN-13: 978-3-527-31839-1



Preisänderungen vorbehalten!



BS_0610_CL_10_1-21

 WILEY-VCH

ARTICLE 3:

“Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue. Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array”. Daniel Calvo, Alejandro Durán i Manel del Valle. *Analytica Chimica Acta*, acceptat novembre de 2007. doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue

Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array

Daniel Calvo^a, Alejandro Durán^b, Manel del Valle^{a,*}

^a Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Materials and Reactants Institute, Havana University, Havana, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2006

Received in revised form

22 November 2006

Accepted 27 November 2006

Keywords:

Potentiometric sensor array

Electronic tongue

Sequential injection analysis

Fourier transform

Artificial neural network

ABSTRACT

An electronic tongue based on the transient response of an array of non-specific-response potentiometric sensors was developed. A sequential injection analysis (SIA) system was used in order to automate its training and operation. The use of the transient recording entails the dynamic nature of the sensor's response, which can be of high information content, of primary ions and also of interfering ions; these may better discriminated if the kinetic resolution is added. This work presents the extraction of significant information contained in the transient response of a sensor array formed by five all-solid-state potentiometric sensors. The tool employed was the Fourier transform, from which a number of coefficients were fed into an artificial neural network (ANN) model, used to perform a quantitative multidetermination. The studied case was the analysis of mixtures of calcium, sodium and potassium. Obtained performance is compared with the more traditional automated electronic tongue using final steady-state potentials.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

An electronic tongue (ET) can be defined as analytical instrument for liquid samples that is composed of two clearly different parts: the first is a sensing part that generates a high dimensional signal; this signal must be related with the composition of the sample [1]. The sensing part can be an array of simple sensors with cross-selectivity response [2,3]; it also can be composed by sensors that generate complex readings, for instance, in voltammetric measurements [4–6]. The other part of an ET is the chemometric tool for the pro-

cessing of the previously generated data. When the used tool is artificial neural networks (ANNs), a large amount of standards are needed to generate the response model; for this reason, techniques for automated preparation and/or measurement of hundreds of samples, like flow injection analysis (FIA) or sequential injection analysis (SIA) [2,4], have been used in conjunction with ETs. Apart from our experience, the coupling of automated flow techniques with the electronic tongue concept has been also proposed by Wróblewski [7] and Vlasov [8]. Typical applications are qualitative, for instance, classifying varieties of samples [9] or quantitative, the multi-

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5811017; fax: +34 93 5812379.

E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

0003-2670/\$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2006.11.079

determination of several compounds in a single measure stage [2–4,6].

There is a large compilation in the literature [10–12] about selectivity features of ion-selective electrodes (ISEs). The variety of selectivities permits a lot of possibilities for constructing ETs aimed at different applications.

Recently, in our laboratory we have developed ETs with arrays of ISEs in all-solid-state configuration, and employing the SIA [2] or FIA [3] techniques. Information used in there was the simple peak heights or the step response steady-state potential. But when the sensors are used in flow conditions, a richer signal can be acquired, which is the transient response to a step or pulse profile of sample arriving to the sensor array. This richer signal, which entails the dynamic nature of the sensor's response, can be of high information content, of primary ions and also interfering ions, which can be better discriminated thanks to the kinetic resolution added. Recently, the groups of Vlasov in St. Petersburg has been also exploring this idea, but with the FIA technique and partial least squares (PLS) tool [13].

The dynamic response of ISEs depends on various factors, including the nature of the electrode and the particular working conditions: for example, the time response is different when the primary ion is alone or in presence of interferents [14]; the speed of potentiometric response is also known to show different values if the activity of the primary ion is near to the detection limit. Moreover, the dynamic response can be different to the typical exponential rise if the principal ion is in presence of interferents [15]. A detailed case studied recently is the ion-selective electrode based on the antibiotic ionophore tetronasin [16].

The fact that the dynamic response of sensors can contain information about the sample seems evident, but dynamic signals present difficulties if a response model has to be obtained from them; the reason is the increased complexity of the departure information when the kinetic dimension is added. The usual approach is feature extraction of the data prior to modelling. Different procedures have been proposed in the literature for the compression and feature extraction of complex data applied to ETs or to equivalent applications. Some of these are: principal component analysis (PCA) [17–19], Wavelet decomposition [20–22], Legendre's polynomials [23,24] or the Fourier transform [22,25].

The aim of this work is to develop an ET using the dynamic response of an array of ISEs implemented in a SIA System. The method proposed as feature extraction is the Fourier transform, using a reduced number of Fourier coefficients as fed information to obtain a response model by artificial neural networks (ANNs). To demonstrate the applicability of this concept, we chose the multidetermination of calcium, sodium and potassium cations in real samples. For this purpose, a sensor array with five flow through sensors was used to show the improvements using the dynamic resolution. Also, a comparison between the obtained results and the results of the classic ET using simple steady-state potentials is made. Finally, we compare other chemometric tools, like partial least squares (PLS), to validate results obtained with ANNs.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared using doubly distilled water and proanalysis or better quality reagents.

The polymeric membranes responsible for the potentiometric response were prepared by deposition of a PVC membrane cocktail, formulated including the ionophore, an ionic additive (in some cases), the plasticizer and the polymer in tetrahydrofuran (THF, from Merck). The different ionophores used were: the sodium salt of the antibiotic tetronasin (provided by the University of Cambridge [26]), ETH1001 (Fluka), bis[(12-crown-4)methyl]-2-dodecyl-2-methylmalonate (BCMDM) (Dojindo Laboratories, Japan), valinomycin (Fluka) and dibenzo(18-crown-6) (DBC) (Fluka). These ionophores were selected with the aim to obtain information of calcium, sodium and potassium ions in a sample. The used plasticizers were 2-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE) and bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) (both from Fluka). The ionic additive was potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate ($K^+TpClPB^-$) (Fluka). The polymeric base of the membranes was Poly(vinyl chloride) high molecular weight (PVC) (from Fluka).

The internal ohmic contact of the all-solid-state electrodes was prepared by mixing the same quantities of graphite (BDH, UK) and epoxy resin Araldite M+HR Hardener (both from Uneco, Spain).

Others reagents for preparing stock solutions or buffers were: calcium chloride (Riedel-de Haën), sodium chloride (Merck), potassium chloride (Fluka), lithium hydroxide (Merck) and citric acid (Panreac).

2.2. ISE array

The array used in the proposed e-tongue was formed by five ISEs with different cross-selectivity response. The ISEs were manufactured in all-solid-state and tubular flow-through configurations, as shown in the insert of Fig. 1. These electrodes were prepared using an electrical connector inserted in a perspex tube body. The electrode body was filled with an internal ohmic contact made from an epoxy-graphite composite, as normal transducer in our laboratories [27]. The PVC membrane cocktails were solvent casted, covering the inner wall of a hole made in the conductive composite. Once formed, the membranes were conditioned in a solution 0.01 M of their primary ion for 24 h. The compositions of the five used membranes are shown in Table 1.

2.3. Instrumentation

The developed SIA system (Fig. 1) has two clearly different parts: a fluid system and a measurement system. The fluid system consisted of a Crison 2030 automatic microburette (Crison, Spain), fitted with a 5 ml syringe (Hamilton, Switzerland). It was controlled by a computer using a virtual instrument developed in Labview [28]; the system was completed by a holding coil, formed by a PTFE tube (Bioblock, France) with an i.d. of 1 mm and a total inner volume of 5 ml,

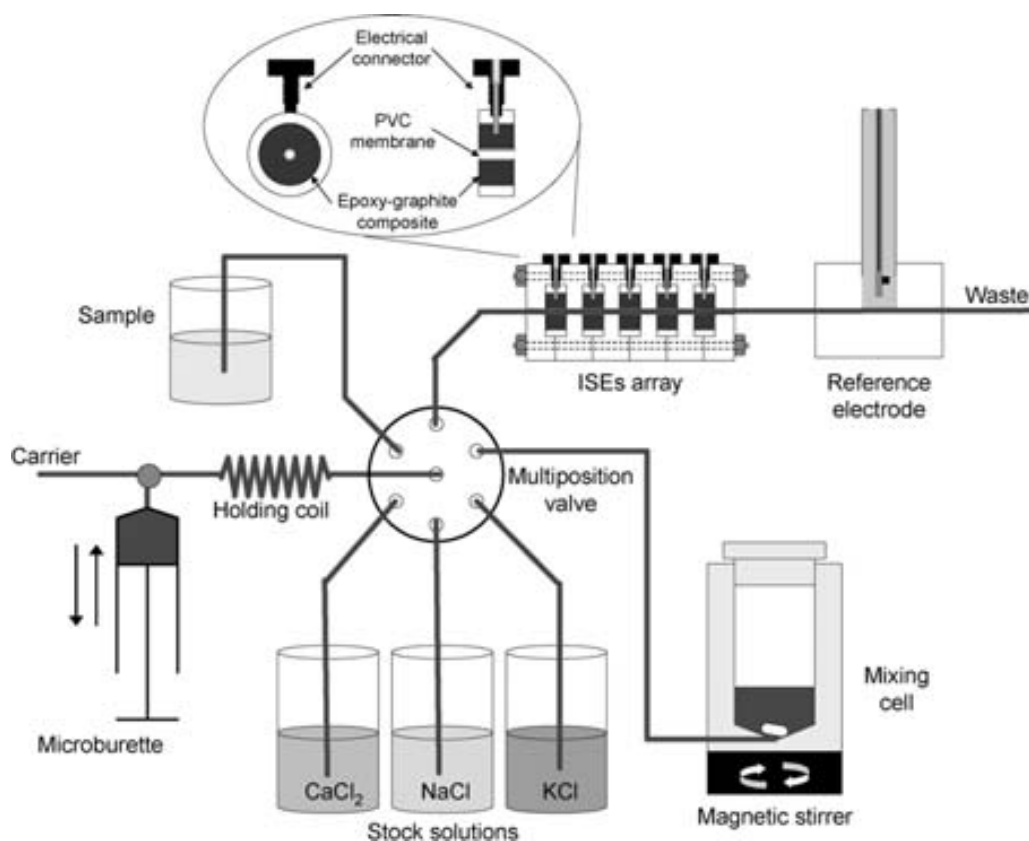


Fig. 1 – Manifold of the SIA technique used in this work. The inset shows the design of the flow-through tubular all-solid-state electrode.

a six-way Hamilton MVP valve (Hamilton, Switzerland) (Ref HVXM R36760), also controlled by PC, and a 7 ml methacrylate mixing cell with a magnetic stirrer, used to homogenise the solutions. The elements were connected together using low-pressure liquid chromatography connectors.

The measurement system comprised the detection system (the 5-sensor array placed in series), a Ag/AgCl double-junction reference electrode (Orion 900200) and an eight-channel multipotentiometer built in our laboratories connected to the ADC PCL-812PG multifunction I/O (Advantech, Taiwan), which was also controlled by the designed virtual instrument [28].

Communication between the computer (PC Pentium II at 233MHz) and various devices of the SIA system was achieved by means of RS-232 protocol.

2.4. Procedures

The ISE characterization was done constructing the calibration curve for each cation. The calibration consisted of recording the ISE potentials for primary ion solution with different concentrations, prepared automatically by the SIA system. The lower detection limit was taken at the point of intersection of the two asymptotic behaviours of the calibration curve, as recommended by IUPAC [29].

For the calibration of the ET, a set of 64 samples consisting of random mixtures of calcium, sodium and potassium was automatically prepared by the SIA system. All potentiometric measurements were performed with equivalent ionic media (buffer citric/citrate 5 mM at pH 5.0). The SIA system also per-

Table 1 – Membrane compositions of the ISEs used in the sensor array and its potentiometric response to calcium, sodium and potassium

Ion selective electrode	PVC (wt%)	Plasticizer, (wt%)	Ionophore (wt%)	Additive (wt%)	Sensitivity (mV/dec)		
					For Ca ²⁺	For Na ⁺	For K ⁺
Calcium (1)	32.9	o-NPOE, (66.0)	Tetronasin, (1.0)	K ⁺ TpClPB ⁻ , (0.14)	39.83	17.95	18.11
Calcium (2)	33.3	o-NPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	K ⁺ TpClPB ⁻ , (0.36)	40.21	12.01	3.43
Sodium	21.8	o-NPOE, (70.0)	BCMDM, (6.0)	K ⁺ TpClPB ⁻ , (2.20)	17.81	54.34	41.07
Potassium	30.7	DOS, (67.6)	Valinomycin, (1.1)	K ⁺ TpClPB ⁻ , (0.64)	–	21.28	32.35
Generic	29.0	DOS, (67.0)	DBC, (4.0)	–	15.06	9.66	13.63

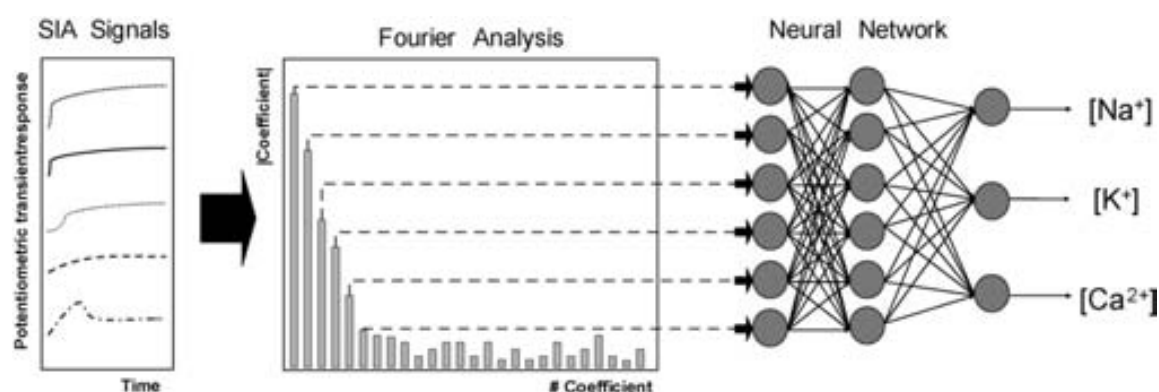


Fig. 2 – Scheme of the process for the extraction of significant information from the dynamic response and its use as input information for the ANN.

formed the sample step and the transient recording for the 5 ISEs array.

The data generated per sample were 256 potential readings (approximately 60 s) for each ISE, with a total of 256 readings \times 5 ISEs = 1280 total readings per sample. Fourier transform was used in order to compress the original transient response; we reduced from 1280 to 30 numeric values using the six first module coefficients from the Fourier transform for each sensor. These 30 variables (six Fourier coefficients \times 5 ISEs) were used as input information fed to the ANN model (Fig. 2).

ANNs were used in order to model the combined response of the three studied ions (calcium, sodium and potassium). ANNs were trained employing the Bayesian Regularisation algorithm as suggested from experience of the authors [2], optimizing the number of neurons in the hidden layer and also the transfer functions in the hidden and the output layers.

The set of 64 samples was divided into two subsets: (1) training: with 3/4 parts of total set (48 samples) which served to establish the response model; (2) test: with 1/4 parts of the set (16 samples) which served to evaluate the model's predictive ability. Samples were selected randomly with the only precaution that samples with maximums and minimums had to be in the training subset, in order to avoid any extrapolation.

The results obtained with the electronic tongue were compared with reference analytical methods. The reference method was the inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) [30].

Others two ETs were constructed using the same data. One of them corresponded to the classical ET, using the end-potential of an ISEs array [2]; this system used five steady-state potentials after the sample introduction (one per ISE) as fed information to the ANN model. The last constructed ET used the same input information than the proposed tongue (six Fourier coefficients \times 5 ISEs = 30 inputs) but the model was constructed using the PLS method, for comparison purpose.

2.5. Software

To design the virtual instrument [28] to control the SIA system, the programming environment Labview 6.1 (National Instruments, USA) was used. Matlab 6.0 (Math works), was used in

the Fourier pre-treatment of data. Neural Network processing was developed with Matlab 6.0, using its Neural network toolbox (v. 3.0). SIMCA-P 11.0.0.0 [31] was used to construct the model with PLS. Sigma Plot 2000 (SPSS Inc., USA) was used in graphic representation of data.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the sensors

The cross-selectivity feature is one of the most important premises for multidetermination employing ETs [1]. This was initially verified for the sensor array used in this research. The results of the response characterization for the three considered ions are shown in Table 1, where the sensitivities of the five ISEs used in this work are outlined. Calibrations correspond to the preparation of six standard solutions of a single ion by successive dilutions performed by the SIA system. We can see that all ISEs, except the potassium ISE (valnomicin) which lacks calcium response, are sensitive to each of the cations considered. Supernernstian responses for calcium sensors at this pH have been explained in recent work [16]. Our desire to use this calcium (1) ISE forced us to fix the ionic medium at pH 5.0 with a citric/citrate buffer. However, this decision could be in detriment of the sensitivity of other ISEs, like potassium ISE, that as is well known [32], has a sensitivity close to the theoretical (59 mV/dec) in other media.

3.2. Pre-treatment of transient responses

Once each sample was prepared with the SIA system and presented to the sensor array, the transient recording of the five-sensor array corresponding to a step sample was acquired. Transient recording of the array of five ISEs generated a large data file. For each sample, there was a 256 (potential readings) \times 5 (ISEs) data matrix that contained the information about the composition of the sample. This large number of inputs difficults the obtaining of a response model and it is necessary to reduce its complexity for the proper modelling.

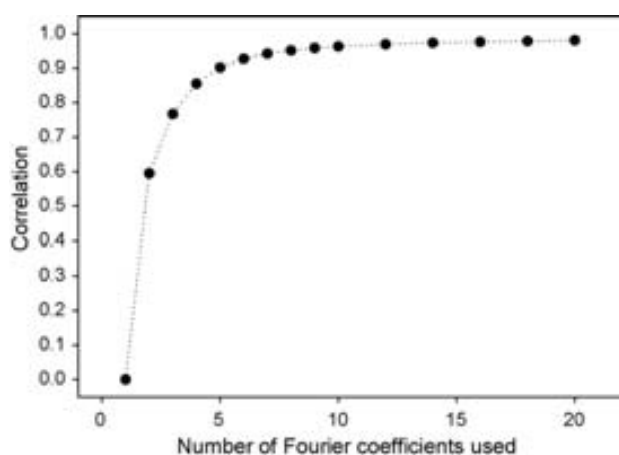


Fig. 3 – Reconstruction degree of the potentiometric transient signal according to the number of Fourier coefficients employed.

Fast Fourier transform (FFT) was the method used to compress information into a few number of inputs prior to modelling. Although the original recording was slightly larger, it was truncated to $256 = 2^8$ values, since this is a prerequisite for the FFT algorithm. Whether the initial complexity makes very difficult the ANN modelling, an appropriate compression degree is needed; otherwise, significant information about the sample can be lost.

To optimize compression an arbitrary transient signal for one ISE was taken and FFT was applied to it. Next, the signal was reconstructed (FFT^{-1}) using different number of Fourier coefficients. The quality of the reconstructed potential transient response was evaluated by comparison with the original signal. The correlation coefficient between original/reconstructed potential permitted to compare the goodness of reconstruction. Fig. 3 shows these correlation coefficient values versus the number of Fourier coefficients used in the reconstruction of the signal. We can see that with few Fourier coefficients, the reconstruction of the signal was poor (correlation near to zero), which gradually increased up to 1 with the number of Fourier coefficients used.

When the reconstructed signal used the first six Fourier coefficients, correlation reached 0.9 value. Considering that the original transient potential signal is packed in the six first coefficients, this was the reduced information fed into the ANN model. Thus, the inputs are reduced from $256 \times 5 = 1280$ potential readings to 6 (Fourier coefficients) $\times 5$ (ISEs) = 30 coefficients per sample, making possible the modelling employing ANNs.

3.3. ANN modelling of the electronic tongue

A response model of the electronic tongue was constructed using ANNs. The ANN was trained with a subset of 48 samples, prepared automatically by the SIA system, with solutions having random concentrations of calcium, sodium and potassium. The studied ranges of concentrations were: for calcium, between 0.2 and 5.0 mM; for sodium, between 0.05 and 1.0 mM and for potassium, between 0.02 and 0.5 mM. These ranges

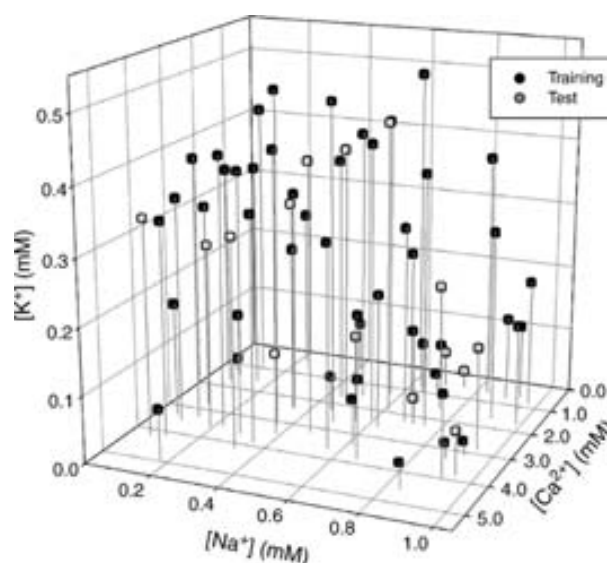


Fig. 4 – Random distribution of concentrations of the three ions (calcium, sodium and potassium) for the 64 training and test samples prepared automatically by the SIA system.

of concentration were selected according to expected concentrations in water samples. The random distribution of concentrations of the prepared standards can be seen in the Fig. 4, where the external test samples (those not participating in the training process) are also shown. The external test samples are used to evaluate the prediction ability of the developed electronic tongue.

For each standard generated and recorded by the automatic system, the corresponding Fourier coefficients from each sensor in the array were taken. Thus, the response model was built from an ANN with 30 neurons in the input layer. The output layer was also defined a priori: it required three neurons, one for each species to be quantified (calcium, sodium and potassium). Other fixed characteristic of the net, based on previous experience from the authors [2,33] was the algorithm used to train the model; the algorithm used was Bayesian regularization. An advantage of this algorithm is that it does not require an internal validation subset of samples, used to prevent overfitting, as it happens with more classical algorithms, such as Gradient descent [2,33]. Internal parameters used in the training process was the learning rate (fixed at $\alpha = 0.1$) and the momentum (fixed at $\beta = 0.4$). The transfer function of the neurons at the input layer was lineal.

Then, the following parameters, not defined a priori, were optimized by systematic evaluation in order to obtain the best ANN model: the number of neurons in the hidden layer, that were varied between 3 and 12 neurons, the transfer function of neurons in the hidden layer (*tansig* or *logsig*) and that of neurons in the output layer (*tansig* or *purelin*).

The goodness of the model generated with the training samples (convergence attained for a fixed root mean squared error of residuals, RMSE) was evaluated with the external test subset. The concentrations of calcium, sodium and potassium, obtained by interpolation in the generated model, were compared with the reference concentrations values. When the generated model works correctly, the representation of the

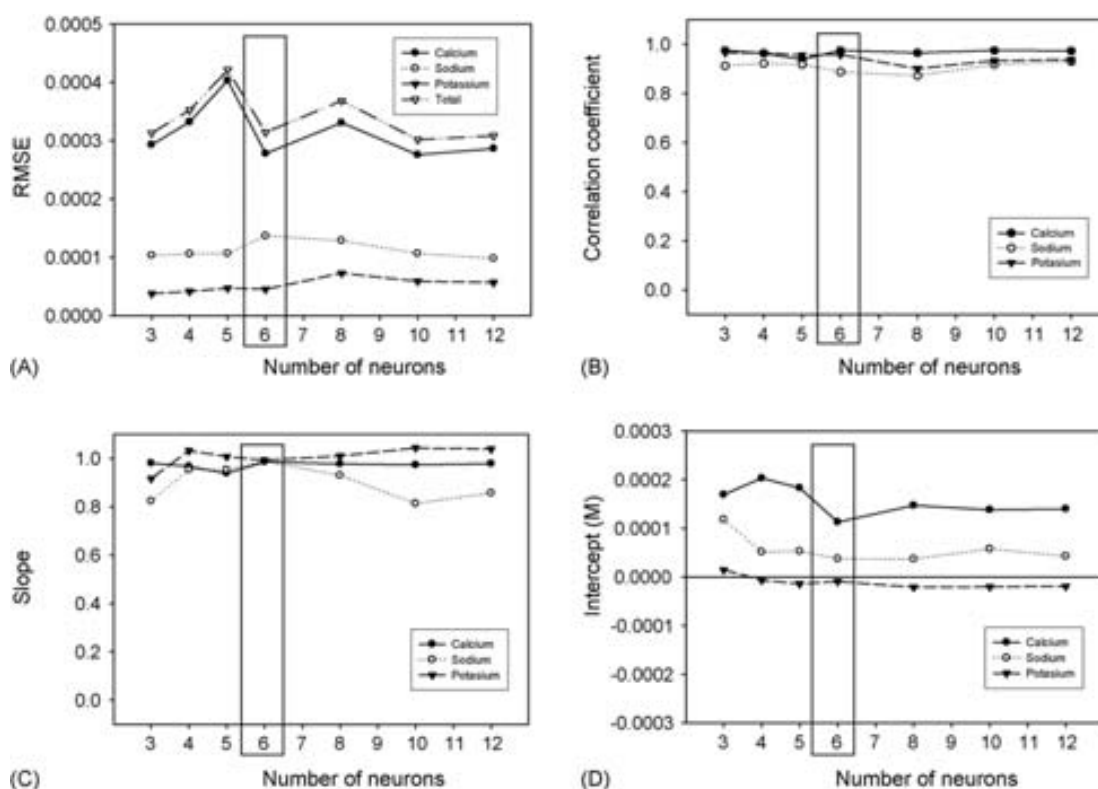


Fig. 5 – Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model. (A) RMSE values obtained for calcium, sodium, potassium and total ions. (B) Correlation coefficients for the three studied ions. (C) Obtained slopes and (D) intercepts for the comparison regression between obtained vs. reference concentrations.

predicted concentrations versus the reference concentrations can be fitted using linear regression with good correlation coefficient, slope equal to 1 and zero intercept.

The best configuration found for the ANN used the Bayesian regularization algorithm in combination with a *tansig* transfer functions both for the hidden and for the output layers. The selection of the number of hidden neurons is shown in the Fig. 5, where we can see that the best balance between minimum RMSE, maximum correlation, slope close to 1 and intercept close to 0 is a configuration with 6 neurons in its hidden layer. The comparison of results obtained for the training samples versus their obtained values showed a correct behaviour, as summarized by the linear regression of the comparison data (Table 2) for the three studied ions.

The results obtained for the 16 test samples also prepared by the SIA system are presented on Fig. S1 (in supplementary information) and on Table 2. The correlations between the obtained concentrations and the reference concentration are good for the three studied cations (correlation > 0.9) and the slopes and intercepts are satisfactory, with slopes and intercepts nearly 1 and 0, respectively.

3.3.1. Application to real and synthetic samples

Once the proper modelling of the electronic tongue for determining calcium, sodium and potassium ions had been checked with the test subset, it was decided to apply the constructed ET to the determination of these three ions in synthetic and real samples. The samples used in this validation process were four synthetic samples prepared in

the laboratory and eight natural waters (well water, spring water and tap waters).

The real and synthetic samples were prepared in the same ionic medium (buffer citric/citrate at pH 5.0). The measurements of these samples followed the same procedures as for the training and the test samples. The calcium, sodium and potassium reference values were obtained by means of ICP-OES instrumental technique [30].

Table 2 – Results obtained in the determination of calcium, sodium and potassium for the proposed ET (using the six first Fourier coefficients to train the model with ANNs)

Training	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca ²⁺	0.996	1.020 ± 0.037	-0.04 ± 0.09
Na ⁺	0.998	1.032 ± 0.048	-0.01 ± 0.06
K ⁺	0.996	1.011 ± 0.042	-0.003 ± 0.005
Test			
Ca ²⁺	0.965	1.026 ± 0.160	0.1 ± 0.4
Na ⁺	0.919	0.852 ± 0.209	0.1 ± 0.1
K ⁺	0.953	0.976 ± 0.178	0.02 ± 0.05
Real samples			
Ca ²⁺	0.909	1.236 ± 0.399	-0.3 ± 0.7
Na ⁺	0.897	0.644 ± 0.223	0.2 ± 0.1
K ⁺	0.934	0.870 ± 0.235	-0.02 ± 0.05

Confidence intervals calculated at 95% confidence level.

The results obtained are shown in Table 2, where good correlations can be seen for the three studied ions (near or up to 0.9). The regression parameters and their confidence intervals indicate no significant differences between the obtained and the expected values for calcium and potassium. Sodium is determined only semi-quantitatively with the higher discrepancies observed for the real samples tested, and probably caused by interferences of non considered species. In any case, its presence is counterbalanced in the calculation of the other ions by the electronic tongue.

3.4. Comparison with the classical electronic tongue

In order to verify the improvements attained with the proposed electronic tongue, a classical ET was trained using the steady-state potentials, calculated as the mean of the potential readings corresponding to the last 5 s of the transient recording.

The ANN model used for this classical ET had the same characteristics that the e-tongue proposed in Section 3.3. The training algorithm was Bayesian regularization and the net used a *tansig* function for the neurons in the hidden layer (with six neurons in it) and also for the neurons in the output layer. In this case, the number of neurons at the input layer was 5, one per sensor.

The results obtained for this ET are summarized in Table 3. If we compare these results for the training subset with the results of the proposed ET (Table 2), we can see that the correlations, slopes and intercepts were better in the proposed ET that uses dynamic resolution. The results for the test subset displayed an equivalent behaviour, slightly deteriorated than those of training. Besides, the classical ET showed poorer results for the real samples; only calcium could be determined quantitatively for this system whereas it had worse results with the potassium ion. The sodium concentration was impossible to be determined for the classical ET, since the ideal correlation and slope between the obtained and reference values were far from ideal values (correlation = 0.265 and slope = 0.3).

Table 3 – Results obtained in the determination of calcium, sodium and potassium for the classical ET (using steady-state potentials of ISEs to train the model with ANNs)

Training	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca ²⁺	0.975	0.938 ± 0.062	0.1 ± 0.2
Na ⁺	0.984	0.934 ± 0.050	0.03 ± 0.03
K ⁺	0.974	0.945 ± 0.065	0.01 ± 0.02
Test			
Ca ²⁺	0.967	0.937 ± 0.136	0.1 ± 0.4
Na ⁺	0.925	0.970 ± 0.219	0.0 ± 0.1
K ⁺	0.977	0.941 ± 0.114	0.02 ± 0.03
Real samples			
Ca ²⁺	0.907	1.192 ± 0.304	-0.4 ± 0.6
Na ⁺	0.265	0.298 ± 0.490	0.1 ± 0.2
K ⁺	0.909	0.750 ± 0.228	0.02 ± 0.04
Confidence intervals calculated at 95% confidence level.			

Table 4 – Results obtained in the determination of calcium, sodium and potassium for an alternative ET (using the six first Fourier coefficients to train the model with PLS)

Training	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca ²⁺	0.9418	0.889 ± 0.093	0.2 ± 0.2
Na ⁺	0.9394	0.885 ± 0.095	0.06 ± 0.06
K ⁺	0.9272	0.863 ± 0.102	0.03 ± 0.03
Test			
Ca ²⁺	0.9428	0.851 ± 0.166	0.3 ± 0.4
Na ⁺	0.8908	0.880 ± 0.246	0.1 ± 0.1
K ⁺	0.9303	0.727 ± 0.158	0.07 ± 0.04
Real samples			
Ca ²⁺	0.8403	1.194 ± 0.508	-0.6 ± 0.9
Na ⁺	0.9438	1.379 ± 0.323	-0.4 ± 0.1
K ⁺	0.9181	0.918 ± 0.276	0.06 ± 0.05
Confidence intervals calculated at 95% confidence level.			

3.5. Comparison with the electronic tongue based on PLS

A widely used chemometric tool when working with electronic tongues is partial least squares (PLS) modelling. This method was used with previous data, using the same inputs than with the proposed ET. After calculation, the software used seven components to construct the response model for the three ions, with a R^2 (accumulated) = 0.9362.

Results obtained using PLS to predict the concentrations are shown in Table 4. We can see that the training and the test subsets had worse results than with the proposed ET; especially, all slopes were below of 0.89. The superior performance of ANNs than that of PLS has been previously claimed by other authors [34]. Surprisingly, with this poor predictive ability for the training and the test subsets, the real samples subset had only slightly deteriorated results than the proposed tongue; the correlations for the three ions were worse although up to 0.84, the intercepts included zero at 95% confidence level but the regression slope for the sodium ion did not include the ideal value again.

4. Conclusions

In this work, an electronic tongue based on the dynamic response of an array of five cross-selectivity potentiometric sensors was developed. This analytical instrument was constructed thanks to the automation features brought by the SIA technique, in the preparation of standards and in the acquisition of the dynamic signals. With the complexity of the measured data, previous compression of information is necessary in order to build proper ANN models. The method used for the feature extraction was FFT, while its six first coefficients were used as the fed information to the response model. In the prediction of concentrations of calcium, sodium and potassium cations in aqueous samples, ANN models were found to be superior in modelling than PLS, probably to the high nonlinearity present with potentiometric sensors. The optimal ANN model used six neurons in the hidden layer and *tansig* trans-

fer functions for the hidden and output layers. Overall, the Fourier transform has shown to be an adequate pre-processing stage for the feature extraction of dynamic components in the transient response of a potentiometric sensor array in a SIA system.

The proposed ET permits the quantitative multidetermination of calcium and potassium while the sodium ion can be determined only semi-quantitatively, although the response model shows a correct behaviour. The case of sodium determination was not easy to solve using ETs, as noticed in previous works [2], where it was not possible to determine sodium, although the sensor array was not exactly the same. These results, in comparison with the classical ET using the steady-state potential, show that the dynamic characteristics of the ISEs furnishes extra information about the sample composition, helping to better discriminate components in the sample.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Ministry of Education, Science and Sports (MECD, Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134 and by the Generalitat de Catalunya. We thank Dr. Albert Gutes for his contributions in the early SIA electronic tongue systems.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.

REFERENCES

- [1] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C.D. Natale, A. D'Amico, *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1965.
- [2] M. Cortina, A. Gutes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1197.
- [3] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Sens. Actuators B* 101 (2004) 72.
- [4] A. Gutes, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1187.
- [5] A. Gutes, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1668.
- [6] A. Gutes, F. Céspedes, M. del Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist, *Sens. Actuators B* 115 (2006) 390.
- [7] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Talanta* 69 (2006) 1156.
- [8] J. Mortensen, A. Legin, A. Ipatov, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, K. Hjulser, *Anal. Chim. Acta* 403 (2000) 273.
- [9] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1303.
- [10] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1851.
- [11] Y. Umezawa, K. Umezawa, P. Bühlmann, N. Hamada, H. Aoki, J. Nakanishi, M. Sato, K.P. Xiao, Y. Nishimura, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 923.
- [12] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, N. Hamada, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 995.
- [13] A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, K.A. Legin, A.V. Ipatov, Y.G. Vlasov, *Russ. J. Appl. Chem.* 78 (2005) 89.
- [14] C. Maccà, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 183.
- [15] E. Lindner, K. Toth, E. Pungor, *Dynamic Characteristics of Ion-selective Electrodes*, CRC Press, Boca Ratón, 1988, Chapter 4.
- [16] D. Calvo, J. Bartolí, M. del Valle, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1569.
- [17] S. Ventura, M. Silva, D. Pérez-Bendito, C. Hervas, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 37 (1997) 287.
- [18] R.M. de Carvalho, C. Mello, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 109.
- [19] P. Ciosek, T. Sobanski, E. Augustyniak, W. Wroblewski, *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 6.
- [20] T. Fearn, *Spectroscopy Europe* 11 (1999) 24.
- [21] L. Moreno-Barón, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P.R. Hernandez, R. Muñoz, *Sens. Actuators B* 113 (2006) 487.
- [22] N.H. Beltrán, M.A. Duarte-Mermoud, M.A. Bustos, S.A. Salah, E.A. Loyola, A.I. Peña-Neira, J.W. Jalocho, *J. Food Eng.* 75 (2006) 1.
- [23] M. Cortina, A. Duran, S. Alegret, M. del Valle, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1186.
- [24] J. Simons, M. Bos, W.E. van der Linden, *Analyst* 120 (1995) 1009.
- [25] P.J. Gemperline, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 39 (1997) 29.
- [26] T. Fonseca, N.P. Lopes, P.J. Gates, J. Staunton, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 15 (2004) 325.
- [27] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Trac-Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296.
- [28] A. Durán, M. Cortina, L. Velasco, J.A. Rodríguez, S. Alegret, M. del Valle, *Sensors* 6 (2006) 19.
- [29] J. Inczèdey, T. Lengyel, A.M. Ure, *Compendium of Analytical Nomenclature IUPAC*, Blackwell Science, Oxford, 1998, Chapter 8.
- [30] US EPA Method 200.7, Revision 4.4, *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples*, Supplement I, EPA-600/R-94-111, May 1994.
- [31] <http://www.umetrics.com>.
- [32] R.J. Forster, D. Diamond, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1721.
- [33] H. Demuth, M. Beale, *Neural Network Toolbox, for Use with MATLAB*, Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 1992.
- [34] M. Baret, D.L. Massart, P. Fabry, F. Conesa, C. Eichner, C. Menardo, *Talanta* 51 (2000) 863.

ARTICLE 4:

“Multicomponent titration of calcium + magnesium mixtures employing a potentiometric electronic-tongue”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. *Analytical Letters*, 40 (2007) pp. doi: 10.1080/00032710701380780.

CHEMICAL & BIOSENSORS

**Multicomponent Titration of Calcium +
Magnesium Mixtures Employing a
Potentiometric Electronic-Tongue**

Daniel Calvo, Jordi Bartrolí, and Manuel del Valle

Sensors and Biosensors Group, Chemistry Department, Autonomous
University of Barcelona, Catalonia, Spain

Abstract: A fast novel potentiometric titration procedure is proposed, in which the detection system is formed by a potentiometric electronic tongue. The titration consists in a reduced number of fixed titrant additions to the sample and the recording of the potentials of an array of Ion Selective Electrodes. The obtained data matrix is entered to an Artificial Neural Network response model, previously trained to furnish concentrations of a multicomponent mixture. The principle is demonstrated with automated EDTA titration of mixtures of Ca^{2+} and Mg^{2+} at fixed pH 8.5. In this case, five 2 ml fixed volume additions plus the readings of four sensors were adequate for the resolution of the mixture. In the conditions used, titration was feasible up to 3.3 mM total ion concentration, the precision was estimated as 3.20% RSD for Ca^{2+} and 2.76% RSD for Mg^{2+} ($n = 5$), and the detection limits 0.16 mM Ca^{2+} and 0.26 mM Mg^{2+} . The procedure was applied to mineral waters and compared with reference methods (correlation = 0.92 for Ca^{2+} and correlation = 0.89 for Mg^{2+} , $n = 15$).

Keywords: Potentiometric titration, electronic tongue, ion selective electrode, artificial neural network, calcium, magnesium

Received 15 November 2006; accepted 22 February 2007

Financial support for this work was provided by the Ministry of Education, Science and Sports (MECD, Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134 and by the Department of Universities and the Information Society (DURSI) from the Generalitat de Catalunya.

Address correspondence to Manuel del Valle, Sensors and Biosensors Group, Chemistry Dept., Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Spain. E-mail: manel.delvalle@uab.es

INTRODUCTION

Recently in our laboratory, we have developed electronic tongues (ETs) employing sensor arrays formed by potentiometric ion-selective electrodes (ISEs) or voltammetric electrodes. A novel application of ETs is first shown in this communication, in which a potentiometric sensor array is used as end point detection system in an automated, fixed volume titration. An ET can be defined as analytical instrument for liquid samples that is composed of two clearly different parts: the first is a sensing part that generates a high dimensional signal and is composed by an array of sensors with cross-selectivity response (Vlasov, 2005); usually, forms the sensing part an array of low specificity ISEs (Gallardo 2004; Cortina 2005; Gutes 2005; Calvo 2006b). The other part of an ET is a chemometric tool to process the generated complex data; two widely used tools used in ETs are Artificial Neural Networks (ANNs) (Cortina 2005) and Partial Least Squares (PLS) (Lvova 2003). Typical developed applications are qualitative, for instance, identifying or classifying varieties of samples (Gallardo 2005) or quantitative, the multidetermination of several compounds in a single measure stage (Gallardo 2004; Cortina 2005; Calvo 2006b; Gutes 2006).

The use of ISEs to determine the equivalence point in titrations is well established for more than half a century (Gran 1952). The simultaneous determination of different species is an important drawback for many classical titrations; one possibility is to add masking agents in order to shift one equivalent point but this method are limited for few numbers of analytes; normally, its efficiency has been proved only for two analytes (Christiansen 1976).

More recently, the combination of potentiometric titration and chemometric tools appears as a methodology to extract significant information about a complex sample with several analytes (Moisio 1996; Ni 1998; Shamsipur 2002; Shamsipur 2004). These procedures require a previous training process with standards that generates the necessary information for acquiring the predictive ability. The exploited detection systems have been usually the pH-ISE, used in combination with different mathematical models to solve complex acid-base mixtures after NaOH titration (Moisio 1996; Ni 1998; Shamsipur 2002) or metal mixtures after complexometric titrations (Ni 1995); sulphate, or calcium, were separately determined employing an hydrolytic potentiometric titration in conjunction with an ANN model (Brodnjak-Vonina 1999). Also, the acid-base flow injection titration of mixtures of acids in juice samples is described in the literature, for which an ANN model was developed (Zampronio 2004). Other type of sensors has been also used with this approach, as a paste carbon electrode (Shamsipur 2004) for the detection point of silver, mercury and copper after titration with thiocyanate.

The aim of this work is to explore the viability of a titration procedure based on fixed volume additions, combined with an ET constructed using an array of ISEs, in order to perform multianalyte determinations. The ISE

array was initially formed by eight polymeric matrix polyvinyl chloride (PVC) electrodes, incorporating neutral carriers from the family of the ionophoric antibiotics as recognition elements. The case study was the multicomponent determination of alkaline-earth cations, to which the sensors used were adapted. Complexometric EDTA titrations were carried out using a fixed-volume automatic titration system with multiplexed potentiometric detection system. The fed information to the response model was reduced from 168 (21 readings \times 8 ISEs) to 24 inputs (6 readings \times 4 ISEs). The subsequent processing of the data was accomplished with an ANN model, used to predict the composition of a calcium-magnesium mixture. The network architecture and configuration were optimized to achieve a low prediction error. The modeling ability was verified with an external set of standards. To finally demonstrate the applicability of the proposed concept, the multitermination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in real samples was performed and compared with reference methods. The concept proved here may be of interest when extended to other situations with larger number of species.

EXPERIMENTAL

Reagents and Solutions

Potentiometric membranes of the ISEs forming the sensor array were formulated with standard compositions from the literature. These included the ionophore, an ionic additive (in some cases), the plasticizer and the PVC polymer dissolved in tetrahydrofuran (THF) (Merck). The different ionophores used were: the sodium salt of the antibiotic tetronasin (provided by the University of Cambridge) (Fonseca 2004), ETH1001 (Fluka), bis(bis(4-1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl)phosphate calcium salt (BBTP) (Fluka), monensin sodium salt (Acros), 4-tert-butylcalix[8]arene octaacetic acid octaethyl ester (TBCOO) (Acros), lasalocid A sodium salt (Fluka), cis-Dicyclohexane-18-crown-6 (DCHC) (Aldrich), and dibenzo(18-crown-6) (DBC) (Fluka). The used plasticizers were 2-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE), dioctyl phenylphosphonate (DOPP), tributylphosphate (TPB), dibutyl sebacate (DBS) and bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) (all from Fluka). The ionic additives (Fluka) were potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate ($\text{K}^+\text{TpClPB}^-$) and sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] borate ($\text{Na}^+\text{TFFPB}^-$). The polymeric base of the membranes was PVC high molecular weight (Fluka).

Membranes were solvent cast over an internal ohmic contact to form the all-solid-state electrodes. This contact was prepared by mixing the same quantities of graphite (BDH) and epoxy resin Araldite M + HR Hardener (Uneco).

Other reagents used for preparing stock solutions or buffers were: calcium chloride (Riedel-de Haën), magnesium chloride (Merck), barium chloride (Fluka), strontium chloride (Fluka), hydrochloric acid (Panreac),

tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) (Merck) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) (Panreac). All solutions were prepared using doubly distilled water and reagents of proanalysis or higher quality.

Construction of the ISE Array

For the construction of the sensors array to detect Ca^{2+} and Mg^{2+} , we first selected eight ion-selective electrodes, candidates with alkaline-earth related selectivity or with generic response. The compositions of the eight membranes used are shown in Table 1. The ISEs were constructed in all-solid-state configuration, as of normal use in our laboratories (Céspedes, 1996). Membranes had an estimated thickness of ca. 0.3 mm. Before its first use, they were conditioned in a solution 0.1 M of their primary ion for 24 h.

Apparatus

An automatic titration system with multiplexed potentiometric detection was developed for this work. The system used a Crison 2030 automatic

Table 1. Membrane compositions of the eight ISEs initially considered in the sensor array

ISE	PVC (wt%)	Plasticizer (wt%)	Ionophore (wt%)	Additive (wt%)	Ref.
Calcium (I)	(32.9)	<i>o</i> -NPOE, (66.0)	Tetronasin, (1.0)	$\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$, (0.14)	(Calvo 2006a)
Calcium (II)	(33.3)	<i>o</i> -NPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	$\text{K}^+\text{TpCIPB}^-$, (0.36)	(Lee 2002)
Calcium (III)	(30.0)	DOPP, (65.0)	BBTP, (5.0)	—	(Morton 1986)
Barium	(27.0)	DBS, (70.0)	Monensin, (3.0)	—	(Suzuki 1988)
Strontium	(38.9)	TBP, (58.4)	TBCOO, (1.9)	Na^+TFPB^- , (0.78)	(Jain 2004)
Generic (I)	(27.0)	DBS, (70.0)	Lasalocide, (3.0)	—	(Suzuki 1988)
Generic (II)	(29.0)	DOS, (67.0)	DCHC, (4.0)	—	(Isildak 1999)
Generic (III)	(29.0)	DOS, (67.0)	DBC, (4.0)	—	(Umezawa 1990)

microburette (Crison), fitted with a 10 ml syringe (Hamilton) and controlled by a computer using QBasic program developed in our laboratories. Communication between the computer and various apparatus of the system is achieved by means of RS-232 protocol. The measurement system comprised the detection system (ISE array), a Ag/AgCl double-junction reference electrode (Thermoelectron 900200), a Crison 2002 potentiometer and an ISE multiplexer built in our laboratories, enabling the measurement of eight electrodes, also controlled by the computer.

For the preparation of the buffer solution a Crison 2002 pHmeter with a combination pH electrode (Ingold model 10/402/3092) was used.

Characterization of Sensors

ISEs were characterized for both considered cations by separate calibrations. These consisted on the recording of ISE potentials after microadditions of each considered ion. The sensitivity corresponded to the slope of the linear response against the ion activity's logarithm. The ion activity coefficients in solution were calculated according to the Debye-Hückel formalism (Wang 2000). The ISEs lower detection limit (DL) was taken at the point of intersection of the two asymptotic behaviours of the calibration curve, as recommended by IUPAC (Inczèdy 1998).

Titration Procedure

All titrations were made with equivalent ionic media, and the activity coefficients were taken to be constant. To 25 ml of each sample, a 5 ml of 0.21 M TRIS buffer at pH 8.5 was added for pH buffering. Titrations were carried out recording the potentials between ISEs and the reference electrode after 15 s homogenization of the sample and the buffer, and also after each addition of titrant. First titrations attempted used small additions (0.5 ml) of EDTA 0.025 M in order to show how different were the recorded curves for samples with different composition (Fig. 1). The titrations finally proposed were simpler in order to achieve quick procedures with less experimental complexity, the additions were of 2 ml, and the concentrations of the standards titrated were restricted to 3.3 mM. The EDTA concentration was adjusted to 8.75 mM in order to limit the end volume of the titration to be lower than the syringe volume used in the employed burette (10 ml). Concentrations of standards and titrant were selected according to expected concentrations in the real samples. The data generated per sample and per ISE are five potential readings after each addition, plus the initial potential. As we finally used the information from four ISEs, the input data for the response model were 6 (potential readings) × 4 (ISEs) = 24 readings per sample.

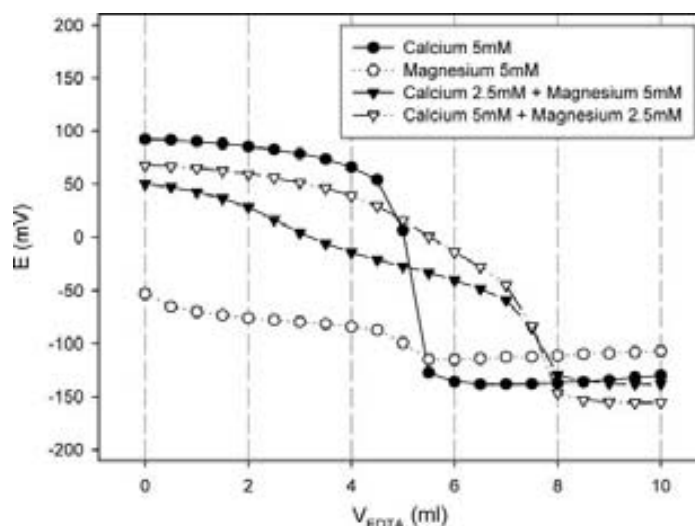


Figure 1. Titration curves for different calcium and magnesium mixtures measured using the ISE Calcium (I) and using EDTA 0.025 M as titrant. Vertical dotted lines indicate fixed volumes finally entered to the response model.

Building of the Response Model

A set of 50 samples, consisting of solutions with random mixtures of Ca^{2+} and Mg^{2+} , were prepared manually and processed for the construction of the response model. The set was subdivided into two subsets: (1) training: with 2/3 parts of total set (34 samples) and it served to build the model; and (2) test: with 1/3 parts of the set (16 samples) and it evaluated the model's predictive ability. The samples are classified randomly with the precaution that the samples with maximums and minimums must be in the training subset. The use of Bayesian regularisation (BR) algorithm for building the response model did not require an internal validation subset of samples, usually used to prevent overfitting, as it happens with more classical algorithms, such as Gradient descent (Demuth 1992; Cortina 2005).

Additionally, 15 samples were prepared in order to calculate the repetitivity and the DL of the proposed method. The repetitivity was calculated (for each ion) processing five replicate samples with intermediate concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} ; the repetitivity was calculated as the standard deviation of the five obtained concentrations. The DL of the proposed method was calculated in similar way; the DL corresponded to three times the standard deviation of five blank's concentrations.

The proposed procedure used the ANNs in order to model the potentiometric response of the two ions studied (Ca^{2+} and Mg^{2+}). The ANNs constructed had 24 neurons in the input layer and were trained using the

Bayesian Regularisation algorithm. The parameters optimized in detail were the number of neurons in the hidden layer (from 3 to 12) and the transfer functions employed in the hidden and the output layer.

Software

SPSS 12.0S (SPSS Inc.) was used for Principal Component Analysis (PCA). Neural Network processing was developed with Matlab 6.5 (Mathworks), using its Neural network toolbox (v. 4.0). SIMCA-P 11.0.0.0 Demo was used to construct the model with Partial Least Squares (PLS). Sigma Plot 2000 (SPSS Inc.) was used in graphic representation of data.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of ISEs

The eight constructed ISEs were characterized for each studied ion. The obtained sensitivities and DL for Ca^{2+} and Mg^{2+} are shown in Table 2. We can see that most ISEs respond preferably to Ca^{2+} , while some others showed sub-nernstian response to Mg^{2+} (for instance calcium II, calcium III, barium, strontium and generic I). The detection limits are close to 10^{-3} mM, as expected for this type of sensors (Bakker, 1999). These characteristics permitted their use for the construction of an ET for determinations of Ca^{2+} and Mg^{2+} with concentrations up to 10^{-3} mM.

One of the most important premises for the multidetermination with ETs is cross-selectivity (Vlasov, 2005), as some degree of cross-response is needed. This feature is demonstrated in Table 2. Six of the ISEs presented

Table 2. Sensitivity and detection limits (DL) obtained for the eight constructed ISEs

ISE	Sensitivity (mV/dec)		DL (mM)	
	For Ca^{2+}	For Mg^{2+}	For Ca^{2+}	For Mg^{2+}
Calcium (I)	33.8 ± 0.4	4.60 ± 1.4	4.5×10^{-3}	—
Calcium (II)	29.9 ± 0.5	28.9 ± 4.2	2.8×10^{-3}	2.6×10^{-3}
Calcium (III)	30.6 ± 0.7	8.03 ± 0.8	5.1×10^{-3}	2.8×10^{-3}
Barium	11.3 ± 0.7	5.85 ± 0.2	2.9×10^{-3}	4.0×10^{-4}
Strontium	30.0 ± 0.5	22.5 ± 1.6	2.8×10^{-3}	2.2×10^{-2}
Generic (I)	23.7 ± 3.4	4.30 ± 0.3	3.4×10^{-1}	8.4×10^{-4}
Generic (II)	21.0 ± 1.7	—	7.0×10^{-1}	—
Generic (III)	6.30 ± 0.4	—	7.8×10^{-4}	—

Confidence intervals calculated at 95% confidence level.

cross-response to Ca^{2+} and Mg^{2+} , while other two ISEs showed response only for Ca^{2+} .

Selection of the Input Data

The titration curves, showed on Fig. 1, were reduced from 20 to 5 additions, in order to reduce the total amount of the fed information to the ANNs. The total information input with this precaution were 6 potential readings \times 8 ISEs = 48 inputs.

From the eight initially used ISEs, it could be that two or more ISEs give us colinear information about the titration. We tested this possibility doing a PCA analysis of a titration data with intermediate concentration of the two studied cations (2.5 mM Ca^{2+} + 5 mM Mg^{2+}). The initial 21 variables (the potential readings) were reduced to two principal components; these two components were used to visualize similarities between the eight ISEs (Fig. 2). The ISEs group together on four different types: the first type was formed by Calcium (I) and Calcium (II) ISEs; a second type was formed by Generic (I) and Barium ISEs; the third type had the Strontium, Generic (II) and Generic (III) ISEs; the last type included only the Calcium (III) ISE. This classification helped us to reduce the number of ISEs in the sensor array, for a simpler setup and quicker procedure. The finally proposed sensor array therefore comprised Calcium (I), Calcium (III), Barium and Strontium ISEs. This precaution permitted us to reduce considerably the number of inputs of the ANN and the training effort. In this way, the total amount of information was 6 (potential readings) \times 4 (ISEs) = 24 inputs as fed information per sample with the proposed methodology. In comparison with standard potentiometric titration, the complexity of the sequence of volume additions is substituted by the extra information, the potentials of the ISE array.

Response Model Based on ANNs

A response model to obtain titration results was constructed using ANNs. The purpose is to correlate the input information with concentrations of titrated species in the multicomponent solution. To train the ANN model, a subset of 34 samples was used; this was formed by using solution mixtures having random concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} . The studied ranges of concentrations for both cations were between 0.0–3.3 mM, with the precaution that the total cation concentration did not exceed 3.3 mM. The random distribution of concentrations of the prepared standards can be seen in the Fig. 3, where the external test samples (those not participating in the training process) are also shown. External test samples were used to evaluate the prediction ability of the developed electronic tongue.

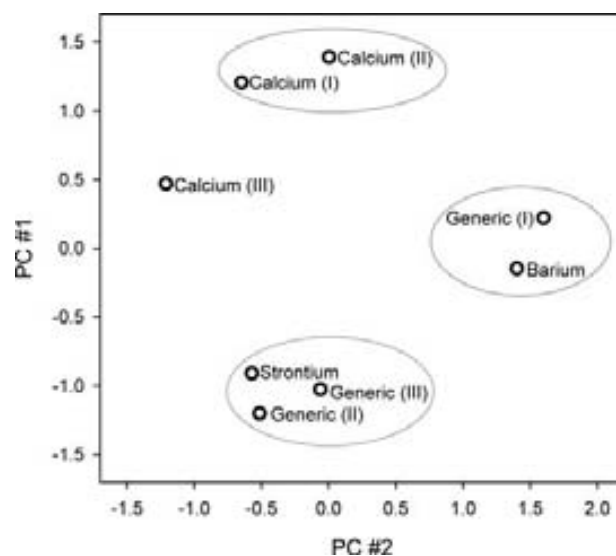


Figure 2. Principal component analysis of a representative titration curve followed with the eight initially considered ISEs.

For each titrated standard, the corresponding 6 potentials (initial plus each addition) per sensor in the array were recorded. Thus, the response model was built from an ANN with 24 neurons in the input layer. The output layer was also fixed: it required two neurons, one for each species to be quantified (Ca^{2+} and Mg^{2+}). Other characteristics of the network were selected, based on previous experience: the algorithm used to train the model (BR) and internal parameters used in the training process like the learning rate (fixed at $\alpha = 0.1$) and the momentum (fixed at $\beta = 0.4$) (Cortina 2005). The transfer function of the neurons at the input layer was lineal.

Then in order to obtain the best network configuration, the following parameters were optimized by systematic evaluation: the number of neurons in the hidden layer (varied between 3 and 12 neurons), the transfer function of neurons in the hidden layer (tansig or logsig) and that for the neurons in the output layer (tansig or purelin).

The goodness of the model generated with the training samples (convergence attained for a fixed error goal of 0.001) was evaluated with the external test subset. Additionally, the concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} , obtained by interpolation in the generated model, were compared with the expected values. When the generated model has correct prediction ability, the representation of predicted (Y) versus expected concentrations (X) can be fitted using linear regression with good correlation coefficient (R), slope equal to 1 and zero intercept.

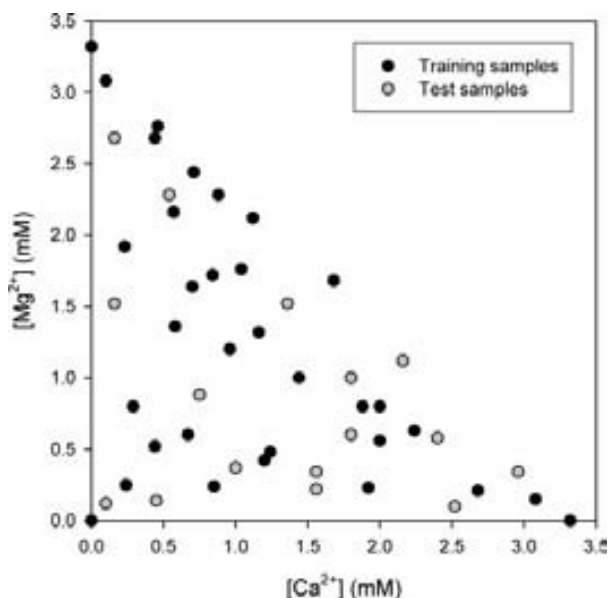


Figure 3. Random distribution of calcium and magnesium prepared mixture solutions, used for the training and test samples.

In this way, the best configuration found for the ANN used, as transfer functions, tansig for the hidden and purelin for the output layers, respectively. The selection of the number of hidden neurons is illustrated in Fig. 4, where the best balance between minimum Root Mean Squared Error of Residuals (RMSE), maximum correlation, slope close to 1 and intercept close to 0 can be deduced; this corresponded to a configuration with 12 neurons in its hidden layer. Larger networks were not assayed because of the limited training information available. Comparison graphs were then constructed for the two subsets used, training and external test set. The results obtained for the training samples showed a correct behaviour, excellent correlations and regressions close to ideality.

$$Ca^{2+} : Y = 0.999(\pm 0.003) \cdot X + 0.001(\pm 0.004) \quad R = 0.99997$$

$$Mg^{2+} : Y = 1.000(\pm 0.002) \cdot X + 0.001(\pm 0.003) \quad R = 0.99998$$

The results obtained for the 16 test samples are presented on Fig. 5 and their regression results on Table 3. The correlations between the obtained and expected concentrations were good for the two studied cations ($R > 0.94$), whereas the slopes and intercepts were satisfactory, with slopes and intercepts that included 1 and 0, respectively.

Once trained, the response model was employed to estimate analytical properties of the proposed procedure. For this purpose, an additional set of

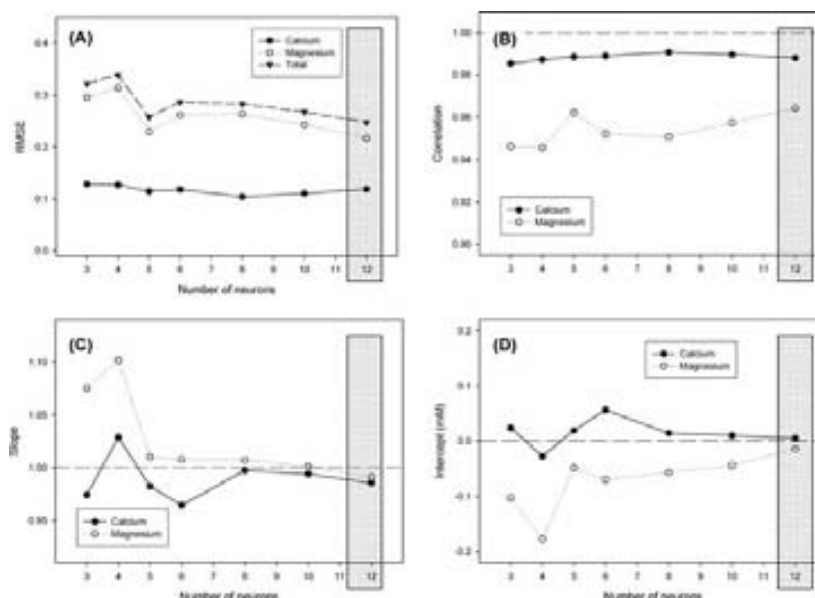


Figure 4. Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model. (A) RMSE values. (B) Correlation coefficients. (C) Obtained slopes and (D) intercepts for the comparison regression between obtained/vs./expected concentrations.

standards, as specified in the experimental section, was used. The DL from blank samples was compared with the DL obtained from other five blanks that contain the other ion as interferent in intermediate concentration (1.52 mM). The DLs obtained in presence of interferents were 0.112 and 0.612 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} respectively, whereas in absence of interferents were 0.161 and 0.263 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} respectively. These values of DL permit the application of the ET, as detection system in titrations, for determinate Ca^{2+} and Mg^{2+} in mineral waters. Finally, precision of the proposed procedure, estimated as its repetitivity, were 3.20 and 2.76%RSD for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively, calculated for five replicate determinations of a mixture containing 1.52 mM of each cation.

Validation of the Proposed Methodology

In order to compare and validate the performance attained with the proposed methodology, three variants were evaluated using previous titration data sets. The three alternatives were: (1) to use direct potentiometric data, without any addition of titrant, (2) to use titration data from a single sensor, and (3) to compare the use of ANN with other chemometric tools, such as Partial Least Squares (PLS).

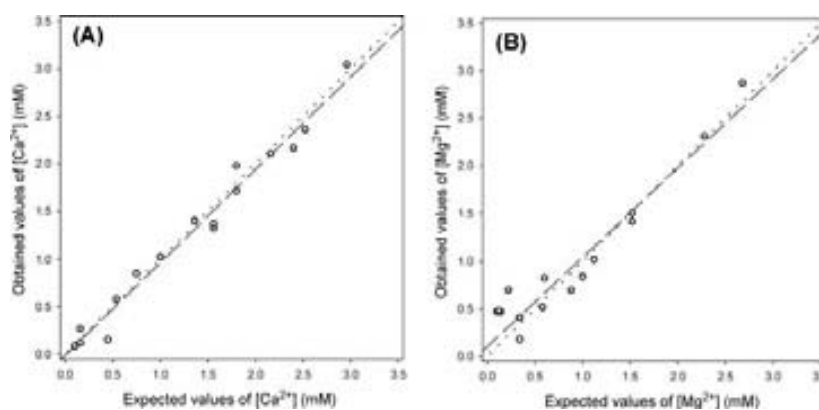


Figure 5. Correlations between the obtained and the expected concentrations of calcium (A) and magnesium (B) for the external test samples. The dotted line represents the ideal values, the dashed one the regression of the obtained/vs./expected values.

To check the gain in analytical features of the electronic tongue titration procedure, this was compared with the classical electronic tongue principle that is to process with the chemometric tool the direct measurements corresponding to the used sensor array. In our case this meant to build an ANN response model from the initial measurements of the sensor array, before any titrant addition. This variant used 4 potential readings (one per ISE) as fed information to train the ANN. To simplify, the model used for this

Table 3. Summary of the different Results obtained in the determination of calcium and magnesium for the external test subset of samples ($n = 16$)

	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Proposed procedure			
Ca ²⁺	0.9872	0.977 ± 0.087	-0.018 ± 0.139
Mg ²⁺	0.9411	0.937 ± 0.186	0.103 ± 0.214
ANN Model trained direct potentiometric data			
Ca ²⁺	0.9609	1.010 ± 0.161	-0.006 ± 0.257
Mg ²⁺	0.2387	0.980 ± 1.523	0.908 ± 1.753
ANN Model trained with the response of one ISE			
Ca ²⁺	0.9846	0.901 ± 0.088	0.056 ± 0.141
Mg ²⁺	0.9700	0.930 ± 0.129	0.121 ± 0.148
Use of PLS model			
Ca ²⁺	0.9618	0.935 ± 0.153	-0.054 ± 0.244
Mg ²⁺	0.6492	0.540 ± 0.363	0.612 ± 0.417

Confidence intervals calculated at 95% confidence level.

methodology employed an ANN with the same characteristics and architecture proposed before, except for the input layer, which had only 4 neurons.

After its training, if we compare the results for the training subset with the results of the proposed procedure, the correlations ($R < 0.997$), slopes (0.991 and 0.987) and intercepts (0.010 and 0.016 for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively) were worse than the proposed procedure that used the data generated in the titration. More interestingly, the results for the external subset are summarized on Table 3, where we can observe that this procedure cannot be used for the determination of Mg^{2+} ($R = 0.24$).

These poorer results with the direct measurement ET were also reflected in the obtained DLs and precision. DL in presence of interferents were 0.324 and 3.834 mM, whereas in absence of interferents were 2.474 and 2.989 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively. The repetitivities obtained for this ET were 20.26 and 14.84 %RSD for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively, clearly degraded, and making this simpler alternative useless for the purpose.

The second check was to employ only the data from a single sensor, to visualize the improvements yielded by the sensor array. There are several works in the literature with multidetermination application of titrations using one ISE (usually with a pH-ISE) (Ni 1995; Moisiu 1996; Shamsipur 2002). To compare with this situation, a response model was built employing the readings of the ISE Calcium I, which was one of the sensors with response to both ions, as observed on Fig. 1. For the sake of simplification, the ANN configuration was the same as before, except for the input layer, which had only 6 neurons, corresponding to the fixed-volume titration sequence.

After training, worse results were again obtained for the training subset, with correlations below than 0.998, slopes (0.993 and 0.987) and intercepts (0.008 and 0.017) for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively. Acceptable results were obtained for the test samples (see Table 3) but with some deterioration respect the proposed procedure, especially in slopes and intercepts.

The DLs obtained in presence of interferents were similar to those with the proposed procedure (0.116 and 0.409 mM), whereas in absence of interferents were higher than the proposed method (0.453 and 0.723 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively). The repetitivity obtained for Ca^{2+} was the same order than the proposed procedure (3.70% RSD), whereas it was higher for Mg^{2+} (14.83% RSD). The single sensor titration was then capable of correctly determining the first species but not the second one.

The last variant used the PLS method to construct the response model from the whole array titration data, in order to validate the performance obtained with ANNs. PLS modelling is a widely used chemometric tool when working with ETs (Lvova 2003) where it has been specially used for quantitative applications. Again, this variant was used with previous data, using the same inputs than with the proposed procedure (6 potential readings \times 4 ISEs = 24 inputs).

Results obtained using PLS to predict the concentrations of the training and the test subsets had worse results than with the proposed procedure;

especially, the slopes for Mg^{2+} in training and testing subsets were below of 0.62, denoting very low prediction ability. The superior performance of ANNs than that of PLS has been previously claimed by various other authors (Baret 2000; Gutiérrez 2006).

Calculated DLs and repetitivities were also worse than with the procedure constructed with the ANN model. The DLs in presence of interferents were 0.802 and 0.846 mM, whereas in absence of interferents were 0.348 and 1.050 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} respectively. The repetitivities for this procedure were 13.03 and 22.07% RSD for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively.

Application to Real Samples

The proposed procedure was applied to the determination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in real samples. The samples used in this validation process were 14 mineral waters (5 of them sparkling waters) with total hardness between 60–318 mgCaCO_3/L ; 3 of these samples could be classified as soft water (0–20 mgCa/L), 6 as moderately soft water (20–40 mgCa/L), 4 as slightly hard water (40–60 mgCa/L) and 1 as moderately hard water (60–80 mgCa/L).

The real samples were prepared in the same ionic medium (TRIS buffer at pH 8.5). After titration, the results obtained with the proposed procedure were compared with reference analytical methods. The reference method was the inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).

The results obtained are shown in Fig. 6, where good correlations can be seen for the two studied ions (near to 0.9). The regression parameters and their confidence intervals indicate no significant differences between the obtained and the reference values for Ca^{2+} and Mg^{2+} .

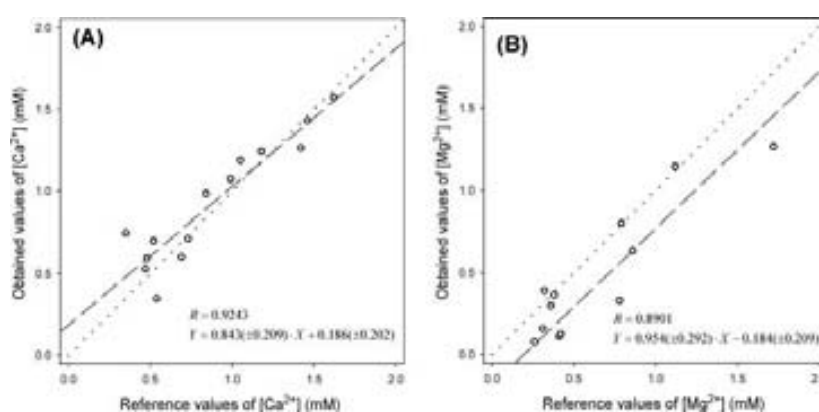


Figure 6. Correlations between the obtained and the reference concentrations of calcium (A) and magnesium (B) for the real samples. The dotted line represents the ideal values, the dashed one the regression of the obtained/vs./reference values.

Real samples titration data were also processed using the three variants tested above. The results obtained were inferior in all cases, obtaining for the procedure that used the classical ET principle, correlations below than 0.33 for the two studied cations. The methodology that used the potentials of one ISE was useless at determining Mg^{2+} ($R = 0.829$; slope = 0.557; and intercept = 0.327). And the last procedure tested (with the PLS model) had also worse results for the real samples than the proposed procedure; the correlations for the two ions were down to 0.171, the slope for Ca^{2+} was -0.616 and the intercept values (2.251 and -1.233 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively) were far away to the ideal ones.

CONCLUSIONS

In this work, an ET based on a potentiometric sensor array used as end point detection system in an automated, fixed volume titration, is employed for the first time.

The fed information to construct the ANN model was reduced from 168 (21 readings \times 8 ISEs) to 24 inputs (6 readings \times 4 ISEs). The proposed methodology permits the quantitative multidetermination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in aqueous samples with a very simple procedure. The proposed titration procedure showed superior analytical properties than equivalent systems with just direct potentiometry (classical ET concept). This fact made us believe that the use of the titration data furnishes extra information about the sample composition, helping to better discriminate components in the sample. Analogously, the use of a sensor array instead of only one sensor provides relevant information to discriminate better the studied alkaline-earth cations.

On the other hand, when selecting the chemometric tool to use, ANN models were found to be superior in modelling than PLS, probably due to non-linearity components present in the response of potentiometric sensors.

The proposed concept, initially applied to a multicomponent titration of simply two ions, Ca^{2+} and Mg^{2+} , can be easily extended to more complex mixtures. The methodology may represent an extremely simple procedure for automated titrations, in which no complexing or masking agents are needed; additionally, very simple experimental steps are used, just a number of fixed volume additions in contrast to variable volume titrations, where total analysis time can be on the order of 30 min. Again the proposed methodology follows current trends in modern analytical chemistry, shifting the complexity from methodological stages or instrumental complexity to the software field.

REFERENCES

- Bakker, E., Bühlmann, P., and Pretsch, E. 1999. Polymer membrane ion-selective electrodes-what are the limits? *Electroanalysis*, 11: 915–933.

- Baret, M., Massart, D.L., Fabry, P., Conesa, F., Eichner, C., and Menardo, C. 2000. Application of neural network calibrations to an halide ISE array. *Talanta*, 51: 863–877.
- Brodnjak-Vonina, D., Dobnik, D., Novi, M., and Zupan, J. 1999. Determination of concentrations at hydrolytic potentiometric titrations with models made by artificial neural networks. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 47: 79–88.
- Calvo, D., Bartrolí, J., and del Valle, M. 2006a. EIS study of potentiometric membranes selective to Ca²⁺ employing the new ionophoric antibiotic tetronasin. *Electrochim. Acta.*, 51: 1569–1575.
- Calvo, D., Durán, A., and del Valle, M. 2006b. Use of sequential injection analysis to construct an Electronic-Tongue. Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array. *Anal. Chim. Acta.*, in press.
- Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., and Alegret, S. 1996. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 15: 296–304.
- Christiansen, T.F., Busch, J.E., and Krogh, S.C. 1976. Successive determinations of calcium and magnesium in drinking water by complexometric, potentiometric digital titration to two equivalence points. *Anal. Chem.*, 48: 1051–1056.
- Cortina, M., Gutes, A., Alegret, S., and del Valle, M. 2005. Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions. *Talanta*, 66: 1197–1206.
- Demuth, H. and Beale, M. 1992. *Neural Network Toolbox, for Use with MATLAB*; Mathworks Inc.: Natick, MA.
- Fonseca, T., Lopes, N.P., Gates, P.J., and Staunton, J. 2004. Fragmentation studies on tetronasin by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 15: 325–335.
- Gallardo, J., Alegret, S., and del Valle, M. 2004. A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride. *Sens. Actuators B*, 101: 72–80.
- Gallardo, J., Alegret, S., and del Valle, M. 2005. Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis. *Talanta*, 66: 1303–1309.
- Gran, G. 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst.*, 77: 661–677.
- Gutes, A., Céspedes, F., Alegret, S., and del Valle, M. 2005. Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 1. Voltammetric e-tongue for the determination of oxidizable compounds. *Talanta*, 66: 1187–1196.
- Gutes, A., Céspedes, F., del Valle, M., Louthander, D., Krantz-Rülecker, C., and Winquist, F. 2006. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sens. Actuators B*, 115: 390–395.
- Gutiérrez, M., Alegret, S., and del Valle, M. 2006. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples. *Biosens. Bioelectron.*, in press. (doi:10.1016/j.bios.2006.10.007).
- Inczedy, J., Lengyel, T., and Ure, A.M. 1998. *Compendium of Analytical Nomenclature IUPAC*; Blackwell Science: Oxford, Ch. 8.
- Isildak, I. and Asan, A. 1999. Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all-solid-state contact PVC membrane anion- and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography. *Talanta*, 48: 967–978.
- Jain, A.K., Gupta, V.K., and Raison, J.R. 2004. Strontium (II)-selective potentiometric sensor based on ester derivative of 4-tert-butylcalix(8)arene in PVC matrix. *Sensors*, 4: 115–124.

- Lee, M.H., Yoo, C.L., Lee, J.S., Cho, I., Kim, B.H., Cha, G.S., and Nam, H. 2002. Tweezer-type neutral carrier-based calcium-selective membrane electrode with drastically reduced anionic interference. *Anal. Chem.*, 74: 2603–2607.
- Lvova, L., Legin, A., Vlasov, Y., Cha, G.S., and Nam, H. 2003. Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem. *Sens. Actuators B*, 95: 391–399.
- Moisio, T. and Heikonen, M. 1996. A simple method for the titration of multicomponent acid-base mixtures. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354: 271–277.
- Morton, R.W., Chung, J.K., Miller, J.L., Charlton, J.P., and Fager, R.S. 1986. Extended sensitivity for the calcium selective electrode. *Anal. Biochem.*, 157: 345–352.
- Ni, Y. 1998. Simultaneous determination of mixtures of acids by potentiometric titration. *Anal. Chim. Acta.*, 367: 145–152.
- Ni, Y. and Peng, Z. 1995. Determination of mixed metal ions by complexometric titration and nonlinear partial least squares calibration. *Anal. Chim. Acta.*, 304: 217–222.
- Shamsipur, M., Hemmateenejad, B., and Akhond, M. 2002. Multicomponent acid–base titration by principal component-artificial neural network calibration. *Anal. Chim. Acta.*, 461: 147–153.
- Shamsipur, M., Hemmateenejad, J., and Sharghi, H. 2004. Application of artificial neural network to simultaneous potentiometric determination of silver(I), mercury(II), and copper(II) ions by an unmodified carbon paste electrode. *Talanta*, 64: 590–596.
- Suzuki, K., Tohda, K., Aruga, H., Matsuzoe, M., Inoue, H., and Shirai, T. 1988. Ion-selective electrodes based on natural carboxylic polyether antibiotics. *Anal. Chem.*, 60: 1714–1721.
- Umezawa, K. 1990. *Handbook of Ion-Selective Electrodes Selectivity Coefficients*; CRC Press: Boca Raton.
- Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Natale, C.D., and D'Amico, A. 2005. Nonspecific sensor arrays (“Electronic Tongue”) for chemical analysis of liquids. *Pure Appl. Chem.*, 77: 1965–1983.
- Wang, J. 2000. *Analytical Electrochemistry*; Wiley-VCH.
- Zampronio, C.G., Rohwedder, J.J.R., and Poppi, R.J. 2002. Artificial neural networks applied to potentiometric acid–base flow injection titrations. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 62: 17–24.

ANNEXOS

Annexos

ARTICLE 1-A:

“Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetronasin”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. Per enviar a la revista *The Analyst*.

ARTICLE 2-A:

“Simultaneous titration of ternary alkaline-earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue”. Daniel Calvo i Manel del Valle. *Microchemical Journal*. Acceptat maig de 2007. doi:10.1016/j.microc.2007.04.005.

ARTICLE 1-A:

“Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetronasin”. Daniel Calvo, Jordi Bartrolí i Manel del Valle. Per enviar a la revista *The Analyst*.

Characterization of potentiometric sensors employing the new ionophoric antibiotic tetronecin

D. Calvo, J. Bartrolí, M del Valle

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN. e-mail: manel.delvalle@uab.es

Received xx xxxx xxxx, Accepted xx xxxx xxxx
Published on the web xx xxxx xxxx

Abstract

Tetronecin is a recently isolated ionophoric antibiotic with appropriate lipophilicity and marked coordination properties for alkali and alkaline earth metals. This fact makes it a candidate to construct polymeric membrane potentiometric sensors, firstly studied in depth in this communication. Although tetronecin is supposed to have a favoured interaction with Na^+ , extremely fast, reversible and stable responses were recorded for Ca^{2+} . The optimal formulation of a PVC membrane for Ca^{2+} employs 1% ionophore, 0.2% anionic sites, 66% *o*-nitrophenyloctylether and 33% PVC. After extensive characterization of constructed sensors, the response confirmed to be of super-Nernstian nature, with highest value (65 mV/decade) at pH=5.0. This particular behaviour is related to similar antibiotic ionophores with acidic groups, whose sensitivity was designated as “apparently twice-Nernstian response”.

Keywords: Ion selective electrode, Calcium, Ionophoric antibiotic, Tetronecin, apparently twice-Nernstian response

Introduction

Potentiometric sensors are increasingly being used for the determination of a large range of analytes¹⁻⁴. The offered advantages include simplicity of operation, relatively fast response, reasonable selectivity, in-situ application, large linear dynamic range and low cost.

Successful potentiometric membrane sensors rely on the use of formulations with best behaviour of response, which is mainly determined by the employed ionophore or ion carrier. Among the best response sensors reported are those employing neutral carriers, per example ionophoric antibiotics such as valinomycin⁵ and nonactin⁶, for K^+ and NH_4^+ detection, respectively. Tetronecin (CAS-75139-05-8) is a recently isolated ionophoric antibiotic, not yet commercialised⁷. Its properties, derived from a polyether with an acyltetronecin acid structure, are similar to the better known antibiotic monensin, which is widely used for veterinary use⁸ and has been studied as ionophore in potentiometric membranes⁹. Fundamental studies on the behaviour of tetronecin in solution have shown its affinity and rapid interaction with Na^+ ion¹⁰ (see Figure 1). Additional studies also suggest interactions with Ca^{2+} ion¹¹. Based on these findings and on the successful use of ionophoric antibiotics for potentiometric sensors, we have first investigated its potential use as ionophore in poly(vinyl chloride) (PVC) membranes for Na^+ potentiometric sensing.

ISEs for Na^+ based on tetronecin were then constructed and characterized. Unexpectedly, during the studies with potential interferent species, an extremely fast, reversible and stable response was observed when the sensors were placed in contact with Ca^{2+} ion in dynamic conditions. The calcium response had several particularities; one of them was an abnormal high sensitivity (twice the

Nernstian value). This rare feature is important in all uses of the calcium sensors, but mainly for biological samples, as their normal concentration range of this ion is rather reduced. For calcium determination, this can be an added advantage because other calcium-ionophores commercially available, such as ETH1001¹² or phosphonates¹³, are limited to the Nernstian slope.

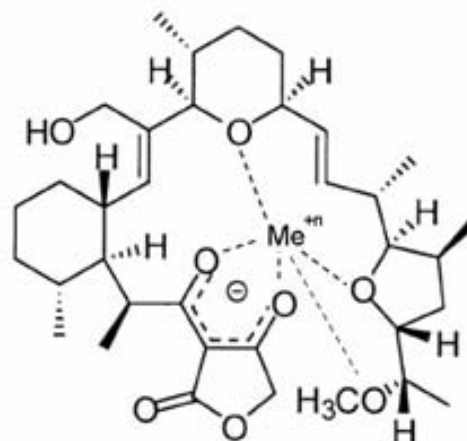


Fig.1. Chemical structure of the Metal-Ionophore complex for tetronecin.

The potentiometric response characteristics of these calcium sensors were then fully evaluated, which results are presented in this work and include calibration slope, lower detection limit, selectivity towards alkali and alkaline earth ions, dynamics of the response and effect of pH. Further, the formulation of membranes was optimized according the nature of the plasticizer, ionophore form and type and content of ionic sites. Finally, the abnormal high sensitivity of these sensors was justified from the expressions of the phase boundary potential model¹⁴. Its application considers the acidic

properties of the ionophore, which is the case for tetronasin, and also for monensin or lasalocid. The case of the latter two ionophores has been studied in the literature¹⁵, where sensitivities of ca. 60 mV, double value than the Nernstian theory (“apparently twice-Nernstian”) as well as their variation with the pH of the employed media were fully justified. Thus, the best working conditions for a potential application of calcium sensors employing the ionophore tetronasin were established. The sensors were constructed as all-solid-state ion selective electrodes (ISEs), a configuration which offered improvements in robustness and reliability¹⁶. In this variant, the polymeric membrane is deposited onto an internal ohmic contact made from a graphite-epoxy resin composite¹⁷. This configuration permits the miniaturization and the flexibility in design.

Experimental

Reagents and solutions

The ion-selective membranes were formulated including the ionophore, an ionic additive, the plasticizer and the polymer, all dissolved in tetrahydrofuran (THF, from

Merck). The antibiotic tetronasin, in its sodium form, was provided by the University of Cambridge⁸. Tetronasin in its protonated form (TH) was prepared from the sodium salt (TNa) by standard procedures. The used plasticizers were Bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) and *o*-nitrophenyloctyl ether (*o*NPOE) (both from Fluka). The used ionic additives were potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate ($K^+TpCIPB^-$), Tridodecylmethylammonium nitrate ($TDDMA^+NO_3^-$) and Sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] borate (Na^+TFPB^-) (all from Fluka). The polymer used was PVC high molecular weight (Fluka).

The internal ohmic contact of the all-solid-state electrodes was prepared from graphite (BDH, UK) and epoxy resin Araldite M + HR Hardener (both from Uneco, Spain).

Alkaline and alkaline-earth solutions were prepared from the chloride salts (Fluka). Other reagents used to prepare solutions or buffers were: Glicyne (Panreac), citric acid (Panreac), trishydroxymethylaminomethane (Merck) and imidazole (Fluka). The different solutions were prepared using doubly distilled water and reagents of proanalysis or higher quality.

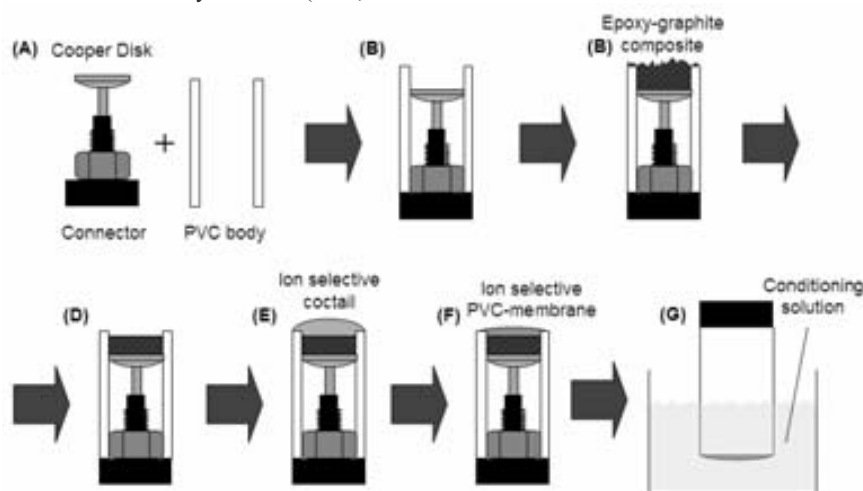


Fig. 2. Fabrication process of the PVC-membrane all-solid-state potentiometric sensors, based on the graphite-epoxy composite.

Table 1. Membrane compositions for the selective electrodes tested in this study and their potentiometric response characteristics without regulating pH. Between brackets the reproducibility values for Na-ISEs corresponded to 5 calibration runs along 2 weeks and for Ca-ISEs corresponded to 8 calibration runs along 1 month.

Membrane Name	PVC, (wt%)	Plasticizer, (wt%)	Ionophore form, (wt%)	Additive, (mol%) ^a	Slope (rep) mV/dec	Detection limit (rep) M
A - Na ⁺	32.7	DOS, 66.0	TH, 1.0	Na ⁺ TFPB ⁻ , 18.6	21.5 (9.1)	4·10 ⁻⁶ (1.4·10 ⁻⁴)
B - Na ⁺	32.6	DOS, 66.2	TNa, 1.0	Na ⁺ TFPB ⁻ , 18.2	25.8 (7.1)	6·10 ⁻⁶ (1.4·10 ⁻⁴)
C - Na ⁺	33.4	DOS, 65.0	TH, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 75.8	34.3 (7.8)	2.1·10 ⁻⁵ (1.2·10 ⁻⁵)
D - Na ⁺	33.1	DOS, 65.4	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 73.4	48.7 (5.5)	3.1·10 ⁻⁵ (1.0·10 ⁻⁵)
E - Na ⁺	32.7	DOS, 66.3	Without ionophore	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 1.0 wt%	69.4 (3.8)	2.3·10 ⁻⁵ (1.6·10 ⁻⁵)
A - Ca ²⁺	33.3	<i>o</i> NPOE, 65.5	TH, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 18.6	47.5 (5.9)	2.3·10 ⁻⁶ (2.6·10 ⁻⁶)
B - Ca ²⁺	32.8	<i>o</i> NPOE, 66.1	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 17.9	47.0 (5.8)	3.7·10 ⁻⁶ (2.0·10 ⁻⁶)
C - Ca ²⁺	33.1	<i>o</i> NPOE, 65.9	TNa, 1.0	Without additive	45.5 (5.6)	1.10·10 ⁻⁵ (4·10 ⁻⁶)
D - Ca ²⁺	32.7	DOS, 66.2	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 19.2	49.1 (5.9)	3.0·10 ⁻⁶ (2.1·10 ⁻⁶)
E - Ca ²⁺	32.8	<i>o</i> NPOE, 66.1	TNa, 1.0	TDDMA ⁺ NO ₃ ⁻ , 19.0	42.0 (2.8)	1.66·10 ⁻⁵ (7·10 ⁻⁶)
F - Ca ²⁺	32.6	<i>o</i> NPOE, 66.4	Without ionophore	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 1.0 wt%	37.3 (3.0)	4.4·10 ⁻⁵ (4.5·10 ⁻⁵)
H - Ca ²⁺	32.5	<i>o</i> NPOE, 66.2	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 54.7	40.6 (6.7)	1.9·10 ⁻⁶ (1.4·10 ⁻⁶)
I - Ca ²⁺	32.6	<i>o</i> NPOE, 65.9	TNa, 1.0	K ⁺ TpCIPB ⁻ , 79.8	40.7 (6.9)	9.7·10 ⁻⁷ (9.6·10 ⁻⁷)

^a: relative to ionophore

Construction of the sensors

The ISEs on the present work were manufactured in all-solid-state configuration or non-symmetrical configuration as sketched on Figure 2. This configuration uses a direct contact between the polymeric membrane and a solid ohmic contact. These electrodes were prepared using a PVC tube body (A) (6 mm id) and a small copper disk soldered to an electrical connector (B). The inner contact is an epoxy-graphite conductive composite, formed from graphite (50%), epoxy resin (36%) and hardener (14%)¹⁷, deposited filling the cavity in the plastic body. Once cured, a flat base is formed at 0.3 mm depth (D). The ion selective membrane is then deposited on this surface.

The study used different membranes whose compositions are shown in Table 1, and used THF as volatile solvent. For the formation of each membrane, 3 drops of a diluted cocktail were deposited on the electrode base (E). Seven further additions were performed after a waiting period of 30 min. The last step for the construction of the ISEs is the conditioning of the membrane (F), which lasted for 24h and employed a 10^{-1} M primary ion solution. The sensors were stored dry when not in use.

Potentiometric measurements

The EMF measurements were carried out with a potentiometer (Crison GLP22, Spain). The reference electrode used was a double-junction Ag/AgCl electrode (Thermo Orion 900200), with a solution of MgCl_2 0.01M in its outer compartment.

For the preparation of the buffer solutions a Crison 2002 pHmeter with a combination pH electrode (Ingold model 10/402/3092) were used. This pH electrode was calibrated with pH buffers provided by Crison.

Sensor calibration consisted on the recording of potentials after microadditions of concentrated primary ion solutions over a fixed initial volume. The lower detection limit was taken as the intersection of the two asymptotic behaviours of the calibration curve, as recommended by IUPAC¹⁸. Reproducibility was examined by repeated monitoring of the slope and the detection limit of calibration curve. The activity coefficients of ions in solution were calculated according to the Debye-Hückel formalism¹⁹.

Selectivity characteristics were determined according to the IUPAC recommended separate solution method² (SSM) and fixed interference method² (FIM). FIM determination implied a calibration of the primary ion over a constant background of interfering ion, while SSM determination simply measured the potential of two equal activity solutions, of primary ion and of interfering ion. pH influence, determined as the Reilly diagram²⁰ was recorded in a saturated solution of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and 10^{-3} M CaCl_2 (for calcium-ISEs) varying the pH from 10 to 2. At the beginning of the experiment the pH was approximately 10, and then HCl was added to decrease pH.

The response time (t_{90}) of tested sensors was determined as the time required to achieve a 90% steady potential²¹ for four additions of primary ion solution when the concentrations were rapidly increased by one decade.

Results and discussion

ISE for Na^+

The interest of finding a sodium-selective electrode with better characteristics than the existing commercial ones and the fact that the antibiotic tetronasin has fast equilibria with sodium ion¹⁰ made us think about the use of this antibiotic for sodium ISEs.

Three ISEs were built for each membrane composition. They are shown in Table 1. Five calibration curves were carried out for two weeks; the sensitivity and detection limits were obtained, as well as their corresponding reproducibilities. The use of the antibiotic tetronasin in sodium-selective electrodes had poor selectivity for sodium ion and poor sensitivity with values below Nernst theory.

Comparison of different membranes

The effect corresponding to the change of the ionophore form (TH or TNa) is seen when comparing the characteristics of membranes type A- Na^+ /C- Na^+ with type B- Na^+ /D- Na^+ . The use of different ionophore form did not show significant differences in the ISEs response (Figures 3 and 4). However, the selectivity coefficients of Ba^{2+} and Ca^{2+} ions were worse with the protonated ionophore (Figure 5).

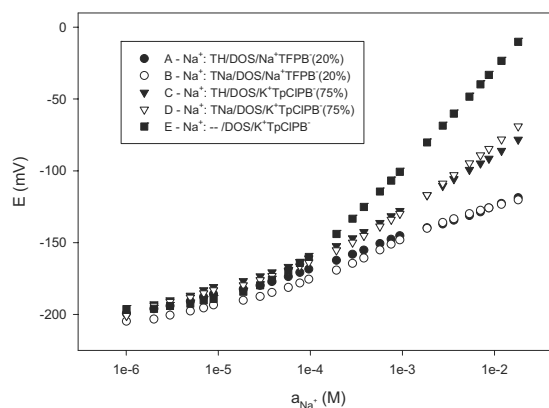


Fig. 3. Potentiometric response of different sodium-selective electrodes developed against sodium ion activity.

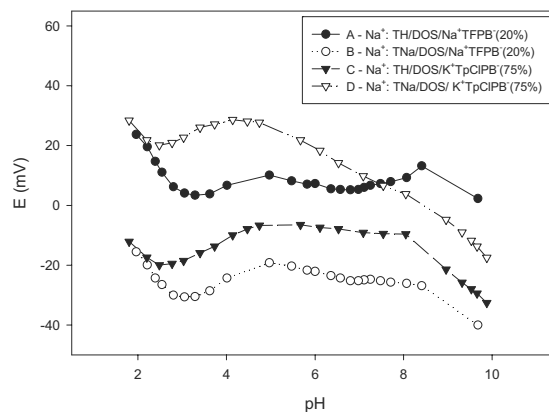


Fig. 4. Reilly diagram of different sodium-selective electrodes developed with fixed sodium activity of 10^{-3} M.

The rise from 20%mol (type A-Na⁺ and B-Na⁺) to 75%mol (type C-Na⁺ and D-Na⁺) in the molar ratio of anionic additive increased the sensitivity (approximately 15mV/dec); this increase is more accused when the membrane contains the protonated ionophore. At the same time, the addition of anionic additive deteriorates in one order of magnitude the detection limit. Besides, significant differences were not observed in the pH response when varying the amount of anionic additive in the membrane; nevertheless, selectivity coefficients were highly influenced because the response of the electrode became more generalized when the amount of anionic additive was increased.

In order to see more clearly the effect of ion recognition, a blank membrane (without ionophore) was made. This effect can be observed in Figure 5, where blank membrane (E-Na⁺) displays a much generalized response. The order of alkaline-earth and alkaline ions response for this membrane was according to its size and charge²². However, it is necessary to highlight that this order was altered by the ionophore tetronasin.

After the selectivity experiments, tests to obtain the response time of the electrodes were carried. Surprisingly, the dynamic response of ISEs, after being in contact with solutions of interfering ions, was altered. The obtained curve transient appeared to be the sum of two processes, one fast exponential rise and one slow exponential decay, instead of displaying the typical exponential rise in response to concentration step change. This type of dynamic response has been associated to a situation where the membrane of an ISE is placed in contact with the solution of an interfering ion²³. Therefore, it seemed that sodium ISE changed its selectivity pattern after the interference study, suggesting that the used ionophore had a stronger equilibrium with another ion. This explanation could justify the change of behaviour in dynamic conditions towards a sodium step change before and after being in contact with other ions. Among the ions tested, calcium was thought to be the responsible for the observed changes, since the recorded potential values to calcium ion were faster and much larger than those observed for sodium or the rest of ions. In this way, the ionophore tetronasin is proposed as recognition element for calcium ion in potentiometric sensors. This fact agrees with suggestions from literature, where interactions of tetronasin with calcium ion are stronger than with sodium ion¹¹.

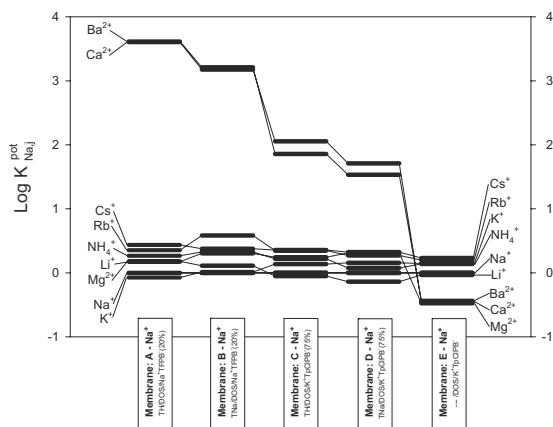


Fig. 5. Selectivity coefficients obtained for different sodium-selective membrane. Values corresponding to Separate Solutions Method.

ISEs for Ca²⁺

Three ISEs were built for each membrane composition (as specified in Table 1). Eight calibration curves were carried out along one month and their sensitivity and detection limits were obtained, as well as their corresponding reproducibilities. The use of the antibiotic tetronasin in calcium-selective electrodes showed interesting results, like sensitivity above Nernstian values, an extremely fast response and a good selectivity for calcium ion with respect to alkaline ions and magnesium ion. However, interferences of barium and strontium ions were observed. This does not represent a problem for the application of the developed sensors, since the two interfering ions are rarely present in natural samples. In fact the presence of calcium, barium and strontium at the same time was detected only in the analysis of cements²⁴.

Comparison of different membranes

Characteristics of the membranes A-Ca²⁺ and B-Ca²⁺ are compared and the effect of the ionophore form in the ISE response is shown in the figures 6 and 7. These figures show the calibration curve and the response to the pH, respectively. As it can be seen there are no significant differences between the use of the sodium salt or the protonated form. However, some differences were observed in the selectivity coefficients between the membranes A-Ca²⁺ and B-Ca²⁺ (Figure 8). The membrane B-Ca²⁺ (with the sodium salt of ionophore) has better selectivity for the ions K⁺, Na⁺ and NH₄⁺.

Two types of plasticizer were used, *o*NPOE (membrane B-Ca²⁺) and DOS (membrane D-Ca²⁺). Results represented in table 1 and Figure 6 suggest that there are no significant differences in the sensitivity and the detection limit. The Reilley diagrams for the membranes with different plasticizer also show similar potentiometric response. However, the selectivity of the membrane with *o*NPOE is slightly improved in respect to the membrane with DOS. This fact was already expected. In fact previous works report that the characteristic response and selectivities of divalent cations are favoured by solvents with high dielectric constant²⁵.

A blank membrane (F - Ca²⁺) conditioned with 0.1M CaCl₂ was prepared in order to check the effect of calcium recognition by the ionophore. The membrane with tetronasin as ionophore (B - Ca²⁺) presented different potentiometric properties. In addition, its sensitivity increases in 8mV/dec when tetronasin is incorporated. The Reilley diagrams were also presented some differences: the membrane B-Ca²⁺ (with ionophore) had a constant response in the pH range of 4 to 9, while the membrane F-Ca²⁺ responded to H⁺ in all the pH range. The effect of ion recognition is shown in Figure 8, where the membrane F-Ca²⁺ displays a generalized response for all studied ions. As shown, the membrane with tetronasin altered the order of potentiometric response according to the size and the charge of the ions. The ionophore tetronasin showed a preference for the ions Ca²⁺, Ba²⁺ and Sr²⁺. This fact is also coincident with the strongest interaction of tetronasin with calcium¹¹.

A comparable sensitivity is presented by membranes with anionic or cationic additive and for different quantities of anionic additive. However, the detection limit for these ISEs gets worse when the selective membrane did not incorporate additive (C-Ca²⁺) or when it contained cationic additive (E-Ca²⁺).

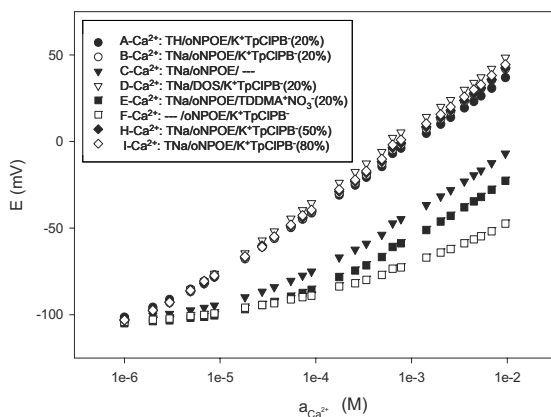


Fig. 6. Potentiometric response of different calcium-selective electrodes developed against calcium ion activity.

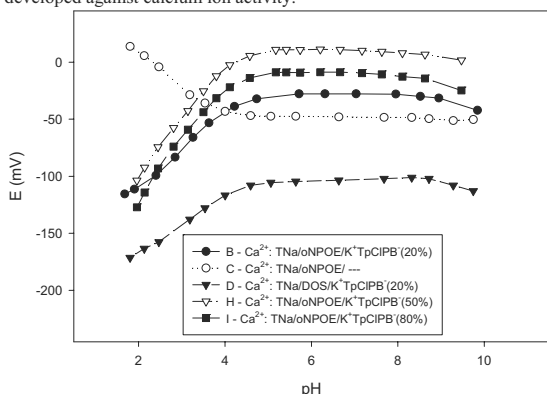


Fig. 7. Reilly diagram of different calcium-selective electrodes developed with fixed calcium activity of 10^{-3} M.

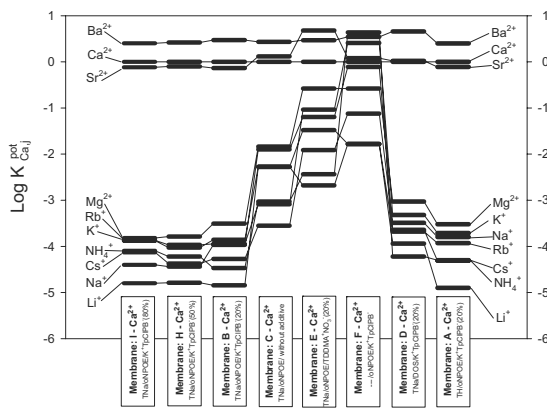


Fig. 8. Selectivity coefficients obtained for different calcium-selective membrane. Values corresponding to Fixed Interference Method.

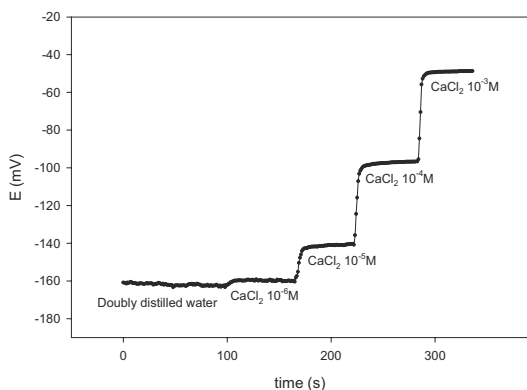


Fig. 9. Dynamic potentiometric response of electrode based on type B- Ca^{2+} membrane; Response corresponding to four concentration steps changes from negligible concentration of Ca^{2+} to 10^{-6} M, from 10^{-6} to 10^{-5} M, from 10^{-5} to 10^{-4} M and from 10^{-4} to 10^{-3} M Ca^{2+} .

Figure 7 shows that the membranes with anionic additive (B-Ca^{2+} , H-Ca^{2+} and I-Ca^{2+}) present similar potentiometric response, with potential constant in the pH range from 4.0 to 9.0. Nevertheless, the membrane without additive (C-Ca^{2+}) responded to H^+ like the membrane with cationic additive (E-Ca^{2+}) (that had a constant response between pH 4.0 and 9.0) but it responded to H^+ ion below pH 4.0.

Figure 8 shows how improves the selectivity for ions calcium, barium and strontium when the amount of anionic additive is increased. However, this improvement was complete at 20%mol of anionic additive (B-Ca^{2+}) and the improvement in the selectivity with 50%mol (H-Ca^{2+}) or to 75%mol (I-Ca^{2+}) of anionic additive was practically negligible. The membrane without additive (C-Ca^{2+}) and the one that contains the cationic additive (E-Ca^{2+}) had low selectivity for the determination of calcium ion.

In conclusions, the membranes with the best selectivity contained the ionophore tetronasin and the anionic additive (A-Ca^{2+} , B-Ca^{2+} , H-Ca^{2+} and I-Ca^{2+}). Ba^{2+} and Sr^{2+} ions were interferences for these four membranes, whilst the interference of ions Mg^{2+} , Rb^+ , K^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Na^+ and Li^+ was practically negligible (selectivity coefficients lower than 10^{-3}). This fact suggests a potential use of tetronasin sensors for the determination of Ca^{2+} , since Ba^{2+} and Sr^{2+} are rarely found in natural samples.

The response time (t_{90}) for all membranes with tetronasin were lower than 12 seconds, although the great part of the membranes responded in 3 to 4 seconds. This exceptionally fast response can be explained by the open structure of the antibiotic tetronasin to coordinate the metal. The coordination of the metal was given by five oxygen atoms of the tetronasin and the sixth coordination position was occupied by a molecule of water¹⁰. Hence, the molecule of water provided a coordination point with more mobility; this fact maybe is the explanation for the fast coordination process by the ionophore tetronasin.

Figure 9 shows the measured potential of an ISE B- Ca^{2+} corresponding to four additions of Ca^{2+} . The transient response observed for one decade changes of concentration had the typical exponential profile.

Influence of pH on the response

In order to study the pH influence, a detailed study at pH influence on working conditions was performed. The used buffers were tris(hydroxymethyl)aminomethane 5mM at pH 9.0 and pH 8.0, imidazole 5mM at pH 7.0 and pH 6.0, citric acid 5mM at pH 5.0 and pH 4.0 and glycine 5mM at pH 3.0. The pH of the citric acid buffers was adjusted with lithium hydroxide, while the rest of buffers were adjusted with HCl.

The potentiometric characteristics for the membranes B- Ca^{2+} , C- Ca^{2+} , E- Ca^{2+} , H- Ca^{2+} and I- Ca^{2+} are summarized in Table 2. Figure 10 shows how varies the sensitivity vs pH for these five membranes; in the figure it is possible appreciate a maximum of sensitivity at pH 5.0 (double Nernstian value) for membranes with anionic additive (B- Ca^{2+} , H- Ca^{2+} and I- Ca^{2+}). On the other hand, the membrane without ionic additive (C- Ca^{2+}) and the membrane with cationic additive (E- Ca^{2+}) displayed equivalent sensitivities near the Nernstian value in a range at pH 5.0.

The detection limit also depends on pH. Table 2 shows that the membrane with cationic additive and the membrane without additive presented interference due to H^+ ion and, consequently, high detection limits. On the other hand, the membranes with anionic additive had acceptable detection limits at pH 5.0.

The highest sensitivity corresponds to pH = 5.0 as results from the potentiometric optimisation study for the buffered media suggested a highest sensitivity at pH 5.0. The maximum sensitivity for the ISE B- Ca^{2+} at pH 5.0 was 65.1mV/dec. This value corresponded to twice the Nernstian value.

“Apparently twice-Nernstian response”

There exist other cases of ISEs with twice-Nernstian sensitivity in the literature. The simplest case are for Pb^{2+} or Hg^{2+} ISEs²⁶⁻²⁸; in these cases, the ionophore recognizes a complex with charge +1 derived from the primary ion. The ISEs respond to the complex $[MeOH]^+$ instead of to the Me^{2+} ion, however, it seems that they respond to Me^{2+} with twice the sensitivity due to the concentration of OH^- usually remains constant.

The hypothesis that the hydroxocomplex $[CaOH^+]$ could be responsible for the response is false, since the anomalous response prevails in acidic pH. A second possibility could be that the response was caused by a charge +1 complex of calcium with chloride that comes

from the $CaCl_2$ used in all experiments. In order to check this hypothesis, three calibrations were done using calcium salts from different anions. The overlapped curves with nitrate, acetate and chloride salts confirmed that the $[CaCl^+]$ was not responsible for the high slope response of tetronasin ISEs.

Other authors²⁹ explain that the non-Nernstian response is a consequence of the coupling of two simultaneous processes: the ion recognition and small changes inside the membrane that affect to the membrane potential. The theoretical frame Phase Boundary Potential Model¹⁴ describes these changes in the membrane and allows to calculate the membrane potential. This response mechanism quantifies the membrane potential at the interface of the aqueous and organic membrane phases using thermodynamic equilibriums and the electroneutrality condition.

By applying this response model, it is possible to explain non-Nernstian responses with bigger, smaller or inverse sensitivity for ISEs incorporating ionophores with acid-base properties²⁹. ISEs have been described employing natural antibiotics with carboxyl groups (e.g. monensin and lasalocid¹⁵) displaying experimental sensitivity values of 58 mV/dec for divalent ions (e.g. Ca^{2+} and Ba^{2+}). This sensitivity is twice the expected for Nernstian responses to these alkaline-earth ions; this is the reason why this phenomena was named as apparently “Twice-Nernstian” response²⁹.

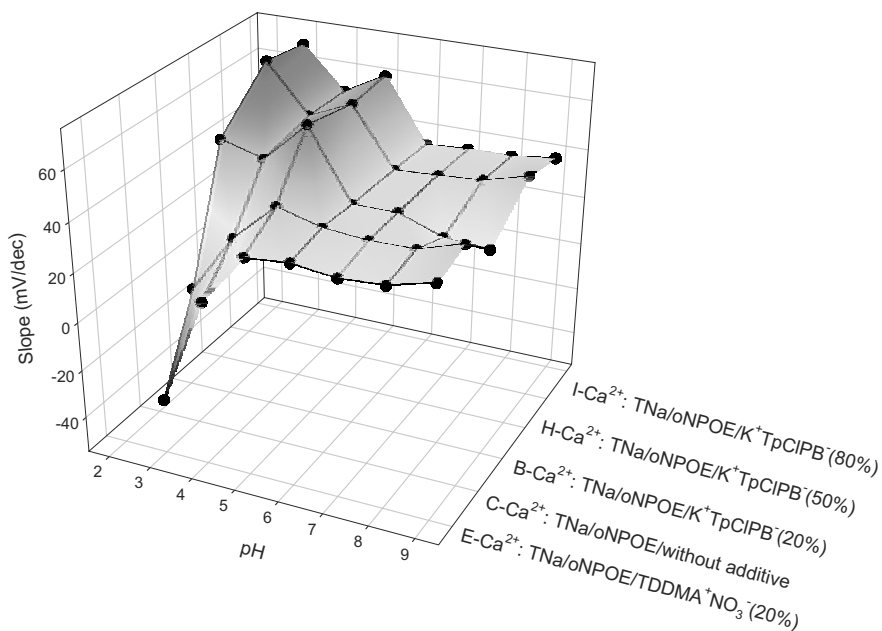


Fig. 10. Dependence of the sensitivity versus pH and against the type of lipophilic additive.

Table 2. Potentiometric response characteristics for 5 different Ca^{2+} selective membranes varying pH.

pH	Membrane B - Ca^{2+}		Membrane C - Ca^{2+}		Membrane E - Ca^{2+}		Membrane H - Ca^{2+}		Membrane I - Ca^{2+}	
	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)
3.00	53.5	$3.1 \cdot 10^{-4}$	2.8	$4.2 \cdot 10^{-2}$	-32.0	---	72.1	$1.9 \cdot 10^{-5}$	69.2	$1.0 \cdot 10^{-5}$
4.00	48.8	$1.9 \cdot 10^{-5}$	27.1	$1.0 \cdot 10^{-3}$	12.6	$1.0 \cdot 10^{-3}$	52.8	$6.3 \cdot 10^{-6}$	52.4	$4.5 \cdot 10^{-6}$
5.00	65.1	$3.0 \cdot 10^{-5}$	43.0	$8.5 \cdot 10^{-4}$	33.8	$1.0 \cdot 10^{-3}$	60.3	$9.8 \cdot 10^{-6}$	61.5	$9.5 \cdot 10^{-6}$
6.00	37.4	$8.9 \cdot 10^{-6}$	38.3	$9.3 \cdot 10^{-5}$	35.5	$1.9 \cdot 10^{-4}$	36.8	$8.5 \cdot 10^{-6}$	36.0	$1.3 \cdot 10^{-5}$
7.00	37.5	$3.7 \cdot 10^{-6}$	36.9	$2.2 \cdot 10^{-5}$	33.5	$7.9 \cdot 10^{-5}$	37.8	$6.9 \cdot 10^{-6}$	37.1	$7.1 \cdot 10^{-6}$
8.00	31.2	$1.1 \cdot 10^{-6}$	37.2	$7.9 \cdot 10^{-6}$	34.5	$3.8 \cdot 10^{-5}$	39.1	$4.1 \cdot 10^{-6}$	37.4	$1.7 \cdot 10^{-6}$
9.00	30.2	$3.5 \cdot 10^{-6}$	42.8	$5.1 \cdot 10^{-6}$	39.4	$1.8 \cdot 10^{-5}$	44.0	$3.3 \cdot 10^{-6}$	39.6	$9.1 \cdot 10^{-7}$

The derived quantitative model predicts that, in the case of membranes with acidic ionophores and anionic additive, the slopes of divalent cations depend on the pH of the solution²⁹. As the pH decreases, response slopes are found to change from Nernstian to apparently “twice-Nernstian” slopes and after that to come back to Nernstian response again. The same model predicts that, in the case of membranes with ionophore with acidic groups and employing a cationic additive, at high pH the sensitivity is Nernstian for the primary cation, but at low pH, the response is Nernstian for the cation H⁺. In order to decide if our ISEs follow the apparently “Twice-Nernstian” response, is necessary to compare the sensitivity results versus pH with the theoretical results according to this model. The dependence of the sensitivity for the ISEs versus pH and against the type of lipophilic additive is shown in Figure 10. The detection limits obtained for these ISEs in the different buffer are shown in Table 2. All ISEs that contained ionophore tetroneasin had Nernstian slopes (approximately 35 mV/dec) at high pH (between 9.0 and 6.0). The behaviour changed at pH lower than 6.0, where the three membranes with anionic additive presented a maximum of sensitivity at pH 5.0 with apparently “Twice-Nernstian” response (65 mV/dec); below pH 5.0, the sensitivity decreased again. The membrane without additive and the membrane with cationic additive have similar response with important interference of the hydrogen ion below pH 5.0. This interference is also shown in the Reilly diagram (Figure 7). These results have been recently confirmed using the Electrochemical Impedance Spectroscopy technique³⁰.

Conclusions

In this work, exhaustive characterization of ISEs using for first time the ionophoric antibiotic tetroneasin was performed. A previous characterization for these sensors to sodium ion gave low sensitivity and poor selectivity. Nevertheless, the sensitivity and the selectivity demonstrated to be interesting for calcium ion, where superernstian responses could be obtained.

The best response was obtained with membranes that contain *o*NPOE, the ionophoric antibiotic tetroneasin and 20% anionic additive. In this type of ISEs, the sensitivity rises to approximately 60mV/dec for a pH value of 5.0. This anomaly, also observed for related ionophores, was fully justified applying the established “Apparently-Twice Nernstian” model.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the Ministry of Education, Science and Sports (MECD, Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134 and by the Department of Universities and the Information Society (DURSI) from the Generalitat de Catalunya.

References

- 1 E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Electroanalysis* 1999 **11** 915.
- 2 Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure Appl. Chem.* 2000 **72** 1851–2082.
- 3 Y. Umezawa, K. Umezawa, P. Bühlmann, N. Hamada, H. Aoki, J. Nakanishi, M. Sato, K. P.

- Xiao, Y. Nishimura, *Pure Appl. Chem.* 2002 **74** 923.
- 4 Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, N. Hamada, *Pure Appl. Chem.* 2002 **74** 995.
- 5 P. Anker, H. B. Jenny, U. Wuthier, R. Asper, D. Ammann, W. Simon, *Clin. Chem.* 1983 **29** 1447.
- 6 O. G. Davies, G. J. Moody, J. D. R. Thomas, *Analyst* 1988 **113** 497–500.
- 7 S. L. Less, P. F. Leadlay, C. J. Dutton, J. Staunton, *Tetrahedron Lett.* 1996 **37** 3519.
- 8 T. Fonseca, N. P. Lopes, P. J. Gates, J. Staunton, *J. Am. Chem. Soc. Mass Spectr.* 2004 **15** 325.
- 9 K. Suzuki, K. Tohda, H. Aruga, M. Matsuzoe, H. Inoue, T. Shirai, *Anal. Chem.* 1988 **60** 1714.
- 10 T. Martinek, F. G. Riddell, T. J. Rutherford, S. Sareth, C. T. Weller, *Chem. Comm.* 1998 **17** 1893.
- 11 J. Grandjean, P. Laszlo, *Tetrahedron Lett.* 1983 **24** 3319.
- 12 P. Anker, E. Wieland, D. Ammann, R. E. Dohner, R. Asper, W. Simon, *Anal. Chem.* 1981 **53** 1970.
- 13 A. J. Freund, G. J. Moody, J. D. R. Thomas, B. J. Birch, *Analyst* 1983 **108** 1072.
- 14 E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Talanta* 2004 **63** 3.
- 15 S. Amemiya, P. Bühlmann, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* 1998 **70** 445.
- 16 A. A. S. C. Machado, *Analyst* 1994 **11** 2263.
- 17 F. Cespedes, E. Martinez-Fabregas, S. Alegret, *Trac-Trends Anal. Chem.* 1996 **15** 296.
- 18 J. Inczedy, T. Lengyel, A. M. Ure, *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*, Blackwell Science: Oxford, 1998.
- 19 P. C. Meier, *Anal. Chim. Acta* 1982 **136** 363.
- 20 C. N. Reilley, R. W. Schmid, *Anal. Chem.* 1958 **30** 947.
- 21 R. P. Buck, E. Lindner, *Pure Appl. Chem.* 1994 **66** 2527.
- 22 D. Wegmann, H. Weiss, D. Ammann, W. E. Morf, E. Pretsch, K. Sugahara, W. Simon, *Microchim. Acta* 1984 **3** 1.
- 23 E. Lindner, K. Toth, E. Pungor, *Dynamic characteristics of ion-selective electrodes*, CRC Press, BocaRaton: FL, 1988.
- 24 F. Burriel, *Química analítica cuantitativa*, Paraninfo: Madrid, 2001.
- 25 R. D. Armstrong, G. Horvai, *Electrochim. Acta* 1990 **35** 1.
- 26 W. Hasse, B. Ahlers, J. Reinbold, K. Cammann, *Sens. Actuator B-Chem.* 1994 **19** 383.
- 27 E. Lindner, K. Toth, E. Pungor, *Anal. Chem.* 1984 **56** 1127.
- 28 J. Lu, X. Tong, X. He, 2003 **540** 111.
- 29 S. Amemiya, P. Bühlmann, K. Odashima, *Anal. Chem.* 2003 **75** 3329.
- 30 D. Calvo, J. Bartroli, M. del Valle, *Electrochim. Acta* 2006 **51** 1569.

ARTICLE 2-A:

“Simultaneous titration of ternary alkaline-earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue”. Daniel Calvo i Manel del Valle. *Microchemical Journal*. Acceptat maig de 2007. doi:10.1016/j.microc.2007.04.005.



Simultaneous titration of ternary alkaline–earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue

Daniel Calvo, Manuel del Valle *

Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 8 March 2007; accepted 30 April 2007

Abstract

A fast novel complexometric titration procedure is proposed, in which equivalence concentrations were determined using a potentiometric electronic tongue. The titration consists in a reduced number of fixed additions of titrant and the recording of the potentials of an array of ion-selective electrodes with cross-selectivity response. The generated data (number of sensors \times number of additions) were used as input data to an artificial neural network response model previously trained with standards. The application of this procedure is demonstrated with automated EDTA titrations of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} mixtures, up to 3.3 mM total ion concentration. In the studied case, good results predicting the three concentrations were obtained using five 1 mL fixed volume additions plus the readings of eight sensors. The unique additional step required was the pH buffering of the sample to pH 9.5. Good comparisons were observed between obtained and expected concentrations for the three cations with the external validation samples ($n=17$, with RMSE values of 0.18, 0.28 and 0.32 mM for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} , respectively). The proposed procedure was applied to mineral waters and compared with reference methods.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Potentiometric titration; Electronic tongue; Ion-selective electrode; Artificial neural network; Alkaline–earth ions

1. Introduction

Complexometric titrations are established techniques for determining metal ions, although they are unable to solve the most complex cases. Simultaneous determinations of mixtures of species are one of the critical issues when these present very similar characteristics, yielding therefore global results, such as hardness, alkalinity, saponification index, chlorine or oxygen demands, etc. The use of ion-selective electrodes (ISEs) to determine titration end points, known for more than half a century [1], permits in particular to resolve binary mixtures, normally after addition of a masking agent; this complexometric agent shifts one equivalent point in order to visualize the second one; however, this strategy is limited for few analytes, whereas its effectiveness is proven only for binary mixtures [2].

More recently, thanks to available computing power, the combination of potentiometric titrations with chemometrics tools was made feasible [3–7]. Mathematical tools were used to

extract the significant composition information from the titration curve. These chemometric-based methods had the particularity that a previous training process (with standards that generate the necessary information) was needed for getting the predictive ability. The commonly used sensor for this purpose was the pH-ISE, used in combination with different mathematical tools in order to resolve acid–base mixtures using NaOH as titrant [3–5], or metal mixtures after complexometric titrations [6]. In other applications, sulfates, or calcium, were separately determined employing a hydrolytic potentiometric titration in conjunction with an artificial neural network (ANN) model [8]. Related to these, the acid–base flow injection titration of mixtures of acids in juice samples is described in the literature, for which an ANN model was developed [9]. Other types of sensors have been also used with this approach, as the unmodified paste carbon electrode [7], used for determination of binary or ternary mixtures of silver, mercury and copper mixtures after titration with thiocyanate.

The use of non-specific sensor arrays plus chemometric tools to solve various problems, like multidetermination or classification, has been demonstrated [10] recently. This new analytical

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5813235; fax +34 93 5812379.

E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

concept, also known as electronic tongue (ET) when analyzing liquid samples, is based on the use of an array of sensors with cross-selectivity response, usually formed by an array of cross-sensitive ISEs [11,12] or alternatively, voltammetric sensors [13–15]. The data obtained by the sensor array are processed using chemometric tools in order to extract the information needed to predict new samples characteristics. There are two widely used tools in ETs for quantitative applications, ANNs [11] and Partial Least Squares (PLS) [16]. In the qualitative application, for instance, to identify or to classify varieties of samples [17], the mathematical tools used are Discriminant Analysis (DA), SIMCA and PLS-DA but the most extensively used tool is Principal Component Analysis (PCA), used to visualize the data structure obtained by the sensor array [18,19].

Recently in our laboratory, we have started a research line dealing with the use of ETs, mainly for quantitative multi-determination applications [11]. The purpose of this communication is to couple the ET detection with a complexometric fixed volume titration, in order to resolve, for the first time, ternary mixtures, in this case of alkaline–earth metals. The proposed sensor array used for the application was formed by eight potentiometric sensors. These all-solid-state ISEs were based on polyvinyl chloride (PVC) membranes that contain neutral carriers from the family of the ionophoric antibiotics as recognition elements. The application examined was the simultaneous determination of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} mixtures. Concentrations were calculated from a properly trained response model, which was constructed using ANNs, and was optimized in order to improve its prediction. Finally, to show the applicability of the proposed concept, it was applied to real water samples and compared with reference methods. The proposed methodology may be a precise and fast procedure for resolving mixtures, where complexity is shifted from the handling steps to detection and data treatment.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Potentiometric membranes of the ISEs forming the sensor array were formulated with standard compositions from the literature. These included the ionophore, an ionic additive (in some cases), the plasticizer and the PVC polymer dissolved in tetrahydrofuran (THF) (Merck). The different ionophores used

were: the sodium salt of the antibiotic tetronasin (provided by the University of Cambridge [20]), ETH1001 (Fluka), bis(bis(4-1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl)phosphate calcium salt (BBTP) (Fluka), ETH4030 (Fluka), 4-tert-butylcalix[8]aren octoacetic acid octoethyl ester (TBCOO) (Acros), monensin sodium salt (Acros), dibenzo-18-crown-6 (Fluka) and lasalocid A sodium salt (Fluka). The used plasticizers were 2-nitrophenyl octyl ether (oNPOE), dioctyl phenylphosphonate (DOPP), tributylphosphate (TPB), dibutyl sebacate (DBS) and bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) (all from Fluka). The ionic additives (Fluka) were potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate ($\text{K}^+\text{TpClPB}^-$) and sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] borate (Na^+TFPB^-). The polymeric matrix for the membranes was PVC, high molecular weight (Fluka).

Membranes were solvent cast over an internal ohmic contact to form the all-solid-state electrodes. This contact was prepared by mixing the same quantities of graphite (BDH) and epoxy resin Araldite M+HR Hardener (Uneco).

Other reagents used for preparing stock solutions or buffers were: calcium chloride (Riedel-de Haën), magnesium chloride (Merck), barium chloride (Fluka), strontium chloride (Fluka), hydrochloric acid (Panreac), ammonia (Panreac) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) (Panreac). All solutions were prepared using doubly distilled water and reagents of proanalysis or higher quality.

2.2. Construction of the ISE array

The selection of the ionophore candidates to construct the ISE array was determined by its response to alkaline–earth cations. The compositions of the eight membranes used are shown in Table 1. The ISEs were constructed in all-solid-state or non-symmetrical configuration, as of normal use in our laboratories [28]. Membranes had an estimated thickness of ca. 0.3 mm. Before its first use, they were conditioned in a 0.1 M solution of their primary ion for 24 h.

2.3. Apparatus

An automatic titration system with multipotentiometric detection, developed in our laboratories, was used for this work. The system consisted of a Crison 2030 automatic microburette (Crison), fitted with a 5 mL syringe (Hamilton), controlled by a computer. The measurement system comprised the ISE array, a Ag/AgCl double-junction reference electrode

Table 1
Membrane compositions of the eight ISEs considered in the sensor array

ISE	PVC (wt.%)	Plasticizer (wt.%)	Ionophore (wt.%)	Additive (wt.%)	References
Calcium (I)	(32.9)	oNPOE, (66.0)	Tetronasin, (1.0)	$\text{K}^+\text{TpClPB}^-$, (0.14)	[21]
Calcium (II)	(33.3)	oNPOE, (65.2)	ETH1001, (1.0)	$\text{K}^+\text{TpClPB}^-$, (0.36)	[22]
Calcium (III)	(30.0)	DOPP, (65.0)	BBTP, (5.0)	–	[23]
Magnesium	(32.7)	oNPOE, (65.6)	ETH4030, (1.0)	$\text{K}^+\text{TpClPB}^-$, (0.65)	[24]
Strontium	(38.9)	TBP, (58.4)	TBCOO, (1.9)	Na^+TFPB^- , (0.78)	[25]
Barium	(27.0)	DBS, (70.0)	Monensin, (3.0)	–	[26]
Generic (I)	(29.0)	DOS, (67.0)	Dibenzo-18-crown-6, (4.0)	–	[27]
Generic (II)	(27.0)	DBS, (70.0)	Lasalocid A, (3.0)	–	[26]

(Thermoelectron 900200) and an 8-channel signal conditioning circuit connected to the National Instruments NI6221 Multi-function DAQ analog inputs. The whole system was controlled by a PC using a virtual instrument developed in Labview. For the preparation of the buffer solution a Crison 2002 pH meter with a combination pH electrode (Ingold model 10/402/3092) was used.

2.4. Characterization of sensors

ISEs were first characterized versus the three considered cations by separate calibrations. The calibrations consisted on the recording of ISE potentials after getting microadditions of each considered ion on a certain volume of doubly distilled water. The sensitivity corresponded to the slope of the linear response against the logarithm ion's activity. The ion activity coefficients were calculated according to the Debye–Hückel formalism [29]. The ISEs lower detection limit (DL) was calculated following IUPAC recommendations [30] as the point of intersection of the two asymptotic behaviours of the calibration curve.

2.5. Titration procedure

All titrations were made in an equivalent pH and ionic media, by adding 5 mL of 0.3 M $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ buffer at pH 9.5 to 25 mL of each sample. In these conditions, the activity coefficients were taken to be constant. First attempted titrations used 20 additions of 0.25 mL of EDTA 0.018 M in order to show the differences in the titration curve for solutions with different compositions (Fig. 1). The titration curves were constructed using the recorded potentials between ISEs and the reference electrode after 20 s homogenization. These titrations were reduced from 20 additions (working sequence of 7 min) to 5 additions of 1 mL of titrant (sequence of 2 min) in order to achieve quick procedures with less experimental complexity. The generated data per sensor and per sample were 5 potential readings after each addition, plus the initial potential. Thus, the

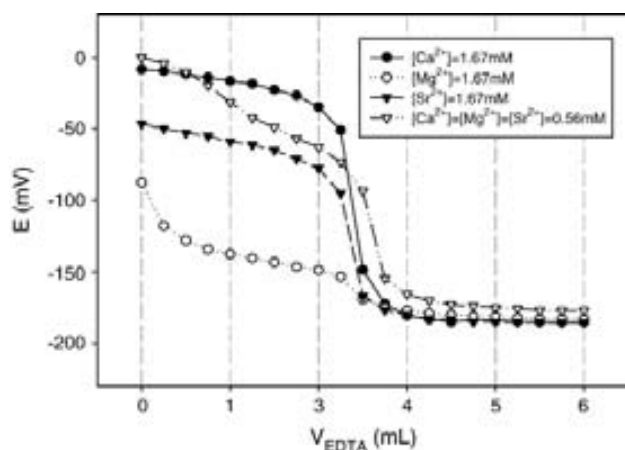


Fig. 1. Titration curves for different calcium, magnesium and strontium mixtures measured using the ISE calcium (II) and using EDTA 0.018 M as titrant. Vertical dashed lines indicate fixed volumes finally entered to the response model.

total input data per sample were 6 (potential readings) \times 8 (ISEs) = 48 input vector.

2.6. Building of the response model

In order to construct and validate the response model, a set of 50 samples, consisting of solutions with random mixtures of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} were prepared manually and processed. The individual and total concentrations were restricted to 3.3 mM, equivalent to a single syringe of titrant. The studied ranges of concentrations for the three ions were 0.0–3.3 mM, according to expected concentrations in the real samples. A representative mineral water ionic media were simulated adding typical ions present in mineral waters ($[\text{K}^+] = 0.1$ mM; $[\text{Na}^+] = 0.5$ mM; $[\text{Cl}^-] = 0.2$ mM and $[\text{SO}_4^{2-}] = 0.15$ mM). The set was subdivided into two subsets: (1) training: with 2/3 parts of total set (33 samples) and it served to build the model; and (2) test: with 1/3 parts of the set (17 samples) and it evaluated the model's predictive ability. The samples were distributed randomly with the precaution that the samples with maximums and minimums must be in the training subset.

Additionally, four samples in triplicate (12 extra samples) were prepared in order to calculate the DL and the repetitivity of the proposed procedure. The DL for each ion was calculated as three times the standard deviation of three blanks. The repetitivity was calculated (for each ion) processing three replicate samples with intermediate concentration (1.7 mM) of Ca^{2+} , Mg^{2+} or Sr^{2+} ; the repetitivity was calculated as the standard deviation of the three obtained concentrations.

The proposed procedure used the ANNs in order to model the potentiometric response of the three ions studied. The ANNs constructed had 48 neurons in the input layer and were trained using the Bayesian Regularisation (BR) algorithm. The use of BR algorithm for building the response has the particularity that an internal validation subset of samples, usually used to prevent overfitting is not needed, as it happens with more classical algorithms, such as Gradient descent [11,31]. The parameters optimized in detail were the number of neurons in the hidden layer (from 3 to 12) and the transfer functions employed in the hidden and the output layers.

2.7. Software

Neural network processing was developed with Matlab 6.5 (Mathworks, USA), using its Neural network toolbox (v. 4.0). Sigma Plot 2000 (SPSS Inc., USA) was used in graphic representation of data.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of ISEs

The eight constructed ISEs were characterized for each considered ion. The obtained sensitivities and DL for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} are shown in Table 2. One of the most important premises for construct a multianalyte ET is the cross-selectivity of the sensor array [10]. The needed cross-selectivity is dem-

Table 2
Sensitivity and detection limits (DL) obtained for the eight constructed ISEs

ISE	Sensitivity (mV/dec)			DL (mM)		
	For Ca ²⁺	For Mg ²⁺	For Sr ²⁺	For Ca ²⁺	For Mg ²⁺	For Sr ²⁺
Calcium (I)	37.64±1.12	–	29.39±0.67	2.65·10 ⁻³	–	2.86·10 ⁻²
Calcium (II)	28.28±0.21	–	21.33±1.58	6.07·10 ⁻⁴	–	3.00·10 ⁻²
Calcium (III)	29.18±0.32	4.51±0.61	22.21±0.99	9.54·10 ⁻⁴	1.45·10 ⁻³	1.03·10 ⁻³
Magnesium	22.86±0.26	29.91±0.68	30.42±1.05	1.33·10 ⁻³	3.85·10 ⁻³	3.68·10 ⁻³
Strontium	39.47±0.44	26.63±0.90	28.67±0.61	2.06·10 ⁻³	8.48·10 ⁻³	4.67·10 ⁻³
Barium	9.71±1.83	7.35±1.63	16.09±3.53	4.00·10 ⁻¹	1.90	1.14·10 ⁻²
Generic (I)	10.84±2.10	–	11.03±2.97	5.44·10 ⁻¹	–	1.21·10 ⁻¹
Generic (II)	25.98±1.70	9.62±1.63	30.62±0.86	5.49·10 ⁻²	4.93·10 ⁻¹	1.75·10 ⁻²

Confidence intervals calculated at 95% confidence level.

onstrated when observing the obtained sensitivities; we can see that five ISEs responded to the three considered species. The sensors with more cross-selectivity response are the magnesium and strontium ISEs, with sensitivities up or near than 20 mV/dec for the three ions. Other ISEs with response to the three ions are the calcium (III), barium and generic (II) ISEs, although some slopes are below than 10 mV/dec for certain ion. The ISEs calcium (I) and calcium (II) did not present response to Mg²⁺, this feature is explained by the high selectivity of the ionophores tetronasin [21] and ETH1001 [22]. Obtained DL are below 5·10⁻³ mM for the primary ion, as expected for this type of sensors [32]. These characteristics allowed us to use this sensor array for the construction of an ET to determine Ca²⁺, Mg²⁺ and Sr²⁺ mixtures with concentrations down to 5·10⁻³ mM.

3.1.1. Response model based on ANNs

To construct the response model with ANNs, a subset of 33 samples was used; this subset was formed by solutions with random concentrations of Ca²⁺, Mg²⁺ and Sr²⁺. The compositions of these solutions are summarized in the Table 3, where we can see that the studied ranges of concentrations for the three ions were between 0.0 and 3.3 mM. An extra 17 samples were prepared and processed in order to evaluate the prediction

ability of the developed procedure, forming the external test set. These samples (also summarized in Table 3) had different compositions than the training samples and did not participate in the training process.

For each performed titration, an input information vector was acquired, which corresponded to 48 values (8 sensors×6 titrant additions). Thus, the configuration of the ANN used for the response model had 48 neurons in its input layer. The number of neurons in the output layer was fixed too; it required 3 neurons, one for each species to be quantified. Other parameters fixed a priori, based on our previous experience [11], were the BR algorithm used to train the model, the learning rate (fixed at $\alpha=0.1$), the momentum ($\beta=0.4$) and a linear transfer function of the neurons at the input layer (*purelin*). Then, the following parameters were optimized by systematic evaluation in order to obtain the best ANN configuration: the number of neurons in the hidden layer (varied between 3 and 12 neurons), the transfer function of neurons in the hidden layer (*tansig* or *logsig*) and that for the neurons in the output layer (*tansig* or *purelin*).

The goodness of the model generated with the training samples (convergence attained for a fixed error goal of 0.001) was evaluated with the external test subset. The best ANN

Table 3
Random distribution of calcium, magnesium and strontium prepared mixtures, used for the training and external test sets

Sample	[Ca ²⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	[Sr ²⁺] (mM)	Sample	[Ca ²⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	[Sr ²⁺] (mM)	Sample	[Ca ²⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	[Sr ²⁺] (mM)
Train01	0.000	0.000	0.000	Train18	0.429	1.455	0.257	Test01	0.104	0.239	2.446
Train02	3.326	0.000	0.000	Train19	2.605	0.437	0.217	Test02	0.052	2.992	0.245
Train03	0.000	3.356	0.000	Train20	1.443	1.294	0.285	Test03	0.160	0.388	1.042
Train04	0.000	0.000	3.328	Train21	0.842	0.421	1.283	Test04	0.529	0.263	0.152
Train05	1.443	0.045	0.726	Train22	0.345	0.198	0.922	Test05	0.709	0.760	0.605
Train06	0.168	2.304	0.245	Train23	0.204	0.186	0.621	Test06	0.581	0.226	0.922
Train07	2.324	0.889	0.116	Train24	0.180	1.496	0.529	Test07	2.124	0.121	0.798
Train08	0.842	0.045	0.433	Train25	0.842	1.375	0.509	Test08	1.323	0.485	1.323
Train09	0.425	2.264	0.096	Train26	0.309	0.053	2.406	Test09	0.140	0.712	0.882
Train10	1.643	0.202	0.962	Train27	2.004	0.562	0.718	Test10	0.505	0.049	2.446
Train11	0.457	1.132	1.163	Train28	0.273	0.113	2.005	Test11	1.443	0.849	0.962
Train12	0.092	1.051	1.764	Train29	0.220	2.870	0.229	Test12	0.369	0.635	1.403
Train13	2.324	0.214	0.116	Train30	0.092	0.097	2.887	Test13	0.882	1.698	0.221
Train14	2.004	0.271	0.249	Train31	0.112	1.779	0.084	Test14	0.509	0.170	1.443
Train15	1.403	0.166	0.016	Train32	0.765	2.183	0.313	Test15	0.922	0.578	1.844
Train16	0.545	1.011	0.409	Train33	0.325	1.819	0.481	Test16	0.481	1.779	0.168
Train17	0.601	0.421	0.044	–	–	–	–	Test17	1.162	0.198	0.168

configuration should have the minimum error between the expected values (\hat{c}_{ij}) and the calculated values of the concentrations (c_{ij}); this error was calculated as the Root Mean Square Error (RMSE):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{m \cdot n - 1}}$$

for each of the n samples (i) and for each of the m species (j) considered.

Additionally, the calculated concentrations were compared with their expected values. When the generated model has a correct prediction ability, the representation of predicted (Y) versus expected (X) concentrations could be fitted using linear regression with correlation coefficient close to 1, slope equal to 1 and zero intercept.

After comparing performance with the different configurations evaluated, the best architecture for the ANN had 48/6/3 neurons in the input/hidden/output layers. Its architecture used a sigmoidal *tansig* transfer function for the hidden layer and a linear *purelin* for the output layer. Part of the selection process of the best network architecture is illustrated in Fig. 2, where the best balance between minimum RMSE, maximum correlation coefficient, slopes close to 1 and intercept close to 0 can be deduced (6 neurons in its hidden layer).

This optimal network was evaluated constructing comparison graphs of obtained/vs/expected concentrations for the training and the external test sets. These comparisons showed a right behaviour, with correlations up to 0.9999 and regressions close to the ideality (the intervals were calculated at 95% confidence level), in the case of the training subset:

$$\text{Ca}^{2+} \quad Y = 0.999(\pm 0.003) \cdot X + 0.001(\pm 0.004) \quad R = 0.99996$$

$$\text{Mg}^{2+} \quad Y = 0.999(\pm 0.001) \cdot X + 0.001(\pm 0.002) \quad R = 0.99999$$

$$\text{Sr}^{2+} \quad Y = 0.999(\pm 0.002) \cdot X + 0.000(\pm 0.002) \quad R = 0.99999$$

The prediction ability of the optimal network may be best assessed with the results of the external test subset. The results of these 17 samples are presented in Fig. 3, where we can see correlation coefficients showing a clear relationship for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} , whereas the slopes and intercepts were also correct, with values that included 1 and 0, respectively. The RMSE for these regressions were 0.18, 0.28 and 0.32 mM for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} , respectively.

In order to calculate the analytical properties of the proposed procedure, an additional set of samples, as specified in the Experimental section, were titrated and processed. Using the obtained concentrations of the three ions from blanks we can

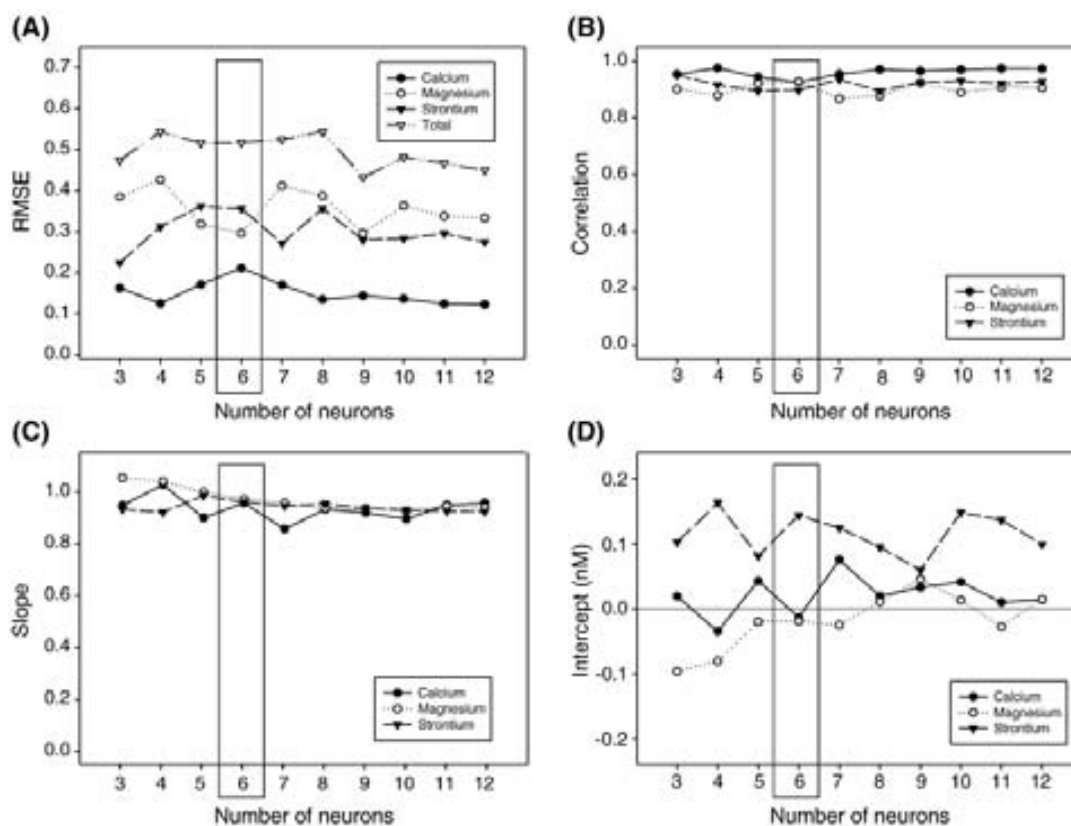


Fig. 2. Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model using *tansig* and *purelin* transfer functions for hidden and output layers respectively. (A) RMSE values. (B) Correlation coefficients. (C) Obtained slopes and (D) intercepts for the comparison regression between obtained/vs/expected concentrations.

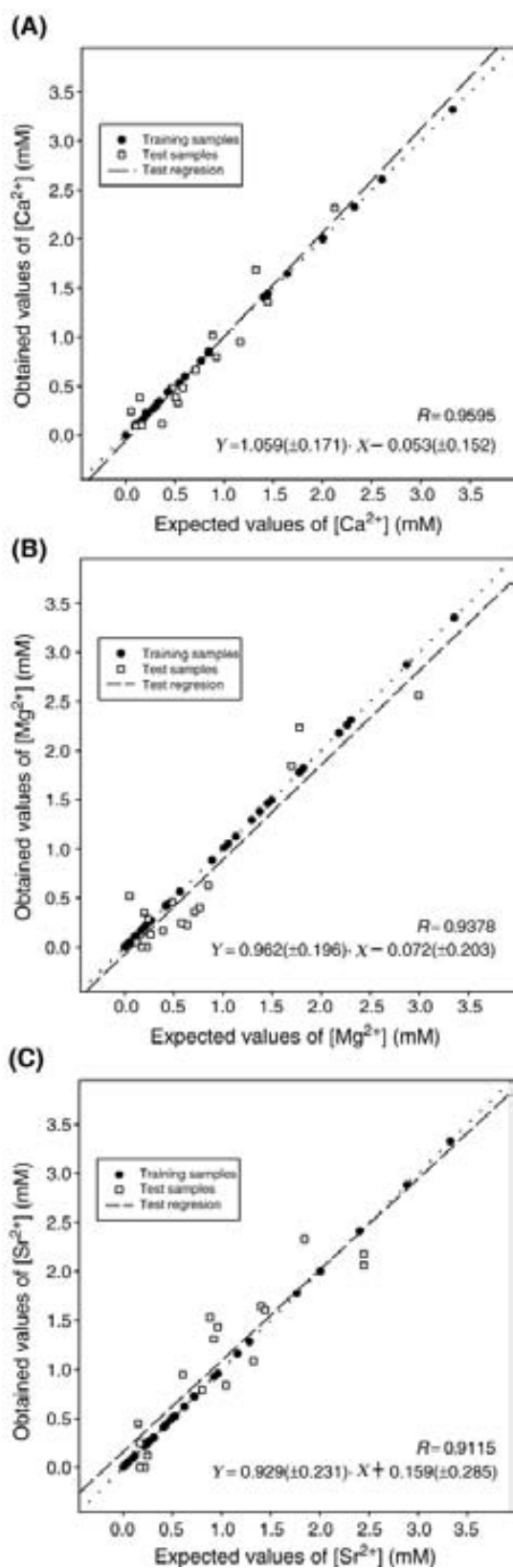


Fig. 3. Correlations between the obtained and the expected concentrations of calcium (A), magnesium (B) and strontium (C) for the training and the external test samples. The dotted line represents the ideal values, the dashed one the regression of the obtained/vs/expected values for the external test samples.

calculate the DL for the proposed method. The DL for the three determinations were 0.070, 0.094 and 0.18 mM for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} , respectively. These values of DL suggest a potential application of the proposed method to resolve the alkaline–earth metals in mineral water samples.

Finally, the precision of the procedure was calculated as its repetitivity using three replicate determinations of solutions containing 1.7 mM of each cation. The calculated repetivities were 4.8, 3.8 and 16% RSD for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} respectively. The unexpected high value of %RSD for Sr^{2+} may have its justification in the poor selectivity of the unique strontium-selective electrode used.

3.1.2. Validation of the proposed methodology

In order to check the gain in analytical features of the proposed methodology, other variant was evaluated using part of the same data. The alternative procedure was the construction of a classic potentiometric electronic tongue using initial measurements only, before any addition of titrant. This alternative used 8 potential readings (one per sensor) as fed information to construct the response model training the ANN. The architecture and the characteristics of the new network were the same with that proposed before in order to simplify, except for the input layer, in which there were only 8 neurons. Then, the configuration of the used ANN had 8/6/3 neurons in the input/hidden/output layers, and employed the *tansig/purelin* transfer functions in the hidden and output layers, respectively.

When the training process was finished, the obtained results were compared with the proposed procedure; these results are summarized in Table 4. An acceptable response model was constructed using the training subset of samples, obtaining significant correlations for the three ions, acceptable slopes close to 1 and intercepts close to 0. In comparison with the model that used titration data, the correlations (all $R > 0.995$), the slopes (0.986 for Ca^{2+} , 0.993 for Mg^{2+} and 0.994 for Sr^{2+}) and the intercepts (especially for Ca^{2+} is 0.017 mM) were slightly worse.

More interestingly, the results for the external subset showed a clear deterioration of the prediction ability. This deterioration

Table 4

Comparison results obtained with an ANN model built from initial potentials only ($V=0$)

Training	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca^{2+}	0.9959	0.986 ± 0.033	0.017 ± 0.040
Mg^{2+}	0.9997	0.993 ± 0.008	0.006 ± 0.010
Sr^{2+}	0.9977	0.994 ± 0.025	0.004 ± 0.027
Test	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca^{2+}	0.9772	0.939 ± 0.112	0.084 ± 0.100
Mg^{2+}	0.2191	0.336 ± 0.822	0.768 ± 0.851
Sr^{2+}	0.9517	0.872 ± 0.155	-0.003 ± 0.191
Real samples	Correlation	Slope	Intercept (mM)
Ca^{2+}	0.8240	0.859 ± 0.371	0.031 ± 0.382
Mg^{2+}	0.3533	-1.358 ± 2.262	1.550 ± 1.228

Confidence intervals calculated at 95% confidence level.

was especially evident in the case of magnesium cation, obtaining a correlation coefficient of 0.219, a slope of 0.336 and an intercept of 0.768 mM. The rest of cations could be determined more or less using the simplified data, but the case of strontium was also poorer as shown by the slope of its comparative regression (decreasing to 0.872).

The values of DL and precision for this variant reflected the poorer results for the external subset of samples. The DL for Ca^{2+} determinations was 0.008 mM in the presence of Mg^{2+} , 0.36 mM in the presence of Sr^{2+} and 0.083 mM in the absence of interferents. The DL for Mg^{2+} was 0.98 mM in the presence of Ca^{2+} , 6.1 mM in the presence of Sr^{2+} and 2.9 mM in the absence of interferents. The DL for Sr^{2+} determinations was 0.31 mM in the presence of Ca^{2+} ion, 0.039 mM in the presence of Mg^{2+} and 0.36 mM in the absence of interferents. The calculated repetitivities were 4.6, 29 and 35% RSD for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} respectively. All these data make the determination impractical if using this alternative. Besides, these values confirmed the profit of using the complete titration data.

3.1.3. Application to real samples

Once demonstrated the applicability of the proposed procedure in synthetic samples (subset of external test samples), the methodology was applied to the determination of alkaline–earth cations in mineral water samples. Unfortunately, natural samples normally do not contain strontium, so this species was not further considered. The samples used in this validation process were 14 commercial mineral waters (4 of them sparkling waters) with total hardness between 60 and 281 mg CaCO_3/L ; 1 of these samples could be classified as soft water (0–20 mg Ca/L), 4 as moderately soft water (20–40 mg Ca/L), 7 as slightly hard water (40–60 mg Ca/L) and 2 as moderately hard water (60–80 mg Ca/L).

The real samples were processed and titrated as before. To 25 mL of sample, 5 mL of 0.3 M $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ buffer at pH 9.5 was added in order to adjust the pH and the ionic media. The resulted solution was titrated with five 1 mL additions of EDTA 0.018 M and the recorded data were processed by the trained network.

The results obtained for the real samples with the proposed procedure were compared with reference analytical methods. The reference method was the inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) [33]. The results obtained are shown in Fig. 4, where satisfactory correlations can be seen for the two ions greater than 0.83. The regression parameters and their confidence intervals indicate no significant differences between the obtained and the reference values for Ca^{2+} and Mg^{2+} . The obtained RMSE values were 0.17 and 0.25 mM for Ca^{2+} and Mg^{2+} regressions, respectively.

The data generated for the real samples were also processed using the alternative method. The results obtained are summarized in Table 4, where we can see that the calcium determination was more difficult, obtaining a 0.824 correlation coefficient (with the proposed method was 0.941). About the Mg^{2+} cation, its determination was not feasible with this simpler alternative; the comparison regressions between the obtained and the reference values of concentrations showed a correlation

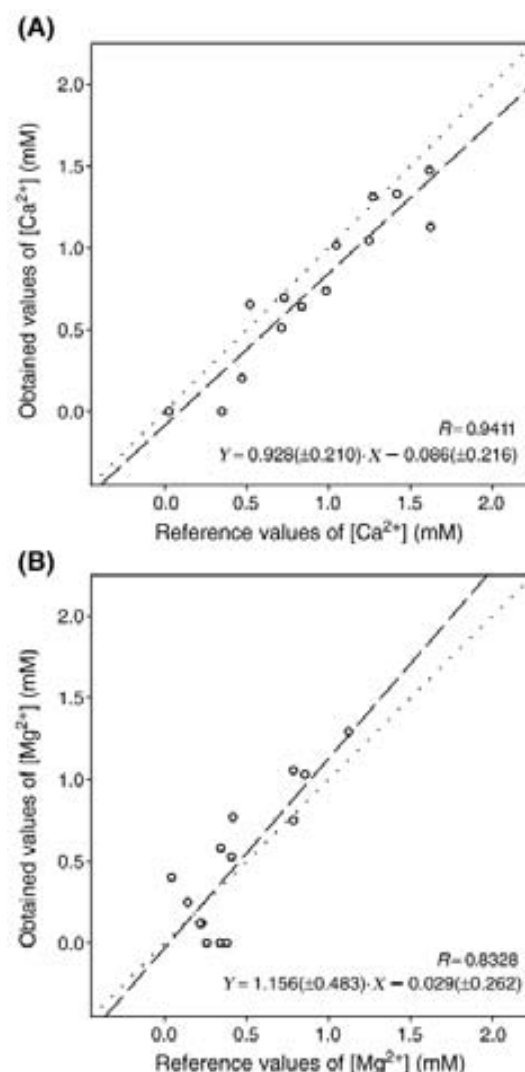


Fig. 4. Correlations between the obtained and the reference concentrations of calcium (A) and magnesium (B) for the real mineral water samples. The dotted line represents the ideal values, the dashed one the regression of the obtained/vs/reference values.

coefficient as low as 0.353 and a negative slope, all these values are also sketched in Table 4.

4. Conclusions

A multidetermination procedure of ternary solutions of alkaline–earth cations is presented, based on a fixed volume titration, the use of a potentiometric sensor array as end point detection system and the data treatment employing ANNs.

The proposed method permits the quantitative multidetermination of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} in aqueous samples with a very simple and quick procedure. The fed information to the ANN model is a 48-value vector (6 readings \times 8 sensors). The extraordinary modelling capabilities of ANN permit to resolve the concentrations of three substances, extremely difficult to achieve with standard titration procedures, even if masking agents are used. The proposed titration procedure showed better features than equivalent systems that use only the direct mea-

surements of potentiometric sensor array (classical ET concept). Then, the use of a titration procedure furnishes extra information about the sample composition, helping to better discriminate the components in the sample. Again, the proposed methodology follows current trends in modern analytical chemistry, shifting the complexity from methodological stages or instrumental complexity to the software field.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Ministry of Education, Science and Sports (MECD, Madrid, Spain) through project CTQ2004-08134 and by the Department of Innovation, Universities and Enterprise from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] G. Gran, *Analyst* 77 (1952) 661.
- [2] T.F. Christiansen, J.E. Busch, S.C. Krogh, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1051.
- [3] M. Shamsipur, B. Hemmateenejad, M. Akhond, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 147.
- [4] T. Moisisio, M. Heikonen, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 271.
- [5] Y. Ni, *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 145.
- [6] Y. Ni, Z. Peng, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 217.
- [7] M. Shamsipur, J. Hemmateenejad, H. Sharghi, *Talanta* 64 (2004) 590.
- [8] D. Brodnjak-Vonina, D. Dobnik, M. Novi, J. Zupan, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 47 (1999) 79.
- [9] C.G. Zampronio, J.J.R. Rohwedder, R.J. Poppi, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 62 (2002) 17.
- [10] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C.D. Natale, A. D'Amico, *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1965.
- [11] M. Cortina, A. Gutes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1197.
- [12] D. Calvo, A. Duran, M. del Valle, *Anal. Chim. Acta* (2007), doi:10.1016/j.aca.2006.11.079.
- [13] A. Gutes, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1187.
- [14] A. Gutes, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle, *Microchim. Acta* 157 (2007) 1.
- [15] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winquist, I. Lundström, *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 217.
- [16] L. Lvova, A. Legin, Y. Vlasov, G.S. Chab, H. Namb, *Sens. Actuators, B, Chem.* 95 (2003) 391.
- [17] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Talanta* 66 (2005) 1303.
- [18] V. Pravdová, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Anal. Lett.* 35 (2002) 2389.
- [19] P. Ciosek, W. Wróblewski, *Talanta* 69 (2006) 1156.
- [20] T. Fonseca, N.P. Lopes, P.J. Gates, J. Staunton, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 15 (2004) 325.
- [21] D. Calvo, J. Bartrolí, M. del Valle, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1569.
- [22] M.H. Lee, C.L. Yoo, J.S. Lee, I. Cho, B.H. Kim, G.S. Cha, H. Nam, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2603.
- [23] R.W. Morton, J.K. Chung, J.L. Miller, J.P. Charlton, R.S. Fager, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 345.
- [24] M. Müller, M. Rouilly, B. Rusterholz, M. Maj-Zurawska, Z. Hu, W. Simon, *Microchim. Acta* 96 (1988) 283.
- [25] A.K. Jain, V.K. Gupta, J.R. Raison, *Sensors* 4 (2004) 115.
- [26] K. Suzuki, K. Tohda, H. Aruga, M. Matsuzoe, H. Inoue, T. Shirai, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1714.
- [27] K. Umezawa, *Handbook of Ion-selective Electrodes Selectivity Coefficients*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [28] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296.
- [29] J. Wang, *Anal. Electrochem.*, Wiley-VCH (2000).
- [30] J. Inczedy, T. Lengyel, A.M. Ure, *Compendium of Analytical Nomenclature IUPAC*, Blackwell Science, Oxford, 1998 Ch. 8.
- [31] H. Demuth, M. Beale, *Neural Network Toolbox User's Guide*, Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 1992.
- [32] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Electroanalysis* 11 (1999) 915.
- [33] US EPA Method 200.7, Revision 4.4, Methods for the determination of metals in environmental samples, Supplement I, EPA-600/R-94-111, May 1994.