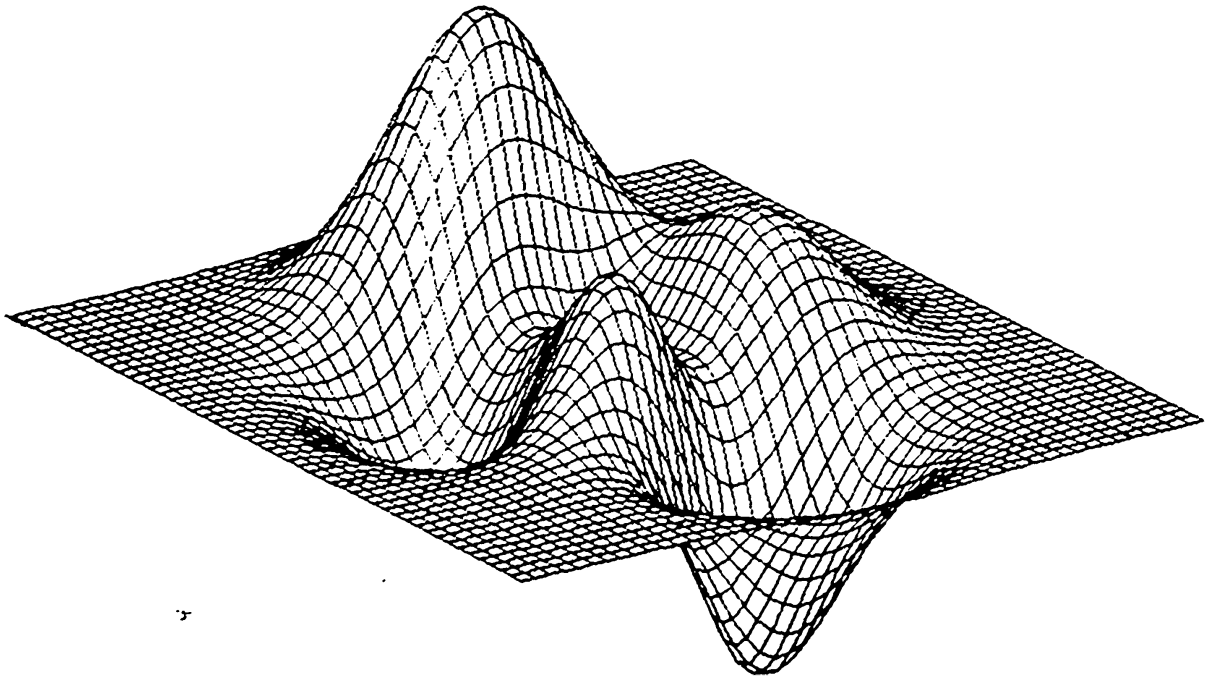
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΗ Α. ΠΕΤΤΑ
Χημικού

Εφαρμογή Μεθόδων Πολυπαραμετρικής Βαθμονόμησης με Χημειομετρικές Τεχνικές στον Ταυτόχρονο Προσδιορισμό Πολλών Συστατικών



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000

Αφιερώνεται στη μνήμη του πατέρα μου, Ανδρέα

"Every attempt to employ mathematical methods in the study of chemical questions must be considered profoundly irrational and contrary to the spirit of chemistry... If mathematical analysis should ever hold a prominent place in chemistry – an aberration which is happily almost impossible – it would cause a rapid and widespread degeneration of that science."

Auguste Comte, Philosophie Positive (1830)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή περιγράφει μερικές από τις πιο δημοφιλείς εφαρμογές της χημειομετρίας στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλών συστατικών. Ο κύριος σκοπός της εργασίας είναι η εξέταση της συμπεριφοράς χημειομετρικών μοντέλων σε χημικά συστήματα που βρίσκουν εφαρμογή στην Αναλυτική Χημεία. Διάφορες αναλυτικές μέθοδοι εξελίχθηκαν και εφαρμόσθηκαν με τη χρησιμοποίηση χημειομετρικών αλγορίθμων που είτε υπήρχαν διαθέσιμοι στο εμπόριο, είτε αναπτύχθηκαν από εμάς. Οι μέθοδοι αυτές, εφαρμόσθηκαν σε πακέτα πειραματικών δεδομένων από διάφορα χημικά συστήματα και τα αποτελέσματά τους επεξεργάστηκαν στατιστικά, αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν. Η φύση των δεδομένων και κυρίως ο τρόπος λήψεώς τους έκανε εφικτή την επεξεργασία τους σαν δισδιάστατες σειρές με την εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων δυο δρόμων, όπως οι μέθοδοι CLS, ILS, PCR και PLS. Η πιο σημαντική πλευρά της παρούσης εργασίας δεν είναι τόσο οι μαθηματικές επεξεργασίες και η ανάπτυξη νέων αλγορίθμων για τις ήδη προϋπάρχουσες χημειομετρικές τεχνικές, όσο η επιτυχής εφαρμογή των τελευταίων σε πολλές περιπτώσεις όπου η παραδοσιακή ανάλυση αποτυγχάνει.

Στο σημείο αυτό θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα της διατριβής μου καθηγητή Μιλτιάδη Ι. Καραγιάννη για την ανάθεση του θέματος, τη σωστή και ουσιαστική καθοδήγηση, τις εύστοχες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράσταση του καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Λέκτορα Κωνσταντίνα Κονιδάρη για την ποικιλόμορφη βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις της και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτριο Θεμελή για τις εποικοδομητικές κριτικές και παρατηρήσεις του, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθηγητή Μιχαήλ Α. Κουπάρη, καθηγητή Κωνσταντίνο Η. Ευσταθίου, επίκουρο καθηγητή Κωνσταντινο Γεωργίου και επίκουρο καθηγητή Ιωάννη Σαμιωτάκη.

Τέλος, ευχαριστώ τον Ανδρέα, την Αδαμαντία, την Αθηνά, τη Μαρία και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς μου, τη σύντροφό μου Άννα, τον π. Θεοδόσιο και όλους τους συνάδελφους του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθεια που μου προσέφεραν με οποιονδήποτε τρόπο.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ

ENGLISH	*ΕΛΛΗΝΙΚΑ*
Average Absolute Relative Error (AARE)	Μέσο Απόλυτο Σχετικό Σφάλμα
Classical Least Squares (CLS)	Κλασσική Μέθοδος Ελαχίστων Τετραγώνων
Condition Number	Αριθμός Συνθήκης
Correlation Coefficient (R)	Συντελεστής Συσχέτισης
Cross Validation (CV)	Διασταυρούμενη Επικύρωση
Data Acquisition	Συλλογή Δεδομένων
Decision Limit	Όριο Λήψης Απόφασης
Detection Limit	Όριο Ανίχνευσης
Determination Limit	Όριο Προσδιορισμού
Eigenvalue	Ιδιοτιμή
Eigenvector	Ιδιοδιάνυσμα
Evaluation	Αξιολόγηση
Experimental Design	Σχεδιασμός Πειραμάτων
Genetic Algorithm	Γενετικός Αλγόριθμος
Inverse Least Squares (ILS)	Αντεστραμμένα Ελάχιστα Τετράγωνα
Mean Centering	Κεντράρισμα του Μέσου όρου
Mean Squared Error of Calibration (MSEC)	Τετράγωνο του Μέσου Σφάλματος Βαθμονόμησης
Multivariate Calibration	Πολυπαραμετρική Βαθμονόμηση
Multiway PCA (mPCA)	Πολυδιάστατη Ανάλυση Κυρίων Συστατικών
Normalization	Κανονικοποίηση
Orthogonality	Ορθογωνικότητα
Orthonormality	Ορθοκανονικότητα
Parallel Factor Analysis (PARAFAC)	Παράλληλη Ανάλυση Παραγόντων
Partial Least Squares Regression (PLSR)	Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
Perturbation	Διατάραξη

(Photo)diode Array	Συστοιχία (Φωτο)διόδων
Pixel	Εικονοστοιχείο
Predicted Residual Error Sum of Squares (PRESS)	Προβλεπόμενο Άθροισμα Τετραγώνων Υπολειμματικών Σφαλμάτων
Principal Component Analysis (PCA)	Ανάλυση Κύριων Συστατικών
Principal Component Regression (PCR)	Παλινδρόμηση Κύριων Συστατικών
Regression	Παλινδρόμηση
Residual	Υπόλειμμα
Robustness	Ανθεκτικότητα
Scaling/Autoscaling	Κλιμάκωση/Αυτοκλιμάκωση
Software	Λογισμικό
Standard Error of Prediction (SEP)	Τυπικό Σφάλμα Πρόβλεψης
Stopped- flow Technique	Τεχνική Αναχαίτισης της Ροής
Tip	Ακροφύσιο
Validation	Επικύρωση

2. Πολυπαραμετρική Βαθμονόμηση

Μια επιτυχής φασματοφωτομετρική ταυτόχρονη ανάλυση πολλών συστατικών, με την εφαρμογή πολυπαραμετρικής βαθμονόμησης, πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

1. Χρησιμοποίηση ενός κοινού, μη εκλεκτικού αντιδραστηρίου, με μεγάλο ε, διαφοροποίηση των προϊόντων αντίδρασής του με τους διάφορους αναλύτες [10, 11].
2. Να μην υπάρχει συγγραμμικότητα μεταξύ των συγκεντρώσεων των συστατικών των δειγμάτων βαθμονόμησης [4, 9, 12].
3. Να υπάρχει η δυνατότητα πολλαπλών, ταυτόχρονων μετρήσεων σε διάφορα μήκη κύματος [13-16].
4. Ο αριθμός των προτύπων δειγμάτων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των προς ανάλυση συστατικών. Κατά κανόνα, όσο περισσότερα δείγματα βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται, τόσο πιο ανθεκτική γίνεται η βαθμονόμηση [18-20].
5. Τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα (ρύθμιση του pH και αυστηρή ρύθμιση της θερμοκρασίας, κυρίως κατά τη λήψη κινητικών δεδομένων [21-23]).
6. Η επιλογή των μηκών κύματος να είναι τέτοια ώστε να καταγράφεται η απόκριση που οφείλεται μόνο στους αναλύτες [24-27].
7. Το εύρος των συγκεντρώσεων να περιλαμβάνει όλες τις πιθανές τιμές συγκεντρώσεων των αγνώστων [28].
8. Γενικότερα, οι πειραματικές συνθήκες κατά τη βαθμονόμηση να προσομοιάζουν κατά το μέγιστο δυνατό τις συνθήκες μέτρησης των αγνώστων [29].

2.1. Οργάνωση Δεδομένων

Η πολυπαραμετρική βαθμονόμηση εκφράζει τη μέτρηση μιας σειράς παραμέτρων (ή μεταβλητών) σε πρότυπα διαλύματα γνωστής σύστασης [30]. Αυτή η σειρά μπορεί να αποτελείται από φασματικές εντάσεις, κινητικά δεδομένα, ή οποιαδήποτε πληροφορία σχετίζεται με τα προς ανάλυση δείγματα, οργανωμένα σε ένα πίνακα. Το γενικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε αφορά ένα σύστημα από n ενεργές ουσίες, οι οποίες αντιδρούν με ένα κοινό αντιδραστήριο, R προς το σχηματισμό n παρομοίων ή ιδίων προϊόντων, ακολουθώντας συνθήκες αντίδρασης ψευδοπρώτης τάξης:

$$C_n + R \quad P_n \qquad (2.1)$$

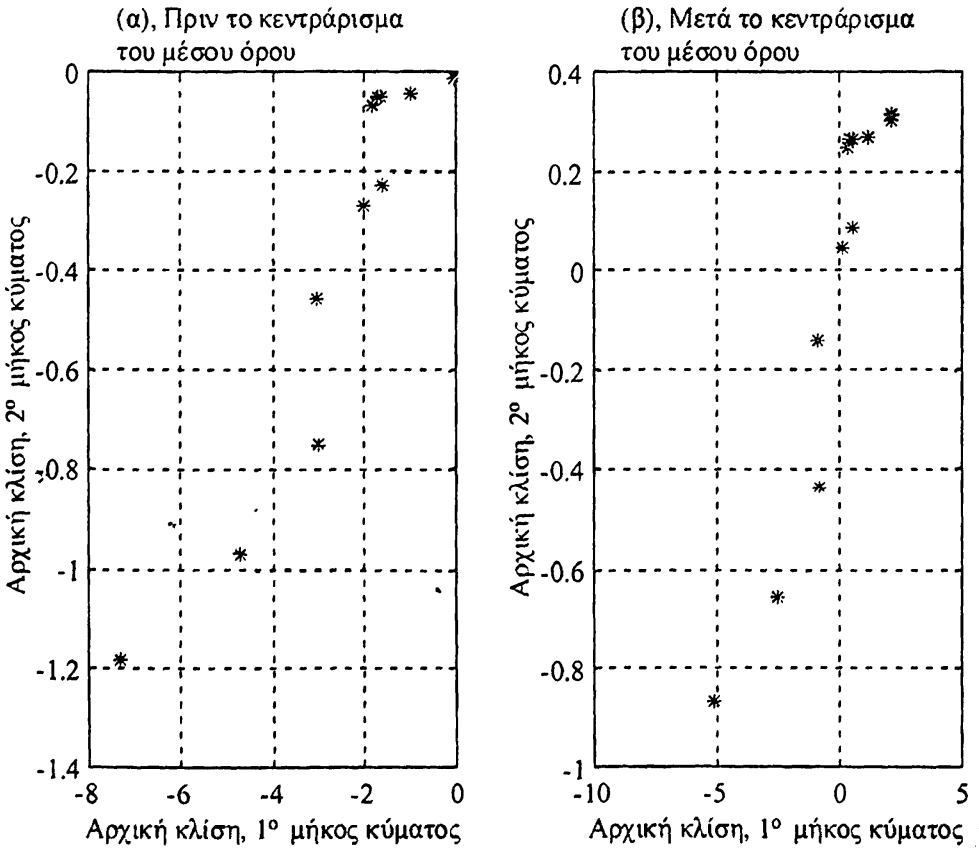
όπου C_n είναι το n-ιοστό συστατικό και P_n το αντίστοιχο προϊόν του. Με τις προϋποθέσεις ότι μόνο τα προϊόντα απορροφούν στη παρατηρούμενη φασματική περιοχή και οι απορροφήσεις είναι προσθετικές και ακολουθούν το νόμο των Lambert-Beer, τότε, η στιγμιαία απορρόφηση, A_{ij}, δίνεται από τη γενική σχέση:

$$A_{i,j} = \Sigma\varepsilon_{i,n}c_n[1-\exp(-k_n t_j)]+B \qquad (2.2)$$

όπου $A_{i,j}$ είναι η απορρόφηση του μίγματος στο i μήκος κύματος σε χρόνο j, $\varepsilon_{i,n}$ είναι η μολαρική απορροφητικότητα του n προϊόντος στο i μήκος κύματος, c_n είναι η αρχική συγκέντρωση του συστατικού C_n, k_n είναι η αντίστοιχη σταθερά ταχύτητας και B είναι η απορρόφηση υποβάθρου, που θεωρείται σταθερή [31, 32]. Η παραπάνω εξίσωση περιέχει την πλήρη φασματο-κινητική εικόνα του μίγματος για χρόνους λήψεως των δεδομένων οι οποίοι κυμάνθηκαν από μερικά ms (για πολύ γρήγορες αντιδράσεις) μέχρι άπειρο χρόνο (για αντιδράσεις όπου η κινητική διαφοροποίηση των αναλυτών ήταν πολύ μικρή ή ανύπαρκτη). Όπως μπορεί να αποδειχθεί, με αντικατάσταση του $t_j =$ η εξίσωση του γενικού μοντέλου συμπεριλαμβάνει την ειδική περίπτωση όπου μετρήθηκαν μόνο τα φάσματα των μιγμάτων και όχι και οι κινητικές τους καμπύλες.

2.2. Κεντράρισμα του Μέσου όρου – Ρύθμιση της Διακύμανσης - Κανονικοποίηση

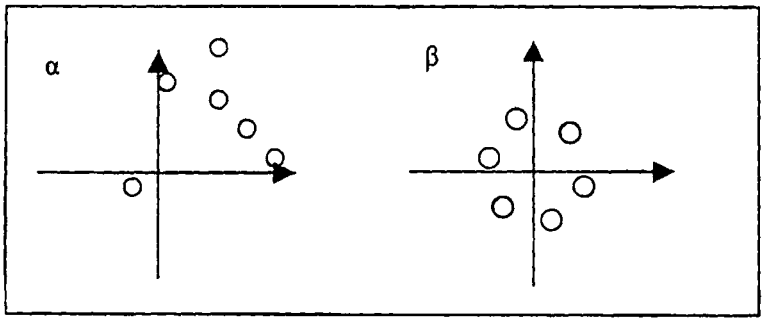
Οι περισσότερες μέθοδοι ανάλυσης παραγόντων χρησιμοποιούν δεδομένα στα οποία έχει προηγηθεί κεντράρισμα του μέσου όρου [33]. Από στατιστική άποψη, η επεξεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα να μεταφερθεί το κέντρο των αξόνων στο «κέντρο βάρους» των δεδομένων, χωρίς να αλλάξει ο τρόπος διάταξης τους στο χώρο (Σχήμα 2.1). Επίσης, το κεντράρισμα του μέσου όρου απομακρύνει ένα βαθμό ελευθερίας από τα δεδομένα και επιτρέπει ώστε η βαθμονόμηση να εστιάσει στις διαφορές μεταξύ των σημείων των δεδομένων. Από την οπτική γωνία της αναλυτικής χημείας, με αυτή την μετατροπή τα δεδομένα τοποθετούνται σε ένα αυθαίρετο σύστημα αναφοράς, του οποίου η αρχή των αξόνων δεν έχει πια καμιά φυσική ή χημική σημασία [34]. Χωρίς κεντράρισμα του μέσου όρου ο πρώτος υπολογιζόμενος παράγοντας (ή κύριο συστατικό, βλέπε ενότητα 3.3) θα περιγράφει την απόσταση της αρχής των αξόνων από το κέντρο των δεδομένων, δηλαδή θα περιγράφει το μέσο όρο τους. Αυτή η περιγραφή της διακύμανσης, άλλοτε είναι χρήσιμη, ενώ άλλοτε όχι. Σε μερικά συστήματα, οι παράγοντες των δεδομένων είναι πιθανό να έχουν τεταγμένη επί την αρχή ίση με μηδέν. Αυτό ισχύει και στην φασματοσκοπική ανάλυση, όπου μηδέν συγκέντρωση ενός αναλύτη αντιστοιχεί σε μηδέν απορρόφηση. Σε αυτή την περίπτωση



Σχήμα 2.1. Δεδομένα πριν (α) και μετά (β) από το κεντράρισμα του μέσου όρου

θεωρείται λογικό να συμπεριλάβουμε το μηδέν στο μοντέλο με το να μην κεντράρουμε γύρω από το μέσο όρο. Σε άλλα συστήματα, όπου το σημείο μηδέν στην κλίμακα των μετρήσεων είναι αυθαίρετο (π.χ. θερμοκρασία μετρούμενη στην κλίμακα Κελσίου) τὸ πρώτο κύριο συστατικό (ή παράγοντας) είναι πιθανό να μην περιέχει χρήσιμη πληροφορία και μπορεί να κάνει την περαιτέρω ανάλυση πιο περίπλοκη, γιατί τα επόμενα κύρια συστατικά θα πρέπει να είναι ορθογώνια σε αυτό (βλέπε ενότητα 1.3). Το κεντράρισμα του μέσου όρου εφαρμόζεται στις μεταβλητές και όχι στο δείγμα, π.χ. σε ένα σύνολο φασμάτων απορρόφησης θα κεντραριστούν οι τιμές της απορρόφησης για το μήκος κύματος και όχι για το μίγμα των αναλυτών. Αρχίζοντας με το πρώτο μήκος κύματος, η μέση τιμή της απορρόφησης υπολογίζεται για όλα τα δείγματα σε αυτό το μήκος κύματος. Κατόπιν, η ευρισκόμενη μέση τιμή αφαιρείται από την απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος για κάθε φάσμα. Τελικά, ο πίνακας των απορροφήσεων θα περιέχει θετικούς και αρνητικούς αριθμούς, και η νέα μέση τιμή της απορρόφησης σε κάθε μήκος κύματος θα είναι ίση με μηδέν για όλα τα δείγματα. Παρόμοια, τα δεδομένα των συγκεντρώσεων μπορούν να κεντραριστούν για αυτά τα δείγματα ανά κάθε αναλύτη. Δεν υπάρχει σχέση μεταξύ του κεντραρίσματος των X και του κεντραρίσματος των Y. Μπορούν να κεντραριστούν μαζί, ή το καθένα χωριστά [35]. Το σχήμα 2.1 αναπαριστά ένα πραγματικό σετ δεδομένων πριν εφαρμοσθεί κεντράρισμα του μέσου όρου (α) και μετά την εφαρμογή αυτού (β). Για κάθε ένα από τα 13 δείγματα σχεδιάζονται οι αρχικές κλίσεις για το πρώτο μήκος κύματος στον άξονα των x και οι αρχικές κλίσεις για το δεύτερο μήκος κύματος στον άξονα των y. Ας σημειωθεί ότι οι σχετικές θέσεις και οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων παραμένουν αμετάβλητες μετά το κεντράρισμα. Η ρύθμιση της διακύμανσης (ή κανονικοποίηση) είναι μια άλλη επεξεργασία δεδομένων, η οποία εξισώνει τη διακύμανση για κάθε μεταβλητή. Από στατιστική σκοπιά, εξισώνει την επίδραση της διακύμανσης της κάθε μεταβλητής και αφαιρεί ένα βαθμό ελευθερίας. Από τη σκοπιά της αναλυτικής χημείας, τα δεδομένα παριστάνονται σε ένα επίπεδο ή πεδίο αναφοράς, του οποίου οι άξονες δεν έχουν καμία φυσική ή χημική σημασία [36]. Μπορεί όμως να μειώσει την επίδραση των μεταβλητών, των οποίων η μεταβολή του σήματος να είναι μεγάλη, ενώ παράλληλα να αυξήσει το ρόλο των μεταβλητών που περιέχουν συνήθως θόρυβο. Για αυτό το λόγο η χρησιμοποίησή της θα πρέπει να γίνεται με προσοχή. Η ρύθμιση της διακύμανσης (ή κανονικοποίηση) μπορεί να εφαρμοσθεί σε συστήματα όπου οι μεταβλητές έχουν διαφορετικές μονάδες, όπως για παράδειγμα συγκέντρωση μετρούμενη σε ppm για ένα συστατικό και σε $mol.lt^{-1}$ για ένα άλλο. Οι χημειομετρικές μέθοδοι επεξεργάζονται τις

μεταβολές στη διακύμανση ενός συστήματος. Έτσι, για μια μεταβολή της συγκέντρωσης ενός συστατικού από 1 σε 2 ppm, η οποία είναι αριθμητικά πολύ μεγαλύτερη από μια μεταβολή της συγκέντρωσης ενός άλλου συστατικού από 0.1 σε 0.5 $mol.lt^{-1}$ θα ερμηνευθεί ανάλογα από το μοντέλο, δηλαδή το πρώτο συστατικό θα έχει μεγαλύτερη επιρροή από το δεύτερο. Παρόλα αυτά, η μεταβολή της συγκέντρωσης του δεύτερου συστατικού είναι μεγαλύτερη και μπορεί να παρέχει μεγαλύτερη πληροφορία από το πρώτο συστατικό. Σε αυτές τις περιπτώσεις, με το να κανονικοποιούνται τα δεδομένα, όλες οι μεταβλητές έχουν την ίδια βαρύτητα (Σχήμα 2.2). Σε συστήματα όπου όλες οι μεταβλητές έχουν τις ίδιες μονάδες, όπως στη φασματοσκοπία, είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η κανονικοποίηση, επειδή οι μεταβλητές με μεγάλη διακύμανση (π.χ. τιμές απορρόφησης κοντά στα μέγιστα ενός φάσματος) περιέχουν περισσότερη χημική πληροφορία από ότι οι μεταβλητές με



Σχήμα 2.2. Δεδομένα πριν (α) και μετά (β) την κανονικοποίηση

μικρότερη διακύμανση [37].

2.3. Σχεδιασμός Πειραμάτων

Ο πειραματικός σχεδιασμός με διαλύματα που περιέχουν μόνο ένα συστατικό την κάθε φορά ονομάζεται ορθογώνιος και τα διαλύματα ορθογώνια μεταξύ τους. Ένας μη ορθογώνιος πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει διαλύματα που περιέχουν περισσότερα του ενός συστατικά σε διαφορετικές αναλογίες. Σε μοντέλα βαθμονόμησης με μη ορθογώνια διαλύματα, συμπεριλαμβάνονται και οι τυχόν αλληλεπιδράσεις των διαφόρων συστατικών που πιθανόν να συνυπάρχουν στα δείγματα και για αυτό προτιμούνται στις περιπτώσεις ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών συστατικών [38]. Μια επιτυχής πολυπαραμετρική βαθμονόμηση εξαρτάται τα μέγιστα από τον πειραματικό σχεδιασμό των δειγμάτων βαθμονόμησης. Τα δείγματα αυτά θα πρέπει είναι όσο το δυνατό αντιπροσωπευτικότερα όλων των αγνώστων δειγμάτων στα οποία θα εφαρμοσθεί η βαθμονόμηση. Δηλαδή, το πακέτο βαθμονόμησης πρέπει να

είναι ένα στατιστικά έγκυρο δείγμα του πληθυσμού που περιέχει όλα τα προς ανάλυση δείγματα. Γενικά, οι χημειομετρικές τεχνικές δεν είναι ακριβείς όταν προβλέπουν τις συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων κάνοντας προεκβολή, δηλαδή εκτιμώντας τις άγνωστες τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών εκτός της περιοχής μετρήσεων [3, 28]. Για την αποφυγή της προεκβολής, οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα βαθμονόμησης πρέπει να συμπεριλαμβάνουν όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που θα έχουν τα άγνωστα δείγματα. Για πολυπαραμετρικά συστήματα, η συμπερίληψη όλων των τιμών συγκεντρώσεων στα δείγματα βαθμονόμησης θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε το κάθε δείγμα να είναι ανεξάρτητο από τα άλλα Ένας μη ορθογώνιος πειραματικός σχεδιασμός μπορεί να είναι παραγοντικός, από τον οποίο εξάγεται η μέγιστη χημική πληροφορία από ένα μικρό αριθμό πειραμάτων, τυχαίος, όπου τα δείγματα επιλέγονται τυχαία μέσα στο εύρος των συγκεντρώσεων των αναλυτών, ή «σχεδιασμένος με το χέρι». Ο αριθμός των πειραμάτων ο οποίος υπολογίζεται με την παραγοντική σχεδίαση συνήθως είναι η βάση λ, που είναι ο αριθμός των τιμών που παίρνει η κάθε μεταβλητή (συνήθως 2), υψωμένη στη δύναμη ν, που είναι ο αριθμός των μεταβλητών. Για παράδειγμα, αν οι συγκεντρώσεις τριών συστατικών σε ένα δείγμα είναι οι ζητούμενες μεταβλητές, τότε ο αριθμός των διαφορετικών πειραμάτων είναι $2^3 = 8$. Στην περίπτωση όπου τα πειράματα είναι «σχεδιασμένα με το χέρι» [4], οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα μπορούν να επιλεγούν έτσι ώστε να συνδυάζονται τα πλεονεκτήματα του παραγοντικού και του τυχαίου σχεδιασμού, ή υπάρχουν πληροφορίες για περιοχές συγκεντρώσεων που προτιμάται να εισάγονται στο μοντέλο βαθμονόμησης από άλλες τιμές συγκεντρώσεων [39, 40].

2.4. Βελτιστοποίηση και Αξιολόγηση

Ο προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού των κύριων συστατικών (ή παραγόντων, principal components) που θα πρέπει να συμπεριληφθούν σε ένα μοντέλο PCR ή PLS συνήθως γίνεται με τον υπολογισμό του σφάλματος πρόβλεψης [41-43]. Η βελτιστοποίηση συμπεριλαμβάνει τη σύγκριση μοντέλων με αυξανόμενο αριθμό των παραγόντων και την επιλογή αυτού που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα κατά την πρόβλεψη [44]. Οι έννοιες της βελτιστοποίησης και της αξιολόγησης συνήθως συγχέονται μεταξύ τους, με συνέπεια το μοντέλο να υπερπροσαρμόζεται και το σφάλμα πρόβλεψης να είναι μικρότερο από την πραγματική τιμή. Υπερπροσαρμογή συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται ένα μοντέλο που είναι πιο πολύπλοκο από αυτό που είναι κατάλληλο για την ερμηνεία των δεδομένων [45]. Τα στατιστικά κριτήρια που

χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της ικανότητας πρόβλεψης μιας μεθόδου είναι το PRESS , το MSEP και το RMSEP (βλέπε ενότητα 4). Όλα τα παραπάνω μεγέθη δίνουν τις ίδιες πληροφορίες, αν και συνήθως προτιμάται ο υπολογισμός του RMSEP γιατί εκφράζεται με τις ίδιες μονάδες της ιδιότητας (π.χ. συγκέντρωση) που προβλέπει το μοντέλο. Για το στάδιο της βελτιστοποίησης, υπολογίζεται το PRESS για μοντέλα με αυξανόμενη πολυπλοκότητα, δηλαδή, με αυξανόμενο αριθμό των κύριων συστατικών και τα αποτελέσματα αναπαριστάνονται γραφικά, με τις τιμές του PRESS ως προς τον αριθμό των παραγόντων. Η καμπύλη συνήθως δείχνει ένα ελάχιστο, το οποίο αντιστοιχεί στη βέλτιστη πολυπλοκότητα του μοντέλου. Σε μια τέτοια γραφική παράσταση μπορεί να υπάρχουν τοπικά ελάχιστα και το κυρίως ελάχιστο να υπολογίζεται για ένα αρκετά πολύπλοκο μοντέλο. Επειδή όμως τα μοντέλα με μεγάλο αριθμό παραγόντων είναι περισσότερο ανθεκτικά από τα λιγότερο πολύπλοκα μοντέλα, η επιλογή του βέλτιστου προτιμάται συνήθως στο πρώτο τοπικό ελάχιστο. Κατά πόσο είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά της τιμής του RMSEP για το απλούστερο μοντέλο σε σχέση με το επιλεγμένο από το κυρίως ελάχιστο, αποφαίνονται τα κριτήρια F και t. Κατόπιν, το βελτιστοποιημένο μοντέλο εφαρμόζεται σε ένα στατιστικά ανεξάρτητο σύνολο δειγμάτων και οι αναμενόμενες τιμές της μετρούμενης ιδιότητας (π.χ. συγκέντρωση) συγκρίνονται με τις υπολογιζόμενες τιμές αυτής της ιδιότητας. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει οπτικά, από τη γραφική παράσταση των παραπάνω μεγεθών (πόσο 'κοντά' βρίσκονται τα αναπαριστώμενα σημεία στην ευθεία με κλίση 1 και τεταγμένη επί τη αρχή 0). Εάν το τελικό μοντέλο είναι κατάλληλο για τη βαθμονόμηση του συστήματος, δηλαδή είναι αμερόληπτο, τότε οι προβλέψεις είναι πιο ακριβείς από αυτές της μεθόδου αναφοράς, εξαιτίας της ιδιότητας της παλινδρόμησης να ελαχιστοποιεί τις υπολειμματικές διαφόρες. Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να αποδειχθεί κάτι τέτοιο από μετρήσεις δειγμάτων αξιολόγησης, οι τιμές των οποίων λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς. Η τιμή του PRESS εξαρτάται από τη ακρίβεια και την επαναληψιμότητα της μεθόδου αναφοράς. Για αυτό το λόγο, το PRESS συχνά εφαρμόζεται στο στάδιο της βελτιστοποίησης σαν επιδιωκόμενη τιμή. Έτσι, για την επιλογή του βέλτιστου αριθμού των παραγόντων ενός μοντέλου μπορεί να επιλεγεί η μικρότερη τιμή που δίνει τιμές PRESS συγκρίσιμες με την ακρίβεια της μεθόδου αναφοράς. Η αξιολόγηση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι το στάδιο στο οποίο εξετάζονται τα αποτελέσματα της πρόβλεψης για το κάθε μοντέλο ανεξάρτητα και μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα αναπόσπαστο μέρος της ανάλυσης με το οποίο ερευνάται αν τα παραγόμενα αποτελέσματα είναι έγκυρα [46]. Για να είναι έγκυρα τα

αποτελέσματα θα πρέπει το αναπτυσσόμενο μοντέλο να αναπαράγει τα δεδομένα πιστά και με τον απλούστερο δυνατό τρόπο, να επηρεάζεται από ορισμένα δείγματα ή μεταβλητές με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράφονται ορισμένα τμήματα των δεδομένων και όχι το σύνολο τους και ο αλγόριθμος να συγκλίνει προς ένα στατιστικό κριτήριο. Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη, τη βελτιστοποίηση και την αξιολόγηση ενός μοντέλου δεν πρέπει να ταυτίζονται, γιατί υπάρχει κίνδυνος για υπερπροσαρμογή και λήψη μικρότερων τιμών σφαλμάτων πρόβλεψης από τις πραγματικές. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν το μέγιστο τρία πακέτα δεδομένων: από ένα για τα στάδια της ανάπτυξης του μοντέλου, της βελτιστοποίησης και της αξιολόγησης, όπως επίσης και δύο πακέτα (στην περίπτωση της εξωτερικής αξιολόγησης) ή ακόμα και ένα (στην περίπτωση της εσωτερικής αξιολόγησης). Το σύνολο όλων των παραπάνω πακέτων δεδομένων καλείται πακέτο βαθμονόμησης. Η τεχνική της εξωτερικής αξιολόγησης χρησιμοποιεί διαφορετικά πακέτα δεδομένων για την ανάπτυξη του μοντέλου και για την πρόβλεψη των αγνώστων δειγμάτων. Κατά την επιλογή των δειγμάτων για τη δημιουργία πακέτων βαθμονόμησης, οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πρέπει να περιλαμβάνονται μαζί στο κάθε πακέτο δεδομένων, έτσι ώστε αυτά να είναι στατιστικά ανεξάρτητα και να περιοριστεί η διατάραξη των αποτελεσμάτων στο ελάχιστο. Κατά την εφαρμογή της εσωτερικής αξιολόγησης, χρησιμοποιούνται τα ίδια δεδομένα κατά την ανάπτυξη του μοντέλου και την αξιολόγησή του με τέτοιο τρόπο που προσομοιώνει την τεχνική της εξωτερικής αξιολόγησης. Υπάρχουν 4 τεχνικές εσωτερικής αξιολόγησης: 1) Τυχαία κατάτμηση ενός πακέτου βαθμονόμησης σε ένα πακέτο πρόβλεψης και ένα νέο πακέτο βαθμονόμησης. Το σημείο της κατάτμησης μπορεί να έχει μεγάλη επίδραση στην τιμή του PRESS, 2) Διασταυρούμενη αξιολόγηση, κατά την εφαρμογή της οποίας τα δεδομένα διαχωρίζονται τυχαία σε υποομάδες. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών των ομάδων αντιστοιχεί σε αξιολόγηση με μικρή διατάραξη του στατιστικού δείγματος, ενώ για μικρό αριθμό των ομάδων αυτών η διατάραξη είναι μεγάλη. Ο όρος διατάραξη χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει ότι τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μοντέλου δεν ταυτίζονται με αυτά που χρησιμοποιούνται για ολοκληρη τη βαθμονόμηση. Πολύ μικρή διατάραξη σημαίνει ότι η υπερπροσαρμογή είναι πιθανή. Η διαδικασία της αξιολόγησης συνεχίζεται για όλα τα πακέτα ακύρωσης και στο τέλος της αξιολόγησης, το κάθε πακέτο από n συνολικά πακέτα έχει χρησιμοποιηθεί μια φορά για πρόβλεψη και n-1 φορές για βαθμονόμηση. Στην περίπτωση αυτή, το PRESS προτιμάται από το RMSEP γιατί εκφράζει διακυμάνσεις και για αυτό είναι αθροιστικό,

3) Η αξιολόγηση με απομάκρυνση ενός δείγματος τη φορά εφαρμόζεται μόνο σε ένα πακέτο δεδομένων (προτιμάται όταν ο όγκος των δεδομένων είναι μικρός και δεν επιτρέπει τον περαιτέρω διαχωρισμό του σε επί μέρους πακέτα δεδομένων). Επειδή η διατάραξη του μοντέλου για κάθε βήμα της τεχνικής είναι μικρή (εφόσον απομακρύνθηκε μόνο ένα δείγμα), η αξιολόγηση αυτού του είδους δημιουργεί υπερπροσαρμογή στο μοντέλο και προτιμάται από τις άλλες τεχνικές, 4) Επαναλαμβανόμενη τυχαία κατάτμηση είναι η πολλαπλή επανάληψη της τεχνικής που περιγράφηκε στο (1). Με αυτό τον τρόπο, στο τέλος της αξιολόγησης, ένα πακέτο δεδομένων είναι πιθανό να προβλέφθηκε πολλές φορές με διαφορετικά δείγματα μαζί. Σταθερά (αξιόπιστα) αποτελέσματα λαμβάνονται μετά την επανάληψη της διαδικασίας για αρκετές φορές (συνήθως μερικές εκατοντάδες) [9, 47].

2.5. Επιλογή Μεταβλητών

2.5.1. Επιλογή του βέλτιστου αριθμού των δειγμάτων βαθμονόμησης

Η επιλογή του βέλτιστου αριθμού των δειγμάτων βαθμονόμησης έχει ως αποτέλεσμα την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των αναλυτών σε άγνωστα δείγματα με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια. Ένας δημοφιλής τρόπος επιλογής του κατάλληλου αριθμού των δειγμάτων κατά τη βαθμονόμηση είναι ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος πρόβλεψης (SEP, βλέπε ενότητα 4.1). Ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων βαθμονόμησης είναι ένας συμβιβασμός μεταξύ της ακρίβειας των προβλέψεων και του χρόνου σχεδίασης και εκτέλεσης των πειραμάτων τους. Ο πειραματικός σχεδιασμός της επιλογής των δειγμάτων βαθμονόμησης έγινε με την αρχική χρησιμοποίηση ενός τυχαίου πακέτου 5 δειγμάτων και με τον υπολογισμό του SEP. Κατόπιν, προστίθεται ένα δείγμα και το SEP υπολογίζεται εξαρχής, μέχρι να συμπεριληφθούν όλα τα δείγματα. Για τις μεθόδους ολόκληρων των φασμάτων (CLS, PCR, PLS) χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το φάσμα, ενώ για τη μέθοδο ILS προηγείται η επιλογή του βέλτιστου αριθμού των μηκών κύματος (βλέπε επόμενη ενότητα). Τα αποτελέσματα αναπαριστάνονται σε γραφήματα του SEP ως προς τον αριθμό των δειγμάτων. Ο ελάχιστος αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να συμπεριληφθούν κατά την βαθμονόμηση χωρίς να μειωθεί η ακρίβεια κατά την πρόβλεψη των αγνώστων δειγμάτων, θεωρείται αυτός ο οποίος δίνει τη μικρότερη τιμή του SEP χωρίς να υπάρχει τάση προς ελάττωση κατά την προσθήκη νέων δειγμάτων βαθμονόμησης [48, 49].

2.5.2. Επιλογή Μηκών Κύματος

Τυπικά, κατά την πολυπαραμετρική βαθμονόμηση στη φασματοφωτομετρία οι τιμές της απορρόφησης σε κάθε μήκος κύματος αποτελούν ένα σύνολο μεταβλητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως έχουν, ή να επιλεγούν αυτοί οι συνδυασμοί μεταβλητών που θα δώσουν τα βέλτιστα αποτελέσματα κατά την ανάλυση [50]. Τέτοιο πρόβλημα δεν υφίσταται όταν ο αριθμός των μεταβλητών είναι μικρός. Σε τέτοιες περιπτώσεις η επιλογή όλων των μεταβλητών θα δώσει αναγκαστικά την πιο σταθερή και καλή βαθμονόμηση (για το ποιός είναι ο ελάχιστος αριθμός μεταβλητών για μια πολυπαραμετρική βαθμονόμηση βλέπε ενότητα 2.3). Όταν τα φάσματα αποτελούνται από μερικές χιλιάδες μήκη κύματος, τότε μέθοδοι όπως οι CLS, PLS και PCR μπορούν να τα χρησιμοποιήσουν ολόκληρα, ενώ άλλες, όπως η ILS, απαιτούν μείωση των μεταβλητών, έτσι ώστε οι υπολογισμοί να είναι εφικτοί. Πέρα από πρακτικούς λόγους, όπως ο χρόνος των υπολογισμών, η επιλογή των μεταβλητών συνήθως επιφέρει σημαντική βελτίωση στην ικανότητα πρόβλεψης της κάθε μεθόδου, και έχει αναπτυχθεί ένα πλήθος από τεχνικές τέτοιου είδους [13, 24-26, 27, 48, 51, 52]. Οι πιο σημαντικές τεχνικές, και αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι η βηματική παλινδρόμηση, ενώ άλλες τεχνικές έχουν σαν αρχή λειτουργίας τούς γενετικούς αλγόριθμους.

2.5.2.1. Διάφορα Κριτήρια Επιλογής των Μηκών Κύματος

Έχει δειχθεί ότι η ελάχιστη τιμή του Cond(**K**) έχει χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για την εύρεση του βέλτιστου αριθμού των μηκών κύματος [53-56]. Η επιλογή του βέλτιστου φασματικού εύρους μπορεί να επιβεβαιωθεί με δύο ακόμη κριτήρια, την τυπική απόκλιση (SD) [57] και το σφάλμα πρόβλεψης (PE) [29]:

$$\mathrm{SD} = \left[\sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{M} \left(c_{ij} - \hat{c}_{ij} \right)^2 / N(M-1) \right]^{1/2} \qquad (2.3)$$

όπου c_{ij} είναι η αναμενόμενη τιμή της συγκέντωσης του συστατικού i στο j μίγμα και $_{ij}$ ή υπολογιζόμενη τιμή της συγκέντωσης του συστατικού i στο j μίγμα. Η τιμή του SD ή και του PE ελαττώνεται με την αύξηση του αριθμού των μηκών κύματος έως ότου φτάνει σε ένα ελάχιστο όπου με την προσθήκη νέων μεταβλητών δεν μεταβάλεται

$$PE = 100 \cdot \left[\sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{M} \left(c_{ij} - \hat{c}_{ij}\right)^2 / \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{M} c_{ij}^2 \right]^{1/2} \qquad (2.4)$$

αισθητά ή και αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι περισσότερα ενός βελτίστου αριθμού μήκη κύματος δεν προσθέτουν περισσότερη σχετική χημική αναλυτική πληροφορία, παρά μόνο θόρυβο [57]. Κατά την επιλογή των κύριων συστατικών, επιλέγονται αυτά που είναι πιο σημαντικά κατά την παλινδρόμησή τους με τον πίνακα των συγκεντρώσεων, **Y**. Τα πιο σημαντικά μήκη κύματος είναι αυτά που συμμετέχουν περισσότερο στα ιδιοδιανύσματα για τα συγκεκριμένα PC. Για αυτό, μόνο αυτά τα μήκη κύματος χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω ανάπτυξη του μοντέλου.

Η αρχή της τεχνικής συσχέτισης με την συγκέντρωση των αναλυτών βασίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ της κάθε μεταβλητής των X (απορροφήσεις) με τις συγκεντρώσεις των υπό ανάλυση συστατικών. Ο συντελεστής συσχέτισης, r, είναι ίσος με την τετραγωνική ρίζα του συντελεστή προσδιορισμού, σύμφωνα με τη σχέση:

$$r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2}} \qquad (2.5)$$

Αυτή η σχέση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ορισμό αυτών των μηκών κύματος που φέρουν χημική πληροφορία, σχετική με τις παραπάνω συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με τον Brown [60], το πρώτο στάδιο είναι η δημιουργία ενός γραμμικού συστήματος εξισώσεων, όπου η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η συγκέντρωση και η εξαρτημένη η απορρόφηση. Για το j μήκος κύματος, x_j, υπολογίζονται οι συντελεστές b, (κλίση b_{j1}, τεταγμένη επί τη αρχή b_{j0}) και η διακύμανση σ_{j2} των υπολειμματικών διαφορών κατά την πρόβλεψη της j μεταβλητής. Για την ταξινόμηση τους χρησιμοποιείται ο υπολογισμός του λόγου b_{j12}/σ_{j2} για την κάθε μεταβλητή. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του λόγου, τόσο σημαντικότερο είναι το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην τιμή αυτή σύμφωνα με αυτό το κριτήριο.

Η τεχνική της βηματικής παλινδρόμησης ξεκινά με μια εξίσωση χωρίς ανεξάρτητες μεταβλητές, οι οποίες προσθέτονται μία σε κάθε βήμα σύμφωνα με ένα στατιστικό κριτήριο, όπου το πλάτος των ορίων εμπιστοσύνης ελαχιστοποιείται [3, 9, 25]. Όσο η τεχνική αυξάνει τον αριθμό των μεταβλητών σε κάθε βήμα, εξετάζεται η πιθανότητα διαγραφής κάποιας μεταβλητής που προηγουμένως, είχε συμπεριληφθεί λανθασμένα στο μοντέλο.

2.5.2.2. Γενετικοί αλγόριθμοι

Αν και οι γενετικοί αλγόριθμοι προέρχονται από τις βιολογικές επιστήμες, εδώ εφαρμόζονται για αριθμητική βελτιστοποίηση [27. 60]. Η αριθμητική βελτιστοποίηση χωρίζεται σε δυο κατηγορίες: στην τοπική και στην ολική βελτιστοποίηση. Το σχήμα 2.3 δείχνει μια τυπική γραφική παράσταση του PRESS συναρτήσει του αριθμού των κύριων συστατικών σε μια ανάλυση PCR, στην οποία υπάρχουν τοπικά ελάχιστα και ολικό ελάχιστο. Η καμπύλη περιέχει τρία ελάχιστα I, II και III, από τα οποία το II είναι το μικρότερο ή ολικό ελάχιστο. Ένα ελάχιστο είναι απλά ένα σημείο στο οποίο η πρώτη παράγωγος της καμπύλης είναι μηδέν και η δεύτερη παράγωγος είναι θετική. Ο σκοπός της τοπικής βελτιστοποίησης είναι να αρχίσει σε κάποιο τυχαίο σημείο και να κινηθεί προς τα κάτω τόσο ώστε να βρεθεί το τοπικό ελάχιστο. Ο σκοπός της ολικής βελτιστοποίησης είναι να βρει ποιο από αυτά τα τοπικά ελάχιστα είναι το μικρότερο. Συνήθως, αναζητείται το ελάχιστο II.

Οι πιθανές λύσεις σε ένα πρόβλημα, όπως η επιλογή των μεταβλητών σε μια πολυπαραμετρική ανάλυση, κωδικοποιείται σε δυαδικές σειρές από 0 και 1. Ο αλγόριθμος ξεκινά με μια τυχαία επιλογή από πιθανές τέτοιες λύσεις. Κάθε μέλος του πληθυσμού των λύσεων αυτών αντιπροσωπεύει μια υποψήφια βέλτιστη λύση και ελέγχεται με στατιστικά κριτήρια. Κατόπιν, τα μέλη του αρχικού πληθυσμού κατατάσσονται αξιολογικά, ανάλογα με το πόσο καλά προσαρμόζονται στα κριτήρια αξιολόγησης. Αυτά τα μέλη που έχουν καλή προσαρμογή "επιβιώνουν" και "αναπαράγονται", ενώ τα υπόλοιπα "πεθαίνουν" και απομακρύνονται. Για παράδειγμα, έστω ότι από ένα πληθυσμό φασμάτων, τα οποία αποτελούνται από τιμές απορροφήσεων σε μια σειρά από δέκα μήκη κύματος, θέλουμε να επιλέξουμε το βέλτιστο συνδυασμό αυτών των μηκών κύματος που θα δώσει το μοντέλο βαθμονόμησης με το μικρότερο SEP (βλέπε ενότητα 4). Ο αλγόριθμος θα παράγει ένα σύνολο από τυχαίους συνδυασμούς των μηκών κύματος σε δυαδικές σειρές όπου το 1

αναπαριστά την παρουσία του μήκους κύματος στη συγκεκριμένη θέση ενώ το 0 υποδεικνύει την απουσία του. Έτσι, αρχικά μπορούν να κατασκευαστούν τα εξής τέσσερα μέλη ενός αρχικού πληθυσμού:

1010101010

1100101111

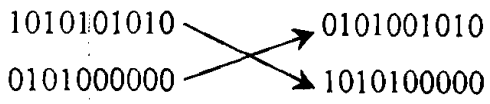
0101000000

0000110000

Σχήμα 2.3. Γραφική παράσταση του PRESS συναρτήσει του αριθμού των κύριων συστατικών σε μια ανάλυση PCR

Στο πρώτο μέλος φαίνεται ότι συμπεριλαμβάνεται το δεύτερο, το τέταρτο, το όγδοο και το δέκατο μήκος κύματος (αρίθμηση από δεξιά προς τα αριστερά), στο δεύτερο μέλος συμπεριλαμβάνονται όλα τα μήκη εκτός από το πέμπτο, το έβδομο και το όγδοο, κ.ο.κ. [61-63]. Κάθε ένα από αυτά τα μέλη χρησιμοποιείται για την κατασκευή ενός χημειομετρικού μοντέλου και αξιολογείται ως προς την ικανότητα πρόβλεψής του. Δηλαδή, μια χημειομετρική μέθοδος μπορεί να αποτελέσει ένα μέρος από τους γενετικούς αλγόριθμους, αν και το αντίστροφο δεν ισχύει πάντα. Κατόπιν, απορρίπτεται αυτό το μοντέλο με την υψηλότερη τιμή SEP, επιλέγονται τυχαία ζεύγη από τις υπόλοιπες λύσεις και αναπαράγονται νέες δυαδικές σειρές με τη χρησιμοποίηση ενός σημείου διασταύρωσης. Αυτό, είναι ένα τυχαία επιλεγμένο σημείο για το κάθε ζεύγος στο οποίο οι δυαδικές σειρές τους κόβονται και διασταυρώνονται. Για παράδειγμα, έστω ότι έχουν επιβιώσει το πρώτο και το τρίτο μέλος του προηγούμενου πληθυσμού. Αν το σημείο διασταύρωσης επιλέχθηκε να βρίσκεται μεταξύ του πέμπτου και του

έκτου μήκους κύματος, θα έχουμε τη δημιουργία δύο νέων δυαδικών σειρών, ή αλλιώς, δύο νέων συνδυασμών μηκών κύματος:



όπου τα δύο νέα μέλη του πληθυσμού φαίνονται στα δεξιά. Τα μοντέλα αξιολογούνται εκ νέου και η πορεία συνεχίζεται μέχρι να υπάρχει σύγκλιση του σφάλματος πρόβλεψης για τα εναπομείναντα μοντέλα, ή μέχρι να συγκλίνουν οι διασταυρώσεις των σειρών σε ένα μοναδικό μοντέλο το οποίο εκλαμβάνεται σαν το βέλτιστο.

3. Χημειομετρικές Μέθοδοι

Οι μέθοδοι που εφαρμόσθηκαν στην παρούσα διατριβή ανήκουν στις δύο κυριότερες και πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κατηγορίες των ποσοτικών χημειομετρικών τεχνικών βαθμονόμησης: 1) Τις τεχνικές Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης (MLR) και 2) Τις τεχνικές Ανάλυσης Παραγόντων (FA). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι των Κλασσικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Classical Least Squares) και των Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων (Inverse Least Squares). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι Παλινδρόμησης Κύριων Συστατικών (Principal Component Regression) και Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares). Η μέθοδος Ανάλυσης Κύριων Συστατικών (PCA), δεν είναι μέθοδος βαθμονόμησης αλλά επεξεργασίας δεδομένων και αποτελεί ένα στάδιο της μεθόδου PCR και PLS. Για αυτό το λόγο, συμπεριλήφθηκε στην παρουσίαση που δίνεται στη συνέχεια. Η επιλογή των χημειομετρικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών έγινε με κριτήρια τις ιδιότητες του κάθε χημικού συστήματος και τις ιδιότητες των λαμβανόμενων δεδομένων, με την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη οργανολογία. Έτσι, γιά παράδειγμα στο κεφάλαιο 7.7 η παρατήρηση της μεταβολής της απορρόφησης σε ένα μικρό αριθμό μηκών κύματος δεν ενδείκνυται για τη χρησιμοποίηση τεχνικών όπως οι CLS και PLS, οι οποίες εξάλλου ονομάζονται «τεχνικές πλήρους φάσματος» και απαιτούν την εφαρμογή γενικά πολλών μεταβλητών για την ανάπτυξη ενός ανθεκτικού και ακριβούς μοντέλου βαθμονόμησης. Στο κεφάλαιο 7.2 φαίνεται η φτωχή προσαρμογή των μεθόδων CLS και κυρίως της μεθόδου ILS για τον ακριβώς αντίθετο λόγο: η χρησιμοποίηση πολλών μηκών κύματος οδήγησε τις εν λόγω μεθόδους σε υπερπροσαρμογή, διότι από ένα αριθμό μεταβλητών και μετά δεν μπόρεσαν να διαχωρίσουν τους αναλύτες ως διαφορετικές οντότητες στα μίγματά τους. Δεν επιχειρήθηκε μια εξολοκλήρου σύγκριση των επιλεγόμενων μεθόδων στα

μελετούμενα συστήματα αυτής της διατριβής, αφού τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους είναι γνωστά από τη διεθνή βιβλιογραφία [42, 43]. Όμως, παρουσιάστηκε η δυνατότητα επιτυχούς ή αποτυχημένης εφαρμογής του κάθε χημειομετρικού αλγορίθμου σε προσεκτικά επιλεγόμενα χημικά συστήματα χαμηλής εκλεκτικότητας, τα οποία καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος χημικής συμπεριφοράς κατάλληλης για χημειομετρική ποσοτική ανάλυση.

3.1 Κλασσική Μέθοδος Ελαχίστων Τετραγώνων (CLS)

Η πιο παλιά από τις μελετούμενες μεθόδους είναι η κλασσική μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων (Classical Least Squares, CLS). Αυτή η φασματοσκοπική μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης, γνωστή και ως μέθοδος του πίνακα K, στηρίζεται στο νόμο των Beer-Lambert για τον υπολογισμό των συντελεστών απορροφητικότητας σε ολόκληρη την μετρούμενη περιοχή του φάσματος [64-66]. Η εξίσωση που περιγράφει το νόμο αυτό περιέχει 4 μεταβλητές: τη φασματική απόκριση ή απορρόφηση (A_λ) στο λ μήκος κύματος, το συντελεστή απορροφητικότητας για το κάθε συστατικό (ε_λ), την οπτική διαδρομή (b) και τη συγκέντρωση του αντίστοιχου συστατικού (C). Αν το b παραμένει σταθερό, τότε η ενσωμάτωση του με το ε_λ δίνει μια σταθερά, K, και ο νόμος του Beer παίρνει τη μορφή:

$$A_\lambda = K_\lambda C \qquad (3.1)$$

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων ν συστατικών θα πρέπει να σχεδιαστούν ν εξισώσεις σε ν μήκη κύματος σύμφωνα με την παραπάνω σχέση, κάτι το οποίο είναι πρακτικά αδύνατο σε πραγματικά δείγματα, όπου το φάσμα του ενός συστατικού επικαλύπτει σε μικρό ή μεγάλο βαθμό το φάσμα του άλλου συστατικού. Τότε, χρησιμοποιείται μια σημαντική ιδιότητα του νόμου του Beer (νόμος του Vierordt) σύμφωνα με την οποία η συνολική απορρόφηση κάποιου δείγματος ισούται με το άθροισμα των επιμέρους απορροφήσεων του κάθε συστατικού [67]:

$$\begin{aligned} A_{\lambda 1} &= K_{1,\lambda 1}C_1 + K_{2,\lambda 1}C_2 + \ldots + K_{\nu,\lambda 1}C_\nu + E_{\lambda 1} \\ A_{\lambda 2} &= K_{1,\lambda 2}C_1 + K_{2,\lambda 2}C_2 + \ldots + K_{\nu,\lambda 2}C_\nu + E_{\lambda 2} \\ &\vdots \qquad (3.2) \end{aligned}$$

$$A_{\lambda\nu} = K_{1,\lambda\nu}C_1 + K_{2,\lambda\nu}C_2 + \ldots + K_{\nu,\lambda\nu}C_\nu + E_{\lambda\nu}$$

ή σε μορφή πινάκων:

$$\begin{bmatrix} A_{\lambda 1} \\ A_{\lambda 2} \\ . \\ . \\ . \\ A_{\lambda\nu} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{1,\lambda 1} & K_{2,\lambda 1} & . & . & K_{\nu,\lambda 1} \\ K_{1,\lambda 2} & K_{2,\lambda 2} & . & . & K_{\nu,\lambda 2} \\ . & . & & & . \\ . & . & & & . \\ . & . & & & . \\ K_{1,\lambda\nu} & K_{2,\lambda\nu} & . & . & K_{\nu,\lambda\nu} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ . \\ . \\ . \\ C_\nu \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} E_{\lambda 1} \\ E_{\lambda 2} \\ . \\ . \\ . \\ E_{\lambda\nu} \end{bmatrix} \tag{3.3}$$

ή απλούστερα:

$$\mathbf{A} = \mathbf{KC} + \mathbf{E} \tag{3.4}$$

Όπου **C** είναι το διάνυσμα των συγκεντρώσεων μεγέθους ν, **A** το μεγέθους λ_ν διάνυσμα των απορροφήσεων, **K** είναι ο ν x λ_ν πίνακας των συντελεστών βαθμονόμησης και **E** είναι το σφάλμα υπολογισμού της απορρόφησης (σφάλμα μέτρησης, θόρυβοι). Η βαθμονόμηση επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό των συντελεστών απορροφητικότητας $K_{\nu,\lambda\nu}$. Για να λυθεί η παραπάνω εξίσωση ως προς **K**, πολλαπλασιάζονται και τα δύο μέλη της με τον ανάστροφο του πίνακα των συγκεντρώσεων, $\mathbf{C}^T$:

$$\mathbf{A}\,\mathbf{C}^T = \mathbf{K}\,\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T \tag{3.5}$$

Κατόπιν, απαλείφεται η ποσότητα $\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T$ με τον πολλαπλασιασμό και των δύο μελών της παραπάνω εξίσωσης με τον ψευδοαντίστροφο πίνακα του **C**, $(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1}$:

$$\mathbf{A}\,\mathbf{C}^T(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1} = \mathbf{K}\,\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1} \tag{3.6}$$

Εφόσον το γινόμενο ενός πίνακα με τον αντίστροφό του είναι ο μοναδιαίος πίνακας, η ποσότητα $\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1}$ απαλείφεται από το δεξί μέλος της εξίσωσης:

$$\mathbf{A}\,\mathbf{C}^T(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1} = \mathbf{K} \tag{3.7}$$

Για να υπάρχει ο αντίστροφος του $\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T$ πρέπει ο πίνακας **C** να έχει τουλάχιστον τόσες στήλες όσες και σειρές. Εφόσον κάθε στήλη του **C** αντιστοιχεί σε κάθε αναλύτη και κάθε γραμμή σε κάθε δείγμα, για να υπολογιστεί ο **K** θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τόσα δείγματα όσοι είναι και οι αναλύτες. Επίσης, εάν υπάρχει γραμμική εξάρτηση μεταξύ των στηλών του πίνακα **C**, κάτι το οποίο εύκολα μπορεί να συμβεί με την παρασκευή δειγμάτων βαθμονόμησης με αραίωση ενός δείγματος, ο πίνακας $(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^T)^{-1}$ θα είναι ιδιάζων και ο αντίστροφός του δεν θα υπάρχει. Αφού υπολογιστεί ο πίνακας **K** μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων ενός αγνώστου δείγματος από το μετρούμενο φάσμα του. Εάν $\mathbf{A}_{unk}$ είναι ο πίνακας που περιέχει τα φάσματα των αγνώστων δειγμάτων και $\mathbf{C}_{unk}$ είναι ο πίνακας των αγνώστων συγκεντρώσεων, τότε η εξίσωση του μοντέλου CLS γίνεται:

$$\mathbf{A}_{unk} = \mathbf{K}\,\mathbf{C}_{unk} \qquad (3.8)$$

Για τον υπολογισμό του πίνακα $\mathbf{C}_{unk}$ πολλαπλασιάζονται και τα δύο μέλη της εξίσωσης με τον ανάστροφο του **K**, $\mathbf{K}^T$, και κατόπιν με τον ψευδοαντίστροφο του **K**, $(\mathbf{K}\,\mathbf{K}^T)^{-1}$:

$$(\mathbf{K}\,\mathbf{K}^T)^{-1}\,\mathbf{K}^T\,\mathbf{A}_{unk} = (\mathbf{K}\,\mathbf{K}^T)^{-1}\mathbf{K}\,\mathbf{K}^T\,\mathbf{C}_{unk} = \mathbf{I}\,\mathbf{C}_{unk} = \mathbf{C}_{unk} \qquad (3.9)$$

όπου **I** ο μοναδιαίος πίνακας. Για να υπάρχει ο ψευδοαντίστροφος πίνακας τού **K**, $(\mathbf{K}\,\mathbf{K}^T)$, πρέπει ο **K** να έχει τουλάχιστον τόσες σειρές όσες και στήλες. Εφόσον κάθε σειρά του **K** αντιστοιχεί σε κάθε μήκος κύματος και κάθε στήλη σε κάθε αναλύτη, για να υπολογιστεί ο $\mathbf{C}_{unk}$ θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τόσα μήκη κύματος όσοι είναι και οι αναλύτες.

3.2. Μέθοδος Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων

Μια από τις πιο διαδεδομένες φασματοσκοπικές χημειομετρικές μεθόδους ποσοτικής ανάλυσης είναι η μέθοδος των Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων (Inverse Least Squares, ILS) [18, 50, 68]. Πολλές μέθοδοι που βασίζονται στο νόμο του Beer θεωρούν ότι δεν υπάρχει παρεμποδιστική δράση όλων των ειδών που απορροφούν, ή ότι είναι γνωστή η πλήρης σύσταση του μίγματος (CLS). Σε πραγματικά δείγματα είναι πολύ δύσκολο, αν όχι αδύνατο να γνωρίζουμε τις συγκεντρώσεις όλων των χημικών ειδών που μπορούν να δώσουν απόκριση στον ανιχνευτή. Σε πολύπλοκα μίγματα, μόνο οι συγκεντρώσεις μερικών συστατικών ενδιαφέρουν τον αναλυτή και τότε είναι φανερό

ότι μέθοδοι όπως η CLS δεν είναι εφαρμόσιμες. Ένας εύκολος τρόπος να λυθεί αυτό το πρόβλημα είναι η αναδιάταξη του νόμου του Beer, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\mathbf{C} = \mathbf{PA} + \mathbf{E} \qquad (3.10)$$

όπου **C** είναι το μεγέθους ν διάνυσμα των συγκεντρώσεων, **A** το μεγέθους λν διάνυσμα των απορροφήσεων, **P** ο ν×λν πίνακας των συντελεστών βαθμονόμησης και **E** είναι το σφάλμα υπολογισμού της συγκέντρωσης (σφάλμα μέτρησης, θόρυβοι). Αυτός ο φαινομενικά μικρός μετασχηματισμός της εξίσωσης του μοντέλου CLS έχει πολύ σημαντικές επιπτώσεις για την ανάλυση. Αυτή η έκφραση του νόμου του Beer υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση είναι συνάρτηση των μετρούμενων απορροφήσεων σε μια σειρά από μήκη κύματος. Ο ορισμός αυτός είναι εντελώς διαφορετικός από αυτόν της μεθόδου CLS, όπου η απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος υπολογίζεται σαν συνάρτηση του αθροίσματος των συγκεντρώσεων όλων των συστατικών που απορροφούν. Ακόμα και όταν δεν είναι γνωστή η ακριβής σύσταση του μίγματος, ο πίνακας βαθμονόμησης, **P**, μπορεί να υπολογιστεί σωστά και να χρησιμοποιηθεί για τον ακριβή προσδιορισμό μόνο αυτών των συστατικών που μας ενδιαφέρουν [69]. Τα επιλεγόμενα μήκη κύματος πρέπει να βρίσκονται σε αυτή τη φασματική περιοχή όπου υπάρχει συνεισφορά του προς ανάλυση συστατικού. Επιπλέον, απαιτούνται μετρήσεις σε διαφορετικά μήκη κύματος για κάθε συστατικό και για μια ακριβή βαθμονόμηση χρειάζεται τουλάχιστον μια μέτρηση για κάθε προστιθέμενη πηγή διακύμανσης του φάσματος (αναλύτες). Ο πίνακας **P** των συντελεστών βαθμονόμησης υπολογίζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$\mathbf{P} = \mathbf{C}\,\mathbf{A}^{-1} \qquad (3.11)$$

Αλλά όπως με τη μέθοδο CLS, αν ο πίνακας **A** των αποκρίσεων δεν είναι τετραγωνικός μπορεί να υπολογιστεί από τον ψευδοαντίστροφό του, $(\mathbf{A}\,\mathbf{A}^T)$:

$$\mathbf{P} = \mathbf{C}\,\mathbf{A}^T(\mathbf{A}\,\mathbf{A}^T)^{-1} \qquad (3.12)$$

Εάν $\mathbf{A}_{unk}$ είναι ο πίνακας που περιέχει τα φάσματα των αγνώστων δειγμάτων και $\mathbf{C}_{unk}$ είναι ο πίνακας των αγνώστων συγκεντρώσεων, τότε η εξίσωση του μοντέλου ILS γίνεται:

$$C_{unk} = P\ A_{unk} \qquad (3.13)$$

δηλαδή, ο υπολογισμός των αγνώστων συγκεντρώσεων γίνεται με ένα απλό πολλαπλασιασμό δύο πινάκων, χωρίς την ανάγκη για νέα αντιστροφή του πίνακα βαθμονόμησης. Το παραπάνω μοντέλο μπορεί να βρει λύσεις για σύνθετα μίγματα όπου μόνο μερικά από τα συστατικά των μιγμάτων είναι γνωστά, με τη μόνη προϋπόθεση ότι στα επιλεγόμενα μήκη κύματος απορροφούν τα προς ανάλυση συστατικά. Δυστυχώς, ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι εξαιτίας των διαστάσεων των πινάκων ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων μηκών κύματος δεν μπορεί να υπερβεί τον αριθμό των δειγμάτων βαθμονόμησης. Θεωρητικά, θα μπορούσαν να παρασκευαστούν και να μετρηθούν αρκετά νέα δείγματα βαθμονόμησης για την αύξηση των μηκών κύματος, αλλά αυτό δημιουργεί ένα νέο πρόβλημα. Όλες οι απορροφήσεις του φάσματος τείνουν σε μια συνολική αύξηση ή μείωση μαζί καθώς μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις των συστατικών σε ένα μίγμα. Αυτό το φαινόμενο, είναι γνωστό ως συγγραμμικότητα και οδηγεί στην παραγωγή ασταθών μαθηματικών μοντέλων και αναξιόπιστων αποτελεσμάτων για το κάθε συστατικό. Ένα άλλο πρόβλημα με την αύξηση των μηκών κύματος στο μοντέλο είναι ένα φαινόμενο γνωστό ως υπερπροσαρμογή. Γενικά, ξεκινώντας από ένα μικρό αριθμό μηκών κύματος και προσθέτοντας νέα μήκη στα οποία απορροφούν οι αναλύτες, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων θα βελτιώνεται. Αυτό συμβαίνει γιατί όσο αυξάνεται ο αριθμός των μηκών κύματος στις εξισώσεις βαθμονόμησης μειώνεται η πιθανότητα να μεταβάλλονται τα άγνωστα δείγματα ακριβώς με τον ίδιο τρόπο. Όμως, από ένα σημείο και μετά, οι προβλέψεις θα αρχίσουν να γίνονται με διαρκώς μικρότερη ακρίβεια γιατί η εισαγωγή πάρα πολλών δεδομένων αρχίζει να εισάγει στο μοντέλο και το φασματικό θόρυβο. Για την κατασκευή ενός επιτυχημένου μοντέλου ILS το στάδιο της επιλογής των μηκών κύματος είναι ζωτικής σημασίας. Η ιδανική λύση του προβλήματος θα ήταν η επιλογή ενός τέτοιου αριθμού μηκών κύματος αρκετά μεγάλου ώστε να σχεδιαστεί ένα μοντέλο που προβλέπει με ικανοποιητική ακρίβεια αλλά και σχετικά μικρού ώστε η συνολική βαθμονόμηση να μην είναι χρονοβόρα και να μην επηρεάζεται από το φαινόμενο της συγγραμμικότητας. Οι διάφορες τεχνικές επιλογής αυτού του βέλτιστου αριθμού μηκών κύματος περιγράφονται στην ενότητα 2.4. Η ILS είναι μια πολυπαραμετρική τεχνική, σύμφωνα με την οποία οι εξαρτημένες μεταβλητές (συγκεντρώσεις) υπολογίζονται από πολλαπλές ανεξάρτητες μεταβλητές (όπως οι απορροφήσεις στα επιλεγόμενα μήκη

κύματος). Εφόσον δεν είναι απαραίτητη η γνώση της ακριβούς σύστασης των δειγμάτων (ένα από τα μεγάλα της πλεονεκτήματα), η μέθοδος βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων, όπως σε φυσικά υλικά (ανάλυση αλεύρου, μαλλιού, βαμβακιού, βενζίνης) και σε βιολογικά δείγματα [70-73].

3.3.Ανάλυση Κύριων Συστατικών (Principal Component Analysis, PCA)

Σε πραγματικά δείγματα συνήθως υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεταβολές που αποτελούν ένα φάσμα, όπως τα διάφορα συστατικά σε δείγματα μιγμάτων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών, διακυμάνσεις των οργάνων όπως ο θόρυβος του ανιχνευτή, οι αλλαγές των πειραματικών συνθηκών που επηρεάζουν την απορρόφηση και τη γραμμή βάσης, και ο διαφορετικός χειρισμός των δειγμάτων. Παρόλα αυτά, ακόμα και με όλες τις παραπάνω πολύπλοκες μεταβολές να λαμβάνουν μέρος, θα πρέπει να υπάρχει ένας ορισμένος αριθμός από ανεξάρτητες μεταξύ τους μεταβολές που συμπεριλαμβάνονται στα φασματικά δεδομένα. Ιδανικά, οι μεγαλύτερες μεταβολές κατά τη βαθμονόμηση θα πρέπει να είναι οι μεταβολές του φάσματος, οι οποίες οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των συστατικών των μιγμάτων. Αν ήταν δυνατό να υπολογίσουμε μια ομάδα από φάσματα μεταβολών τα οποία αντιπροσωπεύουν τις μεταβολές της απορρόφησης σε κάθε μήκος κύματος του φάσματος, τότε για το μοντέλο βαθμονόμησης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αυτά τα δεδομένα αντί για τα μη επεξεργασμένα αρχικά φασματικά δεδομένα. Θα πρέπει να υπάρχουν λιγότερες κοινές μεταβολές από τον αριθμό των φασμάτων βαθμονόμησης, και έτσι, υπάρχει κάποιος αποφασιστικός αριθμός ανεξάρτητων μεταβολών στα φασματικά δεδομένα για τις εξισώσεις βαθμονόμησης ο αριθμός των υπολογισμών θα είναι επίσης μειωμένος. Θεωρητικά, τα φάσματα μεταβολής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανακατασκευή ενός φάσματος από ένα δείγμα πολλαπλασιάζοντας το καθένα με ένα διαφορετικό συντελεστή και προσθέτοντας τα αποτελέσματα έτσι ώστε το νέο φάσμα να προσομοιώνει το φάσμα από ένα άγνωστο δείγμα. Κατά την βαθμονόμηση, κάθε φάσμα έχει μια διαφορετική ομάδα από συντελεστές για κάθε μεταβολή, έφοσον οι συγκεντρώσεις των συστατικών είναι διαφορετικές. Έτσι, το ποσοστό του κάθε φάσματος που θα πρέπει να προστεθεί για την ανακατασκευή και σύγκριση πληροφορίας ενός αγνώστου δείγματος, θα έχει σχέση με τις συγκεντρώσεις των συστατικών του. Τα φάσματα μεταβολής συχνά καλούνται και ιδιοδιανύσματα της μεθόδου υπολογισμού τους. Η μέθοδος μείωσης μιας ομάδας φασματοσκοπικών δεδομένων στις πιο βασικές της πηγές μεταβολής ονομάζεται

Ανάλυσή Κύριων Συστατικών (Principal Component Analysis, PCA) [74]. Εφόσον τα ιδιοδιανύσματα υπολογίζονται από τα αρχικά δεδομένα βαθμονόμησης, θα πρέπει με κάποιο τρόπο να συνδέονται με τις συγκεντρώσεις των συστατικών που υπάρχουν στα δείγματα. Τα ίδια ιδιοδιανύσματα θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό αγνώστων δειγμάτων: για αυτό, η μοναδική διαφορά μεταξύ των φασμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των μετρούμενων συστατικών θα βρίσκεται στο διαφορετικό ποσοστό του κάθε ιδιοδιανύσματος που θα προστίθεται για κάθε φάσμα. Τα σύνολα αυτών των υπολογιζόμενων ποσοστών των ιδιοδιανυσμάτων είναι μοναδικά για κάθε κύριο συστατικό και φάσμα βαθμονόμησης, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί για την απορρόφηση στα κλασικά μοντέλα εξισώσεων (CLS ή ILS). Εφόσον η απεικόνιση των φασμάτων από μίγματα μειώνεται από ένα μεγάλο αριθμό μηκών κύματος σε λίγες μόνο τέτοιες ομάδες, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί η έκφραση του νόμου του Beer με την μέθοδο ILS για τον υπολογισμό συγκεντρώσεων εξαιτίας της ικανότητας της μεθόδου να μην επηρεάζεται από τυχόν παρεμποδίσεις. Επίσης, με την χρησιμοποίηση ενός μεγάλου αριθμού μηκών κύματος του φάσματος (μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ολόκληρο το φάσμα για τον υπολογισμό των ιδιοδιανυσμάτων), οι υπολογισμοί διατηρούν την εξισορροπητική ιδιότητα της μεθόδου CLS. Συμπερασματικά, το μοντέλο των ιδιοδιανυσμάτων συνδυάζει τα καλύτερα χαρακτηριστικά και των δυο προαναφερόμενων μεθόδων (CLS και ILS) μαζί στην ίδια επεξεργασία δεδομένων. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που τα μοντέλα ιδιοδιανυσμάτων γενικά συμπεριφέρονται καλύτερα από τα κλασικά μοντέλα και σε ακρίβεια και σε ανθεκτικότητα μεθόδου (ή αξιοπιστία) [43]. Ο τρόπος υπολογισμού των ιδιοδιανυσμάτων είναι το πιο κρίσιμο κομμάτι της μεθόδου. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αυτά τα μοντέλα βασίζονται σε σχετικές μεταβολές των αρχικών δεδομένων και όχι σε απόλυτες μετρήσεις της απορρόφησης (κάτι το οποίο γίνεται στα κλασσικά μοντέλα). Για να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο PCA, τα φασματικά δεδομένα θα πρέπει με κάποιο τρόπο να μεταβάλλονται. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι να μεταβληθούν οι συγκεντρώσεις των συστατικών που μας ενδιαφέρουν. Όπως και με το μοντέλο ILS, μπορεί να υπάρχουν προβλήματα με την παλινδρόμηση. Αν οι συγκεντρώσεις των δυο σημαντικών συστατικών βρίσκεται στα δείγματα βαθμονόμησης στην ίδια αναλογία, τότε το μοντέλο θα ανιχνεύσει μόνο μια μεταβολή, και όχι δυο. Έτσι, όταν όλες οι απορροφήσεις τού ενός συστατικού αυξάνονται ή μειώνονται τότε και του άλλου συστατικού θα αυξάνονται ή θα μειώνονται - και το αντίστροφο - και θα είναι ανιχνεύσιμη μόνο μία μεταβολή: οι αλλαγές του φάσματος

των δυο συστατικών μαζί. Για αυτό, κατά την εφαρμογή μοντέλων ιδιοδιανυσμάτων κατά τη βαθμονόμηση οι συγκεντρώσεις των μετρούμενων συστατικών θα πρέπει να βρίσκονται σε τυχαία και ομαλά κατανεμημένες αναλογίες. Πριν εφαρμοσθεί η μέθοδος σε κάποιο δοκιμαστικό πακέτο τιμών, τα αρχικά δεδομένα υφίστανται την εξής επεξεργασία: λαμβάνεται ο μέσος όρος όλων των αρχικών φασμάτων βαθμονόμησης και μετά αφαιρείται από κάθε ένα χωριστά. Αυτή η επεξεργασία, λέγεται κεντράρισμα του μέσου όρου και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των λεπτών διαφορών μεταξύ των φασμάτων, αφού η μέθοδος υπολογίζει τα κύρια συστατικά από τις διαφορές των απορροφήσεων και όχι από τις απόλυτες τιμές τους. Ως αποτέλεσμα, οτιδήποτε βελτιώνει την ικανότητα να υπολογίζονται αυτές τις διαφορές μεταξύ των φασμάτων βαθμονόμησης, βελτιώνει και το ίδιο το μοντέλο. Αυτό γίνεται πιο κατανοητό αν ληφθεί υπόψη ο τρόπος με τον οποίο η PCA υπολογίζει τα ιδιοδιανύσματα. Εφόσον τα ιδιοδιανύσματα αντιπροσωπεύουν τις διαφορές στα φασματικά δεδομένα τα οποία είναι κοινά σε όλα τα φάσματα της βαθμονόμησης, η απομάκρυνση του μέσου όρου των απορροφήσεων απλά απομακρύνει την πρώτη πιο κοινή διακύμανση πριν τα δεδομένα επεξεργαστούν με τον αλγόριθμο της μεθόδου. Η μέθοδος PCA είναι στην ουσία μια μέθοδος αποκλεισμού ή εξαλείψεως. Με διαδοχικούς αποκλεισμούς κάθε ανεξάρτητης διακύμανσης από τα φάσματα βαθμονόμησης στη σειρά, είναι εφικτή η δημιουργία ενός πακέτου ιδιοδιανυσμάτων (κύρια συστατικά) αντιπροσωπευτικών των κοινών μεταβολών της απορρόφησης. Όταν τα δεδομένα έχουν υποστεί πλήρη επεξεργασία με τον αλγόριθμο PCA, συμπτύσσονται σε δυο βασικούς - και μικρότερους – πίνακες: αυτόν των ιδιοδιανυσμάτων (loadings) ή φασμάτων, και αυτόν των τιμών των στατιστικών βαρών (scores) για όλα τα φάσματα βαθμονόμησης. Η μαθηματική έκφραση των πινάκων και η εξίσωση του μοντέλου για τα φασματικά δεδομένα δίνεται από τη σχέση:

$$\mathbf{A} = \mathbf{SF} + \mathbf{E} \qquad (3.14)$$

όπου **A** είναι ο $n \times p$ πίνακας των απορροφήσεων των φασμάτων, **S** είναι ο $n \times f$ πίνακας των τιμών των συντελεστών για όλα τα φάσματα και **F** είναι ο $f \times p$ πίνακας των ιδιοδιανυσμάτων. Ο πίνακας **E** περιέχει τα σφάλματα της ικανότητας του μοντέλου να προβλέψει τις απορροφήσεις της βαθμονόμησης και έχει τις ίδιες διαστάσεις με τον πίνακα **A**. Οι διαστάσεις των πινάκων είναι ενδεικτικές των πληροφοριών που φέρουν: n είναι ο αριθμός των δειγμάτων (φασμάτων), p είναι ο αριθμός των σημείων (π.χ.

μηκών κύματος) που χρησιμοποιούνται κατά τη βαθμονόμηση και f είναι ο αριθμός των PCA ιδιοδιανυσμάτων. Η παραπάνω εξίσωση είναι μια απλουστευμένη μορφή της πραγματικής εξίσωσης του μοντέλου PCA.

Υπολογισμός των κύριων συστατικών

Υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι για τον υπολογισμό των κύριων συστατικών για ένα σύνολο δεδομένων: ο αλγόριθμος NIPALS [75] και η Αποικοδόμηση της Συμμεταβλητότητας [76-79]. Σημείωση: Τα ιδιοδιανύσματα είναι τα στατιστικά βάρη για το πόσο σημαντικός είναι κάθε παράγοντας για την ανακατασκευή των φασματικών δεδομένων. Ο πίνακας των ιδιοδιανυσμάτων είναι ένας διαγώνιος τετραγωνικός πίνακας, δηλαδή έχει τιμές μηδέν παντού εκτός από τη διαγώνιο. Οι τιμές των ιδιοδιανυσμάτων θα πρέπει πάντα να μειώνονται όσο κατεβαίνουμε στη διαγώνιο, γιατί το πρώτο ιδιοδιάνυσμα αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη διακύμανση, το δεύτερο στην αμέσως επόμενη μεγαλύτερη κ.ο.κ.

Ο αλγόριθμος NIPALS

Ο αλγόριθμος αυτός είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος για τον υπολογισμό των κύριων συστατικών για μια ομάδα δεδομένων. Παράγει πιο ακριβή αριθμητικά αποτελέσματα συγκριτικά με τη μέθοδο της Αποικοδόμησης της Συμμεταβλητότητας, αλλά είναι πιο αργός στους υπολογισμούς. Περισσότερα για τον αλγόριθμο NIPALS και για τα στάδια που περιλαμβάνει αναφέρονται στο παράρτημα.

Αποικοδόμηση της συμμεταβλητότητας

Αυτή η μέθοδος είναι πιο γρήγορη, αλλά εμφανίζει την τάση για αριθμητικά σφάλματα στα τελευταία ιδιοδιανύσματα όταν εκτελείται σε υπολογιστές που χρησιμοποιούν μόνο απλή επαναληψιμότητα. Αυτό οφείλεται στο στάδιο συμπίεσης δεδομένων που εκτελείται στην αρχή για τον υπολογισμό του πίνακα μεταβλητότητας - συμμεταβλητότητας. Κατά την εφαρμογή αυτού του αλγορίθμου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται αριθμοί διπλής επαναληπτικότητας, ή αυτός να εφαρμόζεται μόνο για τον υπολογισμό των πρώτων ιδιοδιανυσμάτων. Τα στάδιά του περιγράφονται στο παράρτημα.

3.4. Παλινδρόμηση Κύριων Συστατικών (PCR)

Η μέθοδος παλινδρόμησης κύριων συστατικών (Principal Component Regression, PCR) συνδυάζει την τεχνική ανάλυσης κύριων συστατικών (PCA) για την αποικοδόμηση των φασματο-κινητικών δεδομένων ακολουθούμενη από ένα στάδιο παλινδρόμησης με τη μέθοδο αντεστραμμένων ελαχίστων τετραγώνων (ILS). Αντίθετα από τις μεθόδους που χρησιμοποιούν το νόμο του Beer όπως έχει (CLS, ILS), η μέθοδος PCR δεν υπολογίζει τους συντελεστές βαθμονόμησης με μια απευθείας παλινδρόμηση των συγκεντρώσεων των αναλυτών με τις φασματο-κινητικές αποκρίσεις τους, αλλά εφαρμόζει ένα βήμα παλινδρόμησης μεταξύ των συγκεντρώσεων και των κύριων συστατικών PCA [80]. Τα ιδιοδιανύσματα από μια αποικοδόμηση PCA αντιπροσωπεύουν τις φασματο-κινητικές μεταβολές που είναι κοινές σε όλα τα δεδομένα βαθμονόμησης. Έτσι, η χρησιμοποίηση αυτών των ιδιοδιανυσμάτων για τον υπολογισμό του μοντέλου βαθμονόμησης αντί για τις απευθείας τιμές των αποκρίσεων θα δώσει ένα πιο ανθεκτικό μοντέλο για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των άγνωστων συστατικών σε πολύπλοκα δείγματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο πίνακας **F** των παραγόντων PCA, λειτουργεί παρόμοια με τον πίνακα **K** της μεθόδου CLS, δηλαδή αποθηκεύει τις φασματο-κινητικές ιδιότητες του κάθε αναλυόμενου συστατικού, αν και κάθε σειρά του **F** δεν περιέχει τα αρχικά φάσματα του κάθε συστατικού (π.χ. μέθοδος CLS). Αντίθετα, τα αρχικά δεδομένα αναπαράγονται σε συνδυασμό με τον πίνακα **S** των κύριων συστατικών. Τα κύρια συστατικά του πίνακα **S** είναι μοναδικά για κάθε φάσμα βαθμονόμησης, και όπως ένα φάσμα αποτελείται από μια σειρά τιμών απορροφήσεων σε μια σειρά από μήκη κύματος, μια σειρά από κύρια συστατικά αντιστοιχεί σε ένα φάσμα κύριων συστατικών. Σε αντίθεση με τα κλασσικά μοντέλα, όπου η παλινδρόμηση εκτελείται μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων και των απευθείας αποκρίσεων του ανιχνευτή, με τη μέθοδο PCR οι συγκεντρώσεις παλινδρομούνται ως προς τα κύρια συστατικά. Η τεχνική παλινδρόμησης σύμφωνα με τη μέθοδο ILS αποτελεί την καλύτερη επιλογή εφόσον συνδυάζει πλεονεκτήματα όπως η βαθμονόμηση και ανάλυση δειγμάτων άγνωστης σύστασης και η ανθεκτικότητα των αποτελεσμάτων πρόβλεψης ως προς τις συγκεντρώσεις των συστατικών που απουσιάζουν κατά τη βαθμονόμηση. Η εξίσωση του μοντέλου είναι:

$$\mathbf{C} = \mathbf{BS} + \mathbf{E} \qquad (3.15)$$

όπου **C** είναι ο mxn πίνακας των συγκεντρώσεων, **B** είναι ο m x f πίνακας των συντελεστών βαθμονόμησης και **S** ο πίνακας των παραγόντων από το στάδιο PCA. Οι

διαστάσεις των πινάκων είναι n για τον αριθμό των δειγμάτων, m για τον αριθμό των συστατικών και f για τον αριθμό των ιδιοδιανυσμάτων PCA. Όπως και με τη μέθοδο ILS, σ πίνακας **B** των συντελεστών βαθμονόμησης υπολογίζεται όπως παρακάτω:

$$\mathbf{B} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T(\mathbf{S}\mathbf{S}^T)^{-1} \qquad (3.16)$$

Η εξίσωση ενός μοντέλου PCR δίνει τον πίνακα των παραγόντων σε συνάρτηση του πίνακα των αποκρίσεων **A** και του πίνακα **F** των ιδιοδιανυσμάτων:

$$\mathbf{S} = \mathbf{A}\mathbf{F}^T \qquad (3.17)$$

Δεν είναι απαραίτητο να βρεθεί ο αντίστροφος ή ο ψευδοαντίστροφος του πίνακα **F** για τη λύση της εξίσωσης, γιατί ο πίνακας **F** που προκύπτει από την τεχνική PCA είναι ορθοκανονικός. Αυτό σημαίνει ότι αν ο πίνακας πολλαπλασιαστεί με τον ανάστροφό του θα δώσει τον μοναδιαίο πίνακα. Για αυτό, στην εξίσωση από την τεχνική PCA, απλά πολλαπλασιάζονται και τα δύο μέλη της εξίσωσης με τον ανάστροφο του **F** και προκύπτει η παραπάνω εξίσωση των παραγόντων. Τελικά, συνδυάζοντας την εξίσωση των συγκεντρώσεων με την εξίσωση των παραγόντων προκύπτει η ολοκληρωμένη εξίσωση του μοντέλου PCR:

$$\mathbf{C} = \mathbf{B}\mathbf{A}\mathbf{F}^T + \mathbf{E} \qquad (3.18)$$

Όπου **C** είναι ο m x n πίνακας των συγκεντρώσεων των συστατικών, **B** είναι ο m x f πίνακας των συντελεστών παλινδρόμησης, **A** είναι ο n x p πίνακας των αποκρίσεων του ανιχνευτή και **F** ο f x p πίνακας των ιδιοδιανυσμάτων, ή παραγόντων. Οι διαστάσεις των πινάκων είναι n για τον αριθμό των δειγμάτων, m για τον αριθμό των συστατικών βαθμονόμησης, p είναι ο αριθμός των μηκών κύματος βαθμονόμησης και f είναι ο αριθμός των ιδιοδιανυσμάτων από την τεχνική PCA. Η PCR είναι μέθοδος δύο σταδίων: τα ιδιοδιανύσματα και τα κύρια συστατικά υπολογίζονται με PCA και παλινδρομούνται ως προς τις συγκεντρώσεις των συστατικών με ένα στάδιο παλινδρόμησης παρόμοιο με αυτό της μεθόδου ILS. Όπως και η μέθοδος ILS, προβλέπει με ακρίβεια τις συγκεντρώσεις των αγνώστων υπό την προϋπόθεση ότι οι επιλεγόμενες μεταβλητές σχετίζονται άμεσα με τις ιδιότητες των αναλυτών με τις οποίες παλινδρομούνται. Όμως τα επιλεγόμενα κύρια συστατικά PCA υπολογίζονται

ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις των αναλυτών και απλά αντιπροσωπεύουν τις μεγαλύτερες κοινές διακυμάνσεις των φασμάτων σε ένα πακέτο βαθμονόμησης. Αν και αυτές οι διακυμάνσεις συνήθως αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των αναλυόμενων συστατικών, δεν υπάρχει εγγύηση ότι αυτό είναι πάντα αληθές. Στην πραγματικότητα, ένα μοντέλο PCR μπορεί να περιέχει περισσότερα κύρια συστατικά από αυτούς που είναι απαραίτητοι για την ανάλυση, δηλαδή μερικά από τα ιδιοδιανύσματα δεν σχετίζονται με τους αναλύτες. Για αυτό το λόγο με τεχνικές όπως η διασταυρούμενη επικύρωση επιχειρείται ένα στάδιο επιλογής αυτών των κύριων συστατικών (όπως η επιλογή των μηκών κύματος στη μέθοδο ILS) που απαιτούνται για την κατασκευή ενός μοντέλου για την ακριβή πρόβλεψη των συγκεντρώσεων του κάθε αναλύτη. Επίσης, όπως και στη μέθοδο ILS, η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου επηρεάζεται αρνητικά από συγγραμμικές τιμές συγκεντρώσεων των αναλυτών και για αυτό απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός από δείγματα βαθμονόμησης, τα οποία πρέπει να εξετάζονται ως προς την τυχαία κατανομή των συγκεντρώσεων του κάθε αναλυόμενου συστατικού.

3.5. Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων βρίσκει πολλές εφαρμογές σε διάφορες περιοχές της χημείας όπως στην αναλυτική χημεία. στη φυσικοχημεία, στη κλινική χημεία και στον έλεγχο των βιομηχανικών διεργασιών [81-89]. Η πρωτότυπη εργασία πάνω σε αυτή τη μέθοδο δημοσιεύθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '60 στο πεδίο της οικονομετρίας από τον H.Wold. Η εφαρμογή της μεθόδου στη χημεία ξεκίνησε από τον Kowalski μια δεκαετία αργότερα. Χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπία για την συλλογή πληροφοριών από πολύπλοκα φάσματα τα οποία περιέχουν επικαλυπτόμενες κορυφές απορρόφησης, παρεμποδιστικά φαινόμενα από σκεδαζόμενη ακτινοβολία και θόρυβο από την πειραματική διάταξη συλλογής των δεδομένων [90]. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πολυπαραμετρικών δεδομένων με μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μεταβλητών (για παράδειγμα τα παρατηρούμενα μήκη κύματος στη φασματοφωτομετρία). Η επιλογή των μηκών κύματος μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο κατά την σχεδίαση ενός μοντέλου PLS, εφόσον αυτό μπορεί να βελτιώνει την ικανότητα πρόβλεψης των συγκεντρώσεων των αγνώστων δειγμάτων. Για την παραγωγή ενός ανθεκτικού μοντέλου τα παρατηρούμενα μήκη κύματος πρέπει να αντιστοιχούν ακριβώς στην ιδιότητα του συστατικού που προσδιορίζεται, διαφορετικά. Έχει αποδειχθεί [90] ότι η μέθοδος PLS είναι συχνά μια καλύτερη εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με την παλαιότερη πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

ή την μέθοδο PCR, γιατί είναι πιο ανθεκτική. Ανθεκτικότητα μιας στατιστικής μεθόδου σημαίνει ότι οι παράμετροι του αναπτυσσόμενου μοντέλου δεν μεταβάλλονται αισθητά (ενίοτε και επικίνδυνα) κατά την προσθήκη νέων ή κατά την αφαίρεση προϋπαρχόντων δειγμάτων βαθμονόμησης από τον συνολικό πληθυσμό [91-93]. Η μέθοδος PLS είναι μια απλή παραλλαγή της μεθόδου PCR. Η μέθοδος PCR με απλά λόγια αποτελείται από ένα στάδιο ILS εφαρμοζόμενο σε ένα νέο σύστημα συντεταγμένων των φασμάτων, το οποίο υπολογίζεται με την τεχνική PCA. Δηλαδή, οι ανεξάρτητες μεταβλητές παύουν να είναι τα μήκη κύματος και την θέση τους παίρνουν τα κύρια συστατικά. Η μέθοδος PLS πάει ένα βήμα παρακάτω: χρησιμοποιεί ένα σύστημα συντεταγμένων, το οποίο βρίσκει τα κύρια συστατικά με βάση όχι μόνο τα φάσματα αλλά και τις συγκεντρώσεις. Δύο είναι οι λόγοι που γίνεται αυτό. Πρώτο, η ικανότητα απομάκρυνσης του θορύβου με την τεχνική PCA μπορεί να εφαρμοσθεί εξίσου αποτελεσματικά και για τις τιμές των συγκεντρώσεων. Δεύτερο, τα σφάλματα που οφείλονται στο φασματικό θόρυβο μετατοπίζουν τα ιδιοδιανύσματα των φασμάτων από τη θέση που θα είχαν αν τα δεδομένα ήταν απαλλαγμένα από θόρυβο. Το ίδιο συμβαίνει και για τα ιδιοδιανύσματα των συγκεντρώσεων. Αυτό που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο PLS είναι η μετατόπιση του κάθε ζεύγους των ιδιοδιανυσμάτων συγκέντρωσης-απορρόφησης στη διχοτόμο της γωνίας που σχηματίζουν και την ευθυγράμμισή τους. Με αυτό τον τρόπο ο θόρυβος απομακρύνεται αποτελεσματικότερα και πιο ελεγχόμενα από την ό,τι με την PCR. Το στάδιο πρόβλεψης της μεθόδου PLS είναι επίσης διαφορετικό από την PCR. Γίνεται σταδιακά με τη χρησιμοποίηση ζευγών φασματικών κύριων συστατικών και συγκέντρωσης. Για κάθε αναλύτη, η προβολή του αγνώστου φάσματος στο πρώτο κύριο συστατικό κλιμακώνεται με ένα συντελεστή, ώστε να ταυτιστεί με την αντίστοιχη προβολή στο πρώτο κύριο συστατικό της συγκέντρωσης. Αυτό αντιπροσωπεύει τη συνεισφορά της ολικής συγκέντρωσης του αναλύτη, η οποία συλλέγεται από το πρώτο ζεύγος των κύριων συστατικών απορρόφησης και συγκέντρωσης. Κατόπιν, η πορεία επαναλαμβάνεται για το δεύτερο ζευγάρι κύριων συστατικών, προσθέτοντας τη συνεισφορά της συγκέντρωσης σε αυτή από το πρώτο ζευγάρι. Η πορεία συνεχίζεται με τη σταδιακή προσθήκη αυτών των συνεισφορών για κάθε επόμενο ζεύγος κύριων συστατικών, μέχρι την εξάντληση όλων των κύριων συστατικών για το συγκεκριμένο σύστημα συντεταγμένων. Τα μοντέλα PLS σχεδιάζονται σύμφωνα με τους αλγόριθμους NIPALS (βλέπε ενότητα 3.3) ή SIMPLS. Όπως και με τη μέθοδο PCR, ο αρχικός πίνακας δεδομένων μπορεί να εκφραστεί με τον πίνακα των παραγόντων. Ένα απλοποιημένο μοντέλο PLS σχεδιάζεται από τη παλινδρόμηση των παραγόντων των

ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις των αναλυτών και απλά αντιπροσωπεύουν τις μεγαλύτερες κοινές διακυμάνσεις των φασμάτων σε ένα πακέτο βαθμονόμησης. Αν και αυτές οι διακυμάνσεις συνήθως αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των αναλυόμενων συστατικών, δεν υπάρχει εγγύηση ότι αυτό είναι πάντα αληθές. Στην πραγματικότητα, ένα μοντέλο PCR μπορεί να περιέχει περισσότερα κύρια συστατικά από αυτούς που είναι απαραίτητοι για την ανάλυση, δηλαδή μερικά από τα ιδιοδιανύσματα δεν σχετίζονται με τους αναλύτες. Για αυτό το λόγο με τεχνικές όπως η διασταυρούμενη επικύρωση επιχειρείται ένα στάδιο επιλογής αυτών των κύριων συστατικών (όπως η επιλογή των μηκών κύματος στη μέθοδο ILS) που απαιτούνται για την κατασκευή ενός μοντέλου για την ακριβή πρόβλεψη των συγκεντρώσεων του κάθε αναλύτη. Επίσης, όπως και στη μέθοδο ILS, η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου επηρεάζεται αρνητικά από συγγραμμικές τιμές συγκεντρώσεων των αναλυτών και για αυτό απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός από δείγματα βαθμονόμησης, τα οποία πρέπει να εξετάζονται ως προς την τυχαία κατανομή των συγκεντρώσεων του κάθε αναλυόμενου συστατικού.

3.5. Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων βρίσκει πολλές εφαρμογές σε διάφορες περιοχές της χημείας όπως στην αναλυτική χημεία, στη φυσικοχημεία, στη κλινική χημεία και στον έλεγχο των βιομηχανικών διεργασιών [81-89]. Η πρωτότυπη εργασία πάνω σε αυτή τη μέθοδο δημοσιεύθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '60 στο πεδίο της οικονομετρίας από τον H.Wold. Η εφαρμογή της μεθόδου στη χημεία ξεκίνησε από τον Kowalski μια δεκαετία αργότερα. Χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπία για την συλλογή πληροφοριών από πολύπλοκα φάσματα τα οποία περιέχουν επικαλυπτόμενες κορυφές απορρόφησης, παρεμποδιστικά φαινόμενα από σκεδαζόμενη ακτινοβολία και θόρυβο από την πειραματική διάταξη συλλογής των δεδομένων [90]. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πολυπαραμετρικών δεδομένων με μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μεταβλητών (για παράδειγμα τα παρατηρούμενα μήκη κύματος στη φασματοφωτομετρία). Η επιλογή των μηκών κύματος μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο κατά την σχεδίαση ενός μοντέλου PLS, εφόσον αυτό μπορεί να βελτιώνει την ικανότητα πρόβλεψης των συγκεντρώσεων των αγνώστων δειγμάτων. Για την παραγωγή ενός ανθεκτικού μοντέλου τα παρατηρούμενα μήκη κύματος πρέπει να αντιστοιχούν ακριβώς στην ιδιότητα του συστατικού που προσδιορίζεται, διαφορετικά. Έχει αποδειχθεί [90] ότι η μέθοδος PLS είναι συχνά μια καλύτερη εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με την παλαιότερη πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

ή την μέθοδο PCR, γιατί είναι πιο ανθεκτική. Ανθεκτικότητα μιας στατιστικής μεθόδου σημαίνει ότι οι παράμετροι του αναπτυσσόμενου μοντέλου δεν μεταβάλλονται αισθητά (ενίοτε και επικίνδυνα) κατά την προσθήκη νέων ή κατά την αφαίρεση προϋπαρχόντων δειγμάτων βαθμονόμησης από τον συνολικό πληθυσμό [91-93]. Η μέθοδος PLS είναι μια απλή παραλλαγή της μεθόδου PCR. Η μέθοδος PCR με απλά λόγια αποτελείται από ένα στάδιο ILS εφαρμοζόμενο σε ένα νέο σύστημα συντεταγμένων των φασμάτων, το οποίο υπολογίζεται με την τεχνική PCA. Δηλαδή, οι ανεξάρτητες μεταβλητές παύουν να είναι τα μήκη κύματος και την θέση τους παίρνουν τα κύρια συστατικά. Η μέθοδος PLS πάει ένα βήμα παρακάτω: χρησιμοποιεί ένα σύστημα συντεταγμένων, το οποίο βρίσκει τα κύρια συστατικά με βάση όχι μόνο τα φάσματα αλλά και τις συγκεντρώσεις. Δύο είναι οι λόγοι που γίνεται αυτό. Πρώτο, η ικανότητα απομάκρυνσης του θορύβου με την τεχνική PCA μπορεί να εφαρμοσθεί εξίσου αποτελεσματικά και για τις τιμές των συγκεντρώσεων. Δεύτερο, τα σφάλματα που οφείλονται στο φασματικό θόρυβο μετατοπίζουν τα ιδιοδιανύσματα των φασμάτων από τη θέση που θα είχαν αν τα δεδομένα ήταν απαλλαγμένα από θόρυβο. Το ίδιο συμβαίνει και για τα ιδιοδιανύσματα των συγκεντρώσεων. Αυτό που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο PLS είναι η μετατόπιση του κάθε ζεύγους των ιδιοδιανυσμάτων συγκέντρωσης-απορρόφησης στη διχοτόμο της γωνίας που σχηματίζουν και την ευθυγράμμισή τους. Με αυτό τον τρόπο ο θόρυβος απομακρύνεται αποτελεσματικότερα και πιο ελεγχόμενα από την ό,τι με την PCR. Το στάδιο πρόβλεψης της μεθόδου PLS είναι επίσης διαφορετικό από την PCR. Γίνεται σταδιακά με τη χρησιμοποίηση ζευγών φασματικών κύριων συστατικών και συγκέντρωσης. Για κάθε αναλύτη, η προβολή του αγνώστου φάσματος στο πρώτο κύριο συστατικό κλιμακώνεται με ένα συντελεστή, ώστε να ταυτιστεί με την αντίστοιχη προβολή στο πρώτο κύριο συστατικό της συγκέντρωσης. Αυτό αντιπροσωπεύει τη συνεισφορά της ολικής συγκέντρωσης του αναλύτη, η οποία συλλέγεται από το πρώτο ζεύγος των κύριων συστατικών απορρόφησης και συγκέντρωσης. Κατόπιν, η πορεία επαναλαμβάνεται για το δεύτερο ζευγάρι κύριων συστατικών, προσθέτοντας τη συνεισφορά της συγκέντρωσης σε αυτή από το πρώτο ζευγάρι. Η πορεία συνεχίζεται με τη σταδιακή προσθήκη αυτών των συνεισφορών για κάθε επόμενο ζεύγος κύριων συστατικών, μέχρι την εξάντληση όλων των κύριων συστατικών για το συγκεκριμένο σύστημα συντεταγμένων. Τα μοντέλα PLS σχεδιάζονται σύμφωνα με τους αλγόριθμους NIPALS (βλέπε ενότητα 3.3) ή SIMPLS. Όπως και με τη μέθοδο PCR, ο αρχικός πίνακας δεδομένων μπορεί να εκφραστεί με τον πίνακα των παραγόντων. Ένα απλοποιημένο μοντέλο PLS σχεδιάζεται από τη παλινδρόμηση των παραγόντων των

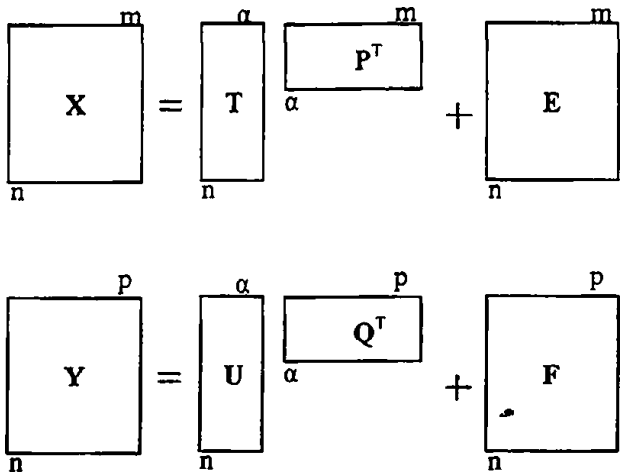
πινάκων των **X** και των **Y** και αποτελείται από εξωτερικές συσχετίσεις του κάθε πίνακα **X** και **Y** χωριστά και από μια εσωτερική συσχέτιση μεταξύ τους. Η εξωτερική συσχέτιση δίνεται από τη σχέση:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E} = \Sigma t_n p^T{}_n + \mathbf{E} \qquad (3.19)$$

Με τον ίδιο τρόπο δίνεται η εσωτερική συσχέτιση του πίνακα **Y**:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{F} = \Sigma u_n q^T{}_n + \mathbf{F} \qquad (3.20)$$

Οι παραπάνω σχέσεις αναπαριστάνονται γραφικά στο παρακάτω σχήμα:



Εάν υπολογιστούν όλα τα κύρια συστατικά, τότε θα ισχύει ότι:

$$\mathbf{E} = \mathbf{F} = 0 \qquad (3.21)$$

Για να ληφθεί μια χρησιμοποιήσιμη σχέση μεταξύ των **X** και **Y**, η περιγραφή των **Y** θα πρέπει είναι τέτοια ώστε το $||\mathbf{F}||$ να είναι όσο το δυνατό μικρότερο. Η εσωτερική συσχέτιση μπορεί να βρεθεί από τα γραφήματα των **Y** παραγόντων, u, ως προς τους παράγοντες του **X**, t, για κάθε συστατικό. Το απλούστερο μοντέλο για μια τέτοια σχέση είναι γραμμικό:

$$\hat{u}_h = b_h t_h \qquad (3.22)$$

όπου: $b_h = u'_h t_h / t_h' t_h$ (3.23)

Τα b_h είναι οι αντίστοιχοι συντελεστές παλινδρόμησης, b, στα μοντέλα MLR και PCR. Το γραμμικό μοντέλο δεν δίνει πάντα ικανοποιητικά αποτελέσματα, γιατί τα κύρια συστατικά υπολογίζονται χωριστά για τους πίνακες **X** και **Y** και έτσι έχουν πολύ μικρή συσχέτιση μεταξύ τους. Μια καλύτερη προσέγγιση είναι να ανταλλάσουν πληροφορίες μεταξύ τους και τα νεα υπολογιζόμενα συστατικά να περιστρέφονται ώστε να βρεθούν πιο κοντά στην ευθεία παλινδρόμησης του u ως προς t.

Συνοπτικά:

i) Υπάρχουν δυο σχέσεις που εκφράζουν τις εξωτερικές συσχετίσεις των **X** και **Y**.

ii) Υπάρχει εσωτερική συσχέτιση μεταξύ των **X** και **Y**.

iii) Στον βηματικό αλγόριθμο, οι πίνακες των ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών ανταλλάσουν τους παράγοντές τους και αυτό βελτιώνει την εσωτερική συσχέτιση.

iv) Η λήψη ορθογώνιων **X** παραγόντων καθίσταται δυνατή εφόσον εισαχθούν στατιστικά βάρη (ή συντελεστές βαρύτητας) στους υπολογισμούς.

Η μέθοδος PLS δεν ενδείκνυται για δεδομένα στα οποία υπάρχει μη γραμμικότητα , η οποία συσχετίζεται συστηματικά με την συγκέντρωση. Συνήθως, η PLS θα απορρίψει τις μη γραμμικές συσχετίσεις νωρίς, ακόμα και αν έχουη πληροφορίες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για πρόβλεψη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μέθοδος PCR οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα.. Η μέθοδος PCR έχει το πλεονέκτημα και στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν μεγάλα σφάλματα συγκεντρώσεων των προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης, ειδικά εάν τα σφάλματα είναι συστηματικά. Τότε, η μέθοδος PLS υπερπροσαρμόζει τα σφάλματα (τα συμπεριλαμβάνει σαν ένα επιπλέον αναλύτη), με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μεγαλύτερα σφάλματα κατά την πρόβλεψη ανεξάρτητων αγνώστων δειγμάτων. Για αυτό, είναι προτιμότερο να εφαρμόζονται και οι δύο μέθοδοι για το ίδιο πακέτο δεδομένων και να επιλέγεται εκ των υστέρων αυτή που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.

4. Σφάλματα

Στην πολυπαραμετρική φασματοφωτομετρική κινητική ανάλυση, όπου συναντάται τόσο η φασματική, όσο και η κινητική επικάλυψη, η ακρίβεια και η επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων μελετούνται με τη θεωρία μετάδοσης σφαλμάτων. Σύμφωνα με

αυτή την προσέγγιση, ένα σφάλμα μικρού μεγέθους στην απόκριση του ανιχνευτή μπορεί να επηρεαστεί από το πολύ δύο παράγοντες με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη τιμή του σχετικού σφάλματος συγκέντρωσης, την ενίσχυση του σφάλματος ή τη μετάδοσή του. Ο πρώτος παράγοντας είναι ο αριθμός κανονικότητας του πίνακα των συντελεστών βαθμονόμησης **K**, cond(**K**), ο οποίος αναπαριστά την απώλεια της αριθμητικής ακρίβειας κατά την αντιστροφή του πίνακα και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\mathrm{cond}(\mathbf{K}) = \|\mathbf{K}\|.\|\mathbf{K}^{-1}\| \qquad (4.1)$$

όπου $\|\mathbf{K}\|$ είναι η νόρμα του πίνακα **K**. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός κανονικότητας του πίνακα, τόσο μεγαλύτερες θα είναι οι τιμές των σφαλμάτων κατά τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων. Ιδανικά, η Cond(**K**) θα πρέπει να έχει τιμή 1 για καμιά απώλεια στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Ο δεύτερος παράγοντας που υπεισέρχεται στην μετάδοση σφαλμάτων είναι ο αριθμός κανονικότητας του πίνακα των συγκεντρώσεων των αναλυτών ή πειραματικού σχεδιασμού, cond(**C**) [38, 53-57].

4.1. Τύποι Σφαλμάτων

PRESS

Το προβλεπόμενο άθροισμα τετραγώνων υπολειμματικών σφαλμάτων (PRESS) είναι το άθροισμα των τετραγώνων όλων των σφαλμάτων όλων των δειγμάτων σε ένα πακέτο δεδομένων και δίνεται από τον τύπο:

$$\mathrm{PRESS} = \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2 \qquad (4.2)$$

Ο όρος PRESS συνήθως αναφέρεται στα αποτελέσματα της τεχνικής της διασταυρούμενης αξιολόγησης εξαιρώντας ένα δείγμα τη φορά. Το PRESS δεν σχετίζεται με κάποια πρότυπη τιμή. Όσο περισσότερα δείγματα περιέχονται στο προς βαθμονόμηση (ή πρόβλεψη) πακέτο δεδομένων, τόσο περισσότερες τιμές σφαλμάτων θα υψωθούν στο τετράγωνο και θα αθροιστούν, με συνέπεια η τιμή του PRESS να είναι μεγαλύτερη. Για αυτό το λόγο το PRESS είναι κατάλληλο μόνο για συγκρίσεις μέσα στο ίδιο πακέτο δεδομένων.

MSEC

Το τετράγωνο του μέσου σφάλματος βαθμονόμησης (MSEC) είναι το PRESS διαιρεμένο με τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας (β.ε.) της κάθε μεθόδου.

$$MSEC = PRESS/(\beta.\varepsilon.) \quad (4.3)$$

Για τη μέθοδο CLS οι βαθμοί ελευθερίας δίνονται από τον τύπο:

$$\beta.\varepsilon. = n - w - 1 \quad (4.4)$$

όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και w ο αριθμός των στηλών του πίνακα βαθμονόμησης K.

Για τη μέθοδο ILS οι βαθμοί ελευθερίας δίνονται από τον τύπο:

$$\beta.\varepsilon. = n - w - 1 \quad (4.5)$$

όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και w ο αριθμός των στηλών του πίνακα βαθμονόμησης P.

Για τη μέθοδο PCR οι βαθμοί ελευθερίας δίνονται από τον τύπο:

$$\beta.\varepsilon. = n - f - 1 \quad (4.6)$$

όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και f ο αριθμός των παραγόντων ή κύριων συστατικών της μεθόδου.

Για τη μέθοδο PLS οι βαθμοί ελευθερίας δίνονται από τον τύπο:

$$\beta.\varepsilon. = n - f - 1 \quad (4.7)$$

όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και f ο αριθμός των παραγόντων ή κύριων συστατικών της μεθόδου. Το MSEC χρησιμοποιείται μόνο σε αυτές τις περιπτώσεις όπου η βαθμονόμηση γίνεται με το ίδιο πακέτο δεδομένων με το οποίο αξιολογείται η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου.

SEP

Το τυπικό σφάλμα πρόβλεψης μιας αναλυτικής μεθόδου (SEP) είναι η τετραγωνική ρίζα της διακύμανσης των αποτελεσμάτων κατά την πρόβλεψη μιας μεθόδου:

$$\mathrm{SEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\hat{y}_{ij} - y_{ij} - bias\right)^2}{n-1}} \qquad (4.8)$$

όπου $_{ij}$ είναι η υπολογιζόμενη τιμή της προβλεπόμενης ιδιότητας (π.χ. συγκέντρωση) του j συστατικού για το i άγνωστο δείγμα, y_{ij} είναι η αναμενόμενη τιμή της προβλεπόμενης ιδιότητας και n ο αριθμός των αγνώστων. Χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις αξιολόγησης των αποτελεσμάτων μιας μεθόδου όπου η βαθμονόμηση και η πρόβλεψη έγιναν με διαφορετικά πακέτα δεδομένων.

4.2. Σφάλματα Μετρήσεων

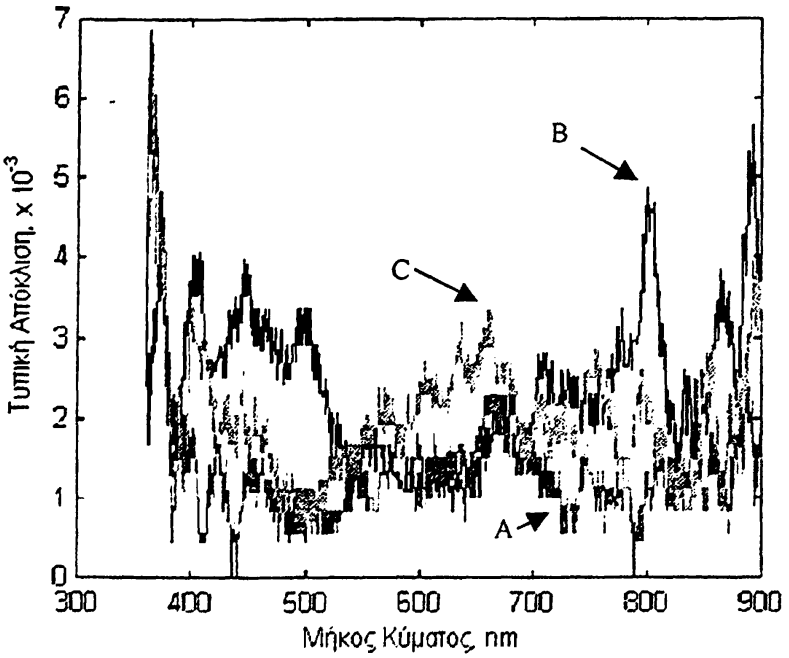
4.2.1. Φασματική Αβεβαιότητα

Εκτιμήθηκε η ποιότητα των λαμβανομένων πειραματικών δεδομένων, όπως η ευαισθησία, η επαναληπτικότητα, η διακύμανση του σήματος και ο λόγος σήματος-προς-θόρυβο για διαλύματα 3 συγκεντρώσεων 2,6-διχλωρο-φαινυλο-ινδοφαινόλη (DCPI) σε όλα τα μήκη κύματος του φάσματος από 350-900 nm, ανά 0.268 nm (Σχήμα 4.1). Μετρήθηκε το φάσμα του κάθε διαλύματος ανά 55 ms για 10 s και η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές (Σχήμα 4.2). Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή συνθετικών φασμάτων που εξομοιώνουν πραγματικές συνθήκες, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.

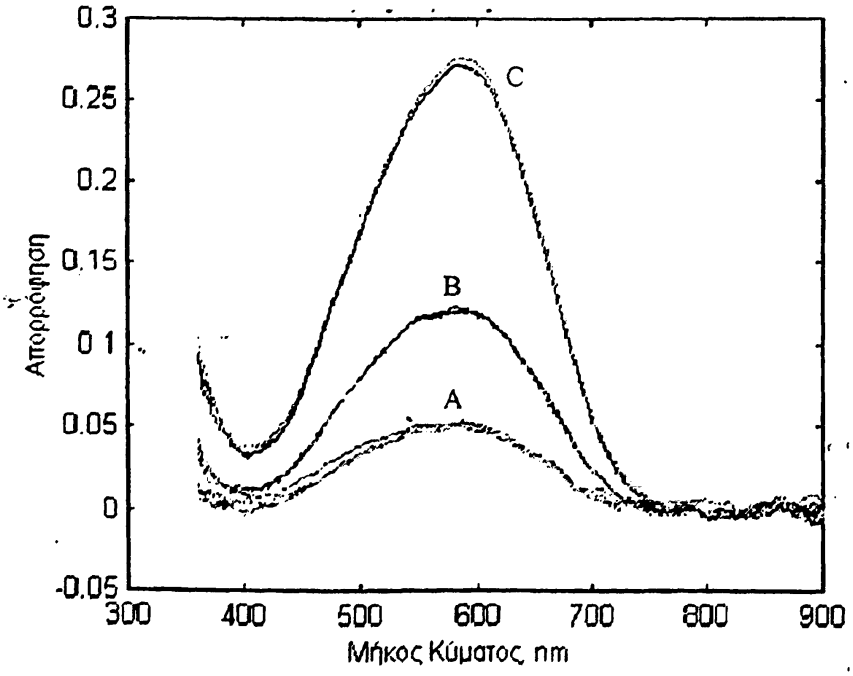
	Συγκέντρωση DCPI, M	S/N, 350-900 nm, $A_{min}/(A_{max}-A_{min})$	S/N, 350-900 nm, A_{mean}/STD
A	0.50×10^{-5}	13-72	38-68
B	1.25×10^{-5}	30-120	41-133
C	2.50×10^{-5}	54-142	60-122

4.2.2. Αβεβαιότητα στη Μέτρηση της Συγκέντρωσης

Για την αξιολόγηση του σφάλματος υπολογισμού της συγκέντρωσης, αρχικά εκτιμήθηκαν τα χαρακτηριστικά του αποκλειστικού οργάνου μέτρησης του όγκου των υγρών, δηλαδή των αυτόματων σιφωνιών (πιπετών) με ζύγιση απεσταγμένου νερού σε



Σχήμα 4.1. Η διακύμανση του σήματος και ο λόγος σήματος-προς-θόρυβο για διαλύματα 3 συγκεντρώσεων DCPI σε όλα τα μήκη κύματος του φάσματος από 350-900 nm, ανά 0.268 nm. A) 0.50 x 10^{-5} M, B) 1.25 x 10^{-5} M, C) 2.50 x 10^{-5} M



Σχήμα 4.2. Το φάσμα του κάθε διαλύματος ανά 55 ms. A) 0.50 x 10^{-5} M, B) 1.25 x 10^{-5} M, C) 2.50 x 10^{-5} M

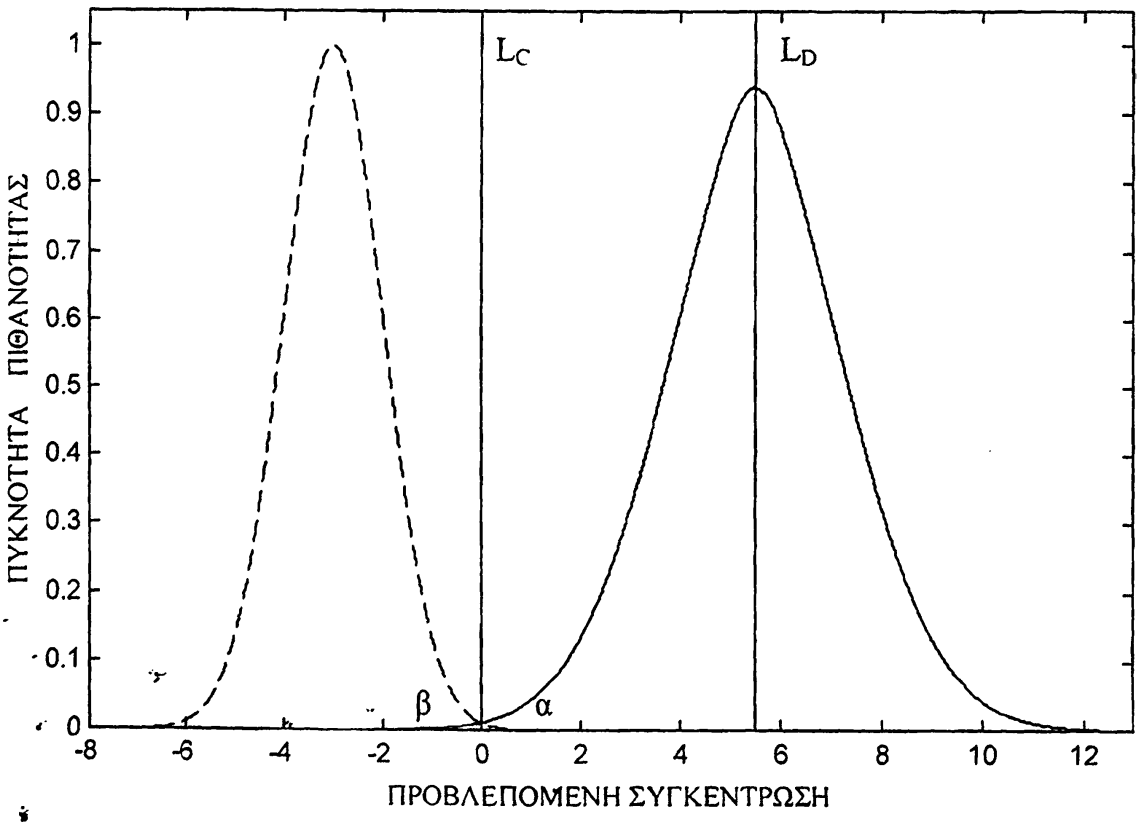
σταθερή θερμοκρασία 21° C. Αυτές οι τιμές του σφάλματος συμπεριλαμβάνουν τα σφάλματα που εισάγονται κατά την αλλαγή της ένδειξης του μετρούμενου όγκου,την αύξηση της θερμοκρασίας λόγω θέρμανσης από τα χέρια του χρήστη και την αλλαγή διαφορετικού ακροφυσίου (tip). Η επαναληπτικότητα των μετρήσεων ελέγχθηκε με τη ζύγιση απεσταγμένου νερού από 30 λήψεις σταθερού όγκου με το ίδιο σιφώνιο και ακροφύσιο. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα η απόλυτη τιμή του % σχετικού σφάλματος μέτρησης κυμαινόταν από 0.6 - 5 %, ενώ η % τυπική απόκλιση κυμαινόταν από 0.15 - 1.5 %.

Μέγιστη Χωρητικότητα Σιφωνίου, μl	Μετρούμενος Όγκος, μl	% Μέσο Σχετικό Σφάλμα	% Τυπική Απόκλιση
20	2	± 5,0	1,50
	10	± 1,0	0,50
	20	± 1,0	0,50
100	20	± 2,0	0,50
	50	± 1,0	0,30
	100	± 1,0	0,20
200	50	± 2,0	0,40
	100	± 1,0	0,20
	200	± 1,0	0,20
1000	200	± 1,0	0,30
	500	± 1,0	0,20
	1000	± 1,0	0,15
5000	1000	± 1,0	
	2000	± 0,5	
	5000	± 0,5	

4.3. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά ποιότητας σε μια αναλυτική μέθοδο και αποτελεί ένα ποιοτικό μέτρο της ικανότητας της μεθόδου να αναγνωρίζει τον αναλύτη σε ιχνοποσότητες. Πρώτος ο Curie συστηματοποίησε και όρισε με επιστημονικό τρόπο το όριο ανίχνευσης μιας αναλυτικής μεθόδου [94]. Οι Faber και Kowalski [95] σε μια προσπάθεια να ορίσουν τον πολυπαραμετρικό δείκτη του ορίου ανχνευσιμότητας, παρουσίασαν τρεις τιμές ορίων: το όριο λήψης απόφασης, το όριο ανίχνευσης και το όριο προσδιορισμού. Το όριο λήψης απόφασης, L_C, είναι το κρίσιμο επίπεδο συγκέντρωσης το οποίο επιτρέπει τη λήψη μιας εκ των υστέρων απόφασης σχετικά με την παρουσία ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, δηλαδή μετά την μέτρηση. Δίνεται από τη σχέση:

$$L_C = k_a \sigma_o \qquad (4.9)$$



Σχήμα 4.3. Διαφορά μεταξύ του ορίου λήψης απόφασης και του ορίου ανιχνευσιμότητας

όπου k_a είναι ένας πολλαπλασιαστής που δείχνει την πιθανότητα ενός σφάλματος 1ου είδους (θετικό) και σ_o είναι η τυπική απόκλιση κατά τη μέτρηση ή τον υπολογισμό της

συγκέντρωσης σε ένα τυφλό δείγμα. Ο δείκτης "ο" υποδηλώνει ότι η παραπάνω εξίσωση χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της «ουράς» μιας κατανομής όταν ισχύει η μηδενική απόφαση ότι ο αναλύτης δεν βρίσκεται στο διάλυμα. Το όριο λήψης απόφασης έχει τη σημαντική ιδιότητα να απομακρύνει την πιθανότητα για λανθασμένες θετικές αποφάσεις, αλλά έχει το μεονέκτημα ότι ένα συστατικό δεν θα ανιχνευθεί με πιθανότητα 50% όταν η αληθής τιμή του ισούται με την L_C. Δηλαδή δεν απομακρύνει σφάλματα 2ου είδους (αρνητικό σφάλμα). Το όριο ανίχνευσης, L_D, είναι εκείνο το επίπεδο συγκέντρωσης το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση του αναλύτη πριν από τη μέτρησή του σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο ορίων εμπιστοσύνης. Πολλοί συγγραφείς επιλέγουν 99,7 % όρια εμπιστοσύνης, όμως η επιλογή αυτή είναι αυθαίρετη. Δίνεται από την εξίσωση:

$$L_D = L_C + k_b\sigma_A \qquad (4.10)$$

όπου k_b είναι ένας πολλαπλασιαστής ο οποίος αντιστοιχεί σε επίπεδο πιθανότητας b για σφάλματα 2ου είδους και σ_A είναι η τυπική απόκλιση για τη μέτρηση ή τον υπολογισμό της συγκέντρωσης από ένα δείγμα που περιέχει τον αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με το όριο ανίχνευσης. Ο δείκτης Α υποδηλώνει ότι η εξίσωση υπολογίζει την ουρά μιας κατανομής όταν η μηδενική υπόθεση είναι ότι ο αναλύτης είναι παρών σε «ανιχνεύσιμη» ποσότητα. Το σχήμα 4.3 δείχνει τη σχέση του ορίου λήψης απόφασης και του ορίου ανίχνευσης. Τέλος, το όριο προσδιορισμού (ή ποσοτικοποίησης), L_Q, είναι το επίπεδο συγκέντρωσης κάποιου αναλύτη κατά την ποσοτική ανάλυση (σε αντιδιαστολή με την ποιοτική). Η εξίσωσή του L_Q είναι παρόμοια με την εξίσωση του L_C αν και με διαφορετικό συντελεστή και τυπική απόκλιση. Πάντως, το L_Q δεν χρησιμοποιείται ευρέως και δε θα συζητηθεί περαιτέρω. Στην περίπτωση της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης, ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ενός στοιχείου, η οποία ανιχνεύεται συνήθως με όρια εμπιστοσύνης 95%, δηλαδή η ποσότητα του στοιχείου, η οποία δείχνει στο όργανο μετρήσεως ένδειξη τριπλάσια της τυπικής απόκλισης μιας σειράς μετρήσεων του διαλύματος του τυφλού. Συχνά χρησιμοποιείται το αθροιστικά γραμμικό μοντέλο, στο οποίο οι αποκρίσεις του ανιχνευτή σχετίζονται με τις συγκεντρώσεις των αναλυτών και αντιστοιχεί στο κλασσικό ολικό μοντέλο βαθμονόμησης (CLS) [19]. Έχει δειχθεί ότι για την μέθοδο CLS απαιτούνται 2 αναστροφές πινάκων για την πρόβλεψη των αγνώστων δειγμάτων. Αυτή η τεχνική αυξάνει την αβεβαιότητα των μετρήσεων και την εγκυρότητα των

αποτελεσμάτων και ένα συνηθισμένο μέτρο της αξιοπιστίας της προβλεπόμενης τιμής είναι το τυπικό σφάλμα, δηλαδή η αναμενόμενη διασπορά γύρω από το μέσο όρο [96].

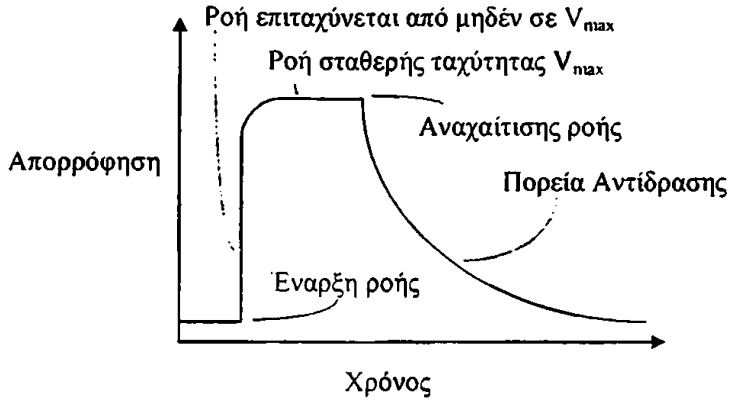
5.Πειραματική Διάταξη

5.1.Τεχνική Αναχαίτισης της Ροής

Η τεχνική αναχαίτισης της ροής είναι η μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για κινητικές μελέτες ταχειών αντιδράσεων και για ταχείες κινητικές μεθόδους αναλύσεως. Πρόσφατα, έχει βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης [97-101]. Βασίζεται στην ταχύτατη και ποσοτική ανάμιξη δύο διαλυμάτων και την απότομη αναχαίτιση της ροής του μίγματος. Από τη στιγμή της αναχαίτισης παρακολουθείται η πορεία της αντίδρασης στο μίγμα με φασματοφωτομετρικές [102-105] (όπως και στην παρούσα εργασία) ή άλλες αναλυτικές τεχνικές. Στην τεχνική αυτή το κατώτερο όριο ταχύτητας της μελετούμενης αντίδρασης εξαρτάται από το χρόνο αναμίξεως των δύο διαλυμάτων και το χρόνο αποκαταστάσεως της υδροδυναμικής ισορροπίας του μίγματος (εξάλειψη υδροστροβίλων). Ο συνολικός αυτός χρόνος ποικίλει ανάλογα με τον τρόπο κατασκευής της κάθε διάταξης αναχαίτισης της ροής. Στην πειραματική διάταξη με την οποία έγιναν οι παρούσες εφαρμογές ο συνολικός χρόνος ήταν περίπου 5 ms και επομένως ήταν αδύνατη η κινητική μελέτη αντιδράσεων που συμπληρώνονται σε μικρότερο χρόνο απο αυτόν. Στο σχήμα 5.2 φαίνεται η λειτουργική διάταξη και τα βασικά τμήματα ενός συστήματος αναχαιτιζόμενης ροής. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται ταχέως και ποσοτικά διερχόμενα μέσα από ειδικό θάλαμο αναμίξεως εισέρχονται στη κυψελίδα παρατηρήσεως. Η ροή αναχαιτίζεται απότομα με τη βοήθεια της σύριγγας αναχαιτίσεως και του μηχανικού εμποδίου (συστήματος σκανδαλισμού), δημιουργώντας έτσι αντανακλαστική πίεση που συμπληρώνει την ανάμιξη και το μίγμα ακινητοποιείται σε χρονικό διάστημα λίγων ms. Το σύστημα κινήσεως των συρίγγων προωθήσεως μπορεί να είναι μηχανικό, αλλά κυρίως πνευματικό (όπως και στην διάταξη που χρησιμοποιήθηκε εδώ). Με την επίδραση του πνευματικού συστήματος το μίγμα αποκτά τελικά μια σταθερή μέγιστη ταχύτητα V_{max}, οπότε η σύριγγα αναχαιτίσεως αρχίζει να γεμίζει και τελικά το έμβολό της σταματά στο μηχανικό εμπόδιο, προκαλώντας έτσι την αναχαίτιση της ροής. Η ηλικία της αντίδρασης κατά την αναχαίτιση δίνεται από τη σχέση:

$t_0 = l/Vmax$ (5.1)

όπου l είναι η απόσταση μεταξύ του σημείου ανάμιξης και του σημείου παρατήρησης. Στο σχήμα 5.1 φαίνονται διαγραμματικά οι διάφορες φάσεις της ροής με την αντίστοιχη μεταβολή μιας αναλυτικής παραμέτρου του μίγματος (απορρόφηση) που παρακολουθείται.



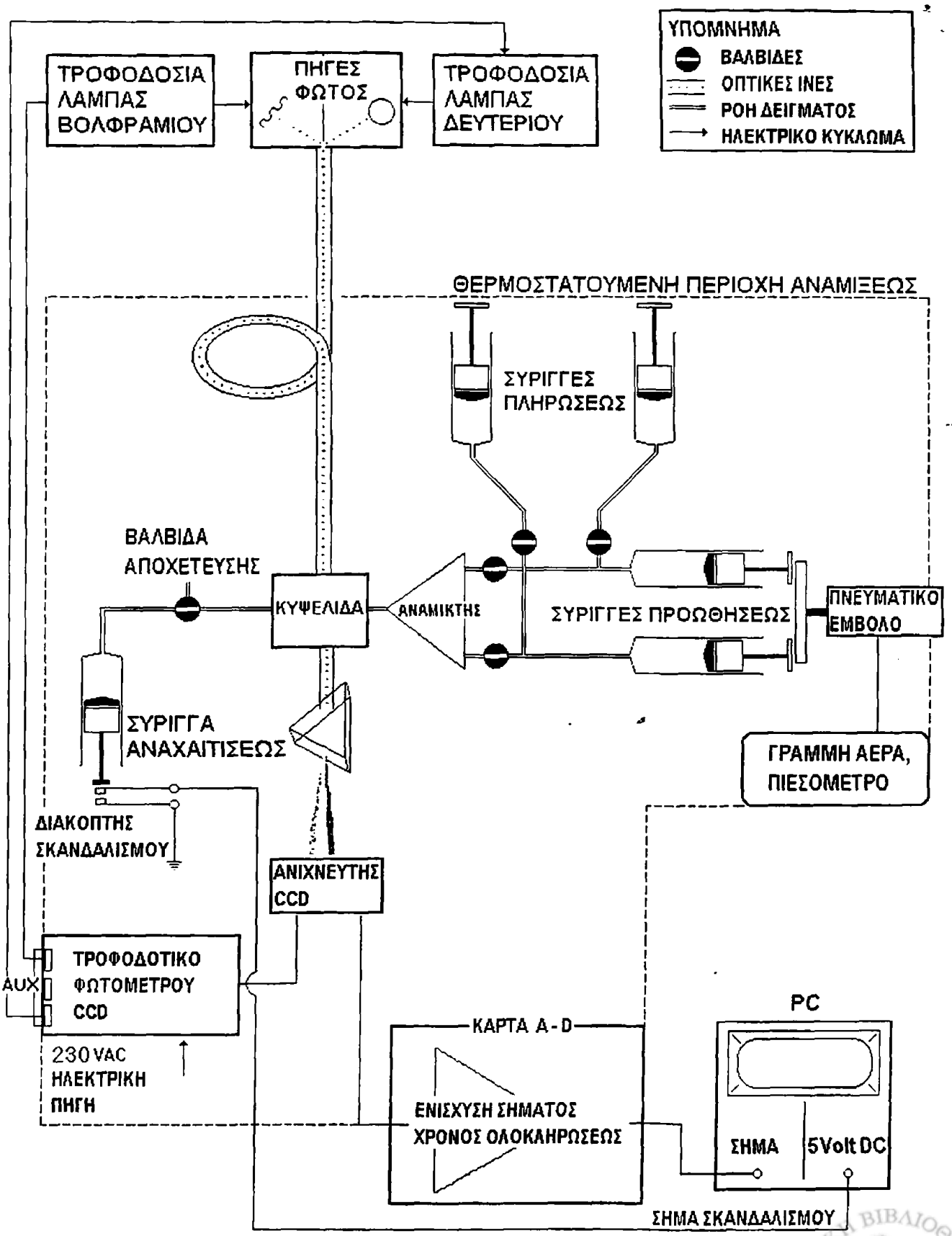
Σχήμα 5.1. Γραφική παράσταση των διαφόρων φάσεων της ροής με την αντίστοιχη μεταβολή της απορρόφησης

Το σημείο παρατηρήσεως του αντιδρώντος μίγματος τοποθετείται σε τέτοια απόσταση από το θάλαμο αναμίξεως, ώστε να εξασφαλίζεται πλήρης ανάμιξη των αντιδρώντων διαλυμάτων. Για την επίτευξη ικανοποιητικής ανάμιξης πρέπει η ροή μέσα στο σύστημα να είναι τυρβώδης. Η κρίσιμη ταχύτητα Vc γιά την επίτευξη τυρβώδους ροής καθορίζεται από τη σχέση:

$Vc = (NRn)/(pd)$ (5.2)

όπου NR ο αριθμός Reynold (περίπου 2000), n και p το ιξώδες και η πυκνότητα του ρευστού αντίστοιχα και d η διάμετρος του σωλήνα ροής [106]. Η αύξηση της ταχύτητας ροής για τη μετατροπή της σε τυρβώδη, περιέχει τον κίνδυνο σχηματισμού ρεύματος μικροσκοπικών φυσαλίδων, που προκαλούν σημαντική μείωση της διαπερατότητας και εμφάνιση θολώματος στο διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό, που καλείται σπηλαίωση, οφείλεται στις σημαντικές διαφορές των υδροστατικών πιέσεων του ρέοντος υγρού στα διάφορα σημεία του σωλήνα. Με την κατάλληλη εκλογή της ταχύτητας του ρευστού εξασφαλίζεται ιδανική τυρβώδης ροή και αποφεύγεται η έντονη σπηλαίωση. Για να μπορούν να μελετηθούν όσο το δυνατόν ταχύτερες αντιδράσεις, το σημείο παρατηρήσεως πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο θάλαμο αναμίξεως. Ο

χρόνος πού μεσολαβεί μεταξύ ανάμιξης και παρατήρησης ονομάζεται νεκρός χρόνος. Ο νεκρός χρόνος είναι χαρακτηριστικό ποιότητας του συστήματος ανάμιξης και μπορεί να μετρηθεί με την εκτέλεση ταχύτατων αντιδράσεων. Στο σχήμα 5.2 φαίνεται το λειτουργικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου αναχαιτιζόμενης ροής που χρησιμοποιήθηκε στις εφαρμογές που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία. Σε αυτό διακρίνονται οι σύριγγες πληρώσεως των διαλυμάτων, οι σύριγγες προώθησης, η σύριγγα αναχαίτισης ρυθμιζόμενου όγκου, ώστε να είναι δυνατή η ρύθμιση του όγκου των αντιδραστηρίων που αναμιγνύονται κάθε φορά, το σύστημα δημιουργίας του σήματος σκανδαλισμού για τη σύγχρονη έναρξη καταγραφής του σήματος (απορρόφηση) στον σκληρό δίσκο του υπολογιστή αμέσως μετά την αναχαίτιση της ροής και το σύστημα συλλογής δεδομένων με τον ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (CCD).



Σχήμα 5.2. Πειραματική διάταξη αναχαίτισης της ροής με ανιχνευτή σύζευξης φορτίου

5.2.Ανιχνευτής CCD

Η παρατηρηση των περισσοτέρων αντιδράσεων που μελετήθηκαν και μια από τις πρωτοτυπίες της παρούσας διατριβής, είναι η συνδυασμένη χρήση μιας διάταξης αναχαίτισης της ροής με ένα ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (Charge Coupled Device, CCD). Ο ανιχνευτής CCD ανήκει στη γενικότερη κατηγορία των συσκευών μεταφοράς ηλεκτρικού φορτίου. Οι συσκευές μεταφοράς ηλεκτρικού φορτίου (Charge Treansfer Device Detectors, CTD) συμπεριλαμβάνουν δύο παρόμοια, ολοκληρωμένα κυκλώματα: τη συσκευή σύζευξης φορτίου, ή CCD και τη συσκευή εγχύσεως φορτίου (Charge Injection Device, CID) [107]. Αυτές οι συσκευές έχουν βρει εφαρμογή σε πολλά πεδία της φυσικής, της ρομποτικής, της αστρονομίας και της χημείας [108-110]. Η μεγαλύτερη εφαρμογή τους είναι η κατασκευή οπτικών ανιχνευτών (Video, οπτικά 0τηλεσκόπια, δορυφόροι, ψηφιακές φωτογραφικές μηχανές κ.ά.). Η υψηλή ευαισθησία των ανιχνευτών CCD με αποτέλεσμα την ανάλυση σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και ο μικρός χρόνος συλλογής των φασματικών δεδομένων τους κάνει ιδανικές συσκευές για την παρατήρηση ταχειών αντιδράσεων [111-113]. Σε ένα φασματοφωτόμετρο CCD, το φως συλλέγεται με μια κατάλληλη οπτική διάταξη, αναλύεται και προσπίπτει σε ένα ανιχνευτή CCD. Πριν την πρόσπτωση του φωτός ο ανιχνευτής αποφορτίζεται και τα προσπτώμενα φωτόνια απορροφούνται και μετατρέπονται σε μια σειρά ηλεκτρονίων. Κατόπιν, εξάγεται ένα ηλεκτρικό, αναλογικό σήμα αποτελούμενο από μια σειρά από τιμές ηλεκτρικού φορτίου, ανάλογου με την πρόσπτωση του φωτός στο κάθε εικονοστοιχείο του ανιχνευτή, στο κάθε μήκος κύματος της παρατηρούμενης φασματικής περιοχής [114, 115].

<u>Πηγές θορύβου σε ένα ανιχνευτή CCD</u> Τέσσερις πηγές θορύβου σχετίζονται με ένα ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (CCD): 1) Ο θόρυβος ανάγνωσης, 2) Ο σκοτεινός θόρυβος, ο οποίος προκαλείται από την φόρτιση των εικονοστοιχείων που οφείλεται σε αιτίες διαφορετικές από αυτές των διεσπαρμένων φωτοηλεκτρονίων, 3) Οι τυχαίοι θόρυβοι, οι οποίοι παράγονται από την τυχαία κίνηση μεμονωμένων ηλεκτρικών φορτίων (συνήθως e^-) [116] και 4) Οι θόρυβοι κατασκευαστικής προελεύσεως, που δημιουργούνται εξαιτίας της διακύμανσης του σήματος ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε εικονοστοιχείου. Το μέγεθος του κάθε θορύβου μπορεί να διαφέρει από ανιχνευτή σε ανιχνευτή. Συνήθως η κύρια πηγή θορύβου είναι ο τυχαίος θόρυβος, ο οποίος είναι ανάλογος με την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των φωτονίων και για αυτό ο λόγος

σήματος προς θόρυβο αυξάνεται γραμμικά με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου συσσώρευσης φορτίου, ή χρόνου έκθεσης του ανιχνευτή στη πηγή φωτός [117].

6.Λογισμικό Επεξεργασίας Δεδομένων

6.1.MATLAB / m-Αρχεία

Το MATLAB, ακρωνύμιο των λέξεων MATrix LABoratory, είναι ένα προϊόν της εταιρίας The MathWorks, Inc. of Natick, MA. Είναι ένα υπολογιστικό περιβάλλον ειδικά προσαρμοσμένο για προβλήματα άλγεβρας πινάκων. Το MATLAB επιτρέπει στο χρήστη να κάνει υπολογισμούς πινάκων με γλώσσα εντολών που μοιάζει πολύ με την τυπική σημειογραφία της γραμμικής άλγεβρας [118]. Τα πολύ καλά γραφικά, το ευέλικτο περιβάλλον, η εύκολη γλώσσα προγραμματισμού, η ταχύτητα των υπολογισμών και ο μεγάλος αριθμός από ενσωματωμένες στατιστικές και αλγεβρικές ρουτίνες, έχουν συντελέσει ώστε το MATLAB να είναι το πιο δημοφιλές περιβάλλον εργασίας για επιστήμονες που ασχολούνται με τη χημειομετρία, με την επιστήμη των μετρήσεων και της ανάλυσης γενικώτερα [119]. Στην παρούσα εργασία, σχεδόν όλος ο όγκος της μαθηματικής επεξεργασίας και ο σχεδιασμός των περισσοτέρων γραφικών έγινε σε αυτό το περιβάλλον.

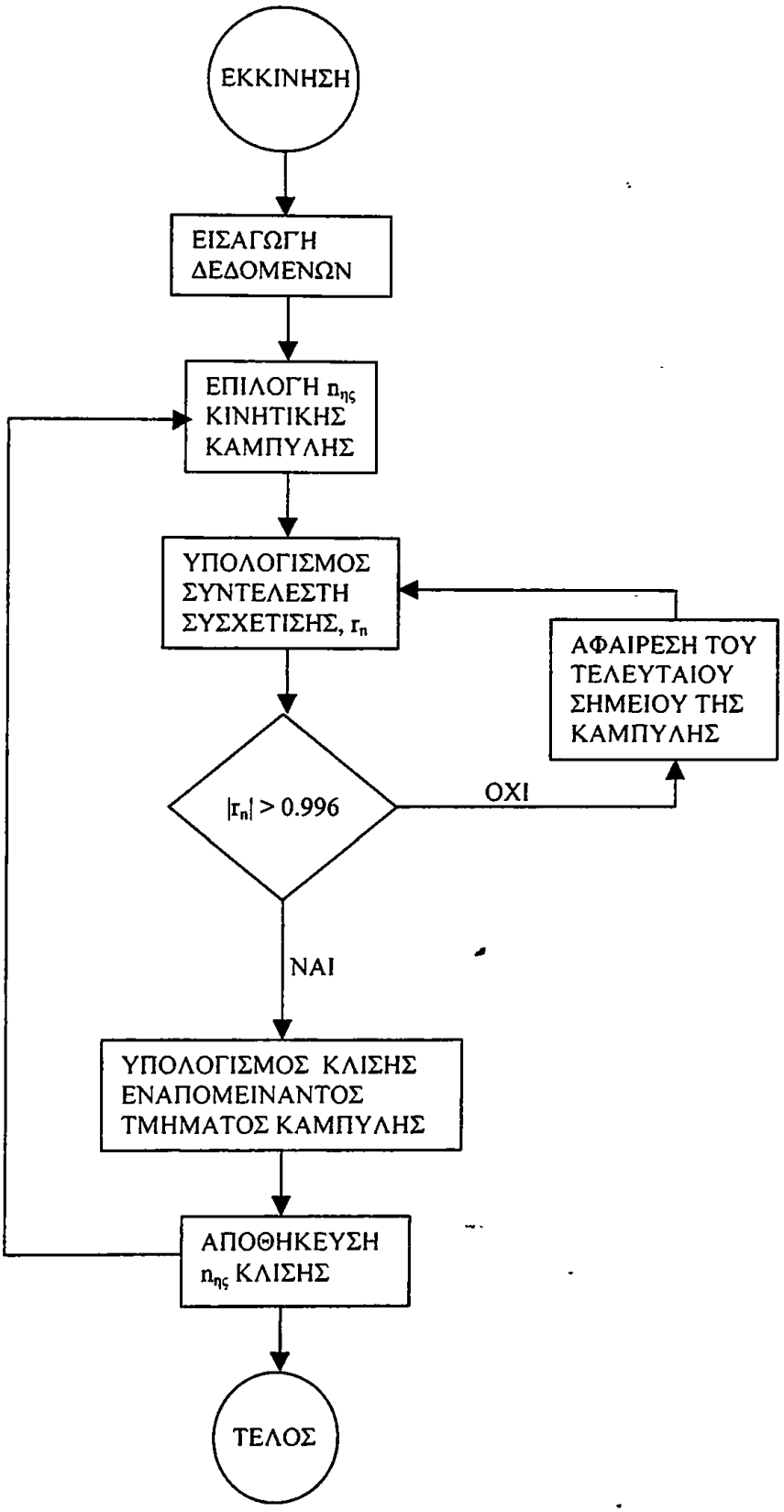
6.2.Πακέτο Εργαλείων PLS 2.0

Το πακέτο εργαλείων PLS 2.0 είναι μια συλλογή από σημαντικούς εξελιγμένους χημειομετρικούς αλγόριθμους για χρήση με το υπολογιστικό περιβάλλον MATLAB. Περιέχει απαραίτητα εργαλεία για την εξερεύνηση αναλυτικών δεδομένων και για την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης στην αναλυτική χημεία. Μερικοί από τους αλγόριθμους αναφέρονται σε τεχνικές όπως οι PCA, PARAFAC και TLD, γραμμικές μεθόδους βαθμονόμησης όπως οι PLS, PCR, RR και CR, τεχνικές βαθμονόμησης οργάνων και προτυποποίησης αναλυτικών μεθόδων.

6.3.Αλγόριθμος Υπολογισμού των Αρχικών Κλίσεων Κινητικών Καμπυλών

Ο υπολογισμός των αρχικών κλίσεων των κινητικών καμπυλών από ένα σύνολο δεδομένων χρονικής σειράς, είναι εφικτός όταν ο αριθμός των καμπυλών αυτών είναι λίγες δεκάδες. Τότε, χρησιμοποιώντας το λογισμικό της διάταξης αναχαίτισης της ροής ή το λογισμικό επεξεργασίας σήματος του MATLAB, οι αρχικές κλίσεις μπορούν να υπολογιστούν χωριστά κάθε φορά για μια κινητική καμπύλη και από αυτές να

κατασκευάστεί ο πίνακας δεδομένων Χ. Σε περίπτωση που ο αριθμός των κινητικών καμπυλών είναι υπερβολικά μεγάλος (της τάξης του 10^2 ή ακόμα και 10^3) τότε ο υπολογισμός των αρχικών κλίσεων με αυτό τον τρόπο είναι πολύ χρονοβόρος και πρακτικά αδύνατος. Για αυτές τις περιπτώσεις, σχεδιάστηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Π.Ι. ένα m-αρχείο, στο οποίο εισάγεται ολόκληρο το σύνολο των πειραματικών δεδομένων, υπολογίζονται οι αρχικές κλίσεις όλων των κινητικών καμπυλών και σε μερικά δευτερόλεπτα εξάγεται κατευθείαν ο πίνακας δεδομένων Χ. Ειδικότερα, αφού εισαχθούν τα δεδομένα υπό μορφή ASCII αρχείων, ο αλγόριθμος επεξεργάζεται κάθε κινητική καμπύλη κάθε φορά χωριστά, με τον ακόλουθο τρόπο: 1) Υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης r όλων των σημείων της καμπύλης, 2) Συγκρίνεται με μία προκαθορισμένη τιμή (εδώ r = |0,996|), 3) Αν η ευρεθείσα τιμή του r είναι μεγαλύτερη, τότε η διαδικασία τερματίζεται, υπολογίζεται η κλίση της καμπύλης, αποθηκεύεται και ο αλγόριθμος προχωράει στην επόμενη κινητική καμπύλη, διαφορετικά, 4) Αν η τιμή είναι μικρότερη από την προκαθορισμένη τιμή του r απομακρύνεται το τελευταίο σημείο της κινητικής καμπύλης και επαναλαμβάνονται τα στάδια 1-3. Ο αλγόριθμος δίνεται και υπό μορφή αρχείου.m στο παράρτημα.



Σχήμα 6.1.Υπολογισμός των αρχικών κλίσεων κινητικών καμπυλών

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σημείωση Οι παραπομπές που αναγράφονται στην παρούσα διατριβή δίνονται χωριστά για το θεωρητικό μέρος και για κάθε κεφάλαιο του πειραματικού μέρους. Έχουν τη γενική μορφή: Συγγραφέας 1, Συγγραφέας 2...., Περιοδικό, Έτος, Τόμος, Σελίδα. Για παραπομπές βιβλίων η μορφή έχει ως ακολούθως: Συγγραφέας 1, Συγγραφέας 2...., "Τίτλος Βιβλίου", Σειρά, Εκδοτικός Οίκος, Τόπος Έκδοσης, Έτος.

1. P.S.Shoenfeld, J.R.De Voe, Analytical Chemistry, 1976, 48, 403R.
2. L.A.Currie, J.J.Filiben, J.R.De Voe, Analytical Chemistry, 1972, 44, 497R.
3. M.J.Adams, "Chemometrics In Analytical Spectroscopy", RSC Analytical Spectroscopy Monographs, Wolverhampton, UK, 1995.
4. R. Kramer, "Chemometric Techniques For Quantitative Analysis", Marcel Dekker, New York, 1998
5. Σ.Ιουλίδη, "Γραμμική Άλγεβρα", Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη, 1997.
6. G.Strang, "Γραμμική Άλγεβρα Και Εφαρμογές", Παν.Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1996.
7. http://www.chem.uoa.gr/cgi-bin/Vocabulary/Search.exe, June, 2000.
8. D.Edelen, A.Kydoniefs, "Εφαρμοσμένη Γραμμική Άλγεβρα", University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1993.
9. B.Wise, N.Gallagher, "PLS_2.0 Toolbox", Eigenvector Research Inc., USA, 1998.
10. H.Rohner, N.Collier, E.Hosten, Anal. Chim. Acta, 1995, 314, 219.
11. P.D.Wentzell, M.I.Karayannis, S.R.Crouch, Anal. Chim. Acta, 1989, 224, 263.
12. B.R.Kowalski, "Chemometrics: Theory And Application", Acs, Washington D.C., 1977.
13. Y.Z.Liang,Y.L.Xie, R.Q.Yu, Anal. Chim. Acta, 1984, 222, 347.
14. J.H.Kalivas, N.Roberts, J.M.Sutter, Anal. Chem., 1989, 61, 2024.
15. R.M.Wallace, Journal Of Physical Chemistry, 1960, 64, 899.
16. J.M.Pena, Anal. Chim. Acta, 1991, 244, 81.
17. S.Ventura, M.Silva, D.Perez-Bendito, C.Hervas, Anal. Chem., 1995, 67, 4458.
18. H.J.Kisner, C.W.Brown, G.J.Kavarnos, Anal. Chem., 1983, 55, 1703.
19. M.Margoshes, S.D.Rasberry, Anal. Chem., 1969, 41, 1163.
20. S.N.Deming, S.L.Morgan, Clin. Chem., 1979, 25, 840.
21. Y.R.Tahboub, H.L.Pardue, Anal. Chim. Acta, 1985, 173, 43.
22. S.C.Rutan, S.D.Brown, Anal. Chim. Acta, 1985, 167, 23.
23. C.A.Corcoran, S.C.Rutan, Anal. Chem., 1988, 60, 1146

24. S.D.Osborne, R.B.Jordan, R.Kunnemeyer, Analyst, 1997, 122, 1531.
25. P.J.Brown, C.H.Spiegelman, M.C.Denham, Phil. Trans. R. Soc. Lond., 1991, 337, 311.
26. C.H.Spiegelman, M.J.Mcshane, M.J.Goetz, M.Motamedi, Q.L.Yue, G.L.Cote, Anal. Chem., 1998, 70, 35.
27. D.Jouan-Rimbaud, B.Walczak, D.L.Massart, I.R.Last, K.A.Prebble, Anal. Chim. Acta, 1995, 304, 285.
28. H.Martens, T.Naes, "Multivariate Calibration", Wiley, New York, 1989.
29. M.Otto, "Chemometrics", Wiley-Vch, Freiberg, Germany, 1999.
30. P.Geladi, B.R.Kowalski, Anal. Chim. Acta, 1986, 185, 19.
31. P.D.Wentzell, M.I.Karayannis, S.R.Crouch, Anal. Chim. Acta, 1989, 224, 263.
32. J.J.Baeza, G.Ramos, F.Pla, R.Molina, Analyst, 1990, 115, 721.
33. B.K.Lavine, Anal. Chem., 1998, 70, 209R.
34. S.D.Brown, R.S.Bear, Jr., T.B.Blank, Anal. Chem., 1992, 64, 22R.
35. B.R.Kowalski, Analytical Chemistry, 1980, 52, 112R.
36. K.R.Beebe, B.R.Kowalski, Anal. Chem., 1987, 59, 1007A.
37. D.Livingstone, "Data Analysis For Chemists", Oxford Science Publication, New York, 1995.
38. I.H.I.Habib, "Computer-Assisted Spectrophotometric Analysis of Some Industrially Important Chemical Mixtures", Ph.D. Thesis, 1997.
39. H.Mark, Anal. Chem., 1986, 58, 2814.
40. E. Morgan, "Chemometrics: Experimental Design", John Wiley & Sons, London, England, 1991.
41. V.Centner, D.-L..Massart, O.E.De Noord, S. De Jong, B.M.Vandeginste, C.Sterna, Anal. Chem., 1996, 68, 3851.
42. D.M.Haaland, E.V.Thomas, Anal. Chem., 1988, 60, 1193.
43. E.V.Thomas, D.M.Haaland, Anal. Chem., 1990, 62, 1091.
44. H.C.Goicoechea, A.C.Olivieri, A.M.Pena, Anal. Chim. Acta, 1999, 384, 95.
45. J.Sustek, Anal. Chem., 1974, 46, 1676.
46. R.Bro, 'Multi-way Analysis in the Food Industry', Ph.D. Thesis, 1998.
47. D.Wienke, T.Vijn, L.Buydens, Anal. Chem., 1994, 66, 841.
48. F.Navarro-Villoslada, L.V.Peraz-Arribas, M.E.Leon-Gonzalez, L.M.Polo-Diez, Anal. Chim. Acta, 1995, 313, 93.
49. T.Isaksson, T. Naes, Appl. Spectrosc., 1990, 44, 1152.

50. C.W.Brown, P.F.Lynch, R.J.Obremski, D.S.Lavery, Anal. Chem., 1982, 54, 1472.
51. M.L.Carreto, L.Lunar, S.Rubio, D.Perez-Bendito, Anal. Chim. Acta, 1997, 349, 33.
52. D.Juan-Rimbaud, D.-L..Massart, R.Leardi, O.E.De Noord, Anal. Chem., 1995, 67, 4295.
53. C.Jochum, P.Jochum, B.R.Kowalski, Anal. Chem., 1982, 53, 85.
54. S.D.Frans, J.M.Harris, Anal. Chem., 1985, 57, 2680.
55. L.L.Juhl, J.H.Kalivas, Anal. Chim. Acta, 1988, 207, 125.
56. J.H.Kalivas, P.Lang, J. Chemometrics, 1989, 3, 443.
57. J.C.Stenberg, H.S.Stillo, R.H.Schwenderman, Anal. Chem., 1960, 32, 84.
58. M.Otto, W.Wegscheider, Anal. Chem., 1985, 57, 63.
59. C.W.Brown , J.Chemom., 1992, 6, 151-161.
60. A.S.Bangalore, R.E.Shaffer, G.W.Small, Anal. Chem., 1996, 68, 4200.
61. J.H.Holland, Scientific American, 1992, 267, 66.
62. C.B.Lucasius, G.Kateman, Chemom. Intell. Lab. Syst., 1993, 19, 1.
63. C.B.Lucasius, G.Kateman, Chemom. Intell. Lab. Syst., 1994, 25, 99.
64. M.K.Antoon, J.L.Koenig, Appl. Spectrosc., 1977, 31, 518.
65. D.M.Haaland, R.G.Easterling, Appl. Spectrosc., 1980, 34, 539.
66. C.W.Brown, Spectroscopy, 1086, 1, 32.
67. I.Y.Bershtein, Fresenius Z. Anal. Chem., 1988, 332, 227.
68. M.A.Maris, C.W.Brown, D.S.Lavery, Anal. Chem., 1983, 55, 1694.
69. Y.Liang, O.M.Kvalheim, R.Manne, Chemom. Intell. Lab. Syst., 1993, 18, 235.
70. M.Blanco, D.Serrano, J.L.Bernal, Talanta, 1999, 50, 527.
71. H.N.A.Hassan, M.E.M.Hassouna, I.H.I.Habib, Talanta, 1998, 46, 1195.
72. J.Getino, M.C.Horrillo, J.Gutiérrez, L.Arés, J.I.Robla, C.García, I.Sayago, Sensors and Actuators B: Chemical, 1997, 43, 200.
73. W.F.Long, D.H.Burns, Analytica Chimica Acta, 1997, 348, 553.
74. S.Wold, K.Esbensen, P.Geladi, Chemom. and Intell. Lab. Syst., 1987, 2, 37.
75. W.Wu, D.L.Massart, S.de Jong, Chemom. Intell. Lab. Syst., 1997, 36, 165.
76. R.Pribic, Analytical Biochemistry, 1994, 223, 26.
77. N.M.Faber, M.J.Meinders, P.Geladi, M.Sjöström, L.M.C.Buydens, G.Kateman, Analytica Chimica Acta, 1995, 304, 257.
78. N.M.Faber, M.J.Meinders, P.Geladi, M.Sjöström, L.M.C.Buydens, G.Kateman, Analytica Chimica Acta, 1995, 304, 273.
79. D.H.Gay, W.H.Ray, Chemical Engineering Science, 1995, 50, 1519.

80. T.Naes, H.Martens, J. Chemometrics, 1988, 2.
81. J.Havel, F.Cuesta, L.Jancar, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1993, 49, 189.
82. A.Espinosa-Mansilla, F.Salinas, I.De Orbe Paya, Anal. Chim. Acta, 1995, 313, 103.
83. F.Blasco, M.J.Medina-Hernandez, S.Sagrado, F.M.Fernandez, Analyst, 1997, 122, 639
84. D.Jouan-Rimbaud, B.Walczak, R.J.Poppi, O.E.De Noord, D.L.Massart, Anal. Chem., 1997, 69, 4317.
85. H.C.Goicoechea, A.C.Olivieri, Anal. Chem., 1999, 71, 4361.
86. T.Khayamian, A.A.Ensafi, B.Hemmateenejad, Talanta, 1999, 49, 587.
87. J.Havel, F.Jimenez, R.D.Bautista, J.J.A.Leon, Analyst, 1993, 118, 1355.
88. D.M.Haaland, E.V.Thomas, Anal. Chem., 1988, 60, 1202.
89. P.Geladi, B.R.Kowalski, Anal. Chim. Acta, 1986, 185, 19
90. P.Geladi, B.R.Kowalski, Anal. Chim. Acta, 1986, 185, 1.
91. I.E.Frank, J.H.Kalivas, B.R.Kowalski, Anal. Chem., 1983, 55, 1800.
92. W.Lindberg, J.A.Persson, S.Wold, Anal. Chem., 1983, 55, 643
93. T.Kappes, G.Lopez-Gueto, J.F.Rodriguez-Medina, C.Ubide, Analyst, 1998, 123, 2071.
94. L.A.Currie, Anal. Chem., 1968, 40, 586.
95. K.Faber, B.R.Kowalski, Fresenius J.Anal.Chem., 1997, 357, 789.
96. J.C.Sternberg, H.S.Stillo, R.H.Schwendeman, Anal. Chem., 1960, 32, 84.
97. M.P.Aguilar-Caballos, A.Gomez-Hens, D.Perez-Bendito, Anal. Chim. Acta, 1997, 354, 173.
98. I.A.Pettas, S.I.Lafis, M.I.Karayannis, Anal. Chim. Acta, 1998, 376, 331.
99. B.M.Quencer, S.R.Crouch, Anal. Chem., 1994, 66, 458.
100. J.Saurina, S.Hernandez-Cassou, R.Tauler, Anal. Chem., 1997, 69, 2329.
101. A.N.Diaz, J.A.G.Garcia, Anal. Chem., 1994, 66, 988.
102. M.I.Karayannis, D.I.Farasoglou, Analyst, 1987, 112, 767.
103. C.N.Konidari, M.I.Karayannis, Anal. Chim. Acta, 1989, 224, 199.
104. M.I.Karayannis, Talanta, 1976, 23, 27.
105. Δ.Ι.Φαράσογλου, Μ.Ι.Καραγιάννης, Chimica Chronika, New Series, 1982, 11, 281.
106. Κ.Η.Ευσταθίου, Μ.Α.Κουππάρης, Δ.Σ.Παπασταθόπουλος, Α.Κ.Καλοκαιρινός, "Ειδικά Θέματα Αναλυτικής Χημείας", Αθήνα, 1989.

107. P.M.Epperson, J.V.Sweeedler, R.B.Bilhorn, G.R.Sims, M.B.Denton, Anal. Chem., 1988, 60, 327A.

108. S.Hanna, A.M.E.Baker, A.H.Windle, Polymer, 1998, 39, 2409.

109. L.Songcan, M.A.Neifeld, Optics Communications, 2000, 178, 283.

110. I.B.Brenner, S.Vats, A.T.Zander, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1999, 14, 1231.

111. Y.Lereah, I.Zarudi, Journal of Crystal Growth, 1999, 198-199, Part 1, 62.

112. J.B.P.Soares, Polymer Reaction Engineering, 1998, 6, 225.

113. C.T.Williams, A.A.Tolia, M.J.Weaver, C.G.Takoudis, Chemical Engineering Science, 1996, 51, 1673.

114. R.Y.Wang, J.A.Jarratt, P.J.Keay, J.J.Hawkes, W.T.Coakley, Talanta, 2000, 52, 129.

115. D.A.Skoog, F.J.Holler, T.A.Nieman, "Principles Of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, Usa, 5Th Edition, 1998.

116. http://www.oceanoptics.com, March, 1999.

117. Μ. Ι. Καραγιάννης, "Χημική Οργανολογία", ΕΠΤΑΛΟΦΟΝ Α.Β.Ε.Ε., Αθήνα, 1980, σελ.31,137.

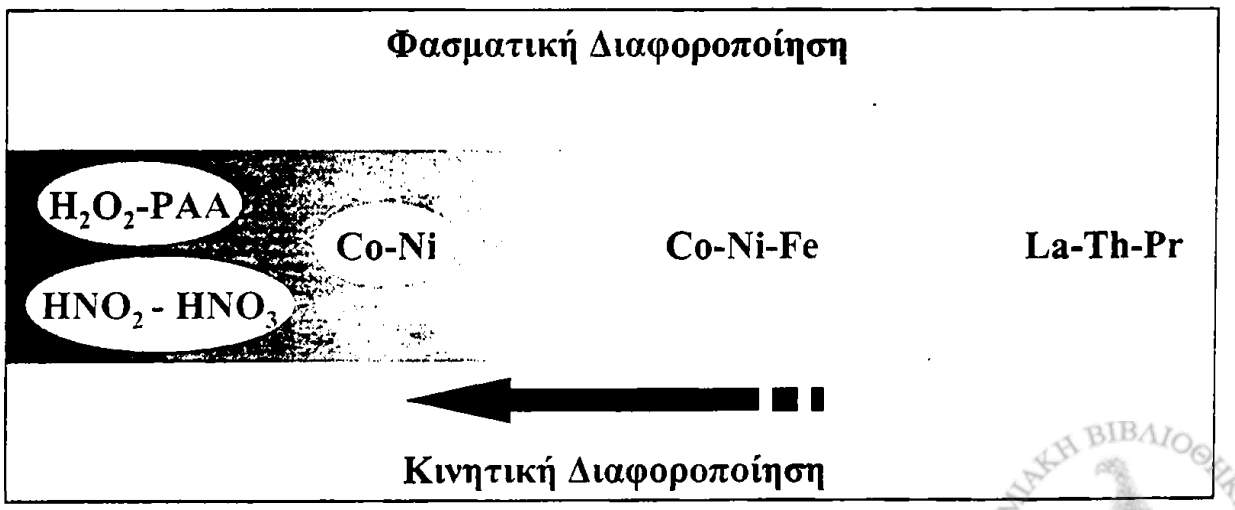
118. http://www.mathworks.com, July, 2000.

119. A.Constantinides, N.Mostoufi, "Numerical Methods for Chemical Engineers with MATLAB Applications", Prentice Hall, 1998.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. Εφαρμογές

Η επιλογή των χημικών συστημάτων έγινε με κριτήριο τις χημικές ιδιότητες που διαφοροποιούν τα αναλυόμενα συστατικά. Οι ιδιότητες αυτές είναι η διαφορά των φασμάτων των προϊόντων αντίδρασής τους με διάφορους οργανικούς υποκαταστάτες, και η διαφορά των ταχυτήτων των αντιδράσεών τους (Σχήμα 7.1). Οι αναπτυσσόμενες αναλυτικές μέθοδοι που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή αναγνωρίζουν και εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες αυτές όταν βρίσκονται σε πολύ μικρά ποσά και σε οποιαδήποτε αναλογία. Έτσι, στο κεφάλαιο 7.2 ο ταυτόχρονος προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξεικού οξέος βασίστηκε εξ'ολοκλήρου στις κινητικές διαφοροποιήσεις των αντιδράσεών τους με διφαινυλαμίνη (DPA), αφού καταλήγουν στο ίδιο έγχωμο προϊόν. Στο κεφ. 7.3 παρουσιάζεται ο κινητικός προσδιορισμός των νιτρωδών παρουσία νιτρικών ανιόντων, τα οποία διαχωρίζονται επιτυχώς. Τα νιτρικά ανιόντα δρουν παρεμποδιστικά και δεν προσδιορίζονται ποσοτικά, αλλά απλώς απομακρύνονται με μαθηματικό και όχι με χημικό τρόπο. Στο κεφάλαιο 7.4 φαίνεται ότι τα φάσματα των συμπλόκων κοβαλτίου και νικελίου με το πορτοκαλί της ξυλενόλης έχουν πολύ μικρή διαφοροποίηση, ενώ οι ταχύτητες σχηματισμού τους είναι σαφώς διαφορετικές. Για αυτό, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των μετάλλων κοβάλτιο και νικέλιο που περιγράφεται εδώ στηρίζεται κυρίως στην διαφοροποίηση των ταχυτήτων σχηματισμού των συμπλόκων τους και λιγότερο στις απόλυτες τιμές



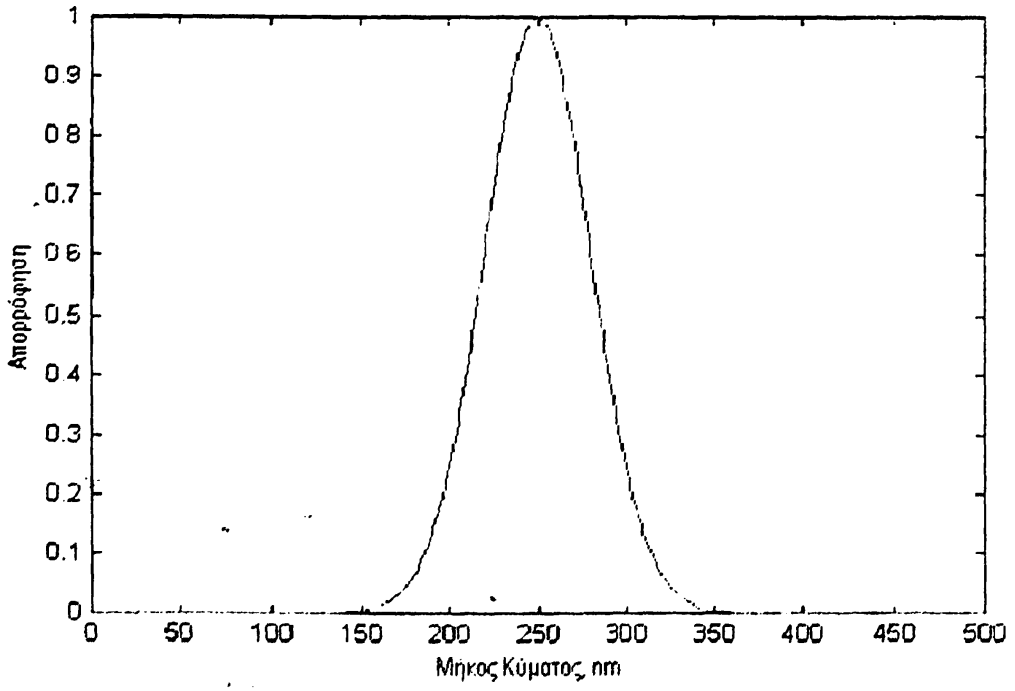
Σχήμα 7.1. Η επιλογή των χημικών συστημάτων με κριτήριο τις φασματικές και κινητικές διαφοροποιήσεις των αντιδράσεών τους

των απορροφήσεων. Στο κεφάλαιο 7.5, με την προσθήκη ενός ακόμη μετάλλου, ειδικότερα του σιδήρου, τα φάσματα των συμπλόκων διαφοροποιούνται συνολικά περισσότερο. Πάλι, όμως ο προσδιορισμός κοβαλτίου-νικελίου είναι κυρίως κινητικός, ενώ ο σίδηρος διαχωρίζεται τόσο κινητικά, όσο και φασματικά. Τέλος, στο κεφάλαιο 7.6 οι τρεις σπάνιες γαίες λανθάνιο, πρασεοδύμιο και θόριο αντιδρούν με το arsenazo-III και σχηματίζουν με την ίδια ταχύτητα τρία σύμπλοκα με λεπτές φασματικές διαφορές. Με τις εφαρμοζόμενες χημειομετρικές μεθόδους ποσοτικής ανάλυσης επιδιώχθηκε ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους με δεδομένα τις τιμές των απορροφήσεων των μιγμάτων τους σε πολλά μήκη κύματος. Αν και η μελέτη αυτή περιορίζεται στη φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους, μπορει να επεκταθεί στην εφαρμογή οποιουδήποτε τρόπου μέτρησης μιας χαρακτηριστικής ιδιότητας ενός αναλύτη, όπως ηλεκτροχημική, φθορισμός και χημειοφωταύγεια, φασματοσκοπία RAMAN, NMR, IR, οπτική ενεργότητα, αγωγιμότητα, σχήμα, ελαστικότητα, θερμότητα, σκληρότητα, χρώμα, γεύση, οσμή, ανακλαστική ικανότητα και άλλες. Η φασματοφωτομετρία επιλέχθηκε γιατί είναι τεχνική χαμηλού κόστους, ταχεία (για κινητικές μετρήσεις – ακόμα ταχύτερη), μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί για online εφαρμογές, παρέχει σχετικό βαθμό εκλεκτικότητας, το δείγμα μπορεί να μετρηθεί πολλές φορές χωρίς να καταστρέφεται, δεν απαιτείται μεγάλη κατανάλωση αντιδραστηρίων, οι πειραματικές συνθήκες δεν είναι επικίνδυνες για την υγεία, το μικρό μέγεθος των οργάνων επιτρέπει μετρήσεις *in-situ*, υπάρχει τεράστιος όγκος βιβλιογραφίας με άνεση επιλογής ενός μεγάλου αριθμού χημικών αντιδράσεων, χρωμοφόρων αντιδραστηρίων και οργάνων κατάλληλων για την κάθε περίπτωση, είναι μέθοδος ακριβής, σταθερή, με χαμηλό όριο ανίχνευσης και μπορεί εύκολα να συντηρηθεί.

7.1. Μελέτη των Κυριοτέρων Παραγόντων σε μια Πολυπαραμετρική Ανάλυση με την Προσομοίωση Τεχνητών Φασματοκινητικών Δεδομένων

Παραγωγή των Δεδομένων Προσομοίωσης

Τα φάσματα μιγμάτων δύο συστατικών προσομοιώθηκαν με τη χρησιμοποίηση κορυφών σχήματος Gauss. Το χημικό σύστημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για ταυτόχρονη ανάλυση είναι αυτό στο οποίο δύο ή περισσότερα συστατικά αντιδρούν με ένα κοινό αντιδραστήριο προς σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων. Οι προϋποθέσεις για μια τέτοια μελέτη είναι: 1) Οι αντιδράσεις να είναι 1ης τάξης ως προς τα παρατηρούμενα συστατικά (αν και αυτή η συνθήκη δεν είναι δεσμευτική για την εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων ποσοτικής ανάλυσης, παρόλα αυτά, προτιμήθηκε η κατασκευή τεχνητών δεδομένων που προσομοιάζουν τα πραγματικά, όπου επικρατούσαν συνθήκες πρώτης η ψευδοπρώτης τάξης) [1-3], 2) Να υπάρχει αθροιστικότητα των απορροφήσεων σε κάθε χρονική στιγμή και να ισχύει ο νόμος του Beer [4-6], 3) Ο θόρυβος που οφείλεται στη μέτρηση του χρόνου είναι αμελητέος σε σχέση με το θόρυβο μέτρησης της απορρόφησης [7]. Το κάθε συστατικό θεωρήθηκε ότι έχει μία μόνο μια κορυφή Gauss στη φασματική περιοχή με μέγιστη απορρόφηση 1 (Σχήμα 7.1.1). Τα φάσματα αποτελούνται από τιμές



Σχήμα 7.1.1. Τυπική κορυφή Gauss σε 500 συμβατικά μήκη κύματος με μέγιστη απορρόφηση 1

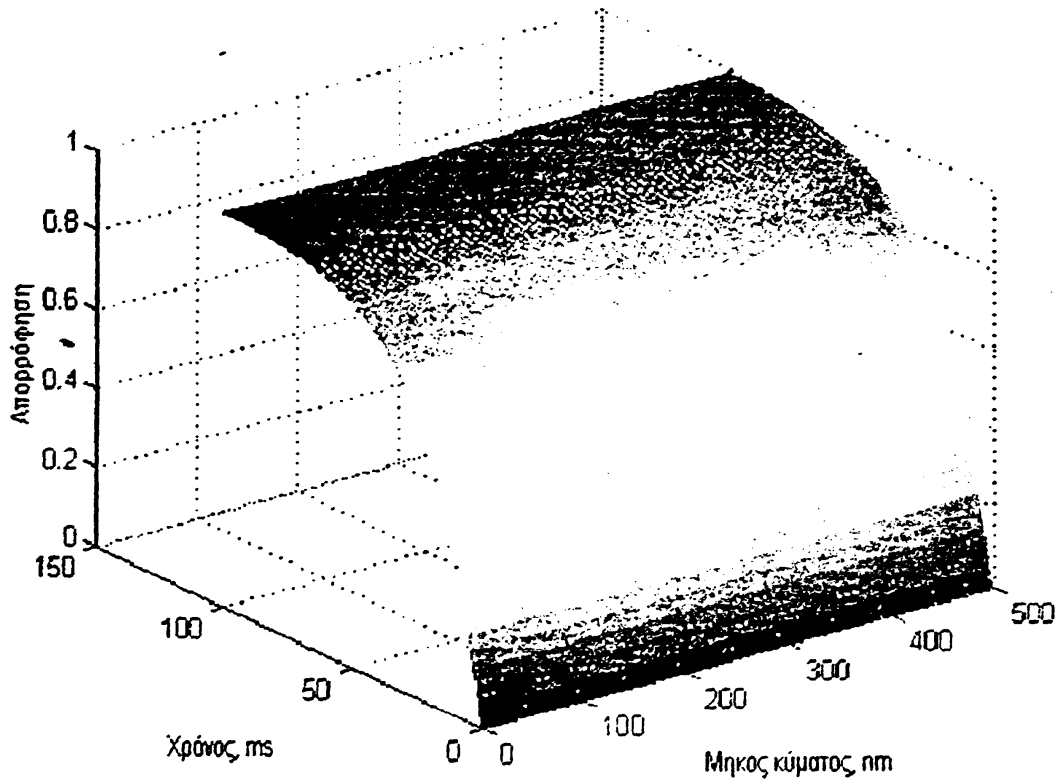
Πίνακας 1. Σύσταση των τεχνητών δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης

Δείγματα Βαθμονόμησης		Δείγματα Επικύρωσης	
Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 1	Συστατικό 2
0.1	1.0	0.1	0.7
0.5	0.7	0.2	0.0
1.0	1.2	0.5	0.2
1.5	0.1	0.7	0.1
1.2	0.5	1.0	0.2
0.2	0.2	1.2	0.0
		1.5	3.0
		0.7	0.0
		0.0	0.2
		0.0	0.5
		2.5	4.0
		0.0	1.0
		0.0	1.2
		0.2	1.5
		0.2	0.0
		3.0	0.1

Τυχόν αποκλίσεις από τις αληθείς τιμές των συγκεντρώσεων, που πιθανό να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα, θεωρούνται αμελητέες, δηλαδή θεωρείται ότι οι συγκεντρώσεις των προτύπων δειγμάτων και η μέθοδος αναφοράς δίνουν τις αληθείς τιμές των αναλυτών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τον υπολογισμό του μέσου απόλυτου σχετικού σφάλματος (AARE, Average Absolute Relative Error) (Σχήματα 7.1.8, 7.1.9):

$$\mathrm{AARE}_j = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left| \frac{\hat{c}_{ij} - c_{ij}}{\hat{c}_{ij}} \right| \times 100}{N} \qquad (7.1.2)$$

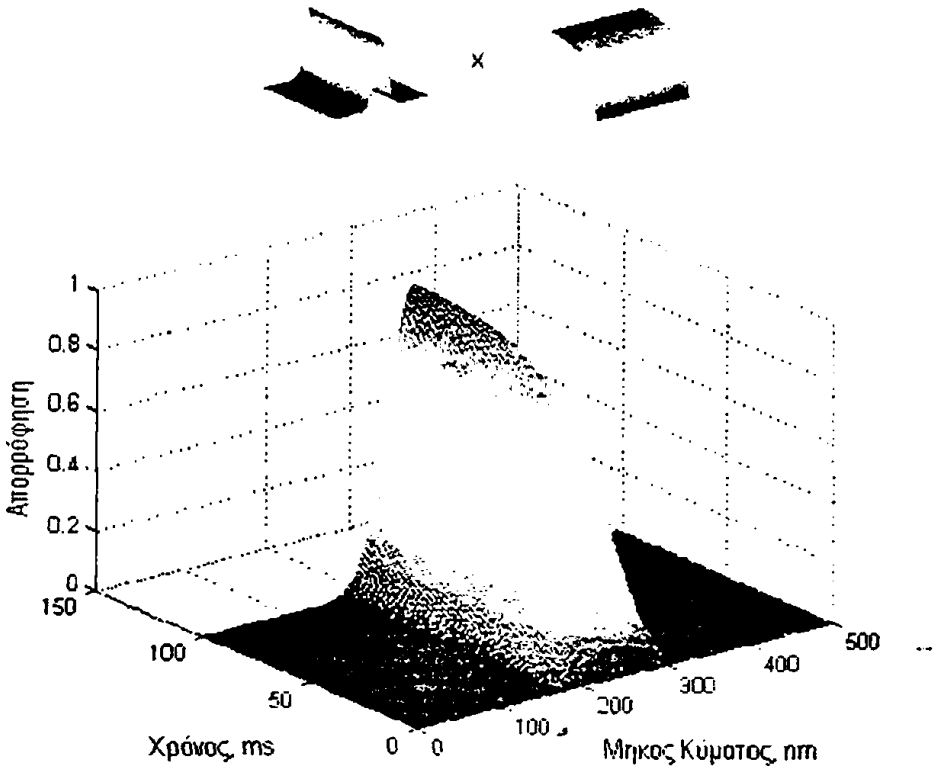
όπου $_{ij}$ είναι η υπολογιζόμενη και c_{ij} η πραγματική τιμή της συγκέντρωσης του συστατικού i στο μίγμα j και N ο αριθμός των μιγμάτων. Ο πρώτος παράγοντας που εξετάστηκε ήταν η σχετική απόσταση των δυο κορυφών. Κατασκευάστηκαν 8 μοντέλα



Σχήμα 7.1.4. 500 κινητικές καμπύλες τοποθετημένες ανά ένα μήκος κύματος

βαθμονόμησης με τη μέθοδο PLS για αποστάσεις των δυο κορυφών από 200 nm μέχρι 0 nm (200, 100, 50, 5, 2, 1, 0 nm, Σχήμα 7.1.10). Κατασκευάστηκαν επίσης πέντε μοντέλα βαθμονόμησης για διαφορετικό ημιεύρος των δύο φασματικών κορυφών (250-50, 100-10, 50-1, 10-7, 2-1 nm, Σχήμα 7.1.11). Τέλος, κατασκευάστηκαν 5 μοντέλα βαθμονόμησης με λόγο σταθερών ταχυτήτων k1:k2 (τα k λαμβάνονται από την 7.1.1 εξίσωση) για λόγους 10:1, 5:1, 2:1, 1.5:1, 1:1 nm (Σχήμα 7.1.12). Όλα τα παραπάνω μοντέλα συνδυάστηκαν με την συμπερίληψη και των τριών παραγόντων, με αποτέλεσμα την κατασκευή συνολικά 8 x 5 x 5 = 200 μοντέλων βαθμονόμησης. Η κατασκευή των μοντέλων και η αξιολόγησή τους έγινε σε περιβάλλον MATLAB. Τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα για τα φάσματα χωρίς θόρυβο. Οι ευρισκόμενες τιμές του σφάλματος ήταν της τάξης του 10^{-18} και ίσες με το ψηφιακό σφάλμα του υπολογιστή. Αυτό συμβαίνει

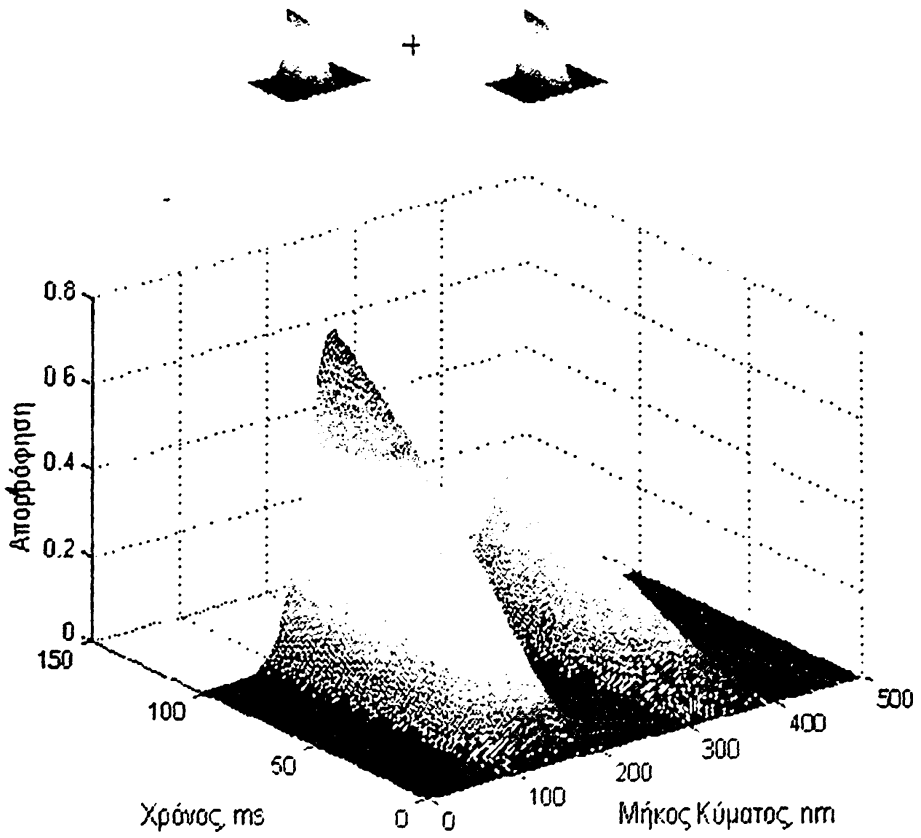
γιατί η τεχνική στην περίπτωση που οι διαφοροποιήσεις των φασμάτων οφείλονται μόνο στο κάθε συστατικό, έχει τέλεια λύση. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχει καμία άλλη πηγή διακύμανσης, όπως διαφορετική γραμμή βάσης, τυχαία διακύμανση των θορύβων, πιθανή ύπαρξη μη γραμμικότητας, και τυχόν παρεμποδίσεις. Σε πραγματικές όμως συνθήκες, οι παραπάνω παράγοντες είναι πάντα παρόντες σε οποιοδήποτε συνδυασμό.



Σχήμα 7.1.5. Γραφική απεικόνιση του γινομένου Hadamard δύο πινάκων

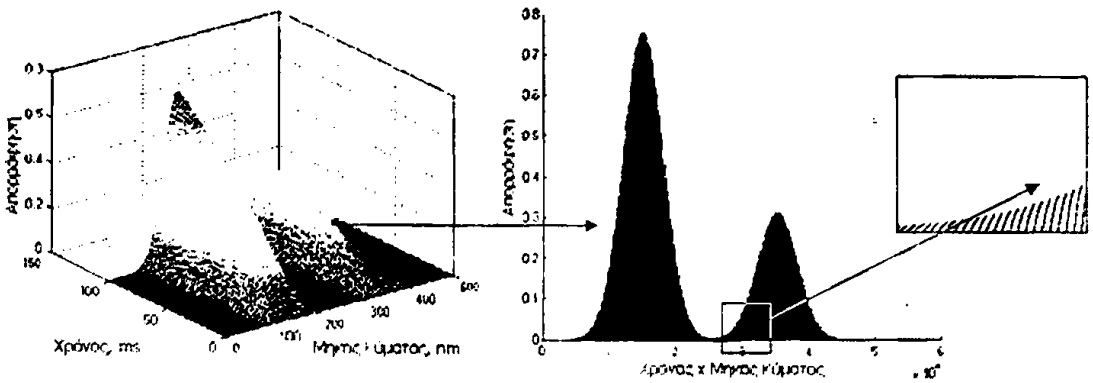
Σε μια τέτοια περίπτωση, μια βαθμονόμηση με δεδομένα όπως τα παραπάνω δεν είναι αντιπροσωπευτική των πραγματικών σχέσεων που διέπουν τα μελετούμενα χαρακτηριστικά. Για αυτό, στα παραπάνω συνθετικά δεδομένα προστέθηκαν: 1) γραμμή βάσης κυμαινόμενη τυχαία μεταξύ $-2x10^{-3}$ και $2x10^{-3}$ μονάδες απορρόφησης με τυχαία κλίση από -0.02 έως 0.02, 2) θόρυβος κατανομής Gauss με τυπική απόκλιση 0.003 και μέσο όρο 0 και 3) θόρυβος κατά τη μέτρηση των συγκεντρώσεων. Η προστιθέμενη γραμμή βάσης προσομοιώνει την ολίσθηση του σήματος (drift) του φασματοφωτομέτρου με την πάροδο του χρόνου και η τάξη μεγέθους που επιλέχθηκε είναι αντιπροσωπευτική για την χρησιμοποιούμενη οργανολογία με ανιχνευτή CCD. Ο θόρυβος τυχαίας κατανομής εξομοιώνει τους ηλεκτρικούς θορύβους που μπορεί να παράγονται από ένα ηλεκτρικό κύκλωμα, όπως αυτό του χρησιμοποιούμενου φασματοφωτομέτρου και

κυμαίνεται, σχετικά με παρόμοιες πειραματικές διατάξεις, σε αρκετά χαμηλά επίπεδα [8,



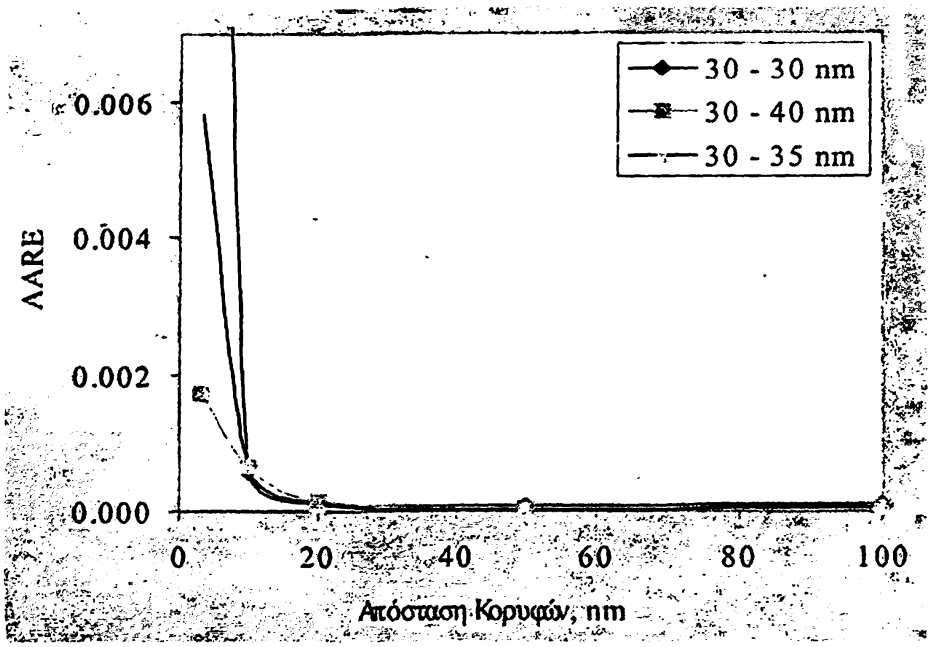
Σχήμα 7.1.6. Άθροισμα των επιφανειών των δυο συστατικών σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης

9]. Το εύρος του προστιθέμενου θορύβου επιλέχθηκε με βάση το μετρούμενο θόρυβο από το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διατριβής (βλέπε ενότητα 8). Τέλος, ο προστιθέμενος θόρυβος κατά τη μέτρηση των συγκεντρώσεων προσομοιώνει την τυχαία διακύμανση των τιμών των συγκεντρώσεων των προτύπων δειγμάτων που μετρήθηκαν με κάποια μέθοδο αναφοράς. Η μεγάλη απόκλιση των μετρούμενων τιμών με την μέθοδο αναφοράς από τις αληθείς τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών, δηλαδή το σφάλμα της μεθόδου, είναι συχνά μία από τις βασικές αιτίες κατασκευής μη αξιόπιστης βαθμονόμησης [10]. Με την προσθήκη αυτών των χαρακτηριστικών, τα δεδομένα ήταν αρκετά «πραγματικά» για τη μελέτη των μελετούμενων παραγόντων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι όλοι οι παράγοντες συσχετίζονται με μεγάλη επίδραση στην πρόβλεψη των αναλυτών. Σε αυτές τις αναλύσεις, το μεγαλύτερο σφάλμα AARE εμφανίζεται για τις κορυφές με τη

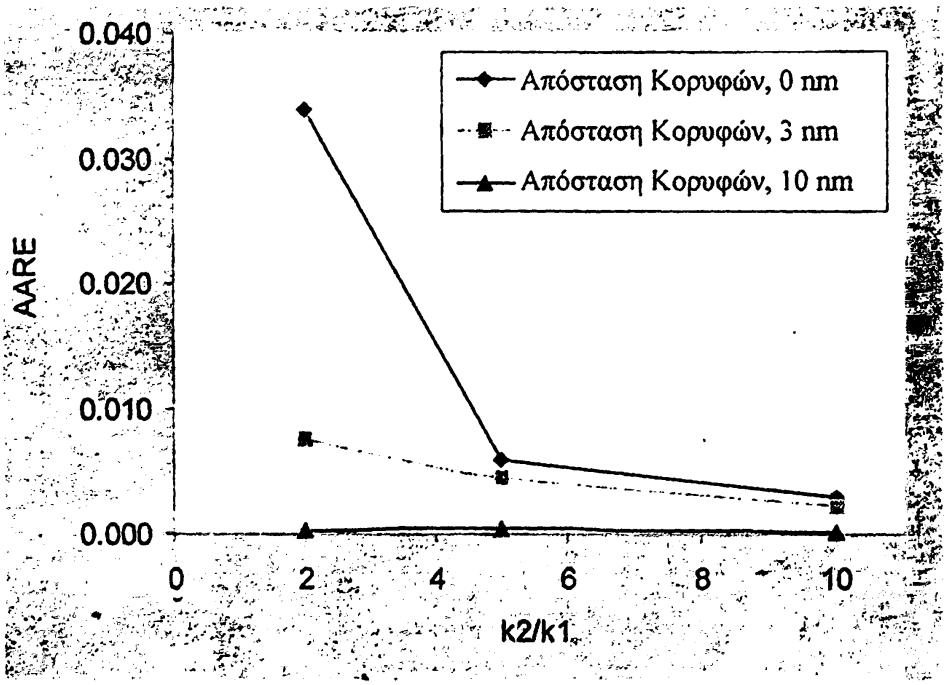


Σχήμα 7.1.7: Τα δεδομένα τεμαχίστηκαν κατά των άξονα του χρόνου και οι κινητικές καμπύλες τοποθετήθηκαν η μία δίπλα στην άλλη.

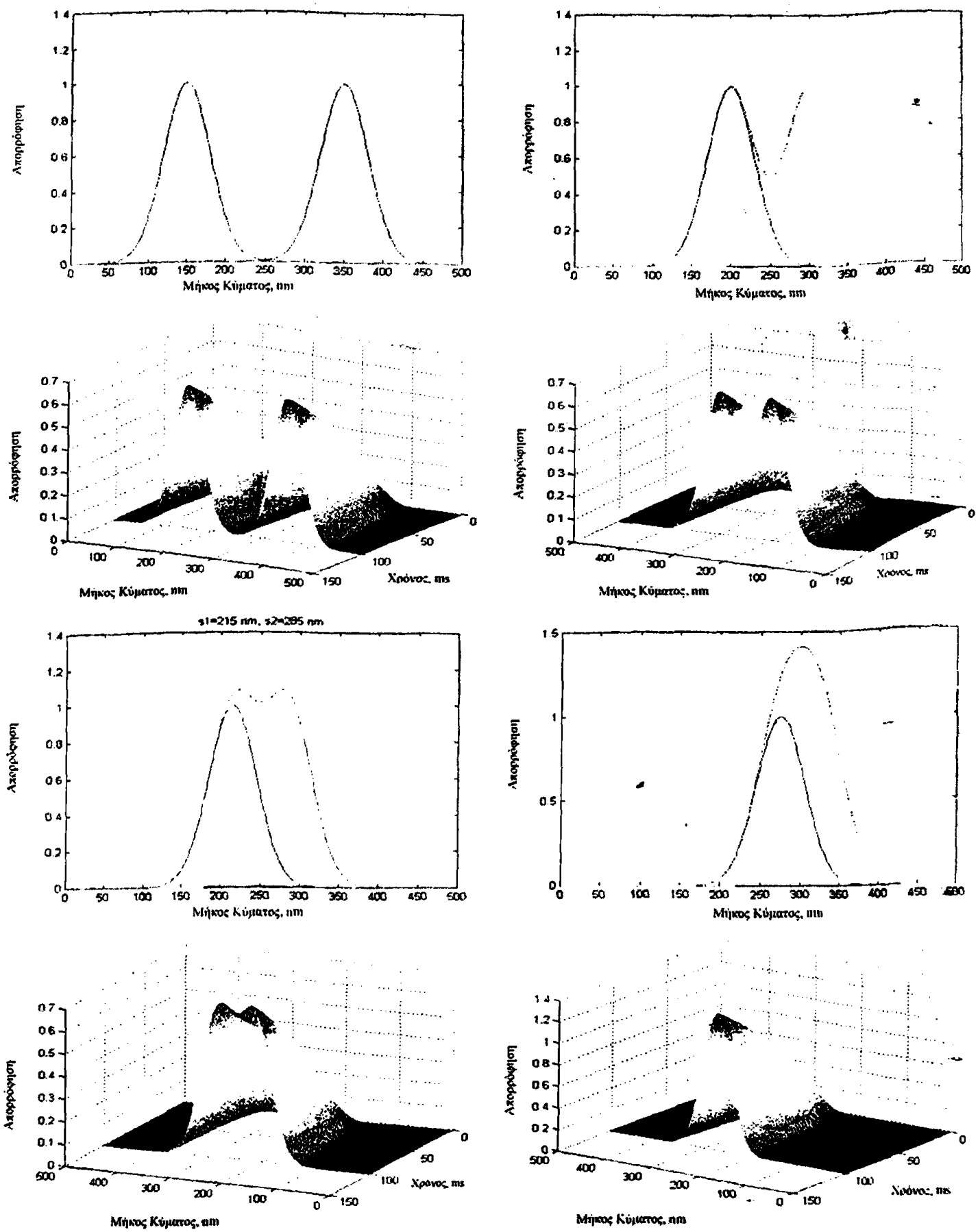
μικρότερη απόσταση και μειωνόταν με την αύξησή της. Αντίστοιχα (και αναμενόμενα) το σφάλμα μειωνόταν με την αύξηση της διαφοράς του ημιεύρους των δύο φασματικών κορυφών και με την αυξηση του λόγου των σταθερών ταχυτήτων, k2:k1. Η διαφορά της θέσης των φασματικών κορυφών δεν επιφέρει σημαντική βελτίωση μετά τα 10 nm (Σχήμα 7.1.8), ενώ η επίδραση του ημιεύρους κορυφής φαίνεται λιγότερο σημαντική. Σημαντική είναι όχι μόνο η ικανότητα πρόβλεψης των συστατικών μόνο με τις κινητικές διαφορές, δηλαδή κάτω από συνθήκες ολικής φασματικής επικάλυψης, κάτι που άλλωστε έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία [11-17], αλλά και η βελτίωση των αποτελεσμάτων πρόβλεψης συνδυάζοντας τις κινητικές με τις φασματικές διαφοροποιήσεις. Με αυτή την τεχνική, η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών συστατικών μπορεί να γίνει εφικτή ακόμα και σε συνθήκες όπου η διαφορά των ταχυτήτων, καθώς και η διαφορά των φασμάτων των συστατικών να είναι τόσο μικρή που να κάνει ανεφάρμοστη οποιαδήποτε παραδοσιακή κινητική ή φωτομετρική μέθοδο ανάλυσης χωρίς προεπεξεργασία των δειγμάτων για τον χημικό διαχωρισμό των προς ανάλυση συστατικών.



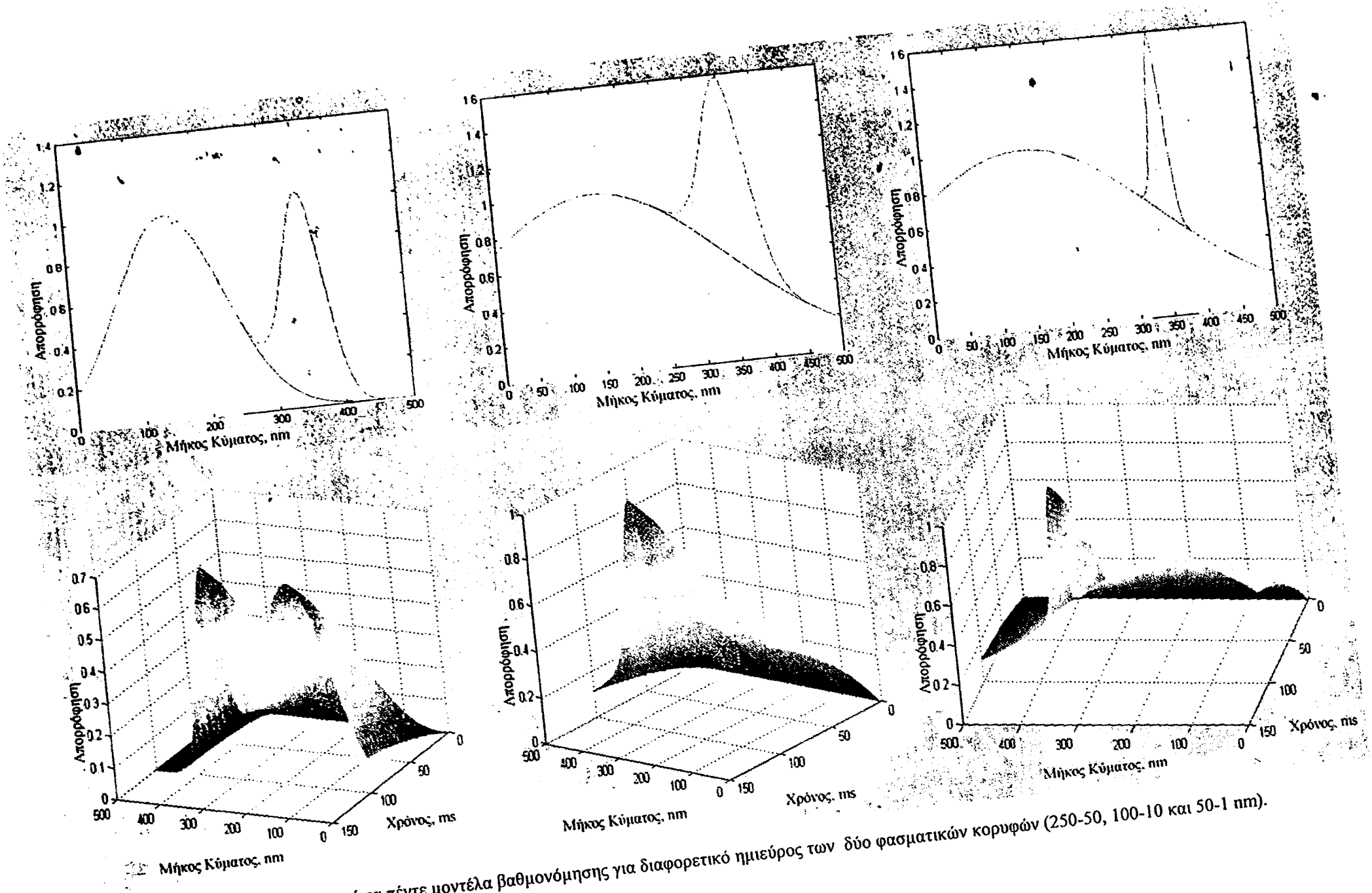
Σχήμα 7.1.8. Γραφική απεικόνιση της μείωσης του σφάλματος AARE συναρτήσει της σχετικής απόστασης των δύο φασματικών κορυφών, για διάφορες τιμές



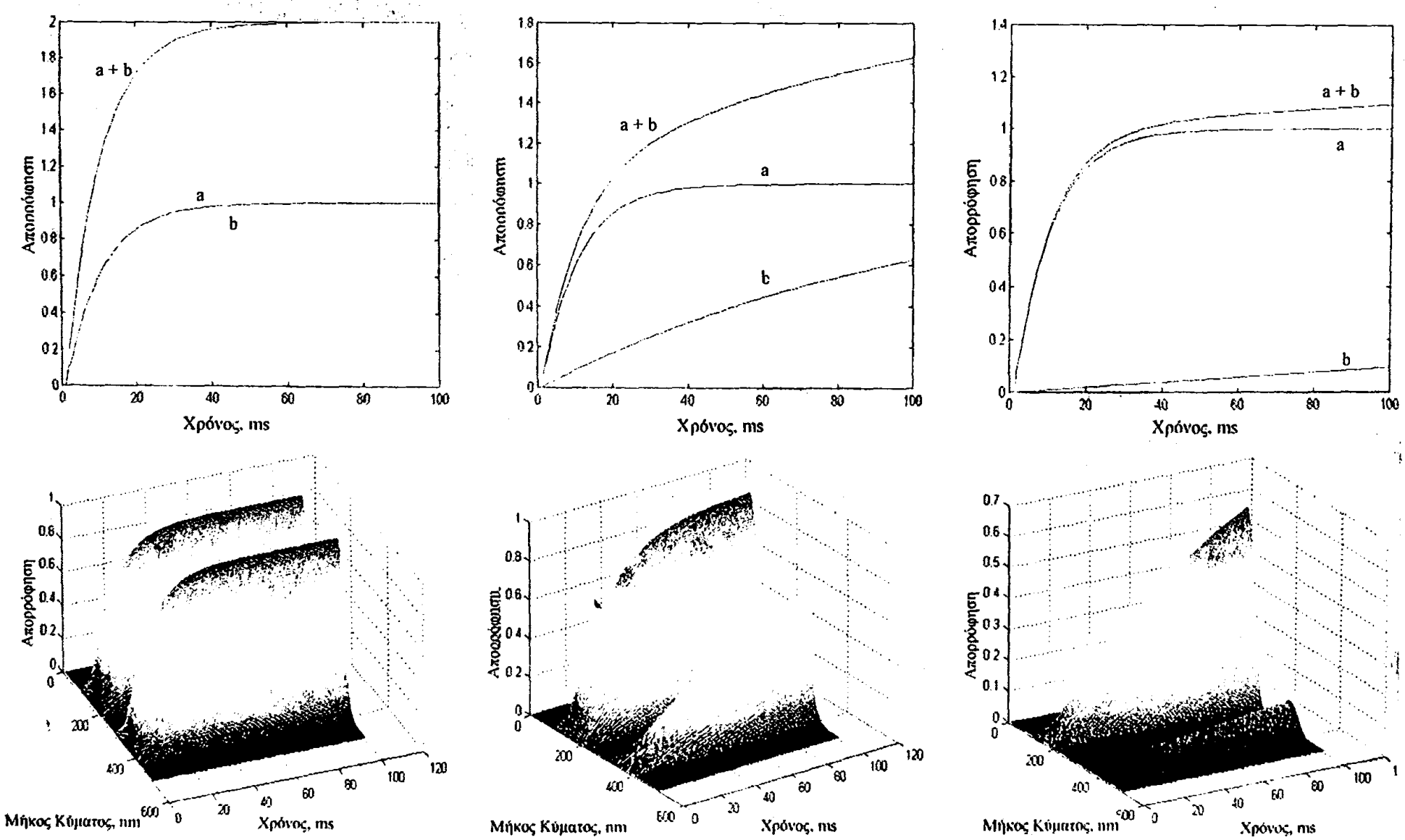
Σχήμα 7.1.9. Γραφική απεικόνιση της μείωσης του σφάλματος AARE συναρτήσει του λόγου των σταθερών των ταχυτήτων, για διάφορες τιμές της σχετικής απόστασης των δύο φασματικών κορυφών



Σχήμα 7.1.10. 4 από τα 8 μοντέλα βαθμονόμησης για αποστάσεις των δυο κορυφών από 200 nm μέχρι 0 nm (200, 100, 75, και 50 nm, για αυθαίρετα μήκη κύματος)



Σχήμα 7.1.11. Τρία από τα πέντε μοντέλα βαθμονόμησης για διαφορετικό ημιεύρος των δύο φασματικών κορυφών (250-50, 100-10 και 50-1 nm).



Σχήμα 7.1.12. Τρία από τα πέντε 5 μοντέλα βαθμονόμησης με λόγο σταθερών ταχυτήτων k1:k2 ίσο με 1:1, 5:1 και 10:

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G.Lopez-Gueto, J.F.Rodriguez-Medina, C.Ubide, Analyst, 1997, 122, 519.
2. P.D.Wentzell, S.R.Crouch, Anal. Chem., 1986, 58, 2855.
3. M.Gul, S.C.Rutan, Anal. Chem., 1994, 66, 1513.
4. O.Hernandez, A.J.Himenez, F.Jimenez, J.J.Arias, J. Havel, Talanta, 1994, 41, 775.
5. S.Ainsworth, Journal Of Physical Chemistry, 1963, 67, 1613.
6. J.C.Sternberg, H.S.Stillo, R.H.Schwendeman, Anal. Chem., 1960, 32, 84.
7. T.F.Cullen, S.R.Crouch, Anal. Chim. Acta, 2000, 407, 135.
8. P.M.Epperson, J.V.Sweeedler, R.B.Bilhorn, G.R.Sims, M.B.Denton, Anal. Chem., 1988, 60, 327A.
9. D.A.Skoog, F.J.Holler, T.A.Nieman, "Principles Of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, Usa, 5Th Edition, 1998.
10. H. Martens, T. Naes, "Multivariate Calibration", Wiley, New York, 1989.
11. J.J.Baeza, G.Ramos, F.Pla, R.Molina, Analyst, 1990, 115, 721.
12. J.Havel, J.L.Gonzalez, Scripta, 1989, 19, 183.
13. J.L.Gonzalez, J.Dusek, J.Havel, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1989, 38, 385.
14. J.Havel, J.L.Gonzalez, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1989, 39, 141.
15. J.L.Gonzalez, J.Havel, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1989, 39, 147.
16. M.Potacek, A.Kukacka, M.Petru, A Manopoulou, J.Havel, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1993, 51, 135.
17. M. Der M.Canedo, J.L.Gonzalez, F.Cuesta, J.Havel, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1992, 48, 77.

7.2. Ταυτόχρονος Κινητικός Φασματοφωτομετρικός Προσδιορισμός Υπεροξειδίου του Υδρογόνου-Υπεροξεικού Οξέος. Εφαρμογή σε Πραγματικά Δείγματα από Απόβλητα Ζυθοποιίας.

Περίληψη

Εφαρμόσθηκε μια νέα χημειομετρική, φασματο-κινητική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του Υπεροξεικού Οξέος (PAA) και του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2), συνδυάζοντας τις αρχικές κλίσεις των αντιδράσεών τους με διφαινυλαμίνη (DPA) με την μέθοδο Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων (ILS). Η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου ILS βασίστηκε στη μικρή κινητική διαφοροποίηση των αντιδράσεων των δύο αναλυτών με DPA παρουσία καταλύτη δισθενή χαλκό. Φάσματα ορατού - υπεριώδους μετρήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα με μια διάταξη αναχαίτισης της ροής με ένα φασματοφωτόμετρο σύζευξης φορτίου (CCD). Η μέθοδος εφαρμόσθηκε με επιτυχία στον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των υπεροξειδίων σε δείγματα από απόβλητα από διαδικασία απολύμανσης εγκαταστάσεων ζυθοποιίας.

7.2.1. Εισαγωγή

Τα υπεροξείδια. όπως το H_2O_2 και το PAA βρίσκουν ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή σε μεθόδους απολύμανσης και λεύκανσης εξαιτίας της φιλικής συμπεριφοράς τους προς το περιβάλλον. Το PAA δρα ταχέως και σε χαμηλές συγκεντρώσεις εναντίον ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών. συμπεριλαμβανομένων gram – και gram + βακτηρίων, μυκητών και αλγών υπό σχεδόν οποιεσδήποτε συνθήκες. Είναι επίσης αποτελεσματικό κατά αναερόβιων και βακτηριακών σπορίων [1]. Χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοκτόνο σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις ψύξης του νερού και σε συστήματα παραγωγής χαρτιού. Πέρα από την ισχυρή του δράση, ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματά του είναι ότι δεν παράγει τοξικά παραπροϊόντα κατά την αποικοδόμησή του, αλλά τα προϊόντα του, όπως οξεικό οξύ, νερό και οξυγόνο, είναι αβλαβή και περιβαλλοντικά αποδεκτά. Το PAA παράγεται κατά την αντίδραση του οξεικού οξέος με H_2O_2, παρουσία κάποιου ισχυρού οξέος ως καταλύτη. Για αυτό, τα διαλύματα του PAA περιέχουν σημαντικά ποσά H_2O_2 σαν υπόλειμμα ή σαν προϊόν της χημικής ισορροπίας. Ο προσδιορισμός αυτών των υπεροξέων βασίζεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες, αλλά πρώτα

απαιτείται ένας αξιόπιστος τρόπος διάκρισης μεταξύ των δύο ουσιών. Τόσο το PAA, όσο και το H_2O_2 είναι ισχυρά οξειδωτικά και οι τεχνικές τους εφαρμογές αφορούν κυρίως τη χημεία οξειδώσεων. Ωστόσο παρουσία ισχυρών οξέων το H_2O_2 δρα ως αναγωγικό μέσο. Αυτή η διαφορά στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες έχει εφαρμοσθεί σε τεχνικές ογκομέτρησης για την ανάλυση μιγμάτων τους οιονεί ταυτοχρόνως [2]. Επίσης. έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές μείωσης των διαστάσεων των δεδομένων για την ανάλυση καμπυλών με χαρακτηριστικά πρόβλεψης [3]. Άλλες τεχνικές προσδιορισμού του PAA περιλαμβάνουν φασματοφωτομετρία [4-10], ηλεκτροχημεία [11-15], αέρια και υγρή χρωματογραφία [16-20]. Καμμία όμως από αυτές τις τεχνικές δεν είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό του H_2O_2 και του PAA εκλεκτικά και ταυτόχρονα. Ο Pinkernell et al. έχει αναπτύξει μια μέθοδο HPLC για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων των δύο αναλυτών μετά από προκατεργασία του δείγματος με τριμεθυλοφωσφίνη και φωσφινοξείδιο [21] αλλά η μέθοδος δεν δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται μια ταχεία μέθοδος για τον ταυτόχρονο και εκλεκτικό προσδιορισμό του PAA και του H_2O_2 χρησιμοποιώντας τις μικρές κινητικές διαφορές αυτών των αναλυτών σε πολλά μήκη κύματος, κατά τις αντιδράσεις τους με DPA. χωρίς ουσιαστική προκατεργασία των δειγμάτων.

7.2.2. Πειραματικό Μέρος

7.2.2.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Παρασκευάστηκαν δύο υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης. συγκέντρωσης 1 mM H_2O_2 και 1 mM PAA (Merck) σε απεσταγμένο νερό. Φρέσκα διαλύματα παρασκευάζονταν κάθε μέρα. Ένα διάλυμα διφαινυλαμίνης (DPA. Sigma) συγκέντρωσης 10 mM παρασκευάστηκε με διάλυση 0.0423 g DPA σε μίγμα 90 % μυρμηκικού οξέος (Riedel-de Haen) και 10 % απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα δεν ήταν σταθερό και έπρεπε να παρασκευάζεται κάθε δεύτερη μέρα. Το αρχικό διάλυμα Cu(II) συγκέντρωσης 0,1 M παρασκευάσθηκε με τη διάλυση 0,855 g στερεού $CuCl_2.2H_2O$ (Merck) σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

7.2.2.2. Πειραματική Διάταξη

Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις έγιναν με ένα φασματοφωτόμετρο S2000 CCD (Ocean Optics. U.K.). Μια διάταξη SF από την Tri-tech Dynamic Instruments (Cantech Scientific Ltd.. Canada) με μια κυψελίδα οπτικής διαδρομής 3 mm συνδέθηκε με το φασματοφωτόμετρο με τη βοήθεια οπτικών ινών. Μια λάμπα αλογόνου βολφραμίου αποτελούσε την πηγή φωτός, το οποίο διερχόταν από την κυψελίδα με τη βοήθεια οπτικών ινών. Τα διαλύματα στα διαμερίσματα του SF και στην κυψελίδα παρέμεναν σε σταθερή θερμοκρασία 25° C, με την κυκλοφορία νερού από ένα θερμοστατούμενο υδρόλουτρο. Τα δεδομένα συλλέγονταν και επεξεργάζονταν με έναν προσωπικό υπολογιστή Pentium 200 MHz. Όλοι οι εφαρμοζόμενοι αλγόριθμοι έχουν προγραμματιστεί σε περιβάλλον MATLAB έκδοση 5.2.

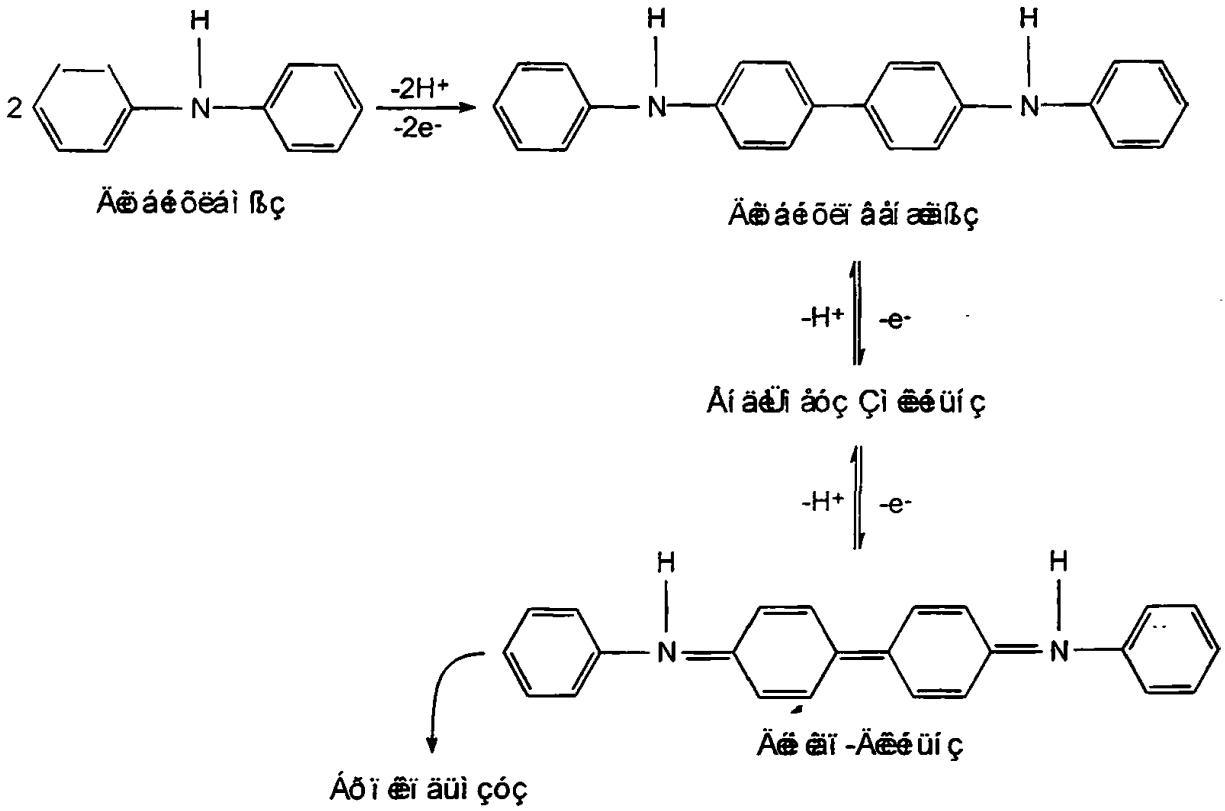
7.2.3. Πορεία Εργασίας

Η μέθοδος ILS χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μιγμάτων H_2O_2-PAA. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τις διαφορές στις αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων των δυο υπεροξέων με DPA παρουσία καταλύτη χαλκού για τον προσδιορισμό τους. Επειδή καταλήγουν σε ένα κοινό έγχρωμο προϊόν τα τελικά φάσματα είναι ίδια. η ταχύτητα σχηματισμού του όμως διαφέρει [22]. Η αντίδραση παρατηρήθηκε ταυτόχρονα σε 2 μήκη κύματος στην ορατή περιοχή του φάσματος και στις δύο μέγιστες τιμές απορρόφησης των κορυφών του φάσματος του κοινού προϊόντος. Ένα μίγμα από 90 % μυρμηγκικό και 10 % νερό επιλέχθηκε ως ο καλύτερος διαλύτης στον οποίο λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις, με

$$\left.\begin{array}{l} H_2O_2 + DPA \xrightarrow{Cu(II)} \\ PAA + DPA \xrightarrow{Cu(II)} \end{array}\right\} \text{Έγχρωμο Προϊόν}$$

κριτήριο την υψηλότερη ευαισθησία και τη μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης. Η οξείδωση της διφαινυλαμίνης παρουσία καταλύτη χαλκού σε ισχυρά όξινο περιβάλλον αρχικά δίνει μη αντιστρεπτά διαφαίνυλο-βενζιδίνη, ένα άχρωμο προϊόν, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται αντιστρεπτά σε δύο στάδια προς την έντονη μπλε διιμιδο-δικινόνη, της οποίας μετράται η απορρόφηση [23]. Αυτό το προϊόν είναι ασταθές και καταστρέφεται αργά και μη αντιστρεπτά, υποδεικνύοντας και ένα επιπλέον λόγο για την κινητική μελέτη αυτού του χημικού συστήματος, όπου η συλλογή των χημικών πληροφοριών γίνεται πριν

την καταστροφή του μετρούμενου χρώματος (Σχήμα 7.2.1). Η ταχύτητα της αντίδρασης του PAA ήταν της τάξεως των μερικών δευτερολέπτων ενώ ο λόγος των αρχικών ταχυτήτων των αντιδράσεων του H_2O_2 και του PAA ήταν 9.7 : 1. αντίστοιχα. Οι αρχικές κλίσεις υπολογίστηκαν με τη βοήθεια ενός m-αρχείου. όπως περιγράφεται παρακάτω. Ως



Σχήμα 7.2.1. Μηχανισμός οξείδωσης της διφαινυλαμίνης σε όξινο περιβάλλον

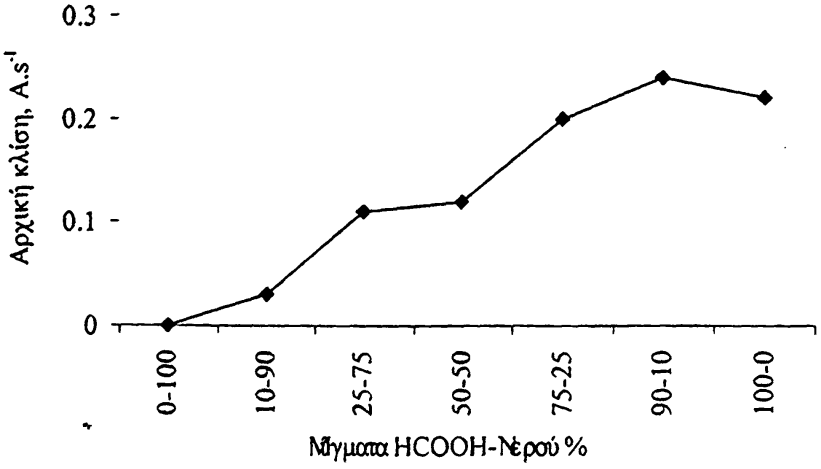
θερμοκρασία εργασίας επιλέχθηκε αυτή των 25 °C, πάνω από την οποία παρατηρήθηκε η διάσπαση μέρους του H_2O_2 και ο σχηματισμός αερίου οξυγόνου μέσα στις σύριγγες πληρώσεως του SF. Για τη βαθμονόμηση. λήφθηκαν οι αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών 13 μιγμάτων (Πίνακας 1). Τα μίγματα διαφορετικής σύστασης των αναλυτών ήταν μέσα στα όρια της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς του κάθε αναλύτη.

Πίνακας 1. Η σύσταση και οι αρχικές κλίσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης για την πολυπαραμετρική βαθμονόμηση

Αριθμός Δείγματος	$[H_2O_2]$, mM	[PAA], mM	Αρχική Κλίση (350 nm), $A.s^{-1}$	Αρχική Κλίση (582 nm), $A.s^{-1}$

1	0,20	0,04	0,0387	0,3197
2	0,24	0,04	0,0393	0,3224
3	0,34	0,05	0,0419	0,3290
4	0,24	0,03	0,0301	0,2458
5	0,34	0,03	0,0357	0,2551
6	0,39	0,05	0,0401	0,2988
7	0,20	0,06	0,0313	0,2490
8	0,15	0,06	0,0319	0,2421
9	0,29	0,07	0,0412	0,3146
10	0,15	0,07	0,0310	0,2252
11	0,15	0,08	0,0409	0,3064
12	0,20	0,05	0,0325	0,2452
13	0,24	0,08	0,0425	0,3221

Ο λόγος των συγκεντρώσεων των δύο αναλυτών ([H_2O_2] : [PAA]) ήταν πάντα διαφορετικός για την αποφυγή συγγραμμικότητας. Η αρχική δομή των δεδομένων ήταν ένα πακέτο τιμών, όπου οι δύο γραμμές αντιστοιχούσαν στις δύο τιμές απορρόφησης στα δύο μήκη κύματος. οι δύο στήλες στους δύο αναλύτες. και η τρίτη διάσταση σε χρονικές στιγμές. Για την εφαρμογή τεχνικών δύο δρόμων, όπως η ILS, όπου οι πίνακες των δεδομένων πρέπει να είναι δυσδιάστατοι, οι κινητικές καμπύλες από τα αρχικά δεδομένα (απορρόφηση ως προς χρόνος) τοποθετήθηκαν η μία δίπλα στην άλλη, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1. Το προκύπτον πακέτο τιμών χρησιμοποιήθηκε για τον



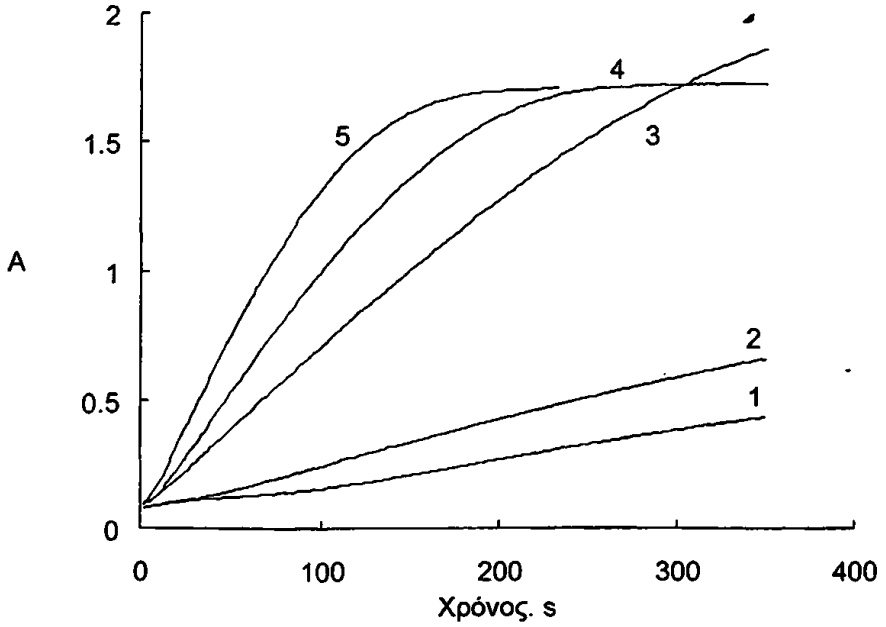
Σχήμα 7.2.2.Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης από το λόγο μυρμηκικού οξέος-νερού: [DPA] = 0.1 mM, [H_2O_2] = 0.20 mM, [Cu(II)] = 10 mM, θ = 25 °C

υπολογισμό των αρχικών κλίσεων με τον αλγόριθμο υπολογισμού των αρχικών κλίσεων που περιγράφεται στο παράρτημα.

7.2.4. Αποτελέσματα και συζήτηση

7.2.4.1. Βελτιστοποίηση Πειραματικών Συνθηκών

Η αντίδραση οξείδωσης της DPA δεν λαμβάνει χώρα, ή στην καλύτερη περίπτωση γίνεται πολύ αργά σε ασθενώς όξινο περιβάλλον. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση του μυρμηκικού οξέος σε όλα τα πειράματα ως το μέσο οξίνισης της αντίδρασης είχε τα πλεονεκτήματα ότι η DPA έχει μεγάλη διαλυτότητα σε αυτό, ενώ στο νερό είναι λιγότερο διαλυτή και λειτουργεί σαν ρυθμιστικό διάλυμα με το να διατηρεί την τιμή του pH πρακτικώς σταθερή σε πολύ χαμηλες τιμές. Από την άλλη πλευρά, στο νερό διαλύεται ευκολότερα το άλας του χαλκού, τα διαλύματα των υπεροξέων είναι σχετικά πιο σταθερά σε λιγότερο όξινα διαλύματα και η τιμή της μολαρικής απορροφητικότητας (ε) του προϊόντος είναι ελαφρά υψηλότερη. Για αυτούς του λόγους, μετρήθηκε η αρχική

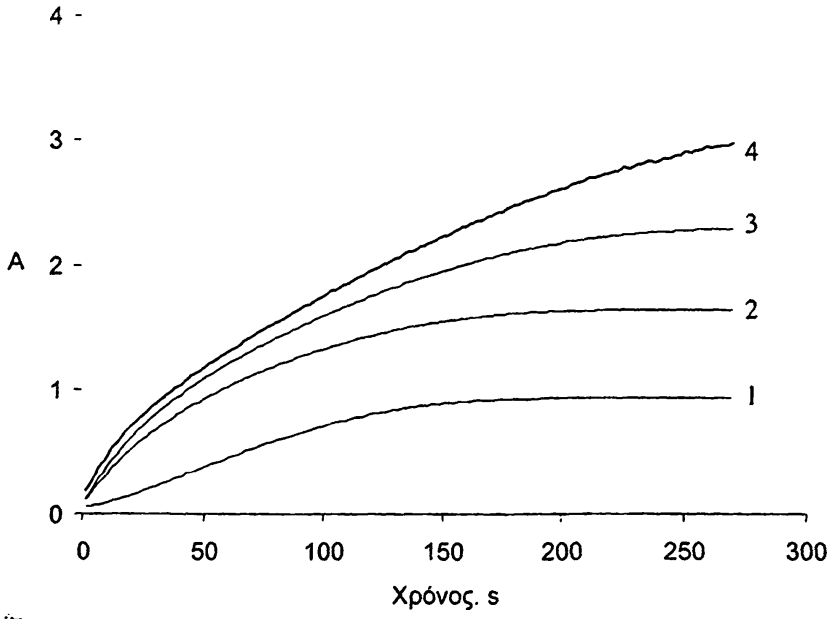


Σχήμα 7.2.3. Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του χαλκού: [DPA] = 0.1 mM. [H_2O_2] = 0.20 mM. θ = 25 °C. 1) [Cu(II)] = 1 mM. 2) [Cu(II)] = 2 mM. 3) [Cu(II)] = 5 mM. 4) [Cu(II)] = 7 mM. 5) [Cu(II)] = 10 mM.

κλίση (μεταβολή της απορρόφησης ως προς χρόνος) στα 582 nm, για την αντίδραση DPA-H_2O_2 με καταλύτη χαλκό για μίγματα διαφόρων αναλογιών μυρμηκικού οξέος-νερού με κριτήριο βελτιστοποίησης τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ταχύτητα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.2.2. το μίγμα 90 % μυρμηκικού οξέος – 10 % νερού επιλέχθηκε για την διεξαγωγή των υπολοίπων πειραμάτων.

Το σχήμα 7.2.3 δείχνει την επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη στην ταχύτητα της αντίδρασης. Από τις πέντε συγκεντρώσεις του χαλκού, μόνο η μεγαλύτερη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των υπεροξέων. Σε αυτή την συγκέντρωση, η οξείδωση της DPA ακολουθεί μηχανισμό αντίδρασης ψευδοπρώτης τάξης ως προς το H_2O_2 και το PAA και ο χρόνος επώασης της αντίδρασης σύμφωνα με τον προαναφερόμενο μηχανισμό πρακτικά μηδενίζεται.

Οι λαμβανόμενες κινητικές καμπύλες. επίσης στα 582 nm για διαφορετικές συγκεντρώσεις DPA φαίνονται στο σχήμα 7.2.4, όπου ως βέλτιστη συγκέντρωση επιλέχθηκε αυτή των 0.1 mM. Η περαιτέρω αύξηση της συγκεντρωσης DPA δεν επιφέρει



Σχήμα 7.2.4.Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση DPA: [H_2O_2] = 0.20 mM. [Cu(II)] = 10 mM. θ = 25°C. 1) [DPA] = 0.05 mM. 2) [DPA] = 0.1 mM. 3) [DPA] = 0.2 mM. 4) [DPA] = 0.5 mM

αύξηση στην ταχύτητα της αντίδρασης. ενώ η τιμή της απορρόφησης παίρνει τιμές πάνω από το 2, όπου ο νόμος του Beer δεν ισχύει.

Εφαρμόζοντας τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς για το H_2O_2 και για το PAA. Οι μετρήσεις έγιναν και στα δύο μήκη κύματος για κάθε αναλύτη ξεχωριστά και βρέθηκε ότι το εύρος της γραμμικής περιοχής της συγκέντρωσης ήταν 0,003 – 0,015 mM για το PAA (σχήματα 7.2.5-7.2.6) και 0,01 – 0,5 mM για το H_2O_2 (σχήματα 7.2.7-7.2.8), ενώ το όρια ανιχνευσιμότητας ήταν 1 μM για το PAA και 3 μM για το H_2O_2. Η μετατόπιση της καμπύλης αναφοράς του PAA παράλληλα με τον άξονα των συγκεντρώσεων οφείλεται στην σταθερή παρουσία H_2O_2 στα διαλύματα του PAA ως προϊόν της αντίδρασης διάσπασής του προς υπεροξείδιο τυ υδρογόνου και οξεικό οξύ. Σαν αποτέλεσμα, η τετμημένη επι τη αρχή αφαιρέθηκε για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του PAA, ενώ η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς είναι μικρότερη του αναμενόμενου.

Πίνακας 2. Η σύσταση και οι αρχικές κλίσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη μονοπαραμετρική βαθμονόμηση

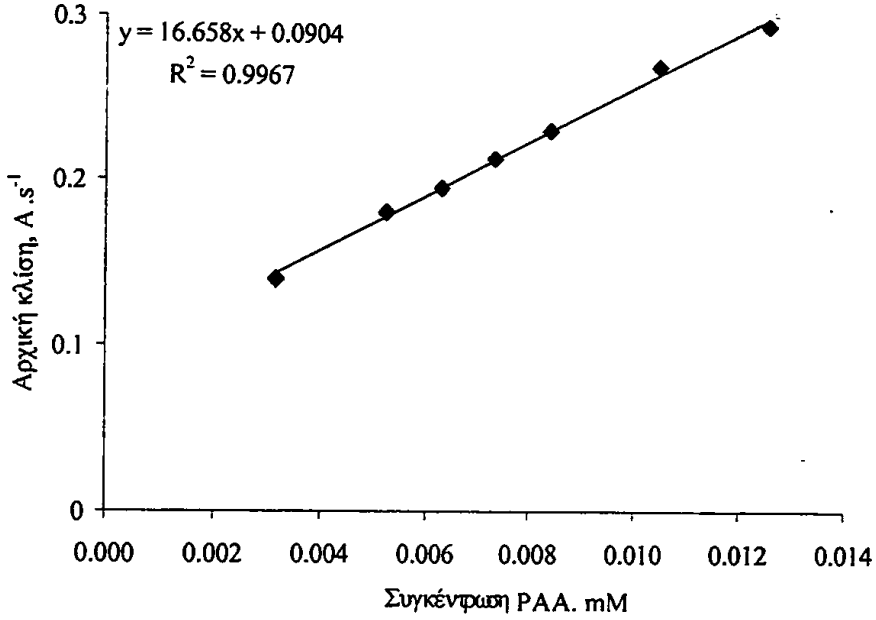
Αριθμός Δείγματος	$[H_2O_2]$, mM	[PAA], mM	Αρχική Κλίση (350 nm), $A.s^{-1}$	Αρχική Κλίση (582 nm), $A.s^{-1}$
1	0,00	0,02	0,0120	0,1060
2	0,00	0,03	0,0190	0,1400
3	0,00	0,05	0,0270	0,1800
4	0,00	0,06	0,0310	0,1950
5	0,00	0,07	0,0350	0,2130
6	0,00	0,08	0,0390	0,2310
7	0,00	0,11	-	0,2700
8	0,00	0,13	-	0,2960
9	0,10	0,00	0,0050	0,0540
10	0,15	0,00	0,0100	0,0850
11	0,20	0,00	0,0110	0,0900
12	0,25	0,00	0,0140	0,1090
13	0,29	0,00	0,0160	0,1280
14	0,34	0,00	0,0200	0,1660
15	0,39	0,00	0,0230	0,1980
16	0,49	0,00	0,0340	0,3020
17	0,59	0,00	0,0330	0,2910

7.2.4.2. Εμβολιασμός Πραγματικών Δειγμάτων - Συμπεράσματα

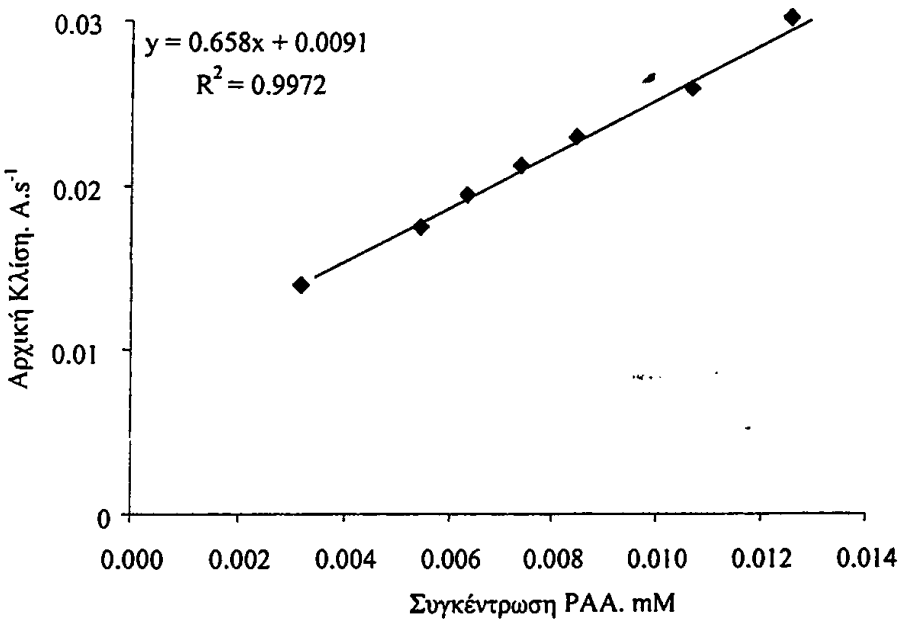
Σε δέκα δείγματα από απόβλητα καθαρισμού εγκαταστάσεων παρασκευής μπύρας προστέθηκαν γνωστά ποσά υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξεικού οξέος σε διάφορες αναλογίες, όπως φαίνεται στον πίνακα 3. Το αρχικό pH των δειγμάτων ήταν ισχυρά αλκαλικό για αυτό. εξουδετερώθηκε με NaOH, ώστε οι απαιτούμενες όξινες συνθήκες να είναι οι ίδιες με αυτές των δειγμάτων βαθμονόμησης μετά την προσθήκη του HCOOH. Οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 97 - 106 % για το H_2O_2 και από 85 - 112 % για το PAA βρίσκονται σε ικανοποιητικά επίπεδα, κάτι που αποδεικνύει την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου στη διαδικασία απομάκρυνσης αυτών των ουσιών από τις συσκευές παραγωγής μπύρας.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα πρόβλεψης για 10 εμβολιασμένα δείγματα

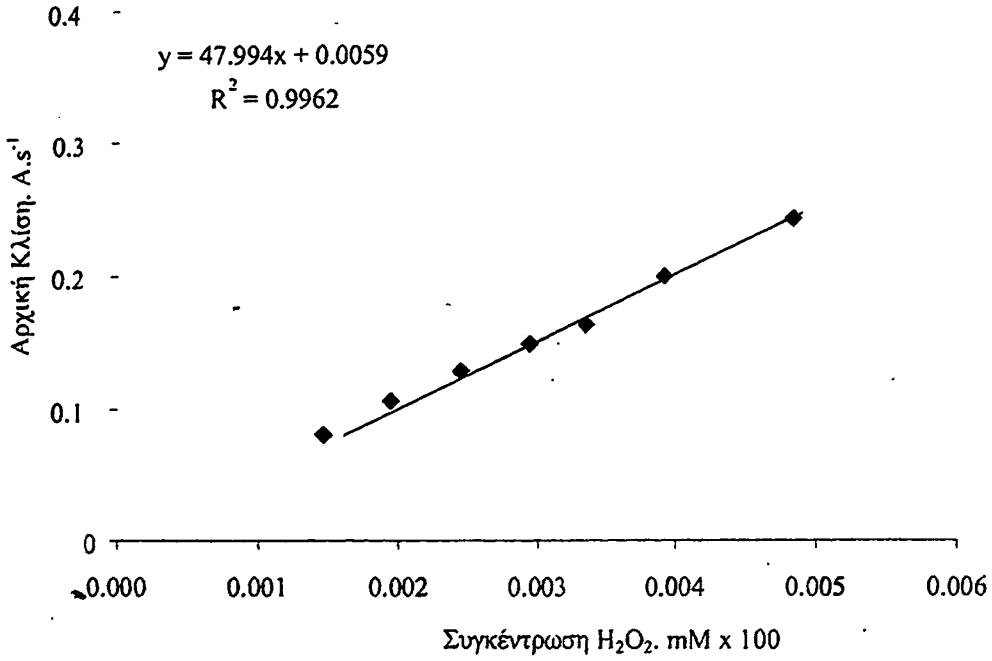
Εμβολιασμένα Δείγματα H_2O_2:PAA	Αριθμός Μίγματος	Αναμενόμενη Συγκέντρωση		Υπολογιζόμενη Συγκέντρωση		Ανάκτηση. %	
		$[H_2O_2]$. mM	[PAA]. mM	$[H_2O_2]$. mM	[PAA]. mM	H_2O_2	PAA
3 : 1	1	0,30	0,01	0,303	0,011	101	112
1 : 1,67	2	0,30	0,05	0,306	0,049	102	98
7,5 : 1	3	0,75	0,01	0,750	0,009	100	88
1,5 : 1	4	0,75	0,05	0,795	0,052	106	104
1,5 : 1	5	0,15	0,01	0,156	0,010	104	97
1 : 3,33	6	0,15	0,05	0,149	0,043	99	85
-	7	0,30	0,00	0,291	0,000	97	98
-	8	0,00	0,01	0,000	0,010	106	104
7,5 : 1	9	0,75	0,01	0,765	0,011	102	114
1 :·6,67	10	0,15	0,00	0,153	0,000	102	-



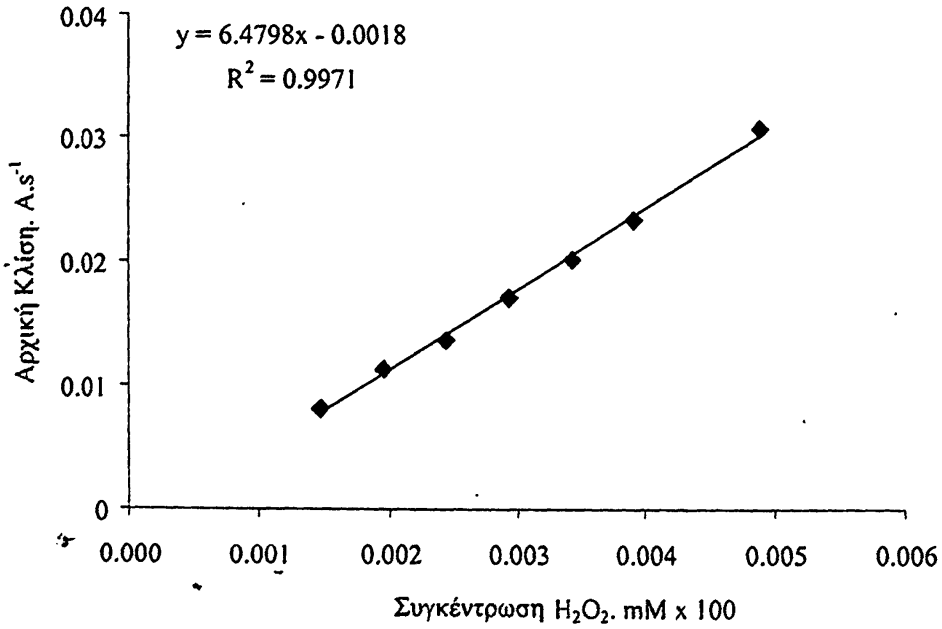
Σχήμα 7.2.5.Καμπύλη αναφοράς του PAA στα 582 nm. $[H_2O_2] = 0.00$ mM, $[Cu(II)] = 10$ mM, $\theta = 25$ °C, [DPA] = 0.1 mM



Σχήμα 7.2.6. Καμπύλη αναφοράς του PAA στα 350 nm $[H_2O_2] = 0.00$ mM. $[Cu(II)] = 10$ mM. $\theta = 25°$ C. [DPA] = 0.1 mM



Σχήμα 7.2.7. Καμπύλη αναφοράς του H_2O_2 στα 582 nm. [PAA] = 0.00 mM. [Cu(II)] = 10 mM. θ = 25 °C. [DPA] = 0.1 mM



Σχήμα 7.2.8. Καμπύλη αναφοράς του H_2O_2 στα 350 nm. [PAA] = 0.00 mM. [Cu(II)] = 10 mM. θ = 25°C. [DPA] = 0.1 mM

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. F.J.Kramer. Materials Performance. 1997. 36(8). 42.
2. F.P.Greenspan. D.G.McKellar. Anal. Chem.. 1948. 20. 1061.
3. G.Niebling. R.Aigner. D.Wabner and R.Menzel. Sensors and Actuators B: Chemical Volume 34(1-3). 1996. 481.
4. J.E.Frew. P.Jones. G.Scholes. Anal. Chim. Acta. 1983. 155. 139.
5. D.M.Davies. M.E.Deary. Analyst. 1983. 113. 1477.
6. T.Tomiyasu. Anal. Chim. Acta. 1997. 349. 43.
7. K.Zhang. L.Mao. R.Cai. Talanta. 2000. 51. 179.
8. X.He. M.Tubino. A.V.Rossi. Anal. Chim. Acta. 1999. 389. 275.
9. D.Harms. J.Meyer. L.Westerheide. B.Krebs. U.Karst. Anal. Chim. Acta. 1999. 401. 83.
10. Doina Bejan. Anal. Chim. Acta. 1999. 390. 255.
11. G.Teske. (Dr. Thiedig & Co.). US. 5. 503. 720. 1996.
12. P.C.Foller. R.T.Bombard. J. Appl. Electrochem.. 1995. 25. 613.
13. V.Lvovich. A.Scheeline. Anal. Chim. Acta. 1997. 354. 315.
14. T.Ferri. A.Poscia. R.Santucci. Bioelectrochem. and Bioenergetics. 1998. 45. 221.
15. M.Gerlache. S.Girousi. G.Quarin. J.M.Kauffmann., *Electrochim. Acta. 1998. 43. 3467.*
16. F.Di Furia. M.Prato. Uuintly. S.Salvagno. G.Scorrano. Analyst. 1984. 109. 985.
17. G.T.Cairns. D.R.Ruiz. K.Selby. D.J.Waddington. J. Chromatogr.. 1975. 103. 381.
18. O.Kirk. T.Damhus. M.W.Christensen. J. Chromatogr.. 1992. 606. 49.
19. U. Pinkernell. U.Karst. K.Cammann. Anal. Chem.. 1994. 350. 159.
20. S.Baj.. Fresenius J. Anal. Chem.. 1994. 350. 159.
21. U.Pinkernell. S.Effkemann. U.Karst. Anal. Chem.. 1997. 69. 3623
22. M.P.Aguilar-Caballos. A.Gomez-Hens. D.Perez-Bendito. Anal. Chim. Acta. 1997. 354. 173.
23. F.Grases. E.Amat. J.Palou. J. Molec. Catalal.. 1987. 305.

7.3. Κινητική Μέθοδος Προσδιορισμού Νιτρωδών με την Ταυτόχρονη Παρουσία Παρεμποδιζουσών Ουσιών

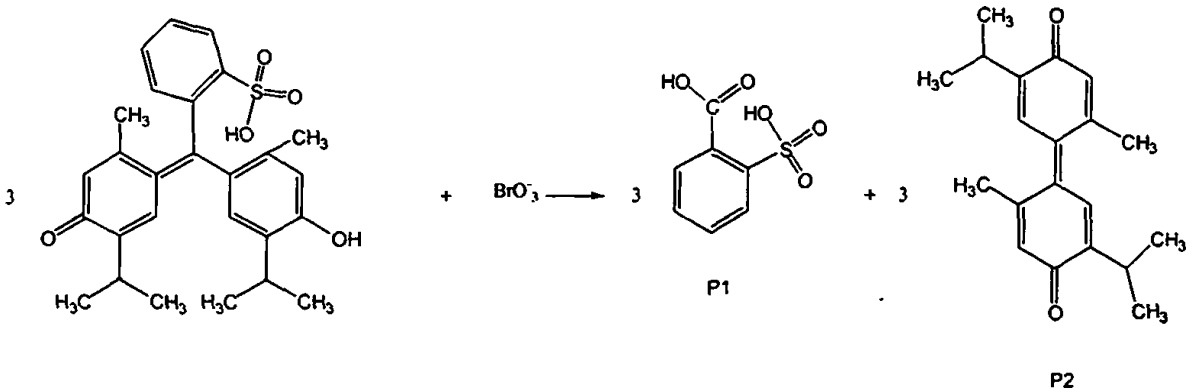
Περίληψη

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται μια ταχεία, ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό των νιτρωδών, βασιζόμενη στην καταλυτική τους συμπεριφορά κατά την αντίδραση μεταξύ του κυανούν της θυμόλης (TB) και των βρωμικών παρουσία θειικού οξέος. Η μελέτη της αντίδρασης έγινε τόσο μονοπαραμετρικά, με τη παρατήρηση στο μέγιστο της απορρόφησης στα 543 nm, όσο και πολυπαραμετρικά, από 300 μέχρι 550 nm οπότε παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα του πολυπαραμετρικού προσδιορισμού όσο αφορά την άρση των παρεμποδίσεων. Τα αποτελέσματα από τις δύο μελέτες συγκρίθηκαν μεταξύ τους και με την επίσημη μέθοδο AOAC. Οι προτεινόμενες μέθοδοι εφαρμόσθηκαν επιτυχώς σε πραγματικά δείγματα τροφίμων με παρόμοια αποτελέσματα με την επίσημη μέθοδο.

7.3.1 Εισαγωγή

Τα νιτρώδη είναι ένας σημαντικός και πολύ κοινός ρύπος στο περιβάλλον και η παρουσία τους είναι ενδεικτική της οργανικής ρύπανσης στην ατμόσφαιρα και σε φυσικά νερά [1, 2]. Είναι γνωστή η παραγωγή καρκινογόνων ενώσεων από τα νιτρώδη άλατα, όπως οι N-νιτρωζαμίνες, στο ανθρώπινο σώμα [3]. Παρόλο που η παρουσία των νιτρωδών είναι αποδεδειγμένα ζημιογόνα για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία, τα άλατα των νιτρωδών χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά τροφίμων σε προϊόντα κόκκινου κρέατος. Για αυτό, η ανάπτυξη ευαίσθητων μεθόδων για τον ακριβή προσδιορισμό των νιτρωδών είναι πολύ σημαντική. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού, σύμφωνα με το πρότυπο AOAC, είναι φασματοφωτομετρική και βασίζεται στη διαζώτωση μιας αρωματικής αμίνης και τον σχηματισμό ενός αζωχρώματος. Επίσης, έχουν εφαρμοσθεί χρωματογραφικές [4,5], φθορισμομετρικές [5,6] και τεχνικές παλμικής πολαρογραφίας [7], αλλά αν και είναι αρκετά ευαίσθητες, είναι χρονοβόρες, απαιτούν μεγάλο όγκο αντιδραστηρίων, δεν είναι απόλυτα εκλεκτικές και χρησιμοποιούν τοξικά αντιδραστήρια. Διάφορες κινητικές μέθοδοι έχουν εφαρμοσθεί

για τον προσδιορισμό των νιτρωδών αλλά και αυτές χρησιμοποιούν καρκινογόνα αντιδραστήρια και υστερούν ως προς την εκλεκτικότητα σε σχέση με τις χημειομετρικές μεθόδους, όπως αυτή που προτείνεται εδώ [8-13]. Ο σκοπός της παρούσης εργασίας είναι ακριβώς η ανάπτυξη ενός κινητικού χημειομετρικού μοντέλου για τον προσδιορισμό των νιτρωδών ανιόντων, το οποίο δεν χρησιμοποιεί καρκινογόνα αντιδραστήρια, η προεπεξεργασία των δειγμάτων μειώνεται στο ελάχιστο, ενώ ταυτόχρονα επιδιώκεται η βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, όπως η εκλεκτικότητα, ο χρόνος ανάλυσης, η ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης. Η αντίδραση μεταξύ του TB και των βρωμικών έχει χρησιμοποιηθεί ως μια ενδεικτική αντίδραση για τον προσδιορισμό του Ru^{III} και του V^{V}, καταλυτικά [14]. Η μη καταλυτική αντίδραση έχει μια πολύπλοκη κινητική συμπεριφορά, με χρόνο ημιζωής 1000 s και ανήκει στην κατηγορία των χημικών ταλαντώσεων της τάξης Belousov-Zabotinsky [15]. Παρουσία, νιτρικών το αποφασιστικό για την ταχύτητα στάδιο της αντίδρασης επιταχύνεται (αντίδραση ψευδοπρώτης τάξης) και η συνολική αντίδραση λαμβάνει χώρα σε χρόνο 1 s, επιτρέποντας κατά αυτό τον τρόπο τον κινητικό προσδιορισμό του καταλύτη. Η αντίδραση συμπεριλαμβάνει πολλά στάδια, με τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών, και συνοψίζεται ως ακολούθως:



Κυανούν της Θυμόλης

όπου κυανό της θυμόλης: 4,4'-(3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidene)bis[5-methyl-2-(1-methy l ethyl)phenol]S,S-dioxide, άλας του νατρίου και P1 είναι το ο-σουλφονυλοβενζοϊκό οξύ και P2 το 2,2΄-μέθυλο-5,5-πρόπυλο-4,4΄-φαινυλοκινόνη.

Όπως αποδείχθηκε από την επίδραση του pH στην ταχύτητα της αντίδρασης η ενεργή μορφή του καταλύτη είναι το νιτρώδες οξύ (HNO_2). Η δοκιμή t εφαρμόσθηκε για τη σύγκριση των προτεινόμενης μεθόδου παρουσία παρεμποδίζουσών ουσιών και της μονοπαραμετρικής τεχνικής απουσία παρεμποδίσεων [16] (I.A.Pettas, S.I.Lafis, M.I.Karayannis, Anal. Chim. Acta,376, (1998), 331-337) και βρέθηκε ότι τα αποτελέσματά τους είναι στατιστικά ισοδύναμα. Τέλος, η μέθοδος συγκρίθηκε ως προς τη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς, την ευαισθησία και την ακρίβεια με την επίσημη μέθοδο σύμφωνα με τα πρότυπα AOAC, η οποία βασίζεται στον σχηματισμό ενός αζωχρώματος, παραγόμενου σε pH 2.0-2.5 από την αντίδραση του σουλφανιλικού οξέος με α-ναφθυλαμίνη [17].

7.3.2. Πειραματικά

7.3.2.1. Αντιδραστήρια

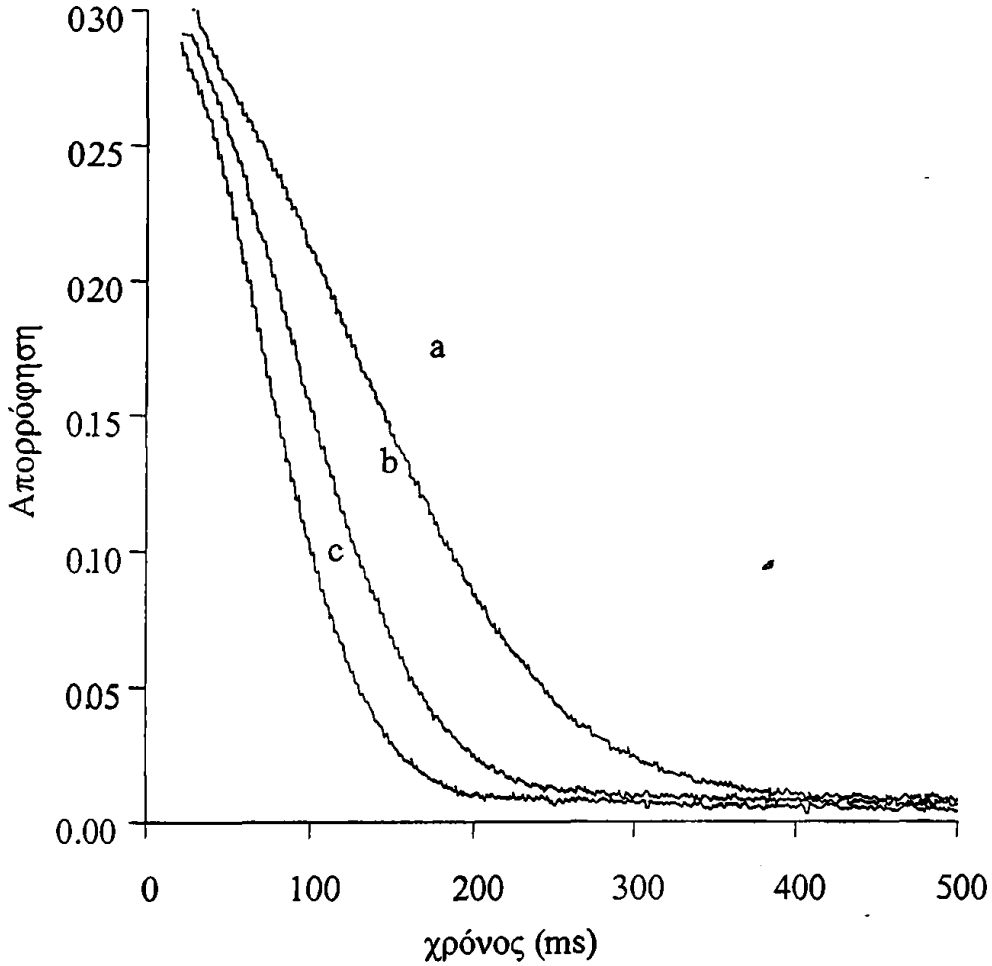
Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απεσταγμένο νερό. Όλα τα διαλύματα, εκτός από το διάλυμα θειικού οξέος, ήταν πρόσφατα παρασκευασμένα. 100 ml νιτρωδών (1000 mg l^{-1}) ενός διαλύματος παρακαταθήκης παρασκευάστηκε με τη διάλυση 1.5000 g νιτρώδους νατρίου (Sigma) σε νερό, μετά από ξήρανση για 2 ώρες στους 110°C. Διαλύματα θειικού οξέος παρασκευάστηκαν με την ανάλογη αραίωση πυκνού θειικού οξέος (Merck) με νερό. Διάλυμα βρωμικών, συγκέντρωσης 0.1 M παρασκευάστηκε με τη διάλυση 1.6700 g βρωμικού καλίου (Sigma) σε νερό μέχρι όγκου 100 ml. Διάλυμα 100 mg lt^{-1} κυανού της θυμόλης παρασκευάστηκε με τη διάλυση 0.0100 g κυανού της θυμόλης σε νερό, μετάγγιση σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραίωση μέχρι χαραγής.

7.3.2.2. Φασματοφωτομετρία

Η οπτική διαδρομή της κυψελίδας ήταν 1 cm. Η μοριακή απορροφητικότητα ε του κυανού της θυμόλης στα 543 nm, που ήταν το μήκος κύματος που παρατήρησης για τη μονοπαραμετρική μέθοδο και το μέγιστο του φάσματος απορρόφησης υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης της γραφικής παράστασης της απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου (Σχήμα) και βρέθηκε ίση με $\varepsilon = 2.32 \times 10^4$ mol^{-1} cm^{-1}.

7.3.2.3. Κινητικές μετρήσεις

Οι μετρήσεις των κινητικών καμπυλών έγιναν με μια διάταξη αναχαίτισης της ροής, (SF), Biosequential SX17MV, Applied Photophysics , UK. Η θερμοκρασία ήταν 32°C, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Στα δείγματα νιτρικών προστίθεται H_2SO_4 και εισάγονται σε μία από τις δύο σύριγγες πληρώσεως του SF. Η άλλη σύριγγα περιείχε ένα διάλυμα TB, $KbrO_3$ και H_2SO_4 στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση παρατηρήθηκε για περίπου 0,5 s (Σχήμα 7.3.1).



Σχήμα 7.3.1.Τυπικές κινητικές καμπύλες στα 543 nm:
a) 10 mg/lt, b) 15 mg/lt, c) 20 mg/lt νιτρώδη

7.3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η χημεία της μη καταλυτικής αντίδρασης έχει μελετηθεί διεξοδικά και ανήκει στην κατηγορία των αντιδράσεων B-Z για συστήματα χημικών ταλαντώσεων. Η καταλυτική

αντίδραση είναι ενός σταδίου όπως φαίνεται από τις κινητικές καμπύλες του σχήματος 7.3.1, καθώς ο καταλύτης οδηγεί την αντίδραση μέσω ενός ταχύτατου βήματος αποικοδόμησης [14]. Κάτω από αυτές τις συνθήκες και εξασφαλίζοντας συνθήκες ψευδοπρώτης τάξεως, έλαβε χώρα η βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και το pH.

7.3.3.1. Μελέτη της ταχύτητας της αντίδρασης

Σύμφωνα με την εξίσωση (7.3.1) της αντίδρασης και θεωρώντας ότι η ταχύτητα καταστροφής του ΤΒ ισούται με την ταχύτητα μείωσης της συγκεντρώσεως του HNO_2 ο νόμος της ταχύτητας μπορεί να γραφεί ως:

$$-\frac{d[TB]}{dt} = -\frac{dC_{NO_2^-}}{dt} = k[TB]^x [BrO_3^-]^y [HNO_2]^z = k[TB]^x [BrO_3^-]^y \left(\frac{[H^+]}{K_{HNO_2} + [H^+]} C_{NO_2^-}\right)^z \quad (7.3.1)$$

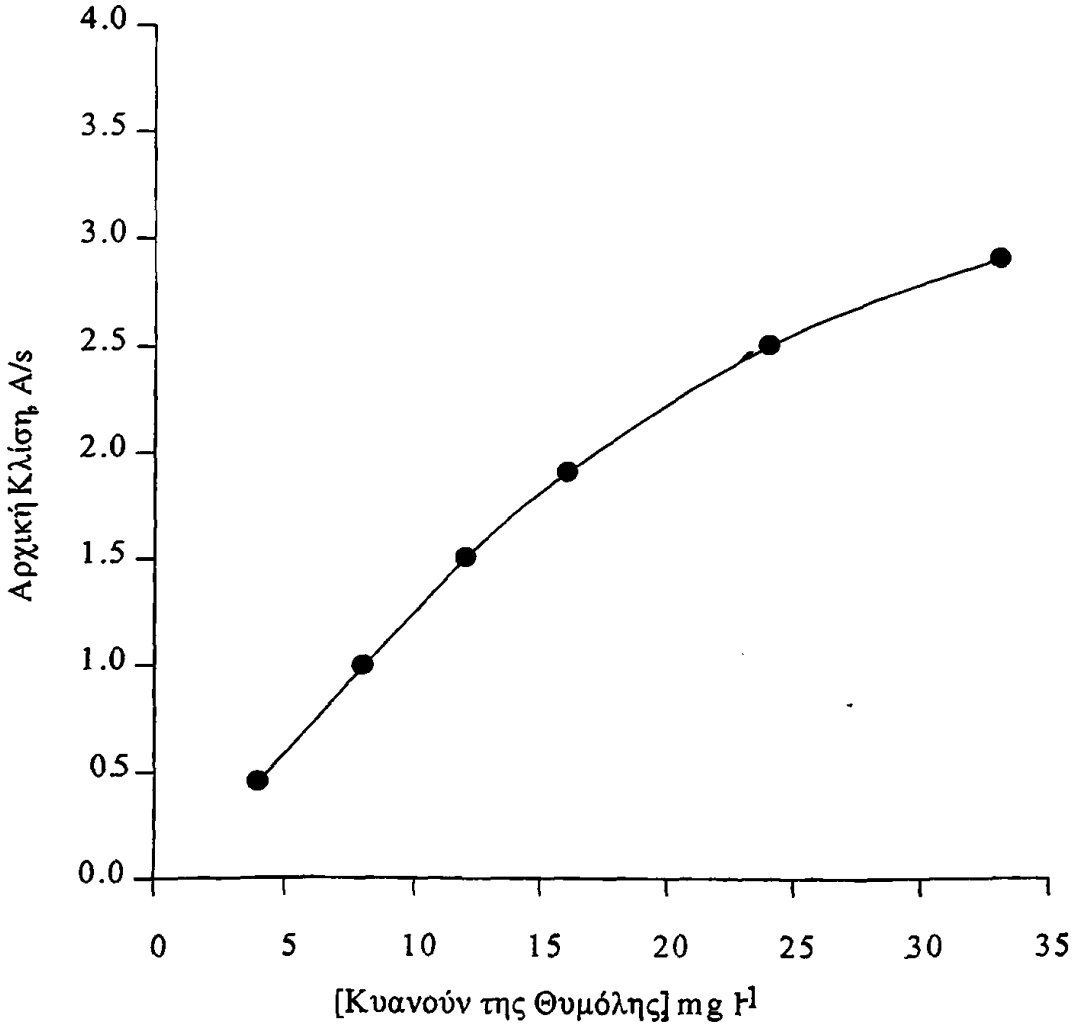
όπου $C_{NO_2^-}$ είναι η αναλυτική συγκέντρωση των νιτρωδών και K_{HNO_2} = 4,5x10-4 είναι η σταθερά διάστασης του HNO_2. Από την παραπάνω εξίσωση προτείνεται ότι το δραστικό συστατικό για να λάβει χώρα η κατάλυση είναι το πρωτονιωμένο νιτρώδες ανιόν, HNO_2. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις pH (pH<1), $[H^+] >> K_{HNO_2}$ και ο παράγοντας $\frac{[H^+]}{K_{HNO_2} + [H^+]} \cong 1$, επειδή $K_{HNO_2} + [H^+] \cong [H^+]$. Όταν οι συγκεντρώσεις των ΤΒ, BrO_3^- και H^+ διατηρούνται σταθερές και σε περίσσεια, έχει βρεθεί ότι η αντίδραση είναι πρώτης τάξεως ως προς την $C_{NO_2^-}$ και αντικαθιστώντας $k[TB]^x[BrO_3^-]^y = k_{ob}$ η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας, k_{ob} η ταχύτητα της μείωσης της απορρόφησης του ΤΒ είναι ίση με την ταχύτητα μείωσης $C_{NO_2^-}$, z = 1. Εισάγοντας το μέγεθος της απορρόφησης Α έχουμε:

$$dA/dt = d(\varepsilon b[TB])/dt = \varepsilon b d[TB]/dt = \varepsilon b d C_{NO_2^-}/dt = \varepsilon b k_{ob} C_{NO_2^-} \quad (7.3.2)$$

Το σχήμα 7.3.1 αναπαριστάνει κινητικές καμπύλες της αντίδρασης ΤΒ με βρωμικά ανιόντα παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων νιτρωδών. Με τη κινητική μελέτη της αποικοδόμησης του ΤΒ κατασκευάστηκε μια καμπύλη αναφοράς από τις αρχικές κλίσεις (dA/dt) των αρχικών ευθυγράμμων τμημάτων των κινητικών καμπυλών ως προς τη $C_{NO_2^-}$, σύμφωνα με την εξίσωση 7.3.2.

7.3.3.2. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων αντίδρασης

Η επίδραση του ΤΒ μελετήθηκε με την παρακολούθηση της μεταβολής της απορρόφησης, μεταβάλλοντας μόνο τη συγκέντρωση αυτού του αντιδραστηρίου και κρατώντας τις άλλες παραμέτρους σταθερές. Ως βέλτιστη τιμή επιλέχθηκε αυτή η οποία δίνει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και λόγο σήματος προς θόρυβο. Από τα πειραματικά



Σχήμα 7.3.2. Επίδραση της [ΤΒ] στην αρχική κλίση της αντίδρασης $t = 32^o$ C, $[H_2SO_4] = 0.6$ M, $[BrO_3^-] = 0.015$ M, $[NO_2^-] = 25$ mg/lt

αποτελέσματα επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 25 mg l^{-1} η οποία αντιστοιχεί σε αρχική ταχύτητα 2,5 A s^{-1} όπως φαίνεται στο σχήμα 7.3.2.

Η καμπύλη του σχήματος περιγράφεται από την εξίσωση 7.3.3:

$$dA/dt=Q[TB]^x \qquad (7.3.3)$$

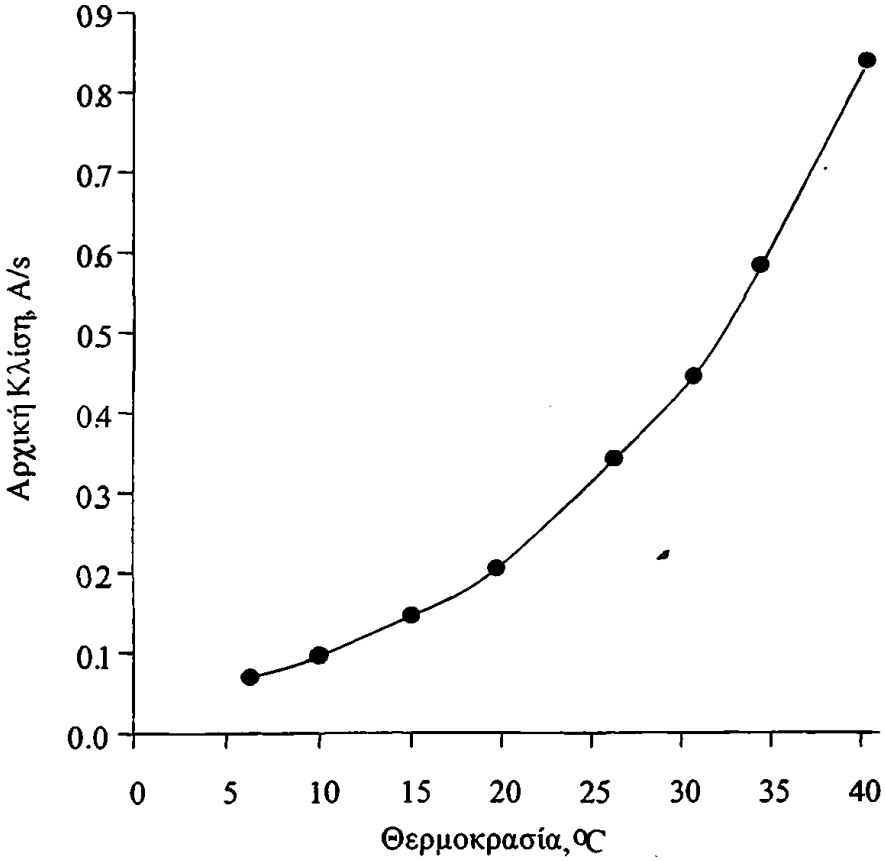
όπου x είναι η τάξη της αντίδρασης σε σχέση με τη συγκέντρωση του TB, και $Q=\varepsilon bk[BrO_3^-]^y C_{NO_2^-}$ είναι σταθερή ποσότητα. Λογαριθμίζοντας την παραπάνω σχέση παίρνουμε:

$$\ln(dA/dt) = \ln Q + x\ln[TB] \qquad (7.3.4)$$

Η γραφική παράσταση του ln(dA/dt) ως προς ln[TB] είναι ευθεία γραμμή με κλίση 1.09, προτείνοντας ότι η τάξη της αντίδρασης είναι 1 ως προς το TB. Η παρασκευή διαλυμάτων με διαφορετικές τιμές του pH έγινε με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών ποσών H_2SO_4. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση 0.6 M H_2SO_4, η οποία αντιστοιχεί σε τιμή pH < 1 είναι αυτή που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Μια τόσο χαμηλή τιμή pH μετατοπίζει την ισορροπία διάστασης του HNO_2 προς τα αριστερά και σε συνδυασμό με την αντίστοιχη αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης η αδιάστατη όξινη μορφή των νιτρωδών προτείνεται ως το δραστικό σωματίδιο κατά την κατάλυση. Στο σχήμα 7.3.3 αναπαριστάνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα της αντίδρασης. Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αυξανόταν με την αύξηση της θερμοκρασίας, αν και σε θερμοκρασίες άνω των 40° C παρατηρήθηκε η δημιουργία φυσαλίδων στην κυψελίδα του SF. Για αυτό, σαν θερμοκρασία εργασίας επιλέχθηκε αυτή των 32° C.

Το σχήμα 7.3.4 δείχνει την επίδραση της συγκέντρωσης των βρωμικών στην ταχύτητα της αντίδρασης. Αυξανομένης της συγκέντρωσης των βρωμικών η ταχύτητα επιταχύνεται με μη γραμμικό τρόπο. Η εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση των βρωμικών ανιόντων είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των χημικά ταλαντούμενων συστημάτων.

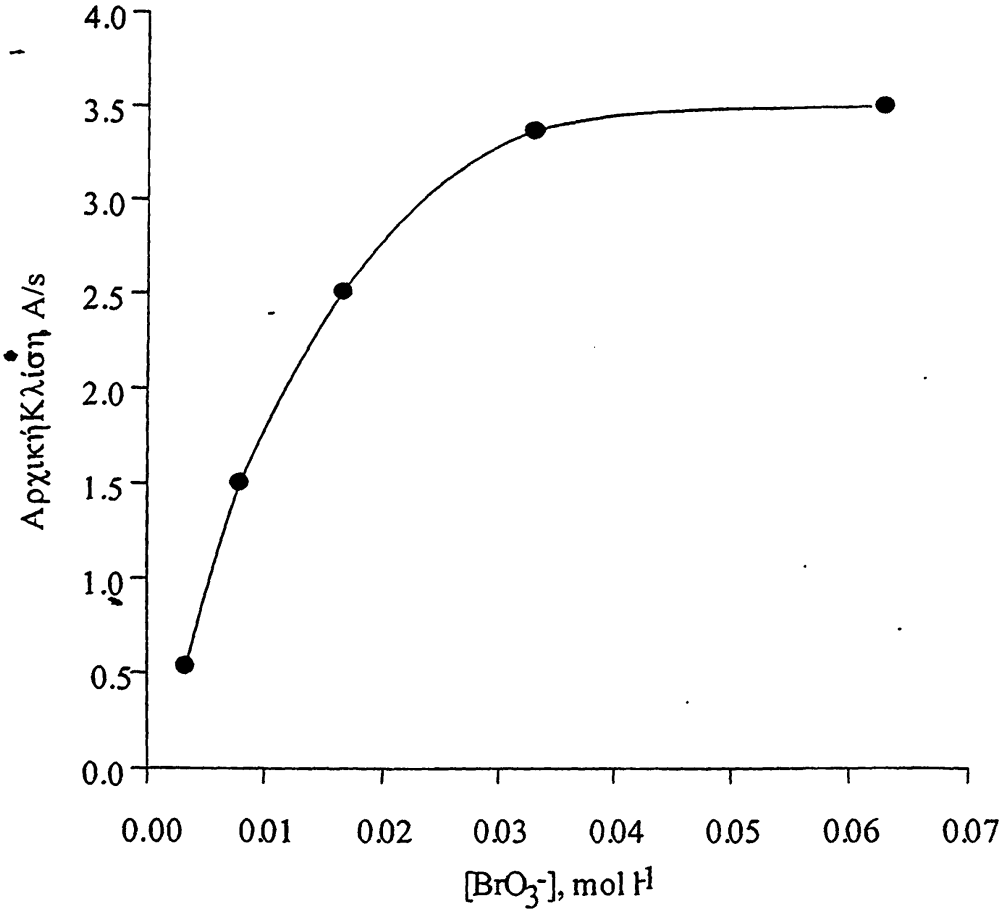
Για τη μέθοδο προσδιορισμού των νιτρωδών ανιόντων η συγκέντρωση των βρωμικών ήταν ίση με $1,5x10^{-2}$ M ή $5x10^{-2}$ M, ανάλογα με την περιοχή συγκέντρωσης του αναλύτη.



Σχήμα 7.3.3. Επίδραση της Θερμοκρασίας στην αρχική κλίση της αντίδρασης
[TB] = 33 mg/lt, $[H_2SO_4]$ = 0.6 M, $[BrO_3^-]$ = 0.015 M, $[NO_2^-]$ = 25 mg/lt

Για τον υπολογισμό της τάξης της αντίδρασης ως προς τα βρωμικά, λογαριθμίστηκε η σχέση 7.3.5:

$$dA/dt=Q'[BrO_3^-]^y \qquad (7.3.5)$$



Σχήμα 7.3.4. Επίδραση της $[BrO_3^-]$ στην αρχική κλίση της αντίδρασης
$t = 32^o$ C, $[H_2SO_4] = 0.6$ M, [TB] = 33 mg/lt, $[NO_2^-] = 25$ mg/lt

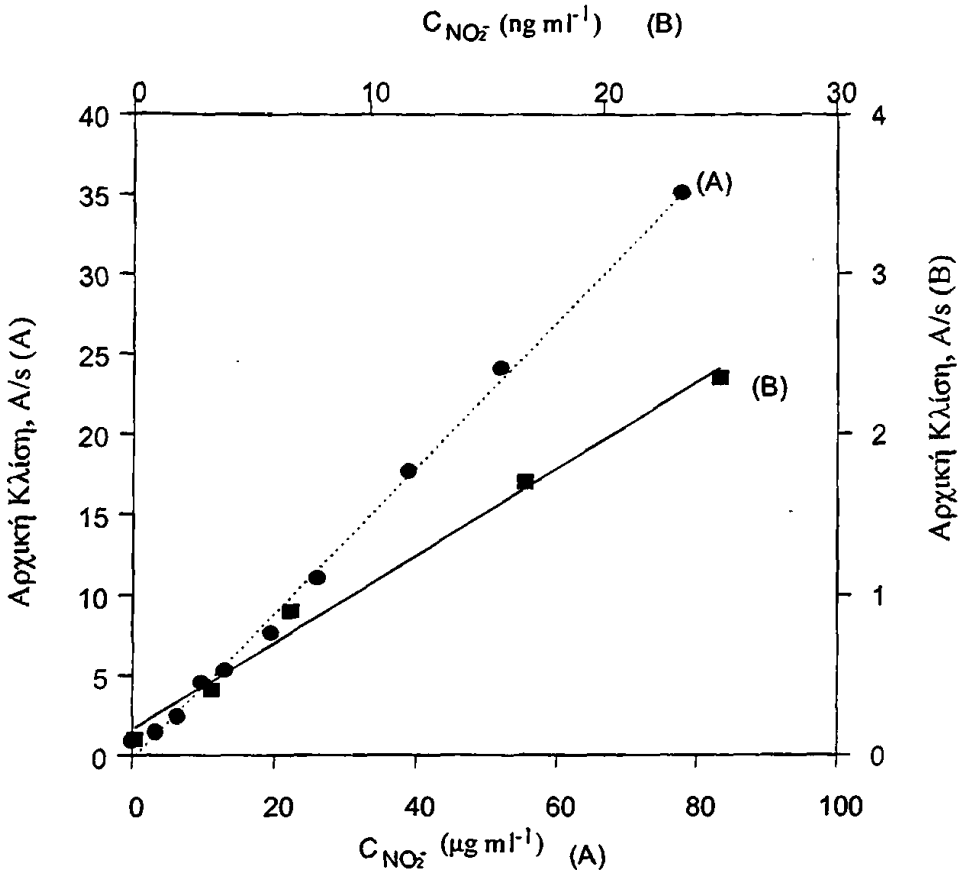
όπου Q΄ είναι σταθερή ποσότητα και y η τάξη της αντίδρασης. Η λογαρίθμηση δεν κατέληξε σε γραμμική σχέση, ενώ μη γραμμική συμμεταβολή και προσαρμογή των δεδομένων έδειξε ότι η καμπύλη του σχήματος είναι εκθετικά αυξανόμενη, σύμφωνα με την εξίσωση 7.3.6:

$$\left(\frac{dA}{dt}\right)_t = \left(\frac{dA}{dt}\right)_\infty \left(1 - e^{-\lambda[BrO_3^-]}\right) \qquad (7.3.6)$$

όπου $\lambda = 67{,}93 \pm 7{,}04$ είναι σταθερά, και $\left(\frac{dA}{dt}\right)_\infty = 3{,}612 \pm 0{,}302$.

Στο σχήμα 7.3.5 απεικονίζεται η αρχική ταχύτητα σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των νιτρωδών σε δύο περιοχές συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα είναι εμφανής και στις δύο καμπύλες αναφοράς και δείχνει ότι η καταλυτική αντίδραση είναι ψευδοπρώτης τάξης ως

προς τα νιτρικά κάτω από τις προαναφερόμενες πειραματικές συνθήκες και για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.



Σχήμα 7.3.5. Καμπύλες Αναφοράς. (A): Υψηλές συγκεντρώσεις Νιτρωδών, (B): Χαμηλές Συγκεντρώσεις Νιτρωδών. t = 32° C, $[H_2SO_4]$ = 0.6 M, [TB] = 33 mg/lt, $[BrO_3^-]$ = 50 mM

Η καμπύλη αναφοράς για τις χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών απεικονίζεται στο σχήμα 6(α) με συντελεστή συσχέτισης r = 0,9971. Για συγκεντρώσεις των νιτρωδών πάνω από τα 100 ng ml^{-1} η ταχύτητα του αρχικού σταδίου της αντίδρασης αυξανόταν περισσότερο με αποτέλεσμα την εξαφάνιση της γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς. Για τον προσδιορισμό υψηλότερων τιμών συγκεντρώσεων νιτρωδών σύμφωνα με το προτεινόμενο σχήμα 7.3.5, η συγκέντρωση των βρωμικών ανιόντων ελαττώθηκε. Έτσι, για τον προσδιορισμό των νιτρικών σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 80 ng.l^{-1} χρησιμοποιήθηκαν 5x10^{-2} M βρωμικών, ενώ στην περιοχή από 0.1-25 mg.l^{-1} η συγκέντρωση των βρωμικών ήταν 1,5x10^{-2} M. Η μείωση της συγκέντρωσης των βρωμικών ανιόντων είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας καμπύλης αναφοράς,

με r = 0,9907 και εφαρμόσθηκε για τον προσδιορισμό υψηλοτέρων συγκεντρώσεων νιτρωδών. Από την εξίσωση 7.3.7

$$C_L = k.s_B/m \qquad (7.3.7)$$

όπου: C_L είναι το όριο ανίχνευσης

k = 2, ένας αριθμητικός συντελεστής επιλεγμένος για 95% όρια εμπιστοσύνης

s_B = 4,5 ± 0.13 είναι η τυπική απόκλιση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης

m = 0,0899 είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς

υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και βρέθηκε ίσο με 4,5 ng ml^{-1} [18].

7.3.3.3. Παρεμποδίσεις

Για την εκτίμηση της εκλεκτικότητας της μονοπαραμετρικής μεθόδου μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων πιθανών παρεμποδιστικών ουσιών (Πίνακας 1). Το όριο ανοχής ήταν ίσο με τη συγκέντρωση του προστιθέμενου ιόντος, το οποίο έδινε σχετικό σφάλμα < 5 %. Τα νιτρικά ανιόντα παρεμποδίζουν σε 20πλάσια συγκέντρωση, ενώ τα ιωδιούχα σε 100πλάσια συγκέντρωση από αυτή των βρωμιούχων. Και τα δύο ανιόντα δρουν ως επιταχυντές στην ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης. Μελετήθηκε επίσης και η παρεμποδιστική δράση διαφόρων μετάλλων, όπως του Hg^{2+}, του Pb^{2+}, του Mg^{2+}, του Co^{3+} και άλλων μετάλλων. Πολλά από αυτά δεν παρεμποδίζουν ακόμα και σε συγκεντρώσεις κατά 2000 φορές μεγαλύτερες των νιτρωδών. Μέταλλα με μεγάλο ατομικό βάρος έχουν μια επιβραδυντική επίδραση στην ταχύτητα της αντίδρασης πιθανώς λόγω της δημιουργίας αδιάλυτων ενώσεων με τη ΤΒ.

Πίνακας 1. Επίδραση διαφόρων παρεμποδιστικών ουσιών κατά τον προσδιορισμό 70 ng ml^{-1} νιτρωδών

Παρεμποδιστικό Ιόν	Μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση (mg ml^{-1}) για 5% σχετικό σφάλμα πρόβλεψης NO_2
Βρωμιούχα	1,4
Υδράργυρος (ΙΙ)	-
Χαλκός (ΙΙ)	15,0
Ιωδιούχα	7,0
Σίδηρος (ΙΙ)	5,0
Μαγνήσιο (ΙΙ)	-
Νικέλιο (ΙΙ)	-

Νιτρικά	2,0
Κάλιο	-
Βανάδιο (V)	1,4

7.3.4. Αναλυτικές Εφαρμογές

7.3.4.1. Προσδιορισμός των νιτρωδών σε δείγματα τροφίμων

Για κρεατοσκευάσματα (κονσέρβες βοδινού ή χοιρινού κρέατος) 1 g του δείγματος ομογενοποιήθηκε με άμμο σε γουδί. Ακολούθησε η πέψη του μίγματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml με 100 ml θερμού νερού. Η φιάλη τοποθετείται σε ατμόλουτρο για 2 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml κεκορεσμένου ύδατος $HgCl_2$ και μετά από ψύξη συμπληρώνεται ο όγκος του διαλύματος μέχρι χαραγής. Ακολουθεί ανάμιξη, διήθηση του μίγματος και έκπλυση του ηθμού με απεσταγμένο νερό. Το διαυγές διήθημα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό ώστε η μέγιστη τιμή της απορρόφησης να μην υπερβαίνει το 2. Το προκύπτον διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με τις προτεινόμενες μεθόδους και με την επίσημη μέθοδο AOAC.

7.3.4.2. Προσδιορισμός των νιτρωδών σε δείγματα νερού

Για 4 δείγματα, 10 ml εμφιαλωμένου νερού ή νερού βρύσης αραιώθηκαν μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml με απεσταγμένο νερό. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα κρέατος και νερού ήταν σε ικανοποιητική συμφωνία με αυτά που λήφθηκαν με την επίσημη μέθοδο AOAC (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Προσδιορισμός νιτρωδών στο νερό και σε κρεατοσκευάσματα

	Υπολογιζόμενη Σγκέντρωση Νιτρωδών, $\mu g\ g^{-1}$		
	Προτεινόμενη Μέθοδος	Επίσημη Μέθοδος AOAC	Τιμές Κατασκευαστή
Corned beef			0,050
Δείγμα 1	0,053	0,050	
Δείγμα 2	0,051	0,051	
Luncheon meat			0,020
Δείγμα 1	0,021	0,018	
Δείγμα 2	0,020	0,021	
Νερό Βρύσης			
Δείγμα 1	0,013	0,010	
Δείγμα 2	0,011	0,009	

Εμφιαλωμένο Νερό			0,000
Δείγμα 1	0,010	0,010	
Δείγμα 2	0,010	0,010	

7.3.5. Πολυπαραμετρική ανάλυση των νιτρωδών

Οι συνθήκες βελτιστοποίησης που εφαρμόσθηκαν για την μονοπαραμετρική μέθοδο ήταν οι ίδιες και για την πολυπαραμετρική, για λόγους συγκρίσεως των δύο μεθόδων. Κατά την πολυπαραμετρική βαθμονόμηση δεν χρειάζεται βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών ώστε να έχουμε παρεκλίσεις από τη γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς, ή σφάλματα λόγω μικρής ευαισθησίας, αρκεί τα δείγματα βαθμονόμησης να είναι όσο το δυνατό αντιπροσωπευτικότερα των αγνώστων δειγμάτων, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία λήψεως των κινητικών δεδομένων και ο λόγος σήματος προς θόρυβο. Τυχαία ποσά νιτρικών ανιόντων, η οποία δρα αποδεδειγμένα παρεμποδιστικά στην αντίδραση, προστέθηκαν σε συνθετικά διαλύματα νιτρωδών και υπολογίστηκε η καμπύλη αναφοράς στα 534 nm. Όπως φαίνεται από το σχήμα, η παρουσία παρεμποδίσεων ισοδυναμεί με την ύπαρξη υψηλού θορύβου, ο οποίος μπορεί να απομακρυνθεί με την τεχνική PLS. Έτσι, η πολυπαραμετρική βαθμονόμηση μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς σε δείγματα όπου δεν απαιτείται απομάκρυνσή των παρεμποδίσεων ή χρησιμοποίηση καλυπτικών αντιδραστηρίων, μικραίνοντας το χρόνο ανάλυσης και κάνοντας εφικτή την παρακολούθηση της μεταβολής της συγκεντρώσεως ενός αναλύτη σε πραγματικό χρόνο, με όλα τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από αυτό. Στο σχήμα 7.3.6 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς για πρότυπα δείγματα νιτρωδών (κύκλοι) και για δείγματα με προσθήκη νιτρικών (τετράγωνα), μιας από τις πιο παρεμποδίζουσες ενώσεις που συναντάται συχνά μαζί με τα νιτρώδη σε πραγματικά δείγματα.

Πίνακας 3. Σύσταση των δειγμάτων βαθμονόμησης παρουσία γνωστών ποσοτήτων νιτρικών ανιόντων

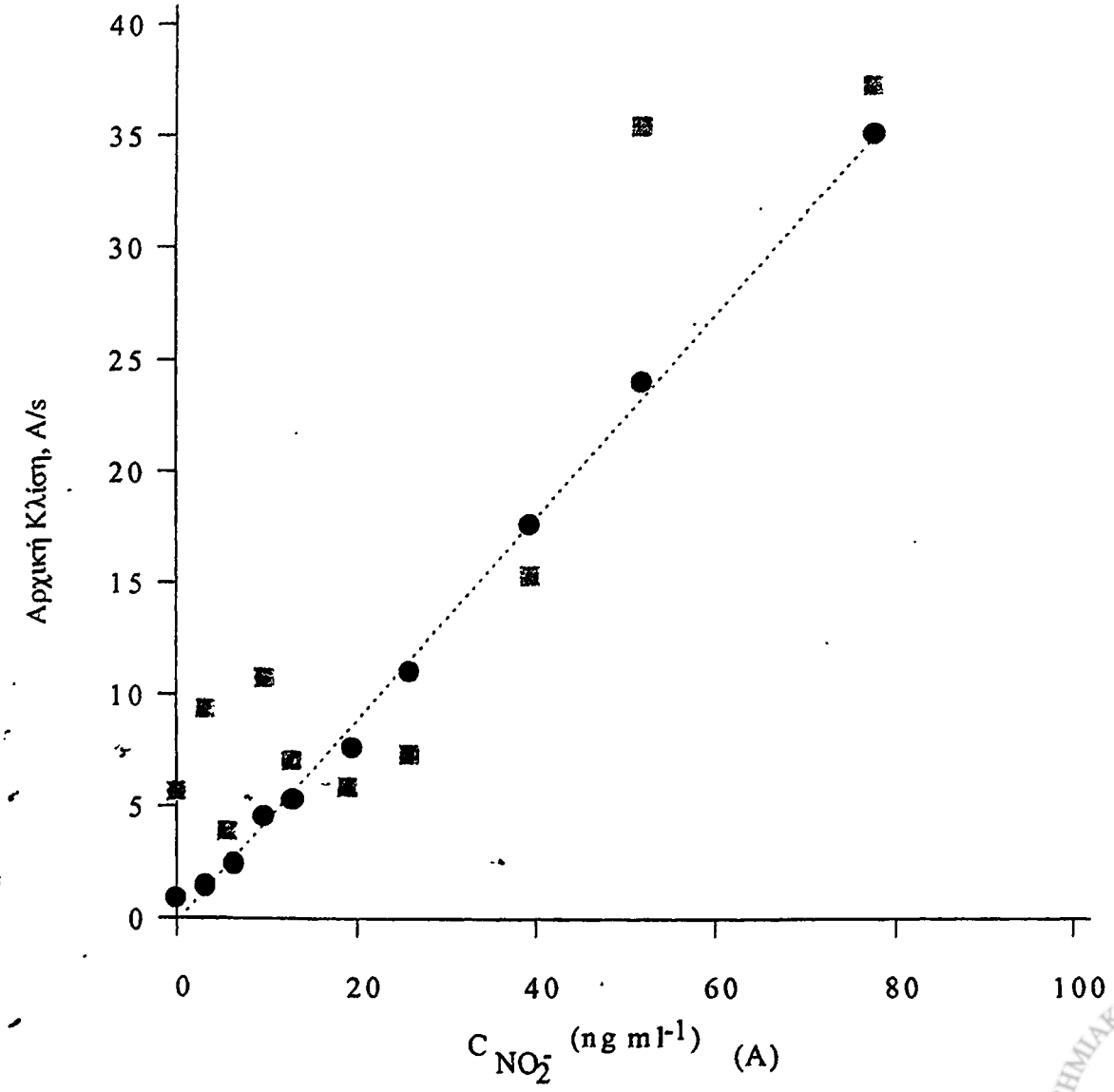
Δείγματα Βαθμονόμησης	
Νιτρώδη, $ng.l^{-1}$	Νιτρικά, $mg.l^{-1}$
0,5	12
3	18

7	5
10	15
12	9
20	3
27	1
40	0
52	20
79	10

Είναι φανερό ότι με αυτή τη μέθοδο, ο προσδιορισμός των νιτρωδών γίνεται με πολύ μεγάλη αβεβαιότητα. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων νιτρωδών παρουσία νιτρικών με την PLS βρέθηκε ότι είναι στατιστικά ισοδύναμος (έχει την ίδια ακρίβεια) με τη μονοπαραμετρική μέθοδο απουσία νιτρικών ανιόντων, χρησιμοποιώντας τον έλεγχο t κατά ζεύγη για 95 % όρια εμπιστοσύνης.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα επικύρωσης για 14 συνθετικά δείγματα παρουσία νιτρικών.

Δείγματα Επικύρωσης		SEP, Μέθοδος PLS, παρουσία Νιτρικών	SEP, Μονοπαραμετρική Μέθοδος, απουσία Νιτρικών
Συγκέντρωση Νιτρωδών, $ng.l^{-1}$	Συγκέντρωση Νιτρικών, $mg.l^{-1}$		
0,5	2	0,0	0,2
1,0	12	10,0	3,2
3,0	18	3,3	1,9
5,0	5	6,0	3,8
7,0	15	2,9	4,4
10,0	9	1,8	2,1
15,0	30	7,1	4,9
20,0	1	1,6	1,6
30,0	0	1,0	2,4
40,0	3	0,1	1,1



Σχήμα 7.3.6. Η καμπύλη αναφοράς στα 534 nm πριν (●) και μετά ( ) την προσθήκη τυχαίων ποσών νιτρικών ανιόντων, σε 10 συνθετικά διαλύματα νιτρωδών

45,0	10	1,1	2,1
50,0	15	2,0	1,8
75,0	5	0,1	0,5
100,0	35	5,2	4,3

7.3.6. Συμπεράσματα

Η αντίδραση μεταξύ του ΤΒ και των βρωμικών ανιόντων, καταλυόμενη από τα νιτρώδη μελετήθηκε για τον κινητικό προσδιορισμό των νιτρωδών ανιόντων. Η αντίδραση βρέθηκε ότι είναι πρώτης τάξης ως προς τη συγκέντρωση των νιτρικών και της συγκέντρωσης του ΤΒ, αλλά δεν κατέστη δυνατό να βρεθεί η τάξη της αντίδρασης ως προς τα βρωμικά ανιόντα. Επίσης βρέθηκε ότι η αντίδραση προχωρά μέσω ενός βήματος που περιέχει μόρια νιτρώδους οξέος. Για τον προσδιορισμό των νιτρωδών κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες αναφοράς για δύο περιοχές συγκεντρώσεων, με όριο ανίχνευσης ίσο με 4,5 ng ml^{-1}. Η μέθοδος εφαρμόσθηκε στον προσδιορισμό των νιτρωδών σε δείγματα τροφίμων και νερού και τα αποτελέσματα βρέθηκαν να είναι σε ικανοποιητική συμφωνία με αυτά που λήφθηκαν με την επίσημη μέθοδο AOAC.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. I.A. Wolff, A.E. Wasserman, Science, 1972, 177, 15.
2. K.K. Chio, K.W. Fung, Analyst, 1980, 105, 241.
3. U. Lijinsky, S.S. Epstein, Nature, 1970, 223, 21.
4. Z. Iskandarani, D.J. Pietrzyk, Anal. Chem., 1982, 54, 2601.
5. S.H. Lee, L.R. Field, Anal. Chem., 1984, 56, 2647.
6. S. Motomizu, M. Hiroshi, Talanta, 1986, 33, 792.
7. P. Damiani, G. Burini, Talanta, 1986, 33, 649.
8. Z. Gao, G. Wang, Z. Zhao, Anal. Chim. Acta, 1990, 230, 105.
9. L. Anderson, Anal. Chim. Acta, 1980, 114, 191.
10. J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.R.S. Souto, J. Agric. Food Chem., 1995, 43, 704.
11. A. Kojlo, E. Gorodkiewicz, Anal. Chim. Acta, 1995, 302, 283.
12. J.F. van Staden, Anal. Chim. Acta, 1982, 138, 403.
13. M.I. Karayannis, E.A. Piperaki, M.M. Maniadaki, Anal. Lett., 1986, 19(1), 13.
14. S.B. Jonnalagadda, C.R. Chinake, I. Love, Fresenius' J. Anal. Chem. 1994, 349, 829.
15. S.B. Jonnalagadda, C. Chinake, R.H. Simoyl, J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1995, 91, 1635.
16. (I.A.Pettas, S.I.Lafis, M.I.Karayannis, Anal. Chim. Acta, 1998, 376, 331.
17. K. Helrich (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1990.
18. G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 1983, 55, 712A.

7.4. Εφαρμογή της Τεχνικής Αναχαίτισης της Ροής στον Ταυτόχρονο Κινητικό Προσδιορισμό Κοβαλτίου και Νικελίου

Περίληψη

Η μέθοδος των αρχικών κλίσεων σε συνδυασμό με την πολυπαραμετρική ανάλυση εφαρμόστηκαν για τον ταυτόχρονο κινητικό προσδιορισμό του νικελίου και του κοβαλτίου με την μέθοδο Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων (ILS). Η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου ILS βασίζεται κυρίως στις μικρές κινητικές και λιγότερο στις φασματικές διαφοροποιήσεις των συμπλόκων αυτών των μετάλλων με το πορτοκαλί της ξυλενόλης. Η παρατήρηση των αντιδράσεων έγινε σε 5, κατάλληλα επιλεγόμενα, μήκη κύματος με τη χρησιμοποίηση μια διάταξη αναχαίτισης της ροής με ανιχνευτή ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Η λήψη των φασματοκινητικών δεδομένων έγινε για κάθε μήκος κύματος και όχι ταυτόχρονα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η διακεκριμένη λήψη των δεδομένων δεν αποτελεί εμπόδιο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αναλυτών και την εφαρμογή τεχνικών πολυπαραμετρικής βαθμονόμησης, αν και τα αποτελέσματα πρόβλεψης είναι κατώτερης ποιότητας από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την μονοπαραμετρική ανάλυση.

7.4.1. Εισαγωγή

Το κοβάλτιο και το νικέλιο χρησιμοποιούνται συχνά ως προσμίξεις σε διάφορα υλικά, όπως σε κράματα μετάλλων [25]. Η ανάλυση και των δύο μετάλλων με μονοπαραμετρικές μεθόδους αρχικά απαιτεί την εφαρμογή μιας από τις μεθόδους διαχωρισμού τους [26]. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος ILS, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός μοντέλου πολυπαραμετρικής βαθμονόμησης και εφαρμόσθηκε στον ταυτόχρονο κινητικό διαχωρισμό αυτών των μετάλλων χωρίς να προηγηθεί κάποιο στάδιο διαχωρισμού. Ο προσδιορισμός του κοβαλτίου και του νικελίου έγινε με την παρατήρηση των αντιδράσεων σχηματισμού των συμπλόκων των δισθενών κατιόντων τους με το πορτοκαλί της ξυλενόλης. Κατασκευάστηκε ένα μοντέλο βαθμονόμησης με τη μέθοδο ILS χρησιμοποιώντας τις αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών σχηματισμού των συμπλόκων Co-XO και Ni-XO σε 5 διαφορετικά μήκη κύματος. Τα μήκη κύματος στα οποία έγινε η λήψη των κινητικών δεδομένων επιλέχθηκαν με κριτήρια την

αθροιστικότητα των απορροφήσεων των συμπλόκων, την υψηλή ευαισθησία και το λόγο σήματος προς θόρυβο.

7.4.2. Πειραματικό Μέρος

7.4.2.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mM Co(II) με τη διάλυση 1,235 g ένυδρου νιτρικού άλατος κοβαλτίου και 1 mM Ni(II) με τη διάλυση 1,239 g ένυδρου νιτρικού άλατος νικελίου (Merck) σε ογκομετρική φιάλη των 250ml και αραίωση μέχρι χαραγής με διπλά απεσταγμένο νερό. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα pH = 6.3 παρασκευάστηκε από ένα διάλυμα Tris, συγκέντρωσης 0,1 M. Το διάλυμα εργασίας του πορτοκαλί της ξυλενόλης (Sigma), συγκέντρωσης 1 mM, παρασκευάστηκε με ζύγιση 0,3803 g στερεάς ουσίας και αραίωση μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml με διπλά απεσταγμένο νερό.

7.4.2.2. Πειραματική Διάταξη

Οι κινητικές μετρήσεις έγιναν με ένα φασματοφωτόμετρο αναχαίτισης της ροής (Stopped-Flow, SF), μοντέλο "Biosequential SX17MV", Applied Photophysics, UK, με ανιχνευτή ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Μια λάμπα ξένου αποτελούσε την πηγή φωτός, το οποίο διερχόταν από την κυψελίδα χαλαζία, οπτικής διαδρομής μήκους 1 cm, με τη βοήθεια μιας οπτικής ίνας. Κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων τα διαλύματα στα διαμερίσματα του SF και στην κυψελίδα παρέμεναν σε σταθερή θερμοκρασία 20° C, με την κυκλοφορία νερού από ένα θερμοστατούμενο υδρόλουτρο. Τα δεδομένα συλλέγονταν και επεξεργάζονταν σε μορφή αρχείων ASCII στο σταθμό εργασίας ACORN A5000 του φασματοφωτομέτρου σε λειτουργικό σύστημα RISC OS. Ο αλγόριθμος ILS προγραμματίστηκε σε περιβάλλον MATLAB έκδοση 5.2 και «έτρεξε» σε έναν προσωπικό υπολογιστή Pentium 200 MHz.

7.4.3. Πορεία Εργασίας

7.4.3.1. Μονοπαραμετρική Βαθμονόμηση

Αρχικά, το κοβάλτιο και το νικέλιο προσδιορίστηκε χωριστά, ούτως ώστε να βρεθεί η γραμμική περιοχή των συγκεντρώσεων για τη μονοπαραμετρική βαθμονόμηση. Για αυτό, μία από τις δύο σύριγγες πληρώσεως περιείχε ένα διάλυμα $5x10^{-4}$ M πορτοκαλί της ξυλενόλης (XO), σε pH = 6.3 ρυθμισμένο με ένα ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.1 M). Η άλλη σύριγγα ήταν γεμάτη με ένα πρότυπο διάλυμα νικελίου (II), ή κοβαλτίου (II). Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων που μετρήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Σύσταση των δειγμάτων μονοπαραμετρικής βαθμονόμησης

Αριθμός δείγματος βαθμονόμησης	Αναμενόμενη Συγκέντρωση, x 10^{-4} mM	
	Co	Ni
1	1	0
2	2	0
3	3	0
4	5	0
5	9	0
6	0	1
7	0	2
8	0	3
9	0	5
10	0	9

Μετά την πλήρωση των δύο συριγγών, 0.05 ml από το κάθε διάλυμα αναμιγνύεται και λαμβάνει χώρα η αντίδραση συμπλοκοποίησης του κάθε μετάλλου με XO. Η μεταβολή της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρήθηκε στα 575 nm, που ήταν η τιμή της μέγιστης απορρόφησης του φάσματος των συμπλόκων όλων των αναλυτών. Η τεχνική των αρχικών κλίσεων εφαρμόσθηκε με την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της αρχικής κλίσης της κινητικής καμπύλης ως προς τη συγκέντρωση του μετάλλου του κάθε προτύπου δείγματος. Αν και η απορρόφηση υποβάθρου ήταν πολύ μικρή σε όλα τα παρατηρούμενα μήκη κύματος, αφαιρέθηκε πριν τη συλλογή των αναλυτικών δεδομένων. Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση.

7.4.3.2. Πολυπαραμετρική Βαθμονόμηση

Η πορεία εργασίας ήταν η ίδια όπως περιγράφεται παραπάνω, αλλά τώρα παρασκευάστηκαν μίγματα διαφορετικού λόγου συγκεντρώσεων και των δύο μετάλλων (Πίνακας 2)

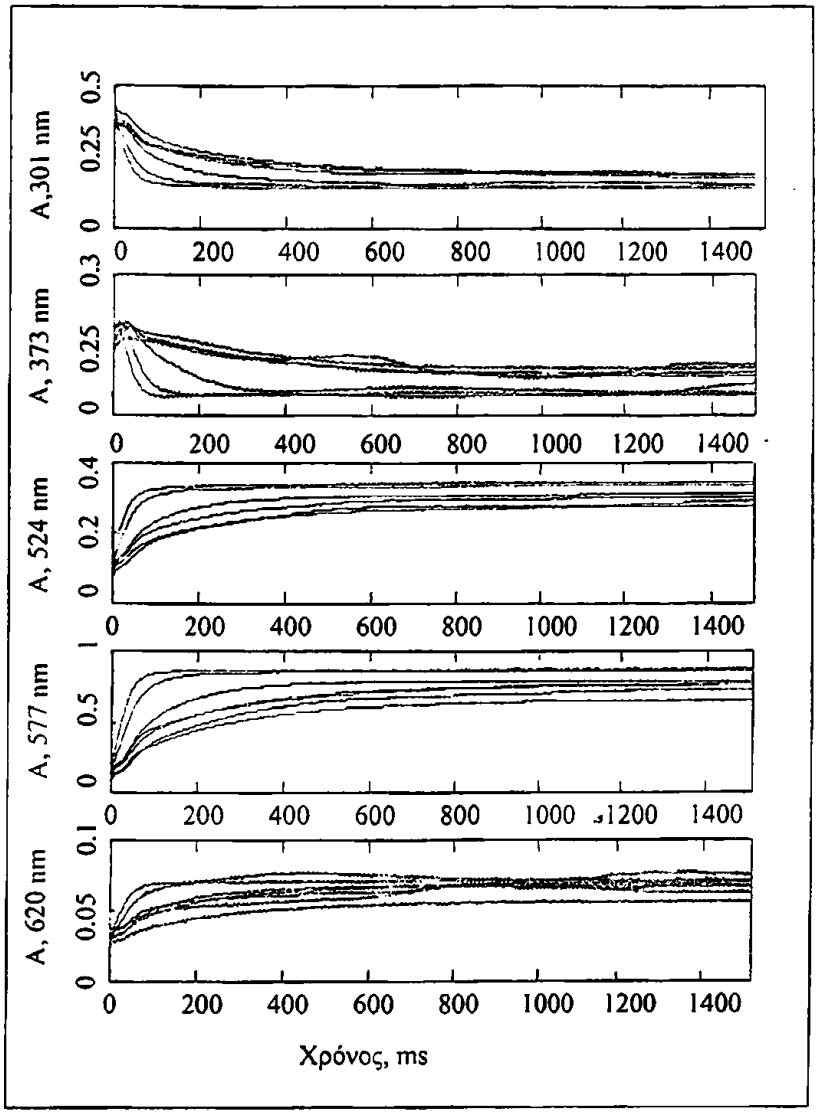
Πίνακας 2. Αποτελέσματα πρόβλεψης από 7 δείγματα βαθμονόμησης

Αριθμός δείγματος βαθμονόμησης	Αναμενόμενη Συγκέντρωση, x 10^{-4} mM	
	Co	Ni
1	1	1
2	2	3
3	5	2
4	2	1
5	4	1
6	6	5
7	1	6
8	1	4

σε συγκεντρώσεις που ήταν μέσα στα όρια της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς του κάθε αναλύτη. Η μεταβολή της απορρόφησης παρατηρήθηκε στα 301, 373, 524, 577 και 620 nm (Σχήμα 7.4.1). Ο λόγος των συγκεντρώσεων των δύο αναλυτών ([Co] : [Ni]) ήταν διαφορετικός σε κάθε μίγμα βαθμονόμησης για την αποφυγή συγγραμμικότητας. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται μια σειρά από 5 αρχικές κλίσεις, σε κάθε μήκος κύματος, και κατασκευάζεται ένας 5 x 7 πίνακας με αριθμό σειρών ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων και αριθμό γραμμών ίσο με τον αριθμό των μηκών κύματος, ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση.

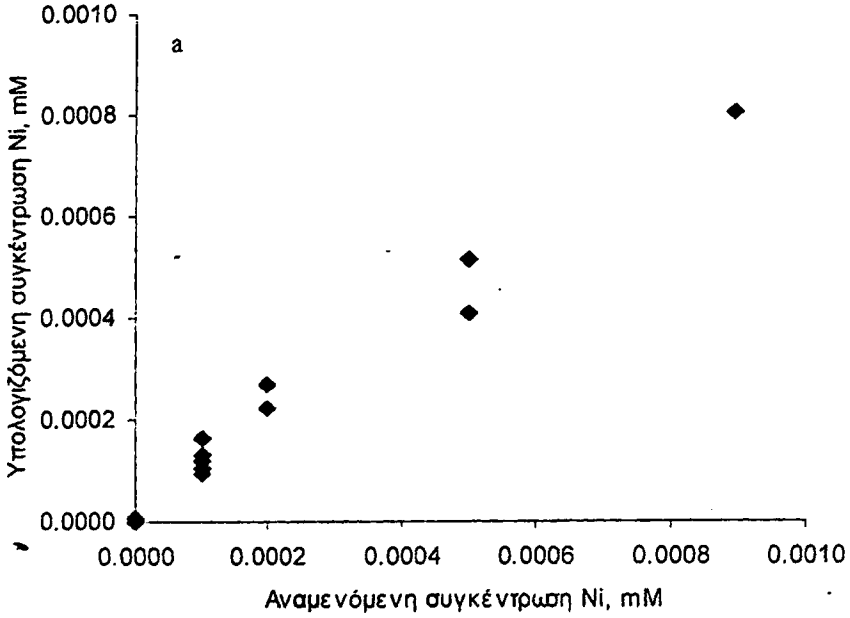
7.4.3.3. Αντεστραμμένα Ελάχιστα Τετράγωνα (ILS)

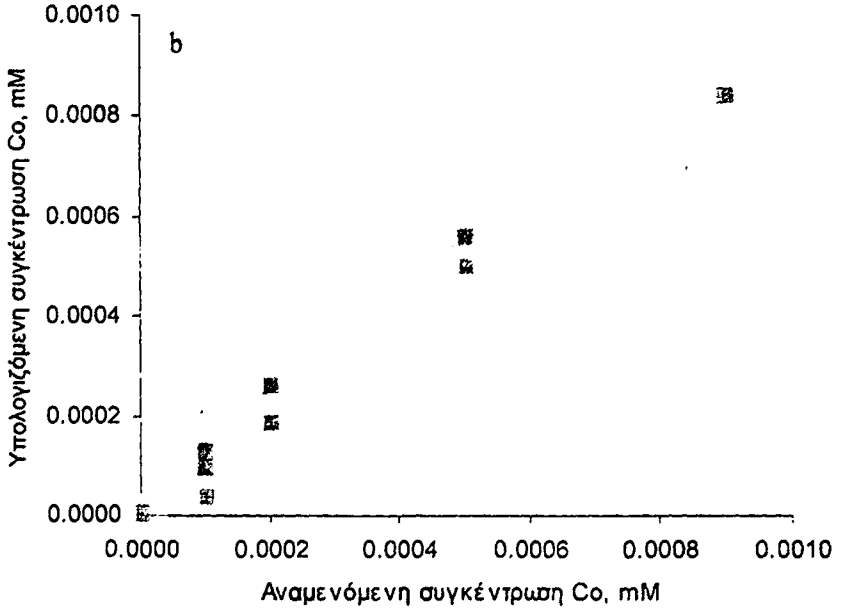
Η εξίσωση του μοντέλου αυτής της μεθόδου βασίζεται στην αντιστροφή του νόμου του Beer όπου οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι οι απορροφήσεις, οι οποίες, με τον



Σχήμα 7.4.1. Κινητικές καμπύλες σχηματισμού των συμπλόκων Co-XO και Ni-XO σε 5 μήκη κύματος

πολλαπλασιασμό των συνελεστών βαθμονόμησης p, δίνουν τις τιμές των συγκεντρώσεων των έγχρωμων ενώσεων του κάθε δείγματος: $c = (\varepsilon b)^{-1}A$, όπου A είναι η απορρόφηση, ε η μολαρική απορροφητικότητα και c η συγκέντρωση των σωματιδίων που απορροφούν στα παρατηρούμενα μήκη κύματος. Για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, οι εξαρτημένες μεταβλητές είναι οι αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών, σύμφωνα με την εξίσωση: $c = (\varepsilon bk)^{-1}dA/dt$, όπου dA/dt είναι η αρχική κλίση της

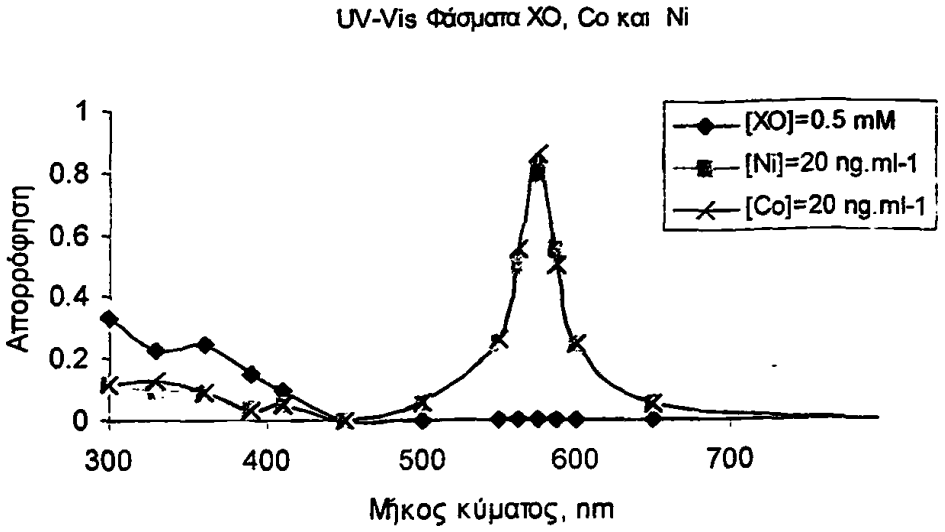




Σχήμα 7.4.2. Διαγράμματα της αναμενόμενης συγκέντρωσης ως προς την υπολογιζόμενη συγκέντρωση του νικελίου (a) και κοβαλτίου (b) σε ανεξάρτητα δείγματα επικύρωσης

κινητικής καμπύλης και k η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της κάθε αντίδρασης. Για να εξεταστεί η συμπεριφορά της μεθόδου κατά την πρόβλεψη, το βαθμονομούμενο μοντέλο προσαρμόστηκε στα δείγματα βαθμονόμησης και σε δείγματα εξωτερικής αξιολόγησης και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν και εξετάστηκαν γραφικά (Σχήμα 7.4.2).

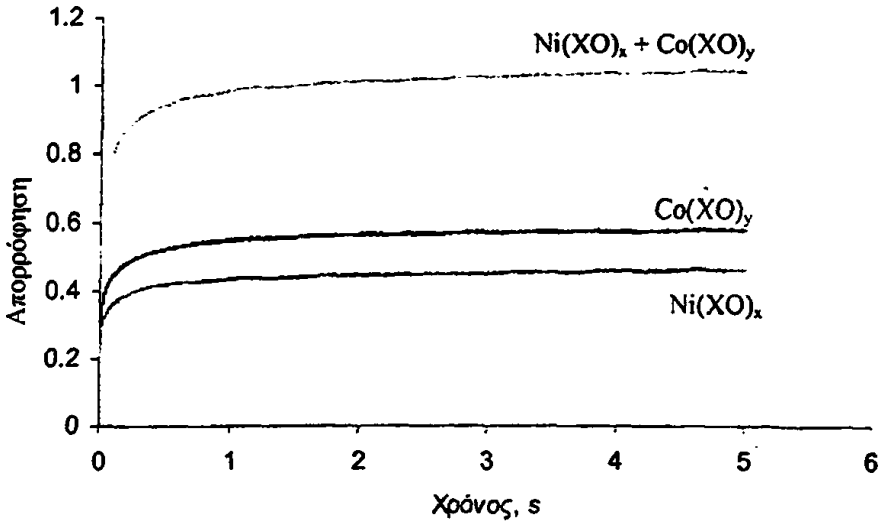
7.4.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση



Σχήμα 7.4.3. Φάσματα συμπλόκων του νικελίου και του κοβαλτίου με το πορτοκαλί της ξυλενόλης

7.4.4.1. Κινητική Μελέτη

Το πορτοκαλί της ξυλενόλης σχηματίζει ταχέως έγχρωμα σύμπλοκα προϊόντα με το κοβάλτιο και το νικέλιο σε ουδέτερο pH σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σύμπλοκα του



Σχήμα 7.4.4. Κινητικά προφίλ του σχηματισμού των συμπλόκων του νικελίου και του κοβαλτίου με το πορτοκαλί της ξυλενόλης

νικελίου και του κοβαλτίου έχουν μικρές φασματικές διαφοροποιήσεις, όπως φαίνεται στο σχήμα 7.4.3. Στο σχήμα 7.4.4 φαίνονται τα κινητικά προφίλ για τα δύο μέταλλα, στις ίδιες συνθήκες. Ο λόγος των αρχικών ταχυτήτων του κοβαλτίου ως προς το νικέλιο ήταν 1.53:1. Ο χρόνος ημιζωής των δύο αντιδράσεων κυμαίνεται από μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου μέχρι λίγα δευτερόλεπτα, κάνοντας την κινητική μελέτη εφικτή μόνο με τη χρήση οργανολογίας ταχειών αντιδράσεων, όπως το SF. Για τα 5 παρατηρούμενα μήκη κύματος, η ολική αρχική κλίση κάθε κινητικής καμπύλης ενός μίγματος ισούται με το άθροισμα των αρχικών κλίσεων που οφείλεται στην αντίδραση του κάθε αναλύτη. Η αθροιστικότητα των απορροφήσεων και συνεπώς και των αρχικών κλίσεων ήταν και ένα από τα κριτήρια επιλογής των μηκών κύματος. Αν και οι συνθήκες των αντιδράσεων έχουν επιλεγεί έτσι ώστε μόνο μία μορφή του ΧΟ να είναι πρακτικά παρούσα (περίσσεια ΧΟ), οι σταθερές ισορροπίας και άλλων συμπλόκων πιθανά με διαφορετικό ε μπορεί να ευνοούν και δευτερεύουσες παράλληλες αντιδράσεις, οδηγώντας στην εξαφάνιση της αθροιστικότητας των απορρόφήσεων σε άλλα μήκη κύματος [19, 20]. Η τεχνική αναχαίτισης της ροής με τη δυνατότητα για ταχεία ανάμιξη και ομογενοποίηση των διαλυμάτων των δύο αντιδρώντων επέτρεψε ώστε οι τιμές των αρχικών κλίσεων να ακολουθούν αντίδραση πρώτης τάξης με τον κάθε αναλύτη και επίσης να είναι προσθετικές.

7.4.4.2. Βελτιστοποίηση Αναλυτικών Παραμέτρων

Είναι γνωστό ότι σε υδατικά διαλύματα η ΧΟ βρίσκεται σε οκτώ διαφορετικές μορφές [19]. Για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας αντίδρασης των τριών αναλυτών με περισσότερες εκ των μία μορφές του υποκαταστάτη, με πιθανό αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσοτέρων του ενός έγχρωμων προϊόντων με διαφορετικό ε, η ΧΟ ήταν πάντα σε 10πλάσια συγκέντρωση από τα προσδιοριζόμενα μέταλλα. Διάφορες παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν το σύστημα βελτιστοποιήθηκαν με την εφαρμογή της μονοπαραμετρικής μεθόδου και των αρχικών κλίσεων των κινητικών καμπυλών στη μέγιστη τιμή της απορρόφησης στα 575 nm (για όλους τους αναλύτες). Κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σαν βέλτιστες τιμές των εξεταζομένων παραμέτρων θεωρήθηκαν αυτές που απέδιδαν την χαμηλότερη δυνατή τυπική απόκλιση, την υψηλότερη ευαισθησία, για συνθήκες αντιδράσεων όπου και οι δύο αναλύτες

ακολουθούσαν κινητική πρώτης τάξεως. Για τη διατήρηση του pH σε τιμές χαμηλότερες από αυτές όπου συμβαίνει αποπρωτονίωση του υποκαταστάτη και σχηματισμός παρεμποδιζουσών ουσιών, όπως σύμπλοκα με άλλα μέταλλα (κάλιο, ή νάτριο) που βρίσκονται στο διάλυμα απαιτείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris με pH = 6.3. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί την περαιτέρω αύξηση της ταχύτητας της ήδη πολύ γρήγορης αντίδρασης, έτσι ώστε μεγαλύτερες τιμές από την θερμοκρασία δωματίου φτάνουν στα όρια μετρήσεως, δηλαδή στο νεκρό χρόνο του SF. Για αυτό, ως θερμοκρασία εργασίας επιλέχθηκε αυτή των 20 °C.

7.4.4.3. Χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς των σχεδιαζόμενων μοντέλων

Οι αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών που λήφθηκαν για 13 μίγματα διαφορετικής σύστασης των δύο μετάλλων, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του πίνακα των συντελεστών βαθμονόμησης **P**, όπως περιγράφεται παραπάνω. Αυτός ο πίνακας χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των αναλυτών στα δείγματα βαθμονόμησης. Η εφαρμογή του κάθε μοντέλου στα δείγματα βαθμονόμησης δεν αποτελεί κριτήριο εκτίμησης της προβλέψιμης ικανότητας των μεθόδων, αλλά δείχνει το πόσο καλά προσαρμόζονται τα δεδομένα βαθμονόμησης στη γραμμική εξίσωση των μοντέλων. Για την εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης σε άγνωστα δείγματα, οι πίνακες βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των τριών μετάλλων σε 13 ανεξάρτητα μίγματά επικύρωσης που δεν συμπεριλήφθηκαν στη βαθμονόμηση. Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα αποτελέσματα, τα οποία ήταν αρκετά παρόμοια για το κοβάλτιο και το νικέλιο. (SEP = sqrt[(sum(-y)^2/N-1]).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα πρόβλεψης από 13 δείγματα επικύρωσης

Αναμενόμενη Συγκέντρωση, x 10^{-4} mM		Υπολογιζόμενη Συγκέντρωση, x 10^{-4} mM		% Ανάκτηση		SEP	
Co	Ni	Co	Ni	Co	Ni	Co, (-y)^2	Ni, (-y)^2
1,00	0,00	1,290	0,070	128,9	-	0,0841	0,0049
2,00	0,00	1,880	0,060	94,0	-	0,0144	0,0036
5,00	0,00	4,990	0,600	99,8	-	0,0001	0,3600
1,00	1,00	0,370	1,000	37,3	100,0	0,3969	0,0000
1,00	2,00	1,160	2,700	115,7	135,0	0,0256	0,4900

1,00	5,00	0,940	4,100	94,0	82,0	0,0036	0,8100
1,00	9,00	1,200	8,000	120,0	88,9	0,0400	1,0000
2,00	1,00	2.600	0,930	130.0	93.0	0,3600	68,8900
5,00	1,00	5,600	1,200	112.0	120.0	0,3600	0,0400
9,00	1,00	8,400	1.700	93.3	170.0	0,3600	0,4900
0,00	1,00	0,620	1,200	-	120.0	0,3844	0,0400
0,00	2,00	0,170	2,200	-	110.0	0,0289	0,0400
0,00	5,00	0,900	5,100	-	102.0	0,8100	0,0100
						0,4888	2,4525

Έτσι, η μέθοδος προβλέπει τις συγκεντρώσεις των αναλυτών εκμεταλλευόμενη κυρίως τις κινητικές και όχι τις φασματικές διαφοροποιήσεις. Η βαθμονόμηση έλαβε χώρα με την χρησιμοποίηση προτύπων μιγμάτων δύο αναλυτών, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. Η παρασκευή προτύπων δειγμάτων ενός συστατικού δεν είναι απαραίτητη. Οι δύο μέθοδοι εφαρμόσθηκαν επιτυχώς σε διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης κοβαλτίου και νικελίου σε σχετικές αναλογίες από 4 : 1 σε 1 : 5 με σφάλματα μικρότερα του 5 %. Το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν 7,5-100 $ng.ml^{-1}$ και 7,5-70 $ng.ml^{-1}$ για το κοβάλτιο και το νικέλιο, αντίστοιχα.

7.4.4.4. Παρεμποδίσεις

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με την προσθήκη διαφόρων πιθανά παρεμποδιζουσών ουσιών, όπως μερικά άλλα μέταλλα που βρίσκονται σε κράματα μετάλλων μαζί με το κοβάλτιο και το νικέλιο (Πίνακας 3).

Πίνακας 4. Παρεμποδιστική δράση διαφόρων μετάλλων κατά τον προσδιορισμό 20 $ng.ml^{-1}$ κοβαλτίου, 20 $ng.ml^{-1}$ και νικελίου παρουσία ΧΟ, συγκέντρωσης 10^{-3} $mol.lt^{-1}$

Παρεμποδίζουσα Ουσία	Μέγιστη Επιτρεπτή Συγκέντρωση ($\mu g.ml^{-1}$) για 5 % σχετικό σφάλμα
Χαλκός	20
Βανάδιο	50
Ψευδάργυρος	100
Μαγνήσιο	1000
Μόλυβδος	1000
Κάλιο	1000
Χρώμιο	2000

Το όριο ανοχής ορίστηκε ώς η συγκέντρωση της προστιθέμενης ουσίας η οποία δίνει σχετικό σφάλμα 5 % ή λιγότερο. Η ΧΟ είναι ένα μη εκλεκτικό αντιδραστήριο και σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με μια πληθώρα μετάλλων. Όμως, η ταχύτητα συμπλοκοποίησης πολλών από αυτά είναι πολύ αργή σε θερμοκρασία δωματίου και για τα περισσότερα απαιτείται θέρμανση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100° C για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ειδικότερα το χρώμιο, ένα πολύ συνηθισμένο πρόσθετο σε χάλυβες και μεταλλικά κράματα είναι πρακτικά αδρανές σε οποιαδήποτε οξειδωτική βαθμίδα και δεν παρεμποδίζει ακόμα και σε μεγάλες τιμές συγκέντρωσης.

7.4.5. Συμπεράσματα

Ο ταυτόχρονος κινητικός προσδιορισμός του κοβαλτίου και του νικελίου αναφέρεται στην περίπτωση όπου το χημικό σύστημα αποτελείται από αναλύτες που διαφοροποιούνται κινητικά, ενώ τα φάσματά των συμπλόκων τους εμφανίζουν μεγάλη αλληλεπικάλυψη. Ο συνδυασμένος διαχωρισμός κυρίως των κινητικών και λιγότερο των φασματικών διαφοροποιήσεων, με την χρησιμοποίηση της τεχνικής SF και ενός χημειομετρικού αλγόριθμου, όπως η μέθοδος ILS, επέτρεψε τον επιτυχή προσδιορισμό των δύο μετάλλων. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από ένα φασματοφωτόμετρο με μονοχρωμάτορα και ανιχνευτή φωτοπολλαπλασιαστή έχει συγκριτικά με άλλες οργανολογίες (βλέπε ενότητα 5.2) μειονεκτήματα, όπως σφάλματα μέτρησης κατά την επιλογή του μήκους κύματος από τον μονοχρωμάτορα και το σχετικά μεγάλο χρόνο λήψεως κινητικών δεδομένων. Όμως, η ακρίβεια με την οποία έγιναν οι προβλέψεις σε αυτή την εργασία επισημαίνει την πολλά υποσχόμενη προβλέψιμη ικανότητα χημειομετρικών μεθόδων για μη εκλεκτικά συστήματα, και την μεγάλη δυνατότητα περαιτέρω βελτίωσης της ακρίβειας με την κατάλληλη οργανολογία (βλέπε κεφάλαιο 7.5).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η βιβλιογραφία αυτού του κεφαλαίου δίνεται μαζί με το κεφάλαιο 7.5, στις σελίδες 138-139.

7.5. Ταυτόχρονος Κινητικός Προσδιορισμός Κοβαλτίου, Νικελίου και Σιδήρου συνδυάζοντας την Τεχνική Αναχαίτισης της Ροής με Ανιχνευτή Σύζευξης Φορτίου. Εφαρμογή σε Μεταλλικά Κράματα

Περίληψη

Εφαρμόστηκαν δύο κινητικές προσεγγίσεις για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του νικελίου, του κοβαλτίου και του σιδήρου με την μέθοδο Αντεστραμμένων Ελαχίστων Τετραγώνων (ILS), χρησιμοποιώντας ολόκληρες τις κινητικές καμπύλες ή τις αρχικές κλίσεις. Η ικανότητα πρόβλεψης της μεθόδου ILS βασίζεται στις κινητικές και ταυτόχρονα φασματικές διαφοροποιήσεις αυτών των μετάλλων οι οποίες συμβαίνουν σε ένα μεγάλο αριθμό μηκών κύματος, κατά την αντίδρασή τους με το πορτοκαλί της ξυλενόλης. Οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης παρατηρήθηκαν με έναν ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (CCD) τοποθετημένο σε μια διάταξη αναχαίτισης της ροής (Stopped-flow, SF). Αυτή η οργανολογία έκανε εφικτή τη ταυτόχρονη λήψη κινητικών δεδομένων σε ένα μέγιστο από 2048 μήκη κύματος. Η μέθοδος ILS εφαρμόσθηκε με επιτυχία στον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των μετάλλων σε κράματά τους και τα λαμβανόμενα αποτελέσματα από τις δύο διαφορετικές κινητικές προσεγγίσεις συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Η προτεινόμενη μέθοδος συγκρίθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.4 και συζητούνται συγκριτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά της.

7.5.1. Εισαγωγή

Εφαρμοσθεί διάφορες χημειομετρικές τεχνικές έχουν για τον προσδιορισμό της σύστασης μιγμάτων διάφορων αναλυτών με τη χρησιμοποίηση των φασμάτων τους στην κατάσταση χημικής ισορροπίας [1-4]. Αυτά τα φάσματα (κυρίως UV-Vis, αλλά και φθορισμού) είναι μοναδικά για κάθε δείγμα και δεν λαμβάνουν υπόψη την κινητική συμπεριφορά των αντιδράσεων των αναλυτών με ένα κοινό υποκαταστάτη, όπως συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις. Συνήθως, καταγράφουν τα φάσματα των προϊόντων, αφού οι αντιδράσεις έχουν φτάσει σε ισορροπία. Επίσης, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός απο διαφορικές κινητικές μεθόδους [5-11] για την ανάλυση των μιγμάτων αναλυτών με παρόμοια ή ίδια φάσματα τα οποία δεν επιτρέπουν την εφαρμογή μεθόδων χημικής ισορροπίας. Ο ταυτόχρονος κινητικός προσδιορισμός τέτοιων αναλυτών βασίζεται στις διαφορές των σταθερών ταχύτητας των αντιδράσεών τους. Αυτές οι διαφορές πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες, έτσι ώστε οι

διαφορικές κινητικές μέθοδοι να τις ξεχωρίζουν και να είναι επιτυχής η ανάλυση μονοπαραμετρικών δεδομένων (δηλαδή, για κάθε δείγμα λαμβάνεται ένας αριθμός από μία μοναδική μέτρηση). Παρόλα αυτά, σε περιπτώσεις όπου ένα μίγμα έχει πολύπλοκη σύσταση, οι αναλύτες βρίσκονται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης, οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεών τους είναι παρόμοιες και οι παρόμοιες χημικές τους ιδιότητες έχουν σαν αποτέλεσμα αμοιβαία παρεμποδιστική συμπεριφορά, τότε η εκλεκτικότητα της μονοπαραμετρικής μεθόδου ανάλυσης είναι πολύ χαμηλή και τα αποτελέσματα πρόβλεψης είναι φτωχά. Επίσης, οι παραδοσιακές διαφορικές κινητικές μέθοδοι είναι πολύπλοκες και στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτούν επιπλέον πληροφορίες από άλλες ανεξάρτητες μεθόδους [12]. Έχουν προταθεί διάφορες πολυπαραμετρικές μέθοδοι για την εφαρμογή πολυπαραμετρικών κινητικών προσδιορισμών [5,13,14] με αποτελέσματα που έχουν αυξανόμενη εκλεκτικότητα, εύρος και γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς, σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.

Το νικέλιο, το κοβάλτιο και ο σίδηρος έχουν παραπλήσιες χημικές ιδότητες, και έχουν προσδιοριστεί ταυτόχρονα κυρίως ηλεκτροχημικά [15] και χρωματογραφικά [16,17]. Στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται προεπεξεργασία των δειγμάτων [18]. Οι τεχνικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη συνδυάζουν τη αυξανόμενη εκλεκτικότητα και απλότητα της τεχνικής αναχαίτησης της ροής με την ισχυρή ικανότητα πρόβλεψης της χημειομετρικής μεθοδολογίας και της πολυπαραμετρικής ανίχνευσης και μπορούν να δώσουν απαντήσεις σε σύνθετες καταστάσεις, όπως ο ταυτόχρονος προσδιορισμός του νικελίου, του κοβαλτίου και του σιδήρου σε κράματά τους.

Το νικέλιο και το κοβάλτιο είναι μερικά από τα πιο διαδεδομένα μέταλλα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως προσμίξεις για την βελτίωση των ιδιοτήτων του χάλυβα και άλλων υλικών με ειδικές ιδιότητες, όπως μηχανική αντοχή και χημική αδράνεια. Επειδή και τα τρία αυτά μέταλλα είναι τοξικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ο προσδιορισμός τους σε περιβαλλοντικά δείγματα, στα τρόφιμα και στην υγιεινή είναι ιδιαίτερης σημασίας. Για την μελέτη της παρουσίας αυτών των μετάλλων σε βιομηχανικά ή περιβαλλοντικά δείγματα ρουτίνας, απαιτούνται ταχείες και ευαίσθητες μέθοδοι. Ειδικότερα, οι στόχοι αυτής της εργασίας είναι: α) ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός των τριών μετάλλων μετάπτωσης σε άγνωστα

δείγματα, β) η επίδειξη της συλλογής καλής ποιότητας και μεγάλου αριθμού δεδομένων με τη συνδυασμένη χρήση του SF με ανιχνευτή CCD και γ) η εξερεύνηση και η μαθηματική επεξεργασία πολυπαραμετρικών κινητικών δεδομένων με την τεχνική ILS και η αξιολόγηση της ικανότητάς της στο διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση των αναλυτών.

7.5.2. Πειραματικό Μέρος

7.5.2.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης, Co(II) συγκέντρωσης 1 mM, Ni(II) (1 mM) και Fe(III) (1 mM) με διάλυση των ένυδρων νιτρικών αλάτων κοβαλτίου και νικελίου (Merck) ή τριχλωριούχου σιδήρου (Sigma) σε κατάλληλη όγκο διπλά απεσταγμένου νερού. Ρυθμιστικό διάλυμα pH = 6,3 παρασκευάστηκε από ένα διάλυμα Tris συγκέντρωσης 0,1 M. Επίσης παρασκευάστηκε ένα αρχικό διάλυμα πορτοκαλί της ξυλενόλης (Sigma) συγκέντρωσης 1 mM σε διπλά απεσταγμένο νερό.

7.5.2.2. Πειραματική Διάταξη

Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις έγιναν με ένα φασματοφωτόμετρο S2000 με ανιχνευτή CCD (Ocean Optics, U.K.). Μια διάταξη SF από την Tri-tech Dynamic Instruments (Cantech Scientific Ltd., Canada), με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm συνδέθηκε με το φασματοφωτόμετρο, με τη βοήθεια οπτικών ινών. Μια λάμπα αλογόνου βολφραμίου αποτελούσε την πηγή φωτός, το οποίο διερχόταν από την κυψελίδα με τη βοήθεια οπτικών ινών. Τα διαλύματα στα διαμερίσματα του SF και στην κυψελίδα παρέμεναν σε σταθερή θερμοκρασία 20° C, με την κυκλοφορία νερού από ένα θερμοστατούμενο υδρόλουτρο. Τα δεδομένα συλλέγονταν και επεξεργάζονταν με έναν προσωπικό υπολογιστή Pentium 200 MHz. Όλοι οι εφαρμοζόμενοι αλγόριθμοι είχαν προγραμματιστεί σε περιβάλλον MATLAB έκδοση 5.2.

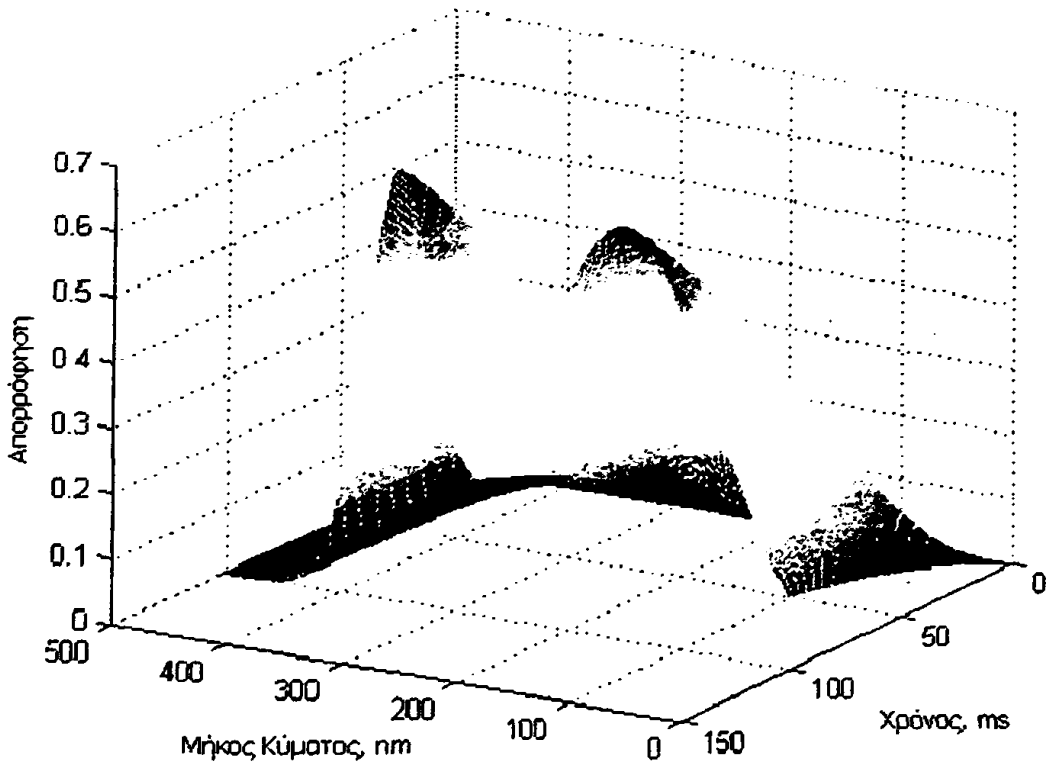
7.5.3. Πορεία Εργασίας

7.5.3.1. Μονοπαραμετρική Βαθμονόμηση

Αρχικά, ο κάθε αναλύτης προσδιορίστηκε χωριστά, ούτως ώστε να βρεθεί το εύρος της γραμμικής περιοχής των συγκεντρώσεών του για τη μονοπαραμετρική βαθμονόμηση. Για το σκοπό αυτό, μία από τις δύο σύριγγες πληρώσεως περιείχε ένα διάλυμα $5x10^{-4}$ M πορτοκαλί της ξυλενόλης (XO), με pH = 6.3 ρυθμισμένο με ένα ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.1 M). Η άλλη σύριγγα ήταν γεμάτη με ένα πρότυπο διάλυμα νικελίου (II), κοβαλτίου (II), ή σιδήρου (III) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,5 - 180 $ng.ml^{-1}$ (8,5 x 10^{-9} M – 306 x 10^{-9} M), 0,5 - 30 $ng.ml^{-1}$ (8,96 x 10^{-8} M – 537,6 x 10^{-8} M) και 0,7 - 90 $ng.ml^{-1}$ (1,2 x 10^{-8} M – 154,3 10^{-8} M) αντίστοιχα. Μετά την πλήρωση των δύο συριγγών, 0,05 ml από το κάθε διάλυμα εισάγονται μέσω του αναμίκτη στην κυψελίδα και λαμβάνει χώρα η αντίδραση συμπλοκοποίησης του κάθε μετάλλου με XO. Η μεταβολή της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρήθηκε στα 575 nm, που ήταν η τιμή της μέγιστης απορρόφησης του φάσματος των συμπλόκων όλων των αναλυτών. Εφαρμόσθηκε η τεχνική των αρχικών κλίσεων με τη χρησιμοποίηση των αρχικών κλίσεων από τις κινητικές καμπύλες των αντιδράσεων. Η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή στους 20° C κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων. Αν και η απορρόφηση υποβάθρου βρέθηκε ότι είναι αμελητέα σε όλη τη φασματική περιοχή όπου γίνονταν οι μετρήσεις, αφαιρέθηκε πριν τη συλλογή των αναλυτικών δεδομένων. Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση.

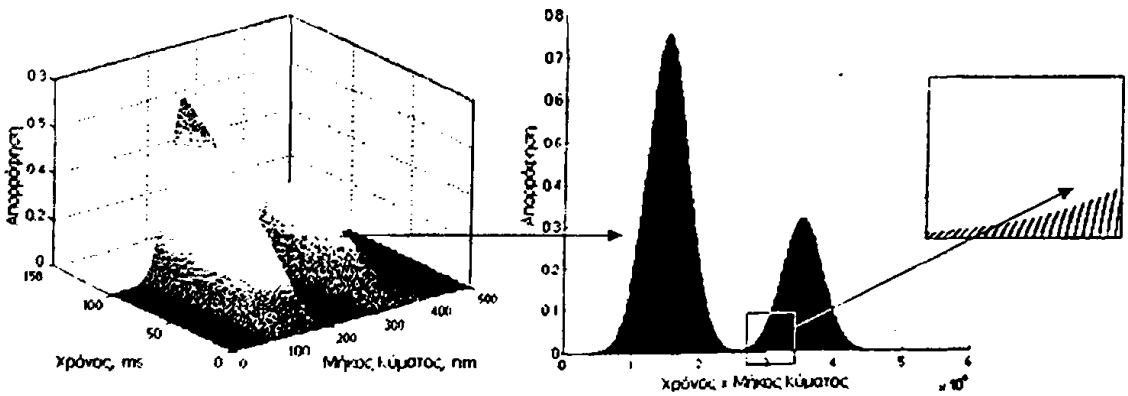
7.5.3.2. Πολυπαραμετρική Βαθμονόμηση

Η πορεία εργασίας ήταν η ίδια όπως περιγράφεται παραπάνω, αλλά τώρα παρασκευάστηκαν μίγματα διαφορετικών λόγων των συγκεντρώσεων των αναλυτών που ήταν μέσα στα όρια της γραμμικής περιοχής της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς του κάθε αναλύτη. Η μεταβολή της απορρόφησης παρατηρήθηκε ταυτόχρονα μεταξύ 190 - 900 nm ανά 0,3467 nm. Παρασκευάστηκαν συνθετικά δείγματα των τριών συστατικών με ένα πειραματικό σχεδιασμό όπου ο αριθμός των δειγμάτων ήταν τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των συστατικών ή και μεγαλύτερος, ούτως ώστε να ενισχυθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου. Ο λόγος των συγκεντρώσεων των τριών αναλυτών ([Co] : [Ni] : [Fe]) ήταν πάντα διαφορετικός για την αποφυγή συγγραμμικότητας. Η αρχική δομή των δεδομένων ήταν ένα τρισδιάστατο πακέτο τιμών, όπου οι γραμμές αντιστοιχούν σε τιμές απορρόφησης, οι στήλες σε μήκη κύματος, και η τρίτη διάσταση σε χρονικές στιγμές (Σχήμα 7.5.1).



Σχήμα 7.5.1: Απεικόνιση τρισδιάστατων δεδομένων των οποίων οι γραμμές αντιστοιχούν σε τιμές απορρόφησης (άξονας z) σε διαφορετικά μήκη κύματος (άξονας x) παρατηρούμενα ανά τακτά χρονικά διαστήματα (άξονας y).

Για την εφαρμογή τεχνικών δύο δρόμων, όπως η MLR, όπου οι πίνακες των δεδομένων πρέπει να είναι δισδιάστατοι, τα αρχικά δεδομένα τεμαχίστηκαν κατά τον άξονα του χρόνου, ώστε να παραχθούν κινητικές καμπύλες (απορρόφηση ως προς



Σχήμα 7.5.2: Τα δεδομένα τεμαχίστηκαν κατά των άξονα του χρόνου και οι κινητικές καμπύλες τοποθετήθηκαν η μία δίπλα στην άλλη.

χρόνο), οι οποίες τοποθετήθηκαν η μία δίπλα στην άλλη (Σχήμα 7.5.2). Το προκύπτον πακέτο τιμών χρησιμοποιήθηκε για βαθμονόμηση.

7.5.3.3. Μέθοδος των Αρχικών Κλίσεων

Οι αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών των αντιδράσεων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια ενός αλγορίθμου, δικού μας σχεδιασμού σε περιβάλλον MATLAB. Από τα πειραματικά κινητικά δεδομένα υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) χρησιμοποιώντας όλα τα σημεία της κάθε κινητικής καμπύλης. Αν το r είναι μικρότερο από μία προεπιλεγμένη τιμή – εδώ, r = 0.996, εξαρτώμενο από το θόρυβο – ο αριθμός των κινητικών σημείων μειώνεται κατά ένα. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθεί η ζητούμενη τιμή του r. Αφού υπολογιστούν οι αρχικές κλίσεις όλων των κινητικών καμπυλών, τα αποτελέσματα τυπώνονται. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται μια γραμμή από αρχικές κλίσεις και κατασκευάζεται ένας πίνακας με αριθμό γραμμών ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων, ο οποίος χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση. Μια λεπτομερέστερη περιγραφή του αλγόριθμου δίνεται στην ενότητα 6.3 και στο παράρτημα Ι.

7.5.3.4. Αντεστραμμένα Ελάχιστα Τετράγωνα (ILS)

Η εξίσωση του μοντέλου αυτής της μεθόδου βασίζεται στην αντιστροφή του νόμου του Beer όπου οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι οι απορροφήσεις, οι οποίες, με τον πολλαπλασιασμό των συντελεστών βαθμονόμησης p, δίνουν τις τιμές των συγκεντρώσεων των έγχρωμων ενώσεων του κάθε δείγματος:

$$c = (\varepsilon b)^{-1} A \qquad (7.5.1)$$

όπου A είναι η απορρόφηση, ε η μολαρική απορροφητικότητα και c η συγκέντρωση των σωματιδίων που απορροφούν στα παρατηρούμενα μήκη κύματος. Για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, οι εξαρτημένες μεταβλητές είναι οι αρχικές κλίσεις των κινητικών καμπυλών και όχι οι απορροφήσεις, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$c = (\varepsilon b k)^{-1} dA/dt \qquad (7.5.2)$$

όπου dA/dt είναι η αρχική κλίση της κινητικής καμπύλης και k η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της κάθε αντίδρασης. Για να εξεταστεί η συμπεριφορά της

μεθόδου κατά την πρόβλεψη, το βαθμονομούμενο μοντέλο προσαρμόστηκε στα δείγματα βαθμονόμησης και σε δείγματα εξωτερικής αξιολόγησης και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν και εξετάστηκαν γραφικά και με το σφάλμα SEP.

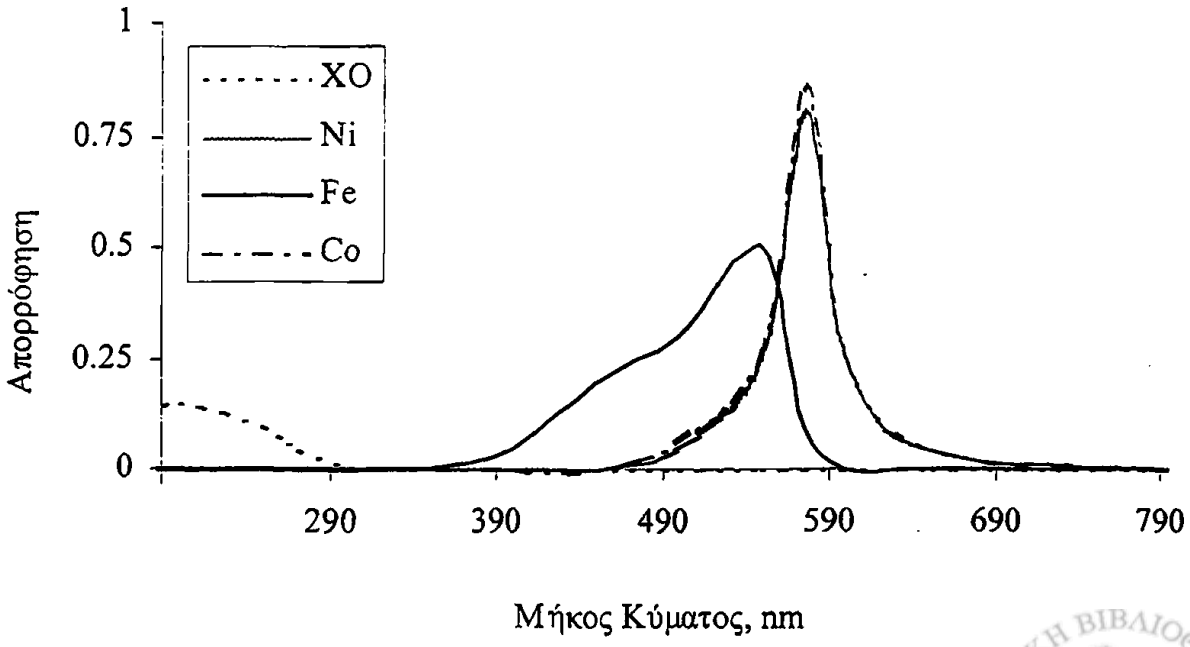
7.5.3.5. Προσδιορισμός Co, Ni, and Fe σε μεταλλικά κράματα

Κάθε δείγμα (0.1-0.5 g) επεξεργάστηκε με 5 ml πυκνού νιτρικού οξέος χωρίς ανάδευση ή θέρμανση. Μετά την πλήρη διάλυση, τα διαλύματα εξουδετερώθηκαν με KOH και αραιώθηκαν στα 100 ml με διπλά απεσταγμένο νερό.

7.5.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

7.5.4.1. Κινητική Μελέτη

Το πορτοκαλί της ξυλενόλης σχηματίζει ταχέως έγχρωμα σύμπλοκα προϊόντα με το κοβάλτιο, το νικέλιο και τον σίδηρο σε ουδέτερο pH και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σύμπλοκα του νικελίου και του κοβαλτίου είναι σχεδόν πανομοιότυπα, ενώ το φάσμα του συμπλόκου του σιδήρου έχει μικρή διαφοροποίηση από τα άλλα δύο, αν και εδώ υπάρχει επίσης μεγάλη φασματική αλληλεπικάλυψη (Σχήμα 7.5.3).



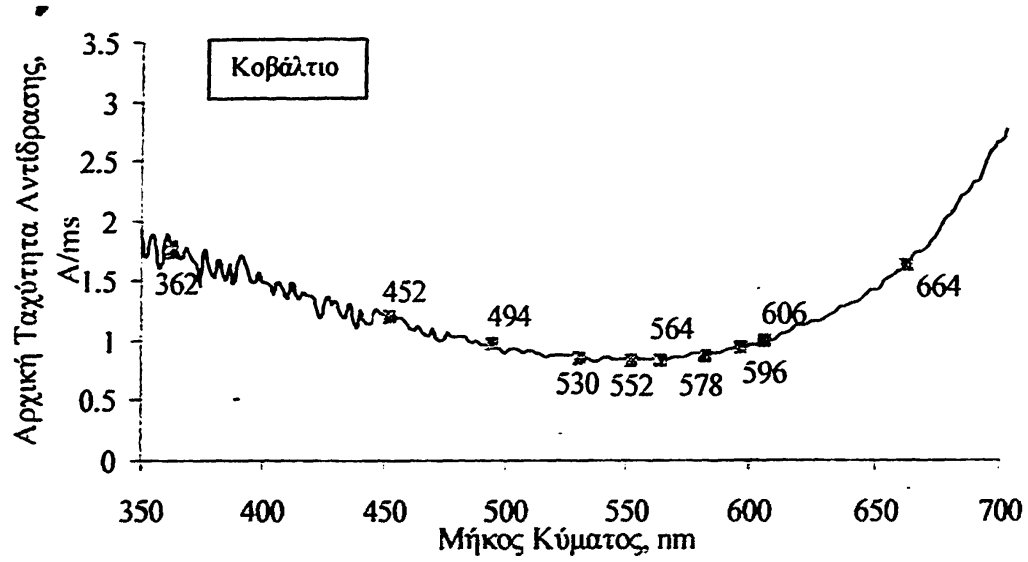
Σχήμα 7.5.3: Φάσματα UV-Vis του πορτοκαλί της ξυλενόλης ([XO] = 1 mM) και των συμπλόκων της με κοβάλτιο 20 $ng.ml^{-1}$, νικέλιο 20 $ng.ml^{-1}$, και σίδηρο 20 $ng.ml^{-1}$.

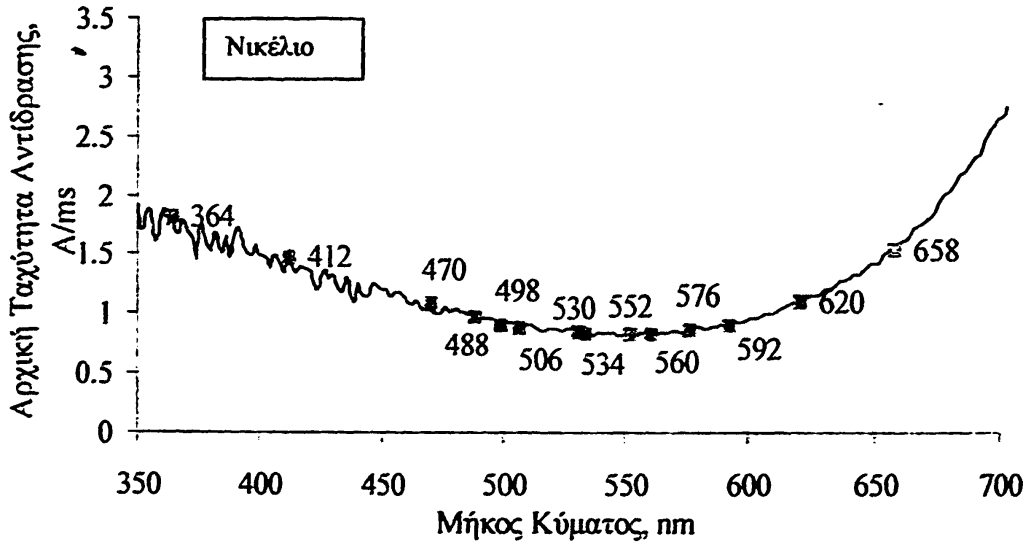
Ο χρόνος ημιζωής όλων των αντιδράσεων είναι μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου, κάνοντας την κινητική μελέτη εφικτή μόνο με τη χρήση οργανολογίας μελέτης ταχειών αντιδράσεων, όπως το SF. Για την πλειοψηφία των μηκών κύματος στην παρατηρούμενη φασματική περιοχή, η ολική αρχική κλίση κάθε κινητικής καμπύλης ενός μίγματος ισούται με το άθροισμα των αρχικών κλίσεων που οφείλεται στην αντίδραση του κάθε αναλύτη. Σε μερικά, όμως μήκη κύματος χάνεται η αθροιστικότητα των απορροφήσεων ή και των κλίσεων στο τμήμα της κινητικής καμπύλης που βρίσκεται μετά το χρόνο ημιζωής της αντίδρασης. Αυτό, πιθανόν να οφείλεται στον παρεμποδιστικό ρόλο που μπορεί να παίζει ο υποκαταστάτης, ο οποίος, σε ένα υδατικό διάλυμα, είναι παρών σε πολλές διαφορετικές μορφές. Οι σταθερές ισορροπίας και άλλων συμπλόκων πιθανά με διαφορετικό ε μπορεί να ευνοεί και δευτερεύουσες παράλληλες αντιδράσεις, οδηγώντας στην εξαφάνιση της αθροιστικότητας [19, 20]. Για την επιλογή των βέλτιστων μηκών κύματος που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση, εφαρμόσθηκε η τεχνική της βηματικής παλινδρόμησης. Η τεχνική αναχαίτισης της ροής με τη δυνατότητα για ταχεία ανάμιξη και ομογενοποίηση των διαλυμάτων των δύο αντιδρώντων επέτρεψε ώστε οι τιμές των αρχικών κλίσεων να ακολουθούν αντίδραση πρώτης τάξης με τον κάθε αναλύτη και επίσης να είναι προσθετικές στα περισσότερα μήκη κύματος. Η ταυτόχρονη παρατήρηση της ταχύτατης μεταβολής της απορρόφησης σε πολλά μήκη κύματος έγινε εφικτή με τον ανιχνευτή CCD, ο οποίος έχει καλύτερα χαρακτηριστικά ποιότητας από άλλους ανιχνευτές, όπως είναι οι ευρέως διαδεδομένες συστοιχίες φωτοδιόδων, όσο αφορά την ευαισθησία, τη δυναμική περιοχή, την ταχύτητα απόκρισης, το λόγο σήματος προς θόρυβο και το χρόνο ολοκλήρωσης [21].

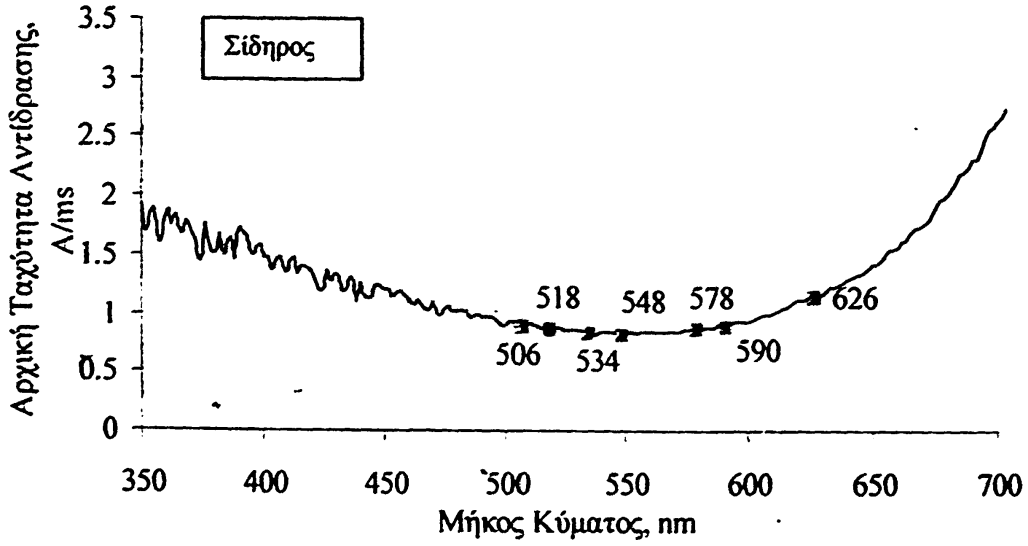
7.5.4.2. Βελτιστοποίηση Αναλυτικών Παραμέτρων

Είναι γνωστό ότι σε υδατικά διαλύματα η ΧΟ βρίσκεται σε οκτώ διαφορετικές μορφές [19]. Για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας αντίδρασης των τριών αναλυτών με περισσότερες εκ των μία μορφές του υποκαταστάτη, με πιθανό αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσοτέρων του ενός έγχρωμων προϊόντων και με διαφορετικό ε, η ΧΟ ήταν πάντα σε 10πλάσια συγκέντρωση από τα προσδιοριζόμενα μέταλλα. Διάφορες παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν το σύστημα βελτιστοποιήθηκαν με την εφαρμογή της μονοπαραμετρικής μεθόδου και των αρχικών κλίσεων των κινητικών καμπυλών στη μέγιστη τιμή της απορρόφησης στα 575 nm (για όλους τους

αναλύτες). Κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σαν βέλτιστες τιμές των εξεταζομένων παραμέτρων θεωρήθηκαν αυτές που απέδιδαν την χαμηλότερη δυνατή τυπική απόκλιση και την υπηλότερη ευαισθησία για συνθήκες αντιδράσεων, όπου και οι τρεις αναλύτες ακολουθούσαν κινητική πρώτης τάξεως. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris με pH = 6.3 απαιτείται για τη διατήρηση του pH σε τιμές χαμηλότερες από αυτές όπου συμβαίνει αποπρωτονίωση του υποκαταστάτη και σχηματισμός παρεμποδιζουσών ουσιών, όπως σύμπλοκα με άλλα μέταλλα (κάλιο, ή νάτριο) που βρίσκονται στο διάλυμα. Χαμηλότερες τιμές pH δεν επιτρέπουν τη συμπλοκοποίηση με την XO και αρχίζει να καθιζάνει δυσδιάλυτο υδροξείδιο του σιδήρου. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί την περαιτέρω αύξηση της ταχύτητας της ήδη πολύ γρήγορης αντίδρασης, έτσι ώστε μεγαλύτερες τιμές από την θερμοκρασία δωματίου φτάνουν στα όρια μετρήσεως, δηλαδή στο νεκρό χρόνο του SF. Για αυτό, ως θερμοκρασία εργασίας επιλέχθηκε αυτή των 20° C. Τα πειραματικά αποτελέσματα μπορούν να βελτιωθούν περαιτέρω με την κατάλληλη επιλογή των μεταβλητών που περιέχουν την κατάλληλη χημική πληροφορία για τους προσδιοριζόμενους αναλύτες χρησιμοποιώντας βηματική παλινδρόμηση. Για να βρεθούν ποια από τα μήκη κύματος συνεισφέρουν σε σημαντικό βαθμό στην πρόβλεψη και ποια μπορούν να μην συμπεριληφθούν στο σχεδιαζόμενο μοντέλο βαθμονόμησης, η τεχνική της βηματικής παλινδρόμησης εφαρμόσθηκε στα κινητικά δεδομένα (βλέπε ενότητα 2.5.2). Για τη μέθοδο των ολικών κινητικών καμπυλών, επιλέχθηκαν 18 μήκη κύματος για το κοβάλτιο, 15 για το νικέλιο και 10 για το σίδηρο, ενώ για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων ο βέλτιστος αριθμός των μηκών κύματος ήταν 10 για το κοβάλτιο, 14 για το νικέλιο και 7 για το σίδηρο (Σχήμα 7.5.4).

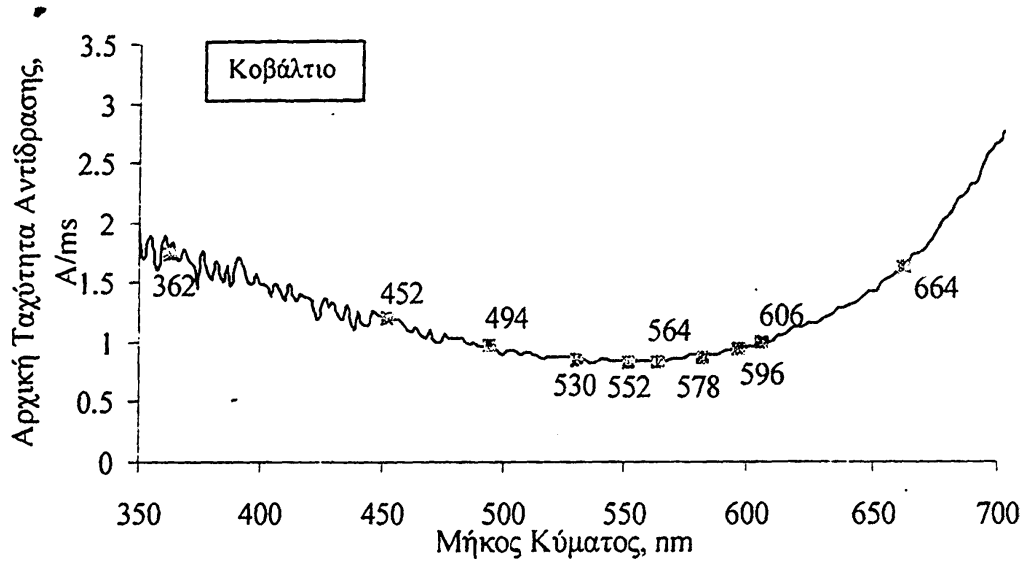


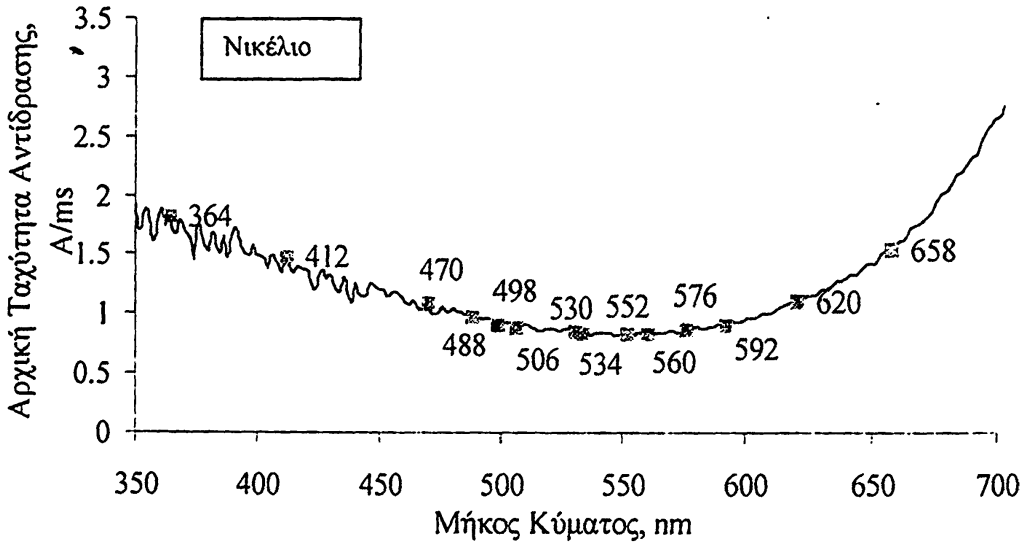


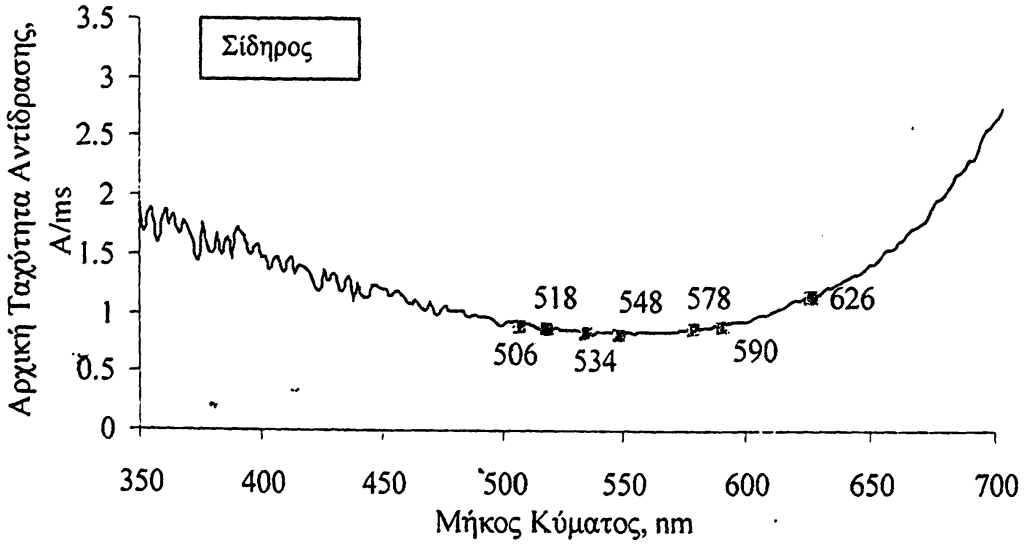


Σχήμα 7.5.4: Τα επιλεγμένα μήκη κύματος για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, για το κοβάλτιο (10 κλίσεις), για το νικέλιο (14 κλίσεις), και για το σίδηρο (7 κλίσεις).

αναλύτες). Κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σαν βέλτιστες τιμές των εξεταζομένων παραμέτρων θεωρήθηκαν αυτές που απέδιδαν την χαμηλότερη δυνατή τυπική απόκλιση και την υπηλότερη ευαισθησία για συνθήκες αντιδράσεων, όπου και οι τρεις αναλύτες ακολουθούσαν κινητική πρώτης τάξεως. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris με pH = 6.3 απαιτείται για τη διατήρηση του pH σε τιμές χαμηλότερες από αυτές όπου συμβαίνει αποπρωτονίωση του υποκαταστάτη και σχηματισμός παρεμποδιζουσών ουσιών, όπως σύμπλοκα με άλλα μέταλλα (κάλιο, ή νάτριο) που βρίσκονται στο διάλυμα. Χαμηλότερες τιμές pH δεν επιτρέπουν τη συμπλοκοποίηση με την XO και αρχίζει να καθιζάνει δυσδιάλυτο υδροξείδιο του σιδήρου. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί την περαιτέρω αύξηση της ταχύτητας της ήδη πολύ γρήγορης αντίδρασης, έτσι ώστε μεγαλύτερες τιμές από την θερμοκρασία δωματίου φτάνουν στα όρια μετρήσεως, δηλαδή στο νεκρό χρόνο του SF. Για αυτό, ως θερμοκρασία εργασίας επιλέχθηκε αυτή των 20° C. Τα πειραματικά αποτελέσματα μπορούν να βελτιωθούν περαιτέρω με την κατάλληλη επιλογή των μεταβλητών που περιέχουν την κατάλληλη χημική πληροφορία για τους προσδιοριζόμενους αναλύτες χρησιμοποιώντας βηματική παλινδρόμηση. Για να βρεθούν ποια από τα μήκη κύματος συνεισφέρουν σε σημαντικό βαθμό στην πρόβλεψη και ποια μπορούν να μην συμπεριληφθούν στο σχεδιαζόμενο μοντέλο βαθμονόμησης, η τεχνική της βηματικής παλινδρόμησης εφαρμόσθηκε στα κινητικά δεδομένα (βλέπε ενότητα 2.5.2). Για τη μέθοδο των ολικών κινητικών καμπυλών, επιλέχθηκαν 18 μήκη κύματος για το κοβάλτιο, 15 για το νικέλιο και 10 για το σίδηρο, ενώ για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων ο βέλτιστος αριθμός των μηκών κύματος ήταν 10 για το κοβάλτιο, 14 για το νικέλιο και 7 για το σίδηρο (Σχήμα 7.5.4).







Σχήμα 7.5.4: Τα επιλεγμένα μήκη κύματος για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, για το κοβάλτιο (10 κλίσεις), για το νικέλιο (14 κλίσεις), και για το σίδηρο (7 κλίσεις).

7.5.4.3. Χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς των σχεδιαζόμενων μοντέλων

Οι κινητικές καμπύλες που λήφθηκαν για 20 μίγματα διαφορετικής σύστασης των τριών μετάλλων, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του πίνακα των συντελεστών βαθμονόμησης **P**, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ένας δεύτερος πίνακας συντελεστών βαθμονόμησης υπολογίστηκε από τις αρχικές κλίσεις των ίδιων καμπυλών. Αυτοί οι δύο πίνακες χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των αναλυτών στα δείγματα βαθμονόμησης, καθώς και σε 10 νέα εξωτερικά δείγματα επικύρωσης. Η εφαρμογή του κάθε μοντέλου στα δείγματα βαθμονόμησης δεν αποτελεί κριτήριο εκτίμησης της προβλέψιμης ικανότητας των μεθόδων, αλλά δείχνει το πόσο καλά προσαρμόζονται τα δεδομένα βαθμονόμησης στη γραμμική εξίσωση των μοντέλων. Για την εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης σε άγνωστα δείγματα, οι πίνακες βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των τριών μετάλλων σε 10 μίγματά τους που δεν συμπεριλήφθηκαν στη βαθμονόμηση. Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα, τα οποία ήταν αρκετά παρόμοια για το κοβάλτιο και το νικέλιο. Η μέθοδος των ολικών κινητικών καμπυλών προβλέπει το σίδηρο σχετικά καλύτερα από τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, όπως φαίνεται και από την χαμηλότερη τιμή του τυπικού σφάλματος πρόβλεψης:

$$SEP = sqrt\{(sum(\ -y)^2/N-1\}) \qquad (7.5.3)$$

Αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό φάσμα του συμπλόκου του σιδήρου, το οποίο δίνει κινητικές καμπύλες με διαφορετική τιμή Α από εκείνες του κοβαλτίου και του νικελίου. Έτσι, η μέθοδος προβλέπει τις συγκεντρώσεις των αναλυτών εκμεταλλευόμενη όχι μόνο τις κινητικές αλλά και τις φασματικές διαφοροποιήσεις. Η βαθμονόμηση έλαβε χώρα με την χρησιμοποίηση προτύπων μιγμάτων των δύο τριών αναλυτών με ένα ορθογώνιο πειραματικό σχεδιασμό, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. Δεν είναι απαραίτητη η παρασκευή προτύπων δειγμάτων ενός συστατικού.

Πίνακας 1

Τα αποτελέσματα πρόβλεψης για 10 ανεξάρτητα μίγματα επικύρωσης.

Μέθοδος Αρχικών Κλίσεων			
Μίγματα Επικύρωσης	Αναμενόμενη Συγκέντρωση, ng.ml-1	Υπολογιζόμενη Συγκέντρωση, ng.ml-1	SEP

	Co	Ni	Fe	Co	Ni	Fe	Co	Ni	Fe
1 : 1,5 : 1,5	1,00	1,50	1,50	1,100	1,400	1,490	0,3904	0,1241	0,1812
1,33 : 0 : 1	1,33	0,00	1,00	1,400	0,010	1,010			
2 : 1 : 5	2,00	1,00	5,00	1,900	1,030	5,020			
3 : 1 : 5	3,00	1,00	5,00	3,100	0,970	5,030			
2 : 1 : 6	2,00	1,00	6,00	2,010	0,960	6,030			
1 : 1,5 : 0	1,00	1,50	0,00	0,970	1,450	0,050			
2 : 2,5 : 1	2,00	2,50	1,00	1,980	2,600	1,010			
2,5 : 1 : 1	2,50	1,00	1,00	2,400	0,990	1,020			
1 : 1 : 4	5,00	5,00	20,00	5,570	4,850	20,200			
1 : 1 : 2	10,00	10,00	20,00	9,000	9,700	20,500			
Μέθοδος Ολικών Κινητικών Καμπυλών									
1 : 1,5 : 1,5	1,00	1,50	1,50	1,120	1,420	1,380	0,1075	0,0768	0,0722
1,33 : 0 : 1	1,33	0,00	1,00	1,350	0,000	1,040			
2 : 1 : 5	2,00	1,00	5,00	2,110	0,970	5,030			
3 : 1 : 5	3,00	1,00	5,00	3,160	0,990	5,030			
2 : 1 : 6	2,00	1,00	6,00	2,020	1,010	6,100			
1 : 1,5 : 0	1,00	1,50	0,00	1,150	1,510	0,050			
2 : 2,5 : 1	2,00	2,50	1,00	1,990	2,570	1,040			
2,5 : 1 : 1	2,50	1,00	1,00	2,420	1,090	1,050			
1 : 1 : 4	5,00	5,00	20,00	5,050	4,940	20,050			
1 : 1 : 2	10,00	10,00	20,00	9,860	9,830	20,100			

Οι δύο μέθοδοι εφαρμόσθηκαν επιτυχώς σε διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης κοβαλτίου, νικελίου και σιδήρου σε σχετικές αναλογίες από 4 : 1 : 1, και 1 : 6 : 1 σε 1 : 1 : 5 με σφάλματα μικρότερα του 5 %. Το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν 0.5-180 $ng.ml^{-1}$, 0.5-30 $ng.ml^{-1}$, και 0.7-90 $ng.ml^{-1}$ για το σίδηρο, το κοβάλτιο και το νικέλιο, αντίστοιχα. Η κατά ζεύγη δοκιμή-t εφαρμόσθηκε με τη μηδενική υπόθεση ότι τα λαμβανόμενα αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους είναι στατιστικά ίδια για 95 % όρια εμπιστοσύνης το οποίο αποδείχτηκε αληθές. Η μέθοδος των ολικών κινητικών καμπυλών είναι φαινομενικά πιο ακριβής, αλλά για 95 % όρια εμπιστοσύνης τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων ήταν το ίδιο ακριβή. Η μερική χρησιμοποίηση της χημικής πληροφορίας στη μέθοδο των αρχικών κλίσεων, σε αντίθεση με την χρησιμοποίηση όλων των σημείων των κινητικών στη μέθοδο των ολικών κινητικών καμπυλών, μπορεί να εξηγήσει τα παραπάνω. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από την εξίσωση 7.5.4:

$$C_L = k\, s_B / m \qquad (7.5.4)$$

όπου C_L είναι το όριο ανίχνευσης, k = 2 είναι ένας αριθμητικός συντελεστής που αντιστοιχεί σε 95 % όρια εμπιστοσύνης, $s_B = \pm 0.13$ είναι η τυπική απόκλιση των

αρχικών κλίσεων των κινητικών καμπυλών στα 575 nm και m είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς της μονοπαραμετρικής μεθόδου. Και οι δύο προτεινόμενες μέθοδοι είναι πιο ακριβείς και ανθεκτικές από την μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.4.

Η εκλεκτικότητα των μεθόδων μελετήθηκε με την προσθήκη διάφορων πιθανά παρεμποδιζουσών ουσιών, όπως μερικά άλλα μέταλλα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2

Παρεμποδιστική δράση ιόντων διαφόρων μετάλλων κατά τον προσδιορισμό 20 $ng.ml^{-1}$ κοβαλτίου, 20 $ng.ml^{-1}$ νικελίου και 20 $ng.ml^{-1}$ σιδήρου παρουσία ΧΟ, συγκέντρωσης 10^{-3} $mol.lt^{-1}$.

Παρεμποδίζουσα Ουσία	Μέγιστη Επιτρεπτή Συγκέντρωση ($\mu g.ml^{-1}$) για 5 % σχετικό σφάλμα
Χαλκός (ΙΙ)	5
Βανάδιο (V)	7
Ψευδάργυρος	20
Μαγνήσιο	100
Μόλυβδος	1000
Κάλιο	1000
Χρώμιο (VI)	2000

Το όριο ανοχής ορίστηκε ώς η συγκέντρωση της προστιθέμενης ουσίας η οποία δίνει σχετικό σφάλμα 5 % ή λιγότερο. Η ΧΟ είναι ένα μη εκλεκτικό αντιδραστήριο και σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με μια πληθώρα μετάλλων. Όμως, η ταχύτητα συμπλοκοποίησης είναι πολύ αργή σε θερμοκρασία δωματίου και για τα περισσότερα από αυτά απαιτείται θέρμανση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100° C για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Ειδικότερα το χρώμιο, ένα πολύ συνηθισμένο πρόσθετο σε χάλυβες και μεταλλικά κράματα, είναι πρακτικά αδρανές σε όλες τις οξειδωτικές βαθμίδες και δεν παρεμποδίζει σε μεγάλες τιμές συγκέντρωσης.

7.5.5. Αναλυτικές Εφαρμογές

Εξαιτίας της καλύτερης ακρίβειας των αποτελεσμάτων, η μέθοδος των ολικών κινητικών καμπυλών εφαρμόσθηκε σε 12 πραγματικά δείγματα από μεταλλικά κράματα, σύμφωνα με την πορεία εργασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, το κοβάλτιο βρέθηκε σε ένα, το νικέλιο σε δύο και ο σίδηρος σε όλα τα δείγματα. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν και βρέθηκαν σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν με τη μέθοδο ατομικής απορρόφησης.

Πίνακας 3

Προσδιορισμός κοβαλτίου, νικελίου και σιδήρου σε μεταλλικά κράματα (% κ.β.)

	Προτεινόμενη μέθοδος (% wt/wt)			Μέθοδος AA (% wt/wt)			Τιμές κατασκευαστή (% wt/wt)		
	Co	Ni	Fe	Co	Ni	Fe	Co	Ni	Fe
Κράμα Μονώσεως Υαλοπινάκων									
Δείγμα 1	17,5	29,5	54,8	16,4	29,5	51,8	17,0	29,0	54,0
Δείγμα 2	17,5	29,2	54,5	16,7	28,3	52,0			
Δείγμα 3	17,8	29,3	54,8	17,4	28,7	53,5			
Σύρμα Θερμοζεύγους									
Δείγμα 1	-	-	44,3	-	-	44,0	-	-	-
Δείγμα 2	-	-	44,6	-	-	44,3			
Δείγμα 3	-	-	44,6	-	-	44,8			
Κράμα Θερμικής Αντίστασης									
Δείγμα 1	-	69,5	29,0	-	68,9	29,5	-	-	-
Δείγμα 2	-	69,4	28,5	-	69,5	26,8			
Δείγμα 3	-	69,2	28,7	-	70,1	27,2			
Μεταλλικό Σφουγγάρι Καθαρισμού									
Δείγμα 1	-	-	88,3	-	-	86,8	-	-	-
Δείγμα 2	-	-	87,9	-	-	87,5			
Δείγμα 3	-	-	88,2	-	-	89,2			

7.5.6. Συμπεράσματα

Ο ταυτόχρονος κινητικός προσδιορισμός του κοβαλτίου, του νικελίου και του σιδήρου σε μίγματα εφαρμόσθηκε με δύο σχεδιασθέντα χημειομετρικά μοντέλα όπως περιγράφεται παραπάνω. Το μελετούμενο χημικό σύστημα αντιστοιχεί στην περίπτωση όπου οι αναλύτες διαφοροποιούνται τόσο κινητικά όσο και φασματικά, αλλά οι αλληλοεπικαλύψεις αυτών των ιδιοτήτων δεν επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό τους με παραδοσιακές, μονοπαραμετρικές φασματοφωτομετρικές τεχνικές. Ο συνδυασμένος διαχωρισμός των κινητικών και των φασματικών διαφοροποιήσεων, με την χρησιμοποίηση της τεχνικής SF και της ανίχνευσης CCD επέτρεψε τον επιτυχή προσδιορισμό των τριών μετάλλων σε ένα μεγάλο εύρος και σε

πολύ χαμηλές τιμές συγκεντρώσεων. Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα και η ταχύτητα των προτεινόμενων μεθόδων, κυρίως για τη μέθοδο των αρχικών κλίσεων όπου η συλλογή των δεδομένων μπορεί να γίνει σε κλάσματα του δευτερολέπτου, προτείνουν την εφαρμογή τους σε αυτοματοποιημένες ταχείες αναλύσεις ρουτίνας. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα των μεθόδων είναι η απλή βαθμονόμηση με σχετικά μικρό αριθμό προτύπων δειγμάτων. Αυτό, όχι μόνο δεν επηρεάζει την ανθεκτικότητα της μεθόδου, αλλά επιπλέον ελαχιστοποιεί τον χρόνο βαθμονόμησης και την συνολική πορεία εργασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. C.W.Brown, P.F.Lynch, R.J.Obremski, D.S.Lavery, Anal. Chem., 1982, 54, 1472.
2. H.J.Kisner, C.W.Brown, G.J.Kavarnos, Anal. Chem., 1983, 55, 1703.
3. H.J.Kisner, C.W.Brown, G.J.Kavarnos, Anal. Chem., 1982, 54, 1479.
4. H.A.Barnett, A Bartoli, Anal. Chem., 1960, 32, 1153.
5. J.Saurina, S.Hernandez-Cassou, R.Tauler, Anal. Chem., 1997, 69, 2329.
6. R.A.Greinke, H.B.Mark, Anal. Chem., 1966, 38, 340.
7. P.D.Wentzell, S.R.Crouch, Anal. Chem., 1986, 58, 2855.
8. J.Havel, J.L.Gonzalez, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1989, 39, 141.
9. M. Der, M.Canedo, J.L.Gonzalez, F.Cuesta, J.Havel, Reaction Kinetics Catalysis Letters, 1992, 48, 77.
10. E.Furusjo, L.G.Danielson , Anal. Chim. Acta, 1998, 373, 83.
11. L.J.Papa, J.H.Patterson, H.B.Mark, C.N.Reilley, Anal. Chem., 1963, 35, 1889.
12. D.W.Osten, B.R.Kowalski, Anal. Chem., 1985, 57, 908.
13. B.M.Quencer, S.R.Crouch, Anal. Chem., 1994, 66, 458.
14. A.N.Diaz, J.A.G.Garcia, Anal. Chem., 1994, 66, 988.
15. E.N.Iliadou, S.T.Girousi, U.Dietze, M.Otto, A.N.Voulgaropoulos, C.Papadopoulos, Analyst, 1997, 122, 1.
16. P.N.Nesterenko, G.Z.Amirova, T.A.Bol'shova, Anal. Chim. Acta, 1994, 285, 161.
17. N.Ryan, J.D.Glennon, D.Muller, Anal. Chim. Acta, 1993, 283, 344.
18. K.Stulik, R.Kalvoda, 'Electrochemistry for Environmntal Protection', Prague, 1995.
19. B.Andziuliene And T.Vesene, Russian Journal Of Physical Chemistry, (1982), 56, 916.
20. K.L.Cheng, Talanta, 1967, 14, 875.
21. D.A.Skoog, F.J.Holer, T.A.Nieman, 'Principles of Instrumental Analysis', Saunders College Publishing, 5th Edition, USA, 1998.
22. P.J. Brown, C.H. Spiegelman, and M.C. Denham, Phil. Trans. R. Soc. Land. A, 1991, 337, 311.
23. M.J.Adams, "Chemometrics In Analytical Sspectroscopy", RSC Analytical Spectroscopy Monographs, Wolverhampton, UK, 1995.
24. G.P.Avila, A.Salvador, M.Guardia, Analyst, 1997, 122, 1543.

25. W.Betteridge, "Cobalt and Its Alloys", Ellis HorwoodLimited, Chichester, UK, 1982.

26. H.Niwa, T.Yasui, T.Ishizuki, A.Yuchi, H.Yamada, H.Wada, Talanta, 1997, 45, 349.

7.6. Σύγκριση των Χημειομετρικών Μεθόδων CLS, MLR, PLS και PCR στον ταυτόχρονο Φασματοφωτομετρικό Προσδιορισμό Σπάνιων Γαιών.

Περίληψη

Ο φασματοφωτομετρικός ταυτόχρονος προσδιορισμός του Λανθανίου, του Θορίου και του Πρασεοδυμίου εφαρμόσθηκε σε μίγματά τους, με τη μέτρηση της απορρόφησης των συμπλόκων τους με Arsenazo-III σε 2048 μήκη κύματος, στην περιοχή του ορατού φάσματος. Οι απορροφήσεις δεν ήταν απαραίτητο να είναι αθροιστικές για τα τρία σύμπλοκα των μετάλλων σε μίγματά τους. Η συγκέντρωση του κάθε μετάλλου υπολογίστηκε για κάθε άγνωστο δείγμα με τέσσερις διαφορετικές χημειομετρικές μεθόδους και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

7.6.1. Εισαγωγή

Οι σπάνιες γαίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη χημεία, τη φυσική, τη μεταλλουργία και την ανάπτυξη κεραμικών υλικών εφόσον αποτελούν το ένα ενδέκατο των γνωστών, φυσικά απαντόμενων στοιχείων [1]. Οι ιδιότητες των μετάλλων, των κραμάτων, των ενώσεων και των διαλυμάτων τους είναι σε ένα σχετικά μεγάλο βαθμό άγνωστες και για αυτό η έρευνά τους συχνά οδηγεί σε νέα και ενδιαφέροντα αποτελέσματα [2-6]. Αν και τα μέταλλά τους δεν έχουν το μικρό βάρος του αλουμινίου, ή τη σκληρότητα του χάλυβα, έχουν πολλές μοναδικές ιδιότητες [7, 8]. Πολλά από τα οξείδια, τα καρβίδια, τα σουλφίδια και τα βορίδιά τους έχουν πολύ υψηλά σημεία τήξης, γίνονται υπεραγωγοί σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ό,τι άλλα υπεραγώγιμα υλικά [9-11], είναι σιδηρομαγνητικά [6, 7, 12-14] και σχηματίζουν κεραμικά με ενδιαφέρουσες ιδιότητες [15-17]. Ειδικά τα υδρίδιά τους έχουν την ενδιαφέρουσα ιδιότητα να συγκρατούν το υδρογόνο ακόμα και σε θερμοκρασίες ερυθροπυρώσεως [18, 19]. Στο πεδίο της οργανικής χημείας τα οξείδιά τους εμφανίζουν ειδικό ενδιαφέρουν ως καταλύτες στην πυρόλυση των υδρογονανθράκων [20-22]. Όλες σχεδόν οι σπάνιες γαίες έχουν μελετηθεί σε βιοχημικές πορείες ή έχουν χρησιμοποιηθεί στην ιατρική διάγνωση (σπινθηρογραφήματα) και θεραπευτική (πυρηνική ιατρική, πολλά ραδιενεργά ισότοπά τους χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου) [23]. Αν και δεν είναι γνωστός ο μεταβολικός τους ρόλος η παρουσία τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε διάφορα

όργανα των θηλαστικών υποδεικνύει την πιθανή μεταβολική τους επίδραση. Ιόντα λανθανίου χρησιμοποιούνται στην επισήμανση κυττάρων στην ηλεκτρονική μικροσκοπία. Για τη μελέτη της φυσιολογίας των μυών έχει εφαρμοσθεί η αντικατάσταση ιόντων ασβεστίου από ιόντα πρασεοδυμίου ή νεοδυμίου [24]. Για αυτό, ο προσδιορισμός του λανθανίου, του πρασεοδυμίου και του θορίου, όπως και των άλλων σπανίων γαιών σε μίγματά τους είναι απαραίτητος σε αναλύσεις ρουτίνας. Οι παραπλήσιες χημικές τους ιδιότητες σε συνδυασμό με το σχετικά υψηλό τους κόστος κάνει αναγκαία την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων χαμηλού κόστους που διαχωρίζουν αποτελεσματικά τους αναλύτες, ενώ ο ταυτόχρονος διαχωρισμός τους καθίσταται εξαιρετικά δύσκολος με την εφαρμογή παραδοσιακών αναλυτικών τεχνικών. Αρκετές μέθοδοι περιγράφουν τον διαχωρισμό αυτών των μετάλλων με την εφαρμογή ενός προηγούμενου σταδίου διαχωρισμού τους [25-27], το οποίο είναι χρονοβόρο, εισάγει σφάλματα με συνέπεια αποτελέσματα μικρότερης ακρίβειας και έχει υψηλότερο κόστος. Οι περισσότερες από αυτές χρησιμοποιούν το Arsenazo-III, ένα μη εκλεκτικό αλλά εξαιρετικά ευαίσθητο αντιδραστήριο, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό αυτών των μετάλλων [8, 9]. Η εφαρμογή παραδοσιακών φασματοφωτομετρικών τεχνικών στον ταυτόχρονο προσδιορισμό των σπανίων γαιών είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της έλλειψης εκλεκτικότητας αυτού του αντιδραστηρίου [28]. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη χημειομετρικών μεθόδων που βασίζονται στη χρησιμοποίηση του Arsenazo-III και δεν απαιτούν προηγούμενο στάδιο διαχωρισμού. Οι μελετούμενες χημειομετρικές μέθοδοι προσδιορίζουν ταυτόχρονα τους τρεις αναλύτες με ανακτήσεις που κυμαίνονται από 92-106 % για τη μέθοδο CLS, 86-113 % για τη μέθοδο ILS, 98-101 % για τη μέθοδο PCR και 98-101 % για τη μέθοδο PLS. Οι αναπτυσσόμενες αναλυτικές μέθοδοι που προτείνονται εδώ επιτρέπουν την ανάλυση ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρόνο με το ελάχιστο κόστος. Άλλες διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται επιτυχώς για την ανάλυση των σπάνιων γαιών, όπως η μέθοδος ICP-MS είναι πολλές φορές οικονομικά ασύμφορες και ανεφάρμοστες για εφαρμογές όπως η παρακολούθηση της μεταβολής κάποιας ιδιότητας ενός προϊόντος σε βιομηχανικές διεργασίες ή της αποτελεσματικής απομάκρυνσης βαρέων μετάλλων σε μία βιολογική διεργασία.

7.6.2. Πειραματικό Μέρος

7.6.2.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το διάλυμα arsenazo-III (3,6-δι[(2-αρσονοφαίνυλ)-αζο]-4,5-διυδροξυ-2,7-ναφθαλενοδισουλφονικό οξύ) (Aldrich) παρασκευάστηκε με ζύγιση στερεάς ουσίας και αραίωση με απεσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη κατάλληλου όγκου. Τα διαλύματα παρακαταθήκης (5×10^{-3} M) του λανθανίου, θορίου και πρασεοδυμίου παρασκευάστηκαν από τα αντίστοιχα ένυδρα νιτρικά ή χλωριούχα άλατά τους. Διαλύματα εργασίας διαφόρων συγκεντρώσεων των μετάλλων παρασκευάστηκαν μετά από αραίωση των διαλυμάτων παρακαταθήκης με απεσταγμένο νερό. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξεικού αμμωνίου (1 M, pH = 3.5) παρασκευάστηκε με την προσθήκη 77.08 g οξεικού αμμωνίου σε 500 ml απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 3.5 με διάλυμα HCl 3 M και ο όγκος του διαλύματος συμπληρώθηκε μέχρι 1 lt με προσθήκη απεσταγμένου νερού.

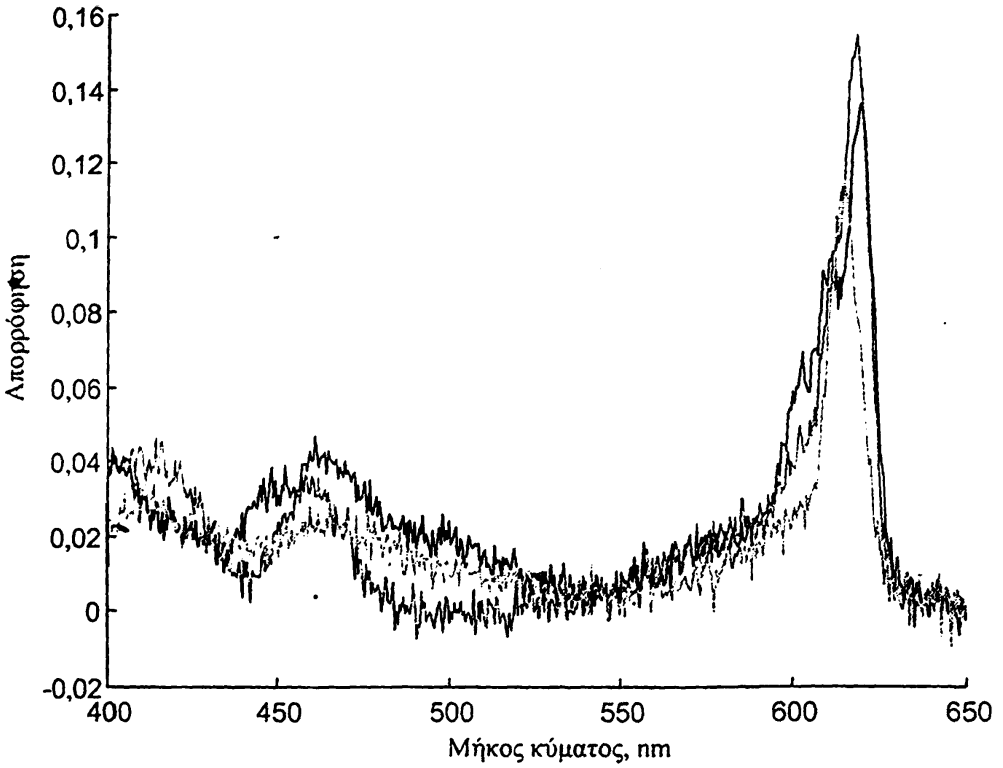
7.6.2.2. Πειραματική Διάταξη

Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις έγιναν με ένα φασματοφωτόμετρο S2000 CCD (Ocean Optics, U.K.) με μια κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, θερμοστατούμενη στους 25 °C. Μια λάμπα αλογόνου βολφραμίου αποτελούσε την πηγή φωτός, το οποίο διερχόταν από την κυψελίδα με τη βοήθεια οπτικών ινών. Τα δεδομένα συλλέγονταν και υφίστανται επεξεργασία με έναν προσωπικό υπολογιστή Pentium 200 MHz. Όλοι οι εφαρμοζόμενοι αλγόριθμοι έχουν προγραμματιστεί σε περιβάλλον MATLAB 5.2.

7.6.3. Πορεία Εργασίας

Οι μέθοδοι CLS, ILS, PCR και PLS χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση μιγμάτων La-Pr-Th. Οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης των μετάλλων αυτών με arsenazo-III χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή φασματοφωτομετρικών δεδομένων και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους. Το arsenazo-III είναι ένα διάζο παράγωγο και χρωμοφόρο οξύ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη φασματοφωτομετρία, εξαιτίας της υψηλής του βαθυχρωμίας, της ικανότητάς του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα και της χαμηλής του εκλεκτικότητας. Έχει εφαρμοσθεί ειδικά για την ανάλυση των λανθανιδών,

αν και υπάρχουν πρόβλήματα καθορισμού της στοιχειομετρίας των συμπλόκων τους [29]. Επίσης, η ύπαρξη στο εμπόριο δειγμάτων arsenazo-III χαμηλής καθαρότητας απαιτεί την προτυποποίηση των διαλυμάτων του. Με την εφαρμογή των προαναφερόμενων μεθόδων δεν είναι απαραίτητο να ελεγχθεί η στοιχειομετρία των παρατηρούμενων συμπλόκων, ενώ το στάδιο προτυποποίησης του υποκαταστάτη μπορεί να παραληφθεί. Επίσης, η ρύθμιση του pH δεν θεωρείται απαραίτητη αν χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων βαθμονόμησης. Στην παρούσα εργασία προτιμήθηκε η παρασκευή ενός μικρού αριθμού δειγμάτων σε συνδυασμό με τη ρύθμιση του pH, εφόσον οι μεγάλες φασματικές διαφοροποιήσεις που οφείλονται σε τυχαίες διακυμάνσεις του pH απαιτούσαν την παρασκευή άνω των 30 μιγμάτων για την λήψη αποδεκτών αποτελεσμάτων. Ο μεγάλος χρόνος παρασκευής των παραπάνω μιγμάτων και η χρησιμοποίηση μεγάλου όγκου αντιδραστηρίων αφαιρούσαν δύο από τα κύρια πλεονεκτήματα των προτεινόμενων μεθόδων και για αυτό προτιμήθηκε η πορεία με ρύθμιση του pH στην τιμή 3.5 με ρυθμιστικό διάλυμα οξεικού αμμωνίου.



Σχήμα 7.6.1. Φάσματα La (μαύρ.), Th (μπλε) και Pr (κόκκ.) συγκεντρώσεων $1,0 \times 10^{-5}$M

Στο σχήμα 7.6.1 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων των μετάλλων με τον υποκαταστάτη Arsenazo-III στη φασματική περιοχή από 400 – 700 nm και για τις ίδιες συγκεντρώσεις των μετάλλων. Από τα φάσματα φαίνεται ότι και τα τρία σύμπλοκα των μετάλλων απορροφούν ισχυρά στην περιοχή από 600 – 675 nm, ενώ σε κάθε μήκος κύματος υπάρχει αλληλεπικάλυψη των τιμών των απορροφήσεων. Παρόλα αυτά, σε αρκετά σημεία παρατηρούνται φασματικές διαφοροποιήσεις, τις οποίες πιθανό να μπορούν να εκμεταλλευθούν χημειομετρικές τεχνικές για την κατασκευή ενός αξιόπιστου μοντέλου βαθμονόμησης. Τα σύμπλοκα ήταν σταθερά για περιορισμένο χρονικό διάστημα και για αυτό, μετά τον ακαριαίο σχηματισμό τους τα φάσματά τους μετρήθηκαν σε χρόνο μικρότερο των 15 λεπτών. Η αθροιστικότητα των απορροφήσεων του θορίου, του λανθανίου και του πρασεοδυμίου εξετάστηκε για μίγματα των ίδιων διαλυμάτων και στην ίδια φασματική περιοχή και αποδείχτηκε ότι υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών αναλυτών με συνέπεια να εμφανίζονται αποκλίσεις από τη γραμμικότητα, ειδικά σε συγκεντρώσεις άνω του 1 mM. Οι αλληλεπιδράσεις

αυτές μπορούν να συμπεριληφθούν στο μοντέλου βαθμονόμησης με τη χρησιμοποίηση ενός μη ορθογωνίου πειραματικού σχεδιασμού, με την κατασκευή μιγμάτων των αναλυτών. Για το σχεδιασμό των τεσσάρων μοντέλων βαθμονόμησης, για κάθε μία μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα βαθμονόμησης, όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 1. Σύσταση των δειγμάτων βαθμονόμησης

	Συγκέντρωση Δειγμάτων Βαθμονόμησης, (10^{-5} M)		
Δείγμα	La	Th	Pr
1	1,06	3,04	2,22
2	1,30	3,35	2,49
3	1,44	3,66	2,65
4	1,51	3,97	2,88
5	2,30	5,40	3,10
6	2,56	8,50	3,25
7	2,71	9,30	3,49
8	2,88	1,10	4,00
9	3,01	1,27	4,54
10	3,55	1,46	4,88
11	3,68	1,65	5,12
12	3,93	1,78	5,50
13	3,10	1,98	1,11
14	4,35	2,20	1,56
15	4,44	2,45	1,79
16	4,98	2,87	2,03

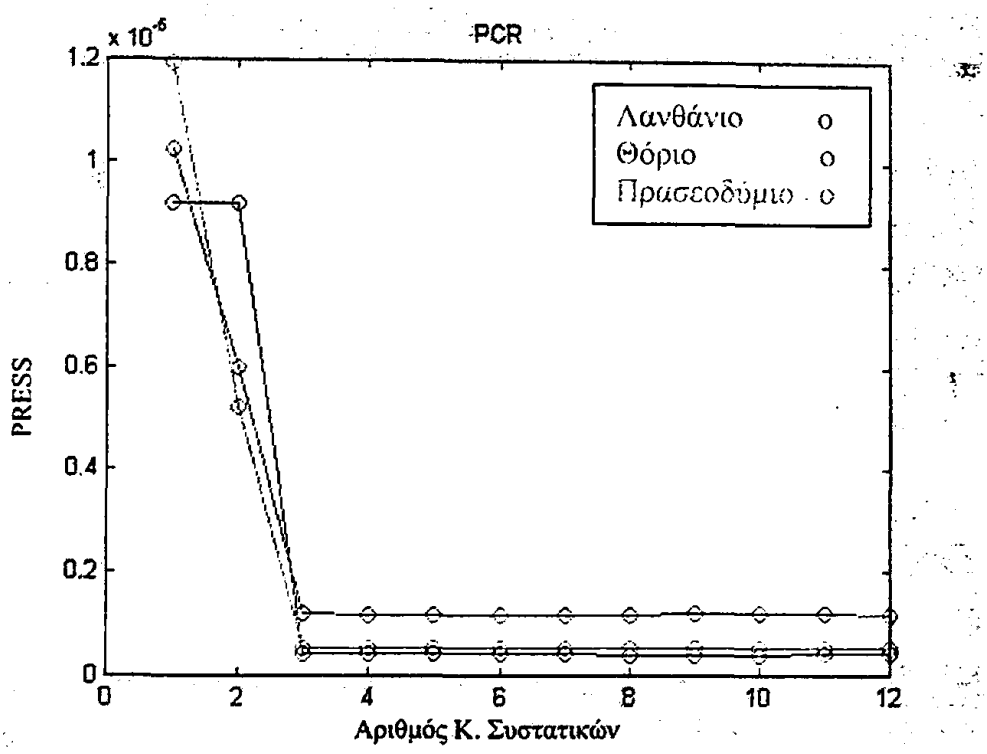
Χημειομετρικές τεχνικές ανάλυσης παραγόντων, όπως η PLS, μπορούν να απομακρύνουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές υπό τη μορφή παραγόντων που δεν μεταβάλλουν τα αποτελέσματα πρόβλεψης αισθητά, ή εισάγουν σε αυτά μεγάλα σφάλματα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των φασματικών θορύβων. Στο ίδιο σχήμα είναι εμφανής και η παρουσία θορύβου ο οποίος επικαλύπτει τις μικρότερες φασματικές διαφορές που οφείλονται στους αναλύτες και μπορεί να απομακρυνθεί με παρόμοιο τρόπο με τις αλληλεπιδράσεις.

7.6.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

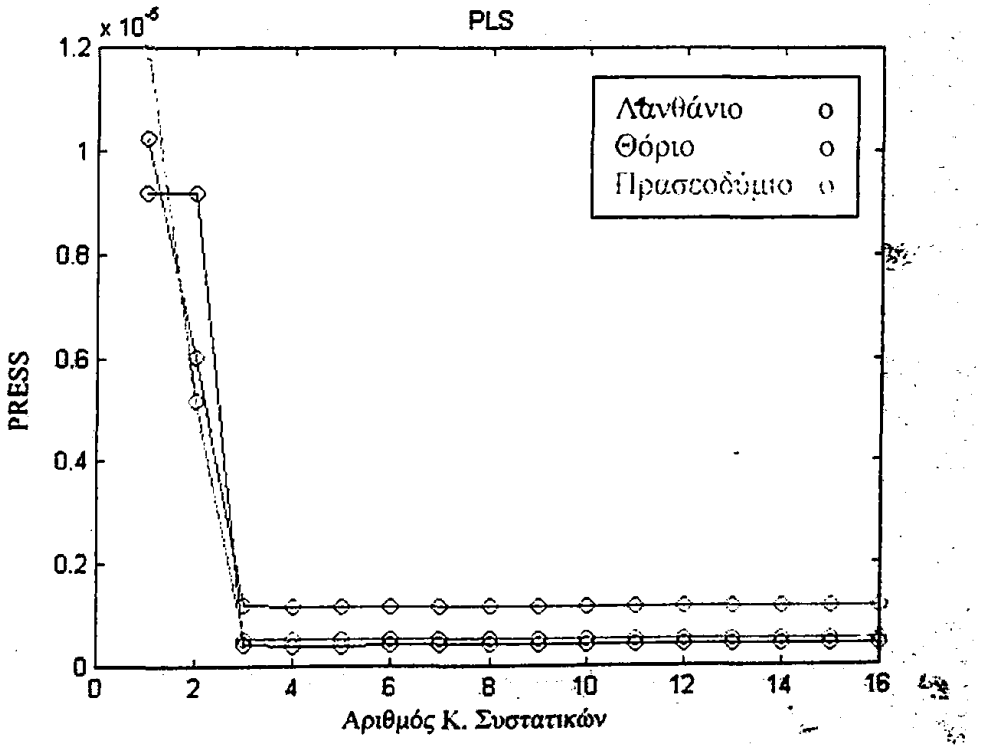
7.6.4.1. Βελτιστοποίηση

Για την επιλογή του βέλτιστου αριθμού κύριων συστατικών για την μέθοδο PCR κατασκευάστηκαν 12 μοντέλα βαθμονόμησης, προσθέτοντας ένα παράγοντα την κάθε

φορά για συνολικά 12 κύρια συστατικά. Κατόπιν, αξιολογήθηκε το κάθε μοντέλο βαθμονόμησης με τον υπολογισμό του σφάλματος PRESS (βλέπε ενότητα 4.1) για τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης και με την τεχνική της διασταυρούμενης επικύρωσης. Το σχήμα 7.6.2 δείχνει τη γραφική παράσταση του αριθμού των παραγόντων ως προς την τιμή του PRESS. Όπως φαίνεται καθαρά από το σχήμα, το σφάλμα PRESS ελαχιστοποιείται με τη χρησιμοποίηση 3 παραγόντων για το βέλτιστο μοντάλο βαθμονόμησης. Για την τεχνική PLS ο βέλτιστος αριθμός των παραγόντων που θα πρέπει να συμπεριληφθούν στο μοντέλο βαθμονόμησης ισούται επίσης με 3 (Σχήμα 7.6.3). Η επιλογή των βέλτιστων μηκών κύματος για την εφαρμογή της μεθόδου ILS έγινε με δύο τεχνικές: 1) Εφαρμογή ενός γενετικού αλγορίθμου, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.4 και 2) με βηματική παλινδρόμηση. Με την πρώτη τεχνική, ο βέλτιστος αριθμός ισούται με 16 ενώ για την βηματική παλινδρόμηση ισούται με 10. Παρόλο που στη δεύτερη περίπτωση η επιλογή λιγότερων μηκών κύματος μπορεί να οδηγούσε σε λιγότερο ακριβή αποτελέσματα, τα αποτελέσματα πρόβλεψης και για τις δύο τεχνικές δεν διαφέρουν μεταξύ τους για βεβαιότητα 95 %. Για την τελική κατασκευή του μοντέλου βαθμονόμησης επιλέχθηκε η τεχνική της βηματικής παλινδρόμησης επειδή είναι ταχύτερη και απλούστερη από την τεχνική του γενετικού αλγορίθμου.



Σχήμα 7.6.2. Γραφική παράσταση που δείχνει την εξάρτηση του σφάλματος βαθμονόμησης, PRESS, από τον αριθμό των κύριων συστατικών για τη μέθοδο PCR.



Σχήμα 7.6.3. Γραφική παράσταση που δείχνει την εξάρτηση του σφάλματος βαθμονόμησης, PRESS, από τον αριθμό των κύριων συστατικών για τη μέθοδο PLS

7.6.4.2. Προσαρμογή των δεδομένων βαθμονόμησης

Για να εξεταστεί πόσο αποτελεσματικά προσαρμόζονται τα δεδομένα βαθμονόμησης στην κάθε μία από τις τέσσερις μελετούμενες χημειομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν οι πίνακες των συντελεστών βαθμονόμησης και οι πίνακες της μετρούμενης ιδιότητας για την πρόβλεψη των συγκεντρώσεων των προτύπων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα προσαρμογής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2.

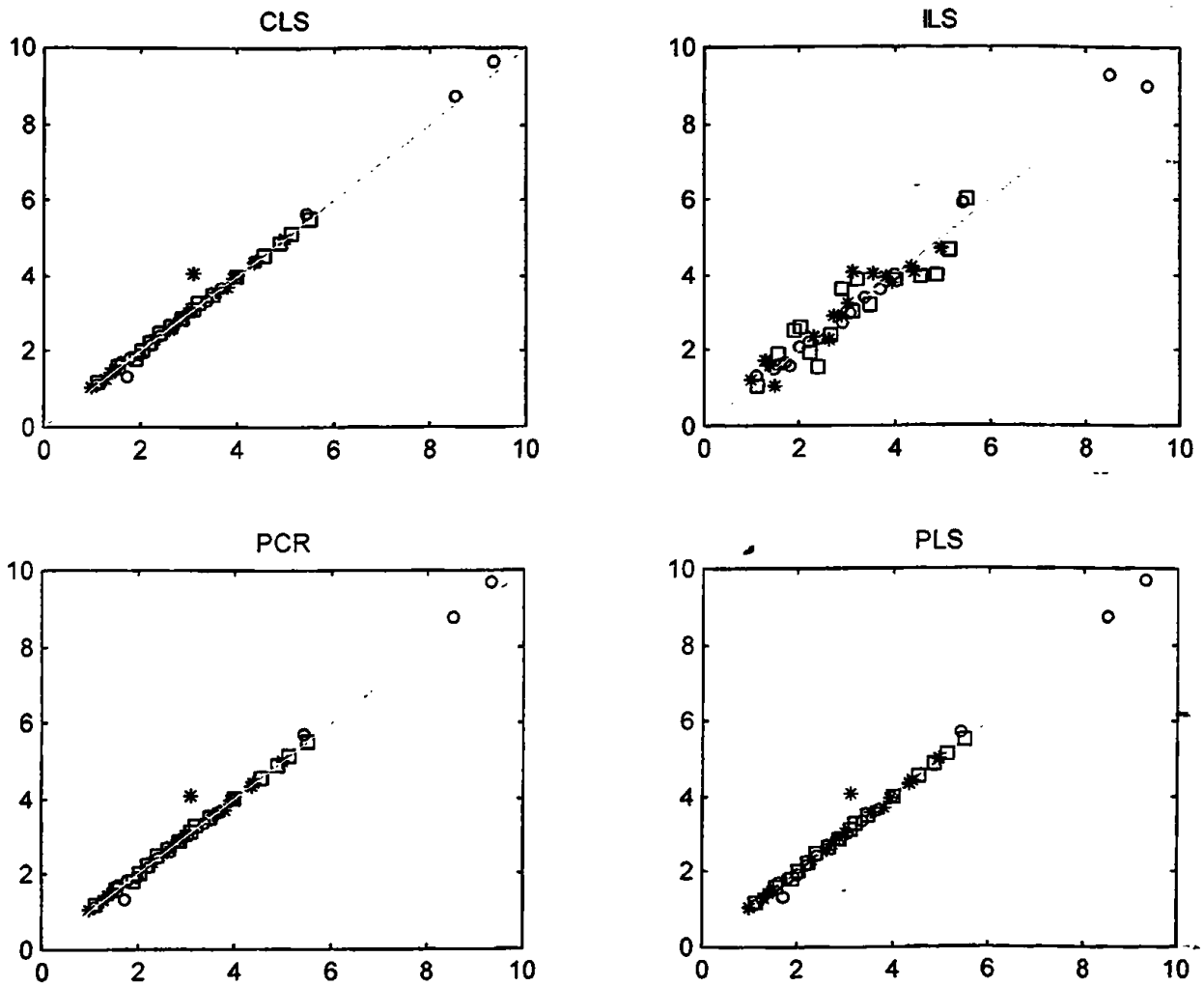
Πίνακας 2. Τα αποτελέσματα προσαρμογής των δειγμάτων βαθμονόμησης για τις 4 μελετούμενες μεθόδους

Αποτελέσματα προσαρμογής x10^{-5} M, μέθοδος CLS			Αποτελέσματα προσαρμογής x10^{-5} M, μέθοδος ILS		
[La]	[Th]	[Pr]	[La]	[Th]	[Pr]
1,046	3,050	2,207	1,231	2,985	1,954
1,282	3,354	2,489	1,732	3,414	1,553
1,424	3,680	2,635	1,586	3,629	2,394
1,499	3,995	2,847	1,066	4,015	3,615
2,300	5,672	3,129	2,365	5,943	3,027
2,572	8,719	3,270	2,260	9,272	3,867
2,742	9,666	3,470	2,892	8,971	3,188
2,909	1,142	3,983	2,891	1,334	3,877
3,027	1,338	4,522	3,244	1,668	3,950
3,574	1,498	4,890	4,018	1,500	4,009
3,702	1,707	5,109	3,943	1,628	4,655
3,958	1,838	5,488	3,765	1,596	6,015
4,079	1,949	1,157	4,087	2,091	1,064
4,350	2,177	1,590	4,192	2,245	1,904
4,429	2,437	1,813	4,093	2,306	2,530
4,982	2,863	2,028	4,694	2,730	2,623

Αποτελέσματα προσαρμογής x10^{-5} M, μέθοδος PLS			Αποτελέσματα προσαρμογής x10^{-5} M, μέθοδος PCR		
[La]	[Th]	[Pr]	[La]	[Th]	[Pr]
1,047	3,038	2,207	1,047	3,038	2,206
1,283	3,342	2,489	1,283	3,342	2,489
1,426	3,667	2,634	1,426	3,667	2,634
1,501	3,980	2,846	1,501	3,980	2,846
2,299	5,722	3,128	2,299	5,724	3,128
2,571	8,760	3,269	2,571	8,761	3,270
2,742	9,708	3,469	2,742	9,711	3,469
2,909	1,146	3,982	2,909	1,146	3,982
3,028	1,342	4,521	3,029	1,340	4,522
3,574	1,503	4,889	3,574	1,503	4,889
3,702	1,711	5,108	3,701	1,712	5,108

3,956	1,842	5,487	3,958	1,843	5,486
4,077	1,949	1,159	4,077	1,949	1,159
4,348	2,176	1,592	4,348	2,176	1,592
4,428	2,435	1,815	4,428	2,435	1,815
4,980	2,860	2,031	4,980	2,860	2,031

Για τη μέθοδο CLS ο πίνακας των απορροφήσεων, **A**, και ο πίνακας **K** αντικαταστάθηκε στην εξίσωση 3.8 (βλ. ενότητα 3.1. CLS), καθώς επίσης και οι πίνακες **P** και **A** στην



Σχήμα 7.6.4. Διαγράμματα της συσχέτισης των αναμενόμενων συγκεντρώσεων (άξονας των x, x10^{-5} M) ως προς τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις (άξονας των y, x10^{-5} M) του λανθανίου (*) του θορίου (o) και του πρασεοδυμίου (□) για 16 δείγματα βαθμονόμησης

εξίσωση πρόβλεψης 3.13 για τη μέθοδο ILS. Υπολογίστηκε το σφάλμα MSEE (βλέπε ενότητα 4.1) για κάθε μία από τις 4 μεθόδους και για κάθε αναλυτή (Πίνακας 3), όπου είναι εμφανής η παρόμοια συμπεριφορά των μεθόδων CLS, PCR και PLS, ενώ η μέθοδος ILS φαίνεται ότι αποτυγχάνει να προσδιορίσει με ακρίβεια το λανθάνιο και το πρασεοδύμιο. Αντίθετα με το λανθάνιο και το πρασεοδύμιο και απροσδόκητα, το θόριο προσδιορίζεται εξίσου καλά όπως με τις άλλες τρεις μεθόδους.

Πίνακας 3. Το σφάλμα MSEE για τις 4 μεθόδους ανάλυσης και για τα 3 μέταλλα

Μέθοδος	MSEE, $x10^{-11}$			
	La	Th	Pr	Συνολικά
CLS	0,18	1,56	0,27	2,01
ILS	11,34	1,55	44,08	56,98
PCR	0,18	1,56	0,27	2,02
PLS	0,12	1,55	0,27	2,00
Άθροισμα	11,82	6,22	44,89	

Συνήθως, το σφάλμα MSEE υπολογίζεται ξεχωριστά για το κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό και το μοντέλο βαθμονόμησης βελτιστοποιείται ανεξάρτητα για τον κάθε αναλύτη. Το σχήμα 7.6.4 παριστάνει τα διαγράμματα συσχέτισης των αναμενόμενων συγκεντρώσεων (άξονας x) ως προς τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις (άξονας y) των τριών μετάλλων στα δείγματα βαθμονόμησης για τις μεθόδους CLS, ILS, PCR και PLS. Αν και είναι εμφανής η συσχέτιση μεταξύ των αναμενόμενων με τις υπολογιζόμενες τιμές συγκέντρωσης για όλες τις μεθόδους, η προσαρμογή των δεδομένων διαφέρει από μέθοδο σε μέθοδο. Τα φασματικά δεδομένα προσαρμόζονται καλύτερα με τη μέθοδο CLS από ότι με τη μέθοδο ILS, παρόλο που συνήθως η δεύτερη είναι πιο ακριβής μέθοδος. Ένας πιθανός λόγος για την φτωχή προσαρμογή της μεθόδου ILS είναι η δύσκολη επιλογή των μηκών κύματος, λόγω των επικαλυπτόμενων φασματικών περιοχών. Οι μέθοδοι PCR και PLS, όπως αναμενόταν προσαρμόζουν τα δεδομένα καλύτερα από ότι η σχετικά πιο κλασσική μέθοδος, όπως είναι η ILS. Η συστηματική απόκλιση της συγκέντρωσης του λανθανίου για το 16° δείγμα αξιολόγησης πιθανότατα οφείλεται σε σφάλμα των αναμενόμενων συγκεντρώσεων για το συγκεκριμένο δείγμα, το οποίο δεν συμπεριλήφθηκε στη συνέχεια. Οι παραπάνω προσαρμογές δίνουν μόνο μια

ένδειξη για το πόσο καλά προσαρμόζονται τα δεδομένα βαθμονόμησης με μεθόδους γραμμικής παλινδρόμησης. Μια καλή προσαρμογή δεν εγγυάται ότι το αντίστοιχο μοντέλο βαθμονόμησης έχει καλή ικανότητα πρόβλεψης των αγνώστων δειγμάτων. Το μόνο συμπέρασμα που προκύπτει από αυτές τις προσαρμογές είναι ότι τα μοντέλα βαθμονόμησης για κάθε μέθοδο δεν μπορούν να προβλέψουν τις συγκεντρώσεις των αγνώστων με μεγαλύτερη ακρίβεια από αυτή που προβλέπουν τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης.

7.6.4.3. Επικύρωση

Για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των μεθόδων κατά την πρόβλεψη συγκεντρώσεων αγνώστων δειγμάτων παρασκευάστηκαν 7 ανεξάρτητα συνθετικά μίγματα των τριών αναλυτών, όπως φαίνεται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4. Σύσταση 7 συνθετικών μιγμάτων La, Th. και Pr

Δείγματα Επικύρωσης, $x10^{-5}$ M		
La	Th	Pr
1,30	2,00	1,50
4,50	5,00	2,10
3,70	0,00	3,30
2,20	2,80	0,00
1,70	1,40	5,00
2,40	0,96	1,50
0,00	4,10	3,00

Οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις αυτών των μιγμάτων με κάθε μια από τις 4 μεθόδους δίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5. Οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των 7 μιγμάτων με κάθε μια από τις 4 μεθόδους ανάλυσης

Δείγματα Αξιολόγησης, CLS, $x10^{-5}$ M			Δείγματα Αξιολόγησης, ILS, $x10^{-5}$ M		
La	Th	Pr	La	Th	Pr
1,473	1,930	1,307	1,820	1,654	0,762
4,009	5,389	2,214	4,853	4,613	1,675
3,507	0,076	3,747	3,148	0,293	4,159
2,930	2,570	-0,692	2,200	2,681	5,175
1,686	1,784	4,992	2,839	0,773	3,339
2,797	1,012	0,976	2,164	1,045	1,887
-0,275	4,990	1,974	2,096	2,862	-0,074
Δείγματα Αξιολόγησης, PLS, $x10^{-5}$ M			Δείγματα Αξιολόγησης, PCR, $x10^{-5}$ M		
La	Th	Pr	La	Th	Pr

1,295	1,998	1,492	1,295	1,998	1,491
4,473	4,951	2,120	4,473	4,951	2,120
3,719	0,051	3,307	3,719	0,051	3,307
2,176	2,748	0,023	2,176	2,748	0,023
1,727	1,482	4,950	1,727	1,482	4,950
2,401	0,966	1,511	2,401	0,966	1,511
-0,006	4,111	2,945	-0,006	4,111	2,945

Το σφάλμα SEP (βλέπε ενότητα 4.1) υπολογίστηκε και για τις 4 μεθόδους, όπως φαίνεται στον πίνακαμ 6:

Πίνακας 6. Το σφάλμα πρόβλεψης (SEP) για τις 4 μεθόδους ανάλυσης και για τα 3 μέταλλα

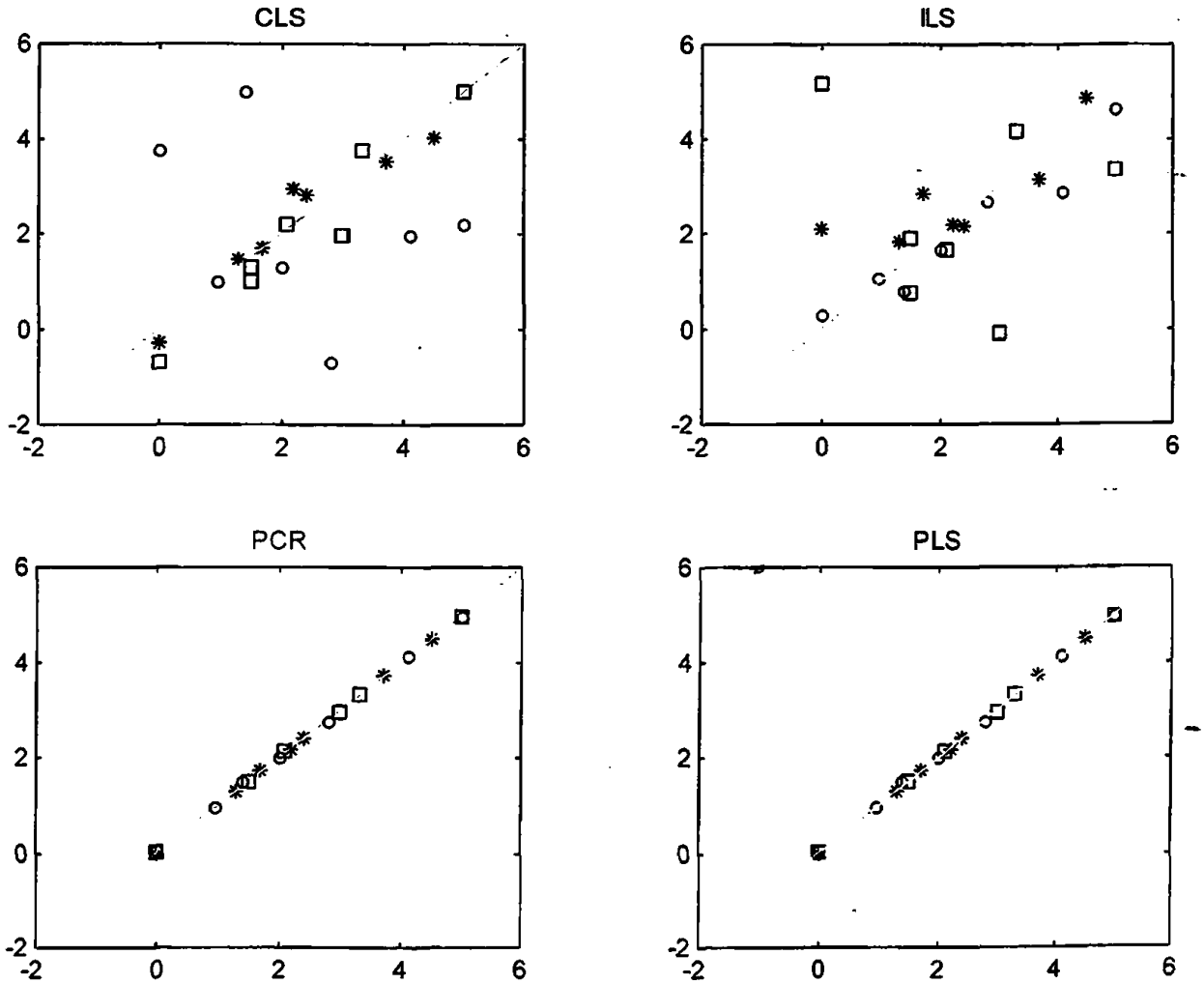
Μέθοδος	SEP			
	La	Th	Pr	Συνολικά
CLS	1,0753E-10	1,1563E-10	2,0559E-10	4,2876E-10
ILS	6,4459E-10	2,3031E-10	1,3820E-09	2,2569E-09
PCR	2,4602E-13	1,4523E-12	6,6093E-13	2,3593E-12
PLS	2,4500E-13	1,4525E-12	6,6079E-13	2,3583E-12
Αθροισμα	7,5262E-10	3,4885E-10	1,5889E-09	

Το σχήμα 5 παριστάνει τα διαγράμματα συσχέτισης των αναμενόμενων συγκεντρώσεων (άξονας x) ως προς τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις (άξονας y) των τριών μετάλλων σε δείγματα εξωτερικής επικύρωσης για τις μεθόδους CLS, ILS, PCR και PLS. Για τις μεθόδους PLS και PCR είναι και εδώ επιτυχής η συσχέτιση μεταξύ των αναμενόμενων με τις υπολογιζόμενες τιμές συγκέντρωσης. Αντίθετα, φαίνεται ότι οι μέθοδοι CLS και ILS αποτυγχάνουν να προσδιορίσουν με ακρίβεια τις τιμές των συγκεντρώσεων για τους τρεις αναλύτες.

7.6.5. Συμπεράσματα

Η μικρή διαφοροποίησητων φασμάτων διαφορετικών συστατικών σε ένα μίγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη πρόβλεψή τους με την κατασκευή πολυπαραμετρικών μοντέλων βαθμονόμησης και με την εφαρμογή χημειομετρικών αλγόριθμων. Επειδή υπάρχει φασματική αλληλεπικάλυψη σε όλα τα μήκη κύματος η επιλογή των βέλτιστων μηκών κύματος και η εφαρμογή της μεθόδου ILS καθίσταται πολύ δύσκολη και τα αποτελέσματα πρόβλεψης μη αποδεκτά. Η μέθοδος CLS συμπεριφέρεται με ακρίβεια κατά την προσαρμογή των δεδομένω βαθμονόμησης γιαατί

εισάγει όλα τα χαρακτηριστικά των δεδομένων στο μοντέλο, δηλαδή, μοντελοποιεί και το θόρυβο. Κατά την πρόβλεψη ανεξάρτητων δειγμάτων, η διαφορετική φύση των δεδομένων δίνει μεγάλες αποκλίσεις από τις αληθείς τιμές των συγκεντρώσεων. Τέλος, οι τεχνικές ανάλυσης παραγόντων, όπως οι PLS και η PCR, τα φάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως έχουν, και η απόκριση του οργάνου σε μήκη κύματος που δεν σχετίζονται με τα βαθμονομημένα συστατικά αποβάλεται σαν θόρυβος.



Σχήμα 7.6.5. Διαγράμματα συσχέτισης των αναμενόμενων συγκεντρώσεων (άξονας των x, x10^{-5} M) ως προς τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις (άξονας των y, x10^{-5} M) του λανθανίου (*) του θορίου (o) και του πρασεοδυμίου (□) για 7 δείγματα επικύρωσης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J.F.Nachman, C.E.Lundin, "Rare Earth Research", Proceedings of the 2nd Conference on Rare Earth Elements Research, University of Denver, 1961.
2. L.Wachowski, P.Kirszensztejn, R.Lopatka, B.Czajka, B. Materials Chemistry and Physics, 1994, 37, 29.
3. M.Chua, P.A.Tanner, M.F.Reid, Solid State Communications, 1994, 90(9), 581.
4. S.Li, Y.Ren, Materials Research Bulletin, 1994, 29, 993.
5. Y.H.Kim, H.S.Lee, J.Yu, K.Kim, Journal of Luminescence, 1994, 62, 173.
6. J.Zhang, F.Wang, P.Zhang, Q.Yan, Materials Science and Engineering B, 2000, 76, 6.
7. Y.Cui, J.Chen, J.Huang, Inorganica Chimica Acta, 1999, 293, 129.
8. A.Inoue, Materials Science and Engineering A, 1999, 267, 171.
9. F.Letouze, C.Martin, M.Huve, A.Maignan, C.Michel, M.Hervieu and B.Ravean, Materials Research Bulletin, 1996, 31, 657.
10. L.F.Mattheiss, Solid State Communications, 1995, 94, 741.
11. L.F.Mattheiss, T.Siegrist, R.J.Cava, Solid State Communications, 1994, 91, 587.
12. L.Siwen, M.Jian, R.Yufang, Materials Research Bulletin, 1999, 34, 1569.
13. J.Costes, A.Dupuis, J.Laurent, Inorganica Chimica Acta, 1998, 268, 125.
14. P.W.Liang, M.Munakata, T.Kuroda-Sowa, M.Maekawa, Y.Suenaga, Inorganica Chimica Acta, 1996, 249, 183.
15. P.Martin, A.Chevarier, G.Panczer, Journal of Nuclear Materials, 2000, 278, 202.
16. T.B.Jackson, Fuel and Energy Abstracts, 1997, 38, 344.
17. W.Y.Sun, P.L.Wang, D.S.Yan, Materials Letters, 1996, 26, 9.
18. G.G.Libowitz, Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1994, 55, 1461.
19. P.Vajda, Physica B: Condensed Matter, 2000, 289-290, 435.
20. F.N.Guerzoni, J.Abbot, Applied Catalysis A: General, 1995, 127, 41.
21. E.Aguiar, M.Valle, M.Silva, D.F.Silva, Zeolites, 1995, 15, 620.
22. J.Nery, Y.Mascarenhas, T.J.Bonagamba, N.C.Mello, E.Aguiar, Zeolites, 1997, 18, 44.
23. M.E.Schott, J.Schlom, K.Siler, D.E.Milenic, D.Eggensperger, D.Colcher, R.Cheng, W.J.Kruper, W.Fordyce, W.Goeckeler, Cancer, 1994, 73, 993.
24. C.H.Evans, "Biochemistry Of The Lanthanides", Plenum Press, New York, 1990.

25. H.Onishi, K.Sekine, Talanta, 1972, 19, 473.
26. A.Mohammad, N.Fatima, Chromatografia, 1998, 25, 536.
27. M.D.Palmieri, J.S.Fritz, Anal. Chem., 1988, 60, 2244.
28. J.S.Fritz, E.C.Bradford, Anal. Chem., 1958, 30, 1021.
29. H.Rohner, N.Collier, E.Hosten, Anal. Chim. Acta, 1995, 314, 219.

I. Γραμμική Άλγεβρα - Πίνακες

Συμβολισμοί

Τα σχήματα και οι εξισώσεις αριθμούνται με ένα διψήφιο αριθμό: το πρώτο ψηφίο αναφέρεται στο κεφάλαιο στο οποίο βρίσκεται το σχήμα ή η εξίσωση, ενώ το δεύτερο ψηφίο είναι ο αύξων αριθμός. Για διανύσματα (n x 1 πίνακες) χρησιμοποιούνται μικροί έντονοι λατινικοί χαρακτήρες και για n x m πίνακες κεφαλαίοι έντονοι λατινικοί χαρακτήρες. Ο ανάστροφος ενός διανύσματος ή πίνακα συμβολίζεται με τον εκθέτη T. Ο αντίστροφος ενός πίνακα N συμβολίζεται με τον εκθέτη −1. Για παράδειγμα:

$$\mathbf{n} = \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{N} = \begin{bmatrix} 1 & 4 & 7 \\ 2 & 5 & 8 \\ 3 & 6 & 9 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{n}^T = [1\ 2\ 3\ 4], \quad \mathbf{N}^{-1}\mathbf{N} = \mathbf{N}\mathbf{N}^{-1} = \mathbf{I} \qquad (1.1)$$

Ένα από τα κύρια αντικείμενα της χημειομετρίας είναι η πολυπαραμετρική βαθμονόμηση. Από ένα δείγμα λαμβάνεται ένα μεγάλο πλήθος από μετρήσεις, μερικές φορές αρκετές χιλιάδες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό του [1]. Στις φασματοκινητικές εφαρμογές αυτές οι μετρήσεις μπορεί να είναι τιμές απορρόφησης, ή διαπερατότητας για ορισμένα μήκη κύματος της φασματικής περιοχής και σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα [2]. Η διαχείρηση και η επεξεργασία τόσο μεγάλων πακέτων δεδομένων κάνει αναγκαία την χρησιμοποίηση πινάκων. Η οργάνωση των δεδομένων υπό μορφή πινάκων έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως την ευκολότερη και ταχύτερη επεξεργασία, και την εύκολη εφαρμογή των υπολογιστών [3]. Ένας πίνακας ή μήτρα είναι ένα σύνολο αριθμητικών τιμών που από τη φύση τους ακολουθούν μια διάταξη κατά δύο έννοιες. Για παράδειγμα στη ανάλυση χημικών δειγμάτων οι τιμές είναι ταξινομημένες κατά τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε σειρά (ή γραμμή) αντιστοιχεί ένα συγκεκριμένο δείγμα και κάθε στήλη περιέχει μερικές τιμές από τις ιδιότητες που περιγράφουν τα δείγματα [4]. Όταν ένας πίνακας έχει n σειρές και m στήλες, τότε ο πίνακας είναι διαστάσεων n x m ή ένας n x m πίνακας. Οι πραγματικοί αριθμοί που περιέχονται σε ένα πίνακα ονομάζονται στοιχεία του πίνακα. Κάθε στοιχείο χαρακτηρίζεται από τη σειρά και τη στήλη του πίνακα στις οποίες ανήκει. Το στοιχείο της σειράς i και της στήλης j ενός πίνακα N συμβολίζεται με n_{ij}. Έτσι, n_{13} είναι το

στοιχείο της πρώτης σειράς και της τρίτης στήλης. Δύο πίνακες **A** και **B** είναι ίσοι μόνο όταν έχουν τις ίδιες διαστάσεις και όλα τα αντίστοιχα στοιχεία τους είναι ίσα

$$\mathbf{A}_{ij} = \mathbf{B}_{ij} \qquad i = 1, 2, \ldots, n \text{ και } j = 1, 2, \ldots, m \tag{1.2}$$

όταν δηλαδή περιέχουν τα ίδια στοιχεία και με την ίδια διάταξη.

I-1. Πρόσθεση Πινάκων

Το άθροισμα **A** + **B** δύο πινάκων **A**, **B** που έχουν τις ίδιες διαστάσεις n x m είναι ένας πίνακας **C** = **A** + **B**, διαστάσεων επίσης n x m, με στοιχεία

$$\mathbf{C}ij = \mathbf{A}_{ij} + \mathbf{B}_{ij} \tag{1.3}$$

Κάθε στοιχείο του **C** προκύπτει προσθέτοντας τα στοιχεία των προσθετέων πινάκων **A** και **B** που βρίσκονται στην ίδια σειρά και στήλη:

$$\mathbf{A}+\mathbf{B} = \begin{bmatrix} a_{11}+b_{11} & a_{12}+b_{12} & \ldots & a_{1m}+b_{1m} \\ a_{21}+b_{21} & a_{22}+b_{22} & \ldots & a_{2m}+b_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & \ldots & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ a_{n1}+b_{n1} & a_{n2}+b_{n2} & \ldots & a_{nm}+b_{nm} \end{bmatrix} \tag{1.5}$$

Στην πρόσθεση πινάκων ισχύει η αντιμεταθετική ιδιότητα:

$$\mathbf{A} + \mathbf{B} = \mathbf{B} + \mathbf{A} \tag{1.6}$$

καθώς και η προσεταιριστική ιδιότητα:

$$(\mathbf{A} + \mathbf{B}) + \mathbf{C} = \mathbf{A} + (\mathbf{B} + \mathbf{C}) \tag{1.7}$$

Ο ορισμός του αθροίσματος επεκτείνεται και σε περισσότερους από δύο πίνακες των ίδιων διαστάσεων:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A} + \mathbf{B} + \mathbf{C} + \ldots + \mathbf{D} \tag{1.8}$$

με στοιχεία:

$$x_{ij} = a_{ij} + b_{ij} + c_{ij} + \ldots + d_{ij} \tag{1.9}$$

Ι-2. Πολλαπλασιασμός πίνακα με πραγματικό αριθμό

Το γινόμενο ενός πραγματικού αριθμού λ με ένα πίνακα **A** είναι ένας πίνακας

$$\mathbf{B} = \lambda\, \mathbf{A} = \mathbf{A}\, \lambda \tag{1.10}$$

των ιδίων διαστάσεων με τον **A** και με στοιχεία

$$b_{ij} = \lambda\, a_{ij} \tag{1.11}$$

Δηλαδή, για να πολλαπλασιάσουμε αριθμό με πίνακα πολλαπλασιάζουμε όλα τα στοιχεία του πίνακα με τον αριθμό:

$$\lambda \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \ldots & a_{1m} \\ a_{21} & a_{22} & \ldots & a_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & \ldots & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ a_{n1} & a_{n2} & \ldots & a_{nm} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \lambda a_{11} & \lambda a_{12} & \ldots & \lambda a_{1m} \\ \lambda a_{21} & \lambda a_{22} & \ldots & \lambda a_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & \ldots & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \lambda a_{n1} & \lambda a_{n2} & \ldots & \lambda a_{nm} \end{bmatrix} \tag{1.12}$$

Ι-3. Διαφορά Πινάκων

Η διαφορά **A** – **B** δύο πινάκων ορίζεται μόνο για πίνακες των ίδιων διαστάσεων με τη βοήθεια των ορισμών του αθροίσματος πινάκων και του πολλαπλασιασμού πίνακα με αριθμό:

$$\mathbf{A} - \mathbf{B} = \mathbf{A} + (-1)\,\mathbf{B} \tag{1.13}$$

Έτσι:

$$\mathbf{A} - \mathbf{B} = \begin{bmatrix} a_{11} - b_{11} & a_{12} - b_{12} & \dots & a_{1m} - b_{1m} \\ a_{21} - b_{21} & a_{22} + b_{22} & \dots & a_{2m} - b_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ a_{n1} - b_{n1} & a_{n2} - b_{n2} & \dots & a_{nm} - b_{nm} \end{bmatrix} \tag{1.14}$$

I-4. Πολλαπλασιασμός Πινάκων

Το γινόμενο των πινάκων ορίζεται μόνο όταν ο αριθμός m των στηλών του πρώτου είναι ίσος με τον αριθμό των σειρών του δευτέρου. Το γινόμενο ενός n x m πίνακα με έναν m x k πίνακα **B** είναι n x k πίνακας **C = A B**, όπου κάθε στοιχείο c_{ij} της i σειράς και της j στήλης ισούται με το γινόμενο της i σειράς του **A** με την j στήλη του **B**:

$$c_{ij} = \begin{bmatrix} a_{i1} & a_{i2} & \dots & a_{im} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} b_{1j} \\ b_{2j} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ b_{mj} \end{bmatrix} = \sum_{l=1}^{m} a_{il} b_{lj} \tag{1.15}$$

Με τη βοήθεια του ορισμού του γινομένου πινάκων, το σύστημα n γραμμικών εξισώσεων με m αγνώστους:

$a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1m}x_m = b_1$

$a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2m}x_m = b_2$

$$\begin{matrix} \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ a_{n1}x_1 + a_{n2}x_2 + \ldots + a_{nm}x_m = b_n \end{matrix} \qquad (1.16)$$

γράφεται σε μορφή πινάκων με το σύντομο συμβολισμό:

$$\mathbf{A\,x = b} \qquad (1.17)$$

όπου:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \ldots & a_{1m} \\ a_{21} & a_{22} & \ldots & a_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & \ldots & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ a_{n1} & a_{n2} & \ldots & a_{nm} \end{bmatrix}, \mathbf{x}^T = [x_1\ x_2 \ldots x_m],\ \mathbf{b}^T = [b_1\ b_2 \ldots b_n] \qquad (1.18)$$

Το γινόμενο δύο πινάκων δεν έχει στη γενική περίπτωση την αντιμεταθετική ιδιότητα, δηλαδή:

$$\mathbf{A\,B} \neq \mathbf{B\,A} \qquad (1.19)$$

Εκτός από τον παραπάνω ορισμό γινομένου πινάκων, που είναι ο πιο συνηθισμένος, υπάρχουν και διαφορετικοί ορισμοί γινομένων. Ο πιο απλός από αυτούς, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε αρκετές φορές και στην παρούσα διατριβή, είναι το γινόμενο Hadamard **A*B** που ορίζεται από τη σχέση:

$$(\mathbf{A*B})_{ij} = a_{ij}b_{ij} \qquad (1.20)$$

δηλαδή πρόκειται για έναν στοιχείο προς στοιχείο πολλαπλασιασμό των δύο πινάκων [5].

I-5. Ειδικές κατηγορίες πινάκων

Ένας πίνακας ονομάζεται μηδενικός και συμβολίζεται με **0** όταν όλα τα στοιχεία του είναι ίσα με το μηδέν π.χ.:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Ο μηδενικός πίνακας έχει για την πρόσθεση πινάκων την ίδια σημασία, όπως το μηδέν για την πρόσθεση πραγματικών αριθμών:

$$\mathbf{A} + \mathbf{0} = \mathbf{0} + \mathbf{A} = \mathbf{A} \qquad (1.21)$$

Ένας πίνακας ονομάζεται τετραγωνικός όταν ο αριθμός των σειρών του είναι ο ίδιος με τον αριθμό των στηλών του, π.χ.:

$$\begin{bmatrix} 1 & 3 \\ 8 & 5 \end{bmatrix}, [4]$$

Ένας τετραγωνικός πίνακας ονομάζεται διαγώνιος όταν όλα τα μη διαγώνια στοιχεία του είναι μηδενικά, π.χ.:

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 5 \end{bmatrix}, [8]$$

Ένας τετραγωνικός πίνακας ονομάζεται κάτω τριγωνικός όταν όλα τα στοιχεία του που βρίσκονται πάνω από τη διαγώνιο είναι μηδενικά και πάνω τριγωνικός όταν όλα τα κάτω από τη διαγώνιο στοιχεία του είναι μηδενικά. Για παράδειγμα, από τους πίνακες

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 34 & 5 & 0 & 0 \\ 5 & 8 & 2 & 0 \\ 3 & 9 & 3 & 4 \end{bmatrix}, \qquad \begin{bmatrix} 1 & 30 & 5 & 3 \\ 0 & 5 & 4 & 9 \\ 0 & 0 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 4 \end{bmatrix}$$

ο πρώτος είναι κάτω τριγωνικός και ο δεύτερος πάνω τριγωνικός.

Ένας τετραγωνικός πίνακας που τα διαγώνια στοιχεία του είναι η μονάδα και τα υπόλοιπα είναι μηδενικά ονομάζεται μοναδιαίος πίνακας και συμβολίζεται με **I**, π.χ.:

$$[1], \quad \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Ο μοναδιαίος πίνακας έχει σε σχέση με το γινόμενο πινάκων την ίδια σημασία που έχει η μονάδα σε σχέση με το γινόμενο αριθμών:

$$\mathbf{A\,I = A}, \quad \mathbf{I\,B = B}, \quad \mathbf{A\,I\,B = A\,B} \qquad (1.22)$$

Ένας πίνακας $\mathbf{A}^T$ που προκύπτει από τη διαδικασία στην οποία οι σειρές του πίνακα **A** γίνονται στήλες και οι στήλες σειρές ονομάζεται ανάστροφος του **A**:

$$(a^T)_{ij} = a_{ji} \qquad (1.23)$$

I-6. Αντιστροφή Πινάκων

Ο αντίστροφος ενός πίνακα, **A**, $\mathbf{A}^{-1}$, είναι ένας πίνακας για τον οποίο ισχύει: $\mathbf{AA}^{-1} = \mathbf{I}$ και $\mathbf{A}^{-1}\mathbf{A} = \mathbf{I}$. Θεωρείται ότι ο **A**, ο $\mathbf{A}^{-1}$ και ο **I** είναι τετραγωνικοί πίνακες με τις ίδιες διαστάσεις. Όταν υπάρχει ο $\mathbf{A}^{-1}$ τότε είναι μοναδικός και ο **A** ονομάζεται αντιστρέψιμος. Ένας τετραγωνικός πίνακας χρησιμοποιείται σε μια πολυπαραμετρική ανάλυση ενός ακριβώς προσδιοριζόμενου συστήματος (ο αριθμός των γνωστών ισούται με τον αριθμό των αγνώστων μεταβλητών, όπως για παράδειγμα ένας πίνακας **A** ο οποίος περιέχει

φάσματα απορρόφησης σε ν αριθμό μηκών κύματος για ν προσδιοριζόμενα συστατικά). Πολλές φορές όμως, τα μελετούμενα συστήματα είναι υπερπροσδιοριζόμενα (αριθμός μηκών κύματος > αριθμός προσδιοριζόμενων συστατικών). Σε αυτή τη περίπτωση, ο αντίστροφος του **A** ονομάζεται ψευδοαντίστροφος $\mathbf{A}^+$ και υπολογίζεται με την τεχνική της γενικευμένης αντιστροφής [6]:

$$\mathbf{A}^+ = (\mathbf{A}^T\mathbf{A})^{-1}\mathbf{A}^T \qquad (1.24)$$

Υπάρχουν, όμως περιπτώσεις όπου ο $\mathbf{A}^{-1}$ δεν υπάρχει, όπως όταν υπάρχουν γραμμικές αλληλεξαρτήσεις στο εξεταζόμενο σύστημα. Τότε στο σύστημα δεν υπάρχουν καλές συνθήκες αλλά μια μαθηματική κατάσταση η οποία ονομάζεται μοναδικότητα. Η μοναδικότητα είναι μια απροσδιόριστη κατάσταση, ένα σύμπτωμα μαθηματικής "παθολογίας" όπου η λύση της εξίσωσης οδηγεί σε άπειρη τιμή της μετρούμενης φυσικής ποσότητας [7]. Τότε ο πίνακας **A** ονομάζεται ιδιάζων και ο δείκτης της μαθηματικής συμπεριφοράς του δίνεται από τον αριθμό κανονικότητας, cond(**A**):

$$\mathrm{cond}(\mathbf{A}) = \|\mathbf{A}\|.\|\mathbf{A}^{-1}\| = (\lambda_{max})^{1/2}.(\lambda_{min})^{-1/2} \qquad (1.25)$$

όπου $\|A\|$ είναι η νόρμα του πίνακα **A**, λ_{max} η μέγιστη καί λ_{min} η μικρότερη ιδιοτιμή του **A**. Η παραπάνω σχέση ισχύει στην περίπτωση που ο **A** είναι τετραγωνικός. Για υπερπροσδιοριζόμενα συστήματα, όπου ο αριθμός των στηλών του **A** είναι διάφορος των αριθμών των γραμμών του, ισχύει:

$$\mathrm{cond}(\mathbf{A}) = [\mathrm{cond}(\mathbf{A}^T\mathbf{A})]^{1/2} \qquad (1.26)$$

Συστήματα με καλή μαθηματική συμπεριφορά έχουν αριθμό κατάστασης κοντά στο 1 και ο αντίστοιχος πίνακας του συστήματος ονομάζεται ομαλός. Ένας πίνακας χαρακτηρίζεται ως ιδιάζων ή μη ομαλός όταν ο αριθμός κατάστασής του είναι άπειρο, ή έχει πολύ μεγάλες τιμές, και ο αντίστροφός του πλησιάζει το επίπεδο ακριβείας του υπολογιστή [8]. Η εύρεση του $\mathbf{A}^{-1}$ γίνεται με τη μέθοδο διαδοχικών προσεγγίσεων των Gauss-Jordan, τη μέθοδο απόσπασης του Gauss, κ.ά.

I-7. Ορθογωνικότητα και Ορθοκανονικότητα

Αν δύο διανύσματα $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ και $\mathbf{y} = (y_1, y_2, y_3)$ σε ένα τρισδιάστατο χώρο ($k = 3$) είναι ορθογώνια, δηλαδή σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 90 μοιρών, τότε το γινόμενό τους είναι ίσο με μηδέν:

$$\mathbf{x}^T\mathbf{y} = x_1y_1 + x_2y_2 + x_3y_3 = 0 \qquad (1.27)$$

Για $k > 3$ αυτή η σχέση είναι ο ορισμός της ορθογωνικότητας. Η ορθογωνικότητα σχετίζεται με την ανεξαρτησία των μεταβλητών. Ορθογωνικότητα σημαίνει απόλυτη μη συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών ($R = 0$). Η ανεξαρτησία των μεταβλητών είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό γιατί με την προσθήκη κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής (π.χ. ενός μήκους κύματος, ή ενός δείγματος βαθμονόμησης) στο μοντέλο βαθμονόμησης τα αποτελέσματα πρόβλεψης συνεχώς βελτιώνονται. Μαθηματικά, η ορθογωνικότητα είναι μια πολύ χρήσιμη ιδιότητα η οποία απλοποιεί αλγόριθμους που χρησιμοποιούνται στην πολυπαραμετρική ανάλυση, γιατί κάθε ομάδα παραμέτρων μπορεί να υφίσταται επεξεργασία ανεξάρτητα από τις άλλες παραμέτρους. Δυο διανύσματα πληρούν την προϋπόθεση της ορθοκανονικότητας όταν είναι ορθογώνια και έχουν μοναδιαίο μέγεθος [9]. Γενικά, ένα σύστημα διανυσμάτων λέγεται ορθοκανονικό αν ισχύει:

$$\mathbf{x}_i^T\mathbf{x}_j = \begin{cases} 0 & \text{για } i \neq j \\ 1 & \text{για } i = j \end{cases} \qquad (1.28)$$

Όπως και με τα διανύσματα, ένας ορθοκανονικός πίνακας έχει την σημαντική ιδιότητα να δίνει τον μοναδιαίο πίνακα όταν πολλαπλασιάζεται με τον ανάστροφό του.

I. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΡΧΙΚΩΝ ΚΛΙΣΕΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ

Το αρχείο με επέκταση *.m για τον υπολογισμό των αρχικών κλίσεων φασματο-κινητικών δεδομένων για εφαρμογή σε περιβάλλον MATLAB.

```
function [b]=mylr(X)
d=size(X);
[n l]=size(X);
for s=1:n
   x=X(s:s,:);
   r=corrcoef(x(1:l),[1:l]);
   l=d(:,2:2);
   while r(2:2,1:l)<=.90
      l=l-1;
      r=abs(corrcoef(x(1:l),[1:l]));
   end
   denom=(l*sum(x(1:l).^2)-(sum(x(1:l)))^2);
   if denom==0
      b(s)=0;
   else
      b(s)=(l*sum(x(1:l).*[1:l])-
sum(x(1:l))*sum([1:l]))/denom;
   end
end
```

II. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ NIPALS ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Ο αλγόριθμος αυτός είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος για τον υπολογισμό των κύριων συστατικών για μια ομάδα δεδομένων. Παράγει πιο ακριβή αριθμητικά αποτελέσματα συγκριτικά με τη μέθοδο της Αποικοδόμησης της Συμμεταβλητότητας, αλλά είναι πιο αργός στους υπολογισμούς. Περιέχει τα ακόλουθα στάδια:

1) Αντιστοιχία του ιδιοδιανύσματος στο πρώτο φάσμα: $F_i = A_1$

2) Υπολογισμός της ιδιοτιμής: $\lambda_{i,j} = (\Sigma S_{i2})^{1/2}$

3) Κανονικοποίηση του ιδιοδιανύσματος: $F_i = F_i / \lambda_{i,j}$

4) Υπολογισμός των συντελεστών για τα ιδιοδιανύσματα: $Si = A\ F_i^T$

5) Έλεγχος για σύγκλιση αυτών των συντελεστών με τους συντελεστές από τον προηγούμενο υπολογισμό για το ίδιο ιδιοδιάνυσμα.. Αν αυτός είναι ο πρώτος υπολογισμός για το ιδιοδιάνυσμα αυτό, ή οι συντελεστές δεν είναι ίδιοι, συνέχισε με το στάδιο 5. Αν οι συντελεστές είναι ίδιοι, συνέχισε με το στάδιο 8

6) Επανάληψη του υπολογισμού του ιδιοδιανύσματος: $F_i = A^T S_i$

7) Επιστροφή στο στάδιο 2

8) Αν i = f τότε γίνεται τερματισμός των υπολογισμών, διαφορετικά υπολογίζεται ο πίνακας των στατιστικών υπολοίπων για το επόμενο ιδιοδιάνυσμα: $A = A - S_i F_i$

9) Αύξηση του απαριθμητή του ιδιοδιανύσματος, i = i + 1 και επιστροφή στο στάδιο 1.

III. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Αυτή η μέθοδος είναι πιο γρήγορη από τον αλγόριθμο NIPALS, αλλά εμφανίζει την τάση για αριθμητικά σφάλματα στα τελευταία ιδιοδιανύσματα όταν εκτελείται σε υπολογιστές που χρησιμοποιούν μόνο απλή επαναληψιμότητα. Αυτό οφείλεται στο στάδιο συμπίεσης δεδομένων που εκτελείται στην αρχή για τον υπολογισμό του πίνακα μεταβλητότητας - συμμεταβλητότητας. Κατά την εφαρμογή αυτού του αλγορίθμου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται αριθμοί διπλής επαναληπτικότητας, ή μόνο να εφαρμόζεται για τον υπολογισμό των πρώτων ιδιοδιανυσμάτων. Τα στάδια είναι τα παρακάτω:

1) Υπολογισμός του πίνακα μεταβλητότητας – συμμεταβλητότητας: $Z = A\ A^T$

2) Εισαγωγή αρχικών αυθαίρετων τιμών στους συντελεστές: $S_i = 0.1$

3) Υπολογισμός των νέων συντελεστών: $S_i = Z\ S_i^T$

4) Υπολογισμός της ιδιοτιμής: $\lambda_{i,j}=(\Sigma S_{i2})^{1/2}$ Κανονικοποίηση των συντελεστών: $S_i = S_i / \lambda_{i,j}$

5) Έλεγχος για σύγκλιση αυτών των συντελεστών με τους συντελεστές από τον προηγούμενο υπολογισμό για το ίδιο ιδιοδιάνυσμα.. Αν αυτός είναι ο πρώτος

υπολογισμός για το ιδιοδιάνυσμα αυτό, ή οι συντελεστές δεν είναι ίδιοι, συνεχίζεται το στάδιο 3. Αν οι συντελεστές είναι ίδιοι, συνεχίζεται το στάδιο 7

6) Αν i = f πηγαίνει στο στάδιο 9, διαφορετικά υπολογίζεται ο πίνακας των στατιστικών υπολοίπων μεταβλητότητας – συμμεταβλητότητας για το επόμενο ιδιοδιάνυσμα: $Z = Z - (S_i S_i^T)\, \lambda_{i,j}$
7) Αύξηση του απαριθμητή του ιδιοδιανύσματος, i = i + 1 και επιστροφή στο στάδιο 3
8) Υπολογισμός όλων των ιδιοδιανυσμάτων: $F = S^T A$

IV. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ PCR

Η γενική εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης είναι η:

$$\mathbf{y = a + x\, b}$$

όπου **b** είναι η στήλη (ή διάνυσμα) των υπολογιζόμενων συντελεστών παλινδρόμησης. Η στήλη των συντελεστών, **b**, μπορεί να γραφεί σαν το γινόμενο του πίνακα των ιδιοδιανυσμάτων, **P**, και των ιδιοδιανισμάτων του y:

$$\mathbf{b = P\, q}$$

Κάθε στήλη του **P** είναι ένα ιδιοδιάνυσμα για τον κάθε παράγοντα που συμπεριλαμβάνεται στο μοντέλο παλινδρόμησης. Τα στοιχεία του πίνακα **P** συμβολίζονται με p_{jk}, όπου j = 1,...m (m είναι ο αριθμός των αρχικών μεταβλητών) και k = 1,...K (K είναι οαριθμός των κύριων συστατικών ή παραγόντων που περιλαμβάνονται στο μοντέλο). Το διάνυσμα (στήλη) **q** αντιστοιχεί στα ιδιοδιανύσματα του y, τα οποία υπολογίζονται από την παλινδρόμηση του πίνακα **Y** με πίνακα των παραγόντων, **T**. Το **q** προκύπτει από την εξίσωση:

$$\mathbf{q = D\, T^T y}$$

όπου **D** είναι ένας διαγώνιος πίνακας με το κάθε διαγώνιο στοιχείο του ίσο με $1/\tau_k$, και τ_k είναι η ιδιοτιμή του παράγοντα k). Η στήλη t_k του πίνακα των παραγόντων, **T**, υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\mathbf{t}_k = \mathbf{X}_{k-1}\, \mathbf{p}_k$$

και οι προσδιοριζόμενοι συντελεστές παλινδρόμηση για k αριθμό παραγόντων είναι:

$$\mathbf{b} = \mathbf{p}_k\, \mathbf{q}_k$$

V. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ PLS

1) Η πρώτη στήλη του πίνακα **Y** των συγκεντρώσεων χρησιμοποιείται σαν την πρώτη στήλη του πίνακα **u** των παραγόντων y: $\mathbf{u} = \mathbf{y}_1$
2) Υπολογίζονται τα στατιστικά βάρη του πίνακα **X**: $\mathbf{w}^T = \mathbf{u}^T \mathbf{X} / \mathbf{u}^T \mathbf{u}$
3) Γίνεται κλιμάκωση των βαρών σε μοναδιαίο διάνυσμα: $\mathbf{w}^T = \mathbf{w}^T / (\mathbf{w}^T \mathbf{w})^{1/2}$
4) Υπολογίζονται οι παράγοντες του πίνακα **X**: $\mathbf{t} = \mathbf{X}\, \mathbf{w}^T$
5) Υπολογίζονται τα ιδιοδιανύσματα του πίνακα **Y**: $\mathbf{q}^T = \mathbf{t}^T \mathbf{Y} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
6) Παράγεται το νέο διάνυσμα των παραγόντων y, **u**: $\mathbf{u} = \mathbf{Y}\, \mathbf{q} / \mathbf{q}^T \mathbf{q}$
   Το νέο διάνυσμα, $\mathbf{u}_{new}$, συγκρίνεται με το προηγούμενο $\mathbf{u}_{old}$. Εάν $||\mathbf{u}_{new} - \mathbf{u}_{old}|| < ||\mathbf{u}_{new}||$ x αριθμός κατωφλιού, η σύγκλιση έχει επιτευχθεί, διαφορετικά η πορεία επιστρέφει στο βήμα 1. Ο αριθμός κατωφλιού ορίζεται με βάση την ακρίβεια του υπολογιστή.
7) Προσδιορίζεται ο συντελεστής παλινδρόμησης, b: $b = \mathbf{u}^T \mathbf{t} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
8) Υπολογίζονται τα ιδιοδιανύσματα του πίνακα **X**: $\mathbf{p}^T = \mathbf{t}^T \mathbf{X} / \mathbf{t}^T \mathbf{t}$
9) Τέλος, υπολογίζεται ο πίνακας, **B**, των συντελεστών παλινδρόμησης σύμφωνα με την εξίσωση: $\mathbf{B} = \mathbf{w}\, (\mathbf{P}^T \mathbf{w})^{-1}\, \mathbf{Q}^T$

SUMMARY

The Present Ph.D. thesis describes some of the most recent applications of chemometrics applied to the simultaneous multicomponent determination. The main goal of this work is the examination of the behavior of chemometric models in chemical systems which used often in Analytical Chemistry, and the extraction of information from kinetic characteristics of the analytes. Various chemometric techniques have been developed and applied with the use of commercial or laboratory-made algorithms (Classical Least Squares, Inverse Least Squares, Partial Least Squares, and Principal Component Regression). These techniques were applied to data sets from a number of "real life" chemical systems, and the results were statistically analyzed, evaluated and/or compared. The most important aspect of this thesis is not so the mathematical processes, or the development of new algorithms for well-known and investigated chemometric techniques, as the successful application of the last in many cases, where traditional methods fails to serve Analytical Chemistry. In addition, a new field of kinetics is proved to be a powerful analytical tool, equal or better than well-established analytical methods

SUMMARY

The Present Ph.D. thesis describes some of the theoretical applications of chemometrics, especially in the simultaneous multicomponent determination. The main aim of this work is the examination of the behavior of chemometric models in chemical systems which used often in Analytical Chemistry, and the extraction of information from kinetic characteristics of the analytes. Various chemometric techniques have been developed and applied with the use of commercial or laboratory-made algorithms (Classical Least Squares, Inverse Least Squares, Partial Least Squares, and Principal Component Regression). These techniques were applied to data sets from a number of real life chemical systems, and the results were discussed, analyzed, evaluated and/or compared. The most important aspect of this thesis is not so the mathematical processes, or the development of new algorithms for well-known and investigated chemometric techniques, as the successful application of the last in many cases, where traditional methods fails to serve Analytical Chemistry. In addition, a new field of chemics is proved to be a powerful alternative and equal to even well-established analytical methods.

"... Despite the prophesy of August Comte, analytical chemistry has not deteriorated or lost its spirit because of this. On the contrary, analytical chemistry has revived and expanded to become the science of measurements and will surely continue to do so in the future."

Y.Z.Liang et. all, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1993, 18, 235