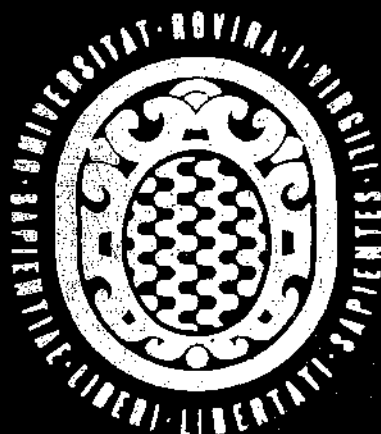


UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química



**LÍMITS DE DETECCIÓ
EN L'ANÀLISI MULTIVARIANT**

**Tesi Doctoral
RICARD BOQUÉ MARTÍ
Tarragona, 1997**

Límits de Detecció en l'Anàlisi Multivariant

Tesi Doctoral

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

0101 - 02060



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química

Àrea de Química Analítica



LÍMITS DE DETECCIÓ
EN L'ANÀLISIMULTIVARIANT

Memòria presentada per
RICARD BOQUÉ MARTÍ
per assolir el grau de
Doctor en Ciències Químiques

Tarragona, maig de 1997

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
BIBLIOTECA



1700130198

Dr. Francesc Xavier Rius i Ferrús, Professor Catedràtic de Química
Analítica de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICA:

Que la present Tesi Doctoral, titulada "LÍMITS DE DETECCIÓ EN
L'ANÀLISI MULTIVARIANT", i presentada per Ricard Boqué Martí per
optar al grau de Doctor en Ciències Químiques, ha estat realitzada sota la
meva direcció a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química
d'aquesta Universitat.

I per a que consti, expedixo aquest certificat a Tarragona, a set d'abril de
1997



Prof. F. Xavier Rius i Ferrús

Quan vaig començar la Tesi i veia d'altres companys a la Facultat que estaven a punt de defensar la seva, els veia absorbits per la feina, una feina que els havia ocupat molt de temps i on hi havien esmerçat molts esforços. Vaig pensar: això deu ser bastant dur, no sé si jo seré capaç! I segurament no ho hagués estat de no ser per un seguit de persones, a les quals vull agrair profundament el seu ajut i recolzament:

Al Prof. Rius, director d'aquesta Tesi, per tot el treball que hi ha dedicat i per tot el que m'ha ensenyat, que ha estat molt. També vull agrair-li la confiança i l'amistat que m'ha mostrat des que em vaig incorporar al seu grup de recerca, i de les que espero continuar essent mereixedor en el futur.

A tota la gent que forma o ha format part durant aquests anys del Grup de Quimiometria: les Dres. Larrechi, Callao i Ruisánchez, el Jordi, el Jaume, el Joan, el Florenci, l'Antoni, el Justo i el Jaume Ramon; i a la nova generació: Àlex, Cristina, Yolanda, Àngel, Santi, Javi, Alicia i Dani. A tots, de veritat, gràcies. Un grup humà com aquest no es troba tan fàcilment.

A totes les persones de l'Àrea de Química Analítica i, especialment, a la gent de l'Escola d'Enologia que, tot i en la distància, sempre han estat al meu costat.

A la meva família, que s'ha fet molt gran durant aquests anys, i espero que encara se'n faci molt més.

Als meus pares, per tots aquests anys. Que considerin aquestes pàgines fruit del seu treball. I a la meva germana, l'Anna, pel seu ajut en les correccions.

A la meva dona, perquè ella ha sigut la meva inspiració. Olga, a tu vull dedicar aquesta Tesi.

*Un dia un bon professor em va dir:
"La vida et donarà el que tu donis a la vida "*

A l'Olga, amb tot el meu afecte

ÍNDEX

Objecte de la Tesi Doctoral	1
Capítol 1. Introducció general	5
1.1 Validació de mètodes i límits de detecció	7
1.2 Perspectiva històrica. Definicions relacionades amb els límits de detecció en la calibració univariant	8
1.3 Concepte actual de límits de detecció i quantificació	17
1.3.1 Etapa de decisió	21
1.3.2 Límit de detecció	22
1.3.3 Límit de quantificació	23
1.4 Aspectes conceptuals relacionats amb els límits de detecció	24
1.4.1 Etapa de decisió	24
1.4.1.1 La possible existència d'errors sistemàtics en el model matemàtic emprat o en les pròpies mesures	24
1.4.1.2 El tipus de distribució de la hipòtesi nul·la, H_0	25
1.4.1.3 Propagació d'errors del model a la concentració predita i el nivell crític	26
1.4.1.4 Estimació dels graus de llibertat pel test de significació	26
1.4.2 Etapa de detecció	27
1.4.2.1 Existència de l'error de 2a espècie, p	27
1.4.2.2 Relació existent entre els errors α , P i el límit de detecció	27
1.4.2.3 La distribució de la hipòtesi alternativa. Potència del test	28
1.5 Estructura de la tesi	30
1.6 Referències	32
Capítol 2. Límits de detecció en la calibració multivariant. Estat actual de la qüestió	35
2.1 Models de calibració multivariants	38
2.1.1 Model directe	38
2.1.2 Model invers	42
2.1.2.1 Regressió per mínims quadrats inversos (ILS)	43
2.1.2.2 Regressió per components principals (PCR)	45
2.1.2.3 Regressió per mínims quadrats parcials (PLS)	47
2.2 Aproximacions basades en el senyal net de l'analit	50
2.3 Aproximacions basades en la variància de la concentració predita	58
2.4 Aproximacions basades en els perfils cromatogràfics d'espècies que coelueixen	62
2.5 Aproximacions basades en la reducció de la matriu de dades original a una dimensió	68
2.6 Altres aproximacions	72
2.7 Referències	74
Article: <i>Multivariate Detection Limits Estimators, A review.</i>	77

Capítol 3. Límits de detecció en tècniques multidimensionals amb elevada correlació	107
3.1 Introducció	109
3.2 Referències	114
Article: <i>Detection Limits in GC-MS Multivariate Analysis</i>	115
Capítol 4. Límits de detecció en models de calibració directes	131
4.1 Models construïts amb els espectres dels constituents purs	134
4.1.1 Càlcul del límit de detecció	139
4.1.2 Validació de l'estimador desenvolupat	144
4.2 Models construïts amb els espectres de les mescles	147
4.2.1 Càlcul del límit de detecció	152
4.2.2 Influència de la sensibilitat i la selectivitat de l'analít en el seu límit de detecció	155
4.2.3 Validació de l'estimador desenvolupat	160
4.2.4 Aplicacions	162
4.3 Referències	163
Article: <i>Detection Limits in Classical Multivariate Calibration Models</i>	165
Article: <i>Figures of Merit in Multivariate Calibration. Determination of Four Pesticides in Water by FIA and Spectrophotometric Detection</i>	189
Article: <i>Computing Detection Limits in Multicomponent Spectroscopic Analysis</i>	209
Capítol 5. Límits de detecció en models de calibració inversos	219
5.1 Estimador basat en els intervals de confiança del model de calibració	222
5.2 Estimador basat en els tests d'hipòtesi	229
5.3 Referències	240
Article: <i>Multivariate Detection Limits with Fixed Probabilities of Error</i>	243
Article: <i>Multivariate Detection Limits in Inverse Calibration Models</i>	271
Capítol 6. Conclusions	287
Apèndix I	301
Apèndix II	304
Apèndix III	306
Glossari	309

Objete de la Tesi Doctoral

La present Tesi Doctoral pretén fer una contribució al coneixement dels paràmetres de qualitat en mètodes analítics que utilitzen les tècniques de calibració multivariant, abordant concretament l'estudi dels límits de detecció i el desenvolupament d'estimadors matemàtics que permetin calcular-los. Amb aquesta fi, hom ha plantejat una sèrie d'objectius individuals entre els que poden citar-se:

- Una revisió crítica de les metodologies desenvolupades fins a la data per al càlcul dels límits de detecció en la calibració multivariant.
- El desenvolupament d'un procediment útil per a l'estimació dels límits de detecció en tècniques d'anàlisi que permeten la reducció a una dimensió de la matriu de dades, originàriament multidimensional, com ara l'acoblament cromatografia de gasos - espectrometria de masses (CG-EM).
- El desenvolupament matemàtic d'un nou estimador útil per a models de calibració directes que utilitzen la regressió per mínims quadrats clàssics (*Classical Least Squares, CLS*).
- El desenvolupament d'un estimador de càlcul dels límits de detecció per a models de calibració inversos, els quals utilitzen diferents mètodes de regressió, com ara la regressió per mínims quadrats inversos (*Inverse Least Squares, ILS*), la regressió per components principals (*Principal Components Regression, PCR*) o la regressió per mínims quadrats parcials (*Partial Least Squares, PLS*).
- La generació dels algorismes corresponents en suport informàtic per facilitar la implantació en els laboratoris d'anàlisi dels estimadors desenvolupats.

Capítol 1

Introducció general

En aquest primer capítol, una vegada descrits els objectius de la Tesi Doctoral, hom introdueix el conjunt del treball de recerca realitzat. En primer lloc, s'emmarquen els límits de detecció dins el procés de validació de les metodologies analítiques, justificant-se d'aquesta manera els objectius plantejats. A continuació, la breu perspectiva històrica de l'evolució dels límits de detecció, que desemboca en el concepte actual d'aquest terme, proporciona la base per entendre el treball que hem desenvolupat dins el camp de la calibració multivariant. Finalment, la darrera secció ens detalla com s'ha portat a terme aquest treball descrivint l'estructura del conjunt de la Tesi.

1.1. Validació de mètodes i límits de detecció

Els resultats de les anàlisis químiques han adquirit una importància rellevant que va d'acord amb les demandes de la societat actual. Per exemple, hom està interessat en conèixer si un determinat aliment està o no adulterat, si la presència d'un contaminant a l'aire pot afectar la nostra salut o si el contingut en colesterol a la nostra sang pot considerar-se perillós. Preguntes com: és present aquesta substància en una determinada mostra?, o està la seva concentració per sota dels nivells permesos per la legislació? s'han de respondre constantment. Diàriament i a nivell mundial es produeix una gran quantitat de resultats analítics, dels quals poden dependre des de grans transaccions comercials fins a la salut de moltes persones, passant per la possible contaminació del medi ambient. Alguns estudis econòmics revelen que la generació d'informació analítica comporta fins a un 5% del producte mundial brut.

És per aquests motius que es necessiten procediments analítics que responguin amb rigor a totes les expectatives d'una societat moderna. Abans, però, que un nou

procediment d'anàlisi pugui ésser utilitzat rutinàriament, hom ha d'estudiar i optimitzar, si s'escau, les seves etapes individuals, i verificar-ne el funcionament en la seva totalitat. Això és el que s'entén per validació, definida per la EURACHEM/WELAC [1] com *l'establiment, mitjançant estudis sistemàtics en el laboratori, de que els paràmetres de qualitat d'un mètode compleixen els requeriments especificats per a una aplicació analítica determinada*. Els paràmetres de qualitat a verificar inclouen: exactitud (traçabilitat), incertesa, selectivitat i especificitat, sensibilitat, interval d'aplicació, linealitat, robustesa, límit de detecció i límit de quantificació.

Així doncs, mesurar la capacitat d'un mètode analític per detectar la presència o l'absència d'analits en mostres i quantificar, amb fiabilitat, la mínima concentració d'aquests analits és un dels requisits del procés de validació.

1.2. Perspectiva històrica. Definicions relacionades amb els límits de detecció en la calibrado univariant

Molt abans que la normativa internacional, amb l'objectiu de donar confiança als clients dels laboratoris analítics, recomanés l'avaluació dels paràmetres de qualitat de les metodologies analítiques, el problema de la detecció ja havia estat fruit de controvèrsia. Existeixen centenars d'estudis publicats sobre límits de detecció en el camp univariant, així com nombroses revisions científiques [2-4], però el tema no està, ni molt menys, tancat. Com a anècdota, solament comentar que en la llista que la ICS (*International Chemometrics Society*) té a Internet, s'hi adrecen habitualment preguntes referents als límits de detecció, tant en calibració univariant com multivariant.

Un dels primers en abordar el problema del límit de detecció en l'anàlisi química va ser Kaiser [5]. En els seus primers treballs suggeria que un senyal major que la desviació estàndard del soroll de fons multiplicada per un factor triat convencionalment, es podia considerar característic d'una quantitat detectable de Panalit en estudi. En principi, ell va anomenar *límit de detecció* a aquest senyal crític, proposant un valor de tres pel factor, que correspon a un nivell de confiança, $(1 - \alpha)$, del 99.86% per a una distribució normal d'una cua i amb desviació estàndard σ coneguda. El valor d' α és la probabilitat de cometre un error de la espècie o fals positiu, *Le.* el risc d'obtenir un senyal degut al soroll de fons per damunt del senyal crític i atribuir-lo erròniament a la presència d'analit. Posteriorment, el mateix Kaiser [6] va introduir el concepte d'error de 2a espècie i va definir el *límit de garantia per la puresa* com el nivell la distribució del qual conté una fracció $(1 - P)$ de valors per sobre del límit de detecció definit anteriorment. La probabilitat de cometre un error de 2a espècie o fals negatiu (valor de β) és el risc d'obtenir un senyal degut a l'analit que estigui per sota del nivell crític i sigui atribuït erròniament a la presència de soroll de fons. Kaiser va ser el pioner en la introducció del concepte de test d'hipòtesi en l'anàlisi espectroquímica, mentre Altshuler [7] ho feia en el camp de les mesures radioactives.

Per la seva banda, Currie [8] proporcionà una aproximació a la detecció i a la quantificació en química analítica i radioquímica que ha servit de base a molts estudis posteriors. En el seu treball proposa la introducció de tres nivells específics: un *límit de decisió* corresponent a un *nivell crític* L_C , el valor de resposta instrumental neta (equivalent a la resposta de la mostra menys la resposta del blanc) per damunt del qual un senyal observat és indicatiu de la presència d'analit (aquest valor L_C és equivalent al límit de detecció definit per Kaiser); un *límit de detecció*, L_D , el límit a partir del qual hom pot confiar que un procediment analític és capaç de detectar la presència d'analit, equivalent al límit de garantia

per la puresa definit per Kaiser; i un *límit de determinació*, L_Q , el nivell en el qual la precisió de la mesura és el satisfactori per dur a terme una determinació quantitativa. En definitiva, el valor LC s'utilitza per a comprovar un resultat experimental, mentre que L_D i L_Q es refereixen a les capacitats del procés de mesura en si mateix i, per tant, són valors establerts "a priori", abans de realitzar la mesura experimental. Matemàticament, aquests tres límits s'expressen com:

$$LC = k_\alpha CTQ \quad (1.1)$$

$$L_D = LC + k_\beta CTD = k_\alpha \sigma_0 + k_\beta \sigma_D \quad (1.2)$$

$$L_Q = k_Q \sigma_Q \quad (1.3)$$

on els factors k_α i k_β són els valors de les abscisses de la distribució normal amb nivells de significació $(1 - \alpha)$ i $(1 - P)$, respectivament. σ_0 i σ_D són les desviacions estàndard de les distribucions del senyal net quan el seu valor vertader és igual a zero i al límit de detecció, LD, respectivament. CTQ és la desviació estàndard del senyal net al nivell del límit de determinació, habitualment un 10% del valor de L_Q .

Hubaux i Vos [9] foren pioners en l'avaluació dels límits de detecció a partir de les rectes de regressió d'una metodologia analítica. Seguint la terminologia introduïda per Currie, defineixen un *límit de decisió* en respostes, y_c , com el mínim senyal que es pot distingir del senyal del blanc, i un *límit de detecció* en concentracions, x_D , com el nivell per sota del qual, "a priori", qualsevol mostra podria ser presa erròniament com un blanc. Els valors y_c i x_D no els obtenen, doncs, a partir de repeticions experimentals sinó que els deriven a partir dels intervals de confiança de la recta de calibratge. Aquesta nova aproximació queda reflectida en la Fíg. 1.1.

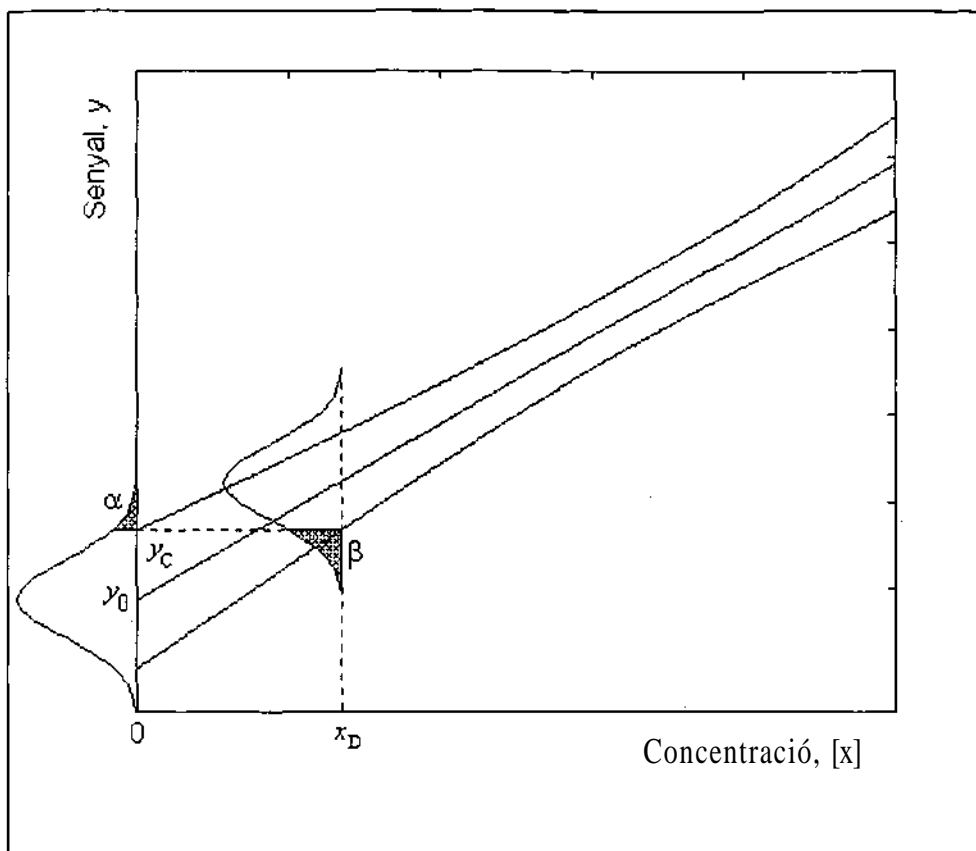


Fig. 1.1. Representació gràfica de la recta de regressió i els seus intervals de confiança, així com dels valors del límit de decisió, y_C , i límit de detecció, x_D , segons Hubaux i Vos.

En aquest cas, l'estimació del senyal del blanc, y_0 , no s'obté a partir de repeticions experimentals, sinó que correspon a l'ordenada en l'origen de la recta de calibratge. El límit de decisió, y_C , correspon a la intersecció de l'interval superior de confiança amb l'eix d'ordenades, construït amb un nivell de significació $(1 - \alpha)$, i és equivalent al terme L_C definit per Currie. Per la seva banda, el límit de detecció, x_D , s'obté a partir de la projecció de y_C sobre l'interval inferior de confiança, construït ara amb un nivell de significació $(1 - \beta)$ i és equivalent al límit de garantia per la puresa de Kàiser i al terme L_D de Currie.

Els mateixos autors van estudiar la influència d'una sèrie de paràmetres experimentals: nombre d'estàndards de calibració, interval de concentracions, distribució dels estàndards dins l'interval de treball, nombre de repeticions de la mostra problema i precisió de la recta de calibratge, sobre els valors dels límits de detecció, proposant a la vegada una sèrie de regles pràctiques per a la disminució dels esmentats límits. Posteriorment, les expressions trobades per Hubaux i Vos van ser generalitzades per Oppenheimer *et al.* [10] per aplicar-les a dades que presenten heteroscedasticitat.

Ingle [11], en un article publicat al *Journal of Chemical Education*, va ser el primer en plantejar que els errors de 2a espècie (errors P o falsos negatius) eren conceptualment massa complicats d'entendre pels químics i, per aquest motiu, eren sovint ignorats. Resulta, si més no, curiós que aquestes consideracions segueixin vigents en l'actualitat i que en molts treballs científics on es fa referència als límits de detecció no es faci cap tipus de menció als errors de 2a espècie, errors que, per altra banda, són inherents al procés de detecció en anàlisi química, tant si es consideren com si no.

Pel que respecta a la posició de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), en un primer moment no tractava el problema dels falsos negatius i simplement recomanava, basant-se en el treball de Kàiser, l'ús d'un factor de 3 per multiplicar al terme de la desviació estàndard de les mesures del blanc [12]. En una primera definició, certament ambigua, la IUPAC sosté que *el límit de detecció per un procediment analític determinat, expressat com una concentració, x_D (o quantitat de substància, q_D), es deriva de la mínima resposta, y_D , que pot detectar-se amb una certesa raonable*. Aquesta resposta y_D s'expressa matemàticament com:

$$y_D = \bar{y}_B + k s_B \quad (1.4)$$

on y_B i s_B són el valor mitjà i la desviació estàndard de les mesures del blanc, respectivament, i $k = 3$. El límit de detecció, x_D , és funció de y_D i, per tant:

$$x_D = \frac{y_D - \bar{y}_B}{b_1} = \frac{k s_B}{b_1} \quad (1.5)$$

on b_1 és la sensibilitat del mètode. Com la lectura mitjana del blanc, y_B , pot ser que no sigui sempre zero, s'ha d'aplicar una correcció del blanc al senyal. L'ús d'un valor $k = 3$ correspon a un risc de fals positiu, α , de $1 - 0.9986 = 0.0014$, o del 0.14% per un test d'una cua, amb població normal i σ coneguda.

Winefordner i Long [13] fan una discussió crítica de la definició de límit de detecció plantejada per la IUPAC i, encara que segueixen recomanant l'equació (1.5) amb $k = 3$ per avaluar el límit de detecció, reconeixen que seguint aquesta aproximació existeix una probabilitat del 50% de cometre falsos negatius. Aquesta és la probabilitat que la mesura instrumental d'una mostra amb concentració equivalent a x_D caigui per sota del valor de y_D . També fan esment de l'existència d'un límit superior, que evita precisament aquesta elevada probabilitat. Aquest valor coincideix amb el *límit de garantia per la puresa* de Kaiser i el *límit de detecció* de Currie. Els mateixos autors, prenent com a base la definició de la IUPAC i aplicant la teoria de propagació d'errors, deriven una expressió del límit de detecció que incorpora els errors associats a la recta de calibratge:

$$x_D = \frac{k \left[s_B^2 + s_{b_0}^2 + (b_0/b_1)^2 s_{b_1}^2 \right]^{1/2}}{b_1} \quad (1.6)$$

on b_0 i b_1 són l'ordenada en l'origen i el pendent de la recta de calibratge, i s_{b_0} i s_{b_1} són les desviacions estàndard associades a aquests valors, respectivament.

En un document posterior [14], la IUPAC ja reconeix l'existència dels errors de la i 2a espècie i recomana el càlcul dels límits de detecció amb riscos α i P del 5%. A més a més, dona un pas important en reconèixer la influència dels graus de llibertat a l'hora d'estimar la variància del blanc, suggerint l'ús de l'estadístic t d'Student per compensar aquest fet.

Liteanu i Rica [15] introdueixen un altre concepte important, com és la *característica de detecció* d'un sistema analític, definida com la relació existent entre la probabilitat d'una detecció correcta, $(1 - p)$, la probabilitat d'una detecció falsa, α , i la concentració de Panalit en estudi. Aquest concepte és anàleg a la característica d'operació d'un sistema de detecció, definida en la teoria estadística de la detecció de senyals, i és un paràmetre fonamental per establir la qualitat d'un sistema analític en l'àmbit de la detecció. És, alhora, diferent per a cada sistema, en funció de cada model de calibració, i variable, ja que el seu valor es veu afectat pels paràmetres de calibració i pel nombre de mesures fetes sobre la mostra problema. El seu estudi pot permetre decidir entre diferents mètodes d'anàlisi o ajudar en la modificació de certs dissenys experimentals del procediment d'anàlisi que es duu a terme per tal d'assolir una característica de detecció específica.

Clayton *et al.* [16] donen un pas més endavant en l'avaluació dels límits de detecció a partir dels models de calibració, afirmant que quan els paràmetres de la recta de calibratge no són coneguts i s'han d'estimar a partir de dades experimentals (fet que succeeix en la majoria dels casos), llavors la probabilitat d'error p segueix una *distribució t -descentrada*. Aquest fet constitueix, per si sol, una de les contribucions estadísticament més rigoroses en el camp dels límits de detecció en calibració univariant. Clayton *et al.* defineixen una *resposta llindar*, y_C , equivalent al límit de decisió definit per Hubaux i Vos, i un *límit de detecció*, x_D , expressat com:

$$x_D = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(y_0)^{1/2}}{b_1} \quad (1.7)$$

on $\text{var}(y_0)$ es la variància de la resposta instrumental a concentració zero, b_1 és el pendent de la recta de calibratge i $\Delta(\alpha, \beta)$ és el paràmetre de descentrat de la distribució t descentrada, que té en compte les probabilitats α i β d'error. Els mateixos autors recuperen també el concepte de característica de detecció d'un sistema analític, originàriament ideat per Liteanu i Rica [15]. Les aportacions de Clayton *et al*, Liteanu i Rica en el camp de la detecció han estat implementades en un interessant programa informàtic de càlcul de límits de detecció i representació de corbes característiques, desenvolupat per Sarabia i Ortiz [17].

En la definició de límit de detecció feta en l'estudi de l'afer del Love Canal [18], així com en un article posterior de Lambert *et al*. [19], les dues probabilitats d'error queden perfectament definides. Ja més recentment, el darrer document de la IUPAC [20] reconeix l'existència d'ambdós tipus d'error i recomana l'ús dels termes *valor crític* (o nivell crític) i *valor mínim detectable* (o límit de detecció) per establir els criteris de decisió i detecció, respectivament. Aquestes noves recomanacions estan consensuades amb la *International Organization for Standardization* (ISO) i basades en el treball original de Currie. Són, per tant, una sòlida referència a l'hora d'encarar, en un futur, el problema de la detecció en l'anàlisi química. Aquests conceptes, no pas nous, però sí normalitzats, es descriuen amb més profunditat a l'apartat 1.3.

Es pot comprovar, doncs, que l'evolució històrica del concepte de límit de detecció en la calibració univariant ha vingut marcada per una certa confusió i diferència de criteris. No ha existit, ni sembla que existeixi, un acord pel que es refereix a la terminologia a fer servir. Així, apareixen constantment en la literatura termes com "límit de decisió", "límit de determinació", "límit de quantificació" o "capacitat de detecció", tots ells relacionats amb la mínima quantitat d'analít detectable i que

no fan més que augmentar la confusió entre la comunitat científica. Cal afegir també que diversos autors han posat de manifest la diferència existent entre el que són els "límits de detecció instrumentals" (obtinguts a partir d'una calibració feta amb estàndards purs) i els "límits de detecció del mètode" (obtinguts a partir de mostres reals fortificades amb Panalit en estudi). Els primers només són representatius de l'etapa de mesura instrumental, mentre que els darrers estan referits al procediment analític en la seva totalitat, englobant les diferents etapes individuals, des de la presa de mostra fins la mesura instrumental i l'obtenció del resultat final.

En segon lloc, i molt més importants, són les diferències metodològiques a l'hora del càlcul dels límits de detecció. Les principals mancances en la seva estimació es poden dividir en tres grans grups:

1) **CONCEPTUALS**: existeix en molts casos una dificultat per comprendre el significat estadístic dels estimadors desenvolupats. Aquesta dificultat fa que, en molts casos, no es contempli la presència dels errors de 2a espècie, produint-se, per tant, una confusió entre el que és l'etapa de decisió (relacionada amb el nivell crític i la resposta instrumental mesurada) i la pròpia capacitat de detecció (definida a priori, abans d'obtenir la resposta instrumental).

2) **METODOLÒGIQUES**: entre elles es troben la utilització de models de calibració no validats, la no contemplació de totes les fonts d'error del mètode d'anàlisi i que es propaguen al resultat final, el desconeixement en molts casos del tipus de distribució que segueixen les mesures experimentals, la manca d'informació sobre la naturalesa del blanc analític o la ignorància de la presència d'heteroscedasticitat a les dades. Una excel·lent crítica sobre tots aquests aspectes ha estat feta per Currie [2].

3) COMPUTACIONALS: dificultat de càlcul dels límits de detecció degut a la manca de programes de còmput adients.

Tot i que diverses organitzacions internacionals relacionades amb la Química Analítica, com la IUPAC, PISO o l'ACS (*American Chemical Society*) han advertit sobre aquesta confusió i han emprés mesures per tal d'unificar criteris, el cert és que encara segueixen apareixent molts articles científics on el tractament del càlcul dels límits de detecció és incorrecte o no està especificat. Sembla, però, que les noves recomanacions de la IUPAC poden ser una base ferma per a un tractament futur molt més rigorós del problema.

Tota aquesta problemàtica que s'ha esmentat es trasllada evidentment a l'avaluació dels límits de detecció en la calibració multivariant, amb la dificultat afegida que suposa haver de tractar amb molta més quantitat d'informació. És per aquest motiu que s'han fixat com a objectius de la present Tesi Doctoral el propi desenvolupament dels estimadors dels límits de detecció (incloent programes informàtics pel seu càlcul) i que aquests estiguin basats en fonaments teòrics ben establerts, intentant superar les mancances conceptuals i metodològiques citades anteriorment.

1.3. Concepte actual de límits de detecció i quantificació

La IUPAC, en les seves darreres recomanacions i per tal d'unificar criteris pel que fa a nomenclatura i terminologia, defineix el límit de detecció com una mesura de la capacitat de detecció inherent que té un procés de mesura químic, amb el nom de *Valor (vertader) Mínim Detectable* [20]. Això vol dir que el límit de detecció,

com altres paràmetres de qualitat, no es pot especificar si no existeix un procés de mesura completament definit, que inclogui aspectes tan diversos com els tipus i nivells d'interferències presents o el model de calibració emprat. Els *límits de detecció instrumentals*, per exemple, són perfectament vàlids dins un determinat àmbit. Si el que s'està buscant, però, són les característiques de detecció i quantificació d'un procés de mesura més complex, el qual involucra per exemple una etapa de presa de mostra, una separació analítica, una purificació i una eliminació d'interferències i dels efectes de matriu, llavors és obligatori que tots aquests factors es considerin a l'hora de derivar els valors dels límits de detecció i/o quantificació. D'altra manera, s'estarà cometent un error per defecte i no s'assolirà la qualitat requerida pel procés de mesura quant a les capacitats de detecció i quantificació.

El tractament del problema de la detecció en les mesures analítiques es fonamenta en la teoria estadística dels tests d'hipòtesi i de la detecció de senyals i utilitza el criteri de Neyman-Pearson [15] com a criteri de decisió. Els aspectes que es descriuran tot seguit han estat revisats recentment per la IUPAC [20]. Les claus per entendre el concepte de límit de detecció en Química Analítica són tres:

- 1) L'existència de dues hipòtesis, les quals hom vol distingir: una *hipòtesi nul·la* (H_0), *i.e.* l'absència de Panalit en la mostra, i una *hipòtesi alternativa* (H_1), *i.e.* Panalit és troba present a la mostra.
- 2) La necessitat d'un procés químic de mesura, com ara un mètode cromatogràfic amb detecció espectrofotomètrica¹, amb un límit de detecció adequat.

¹ Noteu que es prefereix parlar d'un mètode analític més que d'una tècnica o un instrument. La diferència entre límit de detecció instrumental i límit de detecció del mètode ha estat discutida anteriorment.

3) L'existència d'un nivell crític o llindar per a la variable que es mesura (senyal o concentració), per a poder prendre la decisió de si l'analít és detectable o no.

Desafortunadament, no existeix un procés de mesura exacte i sempre es produiran errors de la espècie (falsos positius o errors α), *i.e.* l'analít és detectat erròniament, i errors de 2a espècie (falsos negatius o errors β), *i.e.* l'analít no és detectat quan realment està present. Si no existeix un balanç adequat entre aquests dos tipus d'errors, s'ha de buscar un altre procés de mesura amb un límit de detecció menor (un exemple podria ser canviar el detector UV-Visible per un de fluorescència).

Tanmateix, el significat pràctic dels límits de detecció s'entén millor si es relaciona amb un problema concret. Imaginem que és vital detectar la presència d'un contaminant en aigua a un nivell molt baix, suposem L_R , ja que per damunt d'aquest valor la seva toxicitat pot ser perillosa per a les persones. És evident, doncs, que hom ha de seleccionar un procediment analític amb un límit de detecció, L_D , per sota de L_R . Aquests límits normatius solen escollir-se equilibrant els riscos de cometre falsos positius (crear una falsa alarma de contaminació) i falsos negatius (aparició de trastorns digestius en una part de la població degut a un increment no detectat del contaminant). Això s'il·lustra a la Fig. 1.2, on es mostra el nivell crític de concentració del contaminant (L_C), el límit de detecció (L_D) del mètode i el nivell màxim permès per la normativa (L_R), juntament amb les probabilitats α i β associades.

En la part superior de la figura, es mostra una relació preassumida entre la concentració de contaminant i el cost social que la seva presència implicaria. Evidentment, hom desitjaria establir un nivell normatiu, $L_R = 0$, corresponent a un cost social nul, la qual cosa és impossible d'assolir analíticament. La part inferior

de la figura representa el procés d'anàlisi química en si mateix i en termes de concentració², obtinguda a partir del senyal mesurat a través del model de calibració. El límit de detecció (L_D) requerit pel mètode ha d'estar òbviament per sota de L_R i és funció del nivell crític (L_C) establert i la probabilitat P prefixada de cometre un fals negatiu.

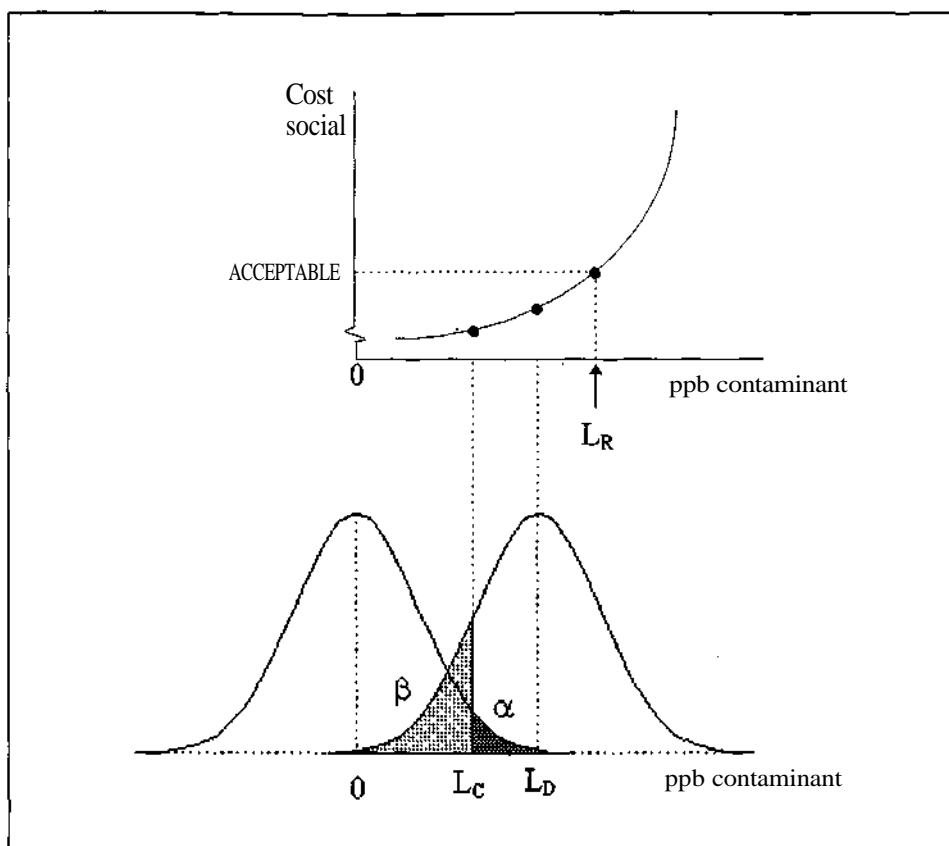


Fig. 1.2. Representació del nivell crític, L_C , límit de detecció, L_D , i nivell normatiu, L_R , i llurs relacions amb les probabilitats α i β d'error. La part superior de la gràfica representa una relació teòrica entre el nivell de contaminant i el cost social que la seva presència generaria.

² En la calibració univariant és indistint representar les distribucions de probabilitat en l'àmbit de les concentracions o de les respostes instrumentals. En la calibració multivariant, en canvi, hom prefereix representar les distribucions en l'àmbit de les concentracions degut a la naturalesa multidimensional de les respostes, la qual cosa dificultaria la seva visualització.

En termes materials, aquesta probabilitat p es traduiria en una alarma social deguda a l'aparició de casos d'intoxicació per ingestió de contaminant a nivells per damunt del nivell crític (L_C), quan en realitat la presència de l'esmentat contaminant no havia estat detectada. A partir de la Fig. 1.2 és pot deduir també que el terme "límit de detecció" no té cap sentit sense l'existència d'una hipòtesi alternativa i que, en definitiva, els errors de 2a espècie, p , encara que no es tinguin en compte, sempre estan presents.

1.3.1. *Etape de decisió*

La decisió "detectat" o "no detectat" es produeix per comparació de la quantitat estimada, \hat{L} (resposta o concentració), amb el valor crític L_C de la distribució respectiva, de manera que la probabilitat d'excedir el valor L_C no sigui major que α (per un test amb una cua) si Panalit és absent ($H_0: L = 0$, hipòtesi nul·la). El valor crític és, per tant, el valor mínim d'un senyal net (sense la contribució del blanc) o concentració estimada que pot considerar-se significativament diferent del blanc. Aquesta definició pot expressar-se com:

$$\Pr(\hat{L} > L_C | L = 0) = \alpha \quad (1.8)$$

Si \hat{L} segueix una distribució normal, amb variància coneguda, l'equació anterior es redueix a:

$$L_C - z_{1-\alpha} \sigma_0 \quad (1.9)$$

on $z_{1-\alpha}$ és el valor crític de la distribució normal i σ_0 és la desviació estàndard de la quantitat estimada, (senyal neta o concentració) sota la hipòtesi nul·la. Prenent un

valor per defecte de $a = 0.05$, llavors $L_C = 1.645\sigma_0$. Per altra banda, si σ_0 no és coneguda i s'estima a partir de s_0 , amb v graus de llibertat, llavors \hat{L} es distribueix segons una t d'Student i L_C s'expressa com:

$$L_C = t_{1-\alpha, v} s_0 \quad (1.10)$$

1.3.2. Límit de detecció

El valor mínim detectable del senyal net (o concentració) és aquell valor (L_D) pel qual la probabilitat de cometre un fals negatiu és p , donat L_C (o a). És el senyal net (o concentració) pel qual la probabilitat de que el valor estimat, \hat{L} , no excedeixi L_C és p . Aquesta definició es pot expressar, doncs, com:

$$\Pr(\hat{L} \leq L_C | L = L_D) = \beta \quad (1.11)$$

Per dades que segueixen una distribució normal, amb variància coneguda, l'equació anterior esdevé:

$$L_D - L_C + z_{1-\beta} CTD - z_{1-\alpha} CTO + z_{1-\beta} \sigma_D \quad (1.12)$$

Per la situació especial on la variància és constant entre $L = 0$ i $L = L_D$ (condició d'homoscedasticitat), la part dreta de l'eq. (1.12) es transforma en $(z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})\sigma_0$; si, a més a més, a i P són iguals, s'obté $2z_{1-\alpha}\sigma_0$, que equival a $2L_C$. Si la variància no és coneguda, i CTO s'estima a partir de s_0 , llavors $(z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})$ s'ha de reemplaçar per $\Delta(\alpha, \beta)$, el paràmetre de descentrat de la distribució t -descentrada, amb v graus de llibertat, i l'eq. (1.12) esdevé (en condicions d'homoscedasticitat):

$$L_D = A(a, \beta) \sigma_0 \quad (1.13)$$

S'observa, doncs, que el límit de detecció no es calcula com un coeficient que multiplica a la desviació estàndard del blanc. Fer-ho així ens portaria a resultats completament erronis. L'expressió correcta del límit de detecció s'ha de derivar a partir de les equacions (1.8) i (1.11), i ha de tenir en compte les probabilitats d'error α i β , els graus de llibertat i la distribució del valor estimat \hat{L} , el qual a la vegada depèn de factors com la pròpia concentració de l'anàlit, els efectes de matriu o les interferències presents a la mostra.

1.3.3. Límit de quantificació

El valor mínim quantificable (L_Q) és un paràmetre de qualitat que marca la capacitat d'un procés químic de mesura per quantificar adequadament un anàlit. La capacitat de quantificar s'expressa generalment en termes del valor de senyal o concentració que produeix estimacions amb una desviació estàndard relativa especificada, normalment d'un 10%. Aquesta definició és la mateixa que la proporcionada per Currie, eq. (1.3).

A priori, les eqs. (1.12) i (1.13) pel càlcul del límit de detecció i l'eq. (1.3) pel càlcul del límit de quantificació, expressades en unitats de concentració, són vàlides per a qualsevol tipus de metodologia analítica, independentment que s'hagi utilitzat la calibració univariant o multivariant en l'etapa de construcció del model. Per tant, el problema, en principi, es veuria reduït a l'avaluació dels diversos termes de les eqs. (1.12) i (1.13). Aquesta darrera afirmació requereix alguna matització i, en aquest sentit, en els capítols posteriors es mostraran les singularitats de cadascuna de les aproximacions presentades, així com les diferents estratègies utilitzades pel càlcul dels esmentats termes.

1.4. Aspectes conceptuals relacionats amb el límit de detecció

Aquest apartat pretén repassar alguns dels conceptes teòrics més importants relacionats amb els límits de detecció i que serviran de base per a posteriors discussions. L'apartat es divideix en dos blocs: en el primer hom analitza l'etapa de decisió (verificació de la hipòtesi nul·la); en el segon es fa referència a l'etapa de detecció (hipòtesi alternativa i probabilitat d'error P). Donat el caràcter introductor del capítol, les consideracions que es presenten són generals per a qualsevol tipus de calibració. Les qüestions relacionades de manera específica amb la calibració multivariant s'abordaran en els capítols subsegüents.

1.4.1. *Etapa de decisió*

Com s'ha mostrat amb anterioritat, l'establiment del nivell crític, L_C , es fa mitjançant un test de significació, amb un nivell de significació α . S'han de tenir presents, però, una sèrie de condicionants que poden afectar aquest test, com són:

1.4.1.1. La possible existència d'errors sistemàtics en el model matemàtic emprat o en les pròpies mesures. És evident que el desenvolupament dels estimadors dels límits de detecció només tenen sentit en el cas que els models als quals s'apliquen són un reflex fidel de les dades experimentals i no existeix el que hom anomena *falta d'ajust*. El procés de validació del model és, per tant, una etapa clau que influirà decisivament en les posteriors etapes de predicció i detecció. Per a models multivariants existeixen diferents criteris de validació, els quals es comentaran en el segon capítol. El lector pot intuir, però, que si la finalitat darrer d'un model matemàtic és la predicció de mostres desconegudes, el criteri de validació ha de passar necessàriament per l'avaluació de la seva habilitat de predicció, obtinguda a

partir de mostres independents no utilitzades en la construcció del model de calibració [21].

1.4.1.2. El tipus de distribució de la hipòtesi nul·la. H_0 . És ben conegut que els coeficients de regressió obtinguts a partir d'un mètode lineal (com el de mínims quadrats o el PCR en calibració multivariant) es distribueixen seguint una distribució normal, sempre que els errors de mesura també es distribueixin normalment, Això es dona amb molta freqüència en processos que incorporen diverses etapes, com són els processos químics de mesura. Quan aquesta assumpció no es pot fer, el teorema del límit central estableix que la distribució per un nombre infinit de mostres de calibració també és normal, sempre que la distribució dels errors de mesura tingui variància finita. La desviació de la normalitat pot ser negligible fins i tot si el nombre de mostres de calibració és de l'ordre de vint, depenent de la desviació de la normalitat de la distribució real. Aquestes consideracions no són aplicables a alguns mètodes de regressió, com el PLS en calibració multivariant, per la qual cosa l'assumpció d'una distribució normal pels coeficients de regressió no tindria el suport estadístic adequat [22].

Si els coeficients de regressió segueixen una distribució normal, també ho fan les concentracions predites pel model i es pot construir un interval de confiança a partir del test estadístic adequat. Si la variància de la concentració predita és coneguda o s'obté a partir d'un nombre de repeticions molt elevat, llavors l'estadístic z corresponent a una distribució normal s'utilitza per calcular els intervals de confiança. El cas més habitual, però, és que la variància de la concentració predita s'estimi a partir del model de calibració. En aquest cas, l'estadístic utilitzat és el t d'**Student**, amb v graus de llibertat obtinguts a partir del model. Quan ens trobem en condicions d'hipòtesi nul·la, la variància s'estima a partir del senyal net (sense la contribució del senyal del blanc) a concentració zero de l'analit d'interès.

1.4.1.3. Propagació d'errors del model a la concentració predita i el nivell crític. Aquest factor està directament relacionat amb els termes de desviació estàndard del senyal net o concentració sota la hipòtesi nul·la (σ_0) i sota la hipòtesi alternativa (σ_D). En calibració multivariant, no s'ha derivat encara una expressió general per avaluar la incertesa en l'etapa de predicció, encara que existeixen diverses aproximacions.

1.4.1.4. Estimació dels graus de llibertat pel test de significació. Aquest factor està directament relacionat amb l'anterior. Hem vist, a través de les eqs. (1.10) i (1.13), que quan el valor de σ_0 no es coneix i s'ha d'estimar a partir de s_0 , el càlcul de L_C i LD es fa assumint distribucions t d'Student. En aquest cas, els graus de llibertat necessaris per al test de significació s'obtenen bé a partir del número de repeticions en l'estimació de s_0 , o bé a partir de l'expressió corresponent de la variància de la variable estimada (\hat{L} en aquest cas). El problema sorgeix quan aquesta variància és el resultat de la suma de dos o més contribucions independents de variància, associades a components d'error individuals, segons:

$$\hat{\text{var}}(y) = \sum_{i=1}^N \text{var}(x_i) \quad (1.14)$$

En aquest cas, però, si les variàncies individuals segueixen una distribució khi quadrat (χ^2), la suma també es distribueix segons una khi quadrat i es poden obtenir uns graus de llibertat *efectius*, v_{ef} , a partir de la regla de Satterthwaite [23]:

$$v_{\text{ef}} = \text{int} \left[\frac{\hat{\text{var}}(y)^2}{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\text{var}(x_i)^2}{v_i} \right)} \right] \quad (1.15)$$

on v_i són els graus de llibertat corresponents a cadascun dels termes individuals i $\text{int}[\cdot]$ indica que el valor de v_{ef} s'ha d'aproximar al número enter més proper. La problemàtica esdevé després amb el càlcul de cadascun d'aquests termes individuals de variància. Aquest aspecte, degut a la seva especificitat, serà tractat individualment en cadascun dels capítols presentats.

1.4.2. *Etapa de detecció*

Els aspectes més importants a tenir en compte en aquesta etapa són:

1.4.2.1. Existència de l'error de 2a espècie, p . Com ja s'ha exposat amb anterioritat, els falsos negatius tenen lloc sempre, es reconegui o no la seva existència. La ignorància d'aquests errors, com en el cas de confondre el nivell crític amb el límit de detecció i establir que $LC = L_D$, dóna lloc a una interpretació errònia de la capacitat de detecció d'un mètode analític.

1.4.2.2. Relació existent entre els errors α , P i el límit de detecció. La connexió entre les probabilitats de cometre un fals positiu (α) i un fals negatiu (P) i el límit de detecció en sistemes analítics és el que anomenem *corbes característiques de detecció*, les quals van ésser introduïdes per primera vegada per Liteanu i Rica [15]. La Fig. 1.3 mostra una típica corba característica de detecció, on es representa la probabilitat d'una detecció correcta, $(1-\beta)$, enfront de la concentració d'analit, per una probabilitat de falsa detecció $\alpha = 0.05$.

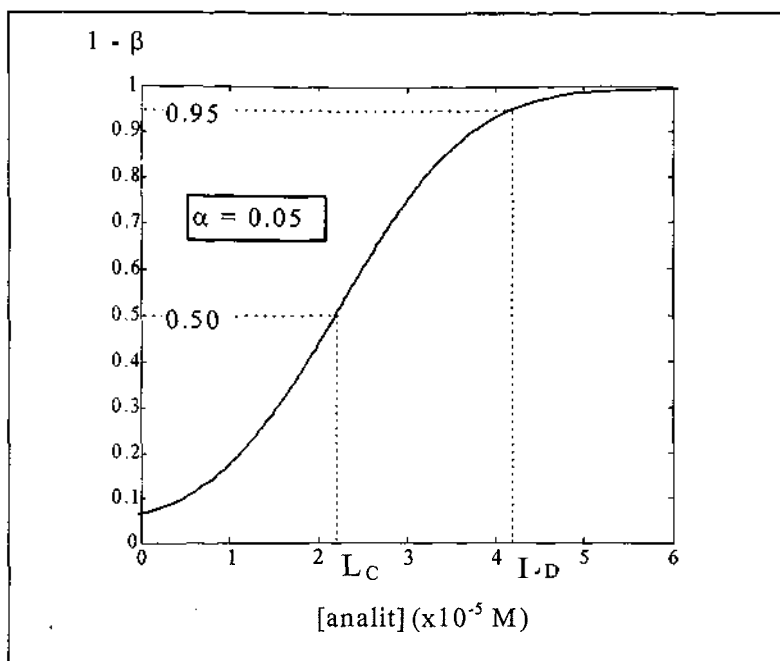


Fig. 1.3. Corba característica de detecció per una probabilitat $\alpha = 0.05$. En la figura es mostren també els valors del nivell crític, L_C , i el límit de detecció, L_D , corresponents a unes probabilitats de fals negatiu (β) de 0.5 i 0.05, respectivament. (Dades extretes de la part experimental del capítol 4).

L'estudi d'aquestes corbes i la seva dependència amb els paràmetres de calibració pot ser de gran ajuda quan hom vol assolir per al seu sistema analític una determinada capacitat de detecció, ja que faciliten la modificació de certs dissenys experimentals en les diferents etapes del procediment (com per exemple el tractament previ de les mostres, el canvi d'analistes o l'ús de diferents instruments).

1.4.2.3. La distribució de la hipòtesi alternativa, H_1 . Potència del test. La relació existent entre α , P i L_D es pot expandir, en el cas de treballar amb distribucions t d'Student, si hi afegim els graus de llibertat. Si reprenem l'eq. (1.13), fixant uns valors per a α i P (per exemple de 0.05), les dues dimensions restants es poden representar com una corba, $\Delta(\alpha, \beta)$ respecte v , o el que és el mateix, el límit de

detecció, L_D (en unitats de σ_0) en funció del nombre de graus de llibertat. En aquest cas, el valor de $A(a,P)$ es determina requerint un 95% de probabilitat ($1 - P$) que el senyal net (o la concentració) dividit per la seva desviació estàndard estimada sobrepassi el nivell crític per la t d'Student. Aquesta relació s'anomena t -descentrada, amb paràmetre de descentrat $A(a,p)$, ja que està desplaçat respecte el zero en aquesta quantitat.

Un altre dels problemes existents al nivell de límit de detecció és el fet que la variància de la distribució de la concentració predita sigui diferent de la variància de la distribució al nivell de la hipòtesi nul·la (*i.e.* $CT_0 \neq CT_D$). Currie [2] ha tractat el problema en la calibració univariant, mentre que Faber i Kowalski [24] l'han abordat en el cas multivariant. Tanmateix, en molts casos és raonable assumir que les distribucions són iguals a ambdós nivells de concentració (condició d'homoscedasticitat).

Finalment, cal esmentar que tots els estimadors del límit de detecció que es presenten en la present Tesi Doctoral són aplicables a mètodes d'anàlisi on s'utilitza un model de calibració per relacionar la resposta instrumental obtinguda amb la concentració d'analít. Els límits de detecció multivariants no es presenten, doncs, com un múltiple de la desviació estàndard del blanc o d'un estàndard a molt baixa concentració. Aquesta darrera metodologia és perfectament aplicable en molts casos però, en d'altres, la no existència de blancs analítics adequats fa difícil la seva implantació. D'altra banda, i en anàlisis de rutina, sembla poc realista pensar que un límit de detecció basat en mesures del blanc es mantindria constant durant molt temps, si pensem que depèn de factors tan diversos com l'equip instrumental, la naturalesa de les mostres o els propis analistes.

1.5. Estructura de la tesi

Les diferents tècniques d'anàlisi multivariant existents, junt amb els diversos models matemàtics utilitzats en cada cas, ha fet que s'hagin desenvolupat diferents aproximacions al càlcul dels límits de detecció multivariants. Una revisió crítica de tots aquests mètodes és el que es presenta en el segon capítol de la present Tesi Doctoral, fent especial èmfasi en l'aplicabilitat de cada estimador derivat a les diverses tècniques multivariants. També es discuteixen les seves limitacions, tant metodològiques com pràctiques, a l'hora de la seva implantació en un laboratori d'assaig.

Tenint en compte totes les consideracions teòriques discutides en l'apartat 1.4 i seguint un ordre lògic quant a complexitat de les metodologies estudiades, en el tercer capítol es presenta l'aplicació d'un mètode per calcular límits de detecció en anàlisi multidimensional, aplicat a unes dades obtingudes mitjançant l'acoblament cromatografia de gasos-espectrometria de masses (CG-EM). El mètode es basa en la representació de les puntuacions (*scores*) del primer component principal (obtinguts per descomposició mitjançant anàlisi de components principals de la matriu de respostes original) enfront de les concentracions dels corresponents patrons de calibració. L'estimador del límit de detecció és, doncs, estrictament parlant, **univariant**. La innovació que s'aporta és la utilització de més dades inicials i, *a priori*, de més informació sobre el sistema, en ser la matriu de dades original de naturalesa multivariant.

Aquest mètode és aplicable si es compleixen una sèrie de condicions, com la no presència de substàncies **interferents** que puguin donar lloc a senyals solapats. Un altre requisit, molt lligat amb el primer, és que el primer component principal ha d'explicar un percentatge molt elevat de la informació continguda en les dades originals. En cas contrari és necessiten, si més no, dos components principals, és a

dir, dues variables, per representar-les front a la concentració i, per tant, ja no són aplicables els mètodes univariants habituals per calcular els límits de detecció.

Amb l'objectiu de solucionar els problemes abans esmentats, es va procedir a desenvolupar un nou mètode de càlcul dels límits de detecció aplicat a models de calibració directes, on les respostes es modelen en funció de les concentracions (veure apartat 2.1). En aquests tipus de models, l'etapa de calibració pot dur-se a terme a partir de mostres consistentes en els constituents purs o mostres consistentes en mescles dels diferents analits. Els estimadors derivats per ambdós casos, juntament amb un programa informàtic de càlcul i una aplicació a dades reals, configuren el quart capítol d'aquesta tesi.

Els mètodes de calibració basats en els models directes tenen l'inconvenient que hom ha de conèixer les concentracions de totes les substàncies que produeixen senyal o, si més no, s'ha de disposar dels espectres dels analits i els interferents purs. Aquesta condició no és la més habitual en els laboratoris d'anàlisi, on la majoria de mostres que hi arriben són matrius complexes, i en les quals moltes vegades només interessa determinar un analit en concret. Amb aquests tipus de mostres l'aplicació del model directe és inviable; s'ha de recórrer als anomenats models inversos (veure apartat 2.1), en els quals la concentració de l'analit es modela en funció de la resposta obtinguda. Aquests models tenen l'avantatge que només és necessari conèixer la concentració de l'analit d'interès per trobar els coeficients en l'etapa de calibració. Es plantejava, per tant, com un treball interessant el derivar un mètode de càlcul dels límits de detecció d'aplicació als models de calibració inversos i que pogués servir per un ventall més ampli de mostres, com ara matrius mediambientals (aigües residuals), fluïts animals (sang, orina), aliments (llet, farines) o productes industrials (gasolines, plàstics). En el primer treball, l'estimador derivat es basa en l'estudi fet per Hubaux-Vos [9] en calibració univariant, i el límit de detecció es calcula a partir dels intervals de

confiança del model multivariant. En una segona aproximació, i seguint el desenvolupament fet pels models directes, es presenta un estimador basat en la teoria dels tests d'hipòtesi i aplicat a la variància de les concentracions predites. Aquests continguts, juntament amb els corresponents programes de càlcul dels límits de detecció per a models inversos, són els que conformen el capítol 5.

Finalment, en l'apartat de conclusions es discuteixen els avantatges i les limitacions dels estimadors presentats i es donen una sèrie de pautes de com s'ha d'enfocar l'estudi de la seva millora en futurs treballs.

1.6. Referències

1. EURACHEM/WELAC Guide 1, *Accreditation of Chemical Laboratories*. Laboratory of the Government Chemist. London. 1993.
2. L.A. Currie, *Detection in Analytical Chemistry. Importance, Theory and Practice*. ACS Symp. Series. ACS, Washington, 1988. Pàg. 1-62.
3. L.S. Oresic; V. Grdinic, *Acta Pharm. Jug.*, 40 (1990) 21.
4. F.C. Garner; G.L. Robertson, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 3 (1988) 53.
5. H. Kaiser, *Z Anal. Chem.*, 3 (1947) 40.
6. H. Kaiser, *Z Anal. Chem.*, 209 (1965) 1.
7. B. Altshuler; B. Pasternack, *Health Physics*, 9 (1963) 293.
8. L.A. Currie, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 586.
9. A. Hubaux; G. Vos, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 849.
10. L. Oppenheimer; T.P. Capizzi; R.M. Weppelman; H. Mehta, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 638.
11. J.D. Ingle, Jr., *J. Chem. Educ.*, 51 (1974) 100.
12. IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, 45 (1976) 99.
13. G.L. Long; J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712A.
14. IUPAC, Commission V.3.; *Recommendations for Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods*, Draft Report, 1986.

15. C. Liteanu; I. Rica, *Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis*. Ellis Horwood. Chichester, 1980. Pàg. 208.
16. C.A. Clayton; J.W. Hiñes; P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506.
17. L. Sarabia; M.C. Ortiz, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 1.
18. CH2M-Hill, *Love Canal Emergency Declaration Area Habitability Study, Final Report*. CH2M-Hill, Reston, VA, 1988.
19. D. Lambert; B. Peterson; I. Terpenning, *J. Am. Stat. Ass.*, 86 (1991) 266.
20. IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, 67 (1995) 1699.
21. B.R. Kowalski; M.B. Seasholtz, *J. Chemom.*, 5 (1991) 129.
22. K. Faber; B.R. Kowalski, *comunicació personal*.
23. F.E. Satterthwaite, *Biom. Bull.*, 2 (1946) 110.
24. K. Faber; B.R. Kowalski, *Fresenius J. Anal. Chem.*, enviat per a publicació..

Capítol 2

Límits de detecció en la calibració multivariant.
Estat actual de la qüestió

Les tècniques de calibració multivariant s'han vingut utilitzant de manera creixent en els laboratoris analítics, des que van assentar-se les seves bases teòriques a la dècada dels 80 [1,2]. Els mètodes analítics que utilitzen aquestes tècniques també estan, naturalment, dins l'àmbit dels estàndards internacionals sobre la qualitat en els laboratoris d'anàlisi i, per tant, en el procés de validació, s'han de determinar els paràmetres de qualitat associats al mètode. Això és important no solament per raons normatives, sinó també per raons científiques ja que certs paràmetres, com ara la selectivitat, la sensibilitat o els límits de detecció i **quantificació**, no tenen una equivalència directa amb els mateixos paràmetres avaluats en mètodes on s'utilitza la calibració univariant.

Les diferents tècniques instrumentals analítiques, així com la diversitat de mètodes de regressió existents, han fet que l'estudi dels límits de detecció en calibració multivariant pugui dividir-se en diversos blocs, cadascun d'ells ben diferenciat. En aquest capítol es pretén fer una revisió crítica de tots els estimadors dels límits de detecció desenvolupats fins a l'actualitat, agrupant-los en aquests blocs, amb l'objectiu de facilitar al lector el coneixement de les diferents problemàtiques existents i dels avantatges i inconvenients que aporta cadascun dels estimadors presentats. La importància d'exposar l'estat de la qüestió radica també en què permet tenir una visió global del problema, la qual cosa facilita la tasca de plantejar com s'ha d'abordar en un futur l'estudi dels límits de detecció en la calibració multivariant i quins són els punts, des d'un punt de vista teòric o experimental, on cal incidir.

El gruix d'aquesta revisió crítica es troba al final del capítol, en l'article titulat *Multivariate Detection Limits Estimators. A Review*, i que ha estat publicat a la revista *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. En la present introducció s'han incorporat els darrers avenços en el camp, no presentats en

l'article original, a més d'una revisió avançada dels mètodes de calibració multivariant.

2.1. Models de calibració multivariant

2.1.1. Model directe

En aquest model, també anomenat *clàssic* o *model additiu lineal*, les respostes mesurades en els J sensors (o longituds d'ona a l'anàlisi espectroscòpica) són combinació lineal de les concentracions dels K analits presents a la mostra i de les seves respectives absortivitats, d'acord amb la llei de Lambert-Beer:

$$r_j = \sum_{k=1}^K s_{j,k} c_k + e_j \quad (2.1)$$

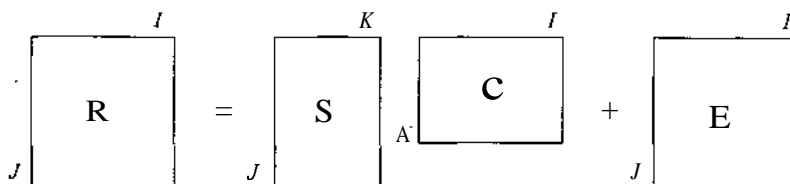
on r_j és la resposta de la mostra mesurada en el sensor j , c_k és la concentració de Panalit k en la mostra, $s_{j,k}$ es l'absortivitat molar (també anomenada sensibilitat parcial) de Panalit k en el sensor j i e_j és l'error residual. El mateix model pot expressar-se en forma matricial com:

$$\mathbf{r} = \mathbf{S}\mathbf{c} + \mathbf{e} \quad (2.2)$$

Diagrama matricial de l'equació (2.2) que mostra la multiplicació de matrius i vectors. El vector \mathbf{r} té dimensions $J \times 1$, la matriu \mathbf{S} té dimensions $J \times K$, el vector \mathbf{c} té dimensions $K \times 1$, i el vector \mathbf{e} té dimensions $J \times 1$.

on el vector $\mathbf{r}_{J \times 1}$ representa les respostes mesurades en J sensors, $\mathbf{S}_{J \times K}$ és la matriu d'absortivitats molars per J sensors i K analits, $\mathbf{c}_{K \times 1}$ és el vector de concentracions dels K analits i $\mathbf{e}_{J \times 1}$ és el vector dels errors. En l'etapa de calibració, la matriu S es troba a partir dels espectres de solucions estàndard dels constituents purs o de mescles. Per K analits i J sensors es necessitaran com a mínim K equacions linearmment independents per obtenir la matriu S . En l'etapa de calibració, el model additiu lineal pot escriure's com:

$$\mathbf{R} = \mathbf{S}\mathbf{C} + \mathbf{E} \tag{2.3}$$



on $\mathbf{R}_{J \times I}$ és la matriu de respostes mesurades en l'etapa de calibració, $\mathbf{C}_{K \times I}$ és la matriu de concentracions conegudes de cadascun dels K analits en les I mostres utilitzades en la calibració i $\mathbf{E}_{J \times I}$ és la matriu d'errors residuals. La matriu S s'obté en l'etapa de calibració com:

$$\mathbf{S} = \mathbf{R}\mathbf{C}^+ \tag{2.4}$$

on \mathbf{C}^+ és la matriu pseudoinversa de C [3], la qual s'utilitza per invertir matrius singulars (el determinant de les quals és zero) o matrius no quadrades. En el cas que les columnes de C siguin linearmment independents, llavors $\mathbf{C}^+ = \mathbf{C}^T(\mathbf{C}\mathbf{C}^T)^{-1}$, és a dir, la solució per mínims quadrats ordinària i, per tant, la matriu S pot obtenir-se com:

$$\mathbf{S} = \mathbf{R} \mathbf{C}^T (\mathbf{C} \mathbf{C}^T)^{-1} \quad (2.5)$$

Cal dir que el mètode dels mínims quadrats minimitza la matriu \mathbf{E} dels residuals de les respostes de calibració, sense tenir en compte en cap moment els errors en la variable independent, *Le.* les concentracions en l'etapa de calibració. Per la seva banda, les columnes de la matriu \mathbf{S} no són més que l'estimació dels espectres dels analits purs a concentració unitat.

Un cas particular d'aquest model és quan el conjunt de calibració està format per mostres consistents en els K constituents purs. Llavors, el model de calibració es pot expressar com:

$$\mathbf{R} = \mathbf{S} \mathbf{C}_0 + \mathbf{E} \quad (2.6)$$

on \mathbf{C}_0 és una matriu quadrada i diagonal, els elements de la qual són les concentracions dels K analits en les K mostres de calibració. En aquest cas, la matriu \mathbf{S} s'obté en l'etapa de calibració com:

$$\mathbf{S} = \mathbf{R} \mathbf{C}_0^{-1} \quad (2.7)$$

La validació del model de calibració normalment es duu a terme mitjançant un conjunt de mostres independent, no utilitzat en l'etapa de calibració i del qual es coneixen les concentracions dels analits en estudi. Les concentracions predites pel

model es comparen amb les mesures, obtenint-se finalment un valor de l'error mitjà de predicció sobre futures mostres.

Un cop el model ha estat validat, les concentracions dels K analits presents en una mostra desconeguda s'obtenen, en l'etapa de predicció, a partir de Peq.(2.2) com:

$$\mathbf{c}_{un} = \mathbf{S}^+ \mathbf{r}_{un} \quad (2.8)$$

$$\begin{array}{c} i \\ \boxed{\mathbf{c}_{un}} \\ K \end{array} = \begin{array}{c} J \\ \boxed{\mathbf{S}^+} \\ K \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{r}_{un}} \\ J \end{array}$$

o el que és el mateix, representant l'eq.(2.4):

$$\mathbf{c}_{un} = (\mathbf{RC}^+)^+ \mathbf{r}_{un} \quad (2.9)$$

on \mathbf{r}_{un} és l'espectre de la mostra desconeguda. De la mateixa manera que abans, si les columnes de \mathbf{S} són linearament independents, $\mathbf{S}^+ = (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \mathbf{S}^T$ (la solució per mínims quadrats), i l'expressió de la concentració predita esdevé:

$$\mathbf{c}_{un} = (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \mathbf{S}^T \mathbf{r}_{un} \quad (2.10)$$

En el cas que la matriu de les absortivitats molars, \mathbf{S} , hagi estat obtinguda en l'etapa de calibració a partir d'estàndards consistents en els analits purs, la concentració predita dels K analits en la mostra desconeguda es pot escriure com:

$$\mathbf{c}_{un} = (\mathbf{RC}_0^{-1})^+ \mathbf{r}_{un} = \mathbf{C}_0 \mathbf{R}^+ \mathbf{r}_{un} \quad (2.11)$$

2.1.2. Model invers

En aquest model, també anomenat *indirecte* o *parcial*, la concentració corresponent a un analít k present a la mostra és funció lineal de les respostes mesurades en J sensors, d'acord amb l'equació:

$$c_k = \sum_{j=1}^J r_j b_{j,k} + e_k \tag{2.12}$$

on c_k és la concentració de l'analít k en la mostra, r_j és la resposta de la mostra mesurada en el sensor j , $b_{j,k}$ és el coeficient que relaciona el sensor j amb la concentració de l'analít k i e_k és el terme corresponent a l'error residual no modelat. La representació en forma matricial d'aquest model és:

$$c_k = \mathbf{r}^T \mathbf{b}_k + e_k \tag{2.13}$$

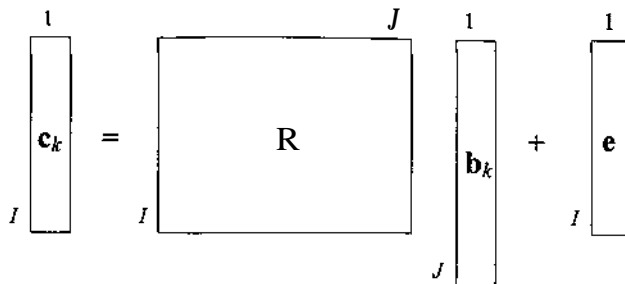
$$\begin{array}{c} 1 \\ \boxed{C_k} \end{array} = 1 \begin{array}{c} J \\ \boxed{\mathbf{r}^T} \end{array} + 1 \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{e_k} \end{array}$$

$\begin{array}{c} 1 \\ \mathbf{b}_k \\ J \end{array}$

on c_k és la concentració de l'analít k en la mostra, \mathbf{r}^T és el vector de la resposta instrumental de la mostra, mesurada en J sensors, \mathbf{b}_k és el vector dels coeficients de regressió per a l'analít k i e_k és l'error residual de la concentració.

En l'etapa de calibració, el model invers s'escriu com:

$$\mathbf{c}_k = \mathbf{R} \mathbf{b}_k + \mathbf{e} \quad (2.14)$$



on \mathbf{c}_k és el vector de concentracions de l'analít k en les I mostres de calibració, \mathbf{R} és la matriu de respostes instrumentals de les I mostres de calibració mesurades en J sensors i \mathbf{e} és el vector dels residuals de les concentracions que no s'ajusten al model. Aquest model té l'important avantatge que l'anàlisi és invariable respecte del nombre total d'analít, K , presents a la mostra i , per tant, només és necessària la informació relativa a l'analít d'interès en l'etapa de calibració per construir el model.

El vector de coeficients de regressió, \mathbf{b}_k , s'obté en l'etapa de calibració com:

$$\mathbf{b}_k = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k \quad (2.15)$$

on \mathbf{R}^+ és la matriu pseudoinversa de \mathbf{R} . La diferència entre els diferents mètodes de regressió que estan basats en el model invers radica precisament en el procés d'obtenció de la matriu \mathbf{R}^+ .

2.1.2.1. Regressió per mínims quadrats inversos (*Inverse Least Squares*, ILS). En aquest mètode es minimitzen els errors al quadrat de les concentracions en l'etapa de calibració (els elements del vector \mathbf{e} al quadrat) i la matriu \mathbf{R}^+ és equivalent a la solució per mínims quadrats clàssica:

$$\mathbf{R}^+ = \mathbf{R}^{-1} \quad \text{si } I = J \quad (2.16a)$$

$$\mathbf{R}^+ = (\mathbf{R}^T \mathbf{R})^{-1} \mathbf{R}^T \quad \text{si } I > J \quad (2.16b)$$

$$\mathbf{R}^+ = \mathbf{R}^T (\mathbf{R} \mathbf{R}^T)^{-1} \quad \text{si } I < J \quad (2.16c)$$

El mètode dels mínims quadrats inversos (ILS) no dóna bons resultats quan les dades presenten colinearitat, és a dir, quan existeixen dependències lineals entre les files o columnes de la matriu \mathbf{R} . En aquests casos, el rang d'aquesta matriu (nombre de fonts de variació intrínseques) no coincideix amb el nombre mínim de files (objectes o mostres) o columnes (variables o sensors). Les principals causes de la presència de colinearitat són tres:

- 1) un disseny experimental pobre per a les concentracions dels analits en el conjunt de calibració
- 2) una elevada correlació entre els espectres de diferents analits
- 3) l'existència de molts més sensors que mostres de calibració

La colinearitat és difícil d'evitar si els espectres dels constituents presenten bandes amples, com és el cas de les mesures en la zona ultraviolada-visible (UV-Vis) o infraroja propera (NIR). Quan existeix colinearitat en les dades espectrals la inversió de la matriu \mathbf{R} presenta dificultats, que es tradueixen en una elevada variància per a alguns elements del vector de coeficients de regressió, \mathbf{b}_k . En conseqüència, la solució per mínims quadrats inversos té un efecte negatiu en l'estabilitat dels coeficients de \mathbf{b}_k i els fa inadequats per a establir un model i predir la concentració de mostres desconegudes. Aquesta és la raó de per què la utilitat pràctica del mètode ILS és limitada en la calibració multivariant. Existeixen, però, altres mètodes de regressió que solucionen el problema de la colinearitat. Són els anomenats mètodes de regressió *esbiaixats*, com la regressió per components principals (*Principal Components Regression*, PCR) o la regressió

per mínims quadrats parcials (*Partial Least Squares*, PLS). S'anomenen esbiaixats perquè donen lloc a coeficients de regressió la mitjana dels quals presenta una desviació respecte del valor real. Aquesta desviació s'anomena *biaix* i és el resultat de descartar part de la informació continguda en les dades a l'hora de calcular els coeficients de regressió. Si el biaix és significatiu i no es té en consideració, l'estimació dels intervals de predicció serà incorrecta [4]. Com a contrapartida, ambdós mètodes de regressió (PCR i PLS) donen lloc a una variància de predicció molt menor, si es compara amb el mètode ILS [2].

2.1.2.2. Regressió per components principals (PCR). Aquest mètode de regressió tracta de resoldre el problema d'invertir la matriu R fent la inversió en un espai multidimensional reduït. En PCR, el càlcul de la matriu pseudoinversa, R^+ , es divideix en tres etapes: descomposició de la matriu R , determinació del nombre de factors òptim (pseudorang o rang químic) de la matriu i subsegüent càlcul de la matriu pseudoinversa. En la primera etapa, els dos algorismes més utilitzats per descompondre la matriu R són el NIPALS [2] i el de la descomposició en valors singulars (*Singular Value Decomposition*, SVD) [3]. Aquest darrer postula que qualsevol matriu de números reals, per exemple R , amb I files ($i = 1, \dots, I$) i J columnes ($j = 1, \dots, J$) pot descompondre's en tres matrius: U , S i V , de la següent manera:

$$\mathbf{R} = \mathbf{U} \mathbf{\Sigma} \mathbf{V}^T \quad (2.17)$$

a) Si $I < J$

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{R} \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 J \\
 \hline
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{U} \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 I \\
 \hline
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{\Sigma} \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 J \\
 \hline
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{V}^T \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 J \\
 \hline
 \end{array}$$

b) Si $I \geq J$

$$\begin{array}{c} \boxed{\text{R}} \\ \begin{array}{l} J \\ I \end{array} \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{\text{U}} \\ \begin{array}{l} J \\ I \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \boxed{\Sigma} \\ \begin{array}{l} J \\ J \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \boxed{\text{V}^T} \\ \begin{array}{l} J \\ J \end{array} \end{array}$$

Les matrius \mathbf{U} i \mathbf{V} són ortonormals (és a dir, $\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}$, $\mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}$, on \mathbf{I} és la matriu identitat) i la matriu Σ és una matriu diagonal on els elements σ_{kk} ($k = 1, \dots, K$) són els valors singulars i equivalen a l'arrel quadrada dels valors propis de les matrius $\mathbf{R}^T \mathbf{R}$ i $\mathbf{R} \mathbf{R}^T$. Els valors singulars estan ordenats de forma decreixent, de manera que $\sigma_{11} > \sigma_{22} > \sigma_{kk} > \sigma_{KK} > 0$. Les columnes de \mathbf{U} (\mathbf{u}_k , sovint anomenades *scores*) són els vectors propis de $\mathbf{R} \mathbf{R}^T$ i, conseqüentment, defineixen l'espai de files (objectes) de \mathbf{R} . Les columnes de \mathbf{V} (\mathbf{v}_k , sovint anomenades *loadings*) són els vectors propis de $\mathbf{R}^T \mathbf{R}$ i, per tant, defineixen l'espai de columnes (variables) de \mathbf{R} . Els vectors propis s'obtenen de manera que descriuin la variància continguda en les dades de manera decreixent. Així, el primer factor ($\mathbf{u}_1 \sigma_{11} \mathbf{v}_1^T$) va en la direcció de la màxima variació de les dades, mentre el segon descriu la següent major font de variació que és ortogonal a la primera. Les propietats ortonormals de \mathbf{U} i \mathbf{V} són molt importants a l'hora de facilitar els càlculs en àlgebra lineal. Així, per exemple, la pseudoïnversa de la matriu \mathbf{R} és simplement:

$$\mathbf{R}^+ = \mathbf{V} \Sigma^{-1} \mathbf{U}^T \quad (2.18)$$

Si \mathbf{R} es deriva de dades reals, el seu rang matemàtic és quasi sempre el menor valor entre I i J . Tanmateix, el veritable rang, des del punt de vista de components químics significatius, normalment és menor que el rang matemàtic. És comú en aquests casos que alguns dels valors propis estimats mitjançant SVD siguin

petits o bé representin només errors aleatoris, és a dir, soroll. Llavors la matriu \mathbf{R} es pot reconstruir, dins uns límits d'error, utilitzant menys vectors propis. El fet de descartar els components que modelen el soroll i reconstruir la matriu \mathbf{R} utilitzant només els vectors propis químicament significatius pot reduir realment el soroll present en les dades originals. La matriu \mathbf{R} reconstruïda es calcula com:

$$\mathbf{R} = \bar{\mathbf{U}} \bar{\mathbf{\Sigma}} \bar{\mathbf{V}}^T \quad (2.19)$$

El diagrama mostra la igualtat $\bar{\mathbf{R}} = \bar{\mathbf{U}} \bar{\mathbf{\Sigma}} \bar{\mathbf{V}}^T$. A l'esquerra, una matriu rectangular etiquetada $\bar{\mathbf{R}}$ amb dimensions I (vertical) i J (horizontal). A la dreta, tres matrius rectangulars etiquetades $\bar{\mathbf{U}}$, $\bar{\mathbf{\Sigma}}$ i $\bar{\mathbf{V}}^T$ respectivament, amb dimensions I , A i J respectivament. Les matrius $\bar{\mathbf{U}}$ i $\bar{\mathbf{V}}^T$ són quadrades de mida A .

i la seva pseudoinversa com:

$$\mathbf{R}^+ = \bar{\mathbf{V}} \bar{\mathbf{\Sigma}}^{-1} \bar{\mathbf{U}}^T \quad (2.20)$$

on les barres indiquen que es tracta de matrius truncades al rang químic òptim, A , del model. Es pot intuir, a partir d'aquesta darrera equació, que si s'escull un valor de A tal que $A = \min(I, J)$, la solució per a la pseudoinversa és equivalent a l'obtinguda amb el mètode ILS, Eqs. (2.16a) a (2.16c). El procés d'escollir el rang químic òptim del model (nombre de factors significatius) no és trivial. En aquest sentit, existeixen diversos criteris i procediments de validació de models [5], els quals es comenten més endavant.

2.1.2.3. Regressió per mínims quadrats parcials (PLS). En el mètode PCR, l'obtenció de la matriu \mathbf{R}^+ es basa únicament en la descomposició de la matriu de respostes original, \mathbf{R} , sense tenir en compte en cap moment la relació existent entre les respostes i les concentracions en l'etapa de calibrado. Podria donar-se el cas

que l'analit d'interès produís un senyal molt petit; si això fos així, la contribució a la variació total de les dades deguda a l'analit estaria descrita en els darrers factors (factors amb valors singulars molt petits) i en conseqüència, la contribució de l'analit al vector de coeficients del model seria molt petita. L'algorisme utilitzat en el mètode PLS soluciona parcialment aquest problema, ja que incorpora la informació continguda en el vector de concentracions de calibració, c , a l'hora de descomposar la matriu R i calcular la seva pseudoinversa. Així, el primer factor calculat és alhora el que descriu la direcció de màxima variació en les dades espectrals i el que millor es correlaciona amb el vector de concentracions de l'analit d'interès. Degut a la complexitat de l'algorisme PLS, aquest no es discuteix amb més profunditat. Existeixen, però, excel·lents referències al respecte [6,7], en les quals el lector pot trobar tota la informació necessària.

Un cop calculada la matriu pseudoinversa i trobats els coeficients del model, a partir de qualsevol dels mètodes de regressió presentats, les concentracions dels analits en mostres desconegudes es calculen en l'etapa de predicció a partir de l'eq. (2.14) com:

$$c_{un,k} = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{b}_k - \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k \quad (2.21)$$

Pel que respecta a l'obtenció del rang químic òptim del model, aquest es tria a partir d'un estadístic de validació. Com els models de calibració s'utilitzen per a predir les concentracions de l'analit/s en estudi en mostres futures, es calcula un estadístic de l'error de predicció. Aquest procediment pot realitzar-se, però, de dues maneres. Si disposem de mostres addicionals que no han estat utilitzades en el procés de construcció del model i en coneixem la concentració de l'analit d'interès, l'estadístic es pot calcular com l'arrel quadrada de l'error mitjà de predicció al quadrat (*Root-Mean-Square Error of Prediction*, RMSEP):

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{I_p} (c_i - \hat{c}_i)^2}{I_p}} \quad (2.22)$$

on I_p és el nombre de mostres de predicció addicionals que constitueixen el conjunt de validació, c_j són les concentracions mesurades de l'analit en aquestes mostres i \hat{c}_i són les concentracions de Panalit predites pel model. En la literatura, aquest mètode de validació s'anomena del conjunt de prova o de predicció (*Test-Set Validation*).

Si només disposem de les mostres del conjunt de calibració, el procediment que es duu a terme per trobar el rang químic òptim s'anomena validació creuada (*Cross-Validation*). En aquest mètode, part de les mostres es descarten i el model es construeix amb les mostres restants, predient-se finalment les mostres que s'han deixat fora. El procés es repeteix fins que totes les mostres s'han descartat, si més no, una vegada. El mètode més comú s'anomena *Leave-One-Out Cross-Validation* i consisteix en descartar només una mostra cada vegada, fins completar totes les mostres de calibració. En aquest cas, l'estadístic de predicció es calcula com l'arrel quadrada de l'error mitjà de la validació creuada al quadrat (*Root-Mean-Square Error of Cross-Validation*):

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^I (c_l - \hat{c}_{v,l})^2}{I}} \quad (2.23)$$

on I és el nombre de mostres de calibració i $\hat{c}_{v,l}$ és la concentració de l'analit predita quan el model es construeix sense la mostra l . La validació creuada s'utilitza molt més sovint, ja que normalment és difícil tenir mostres de predicció

suficients per aconseguir que el RMSEP sigui un bon estimador de l'habilitat de predicció del model.

2.2. Aproximacions basades en el senyal net de l'analit

Lorber [8] va ser el primer en proposar una sèrie de paràmetres de qualitat per l'anàlisi multicomponent de mostres, utilitzant el model de calibració directe. Posteriorment, aquests conceptes han estat amplament revisats [9] i ampliat [10]. La base del seu treball radica en trobar la contribució neta de cada analit a la resposta total mesurada i , a partir d'aquí, derivar-ne els conseqüents paràmetres. Lorber defineix aquesta contribució neta, o *senyal net de l'analit* (*Net Analyte Signal*, NAS), com la part del seu espectre que és ortogonal als espectres dels altres analits presents en la mostra. La part d'un espectre que no és ortogonal als altres espectres vol dir que està continguda en ells; només la part ortogonal és única per a l'analit que es vol determinar. Vectorialment, la part d'un vector u que és ortogonal a una matriu X es pot trobar com:

$$\mathbf{v} = (\mathbf{I} - \mathbf{X}\mathbf{X}^+) \mathbf{u} \quad (2.24)$$

essent v la part ortogonal i I la matriu identitat. És clar que si u fos una combinació lineal dels vectors de la matriu X , llavors la seva multiplicació per la matriu $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$ donaria com a resultat el mateix vector u i la multiplicació per la matriu $(\mathbf{I} - \mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ produiria un vector de zeros. La matriu $(\mathbf{I} - \mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ s'anomena *matriu de projecció* i suprimeix la part del vector u que no és ortogonal a la matriu X .

Seguint aquesta expressió, Lorber va definir el senyal net d'un analit a partir d'un model de calibració construït amb els espectres dels constituents purs de la mescla. Així, la part del vector \mathbf{r}_k , corresponent a l'espectre de l'analit k de la matriu de calibració, orthogonal als espectres dels restants constituents s'expressa en forma matricial com:

$$\mathbf{r}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k \mathbf{R}_k^+) \mathbf{r}_k \quad (2.25)$$

on \mathbf{r}_k^* és el senyal net de l'analit k i \mathbf{R}_k és la matriu de calibració, \mathbf{R} , sense la presència de l'espectre de l'analit k , \mathbf{r}_k . El concepte de senyal net es fa més comprensible si s'observa la Fig. 2.1. Aquesta figura mostra un pla generat per dos analits, $(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$. El vector \mathbf{r}_k conté informació sobre un tercer analit i cau fora d'aquest pla.

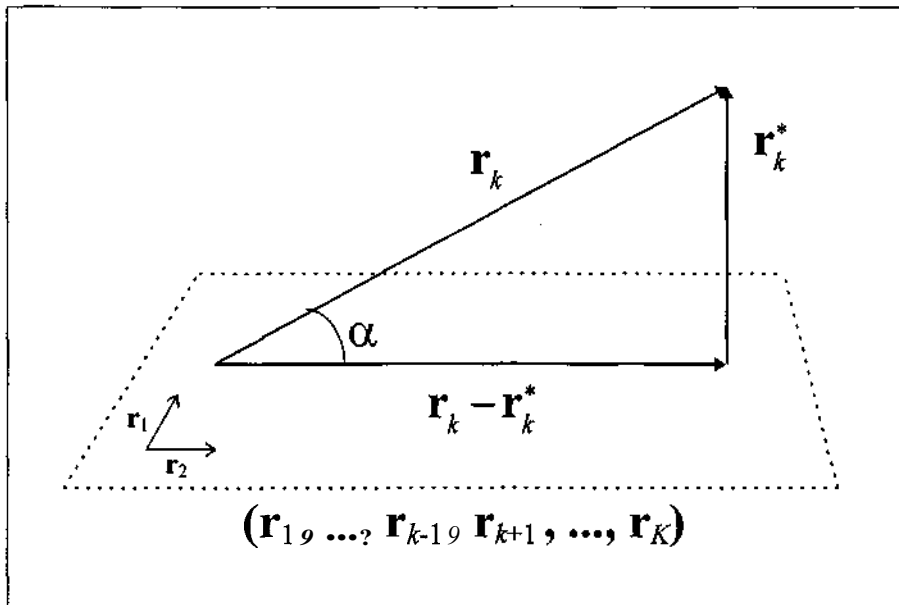


Fig. 2.1. Representació geomètrica del concepte de senyal net d'un analit en un espai bidimensional (s'ha mantingut la notació pel cas general d'un espai K -dimensional).

La part de l'espectre del tercer analit que està continguda en els espectres dels altres dos constituents es pot trobar a partir de la seva projecció ortogonal en l'espai definit per \mathbf{R}_k com $\mathbf{R}_k \mathbf{R}_k^+ \mathbf{r}_k$. Per altra banda, la part neta del seu espectre, \mathbf{r}_k^* , es troba a partir de la projecció de \mathbf{r}_k en l'espai ortogonal a \mathbf{R}_k , *i.e.* $(\mathbf{I} - \mathbf{R}_k \mathbf{R}_k^+)$, tal com mostra l'eq. (2.25).

A partir d'aquest nou concepte, Lorber derivà una sèrie de paràmetres de qualitat associats a l'analit k , com la sensibilitat, la selectivitat i el límit de detecció, entre d'altres. La sensibilitat la calcula com:

$$(\text{SEN})_k = \mathbf{r}_k^* / c_{0,k} \quad (2.26)$$

on $c_{0,k}$ és la concentració de l'analit k pur en l'estàndard de calibració i $\|\bullet\|$ indica la norma euclídea d'un vector. Aquesta és exactament la definició de sensibilitat en calibració univariant, la qual s'expressa com $s = r / c$, essent r^* el senyal net mesurat (diferència entre el senyal total i el senyal del blanc) i c la concentració d'analit.

Pel que respecta a la selectivitat de l'analit k , Lorber la va definir com el quocient entre la norma del senyal net de l'analit k i la norma del seu espectre pur:

$$(\text{SEL})_k = \|\mathbf{r}_k^*\| / \|\mathbf{r}_k\| \quad (2.27)$$

Si s'observa la Fig. 2.1, la selectivitat correspon al sinus de l'angle α . Els seus valors es poden moure, per tant, entre 0 (selectivitat nul·la), per un analit l'espectre del qual és una combinació lineal de tots els altres, i 1 (màxima selectivitat), quan

es té un analit l'espectre del qual és completament independent dels espectres dels altres constituents.

Finalment, Lorber derivà una expressió pel límit de detecció, en unitats de concentració, considerant que els errors experimental en la mesura de les respostes de les mostres de calibració i les mostres desconegudes eren comparables:

$$(\text{LOD})_k = \frac{c_{0,k}}{\left[\frac{\|\mathbf{r}_k^*\|}{3\varepsilon_r} - 1 \right]} \quad (2.28)$$

essent ε_r l'error de mesura en les respostes. L'expressió completa, sense l'aproximació esmentada, es troba desenvolupada a l'Apèndix I. Pot comprovar-se, en l'eq. (2.28), que si $\|\mathbf{r}_k^*\| / 3\varepsilon_r \gg 1$, $(\text{LOD})_k$ es converteix en la definició més habitual de límit de detecció en calibració univariant, com tres vegades l'error dividit per la sensibilitat.

Posteriorment, la definició de senyal net es va ampliar a models de calibració construïts amb mescles dels analits purs [11]. En aquest cas, el NAS d'un analit k s'expressa com:

$$\mathbf{s}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k \quad (2.29)$$

on S_k és la columna de la matriu S d'absortivitats molars (o sensibilitats parcials) corresponent a Panalit k , *i.e.* la resposta de l'analit k pur a concentració unitat. \mathbf{S}_k és la matriu S sense la columna \mathbf{s}_k .

Els autors van derivar també, com en el cas anterior, els paràmetres de qualitat associats a l'analit k . Dos d'ells, la sensibilitat i selectivitat, es calculen respectivament com:

$$(\text{SEN})_k = \|\mathbf{s}_k^*\| \quad (2.30)$$

$$(\text{SEL})_k = \|\mathbf{s}_k^*\| / \|\mathbf{s}_J\| \quad (2.31)$$

Es pot observar la similitud entre ambdós paràmetres. De fet, la sensibilitat definida d'aquesta manera es refereix a la quantitat d'absorció neta de l'analit k . En tractar-se d'un terme "net", forçosament està relacionat amb tots els altres espectres del conjunt de calibració i, per tant, amb la selectivitat.

Els autors no van derivar una expressió del límit de detecció per aquest tipus de dades però, operant de manera anàloga a la desenvolupada per obtenir (2.28), es pot trobar l'equació desitjada (Apèndix II):

$$(\text{LOD})_k = \frac{3 \|\mathbf{r}_{\text{un}}\|}{\|\mathbf{s}_k^*\| \left(\frac{\|\mathbf{r}_{\text{un}}\|}{\varepsilon_r} - \frac{3}{(\text{SEL})_k} \right)} \quad (2.32)$$

on $(\text{SEL})_k$ és la selectivitat de l'analit k en la mescla, definida anteriorment. Es pot deduir que a valors de selectivitat petits correspondran naturalment límits de detecció més elevats. Un fet a destacar, i al qual hom es referirà més endavant, és que el límit de detecció depèn també de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} . D'altra banda, si $\|\mathbf{r}_{\text{un}}\| / \varepsilon_r \gg 3 / (\text{SEL})_k$, el límit de detecció torna a la definició típica de tres vegades l'error dividit per la sensibilitat, també definida amb anterioritat.

La definició de senyal net d'un analit permet intuir ja una conseqüència important a l'hora de treballar amb dades multivariants, i és que alguns paràmetres de qualitat ja no estan referits al mètode analític sinó a un analit en concret; fins i tot, com ja s'ha comprovat, són específics d'una mostra determinada, des del moment que cada mostra té un nivell d'analit i d'interferents diferent. Això, com es veurà més endavant, tindrà una importància cabdal en l'establiment dels límits de detecció en metodologies analítiques que utilitzen les tècniques de calibració multivariant.

Aquest primer estimador té importància des del punt de vista que està basat en el nou concepte del senyal net. Això implica que per a qualsevol sistema multicomponent, sempre que pugui trobar-se el senyal net corresponent a un analit en concret, podrà calcular-se el seu límit de detecció. D'altra banda, el seu càlcul no requereix molt treball experimental: simplement la construcció del model, és a dir, el càlcul de la matriu S , i l'avaluació del terme d'error en la mesura de les respostes, ϵ_r . Aquest darrer terme pot calcular-se a partir de repeticions sobre la mostra problema o bé estimar-se a partir dels residuals del model. Existeixen, però, una sèrie de limitacions que restringeixen, en certa mesura, la seva aplicabilitat i que estan relacionades amb els criteris bàsics sobre el concepte de detecció esmentats en el Capítol 1. En primer lloc, no es fa menció a les probabilitats a i P de cometre falsos positius i falsos negatius, respectivament. No es fa, en definitiva, un tractament del problema basat en els tests d'hipòtesi. Simplement s'aplica el factor $k = 3$ derivat de les primeres recomanacions de la IUPAC [12], amb les implicacions que això suposa i que ja s'han discutit. Lligat amb això, tampoc es fa menció sobre com afecten els graus de llibertat, utilitzats en l'estimació del terme ϵ_r , al valor de k i a la probabilitat d'error α . A més a més, el fet que el terme ϵ_r sigui un escalar és en si mateix una aproximació, ja que considera que tots els sensors són iguals en termes d'error. Finalment, l'estimador és aplicable únicament a models de calibració directes, amb les conegudes restriccions que

això suposa: en l'etapa de calibració cal conèixer les concentracions de tots els constituents de la mostra que produeixen senyal o, si més no, disposar dels espectres de tots els constituents purs.

Un pas endavant en aquest sentit el van donar Lorber *et al.*, en introduir els límits de detecció per a models de calibració inversos [13]. En el cas d'un model invers, expressat habitualment com $\mathbf{c} = \mathbf{R}\mathbf{b} + \mathbf{e}$, el senyal net de la resposta corresponent a l'analit k pur pot expressar-se, en forma escalar, com:

$$r_k^* = c_{0,k} / \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \quad (2.33)$$

on $c_{0,k}$ és la concentració de Panalit k pur en la mostra de calibració i el denominador és la norma euclídea del vector de coeficients de regressió per a l'analit k , $\mathbf{b}_k = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$. En calibració univariant, com s'ha vist anteriorment, la sensibilitat es defineix com el senyal net mesurat dividit per la concentració. Aplicant aquesta definició a l'eq. (2.33), s'obté el següent valor per la sensibilitat multivariant:

$$(\text{SEN})_k = 1 / \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \quad (2.34)$$

La selectivitat s'ha definit com el senyal net de l'analit k dividit pel seu espectre pur i pot expressar-se, a partir de (2.33) com:

$$(\text{SEL})_k = c_{0,k} / (\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_k\|) \quad (2.35)$$

essent \mathbf{r}_k l'espectre de l'analit k pur. Finalment, l'estimador del límit de detecció s'obté com:

$$(\text{LOD})_k = \frac{3 \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_{\text{un}}\|}{\left(\frac{\|\mathbf{r}_{\text{un}}\|}{\varepsilon_r} - \frac{3}{(\text{SEL})_k} \right)} \quad (2.36)$$

Cal remarcar, però, que l'equació anterior és vàlida únicament quan la calibració es fa amb els constituents purs i assumint que els errors relatius en la calibració i la predicció són iguals. L'expressió general es presenta a l'Apèndix III. Si el terme associat a l'error en la calibració, $3/(\text{SEL})_k$, és suficientment petit, l'eq. (2.36) es transforma en:

$$(\text{LOD})_k = 3 \varepsilon_r \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \quad (2.37)$$

on el terme $\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|$ és la inversa de la sensibilitat per a l'analit k .

Malgrat que aquesta nova metodologia és aplicable en presència d'interferents a les mostres problema, la seva aplicabilitat es veu restringida ja que hom ha de disposar dels espectres dels analits i dels interferents purs per trobar els coeficients del model de calibració. A més a més, l'estimador segueix la derivació convencional que es basa en considerar el límit de detecció com la concentració equivalent a tres vegades la precisió en la concentració.

Recentment, Lorber *et al.* [14] han caracteritzat el càlcul del senyal net de l'analit per a models típicament inversos, on només és necessari conèixer, en l'etapa de calibració, la concentració de l'analit en estudi. Una discussió més profunda d'aquesta metodologia es presenta al Capítol 5. Posteriorment, Faber *et al.* [10] han generalitzat el càlcul del senyal net i dels paràmetres de qualitat associats a la calibració de 2n ordre, tot comparant els resultats obtinguts amb la calibració multivariant (o de 1r ordre).

2.3. Aproximacions basades en el càlcul de la variància de la concentració predita

Un pas qualitatiu important en l'establiment dels límits de detecció en calibració multivariant el van donar Lorber i Kowalski [15], en derivar una expressió per a la variància i pels intervals de confiança de les concentracions individuals predites pel model. Un avenç important el van donar també en derivar les esmentades expressions tenint en compte totes les fonts d'error associades al model: respostes mesurades de les mostres de calibració, concentracions dels analítics del conjunt de calibració i respostes mesurades de la mostra desconeguda. Un cop obtinguda l'expressió de la variància de la concentració predita, $\text{var}(c_{\text{un}})$, si els coeficients de regressió del model segueixen una distribució normal, també ho fan les concentracions predites. En aquest cas, es pot obtenir el seu interval de confiança (amb dues cues) a partir del següent estadístic *t* d'Student:

$$t = \frac{(c_{\text{un}} - \hat{c}_{\text{un}})}{\text{var}(c_{\text{un}})^{1/2}} \quad (2.38)$$

Per tant, l'interval de confiança de la concentració predita ve donat per:

$$c_{\text{un}} = \hat{c}_{\text{un}} \pm t_{v,\alpha/2} \text{var}(c_{\text{un}})^{1/2} \quad (2.39)$$

La verificació de si la concentració predita d'analític està per sota del límit de detecció pot fer-se fàcilment comprovant si el valor zero està inclòs en l'interval de confiança, que, en aquest cas específic, seria d'una cua. No es dóna tanta importància a un valor de límit de detecció concret, sinó més aviat es verifica, per cada mostra individual, si la concentració predita pot estar o no per sota d'aquest límit.

Un cop adoptada aquesta filosofia de treball, el problema recau en l'avaluació d'una expressió general per la variància de predicció que tingui en compte totes les fonts d'error associades al model. Lorber i Kowalski, en el mateix article, deriven una primera expressió i demostren la seva utilitat validant-la amb dades simulades. Tanmateix, el seu pobre suport matemàtic ha fet que no hagi estat gaire utilitzada. Recentment, Faber i Kowalski [4] han desenvolupat expressions per a l'error de predicció en models inversos i per diferents mètodes de regressió (ILS, PCR i PLS), així com els intervals de confiança de les concentracions predites. Cal dir que les expressions de la variància de predicció obtingudes a partir dels mètodes de regressió ILS i PCR són equivalents a les presentades per Boque i Rius en el treball que es troba al final del capítol [16]. Faber i Kowalski fan l'avaluació dels límits de detecció segons l'aproximació abans descrita, és a dir, comprovant si el valor zero cau dins l'interval de confiança de la concentració predita. La probabilitat que existeix d'afirmar erròniament que la concentració està per sobre del límit de detecció és el que hom anomena error de la espècie, error a o fals positiu. En aquesta aproximació, però, la probabilitat de cometre un error de 2a espècie o fals negatiu, *i.e.* afirmar erròniament que l'analit es troba per sota del límit de detecció, no es contempla.

Bauer *et al.* [17], utilitzant la tècnica de propagació d'errors, derivaren a partir de l'equació de predicció d'un model de calibració clàssic (Eq. 2.8) una expressió de l'error de predicció vàlida per a aquests tipus de models, incloent un terme corresponent a la línia de base [18]:

$$d\mathbf{c} = -\mathbf{S}^+ (d\mathbf{R} - d\mathbf{B})\mathbf{C}^+ \mathbf{c} + d\mathbf{C}\mathbf{C}^+ + \mathbf{S}^+ (d\mathbf{r}_{\text{un}} - d\mathbf{b}) \quad (2.40)$$

on \mathbf{B} , \mathbf{b} , $d\mathbf{B}$ i $d\mathbf{b}$ són la matriu i el vector els components dels quals formen la línia de base dels espectres de les mostres de calibració, i la mostra desconeguda, així

com els seus respectius errors associats. Per la seva banda, $d\mathbf{R}$, dC i $d\mathbf{r}_{un}$ són les contribucions d'error de les respostes i les concentracions de les mostres de calibració, i de la resposta de la mostra desconeguda, respectivament. A partir d'aquesta expressió deriven la variància de la concentració predita i una expressió per al límit de detecció:

$$c_{D,k} = z(\alpha) \text{var}(c_{0,k})^{1/2} \quad (2.41)$$

on $z(\alpha)$ és un factor estadístic, determinat per l'error de la espècie i que té en compte la probabilitat de falsos positius, i $\text{var}(c_{0,k})$ és la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la, expressada a partir de (2.40) com:

$$\begin{aligned} \text{var}(c_{0,k}) = & \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (S_{k,j}^+ C_{i,n}^+ c_n)^2 [\text{var}(R_{j,i}) + \text{var}(B_{j,i})] + \\ & + \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{i,n}^+ c_n)^2 \text{var}(C_{k,i}) + \sum_{j=1}^J (S_{k,j}^+)^2 [\text{var}(r_{j,0}) + \text{var}(b_j)] \end{aligned} \quad (2.42)$$

on c_n són les concentracions predites pel model sota la condició d'hipòtesi nul·la (l'analit no és present); per tant, $c_n = 0$ quan $n = k$. Per la seva banda, $r_{j,0}$ és el senyal corresponent al blanc de l'analit k en el sensor j . Com es pot comprovar, els autors deriven aquesta expressió assumint que els errors experimentals en la determinació de R , B , C , r i b són heteroscedàstics, és a dir, que la variància no és constant entre mostres i sensors.

L'expressió (2.40) va validar-se a partir de dades experimentals obtingudes per ICP-OES (*Optical Emission Spectroscopy with Inductively Coupled Plasma excitation*) [19]. El resultat de la comparació dels errors de predicció teòrics amb els obtinguts a partir de repeticions experimentals va ser excel·lent. Per a calcular els límits de detecció, els autors apliquen un valor $z(\alpha) = 3$ a l'equació (2.41),

seguint les recomanacions inicials de la IUPAC. Per tant, aquesta aproximació tampoc té en compte la probabilitat de cometre falsos negatius, essent equivalent al *límit de decisió* definit per Currie. A més, existeix una inconsistència en l'expressió (2.42) que ha estat discutida recentment per Faber i Kowalski [20]. Encara que Bauer *et al.* [17] afirmen explícitament que l'equació (2.42) s'ha d'avaluar sota la hipòtesi nul·la, inclouen la concentració de l'analít d'interès al nivell del límit de detecció (desconegut). Això vol dir que l'equació, en el fons, s'està avaluant sota la hipòtesi alternativa. A més a més, han de recórrer a un procediment iteratiu per a calcular la desviació estàndard de manera pràctica.

Faber i Kowalski [20] retornant als postulats de Currie, plantegen el límit de detecció com el nivell que permet, *a priori*, assegurar la detecció d'un analít abans de realitzar la mesura experimental, segons l'eq. (1.2):

$$L_{D,k} = k_{\alpha} \sigma_{0,k} + k_{\beta} \sigma_{A,k} = L_{C,k} + k_{\beta} \sigma_{A,k}$$

on $CTO_{,k}$ i $\sigma_{A,k}$ indiquen les desviacions estàndard de les concentracions de l'analít k sota la hipòtesi nul·la (l'analít no és present a la mostra) i l'alternativa (l'analít és present a la mostra al nivell del límit de detecció), respectivament. Els autors deriven expressions consistents per $CTO_{,k}$ i $\sigma_{A,k}$ i desenvolupen una expressió semi-quantitativa per al límit de detecció:

$$L_{D,k} = L_{C,k} \times \frac{1 + \sqrt{\left(\frac{k_{\beta}}{k_{\alpha}}\right)^2 \left[1 + (k_{\alpha}^2 - k_{\beta}^2)\omega_k\right]}}{1 - k_{\beta}^2 \omega_k} \quad (2.43)$$

amb

$$\omega_k = \sum_{i=1}^I (C_{k,i}^+)^2 \left\{ \text{var}(C_{k,i}) + \sum_{j=1}^J (S_{k,j}^+)^2 [\text{var}(R_{j,i}) + \text{var}(B_{j,i})] \right\} \quad (2.44)$$

Si hom assumeix que $k_\beta^2 \omega_k \gg 1$, l'eq. (2.43) esdevé:

$$L_{D,k} = L_{C,k} \left(1 + \frac{z}{k_\alpha} \right) = (k_\alpha + k_\beta) \sigma_{0,k} \quad (2.45)$$

Aquesta darrera expressió indica que, si la contribució de l'analit d'interès a $\sigma_{A,k}$ és negligible, pot obtenir-se una bona estimació del límit de detecció mesurant només blancs, és a dir, mostres sense contingut d'analit.

2.4. Aproximacions basades en els perfils cromatogràfics d'espècies que coelueixen

Les tècniques cromatogràfiques, degut a les seves característiques peculiars, tenen certament un tractament diferent pel que fa a l'avaluació dels seus paràmetres de qualitat en calibració multivariant. Un dels problemes que poden plantejar-se és la identificació i quantificació d'analits, els pics cromatogràfics dels quals apareguin solapats per constituents majoritaris presents en la mostra. Kvalheim i Liang [21,22] van desenvolupar un mètode, HELP (*Heuristic Evolving Latent Projections*), per resoldre aquesta situació en el cas de disposar d'instruments de segon ordre, capaços de generar una matriu de dades, X, per cada mostra, com és el cas de l'acoblament HPLC-DAD (*Cromatografia Líquida d'Alta Resolució amb detector de Diodes en Fila*). Les dades generades per aquest instrument, tal com mostra la Fig. 2.2, es poden veure, de manera equivalent, com un conjunt de

cromatogrames, cadascun d'ells enregistrat a una longitud d'ona, o com un conjunt d'espectres que canvien amb el temps.

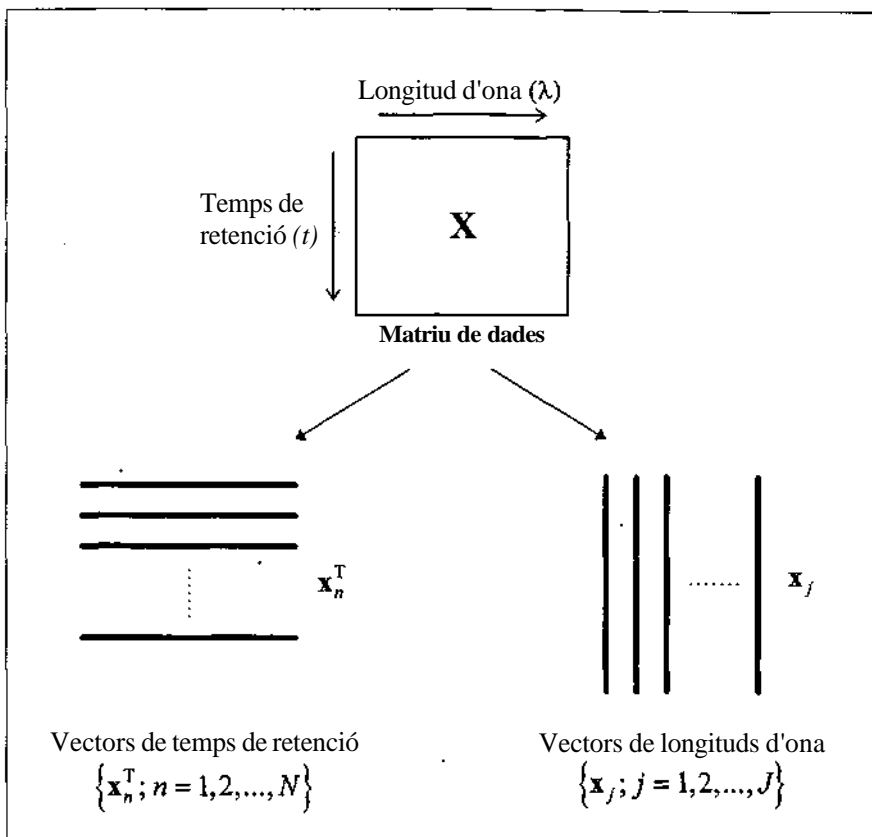


Fig. 2.2. Matriu original X , obtinguda a partir de l'enregistrament de les intensitats de l'espectre complet durant l'elució cromatogràfica. La matriu X pot dividir-se en vectors de 2 maneres diferents: (1) vectors de temps de retenció, \mathbf{x}_n^T , cadascun d'ells corresponent a l'espectre de l'analít que elueix al temps de retenció n , i (2) vectors de longituds d'ona, \mathbf{x}_j , cadascun d'ells corresponent a un perfil cromatogràfic per cada longitud d'ona j .

El més important, però, d'aquesta matriu de dades, $X(N \times J)$, és que pot escriure's com el producte de dues matrius: una matriu de concentracions $C(N \times A)$ i una matriu d'espectres $S^T(A \times J)$, de manera que $X = CS^T + E$, on N és el nombre de temps de retenció, J és el nombre de longituds d'ona espectrals i A és el rang químic de la matriu X , és a dir, el nombre d'espècies químiques del sistema

multicomponent. La matriu $\mathbf{E}(N \times J)$ conté soroll instrumental i experimental. La matriu \mathbf{C} està composta per A vectors columna que contenen els perfils de cadascun dels constituents purs. De manera similar, la matriu \mathbf{S}^T consisteix en A vectors fila corresponents als espectres de cadascun dels constituents purs.

El problema que s'ha de resoldre, doncs, és el càlcul del rang químic, A , de la matriu de dades (o d'una part d'aquesta matriu). Això es duu a terme descomposant la matriu \mathbf{X} a partir de l'anàlisi de components principals (PCA), segons:

$$\mathbf{X} = \sum_{a=1}^A \mathbf{u}_a e_a \mathbf{v}_a^T + \mathbf{E} \quad (2.46)$$

on \mathbf{u}_a i \mathbf{v}_a són els vectors de les puntuacions (*scores*) i dels coeficients (*loadings*), respectivament, i els escalars e_a són els valors propis. El següent pas consisteix en separar la informació (variància) deguda als constituents presents en petita proporció de la informació deguda als errors experimentals o instrumentals. En termes matemàtics, això correspon a la determinació del valor propi límit, e_a , que separa les contribucions d'una espècie química i del soroll, respectivament. La millor manera d'aconseguir aquest objectiu, en el cas de treballar amb tècniques cromatogràfiques, és disposar del que s'anomenen *regions de constituent zero* (RCZ), definides com les regions on no elueix cap espècie química present a la mostra. Aquestes zones, on la matriu \mathbf{X} té rang químic zero, poden ser utilitzades per a establir un criteri de separació entre els factors deguts al soroll i els factors deguts a les espècies minoritàries. El primer valor propi d'una regió de constituent zero, $e_1(\text{RCZ})$, és indicatiu del soroll real de les dades. A continuació, aquest valor propi es compara amb els diferents valors propis, e_j , obtinguts a partir de l'anàlisi factorial de les regions locals d'interès (RL) del cromatograma, mitjançant un test- F . D'aquesta manera, s'obté una relació $e_i^2(\text{RL})/e_1^2(\text{RCZ})$ que es compara amb

un valor F tabulat al nivell de significació, α , escollit. Els graus de llibertat del test s'obtenen multiplicant el nombre de temps de retenció pel nombre de longituds d'ona escollides per la regió local i la regió de constituent zero, respectivament. El valor crític de F dependrà de la grandària de la zona (o finestra) utilitzada per calcular els valors propis tant en la regió de constituent zero com en la regió local d'interès. Es recomana que ambdues grandàries siguin semblants i és per aquest motiu que no poden ser massa grans, ja que d'altra manera s'abraçarien regions locals massa grans, amb pèrdua d'informació valuosa degut a la presència de diverses espècies coelutants. El procediment desenvolupat queda reflectit en la Fig. 2.3.

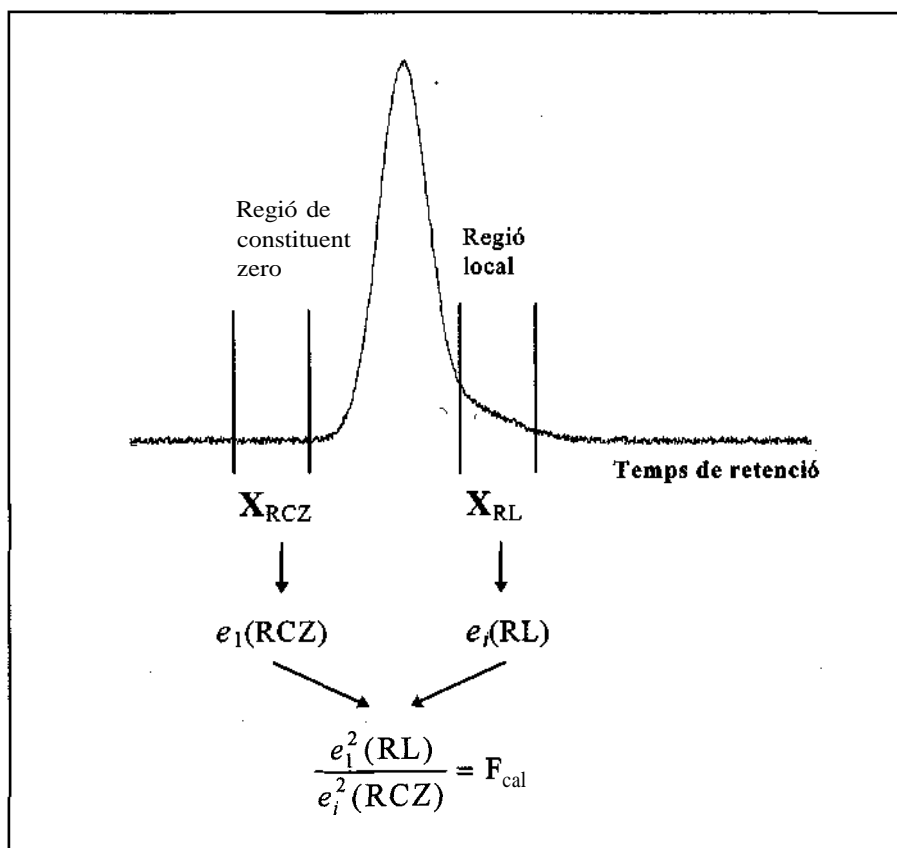


Fig. 2.3. Mètode de Kvalheim per avaluar la presència d'un constituent minoritari en una elució cromatogràfica.

El límit de detecció s'estableix, doncs, com el valor crític $\sqrt{F_{\text{tab}}} e_1$. Això vol dir que el rang químic de la regió del cromatograma examinada és igual al nombre de valors propis que sobrepassin aquest valor. En el cas d'un constituent minoritari de la mostra, voldrà dir que podrà ser detectat sempre que el seu *senyal analític net*, definit per Lorber segons l'eq. (2.25) i calculat en la regió local d'interès, sigui major que aquest valor crític. Estrictament parlant, aquest nivell crític no es pot considerar un límit de detecció pròpiament dit, sinó més aviat un límit de decisió a partir del qual podem establir si un analit es present a la mostra o no. La probabilitat de cometre un error de 2a espècie no es veu contemplada. Una altra limitació d'aquesta metodologia és que, depenent de la grandària de la regió de constituent zero, el valor $e_1(\text{RCZ})$ i, per tant, el límit de detecció, poden variar.

Posteriorment, Liang *et al.* [23], reprenent l'estudi descrit prèviament, van tornar a definir el concepte de límit de detecció multivariant i van proporcionar una metodologia per al seu càlcul en cas de disposar de dades generades per instruments de segon ordre, com ara l'acoblament HPLC-DAD. La base del seu treball radica precisament en una de les limitacions de l'aproximació anterior, com és el fet que el nivell de soroll pot variar depenent de la zona del cromatograma en que estem treballant. Per tant, agafar una zona o una altra, així com la seva grandària, $N \times M$ (nombre de temps de retenció per nombre d'espectres), pot influir en el criteri de detecció final.

Els autors plantegen una aproximació no paramètrica on fan ús de totes les possibles combinacions dels M espectres agafats en els N temps de retenció de la regió de constituent zero inicial. El nombre total de combinacions ve donat per l'expressió:

$$C_N^M = \frac{N!}{M!(N-M)!} \quad (2.47)$$

Suposant una regió inicial de 10 temps de retenció les possibles combinacions, prenent zones de 2, 3 i 4 espectres en cada cas, serien 45, 120 i 210, respectivament. Per cadascuna d'aquestes combinacions s'obté un valor propi e . Si s'ordenen tots els valors propis en intervals de freqüència s'obté una distribució en forma d'histograma, que pot ser aproximadament normal en funció del nombre d'espectres escollit. A partir d'aquesta distribució, hom pot calcular el límit de detecció en funció de les probabilitats que es triïn de cometre falsos positius i falsos negatius

Els autors demostren l'aplicabilitat d'aquesta metodologia en tècniques com els acoblaments HPLC-DAD o GC-MS (*Cromatografia de Gasos-Espectrometria de Masses*). En el cas de no disposar de dades de segon ordre, com el cas de la cromatografia de gasos amb un detector d'ionització de flama clàssic, hom ha de disposar d'una sèrie de mostres amb els mateixos constituents, però en diferents concentracions, per tal de poder fer les combinacions i obtenir la distribució dels valors propis. En aquest cas, les mostres juguen el paper dels espectres quan es disposa de dades de segon ordre.

Aquesta metodologia de càlcul dels límits de detecció té en compte tres factors importants: (1) l'error aleatori en les mesures, (2) la naturalesa multivariant del límit de detecció per a un analit en concret (degut a la influència dels senyals dels altres analit que coelueixen amb ell) i (3) la influència del mètode analític utilitzat per resoldre les mescleres que coelueixen. En base a aquestes consideracions, els autors suggereixen una modificació de la definició de límit de detecció de la IUPAC. Per Liang *et al.* [23], *el límit de detecció d'una espècie química, que coexisteix amb altres espècies en una mostra, és el mínim senyal net que es*

necessita per tal de diferenciar-lo amb confiança del senyal d'un blanc analític. Aquesta definició és important des del punt de vista que és la primera en adaptar-se a la naturalesa multivariant de les dades.

Pel que fa a les limitacions de la metodologia, caldria esmentar que és aplicable únicament en tècniques que disposen de regions on la concentració de l'analít en estudi és zero. L'exemple més clar són les tècniques cromatogràfiques. Aquestes regions juguen el paper de blancs analítics repetits successivament i sembla clar, doncs, que la disposició en els laboratoris d'anàlisi d'aquest tipus de mostres malauradament no sempre és possible.

2.5. Aproximacions basades en la reducció de la matriu de dades original a una dimensió

Dins el grup dels mètodes de regressió multivariants estan aquells en què la matriu multidimensional de dades original pot transformar-se i reduir-se a una dimensió. A partir d'aquest moment, seran aplicables totes les aproximacions conegudes de l'anàlisi univariant per calcular els límits de detecció i altres paràmetres de qualitat. Delaney [24] va proposar aquesta filosofia de treball per a obtenir els límits de detecció d'una metodologia analítica basada en l'acoblament GC-MS-SIM (Cromatografia de Gasos - Espectrometria de Masses amb Monitorització d'Ions Seleccionats).

En aquest tipus de tècnica, només es monitoritzen una sèrie de canals de massa per unitat de temps i no tot l'espectre de masses sencer. Les masses es seleccionen en base als ions més abundants dels analítics en estudi i es monitoritzen en uns intervals de temps coincidents amb els temps on apareixen els màxims dels pics que

elueixen. En un típic anàlisi per GC-MS-SIM, les dades obtingudes amb l'ió primari s'utilitzen per quantificar, a partir d'una corba de calibratge que relaciona la resposta instrumental (àrea de pic per l'ió primari) amb la concentració de Panalit problema en l'estàndard de calibració. Les dades obtingudes amb els altres ions monitoritzats es fan servir per confirmar la identificació de l'analit problema i per protegir el mètode de quantificacions poc acurades, causades per la presència d'interferències químiques (coelució).

És possible, però, utilitzar totes les dades obtingudes amb fins quantitius. Si per a cada estàndard de calibració es disposa de les àrees de pic per als diferents ions monitoritzats, es pot constituir una matriu de respostes multidimensional. Posteriorment, aquesta matriu pot ser sotmesa a l'anàlisi de components principals (PCA) per tal d'extreure'n una única resposta composta que contingui la mateixa informació inicial. Delaney demostra en el seu treball que el primer component principal conté, en tots els casos, més d'un 99% de la variància total de les dades. A partir d'aquí, obté corbes de calibratge representant els *scores* d'aquest primer component principal *vs.* les concentracions d'analit en els estàndards de calibració. El procediment complet, més detallat, està descrit a la introducció del Capítol 3. El problema de l'establiment del límit de detecció es redueix d'aquesta manera al camp univariant. Delaney aplica la metodologia desenvolupada per Hubaux i Vos [25] per al càlcul d'aquest paràmetre, encara que no entra gaire a fons en els conceptes d'errors de la 1a i 2a espècie. També diferencia entre *límits de detecció instrumentals* (obtinguts a partir dels estàndards purs) i *límits de detecció del mètode* (calculats a partir de l'anàlisi de mostres addicionades amb l'analit en estudi). Tot i que fa una reflexió breu sobre la importància dels blancs i els nivells d'addició de les mostres, Delaney en el seu treball no planteja un estudi a fons de la influència dels diversos paràmetres que poden afectar els valors del límit de detecció.

L'aproximació incorpora a més una restricció important, i és que només és aplicable en el cas de disposar de dades amb una gran especificitat. Aquesta especificitat és perfectament assolible en una tècnica com GC-MS-SIM, ja que es pot escollir un ió representatiu per a cada analit en estudi. En el cas, però, de tècniques amb presència de pics solapats o, en general, de substàncies interferents, l'aplicabilitat de la metodologia descrita es veuria limitada, ja que amb tota seguretat el primer component principal calculat no contindria un percentatge tan elevat de la variància total de les dades.

En un treball posterior, Singh [26] amplia el treball dut a terme per Delaney i presenta una metodologia per a calcular límits de decisió i detecció en mètodes que utilitzen l'acoblament GC-MS. La base teòrica és la mateixa que la plantejada per Delaney en el seu treball previ. Si el primer component principal, obtingut de la descomposició de la matriu de dades original, explica un elevat percentatge de la variància, es pot utilitzar per expressar la resposta instrumental multidimensional com una resposta composta unidimensional. Singh, però, incorpora un molt més profund estudi del concepte de detecció, incloent-hi els errors de la 1a i 2a espècie. A més a més, utilitza dues aproximacions univariants: la de Currie [27] i la d'Hubaux i Vos [25], per calcular els límits de detecció.

La novetat més important del treball de Singh radica en què, sobre la base de que les respostes compostes obtingudes poden transformar-se de nou en les originals, mitjançant la seva multiplicació pels components principals corresponents, de la mateixa manera es pot fer amb els límits de detecció calculats en l'espai de respostes. La resposta de tots els estàndards de calibració per a un ió monitoritzat j pot expressar-se com:

$$\mathbf{r}_j = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a p_{ja} \quad (2.48)$$

on A indica el nombre components principals necessaris per reproduir la matriu de dades original, \mathbf{t}_{ja} és el vector de les puntuacions (*scores*) dels estàndards de calibració sobre el component principal a i p_{ja} és el coeficient (*loading*) de la variable resposta de l'ió j sobre el component principal a . Si el primer component principal explica un elevat percentatge de la variància total, \mathbf{r}_j pot expressar-se molt aproximadament com $\mathbf{r}_j = \mathbf{t}_j p_{j1}$. Si hom obté d'aquesta manera les diferents respostes ($\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_J$), llavors poden calcular-se els diferents límits de detecció en l'espai de respostes original, $\mathbf{L}_D(L_{D1}, L_{D2}, \dots, L_{DJ})$. Aquests límits estan definits, com s'ha esmentat, en l'espai de respostes. Per obtenir els corresponents límits en el domini de les concentracions, hom ha de recórrer al model de calibració.

Per tal de confirmar la presència d'un determinat analit en la mostra, aquest vector \mathbf{L}_D ha de caure dins una regió d'identificació predefinida, I , J -dimensional. Finalment, quan s'enregistra la resposta d'una mostra desconeguda, $\mathbf{r}(r_1, r_2, \dots, r_J)$, i aquesta resposta cau dins de la regió d'identificació I , llavors, si es compleix la condició $r_j > L_{Dj}$ per tots els ions monitoritzats ($j = 1, 2, \dots, J$), la resposta enregistrada és significativament diferent del blanc amb probabilitats α i β (3 d'error prefixades). Aquesta metodologia va, doncs, més enllà de la proposada per Delaney, la qual només establí un límit de detecció fix pel mètode, basat en unes dades de calibració concretes. En aquest cas, però, s'estableix també si la resposta obtinguda per a una mostra desconeguda és indicativa de la presència d'analit o no. Aquest concepte d'identificació multivariant ja havia estat discutit pel propi Currie [28].

Les limitacions de l'aproximació de Singh no deixen de ser les mateixes que hem esmentat anteriorment; és aplicable a tècniques on la reducció de la matriu de respostes original suposi que el primer component principal expliqui un percentatge molt elevat de la variància total. D'altra manera, es necessitaria més

d'un component principal i s'hauria de recórrer a models de calibració multivariants, on no serien aplicables les aproximacions univariants clàssiques de càlcul dels límits de detecció.

2.6. Altres aproximacions

Val la pena mencionar en aquest apartat una aproximació proposada per Garner i Robertson [29] que no ha estat tractada prèviament degut al fet que no va arribar a desenvolupar-se. Els autors proposen la tècnica de l'*anàlisi discriminant* [30] com una alternativa vàlida al problema de la detecció. Suggereixen que, en el cas de disposar de molts blancs analítics, la distància de Mahalanobis podria utilitzar-se per determinar si una resposta desconeguda és significativament diferent del núvol (*cluster*) multidimensional de respostes del blanc. La distància de Mahalanobis d'una resposta multivariant respecte el núvol de respostes del blanc s'expressaria com:

$$d_i = (\mathbf{r}_i - \bar{\mathbf{r}}_B)^T (\mathbf{R}_B^T \mathbf{R}_B)^{-1} (\mathbf{r}_i - \bar{\mathbf{r}}_B) \quad (2.49)$$

on \mathbf{r}_i és la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{R}_B és la matriu de respostes del blanc i $\bar{\mathbf{r}}_B$ és el vector de les mitjanes de les respostes del blanc per a cada sensor, és a dir, el centroid del núvol de respostes del blanc. Podria establir-se, doncs, un *límit de decisió* basat en aquesta distància, que permetria decidir si una resposta mesurada és significativament diferent de la resposta del blanc.

Un cop s'ha decidit que la resposta és significativament diferent del blanc, hauria d'establir-se un *límit d'identificació* per a Panalit en concret, basat en els intervals

de predicció del model de calibració. Si la resposta desconeguda cau dins d'aquest límit d'identificació es pot concloure amb seguretat que l'analit es troba present a la mostra. Finalment, els autors suggereixen que el *límit de detecció* hauria de ser la concentració vertadera que donés lloc a respostes multivariants per damunt del límit de decisió i dins del límit d'identificació.

La proposta és interessant, ja que planteja, implícitament, el problema de les dues hipòtesis (nul·la i alternativa) en la detecció. A més, basa el criteri de la identificació d'un analit en funció dels intervals de confiança de predicció del model de calibració multivariant. Una aproximació que té aquestes característiques es presenta en el Capítol 5.

Després de tot el treball de revisió científica sobre l'estat de la qüestió, es pot concloure que, tot i que les aproximacions per al càlcul dels límits de detecció en la calibració multivariant no són gaire nombroses, sí són ben diverses i amb aplicació a tècniques analítiques ben dispars. A mode de resum, pot dir-se que algunes d'elles estan mancades d'un tractament estadístic de la detecció més profund, ja que les probabilitats de cometre errors de 2a espècie no es contemplen. En altres casos no es tenen en compte totes les fonts d'error associades al procediment analític i que poden afectar en gran mesura al valor numèric dels límits de detecció. Finalment, l'usuari ha de ser molt conscient de quina metodologia vol adoptar a l'hora de calcular aquest paràmetre de qualitat. La selecció ha de dur-se a terme en funció de la tècnica analítica que hom utilitzi i del tipus de mostra que s'estigui analitzant, ja que tots dos són factors essencials en l'establiment dels límits de detecció.

2.7. Referències

1. K.R. Beebe; B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1007A.
2. H. Martens; T. Naes, *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester, 1989.
3. W.H. Press; B.P. Flannery; S.A. Teukolsky; W.T. Vetterling. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, New York, 1989. Pàg. 52-64.
4. K. Faber; B.R. Kowalski, *comunicació personal*.
5. B.R. Kowalski; M.B. Seasholtz, *J. Chemom.*, 5 (1991) 129.
6. A. Lorber; L.E. Wangen; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 1 (1987) 19.
7. D.M. Haaland; E.V. Thomas, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1193.
8. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167.
9. K.S. Booksh; B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 782A.
10. K. Faber; A. Lorber; B.R. Kowalski. VI Chemometrics in Analytical Chemistry Conference Abstracts Book (OC-18). Tarragona (Espanya). 1996.
11. A. Lorber; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 67.
12. IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, 45 (1976) 99.
13. A. Lorber; A. Hard; Z. Goldbart; I.B. Brenner, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1260.
14. A. Lorber; K. Faber; B.R. Kowalski, VI Chemometrics in Analytical Chemistry Conference Abstracts Book (OC-16). Tarragona (Espanya). 1996.
15. A. Lorber; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 93.
16. R. Boque; F.X. Rius, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 32 (1996) 11.
17. G. Bauer; W. Wegscheider; H.M. Ortner, *Fres. J. Anal. Chem.*, 340 (1991) 135.
18. G. Bauer; W. Wegscheider; H.M. Ortner, *Spectrochim. Acta*, 46B (1991) 1185.
19. G. Bauer; W. Wegscheider; H.M. Ortner, *Spectrochim. Acta*, 47B (1992) 179.
20. K. Faber; B.R. Kowalski, *Fresenius J. Anal. Chem.*, enviat per a publicació.
21. O.M. Kvalheim; Y.-z. Liang, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 936.
22. Y.-z. Liang; O.M. Kvalheim; H.R. Keller; D.L. Massart; P. Kiechle; F. Erni, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 946.
23. Y.-z. Liang; O.M. Kvalheim; A. Höskuldsson, *J. Chemom.*, 1 (1993) 277.
24. M.F. Delaney, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 3 (1988) 45.
25. A. Hubaux; G. Vos, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 849.
26. A. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 277 (1993) 205. A. Singh; F.C. Garner, *Ibid*, 281 (1993) 686.

27. L.A. Currie, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 586.
28. L.A. Currie, *Detection in Analytical Chemistry. Importance, Theory and Practice*. ACS Symposium Series 361. ACS, Washington, 1988. Pàg. 1-62.
29. F.C. Garner; G.L. Robertson, *Anal. Chim. Acta*, 3 (1988) 53.
30. D.L. Massart; B.G.M. Vandeginste; S.N. Deming; Y. Michotte; L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, Chap. 23, Elsevier, Amsterdam, 1988.

Multivariate detection limits estimators. A review

R. BOQUE *, F.X. RIUS

Departament de Química. Universitat Rovira i Virgili.

Pl. Imperial Tàrraco, 1, 43005 Tarragona. SPAIN

ABSTRACT

The theoretical development of the concept of detection limit in multicomponent systems has only begun very recently and its practical applications are limited to a few specific techniques such as emission spectrometry (ICP-OES) or high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). This paper critically reviews the theoretical approaches advanced up to the present, describes the hypotheses and theoretical backgrounds on which they are based and discusses the advantages and limitations of the different techniques and derived estimators. The connection with the derivation of the detection limits based on the $\text{var}(c_{un})$ variance associated to the predicted response of an individual observation in regression theory is introduced and finally, some suggestions as to potential areas of interest for future development are envisaged.

1. Introduction

Measuring the capacity of an analytical method to detect the presence/absence of analytes and quantifying, with a known probability of error, the minimum concentration of these analytes is one of the challenges for method validation. Currie [1] and Hubaux and Vos [2] are relevant members of a group of pioneers who established the basic concepts of detection limits in univariate calibration. More than 500 studies published in this field have been subject to numerous scientific revisions [3,4], but there is still space for improvement [5,6]. Garner has discussed the state-of-the-art in this field [7] and Clayton *et al.* [8] have published a paper that, in our opinion, constitutes one of the most statistically rigorous contributions to the field of detection limits univariate calibration. Very recently a computer program has been published which allows users to calculate the limits and characteristic curves of detection in accordance with Clayton's approach [9].

The increasing application of multivariate calibration methods in the analysis of multicomponent systems [4,10-12] has obliged the development of the concepts of detection to be considered, alongside other performance characteristics, in multivariate regression.

The various techniques of multivariate data analysis in existence and the differences in the models used within each technique have caused different approaches to be developed for multivariate detection limits. In one of the first, Lorber defines and uses the important concept of net analytical signal [13] in the definition of multivariate detection limit. Subsequently the definition is extended, until a general expression for prediction error is reached which allows a new concept to be established and a new detection limit estimator to be defined [14]. Bauer *et al.*, [15] suggest deducing the estimator of this figure of merit by applying

the technique of error propagation to the multivariate prediction model. More recently, and in the field of HPLC-DAD, Kvalheim *et al.* [16,17] applied a derivation of the Heuristic Evolving Latent Projections (HELP) method to establish the detection limit of the species present in the signal domain by comparing the total signal from the regions of eluting species and the zero component region (the part of the chromatogram with no chemical components eluting) as a zone for deducing the analytical blank. Finally, and in the field of GC-MS-SIM, Delaney [18] and Singh [19] applied the PCA technique to the responses obtained for the different values of m/z and a subsequent linear regression of the first principal component. In the last case the problem was reduced to a univariate calibration and the detection limit is calculated by applying the approaches of Currie [1] and Hubaux-Vos [2].

It should be pointed out that, like univariate calibration terms [6], conceptual differences do exist in the bibliography which affect the terms *limit of decision*, *limit of detection* and *limit of determination*. Often, the former is used to indicate the lowest instrumental response that is needed to verify the presence of analyte. Therefore, it is defined in the signal domain, unlike the limit of detection and limit of determination which are defined in the concentration domain. The limit of detection is used when only the *k*th constituent is present in the sample while the limit of determination is affected by the concentration not only of the *k*th constituent but also of the other sample constituents as well [20]. However, due to the diversity of factors affecting these two concepts in multivariate calibration, a terminological agreement is far from being reached. Researchers are advised to clearly specify in which domain they are defining their limits, as well as whether the single *k*th analyte or the analyte with the corresponding interferences has to be considered.

This paper reviews the theoretical approaches advanced up to the present, describes the hypothesis on which they are based and discusses the advantages and limitations of the different techniques and derived estimators. At the same time, it introduces the links between the latter estimators and the derivation of the determination limit concept based on the well known variance, $\text{var}(c_{\text{un}})$, associated to the predicted response of a multivariate regression model. Finally, there are some suggestions as to possible areas of interest for future development.

2. Notation and Calibration Models

Boldface capital letters are used for matrices, e.g. \mathbf{R} , with the superscript T for transposed matrices, e.g. \mathbf{R}^T . The unity matrix is designated by \mathbf{I} . Boldface small characters for column vectors, e.g. \mathbf{c} and \mathbf{c}_k , with the superscript T for row vectors, e.g. \mathbf{r}^T , and small italics characters for scalars, e.g. c_k . Superscript + denotes the pseudoinverse of a matrix, e.g. \mathbf{R}^+ . The pseudoinverse is used to solve a system of linear equations and differs from the inverse in that nonsquare and singular matrices may be solved. $\|\bullet\|$ designates the Euclidian norm of a vector, defined as the square root of the sum of the squared elements of the vector. The character 5 followed by a letter represents the corresponding error matrix, error vector or error scalar. The subscript 'un' refers to any matrix, vector or scalar that will be calculated in the prediction step according to a previously established model, e.g. c_{un} . The letters 'var' are used to denote the variance of any term, e.g. $\text{var}(c)$. a is used to designate the standard deviation of any quantity and s to designate the estimator of a .

Two basic models of multivariate calibration are considered. In the *classic* (direct) or *linear additive model*, all of the J responses which are obtained for the /

samples are a linear function of the concentrations of the K analytes present in the samples according to the equation:

$$r_j = \sum_{k=1}^K c_k s_{j,k} + b_j \quad (1)$$

where r_j is the measured response of the sample in the j th sensor, c_k is the concentration of the k th analyte in the sample, $s_{j,k}$ is the partial sensitivity of the k th analyte in the j th sensor and b_j is the background contribution. If the variables are scaled or if the term b_j is included as a vector of ones in the sensitivity matrix, the model can be expressed in matrix notation as: $\mathbf{r}^T = \mathbf{c}^T \mathbf{S}$ where \mathbf{r}^T is a $(1 \times J)$ sized vector, \mathbf{c}^T a $(1 \times K)$ sized vector and \mathbf{S} a $(K \times J)$ sized matrix. Even more generally, for a set of J samples: $\mathbf{R} = \mathbf{C}\mathbf{S}$.

In the calibration stage the matrix of sensitivities \mathbf{S} must be found from the model $\mathbf{R} = \mathbf{C}\mathbf{S}$, where \mathbf{R} is the matrix of instrumental responses corresponding to the calibration standards and \mathbf{C} is the matrix of known concentrations of all K constituents in the calibration set. The matrix of sensitivities is calculated from: $\mathbf{S} = \mathbf{C}^+ \mathbf{R}$.

In the prediction stage, the concentrations of the analytes in the unknown samples are obtained from the expressions: $\mathbf{c}_{\text{un}}^T = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{S}^+ = \mathbf{r}_{\text{un}}^T (\mathbf{C}^+ \mathbf{R})^+$.

Another way to represent the linear additive model is $\mathbf{r} = \mathbf{S}\mathbf{c}$. Using this formulation, the matrix of sensitivities, \mathbf{S} , is found in the calibration step as $\mathbf{S} = \mathbf{R}\mathbf{C}_0^{-1}$, where \mathbf{R} is the usual matrix of responses corresponding to the set of calibration standards and \mathbf{C}_0 is a diagonal matrix whose elements, c_k^0 , are the concentrations that correspond to the k th pure components of the calibration set.

The unknown concentrations of the new samples are obtained as $\mathbf{c}_{\text{un}} = \mathbf{S}^+ \mathbf{r}_{\text{un}} = \mathbf{C} \mathbf{R}^+ \mathbf{r}_{\text{un}}$.

In the *inverse calibration model*, all of the concentrations corresponding to the K analytes present in the J samples are a linear function of the measured responses which are obtained at the various J sensors, according to the equation: $\mathbf{C} = \mathbf{R}\mathbf{S}$, or, in terms of vectors, $\mathbf{c} = \mathbf{R}\mathbf{s}$. In the calibration stage the \mathbf{S} matrix or \mathbf{s} vector must again be found from the calibration set which is now expressed as: $\mathbf{S} = \mathbf{R}^+ \mathbf{C}$, or $\mathbf{s} = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}$, where \mathbf{R}^+ is the calculated pseudoinverse of the matrix of experimental responses obtained from the calibration standards and \mathbf{C} is the concentration matrix (or \mathbf{c} the concentration vector) of analytes present in the calibration set. In the prediction stage, the concentrations of the analytes in the unknown samples are calculated from the expressions: $\mathbf{c}_{\text{un}}^T = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{S} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{C}$.

It should be pointed out that, in this final case, to be able to predict the value of the concentration of a k th analyte in an unknown sample, $c_{\text{un},k} = \mathbf{r}_{\text{un},k}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$, only the vector of concentrations for the k th analyte, \mathbf{c}_k , is needed for all the calibration samples as well as the easily obtainable pseudoinverse of the matrix of instrumental responses. This calibration model is also called *indirect* or *partial*. If the \mathbf{R} matrix is determined from K pure standards, then $c_{\text{un},k} = \mathbf{r}_{\text{un},k}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_{0,k}$, where $c_{0,k}$ is the concentration of the k th analyte in the calibration standard. In the classical calibration model, the experimental demands are much stricter since $\mathbf{S}^+ = (\mathbf{C}^+ \mathbf{R})^+$ must be known, that is to say, the concentration of all the analytes in all the calibration samples as well as the instrumental responses. Lorber and Kowalski have elegantly shown the conceptual similarity of the prediction processes in both models [14].

3. Multivariate determination limit approaches

3.1. Net analytical signal approach

The first sound formulation of limit of determination in multicomponent systems was put forward by Lorber [13] for the linear additive model $r = Sc$. The formal solution of this model is $c_{un} = S^+ r_{un}$. If the errors in both calibration and quantitation steps into account are taken, this equation becomes

$$(c_{un} + \delta c_{un}) = (S + \delta S)^+ (r_{un} + \delta r_{un}) \quad (2)$$

δc_{un} is a non-linear function of the errors in the sensitivity matrix and the measured responses, and so it is not easily calculated. To solve the problem, Lorber defines the concept of the *net analytical signal* of a component, as the part of its spectrum which is orthogonal to the spectra of the other components present in the calibration standards. So his approach takes into account the net contribution of each component to the instrumental response. Therefore, error is related not to the global measured response but to each net contribution. By using this important concept a whole series of performance characteristics, including the limit of determination, can be calculated.

This first multivariate definition does not formally break away from the formulation established in univariate calibration in which the limit of detection is defined as the concentration which corresponds to three times the signal to noise ratio [5]. However, so as not to only take into account the error in the measured response, but also the errors in the calibration standard responses, the multivariate determination limit, $(LOD)_k$, is defined as the analyte concentration which corresponds to three times the total relative deviation, $\delta c_{total}/c_k$:

$$(\text{LOD})_k = c_k^0 / \left[\frac{\|\mathbf{r}_k^*\|}{3\varepsilon_r} - 1 \right] \quad (3)$$

Here c_k^0 is the concentration of the pure calibration standard k , \mathbf{r}_k is the part of the response vector \mathbf{r}_k , corresponding to the k th constituent in the calibration matrix, which is free of covariation with the other components, i.e. its net analytical signal. \mathbf{r}_k^* is calculated according to $\mathbf{r}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k \mathbf{R}_k^+) \mathbf{r}_k$, where \mathbf{R}_k is the $(J \times (K-1))$ matrix corresponding to the pure components of the calibration set except the k th component. ε_r is the error in the measured responses of the unknown sample and may be computed, when the number of sensors J is greater than the number of analytes K , as:

$$\varepsilon_r = \left[\frac{\mathbf{r}_{\text{un}}^T (\mathbf{I} - \mathbf{R} \mathbf{R}^+) \mathbf{r}_{\text{un}}}{(J - K)} \right]^{1/2} \quad (4)$$

This formulation of LOD has two fundamental merits: it is the first one and, therefore, opens the way for calculating this figure of merit in multivariate calibration and it introduces the important theoretical concept of net analytical signal. However, in terms of practical application, the proposed expression is of limited use because the classical (linear additive) model requires the knowledge of the concentrations of all analytes and interferences that are present in the calibration samples or the spectra of all pure components in the calibration set. The authors have applied the derived equations of limit of determination and other figures of merit to UV absorbance data. Other applications of the approach include the characterization of a series of chemical piezoelectric sensor arrays [21].

3.2. Extension to inverse calibration models

Lorber *et al.* [20] make ostensible progress in this area when they put forward an expression for the limit of determination of the inverse calibration model in which the unknown concentration of an analyte k in a sample is given by the expression $c_{un,k} = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$. This model can be much more widely applied than the classical model.

If the relative error in calibration is equal to the relative error in prediction, i.e. $\varepsilon_{un} / \|\mathbf{r}_{un}\| = \varepsilon_{un} / \|\mathbf{r}_k^{(pure)}\|$, the new estimator of the limit of determination is given by the expression:

$$(\text{LOD})_k = \frac{3 \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_{un}\|}{\|\mathbf{r}_{un}\| / \varepsilon_{un} - 3 / \zeta_k} \quad (5)$$

Here \mathbf{c}_k is the vector of concentrations of the k th analyte in the calibration set and ε_{un} is the error in the measured responses of the unknown sample, calculated as the residuals between the measured and fitted values. The *selectivity term* ζ_k measures the degree of overlap of the k th constituent with the other constituents used in the calibration. For the pure k th constituent of the k th constituent in the calibration set and $\mathbf{r}_k^{(pure)}$ is the pure spectra the selectivity is computed as $\zeta_k = c_{0,k} / (\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_k^{(pure)}\|)$, where $c_{0,k}$ is the concentration of the k th constituent.

If there is no error in the calibration step, Eq (5) has the same form as the classical univariate determination limits:

$$(\text{LOD})_k = 3 \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \varepsilon_{un} \quad (6)$$

where $\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|$ is the inverse of the instrumental sensitivity.

Now the net analytical signal is much easier to compute since it is expressed as a function of the response of the unknown sample, of the inverse of the matrix of responses corresponding to the calibration set and of the vector of concentrations of the k th analyte in the calibration standards:

$$r_k^{(\text{net})} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k / \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \quad (7)$$

$$r_k^{(\text{net})} = c_{\text{un},k} / \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \quad (8)$$

This method, which is relatively simple to put into practice, still follows the conventional derivation which is based on considering the limit starting from the analyte concentration equal to three times the precision of the concentration. Now, there has to be a priori assessment of the contribution of the background noise and interfering substances. There is, however, an intrinsic problem in the method: the presence in the unknown samples of any interference that has not been modelled in the calibration stage. This interference causes a decrease in the selectivity values and sensitivity of the analyte, with a consequent degrading of the limit of determination. So in these cases, the calculation is feasible but its application to real problems is limited.

The authors have applied this definition to the analysis of geological standard reference materials by ICP-AES [20], showing its effectiveness in the presence of various interfering substances.

3.3. Confidence interval of the predicted concentration approach

A conceptually different strategy has been put forward by Lorber and Kowalski [14]. The concept of net analytical signal is no longer necessary since they deduce a limit of determination from the calculation of the error in the concentration for a general multivariate calibration model.

Assuming the inverse calibration model, which for a scalar is given by $c_{un} = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}$, where there is a linear additivity in the responses, and taking into account the experimental errors associated to the calibration and quantitation steps, they obtain an expression of the sort:

$$c_{un} + \delta c_{un} = (\mathbf{r}_{un} + \delta \mathbf{r}_{un})^T (\mathbf{R} + \delta \mathbf{R})^+ (\mathbf{C} + \delta \mathbf{C}) \quad (9)$$

in which c_{un} , \mathbf{r}_{un} , \mathbf{R} and \mathbf{c} now represent the true (not the measured) values of the unknown concentration and response, the calibration data responses and the concentrations of the determined analyte in the calibration samples respectively. δc_{un} , $\delta \mathbf{r}_{un}$, $\delta \mathbf{R}$ and $\delta \mathbf{c}$ are their corresponding errors.

Even though the problem of calculating the term $(\mathbf{S} + \delta \mathbf{S})^+$ formulated for the development of the error in the concentration of the direct model is here removed, the difficulty now is the calculation of the term $(\mathbf{R} + \delta \mathbf{R})^+$. Due to the impossibility of deducing an exact analytical solution, some approximations have to be made. From a hypothetical relation between the variance of the predicted concentration and the variances of the measured values, the error in the responses of the calibration samples, $\delta \mathbf{R}$, does not appear explicitly but it does appear implicitly in a K coefficient. The model for the variance of the predicted concentrations is:

$$\text{var}(c_{\text{un}}) = \sum_{j=1}^J b_j^2 \text{var}(r_{\text{un},j}) + K \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 \text{var}(c_i) \quad (10)$$

in which the first term corresponds to the errors in the responses of the unknown samples, the second to the errors in the concentrations of the calibration set and K is a scalar which takes into account the errors in the response matrix in the calibration step. Both b_j and h_i are calculated from the measured data, $\mathbf{b} = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}$ and $\mathbf{h} = (\mathbf{R}^+)^T \mathbf{r}_{\text{un}}$, respectively. The K scalar is estimated by:

$$\mathbf{K} = s^2 / \sum_{i=1}^I \text{var}(c_i) \quad (11)$$

in which s^2 is calculated as:

$$s^2 = \frac{\mathbf{c}^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}\mathbf{R}^+) \mathbf{c}}{I - r} \quad (12)$$

r being the number of principal components used in the regression model.

Assuming a t -distribution for the errors in the predicted concentrations, a confidence interval, y , given by:

$$\gamma^2 = \sum_{j=1}^J b_j^2 \text{var}(r_{\text{un},j}) t_{j-r}^2 + \kappa \sum_{i=1}^I \text{var}(c_i) t_{I-r}^2 \quad (13)$$

can be calculated. The total confidence interval is obtained by adding the partial intervals of the various associated sources of error, with their own degrees of freedom. To estimate the prediction error, the terms $\text{var}(r_{\text{un},j})$, the error in the

unknown response, and $\text{var}(c_i)$, the error in the concentration of the calibration standards, cannot be computed and have to be supplied. If it is assumed that $\text{var}(c_i)$ is constant for all c_j and the residuals $\delta \mathbf{r}_{\text{un}} = (\mathbf{I} - \mathbf{R}^+ \mathbf{R}) \mathbf{r}_{\text{un}}$ are used to estimate $\text{var}(r_{\text{un},j})$, the confidence interval y is now:

$$\gamma^2 \cong \sum_{j=1}^J b_j^2 \delta r_{\text{un},j}^2 t_{j-r}^2 + s^2 \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 t_{j-r}^2 \quad (14)$$

This expression allows confidence intervals to be calculated simply, since it does not require accurate knowledge of the variances of the experimental data and it is applicable to all regression techniques. The application of one or the other regression technique will simply give rise to a difference in the estimators of b and h .

Finally, the limit of determination of an analyte in a specific sample is established in terms of this confidence interval, and by checking if the uncertainty region for the concentration includes the value of zero or not.

The model has a series of limitations, such as the fact that it assumes, with no mathematical justification, that the two sources of error in the calibration stage are related. As far as the experimental limitations are concerned, there is the intrinsic problem of *collinearity*, due to the spectra overlapping and a bad experimental design of the calibration data, which gave rise to a high level of prediction error. The same authors subsequently show that the inclusion of more informative variables (sensors) and samples in the calibration stage always decreases the prediction error [22], however, further research is needed to define the experimental design used for selecting these variables and samples.

Recently, a modification of the expression derived by Lorber and Kowalski for $\text{var}(c_{\text{un}})$ has been proposed [23], where the term $(\mathbf{R} + \delta\mathbf{R})^+$ is replaced by $\mathbf{R}^+ + \delta(\mathbf{R}^+)$. The authors define a new expression to model the prediction error. For one component and using the present notation, the equation is written as

$$|c_i - \hat{c}_i| = \alpha \left(\prod_{j=1}^J (b_j e_{i,j})^2 \right)^{1/2} + \sum_{a=1}^A t_{ia} z_a + \sum_{a=1}^A \sum_{c=a}^A t_{ia} t_{ic} z_{ac} + g_i \quad (15)$$

where b_j is the regression coefficient for the j th sensor, e_{ij} is the spectral residual for the i th sample and the j th sensor, t are the scores of the sample in a prediction model, g_i is the residual and a and z are the parameters of the prediction error model.

In the first step, the regression coefficients b_j are calculated from the calibration model and t , $|c_i - \hat{c}_i|$ and e_{ij} from a prediction set. Then, the parameters a and z are estimated by partial least squares taking into account not to overfit the model. The superscript A stands for the number of factors used to build the model. Finally, and for any unknown sample, the value of $|c_i - \hat{c}_i|$ can be obtained. The major difference between this procedure and the one proposed by Lorber and Kowalski is given by the modelling of the data to give the best estimate of prediction error. This approach also differs in the use of the scores t instead of the values of \mathbf{h}_i and s^2 of the concentrations in the last two terms.

A logical derivation of the Lorber and Kowalski's approach is to calculate the confidence interval associated to the value of each predicted concentration in models in which the multivariate linear regression technique can be applied. The well known general expression for the variance corresponding to any unknown point is used:

$$\text{var}(c_{\text{un}}) = \mathbf{r}_{\text{un}}^T (\mathbf{R}^T \mathbf{R})^{-1} \mathbf{r}_{\text{un}} s^2 + s^2 / n \quad (16)$$

in which \mathbf{r}_{un} is the response vector obtained from measurement of the unknown sample. This response can be expressed either as the vector of the original variables (MLR), or as the derived factors or principal components (PCR) [24]. s^2 is the estimator of σ^2 , the variance of the dependent variables in relation to the model [25,26], and is calculated from the calibration step:

$$s^2 = \sum_{i=1}^I (c_i - \hat{c}_i)^2 / (I - P) \quad (17)$$

in which I is the number of calibration standards and P the number of parameters in the model.

It can be seen quite clearly that in the estimation of the expression $\text{var}(c_{\text{un}})$ only the error due to the model intervenes, the independent variables being regarded as exempt from any experimental error. This latter fact can be an important source of error when instrumental responses (e.g. spectra) are considered independent variables in inverse calibration models. The expression obtained is also one particular case of Lorber and Kowalski's [14] general expression, but which does not take into account the errors in the spectral responses. In fact, being $\mathbf{b} = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}$, the general expression defined by Lorber and Kowalski changes to:

$$c_{\text{un}} + \delta c_{\text{un}} = (\mathbf{r}_{\text{un}} + \delta \mathbf{r}_{\text{un}})^T (\mathbf{b} + \mathbf{Sb}) \quad (18)$$

where

$$\delta c_{\text{un}} = \delta \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{b} + \mathbf{r}_{\text{un}}^T \delta \mathbf{Sb} \quad (19)$$

These two terms take the form of a vector of coefficients multiplied by an error term. It is the same case as the variance of a sum, which is the same as the square of the coefficients multiplied by their corresponding variance. So, it would be congruent to say that:

$$\text{var}(c_{\text{un}}) \cong \sum_{j=1}^J b_j^2 \text{var}(r_{\text{un},j}) + \sum_{j=1}^J r_{\text{un},j}^2 \text{var}(b_j) \quad (20)$$

This last expression is very similar to the one obtained from the multivariate linear regression approach, if the errors in the independent variables had been taken into account in the latter.

Finally, from Eq. (16), and considering that $(c_{\text{un}} - \hat{c}_{\text{un}}) / \text{var}(c_{\text{un}})^{1/2}$ follows a t -distribution, the expression for the concentration and its confidence interval will be given by:

$$\hat{c}_{\text{un}} \pm t_{(v, 1-\alpha/2)} \cdot s \sqrt{1/n + \mathbf{r}_{\text{un}}^T (\mathbf{R}^T \mathbf{R})^{-1} \mathbf{r}_{\text{un}}} \quad (21)$$

where n is the number of measured replicates of the unknown sample. If n is very large, $1/n$ is close to zero, and the confidence intervals are defined for the true mean value of c_{un} . The number of degrees of freedom when the value of t is to be found is also given by $v = I - P$, I and P having been previously defined. So, given a vector of responses \mathbf{r}_{un} , an estimated concentration c_{un} can be obtained as well as its confidence interval, with a reliability of $1-\alpha$. The confidence intervals calculated in the case of a bivariate model can be seen in Fig. 1.

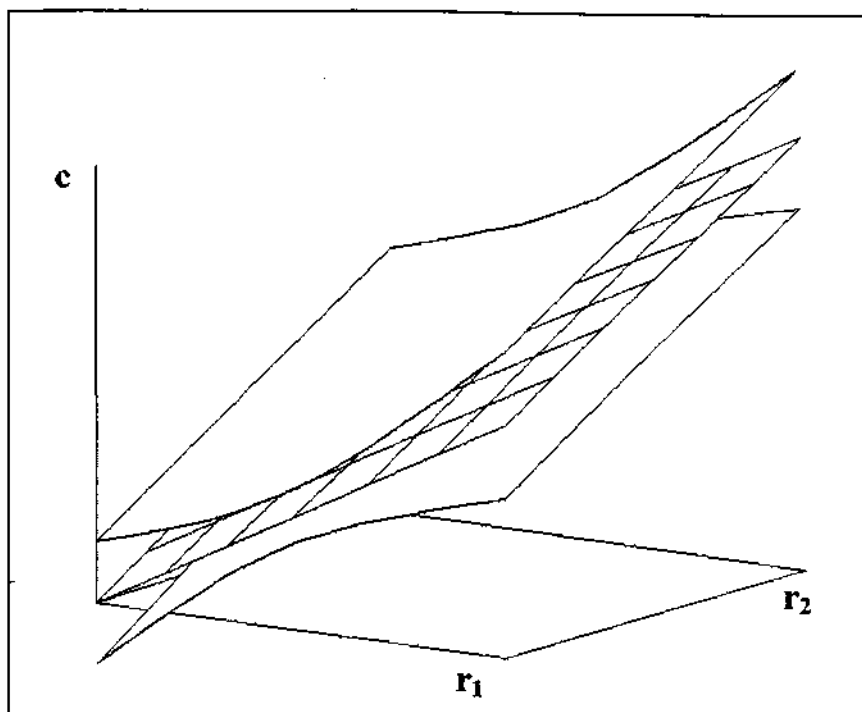


Fig. 1. Confidence interval for a bivariate model derived from the variance associated to each predicted concentration in linear regression analysis.

If the confidence interval of the predicted concentration does not include zero, it can be concluded, with a probability of committing a type I error (false positive), that there is analyte present in the sample since the concentration obtained is over the limit of determination. On the other hand, there will be a β probability of committing a type n error (false negative), i.e. stating that there is no analyte in the sample when it is actually present. This second type of error is often ignored, when in fact it is rather important. Hubaux and Vos [2] introduced this concept in their definition of detection limit based on the confidence intervals of a univariate regression line. Posteriorly, Clayton [8] has derived the inverse relationship between the probability of committing a false negative error and the concentration of analyte present in univariate calibration and has also shown the relation that exists among the α and β probabilities and n (the number of replicates obtained for

the analysed sample). Therefore, in multivariate calibration it is also necessary to specify the probabilities of obtaining false positive or false negative decisions when calculating detection or determination limits. Fig. 2 graphically shows both types of error in the definition of a determination limit based on the confidence intervals for a general inverse calibration model.

For any instrumental response of the unknown sample equal or higher than r_D , there is a probability α of having a type I error, i.e. falsely concluding that the analyte is present in the sample. However, for a given signal, r_{un} , the probability of committing a type II error or erroneously stating that there is no analyte present in the sample is β .

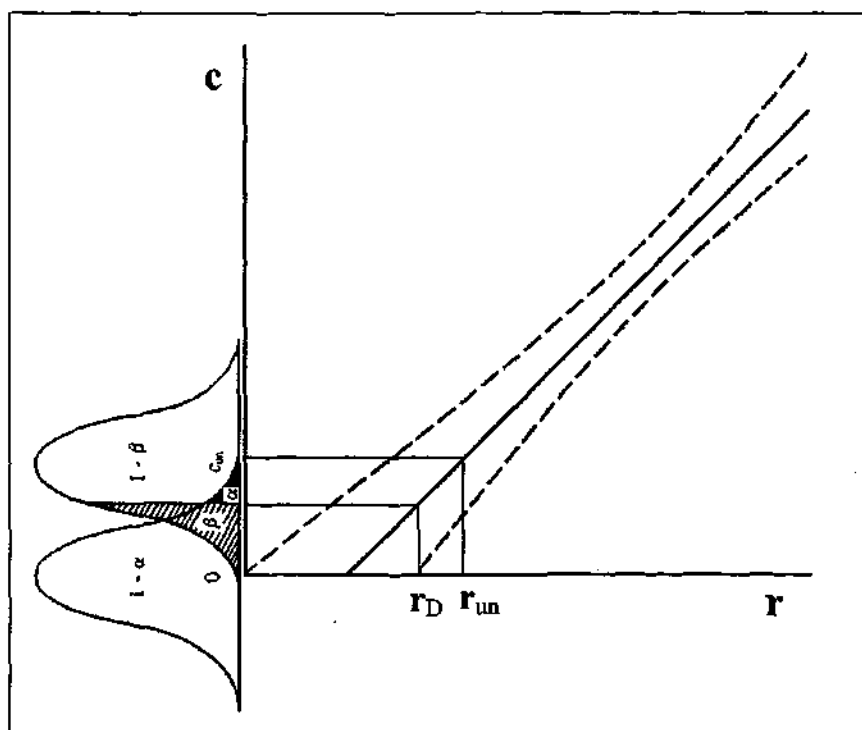


Fig. 2. Graphical plot of type I and type II errors in the multivariate determination limit estimation for a general inverse calibration model ($c = Rb + e$). In order to be visualised, the dimensionality of the original multivariate signal response has been reduced to one.

This approach, despite being simpler than the one proposed by Lorber and Kowalski, is also of limited application since it involves having to comply with the well known restrictions of the least squares technique: presence of collinearity in the independent variables if MLR is used, a normal distribution of their values, constant error distribution (homoscedasticity) and no error in the independent variables.

3.4. Error propagation approach

The next approach is the one proposed by Bauer *et al.* [15]. They also take as a base the linear additive model in the responses, $r = Sc$, and apply the theory of error propagation to the vector of concentrations in the unknown samples, obtaining an expression for the error of prediction for a total calibration model:

$$\delta c = -S^+(\delta R - \delta B)C^+c + \delta CC^+c + S^+(\delta r - \delta b) \quad (22)$$

where here b is the vector of pure background signals of the samples and B is the matrix of pure background signals of the calibration standards. For a k component and neglecting any correlations among the errors of the different signals and calibration concentrations, this equation can be expressed in the following way:

$$\begin{aligned} \text{var}(c_k) = & \sum_{m=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (S_{km}^+ C_{in}^+ c_n)^2 [\text{var}(R_{mi}) + \text{var}(B_{mi})] + \\ & + \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{in}^+ c_n)^2 [\text{var}(C_{ki})] + \sum_{j=1}^J (S_{kj}^+)^2 [\text{var}(r_j) + \text{var}(b_j)] \end{aligned} \quad (23)$$

where the indexes J , L and K stand for the number of sensors (wavelengths), the number of calibration standards used and the number of components in the samples respectively.

Using the classical univariate definition of limit of detection [1,27], a multivariate limit of determination in concentrations is defined thus:

$$c_{k,L} = z_{(\alpha)} \sigma(c_{k,0}) \quad (24)$$

where $z_{(\alpha)}$ is a statistical factor determined by the error α , describing the possibility of adopting false positive decisions, $\sigma(c_{k,0})$ is the standard deviation of the concentration corresponding to the zero net analytical signal and the index k denotes each of the K analytes of interest. By substitution of $\sigma(c_{k,0})$ by $\sigma(c_k)$, for $c_k = c_{k,0}$, in the previous equation, the limit of determination

$$c_{k,L} = z_{(\alpha)} \left\{ \sum_{m=1}^J \sum_{i=1}^L \sum_{n=1}^K (S_{km}^+ C_{in}^+ c_n)^2 [\text{var}(R_{mi}) + \text{var}(B_{mi})] + \right. \\ \left. + \sum_{i=1}^J \sum_{n=1}^K (C_{in}^+ c_n)^2 [\text{var}(C_{ki})] + \right. \\ \left. + \sum_{j=1}^J (S_{kj}^+)^2 [\text{var}(r_j(c_{k,0}, c_{n \neq k})) + \text{var}(b_j)] \right\}^{1/2} \quad (25)$$

is reached, with $c_n = \text{constant}$ for all $n \neq k$ and $c_n = c_{k,0}$ for $n = k$ ($n = 1 \dots K$). The term $r_j(c_{k,0}, c_{n \neq k})$ corresponds to the determined blank signal of the k th component in the j th sensor. The equation is undoubtedly complex and requires \mathbf{S}^+ and \mathbf{C}^+ to be known, that is to say, the concentrations of all the analytes and interferents in all the calibration standards, something which is most unlikely in real situations. What is more, it is also necessary to supply the errors in the measured signals and in the responses and the concentrations of the calibration step so as to be able to

calculate the limit of determination. This problem can be overcome relatively easily by assuming a priori error models in the data. As far as the statistical term $z_{(\alpha)}$ is concerned, it only contemplates the probability of false positive decisions, ignoring the type n error. This formulation of limit of determination was applied by its authors to ICP-OES data [15,28,29], and they drew the conclusion that LOD do not depend only on the element and the emission lines used for their measurement, but that they are also a function of the sample and its individual composition. So, in practice, the LOD has to be calculated separately for each sample, whenever interferent substances appear. The same conclusions had already been reached by Lorber [13], pointing out the importance of the net analytical signal in the definition of LOD. In any sample, the more interferences present, the higher value of LOD due to a higher spectral overlap and a reduction of the net analytical signal value.

3.5. Detection limits for coeluting species

A field of great interest at the moment is that of reliably determining the number of chemical components which elute simultaneously under the same multicomponent chromatographic profile. This is one of the critical phases if a good resolution is to be achieved using factor analysis methods. Recently, the HELP (Heuristic Evolving Latent Projections) method, based on the latent variable model, has been developed to detect and resolve minor components in the presence of other major species and noise level, in the field of HPLC-DAD [16,17]. Consequently, it is logical that the limit of detection is one of the important performance characteristics to be considered in this method.

Here, the procedure is divided into two parts, the first analyses the signal of a local region of interest and the second uses zero component regions (regions where no

species elute) as a zone to estimate the noise level of the data. The first eigenvalue in this region is indicative of the real noise level of the data. Nevertheless, because this zone may be of a different size to the zone of the chromatographic peak of interest, this first eigenvalue is compared to the different eigenvalues of the local regions being studied by means of an *F*-test. In this way the ratio e_i^2/e_0 is obtained, which is compared with a critical *F*-value at the desired level of significance and with a number of degrees of freedom equivalent to the number of retention times multiplied by the number of wavelengths used for the local region investigated and the zero component region respectively. The limit of decision is defined, therefore, as the minimum net analytical signal so it can be said

$$\text{net analytical signal} > \sqrt{F_{\text{crit}}} e_0 \quad (26)$$

This means that for a studied region of the chromatogram, the number of species present, i.e. the chemical rank, is the same as the number of eigenvalues over this limit. For a minor component, the net analytical signal must be over this limit if it is to be detected. Needless to say, the limit of decision depends on the number of spectra and wavelengths used in the calculation. The limitations of this methodology arise when the number of spectra used from the zero-component region increases and these spectra are correlated. The estimated limit is then too high, since the decrease in the critical *F*-value cannot be compensated by an increase in the first eigenvalue of the zero component region, e_0 .

Subsequently, Kvalheim *et al* [30], using these studies as a base, extend the definition of the IUPAC limit of detection [31] for multicomponent systems: "*The detection limit for a chemical species coexisting with other species in a sample is the smallest net signal that is necessary in order to reliably differentiate the signal from an analytical blank*".

In accordance with this methodology, the limit of detection varies in function of the size, in terms of retention times, of the zero component region which is taken. In order to overcome this problem, they calculate a single limit by designing a non-parametric test [30]. First, a zero component region is defined with N retention times. From this region all possible combinations of M spectra are made (the value of M being the same as the window size in the local region of interest), giving a total number of $C_N^M = \frac{N!}{M!(N-M)!}$ spectra combinations. So the total number of eigenvalues, calculated from the spectra combinations in all the retention times, gives rise to a distribution in which a limit of detection at the desired level of significance can be defined depending on the probability of obtaining the false positive or false negative decisions the user wish to assume. This method, compared to the F -test, gives very similar results, but has the advantage of giving only one limit of detection.

This method has been applied, with good results, to techniques such as HPLC-DAD and GC with FID detector. In the case of two-way chromatography (HPLC-DAD) the LOD is obtained from the distribution of the first eigenvalues obtained by all the possible spectra combinations in the zero component region. For single-way chromatography (GC-FID) one must have a collection of samples with different concentrations of the analytes of interest in order to be able to make the combinations and obtain the distribution of the eigenvalues.

To sum up, it seems to be a powerful method to apply to the above mentioned separation techniques, since the noise level can easily be estimated from the zero-component region. It would be necessary, however, to study its applicability to other non-chromatographic techniques in which the establishment of the analytical blank is not so clear since the case may arise that samples with good zero-component regions are not available. •

If non-chromatographic techniques were to be used and especially if analytical blanks were available, i.e. samples which have the matrix but do not contain the analyte of interest, at least two different classes could be established, class 0 made up of analytical blanks and class 1 with a certain amount of analyte present. Multivariate classification and regression techniques could be applied then in order to establish limits of detection [7].

3.6. Transformation to univariate approach

Lastly, Delaney [18] has proposed another approach to multivariate detection limits which has subsequently been extended by Singh [19]. The procedure is conceptually very simple but also has a rather limited application range. So far it has only been applied to gas chromatography with selected ion monitoring mass spectrometry (GC-MS-SIM).

The response matrix resulting from the recording of the MS-SIM spectra obtained for each of the pure calibration standards which have a different concentration of analyte are submitted to principal component analysis. Due to the low number of recorded spectral peaks and to the high correlation among the various spectra, the first principal component contains a high percentage of the total variance. In this way there is a considerable reduction in the multivariate data represented by the abundances for each monitored m/z value. All the calibration sample scores, considered now as a response on the ordinate axis, are plotted as a function of the concentration of each analyte in the calibration standard on the abscissa axis. As the first component explains more than 99% of the total variance, the problem is reduced to a univariate calibration, in which, to determine the limit of detection,

the classical univariate methods of Currie [1] and Hubaux-Vos [2] are used. Figure 3 shows a scheme of this approach.

The technique has been devised to work in rather restricted conditions. Firstly, the recorded signals must be specific. Any detection technique hyphenated to a powerful separation technique such as capillary chromatography or capillary electrophoresis could be useful but it must be borne in mind that even so, this approach is not valid to predict limits of detection in the presence of overlapped peaks or, in general, of interfering substances which give rise to overlapping signals. Secondly, there must be a considerable correlation among the data if the first principal component is to explain nearly the whole variance. If this is not the case a regression model with more than one response [25] would be found, and the limits of detection could not be estimated by using classical univariate models.

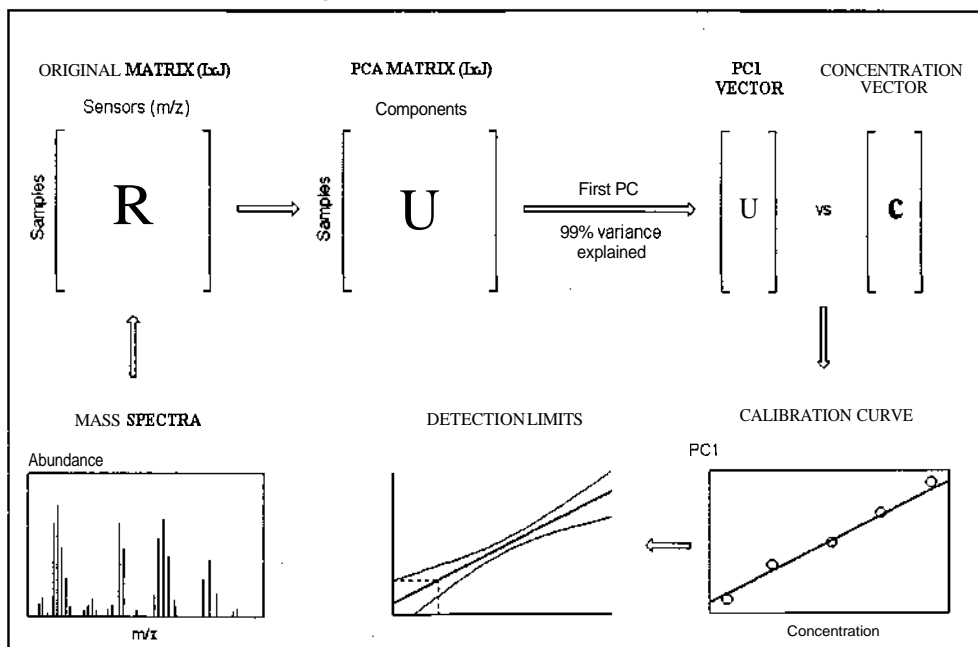


Fig. 3. Scheme of the procedure developed by Singh to calculate limits of detection

4. Conclusions

More than twenty different definitions of limits of detection and limits of determination have been reported in the bibliography for univariate models [3]. This gives an idea of the complexity of the field. This difficulty is even increased when dealing with multivariate analysis due to the distinct approaches used to build the regression models, the different nature of the analytical data, originated from very different analytical techniques, and the lack of a sound statistical basis for multivariate modelling techniques.

The different approaches developed for calculating multivariate detection limits have been reviewed. A summary of these approaches, including assumptions, use and limitations is shown in Table 1. The estimation of these limits in flow systems has specific characteristics due to the aim of determining the presence of minor components in not well resolved profiles and the presence of regions where no species elute. In a general sense, the ultimate goal of multivariate determination limits estimators is to reliably evaluate the minimum concentration of a chemical species which coexists with other species in a sample. This reliability encompasses the differentiation of the signal due to the species under study from the analytical blank considering type I and type n errors. Up to the present, however, only false positive errors have been taken into account.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICYT project n° BP93-0366) is acknowledged.

Approach	Calibration assumptions	Limitations	MDL Estimator	Applications	References
Net analytical signal	Direct model First order calibration	Spectra of pure components required	Three times the total relative deviation	UV Spectroscopy Piezoelectric Sensor Array	13,21
Net analytical signal	Inverse model First order calibration	Spectra of interferences are needed	Three times the precision of the concentration	ICP-AES	20
Confidence intervals for concentration	Inverse model First order calibration	Empirical assumptions in the equations of the confidence intervals	Checking if the uncertainty region for concentration includes the zero value	NIR reflectance spectrometry	14
Error propagation	Direct model First order calibration	Concentrations of all analytes and interferences must be known	Three times the precision of the concentration	ICP-OES	15, 28, 29
Non-parametric test	Second order calibration	Zero-component regions present	Minimum net analytical signal greater than a certain limit in the zero component region	Chromatographic techniques	16, 17
Univariate transformation	Direct model Zero order calibration	Specific and highly correlated signals required	Univariate (Currie and Hubaux-Vos)	GC/LC/EC-MS	18, 19

Table 1. Summary of the different approaches to estimate multivariate detection limits.

References

1. L.A. Currie, Limits for qualitative detection and quantitative determination, *Analytical Chemistry*, 40 (1968) 586-593.
2. A. Hubaux and G. Vos, Decision and detection limits for linear calibration curves, *Analytical Chemistry*, 42 (1970) 849-855.
3. L.S. Oresic and V. Grdinic, Kaiser's 3-sigma criterion: a review of the limit of detection, *Acta Pharmacologica Jugoslavija*, 40 (1990) 21-61.
4. S.D. Brown, R.S. Bear, Jr. and T.B. Blank, Chemometrics, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 22R-49R.
5. G.L. Long and J.D. Winefordner, Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry*, 55 (1983) 712A-724A.
6. N. Cressie, Limits of detection, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 22 (1994) 161-163.
7. F.C. Garner and G.L. Robertson, Evaluation of Detection Limit Estimators, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 3 (1988) 53-59.
8. C.A. Clayton, J.W. Híñes and P.D. Elkins, Detection limits with specified assurance probabilities, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 2506-2514.
9. L. Sarabia and M.C. Ortiz, DETARCHI: a program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *Trends in Analytical Chemistry*, 13 (1994) 1-6.
10. K.R. Beebe and B.R. Kowalski, An introduction to multivariate calibration and analysis, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 1007A-1017A.
11. H. Martens and T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
12. E.V. Thomas and D.M. Haaland, Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 1091-1099.
13. A. Lorber, Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations, *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 1167-1172.
14. A. Lorber and B.R. Kowalski, Estimation of prediction error for multivariate calibration, *Journal of Chemometrics*, 2 (1988) 93-109.
15. G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, Limits of detection in multivariate calibration, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 340 (1991) 135-139.
16. O.M. Kvalheim and Y.-z. Liang, Heuristic Evolving Latent Projections: resolving two-way multicomponent data. 1. Selectivity, latent-projective graph, datascope, local rank and unique resolution, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 936-946.
17. Y.-z. Liang, O.M. Kvalheim, H.R. Keller, D.L. Massart, P. Kiechle and F. Erni, Heuristic Evolving Latent Projections: resolving two-way multicomponent data. 2.

- Detection and resolution of minor constituents, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 946-953.
18. M.F. Delaney, Multivariate detection limits for selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 3 (1988) 45-51.
 19. A. Singh, Multivariate decision and detection limits, *Analitica Chimica Acta*, 277 (1993) 205-214. A. Singh and F.C. Garner, *Ibid*, 281 (1993) 686.
 20. A. Lorber, A. Harel, Z. Goldbart and I.B. Brenner, Curve resolution and figures of merit estimation for determination of trace elements in geological materials by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 1260-1266.
 21. W.P. Carey and B.R. Kowalski, Chemical piezoelectric sensor and sensor array characterization, *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 3077-3084.
 22. A. Lorber and B.R. Kowalski, The effect of interferences and calibration design on accuracy: implications for sensor and sample selection, *Journal of Chemometrics*, 2 (1988) 67-79.
 23. T.V. Karstang, J. Toft and O.M. Kvalheim, Estimation of prediction error for samples within the calibration range, *Journal of Chemometrics*, 6 (1992) 177-188.
 24. T. Næs and H. Martens, Principal components regression in NIR analysis: Viewpoints, background details and selection of components, *Journal of Chemometrics*, 2 (1988) 155-167.
 25. A.I. Khuri, J.A. Cornell, *Response Surfaces Design and Analyses*, Marcel Dekker, 1987.
 26. N. Draper and H. Smith, *Applied Regression Analysis*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 1981.
 27. P.W.J.M. Boumans, *Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry*, Part I, John Wiley & Sons, New York, 1987.
 28. G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, Selectivity and error estimates in multivariate calibration: application to sequential ICP-OES. *Spectrochimica Acta*, 46B (1991) 1185-1196.
 29. G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, Selectivity and limits of detection in inductively coupled plasma optical emission spectrometry using multivariate calibration, *Spectrochimica Acta*, 47B (1992) 179-188.
 30. Y.-z. Liang, O.M. Kvalheim and A. Höskuldsson, Determination of a multivariate detection limit and local chemical rank by designing a non-parametric test from the zero component regions, *Journal of Chemometrics*, 7 (1993) 277-290.
 31. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, Chap. 7, Elsevier, Amsterdam, 1988.

Capítol 3

Límits de detecció en tècniques multidimensionals
amb elevada correlació

3.1. Introducció

Realitzada la revisió científica de les diferents aproximacions als límits de detecció en calibració **multivariant** desenvolupades fins el moment, es va creure oportú assajar una de les metodologies més senzilles, però aplicable posteriorment a tècniques analítiques disponibles en el nostre laboratori. Des d'aquesta perspectiva hom es va plantejar fer l'estudi dels límits de detecció en mètodes d'anàlisi que utilitzen l'acoblament **cromatografia de gasos-espectrometria de masses (CG-EM)**. L'experiència proporcionada pel treball pràctic anterior en aquesta tècnica i la disponibilitat de la instrumentació necessària, en el Servei de Recursos Científics de la Universitat Rovira i Virgili, va facilitar en gran manera aquesta tasca. La Fig. 3.1 mostra l'esquema d'aquest acoblament, amb les parts més importants:

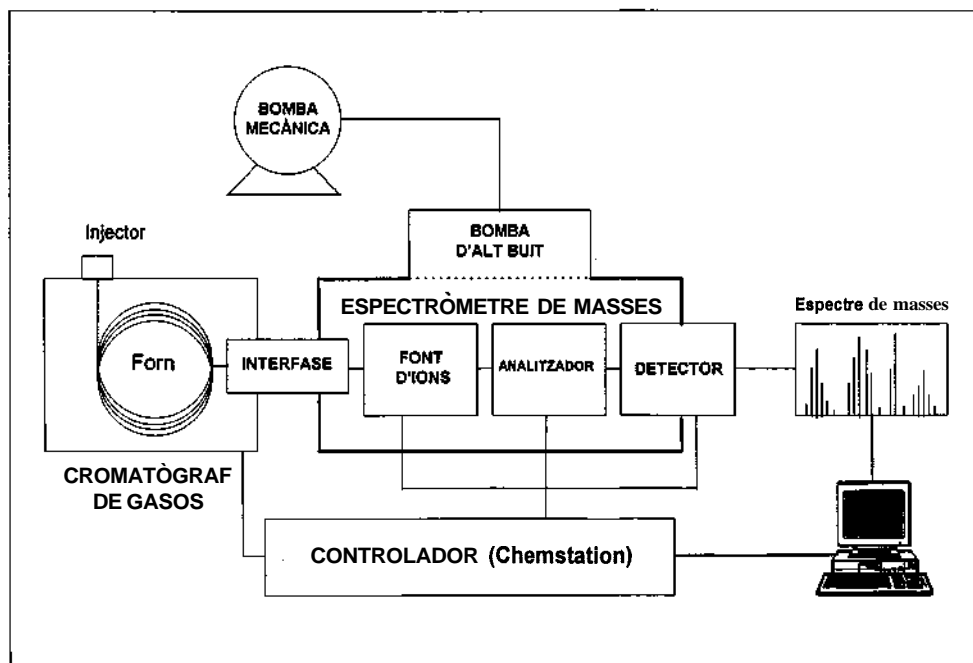


Fig. 3.1. Esquema del sistema CG-EM utilitzat en l'**experimentació** dels límits de detecció

La resposta instrumental obtinguda en l'acoblament CG-EM és l'àrea de pic corresponent a l'analit en estudi, en unitats d'abundància espectral i, per tant, el model de calibració s'estableix representant aquesta àrea de pic (o àrea relativa si s'utilitza la tècnica del patró intern) vs. la concentració de l'analit en el corresponent estàndard de calibració. Existeixen, però, dues modalitats ben diferenciades a l'hora d'enregistrar el senyal en l'espectròmetre de masses:

- Cromatograma d'ions totals (*Total Ion Chromatogram*, TIC): el senyal per unitat de temps en el cromatograma és deguda a la suma de les abundàncies de tots els ions (relacions massa-càrrega, m/z) de l'espectre de masses que arriben al detector.

- Monitorització d'ions seleccionats (*Selected Ion Monitoring*, SIM): el senyal per unitat de temps és degut únicament a la contribució d'un/s ió/ions espectral/s triat/s per l'usuari.

Aquesta darrera tècnica d'adquisició de dades és la més utilitzada a efectes quantitius, ja que ofereix uns avantatges de sensibilitat importants. Això és degut al fet que l'instrument inverteix molt més temps en la monitorització dels ions significatius presents en un pic cromatogràfic. A més a més, es poden adquirir moltes més dades al llarg del pic, la qual cosa condueix a una relació senyal/soroll molt millor i, per tant, a uns límits de detecció sensiblement inferiors [1].

Existeix, però, una altra alternativa a la selecció d'ions. Consisteix en enregistrar el cromatograma d'ions total i després realitzar les integracions dels pics cromatogràfics per a un/s ions individual/s. Aquest procediment, malgrat no tenir

les prestacions del SIM, comentades en el paràgraf anterior, és preferible al cromatograma d'ions totals, ja que incrementa notablement la relació senyal/soroll.

La metodologia de càlcul dels límits de detecció en aquesta tècnica està basada en els treballs previs realitzats per Delaney [2] i Singh [3]. És necessari disposar d'una matriu inicial de dades de naturalesa multivariant. Això s'aconsegueix obtenint la resposta, en aquest cas l'àrea de pic, per a cada mostra de calibració i per a una sèrie de relacions m/z determinades. Enregistrant el cromatograma d'ions totals i integrant els pics per a diversos ions individuals, podem aconseguir aquest objectiu.

Un cop obtinguda la matriu inicial de respostes, aquesta es descomposa mitjançant l'anàlisi de components principals (*Principal Component Analysis*, PCA). Si el procés de calibració s'ha realitzat correctament i no s'ha detectat la presència de substàncies interferents, el primer component principal hauria d'explicar aproximadament un 99% de la variància total. Això és típic en la tècnica CG-EM, degut a la gran correlació existent entre els pics espectrals. Per tant, sense pèrdua significativa d'informació, aquest component principal pot utilitzar-se per representar una resposta composta, que és combinació lineal de les respostes originals. El requeriment de que el procediment de calibració es dugui a terme de manera correcta està relacionat més amb l'etapa de preparació dels estàndards de calibració que no pas amb l'etapa de mesura instrumental, la qual és d'una gran precisió en la tècnica CG-EM.

Si es volen avaluar els límits de detecció en termes de concentració, el primer gran repte de la metodologia és l'establiment del model de calibració que relacioni la resposta composta, representada pel primer component principal, amb la concentració de l'analit en estudi. Això implica una sèrie d'aspectes que tenen a veure amb la regressió lineal com, per exemple, la importància de seguir un

disseny experimental adequat si volem obtenir una recta de calibratge que pugui utilitzar-se de forma eficient, tant per predir concentracions de mostres desconegudes com pel càlcul posterior dels límits de detecció.

La segona etapa clau del procés és el propi estimador del límit de detecció. En els treballs de Delaney i Singh, les aproximacions utilitzades van ser les de Currie i Hubaux-Vos, descrites en el capítol 1. L'aproximació incorporada en el nostre treball va ser la desenvolupada per Clayton *et al.* (també descrita en el primer capítol). La novetat més important que aporta la metodologia de Clayton *et al.* és que, quan es desconeixen els paràmetres del model de calibració i s'han d'estimar (la qual cosa succeeix en la majoria dels casos), la probabilitat d'error de 2^a espècie no es pot avaluar considerant una distribució *t* d'Student normal, sinó que s'ha de fer a partir d'una distribució *t* destentada. L'aproximació assumeix també que les respostes instrumentals segueixen distribucions gaussianes en tot l'interval de concentracions. En conseqüència, tot i que les respostes originals obtingudes en l'acoblament CG-EM no seguissin una distribució gaussiana, recorrent al teorema del límit central pot justificar-se l'assumpció de normalitat dels components principals, ja que aquests són funció lineal de les respostes originals.

L'experimentació realitzada va estar encaminada bàsicament a demostrar la millora que suposa en els valors dels límits de detecció el fet d'utilitzar més informació inicial. Amb aquest motiu, es van comparar els límits de detecció calculats (1) a partir del primer component principal de la descomposició de la matriu de respostes original (aproximació multivariant) i (2) a partir de la resposta de l'ió espectral més abundant (aproximació univariant).

Un segon objectiu plantejat va ser l'estudi de com afecta un increment del soroll de fons de les dades als valors dels límits de detecció. És ben conegut que en la tècnica de PCA, en presència de dades molt correlacionades, els primers

components principals expliquen un percentatge molt elevat de la variància total de les dades, mentre que els darrers simplement modelen el soroll que es troba present en qualsevol mesura experimental. Així doncs, utilitzant el primer component principal per construir la recta de calibratge, l'efecte negatiu del soroll de fons, traduït en un increment dels límits de detecció, hauria de veure's esmorteït. Per validar aquesta hipòtesi es van comparar els resultats obtinguts amb les aproximacions uni i multivariant, després d'incrementar de manera gradual el soroll de fons en les dades.

Els resultats obtinguts van demostrar l'aplicabilitat de la metodologia per calcular els límits de detecció de la tècnica CG-EM. L'estudi es va restringir al càlcul dels límits de detecció instrumentals, obtinguts a partir de la recta de calibratge construïda amb els estàndards purs. No van considerar-se els límits de detecció del mètode, els quan s'haurien d'avaluar a partir de mostres reals addicionades amb els analits en estudi, en aquest cas una sèrie de pesticides.

Malgrat els bons resultats, el fet que sigui indispensable que el primer component principal de la matriu de respostes inicial expliqui un elevat percentatge ($\approx 99\%$) de la variància total, es converteix en la màxima limitació de la metodologia, i a més per un doble motiu. En primer lloc, es restringeix enormement el ventall de tècniques analítiques en les quals es pot aplicar (bàsicament els acoblaments d'alguna tècnica de separació amb un espectròmetre de masses o alguna altra tècnica d'identificació, com IR o UV-Visible); en segon lloc es requereix una elevada selectivitat per tal que no interfereixin en la determinació altres substàncies presents a la mostra. Aquest darrer requisit és relativament fàcil de complir per la majoria de tècniques de separació. El problema esdevindria en cas de coelució de diferents espècies. Una possible solució seria la monitorització d'ions individuals, seleccionats adequadament en base a aquest requisit de selectivitat. Una altra aproximació, en aquest cas per la detecció d'analits

minoritaris que coelueixen amb altres constituents de la mostra, ha estat proposada per Kvalheim *et al.* [4] i revisada al capítol 2.

Una descripció més profunda de tot el procediment, tant teòrica com experimental, així com els resultats obtinguts, es presenten en la segona part d'aquest capítol, en un article enviat a la revista *Química Analítica* i que es troba pendent de publicació.

3.2. Referències

1. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Volum 5. Academic Press, London, 1995. Pàg. 2826.
2. M.F. Delaney, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 3 (1988) 45.
3. A. Singh, *Anal. Chim. Acta*, 277 (1993) 205. A. Singh and F.C. Garner, *Ibid*, 281 (1993) 686.
4. O.M. Kvalheim and Y.-z. Liang, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 936.

Detection Limits in GC-MS Multivariate Analysis

R. BOQUE *, F.X. RIUS

Departament de Química, Universitat Rovira i Virgili.

Pl. Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, SPAIN.

ABSTRACT

A new technique to calculate multivariate detection limits is applied to GC-MS analysis. The approach, based on a principal component analysis followed by the application of the Clayton's method, takes advantage of the high correlation among the instrumental responses recorded. In this way, all information given by the technique is employed in addition to the minimisation of the instrumental noise. The described procedure has been used to calculate the MDL of several commercial pesticides analysed using a GC-MS system with electronic impact ionisation. The calculated detection limits values are in the range 0.3 -1.2 ppm. Characteristic curves of detection are also provided.

INTRODUCTION

Evaluating the performance of analytical methods is one of the basic subjects in quality assurance. Figures of merit such as accuracy and trueness linked to traceability and precision related to uncertainty are extensively dealt with in all subjects related to chemical measurement [1]. Because of society's needs to reliably detect and quantify smaller and smaller quantities of analytes in samples, detection limit is another of the performance characteristics which is of special interest nowadays. The calculation of detection limits in the univariate field has been extensively dealt with in the literature and some of the developed approaches have been implemented in computer programs [2,3].

Multivariate methods of analysis are being increasingly used in analytical laboratories, mainly due to the advantages in terms of cost or time. Their performance characteristics, among which are detection limits (or determination limits when an analyte in a sample with the presence of interferences is going to be determined), must be evaluated like in the univariate case [4].

In the present paper, the calculation of multivariate detection limits, MDL, is applied to a gas chromatography-mass spectrometry coupled system, GC-MS. The traditional method of calculating the detection limits in this technique is based on the selection of a characteristic ion in the mass spectrum (or the sum of two ions) and constructing the univariate calibration line by regressing the analyte response (in abundance units) on the concentration of the analyte of interest in the corresponding calibration sample. The internal standard technique is commonly used to ensure reproducibility in the injection step. However, one of the drawbacks of this approach is the fact that a great deal of information contained in other ions in the recorded mass spectrum is wasted. Furthermore, the presence of background

noise may affect significantly the final result if only one ion is used in the quantitation step.

The described procedure has been used to calculate the MDL of several commercial pesticides analysed using a GC-MS system with electronic impact ionisation. The calculated detection limits values are in the range 0.3 - 1.2 ppm.

THEORY

The methodology discussed is based on using, for each calibration sample, the peak areas for several mass channels, giving rise to a multivariate response matrix [5,6]. The subsequent principal component analysis (PCA) of the data matrix enables its dimensionality to be reduced to the point that only one principal component is able to explain all information contained in the original data; the high correlation among the mass spectra of the different calibration samples being responsible for this fact. Regressing this principal component onto the concentration vector for each of the different standards enables univariate calibration lines to be constructed in which the classical approaches for calculating detection limits can be applied. The procedure for calculating the MDL has four steps: (1) Obtaining the response matrix, R , and the concentration vector, c , (2) calculating the principal components (PCA) of the matrix R , (3) obtaining the calibration model (PCR) by regressing the first principal component onto the concentration vector, c , and (4) calculating the MDL by using one of the several univariate classical approaches.

Data matrix. $\mathbf{R}(I \times J)$ is defined as the response matrix of the ratio of the peak area of the analyte for each monitored ion to the peak area of the internal standard for a

single monitored ion. I is the number of calibration samples and J the number of monitored ions for the analyte.

Principal components analysis (PCA) and regression model (PCR). Figure 1 shows the first principal component, PC1, corresponding to four calibration standards each of them replicated three times. Each of the axes represents a variable (relative peak area) and the points represent the experimental samples (calibration standards). In this case, each of the spectra would contain three monitored ions. The projection of each point onto the line which represents each factor is called the score for the sample on that principal component.

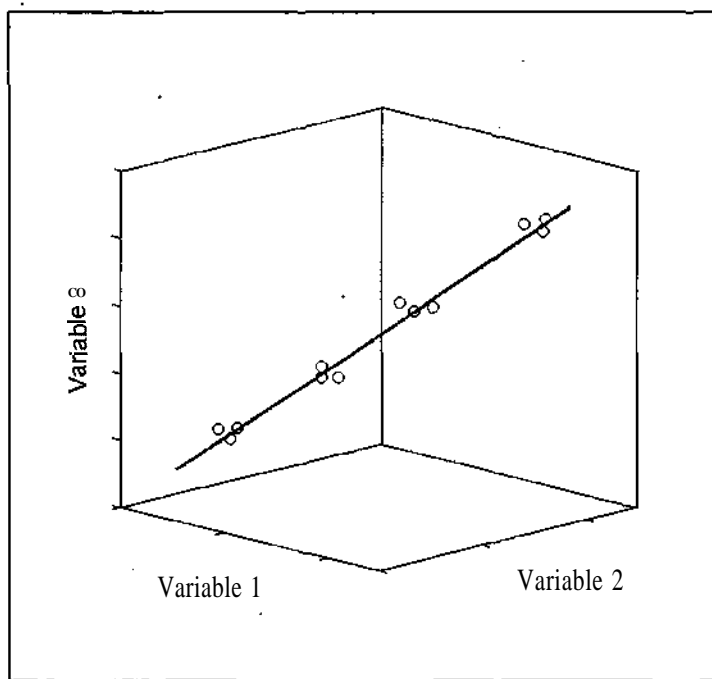


Fig. 1. Plot of the first principal component for 4 samples, each replicated three times, in the space defined by three original variables. It can be seen that the PC1 is situated along the maximum length of the points. The samples in the new, smaller, unidimensional space of this first factor are defined by the value of their projection (score) onto PC1.

Because of the great precision of the technique and the repeatability of the fragmentation process which the molecules undergo, the recorded spectra for the different calibration standards with different concentrations of pesticides are highly correlated. For this reason and because of the low number of mass channels chosen, the first principal component explains a high percentage of all the variation in the data. That is to say, nearly all the information in the spectral peaks in each standard can be reduced to a single variable which is a linear combination of the original variables. So if the scores of this first principal component are chosen and regressed onto the concentration vector of the calibration standard studied, a **univariate** calibration line is obtained and detection limits in the **univariate** field can be calculated, by some of the well-established approaches. Figure 2 shows a diagram of the whole methodology presented:

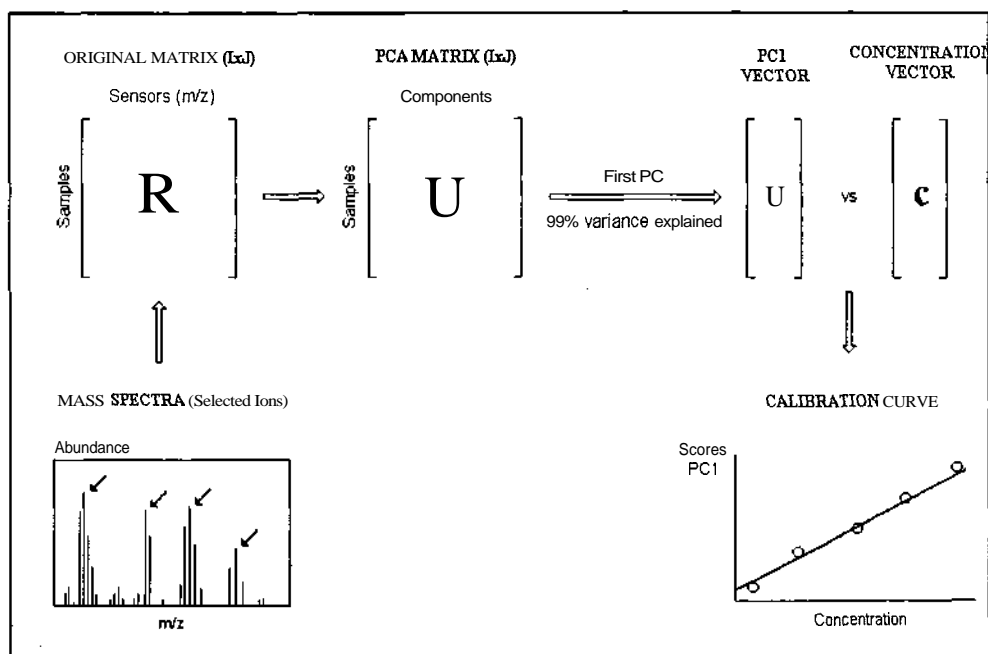


Fig. 2. Diagram of the procedure for reducing the dimensionality of the data and constructing the calibration line

Calculation of the limit of detection. Once the univariate calibration line has been obtained, the detection limits, MDL, can be calculated. One of the most innovative approaches is the one proposed by Clayton *et al.* [7] since it allows to take into account the probability of committing both type I (false positive) and type n (false negative) errors. This method has been implemented in a computer program by Sarabia *et al.* [3].

Figure 3 shows the relation between the calibration line and the two types of error. Once the probability of a type I error has been chosen, and assuming that measurements follow a Student's *t*-distribution, the response corresponding to a zero analyte concentration, r_D , can be calculated. Once this detection signal has been established, if any sample with an analyte concentration higher than zero is analysed, there is a P probability of obtaining a response that is lower than r_D . This probability decreases, as can be seen in Figure 3, as the analyte concentration increases.

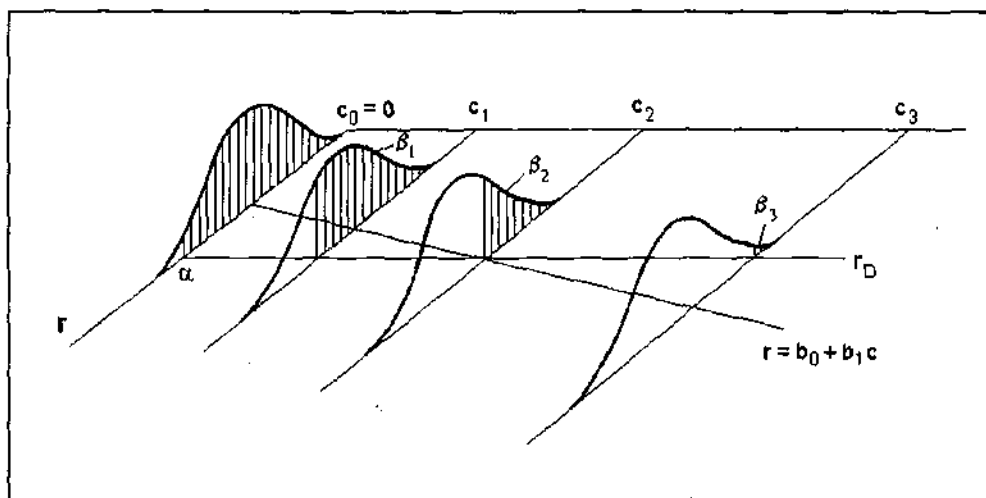


Fig. 3. Plot of the calibration line, the detection response, r_D , and the probability of committing false positives, α , and false negatives, β . Note that for a given α , the β probability increases with the analyte concentration.

The equation of the detection response, r_D , is expressed as:

$$r_D = b_0 + t_\alpha \text{var}(r_0)^{1/2} \quad (1)$$

where b_0 is the intercept of the calibration line, t_α is the value of a Student's t -distribution with $(l - 2)$ degrees of freedom and $\text{var}(r_0)$ is the variance of the response at zero concentration calculated from the regression line. $\text{var}(r_0)$ is expressed as:

$$\text{var}(r_0) = \hat{\sigma}^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{I} + \frac{\bar{c}}{\sum_{i=1}^l (c_i - \bar{c})^2} \right] \quad (2)$$

where N is the number of replicates which will be carried out on the unknown sample, \bar{c} is the average of the calibration standard concentrations and $\hat{\sigma}$ is the estimated standard error of regression. Finally, the limit of detection can be obtained from the expression:

$$c_D = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_0)^{1/2}}{b_1} \quad (3)$$

where $\Delta(\alpha, \beta)$ is the statistical factor that accounts for the α and β probabilities of error [7] and b_1 is the slope of the calibration line. It can be seen that eq 3 depends on a series of experimental parameters, such as instrumental sensitivity through b_1 and experimental design and quality of regression through the different terms of $\text{var}(r_0)$.

EXPERIMENTAL SECTION

Pesticides studied. A total of six pesticides were studied: two organophosphorous insecticides, methyl-parathion and fenitrothion; three carboxymide fungicides, vinclozolin, clozolate and procymidone; and one halogenated methyl-tio-imide fungicide, dichlofluanid, all supplied by Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). They are all used in viticulture so it is interesting to determine their residual presence in vines. The organochlorate insecticide aldrin, supplied by IOIC (Annapol, Poland) was used as internal standard because its retention time is between the times of the other pesticides and also because it is not found in real samples since its use is prohibited at the present.

Preparation of the standards. A stock solution of 40 ppm of all the pesticides was prepared using ethyl acetate as solvent. From this stock solution five calibration standards were prepared with final concentrations of 2, 4, 6, 8 and 10 ppm of each pesticide. The concentration of the internal standard in the final solutions was 5 ppm. Figure 4 shows the chromatogram of the standard of 6 ppm, in which the separation of the different pesticides can be seen.

Chromatographic and spectrometric instrumental conditions. The equipment used was an HP 5890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) coupled to an HP 5989 A Engine mass spectrometer (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) which was equipped with a double EI/CI ionisation source and a quadrupole mass analyser. The gas chromatograph was equipped with a 12m x 0.2mm silica HP-1 capillary column (cross-linked methyl silicone) with a particle size of 0.33 mm. The column was directly inserted into the ionisation source of the mass spectrometer using an interface at a temperature of 250 °C. The injector

temperature was 250 °C and the oven temperature programming was 75 °C for 1 minute, 20 °C/minute up to 200 °C and 3 °C/minute up to 225 °C.

The source and the quadrupole temperatures were 200 °C and 100 °C respectively. The data were collected with the HP/UX ChemStation Model 400t 16, equipped with a Wiley 138 spectrum library which was used to compare the spectra obtained experimentally.

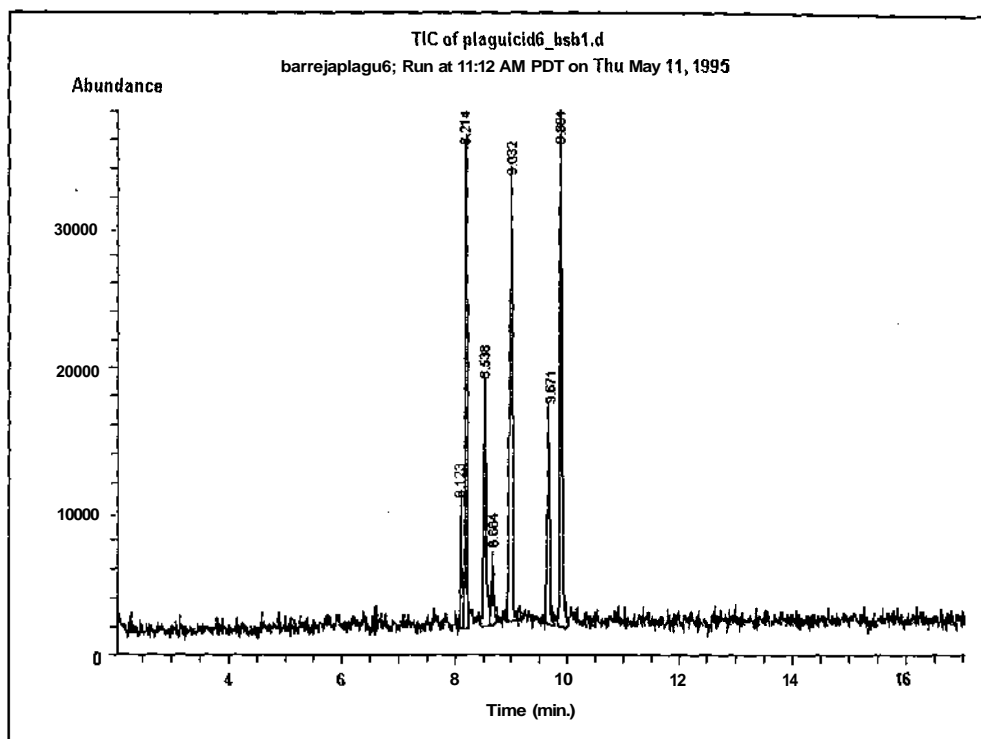


Fig. 4. Chromatogram of the sample which contains 6 ppm of each of the calibration standards, showing the separation of the pesticides studied. In order of elution: (1) Methyl-parathion, (2) Vinclozolin, (3) Fenitrothion, (4) Dichlofluanid, (5) Aldrin, (6) Clozolinat and (7) Procymidone.

The data were collected in the "full-scan" mode, i.e, recording all ions of the spectrum for each retention time. In the quantitation step, however, peak integrations were carried out for each of the selected ions. Four ions were chosen,

according to their intensity, for each pesticide (Table 1). The peak of the m/z 66 ion from aldrin was used in the internal standard method.

Duplicates of the calibration samples were made and so the initial data matrix of responses for each pesticide, R , is made up of 10 samples (5 calibration standards x 2 replicates) and 4 variables (the four ions selected for each pesticide).

The software UNSCRAMBLER (Camo AS, Trondheim, Norway) was used to perform the principal components analysis. The calibration lines were constructed and validated with the ULC program [2] and finally, the MDL were calculated from Clayton's method using the DETARCHI program [3].

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the selected ions for each pesticide, as well as the results obtained from the PCA of each of the R matrices. It can be seen that in all cases the first principal component explains at least 98.9% of the total variance contained in the data.

Table 2 lists the statistical parameters of the different calibration lines, obtained by regressing the scores of the first principal component (corrected using the internal standard method) onto the concentrations of the calibration standards. Intercepts show negative values because the original data were mean-centered, therefore the resulting scores obtained by PCA are also centered. It can be seen that the correlation coefficient is higher in all cases than 0.997 except for fenitrothion ($r = 0.994$). The standard error is lower than 0.015 for all the calibration lines except

for fenitrothion ($s_{\text{res}} = 0.048$) and procymidone ($s_{\text{res}} = 0.060$) the two pesticides with higher sensitivity, as can also be seen in the chromatogram in Figure 4.

	Selected ions m/z	Principal components analysis			Variance explained by 1st PC (%)
		Eigenvalue 1	Eigenvalue 2	Eigenvalue 3	
Methyl-parathion	79, 109, 125, 263	0.1405	0.0009	0.0005	98.97
Vinclozolin	124, 178, 212, 285	0.4927	0.0036	0.0015	98.95
Fenitrothion	79, 109, 125, 277	1.5899	0.0013	0.0007	99.87
Dichlofluaniid	98, 123, 167, 224	0.1240	0.0004	0.00004	99.59
Clozolinat	124, 188, 259, 331	0.6589	0.0067	0.0009	98.86
Procymidone	67, 96, 97, 283	18.4670	0.0345	0.0088	99.76

Table 1. Selected ions for each pesticide, PCA results and percentage of variance explained by the first principal component.

	60	b_1	s_{b_0}	s_{b_1}	s_{res}	r
Methyl-parathion	-0.236	0.209	0.006	0.004	0.008	0.998
Vinclozolin	-0.448	0.384	0.011	0.008	0.014	0.998
Fenitrothion	-0.685	0.686	0.036	0.027	0.048	0.994
Dichlofluaniid	-0.219	0.191	0.008	0.006	0.010	0.996
Clozolinat	-0.306	0.281	0.007	0.005	0.010	0.999
Procymidone	-2.622	2.267	0.044	0.033	0.060	0.999

Table 2. Calibration line parameters for the different pesticides: intercept (b_0), slope (b_1), standard deviation of the intercept (s_{b_0}), standard deviation of the slope (s_{b_1}), standard error of regression (s_{res}) and correlation coefficient (r).

Using the straight calibration lines obtained, the MDL of the different pesticides were calculated. The results obtained are shown in the form of *characteristic curves of detection* (Figure 5). In this type of graph, for each level of significance, α , the variation of the MDL is plotted in function of the β probability of committing a type II error. In this case, the α probability has been set at 5%.

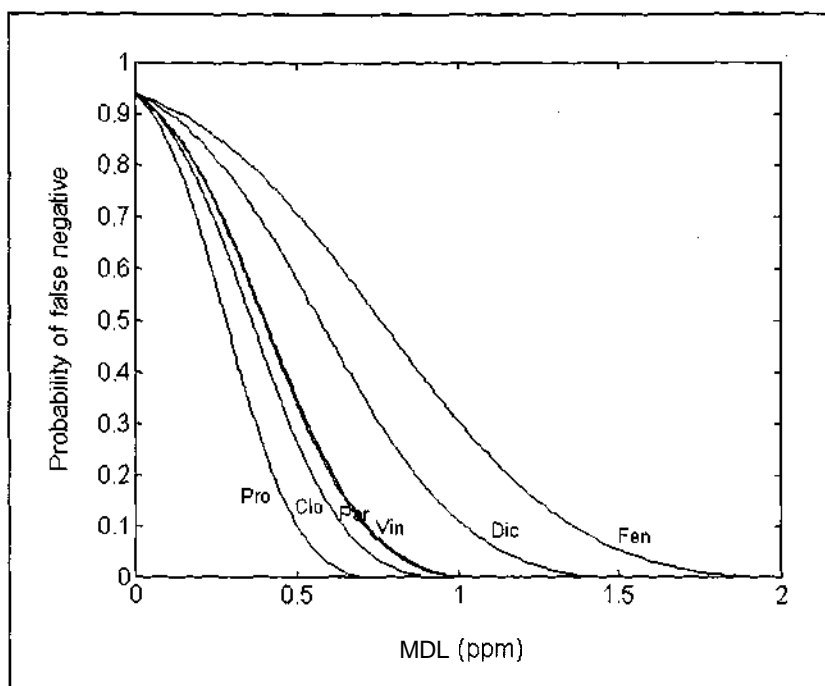


Fig. 5. Characteristic curves of detection for the different pesticides with a probability of false positive, $\alpha = 0.05$, and with a number of replicates carried out on the problem sample, $N = 1$.

It can be seen that the lower MDL's correspond to procymidone. These results can undoubtedly be attributed to the high sensitivity of the method of analysis for this analyte. On the other hand, the pesticide that is determined with the highest MDL's is fenitrothion, due to the higher uncertainties of its calibration line.

Table 3 shows a comparison between the univariate limits of detection for each pesticide obtained using the most sensitive ion, and the MDL's, for different α and β probability values. It can be seen that the multivariate limits of detection, although they are of the same order, are lower than the univariate ones, except in the cases of methyl-parathion, which has a very similar value, and fenitrothion, mainly due to the uncertainty associated to the calibration line.

	UDL (ppm)		MDL (ppm)	
	$\alpha=0.05$ $\beta=0.05$	$\alpha=0.05$ $\beta=0.5$	$\alpha=0.05$ $\beta=0.05$	$\alpha=0.05$ $\beta=0.5$
Methyl-parathion (109)	0.79	0.39	0.81	0.41
Vinclozolin (285)	0.90	0.45	0.83	0.41
Fenitrothion (125)	1.37	0.68	1.55	0.77
Dichlofluanid (123)	1.25	0.62	1.17	0.58
Clozolate (259)	0.81	0.40	0.74	0.37
Procymidone (96)	0.67	0.33	0.58	0.29

Table 3. Comparison of the univariate, UDL, and multivariate determination limits, MDL, for the six pesticides, for a number of replicates on the problem sample, $N = 1$. The most abundant ion in each of the pesticides figures in brackets.

The presence of background noise may significantly affect the final result if only one ion is used in the quantitation step (univariate case) because the influence of the random errors is introduced. Additionally, when using PCA the background noise contained in the original data is modelled by the last principal components and so the final result is not influenced so much if the first principal component is used to build the calibration line. To show this effect, simulated background noise was increasingly added to the original spectra. The new MDL's calculated are the mean values of 1000 simulations. In Fig. 6, the limit of detection for the pesticide

methyl-parathion in both univariate and multivariate cases is plotted against the background noise. It can be seen that the higher the noise the higher the MDL values are but to a lesser extent in the case of the multivariate approach.

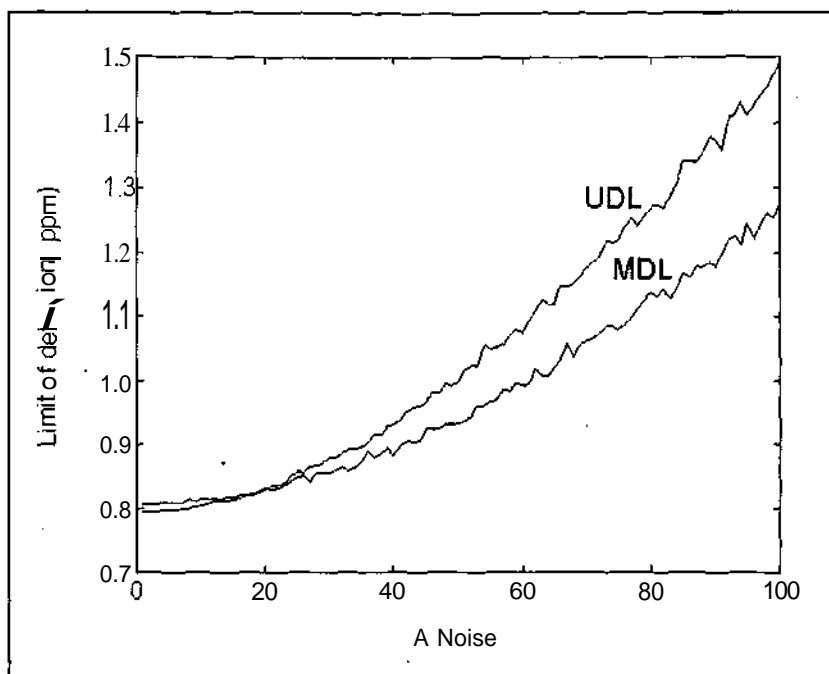


Fig. 6. Univariate, UDL, and multivariate detection limits, MDL, versus background noise for the pesticide methyl-parathion.

CONCLUSIONS

The possibility of calculating detection limits in GC-MS multivariate analysis taking into account the probabilities of committing both type I and type II errors is discussed. The method can be applied to any detection technique hyphenated to a separation technique such as GC, HPLC or capillary electrophoresis, whenever the recorded signals are specific, i.e. with no overlapped peaks or, in general, no

interfering substances which give rise to convoluted signals. In addition, there must be a considerable correlation among the recorded data if the first principal component is to explain nearly the whole variance. If this is not the case, a regression model with more than one principal component should be found and the limits of detection should be estimated using classical or inverse multivariate models [8].

ACKNOWLEDGEMENT

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICYT project BP93-0366) is acknowledged. •

LITERATURE CITED

1. De Bièvre, P.; Kaarls, R.; Peiser, H.S.; Rasberry, S.D.; Reed, W.P. **1996**. *Accred. Qual. Assur.* 10:3-13.
2. Boqué, R.; Rius, F.X. **1994**. *J. Chem. Educ.* 71:230-232.
3. Sarabia, L.; Ortiz, M.C. **1994**. *Trends Anal. Chem.* 13:1-6.
4. Boqué, R.; Rius, F.X. **1996**. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 32:11-23.
5. Delaney, M.F. **1988**. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 3:45-51.
6. Singh, A. **1993**. *Anal. Chim. Acta* 277:205-214.
7. Clayton, C.A.; Hiñes, J.W.; Elkins, P.D. **1987**. *Anal. Chem.* 59:2506-2514.
8. Boqué, R.; Rius, F.X., *J. Chemom.*, submitted for publication.

Capítol 4

Límits de detecció en models de calibració directes

L'anàlisi del treball dut a terme fins el moment i les restriccions de l'estimador derivat en el capítol anterior, van conduir a la necessitat d'avaluar els límits de detecció en un sistema multicomponent pròpiament dit, és a dir, amb presència de l'analít d'interès, a més de substàncies interferents i soroll de fons. Existeixen dos tipus de models de calibració per a predir la concentració de l'analít en estudi en aquest tipus de sistemes: el model directe i el model invers, ja descrits amb anterioritat. El treball que es presenta en aquest capítol es ceneix exclusivament als models de calibració directes. Com ja ha s'ha posat de manifest en el segon capítol, les aproximacions aplicades a aquest model de calibració i descrites fins el moment eren, per una banda, la desenvolupada per Lorber [1] (basada en el concepte del senyal net) i per l'altra la desenvolupada per Bauer *et al.* [2] (basada en la teoria de la propagació d'errors per obtenir la variància de la concentració predita pel model). Ambdues aproximacions utilitzen el criteri de multiplicar la incertesa en la concentració predita per un factor k (normalment igual a 3) a l'hora de derivar les respectives expressions dels límits de detecció, radicant la seva diferència precisament en la forma d'obtenir aquesta incertesa en la concentració.

En l'estudi que s'aborda a continuació es pretén fer un tractament més rigorós del problema des del punt de vista dels tests d'hipòtesi. Així, es posa especial atenció en la distribució que segueix la concentració predita pel model quan l'analít d'interès no es troba present a la mostra (condicions d'hipòtesi nul·la). Tanmateix, s'incorpora en l'estimador el risc existent de cometre falsos negatius i que està relacionat amb la distribució de la concentració predita quan l'analít present es troba al nivell del límit de detecció (condició d'hipòtesi alternativa).

Finalment, esmentar que en la present introducció el tractament del càlcul dels límits de detecció es divideix en dos grans blocs: en el primer s'estudien els models de calibració construïts a partir de mostres d'analít purs, mentre que en el

segon l'estudi es duu a terme en els models de calibració obtinguts a partir de mostres consistents en mescles dels diferents analits.

4.1. Models construïts amb els espectres dels constituents purs

En el model de calibració directe (veure apartat 2.1), la matriu de sensibilitats, S , pot obtenir-se en l'etapa de calibració, bé a partir dels espectres dels analits i interferents purs, o bé a partir dels espectres de mescles. En aquest darrer cas és imprescindible conèixer la concentració, en cada mostra de calibració, de tots els constituents que donen lloc a senyal en l'espectre enregistrat.

En una primera etapa hom va plantejar-se l'avaluació del límit de detecció per un model construït a partir dels constituents purs, utilitzant una metodologia que és una combinació de les aproximacions de Lorber i Bauer *et al.* La idea era derivar el límit de detecció a partir del càlcul de la variància de la concentració predita pel model, però aprofitant el concepte de senyal net de l'analit.

En un model directe construït amb els constituents purs, el senyal net d'un analit k , \mathbf{r}_k^* , és la part del seu espectre, \mathbf{r}_k , que és ortogonal als espectres dels altres constituents purs. Vectorialment, això es pot expressar com:

$$\mathbf{r}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_k \quad (4.1)$$

on \mathbf{R}_k ($(K-1) \times J$) és la matriu dels espectres dels constituents purs, exceptuant-ne l'analit k . Anàlogament, la part de la resposta d'una mostra desconeguda que és única per l'analit k ve donada per:

$$\mathbf{r}_{un,k}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_{un} \quad (4.2)$$

Ambdós costats esquerres de les equacions (4.1) i (4.2) contenen informació només de l'analit k . Això vol dir que $\mathbf{r}_{un,k}^*$ i \mathbf{r}_k^* estan relacionades mitjançant una constant que no és més que el quocient de les concentracions de l'analit k en l'estàndard i en la mostra:

$$c_{0,k} \mathbf{r}_{un,k}^* \sim c_{un,k} \mathbf{r}_k^* \quad (4.3a)$$

o el que és el mateix:

$$c_{0,k} (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_{un} = c_{un,k} (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_k \quad (4.3b)$$

A partir de l'eq. (4.3b) podem arribar, doncs, a quantificar la concentració de l'analit k present a la mostra. La quantificació es pot fer també de manera gràfica si representem $c_{0,k} \mathbf{r}_{un,k}^*$ enfront de \mathbf{r}_k^* (Fig. 4.1). El pendent de la recta de regressió d'aquests punts és precisament $c_{un,k}$.

La solució numèrica es troba després d'operar en l'expressió (4.3b). Si multipliquem ambdós costats de l'equació per la matriu transposta de $(\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}$ obtenim:

$$c_{0,k} \mathbf{r}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_{un} = c_{un,k} \mathbf{r}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_k \quad (4.4)$$

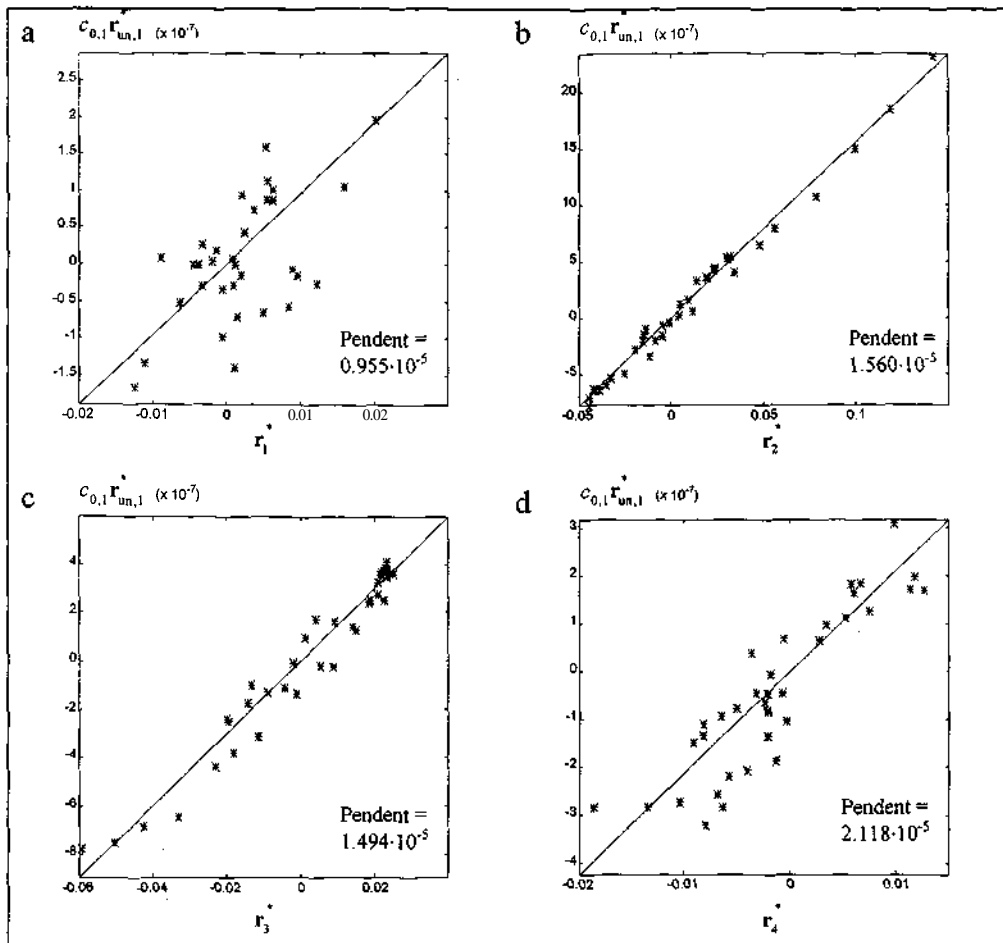


Fig. 4.1. Representació de $c_{0,k} r_{un,k}^*$ enfront de r_k^* per a una mostra que conté quatre nucleòtids: (a) àcid adenílic, (b) àcid citidílic, (c) àcid suanílic i (d) àcid uridílic (Dades extretes de la Ref 1). Els valors dels pendents de les rectes de regressió corresponen a les concentracions de cadascun dels analits en la mostra.

La matriu $(\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)$ es caracteritza per ser simètrica i idempotent i, per tant, compleix les dues propietats següents:

$$(\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)^T = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)$$

$$(\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)^2 = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k)$$

Així doncs, l'eq. (4.4) pot transformar-se en:

$$c_{0,k} \mathbf{r}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_{un} = c_{un,k} \mathbf{r}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_k \quad (4.5)$$

o el que és el mateix (aplicant una altra vegada les dues propietats, abans esmentades, al costat dret de l'expressió):

$$c_{0,k} \mathbf{r}_k^{*T} \mathbf{r}_{un} - c_{un,k} \frac{\|\mathbf{r}_k^*\|^2}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \quad (4.6)$$

Finalment, la concentració predita de Panalit k en la mostra es pot calcular com:

$$c_{un,k} - c_{0,k} \frac{\mathbf{r}_{un}^T \mathbf{r}_k^*}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \quad (4.7)$$

Si s'introdueixen en aquesta expressió els termes d'error tant en l'etapa de calibració com en la de predicció, s'obté:

$$c_{un,k} + \delta c_{un,k} - c_{0,k} (\mathbf{r}_{un} - \mathbf{e}_{un})^T \left(\frac{\mathbf{r}_k^*}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \pm \mathbf{e}_{cal} \right) \quad (4.8)$$

on \mathbf{e}_{un} és l'error associat a la resposta de la mostra desconeguda i \mathbf{e}_{cal} és l'error associat a la resposta de Panalit k en l'etapa de calibració. Cal indicar que en tot el desenvolupament hom està assumint que tant la concentració de Panalit pur en l'etapa de calibració, $c_{0,k}$, com el seu senyal net, \mathbf{r}_k^* , estan lliures de error. Si es desenvolupa l'eq. (4.8), negligint el producte entre dos termes que continguin error, la incertesa en la concentració estimada esdevé:

$$\delta c_{un,k} = c_{0,k} \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{e}_{cal} + c_{0,i} \mathbf{e}_{un}^T \frac{\mathbf{r}_k^*}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \quad (4.9)$$

Cadascun dels termes de l'equació anterior té la forma d'un vector de coeficients multiplicat per un error. Això és la típica situació estadística de la variància d'una suma [3,4], que és igual als coeficients al quadrat multiplicats per la corresponent variància. Canviant, doncs, la notació a variàncies s'obté:

$$\text{var}(c_{un,k}) = c_{0,k}^2 \left(\sum_{j=1}^J r_{un,j}^2 e_{cal,j}^2 + \frac{1}{\|\mathbf{r}_k^*\|^4} \sum_{j=1}^J r_{k,j}^{*2} e_{un,j}^2 \right) \quad (4.10)$$

Si s'assumeix que els errors en l'estimació de les respostes de l'estàndard de calibració i de la mostra desconeguda són iguals i, a més a més, que són constants al llarg de tot l'interval de longituds d'ona (condició d'homoscedasticitat), llavors Peq. (4.10) esdevé:

$$\text{var}(c_{un,k}) = c_{0,k}^2 e_{un}^2 \left(\sum_{j=1}^J r_{un,j}^2 + \frac{1}{\|\mathbf{r}_k^*\|^4} \sum_{j=1}^J r_{k,j}^{*2} \right) \quad (4.11)$$

o el que és el mateix:

$$\text{var}(c_{un,k}) = c_{0,k}^2 e_{un}^2 \left(\|\mathbf{r}_{un}\|^2 + \frac{1}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \right) \quad (4.12)$$

L'únic terme que es desconeix és l'error experimental en la mesura de la resposta de la mostra desconeguda, e_{un} . Tanmateix, es pot estimar, sempre que el nombre de

variables, J , sigui major que el nombre d'analits, K , a partir dels residuals del model de calibració com:

$$\hat{e}_{un} = \left[\frac{\mathbf{r}_{un}^T (\mathbf{I} - \mathbf{R} + \mathbf{R}) \mathbf{r}_{un}}{J - K} \right]^{1/2} \quad (4.13)$$

4.1.1. Càlcul del límit de detecció

La derivació de l'estimador del límit de detecció es va dur a terme a partir de la metodologia desenvolupada per Clayton (descrita al capítol 1), la qual es basa en la teoria dels tests d'hipòtesi i assumeix que els errors (3 (o de 2a espècie) segueixen una distribució t descentrada. En el nostre cas, però, la metodologia va traslladar-se al camp de les concentracions, evitant d'aquesta manera haver de treballar amb distribucions de probabilitat multivariants.

En un mètode de regressió lineal, com el CLS, és ben conegut que els coeficients de regressió segueixen una distribució normal, sempre que els errors de mesura també estiguin distribuïts normalment. Si aquesta condició es compleix, llavors les concentracions predites pel model també segueixen una distribució normal [5]. En aquest cas, i quan la hipòtesi nul·la és certa (la concentració d'analit present és zero), l'estadístic $t = (\hat{c}_k - c_{k|H_0}) / \hat{v}\hat{a}r(c_{k|H_0})^{1/2}$ segueix una distribució t d'Student amb v graus de llibertat, on c_k és el valor estimat de c_k (la concentració real de l'analit en la mostra), $c_{k|H_0} = 0$ i $\hat{v}\hat{a}r(c_{k|H_0})$ és la variància estimada de la concentració en condicions d'hipòtesi nul·la. Existeix, doncs, un valor de concentració crític a partir del qual es rebutjarà la hipòtesi nul·la i hom podrà decidir si l'analit es troba present o no en la mostra:

$$c_{L,k} = t_{\alpha} \hat{\text{var}}(c_{k|H_0})^{1/2} \quad (4.14)$$

En aquesta darrera expressió, t_{α} és el valor de la distribució t d'Student d'una cua amb v graus de llibertat i nivell de significació $(1 - \alpha)$, on α és el risc assumit de cometre un error de la espècie (fals positiu). D'altra banda, si la hipòtesi alternativa és vertadera, $(c_k > c_{k|H_0})$, la potència del test anterior és [6]:

$$1 - \beta = \text{pr} \{ t(\Delta) > t_{\alpha} \} \quad (4.15)$$

on Δ és el paràmetre de descentrat d'una distribució t descentrada amb v graus de llibertat i mitjana $(\hat{c}_k - c_{L,k})$:

$$\Delta = \frac{c_k - c_{k|H_0}}{\hat{\text{var}}(c_{k|H_0})^{1/2}} \quad (4.16)$$

β és el risc de cometre un error de 2a espècie (o fals negatiu). Per un valor fixat de β , el paràmetre de descentrat, $\Delta(\alpha, \beta)$, es pot calcular bé numèricament o a partir de taules estadístiques [6,7]. Això permet, a partir de l'eq. (4.16), calcular la concentració d'analít que, *a priori*, pot ser detectable amb probabilitats d'error α i β prefixades:

$$(\text{LOD})_k = \Delta(\alpha, \beta) \hat{\text{var}}(c_{k|H_0})^{1/2} \quad (4.17)$$

Aquesta aproximació assumeix que la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la és comparable a la variància de la concentració predita al nivell del límit de detecció (condicions d'homoscedasticitat), la qual cosa és realment certa en la majoria de situacions. En el cas que aquesta assumpció no pogués justificarse, el càlcul dels límits de detecció hauria de realitzar-se segons l'aproximació de

Currie, on $L_D = k_\alpha \sigma_0 + k_\beta \sigma_D$, ja que no existeixen taules estadístiques per a calcular el paràmetre de descentrat. Una altra opció seria recórrer al test de Welch [8] per calcular el valor crític $c_{L,k}$ i, posteriorment, aproximar el càlcul del paràmetre de descentrat, $A(a,P)$, a partir de les taules habituals, assumint igualtat de valiancies.

El problema de l'avaluació del límit de detecció radica, doncs, en l'estimació del paràmetre de descentrat i en la variància de la concentració sota la hipòtesi nul·la. En el cas del paràmetre de descentrat la dificultat es centra en el nombre de graus de llibertat utilitzats en el seu càlcul. Aquest nombre depèn de la manera en què s'estima l'error en les mesures experimentals, en aquest cas e_{un} . Si e_{un} s'estima a partir de l'eq. (4.13) el nombre de graus de llibertat és $(J-K)$. Si, pel contrari, e_{un} s'estima a partir de repeticions experimentals, el nombre de graus de llibertat dependrà d'aquest nombre de repeticions. Un cop fixat v , el paràmetre de descentrat es pot calcular en funció de les probabilitats a i P escollides, mitjançant taules estadístiques.

Per la seva banda, la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la es pot expressar com:

$$\hat{v}ar(c_{k|H_0}) = c_{0,k}^2 \hat{e}_{un}^2 \left(\|\mathbf{r}_{un|H_0}\|^2 + \frac{1}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \right) \quad (4.18)$$

on $\mathbf{r}_{un|H_0}$ és la resposta de la mostra sota la hipòtesi nul·la. En aquest cas s'ha assumit també que l'error en la resposta de la mostra desconeguda és igual a l'error en la resposta de la mostra de calibració. Per a l'estimació de $\mathbf{r}_{un|H_0}$ hom disposa de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} . Si es descomposa aquesta resposta com:

$$\mathbf{r}_{un} = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k) \mathbf{r}_{un} + \mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k \mathbf{r}_{un} \quad (4.19a)$$

es reconeix ràpidament que el primer terme correspon al senyal net de Panalit k , $\mathbf{r}_{un,k}^*$. Al segon terme l'anomenem *senyal nul de l'analit* i l'identifiquem com $\mathbf{r}_{un,k}^{nul}$. Es tracta de la part de l'espectre de la mostra desconeguda, corresponent a Panalit k , que està continguda en els espectres dels altres constituents purs. L'eq. (4.19a) es pot expressar, doncs, com:

$$\mathbf{r}_{un} = \mathbf{r}_{un,k}^* + \mathbf{r}_{un,k}^{nul} \quad (4.19b)$$

La matriu $\mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k$ és una matriu de projecció. Si es multiplica per qualsevol vector, com ara \mathbf{r}_{un} , la part de \mathbf{r}_{un} que no estigui continguda en l'espai abarcat per $\mathbf{R}_k^+ \mathbf{R}_k$ s'eliminarà. La Fig. 4.2 mostra el significat d'aquest concepte: si imaginem un pla \mathbf{R}_k definit per dos analits, en obtenir una resposta, \mathbf{r}_{un} , que conté la contribució d'un tercer analit, aquesta pot dividir-se com una part corresponent al nou analit, $\mathbf{r}_{un,k}^*$ (perpendicular al pla definit per \mathbf{R}_k) i una part que pot ser expressada pels altres dos, $\mathbf{r}_{un,k}^{nul}$ (continguda en el pla original).

Finalment, si s'inclou el valor de $\mathbf{r}_{un,k}^{nul}$ en l'eq. (4.18), el límit de detecció per a l'analit k és:

$$(\text{LOD})_k = \Delta(\alpha, \beta) c_{0,k} \hat{e}_{un} \left(\left\| \mathbf{r}_{un,k}^{nul} \right\|^2 + \frac{1}{\left\| \mathbf{r}_k^* \right\|^2} \right)^{Y/2} \quad (4.20)$$

amb \hat{e}_{un} estimada a partir de l'eq. (4.13). Es pot comprovar que l'estimador del límit de detecció derivat depèn de les probabilitats de cometre falsos positius i falsos negatius, així com de l'error experimental en l'estimació de les respostes

instrumentals. Els dos termes que estan dins el parèntesi de l'eq. (4.20) indiquen per si sols la naturalesa multivariant de l'estimador, ja que tant el senyal net com el senyal nul d'un analit depenen de la presència d'altres constituents. Finalment, el límit de detecció és dependent de la mostra desconeguda, ja que el senyal nul d'un analit varia de mostra en mostra. No es pot establir, doncs, un límit de detecció instrumental ni un límit de detecció del mètode; únicament s'està en condicions d'afirmar si un analit es troba present o no en una mostra determinada, amb uns riscos α i β de cometre falsos positius i falsos negatius, respectivament.

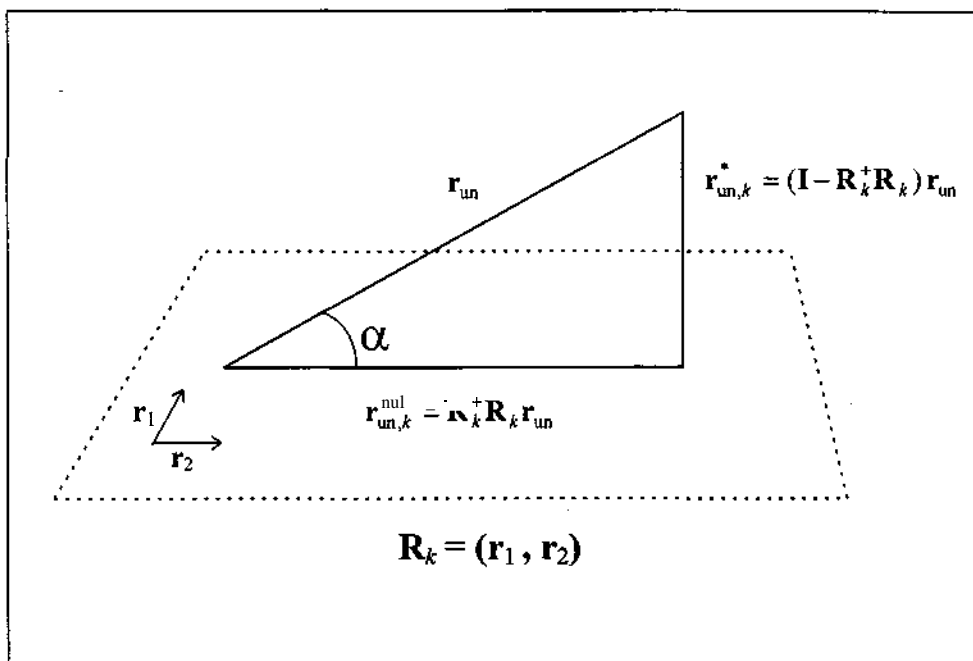


Fig. 4.2. Representació gràfica del concepte de senyal nul d'un analit per un espai bidimensional descrit pels vectors (espectres) r_1 i r_2 .

En el cas que $\|r_{un,nul}\| \ll 1/\|r_k\|^2$, l'expressió del límit de detecció es transforma en:

$$(\text{LOD})_k = \frac{\Delta(\alpha, \beta) c_{0,k} \hat{e}_{\text{un}}}{\|r_k^*\|} \quad (4.21)$$

Si es trien unes probabilitats α i β de manera que $\Delta(\alpha, \beta) = 3$, l'equació anterior esdevé la definició convencional del límit de detecció: tres vegades l'error en la mesura experimental de les respostes dividit per la sensibilitat, la qual, per l'anàlisi k , ve donada per $\|r_k^*\| c_{0,k}$.

4.1.2. Validació de l'estimador desenvolupat

L'estimador desenvolupat es va utilitzar per a calcular els límits de detecció de quatre nucleòtids determinats mitjançant espectroscopia UV-Vis [9]. Aquestes mateixes dades experimentals van ser utilitzades per Lorber en el seu primer treball [1]; per tant, els resultats obtinguts es van comparar amb els proporcionats pel mateix autor. Les dades consisteixen en una matriu de respostes, $\mathbf{R}(4 \times 36)$, corresponents als espectres dels quatre nucleòtids, enregistrats entre 220 i 290 nm (Fig. 4.3), i una matriu de concentracions diagonal, $\mathbf{C}_0(4 \times 4)$, corresponent als analits purs en cadascun dels estàndards de calibració.

La mostra desconeguda es va obtenir preparant una mescla dels quatre nucleòtids amb les mateixes concentracions que les dels estàndards de calibració. La resposta d'aquesta mostra també es va obtenir de les dades de la Ref. 9. Els límits de detecció es van calcular a partir de l'eq. (4.20), amb e_{un} obtingut a partir de l'eq. (4.13). El paràmetre de descentrat, $A(a, p)$, es va calcular mitjançant les taules subministrades per Owen [6], les quals es van introduir en el mateix programa de càlcul.

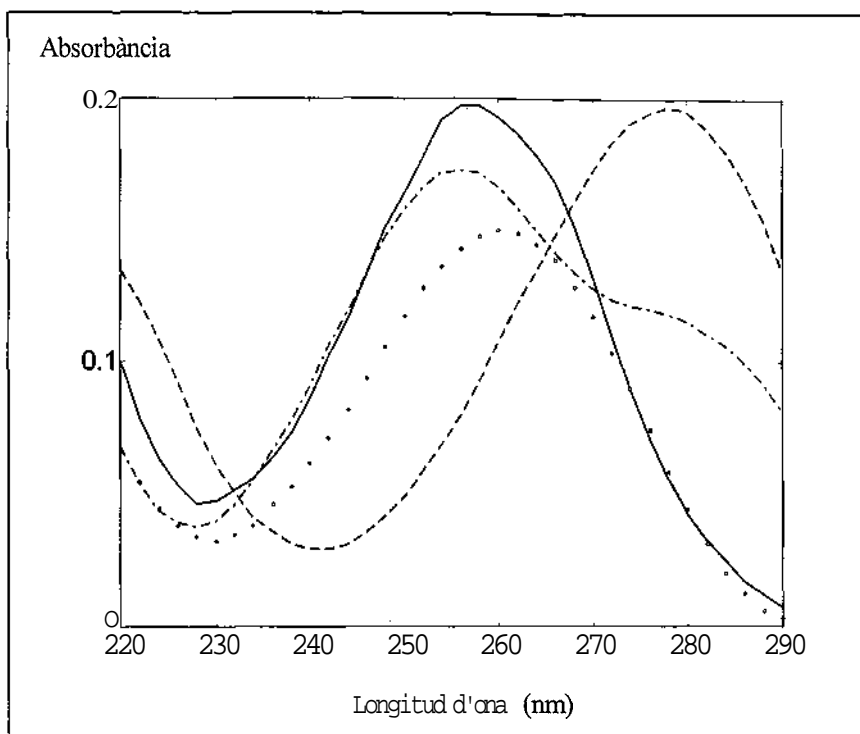


Fig. 4.3. Espectres dels constituents purs: (-) àcid adenílic, (---) àcid citidílic, (-•) àcid suanílic i (•) àcid uridílic

En la Taula IV. 1 es mostren els resultats de la comparació dels límits de detecció trobats amb els proporcionats per Lorber, i també amb els calculats a partir de la definició convencional, eq. (4.21).

	Definició convencional	Lorber 1986	Nostre estimador
Àcid adenílic	0.42	0.60	0.43
Àcid citidílic	0.09	0.10	0.11
Àcid suanílic	0.18	0.20	0.19
Àcid uridílic	0.56	0.87	0.56

Taula IV.1. Comparació dels límits de detecció per als quatre nucleòtids, calculats a partir de les tres aproximacions descrites.

En el cas del nostre estimador hom va assignar, a efectes comparatius, un valor de 3 al paràmetre de descentrat. Aquest valor equival, per a una probabilitat $\alpha = 0.05$ i $\nu = 32$ graus de llibertat, a una probabilitat de cometre falsos negatius, $p \approx 0.10$. Els resultats obtinguts van ser clarament comparables, amb l'avantatge addicional de que el nou estimador, basat en la distribució de les concentracions sota la hipòtesi nul·la, permet calcular els límits *de* detecció en funció de les probabilitats α i p escollides per l'usuari.

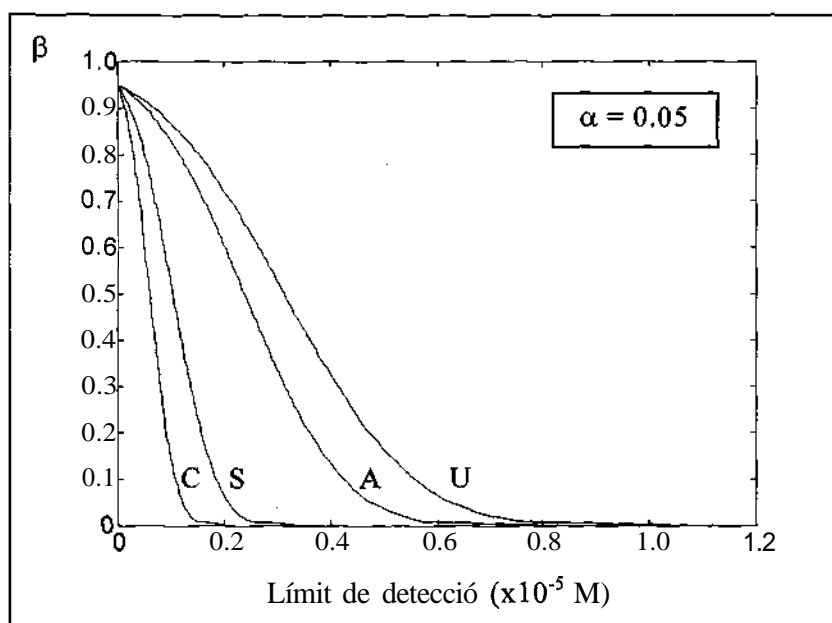


Fig. 4.4. Corbes característiques dels quatre nucleòtids: (C) àcid citidílic, (S) àcid suaníllic, (A) àcid adenílic i (U) àcid uridílic, per a una probabilitat d'error $\alpha = 0.05$.

Aquest nou estimador permet també construir les *corbes característiques de detecció* per un analit determinat, *Le*, les representacions bidimensionals, per una probabilitat d'error α prefixada, de la relació existent entre la concentració de l'analit i la probabilitat d'error p . Aquest tipus de corbes permet establir la capacitat de detecció d'un mètode analític. L'estudi de la seva dependència amb

els paràmetres experimentals pot ser molt útil en la decisió d'escollir entre diferents mètodes d'anàlisi. Aquestes representacions poden convertir-se en tridimensionals si s'hi incorporen els graus de llibertat utilitzats en el test i que venen fixats, com ja s'ha dit, per la forma com s'avalua l'error de mesura. La Fig. 4.4 mostra les corbes característiques de detecció pels quatre nucleòtids en estudi i per a una probabilitat d'error $\alpha = 0.05$.

4.2. Models construïts amb els espectres de les mescles

L'estimador desenvolupat anteriorment presenta la limitació de que només és aplicable en cas que el model es construeixi amb els espectres dels analits i dels interferents purs. En molts casos, però, s'utilitzen com a estàndards de calibració mescles de tots els constituents. Existeixen dues raons fonamentals per actuar d'aquesta manera: la primera és que enregistrant els espectres de les mescles d'acord amb un disseny experimental prèviament establert s'obté una incertesa menor en la estimació dels coeficients del model (elements de la matriu S). Aquest és simplement un raonament teòric; a la pràctica és molt difícil demostrar-ho, ja que matemàticament implicaria obtenir la variància d'una matriu. Tanmateix, experimentalment sí que es pot demostrar, comparant les habilitats de predicció dels dos models: l'un, construït amb els constituents purs, i l'altre, construït amb les mescles. La segona raó és que les mostres de calibració són més semblants a les mostres desconegudes, ja que totes contenen tots els analits. Això suposa un gran avantatge en el cas que es produïssin interaccions entre els analits en mostres reals, ja que aquestes interaccions podrien modelar-se en l'etapa de calibració.

En una primera etapa, el procediment utilitzat per derivar l'estimador del límit de detecció va ser el mateix que el presentat en l'apartat anterior. L'objectiu era

l'obtenció d'una expressió per la variància de la concentració predita basada en el concepte del senyal net. En el cas d'un model construït amb mescles, el senyal net d'un analit k es pot expressar com [10]:

$$\mathbf{s}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k \quad (4.22)$$

on S_k és la sensibilitat de Panalit k o, el que és el mateix, l'espectre de Panalit pur normalitzat a concentració unitat (columna k de la matriu S). \mathbf{S}_k és la matriu de sensibilitats de tots els constituents excepte Panalit k (la matriu S sense la columna k). De la mateixa manera, la part de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} , que és única per a Panalit k ve donada per:

$$\mathbf{r}_{un,k}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{r}_{un} \quad (4.23)$$

Tant \mathbf{s}_k^* com $\mathbf{r}_{un,k}^*$ contenen informació només de Panalit k i, per tant, estan relacionades, mitjançant una constant que no és més que la concentració de Panalit k en la mostra desconeguda:

$$(\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{r}_{un} = c_{un,k} (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k \quad (4.24a)$$

o el que és el mateix:

$$\mathbf{r}_{un,k}^* = c_{un,k} \mathbf{s}_k^* \quad (4.24b)$$

Per resoldre aquesta equació i trobar la concentració de Panalit k en la mostra desconeguda, $c_{un,k}$, es pot utilitzar el mateix procediment descrit per Lorber [1] per derivar Peq. (4.7). Si es multipliquen ambdós costats de Peq. (4.24a) per la transposta de $(\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k$ s'obté:

$$\mathbf{s}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{r}_{\text{un}} = c_{\text{un},k} \mathbf{s}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k \quad (4.25)$$

La matriu $(\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)$ és simètrica i idempotent i, per tant, compleix dues propietats:

$$(\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)^T = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)$$

$$(\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)^2 = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+)$$

Fent ús d'aquestes dues propietats, l'eq. (4.25) pot transformar-se en:

$$\mathbf{s}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{r}_{\text{un}} = c_{\text{un},k} \mathbf{s}_k^T (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k \quad (4.26)$$

o el que és el mateix (aplicant novament les propietats abans esmentades al costat dret de l'expressió):

$$\mathbf{s}_k^{*T} \mathbf{r}_{\text{un}} = c_{\text{un},k} \|\mathbf{s}_k^*\|^2 \quad (4.27)$$

Finalment, la concentració desconeguda de l'anàlit k ve donada per:

$$c_{\text{un},k} \sim \frac{\mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{s}_k^*}{\|\mathbf{s}_k^*\|^2} \quad (4.28)$$

on \mathbf{s}_k^* és el vector de coeficients del model per a l'anàlit k , que normalment es representa per \mathbf{b}_k en l'expressió $c_{\text{un},k} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{b}_k$. Si s'introdueixen els termes d'error de les etapes de calibració i predicció en l'expressió anterior s'obté:

$$c_{un,k} + \delta c_{un,k} = (\mathbf{r}_{un} \pm \mathbf{e}_{un})^T \left(\frac{\mathbf{s}_k^*}{\|\mathbf{s}_k^*\|^2} \pm \mathbf{e}_{cal} \right) \quad (4.29)$$

on \mathbf{e}_{un} és l'error associat a la resposta de la mostra desconeguda i \mathbf{e}_{cal} és l'error associat a l'estimació del vector de sensibilitats, \mathbf{s}_k , de l'analit k en l'etapa de calibració. Negligint el producte entre dos termes que contenen error, la incertesa en la concentració estimada es pot calcular desenvolupant l'eq. (4.29):

$$\delta c_{un,k} = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{e}_{cal} + \mathbf{e}_{un}^T \frac{\mathbf{s}_k^*}{\|\mathbf{s}_k^*\|^2} \quad (4.30)$$

Aquesta equació té la forma d'uns vectors de coeficients multiplicats per uns errors, la qual cosa s'assembla a la variància d'una suma [3,4], que és igual als coeficients al quadrat multiplicats per la corresponent variància. Canviant la notació a variàncies s'obté:

$$\text{var}(c_{un,k}) = \sum_{j=1}^J r_{un,j}^2 e_{cal,j}^2 + \frac{1}{\|\mathbf{s}_k^*\|^4} \sum_{j=1}^J s_{k,j}^{*2} e_{un,j}^2 \quad (4.31)$$

Assumint que els errors en l'estimació de \mathbf{r}_{un} i \mathbf{s}_k són constants al llarg de tot l'interval de longituds d'ona, aquests poden sortir fora del sumatori, obtenint-se:

$$\text{var}(c_{un,k}) = e_{cal}^2 \sum_{j=1}^J r_{un,j}^2 + \frac{e_{un}^2}{\|\mathbf{s}_k^*\|^4} \sum_{j=1}^J s_{k,j}^{*2} \quad (4.32)$$

o el que és el mateix:

$$\text{var}(c_{\text{un},k}) = e_{\text{cal}}^2 \|\mathbf{r}_{\text{un}}\|^2 + \frac{e_{\text{un}}^2}{\|\mathbf{s}_k\|^2} \quad (4.33)$$

e_{un} pot calcular-se a partir de repeticions experimentals o bé estimar-se a partir de l'eq. (4.13). El problema d'aquesta darrera expressió és el càlcul experimental del terme e_{cal} , l'error en l'estimació del vector de sensibilitats de Panalit k en l'etapa de calibració. No existeix una expressió matemàtica per a la seva estimació i a més, no es pot assumir que e_{cal} és igual a e_{un} , ja que els valors de la variància de la concentració predita sortirien anormalment alts.

Aquest fet va posar de manifest la necessitat de recerca d'una nova expressió per a l'error de predicció que tingués en compte totes les fonts d'error associades al model, tant en l'etapa de calibració com en la de mesura de la mostra desconeguda. Hom va adoptar el treball desenvolupat per Bauer *et al.* [2] uns anys abans, i que ha estat discutit al capítol 2. En aquest treball els autors, a partir de l'equació de predicció d'un model directe, i mitjançant la teoria de propagació d'errors, van derivar una expressió per a la variància de la concentració predita, que té la forma:

$$\begin{aligned} \text{var}(c_{\text{un},k}) = & \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (S_{k,j}^+ C_{i,n}^+ c_{\text{un},n})^2 [\text{var}(R_{j,i}) + \text{var}(B_{j,i})] + \\ & + \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{i,n}^+ c_{\text{un},n})^2 \text{var}(C_{k,i}) + \sum_{j=1}^J (S_{k,j}^+)^2 [\text{var}(r_{\text{un},j}) + \text{var}(b_j)] \end{aligned} \quad (4.34)$$

L'expressió té en compte la contribució de l'error en la mesura del blanc, tant en les mesures de les mostres de calibració, $B_{j,i}$, com en la mesura de la mostra desconeguda, b_j . Assumeix també que els errors experimentals en la mesura de les respostes i el blanc, tant en l'etapa de calibració com en la de predicció, així com l'error en les concentracions dels estàndards de calibració, són heteroscedàstics i

no estan correlacionats entre ells (no es tenen en compte els termes de covariància en el desenvolupament de la propagació d'errors).

Els únics termes d'aquesta equació que no es coneixen i s'han d'estimar són les variàncies corresponents a les mesures dels senyals (dels estàndards, dels blancs i de les mostres) i de les concentracions dels analíts en l'etapa de calibració. Per tal que aquestes estimacions siguin una bona aproximació dels errors reals, és necessari dur a terme un gran nombre de repeticions. Bauer *et al.* aconsellen que en certs casos, sobretot quan es té un bon coneixement de la tècnica, poden utilitzar-se valors prefixats de l'error, sense necessitat de dur a terme cap repetició. Paral·lelament, si hom pot assumir que els errors són homoscedàstics i, fins i tot, que la contribució de l'error degut al blanc és negligible, l'eq. (4.34) es simplifica considerablement:

$$\begin{aligned} \text{var}(c_{\text{un},k}) = & \text{var}(R) \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^N \mathcal{E} \left(S_{k,j}^+ C_{i,n}^+ c_{\text{un},n} \right)^2 + \\ & + \text{var}(C) \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^N \left(C_{i,n}^+ c_{\text{un},n} \right)^2 + \text{var}(r_{\text{un}}) \sum_{j=1}^J \left(S_{k,j}^+ \right)^2 \end{aligned} \quad (4.35)$$

4.2.1. Càlcul del límit de detecció

Si les concentracions predites pel model segueixen una distribució normal, llavors per un analít k , el seu nivell crític, així com el seu límit de detecció, es poden calcular mitjançant les equacions (4.14) i (4.17), respectivament. Els dos problemes que es plantegen són, per un costat, l'estimació del nombre de graus de llibertat per al càlcul del paràmetre de descentrat, $A(a,p)$, i, per l'altre, l'estimació de la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la, $\text{var}(c_{k|H_0})$. Una primera aproximació, la més simple, seria l'enregistrament d'una sèrie de

repeticions de blancs analítics, *i.e.* mostres sense presència de l'analit k d'interès. La desviació estàndard al quadrat dels valors de les concentracions de l'analit k predites pel model proporciona una bona estimació de $\text{var}(c_{k|H_0})$. Els graus de llibertat per a calcular el paràmetre de descentrat serien en aquest cas $(n_{bl} - 1)$, on n_{bl} és el nombre de repeticions del blanc. En qualsevol cas, el treball experimental addicional que suposa la repetició dels blancs és un desavantatge d'aquesta aproximació; és preferible estimar el terme $\text{var}(c_{k|H_0})$ a partir del model de calibració. Això suposa desenvolupar l'eq. (4.35) sota la condició d'hipòtesi nul·la, per obtenir:

$$\begin{aligned} \hat{\text{var}}(c_{k|H_0}) = & \text{var}(R) \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (S_{k,j}^+ C_{i,n}^+ c_{n|H_0})^2 + \\ & + \text{var}(C) \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{i,n}^+ c_{n|H_0})^2 + \text{var}(r_{un|H_0}) \sum_{j=1}^J (S_{k,j}^+)^2 \end{aligned} \quad (4.36)$$

En aquesta expressió, $\text{var}(r_{un|H_0})$ és la variància de resposta de la mostra desconeguda sota la hipòtesi nul·la i c_{n,H_0} són les concentracions dels K analits predites per a la resposta $r_{un|H_0}$. En conseqüència, $c_{n|H_0} = 0$ quan $n = k$. El problema és l'estimació de $r_{un|H_0}$, la resposta de la mostra desconeguda sota la hipòtesi nul·la. Aplicant el mateix procediment que el desenvolupat en l'apartat 4.1, el valor de $r_{un|H_0}$ es pot substituir pel senyal nul de l'analit k , $r_{un,k}^{\text{nul}}$. A partir d'aquesta resposta poden estimar-se les diferents concentracions $c_{n|H_0}$.

La segona dificultat important que sorgeix és el càlcul del nombre de graus de llibertat que es necessiten per a l'obtenció del paràmetre de descentrat, ja que l'expressió de la variància de la concentració predita, eq. (4.36), és més complexa i conté diverses contribucions d'error. Una aproximació a l'estimació d'aquests graus de llibertat es pot obtenir aplicant la regla de Satterthwaite [11], eq. (1.38), descrita al primer capítol.

El límit de detecció s'obté, doncs, a partir de l'eq. (4.17) amb el terme $\hat{\text{var}}(c_k|H_0)$ calculat segons l'eq. (4.36) i els graus de llibertat estimats a partir de la regla de Satterthwaite. Solament si l'error en les respostes i concentracions de l'etapa de calibració és negligible comparat amb l'error en la mesura de la resposta de la mostra desconeguda, el límit de detecció es pot expressar com:

$$(\text{LOD})_k = \Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}}|H_0) \left[\sum_{j=1}^J (s_{k,j}^+)^2 \right]^{1/2} \quad (4.37)$$

L'equació (4.37) es pot **rescriure**, si considerem que $\text{var}(r_{\text{un}}|H_0)$ és equivalent a $\text{var}(r_{\text{un}})$, com:

$$(\text{LOD})_k = \Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}})^{1/2} \|S_{k-\text{fila}}^+\| \quad (4.38)$$

on s'ha aplicat la norma euclídea al vector de la fila k de la matriu S^+ . El terme $\|S_{k-\text{fila}}^+\|$ es pot identificar com la inversa de la sensibilitat multivariant de l'analít k , definida per Lorber com $\|s_k^*\|$. En conseqüència, escollint unes probabilitats α i β , de manera que $\Delta(\alpha, \beta) = 3$, hom arriba a la definició del límit de detecció com tres vegades l'error en les mesures dividit per la sensibilitat. La definició de sensibilitat multivariant feta per Lorber té en compte el grau de colinearitat (ortogonalitat) entre les respostes dels constituents purs [10], la qual cosa és, en definitiva, una mesura de la selectivitat. Per tant, un major solapament (colinearitat) de les respostes suposa un menor senyal net per a l'analít k , una menor sensibilitat i finalment, a través de l'eq. (4.38) un límit de detecció major. La influència de la sensibilitat i selectivitat de l'analít en estudi sobre el seu límit de detecció es discuteix tot seguit.

4.2.2. Influència de la sensibilitat i de la selectivitat de l'analit en el seu límit de detecció

La sensibilitat d'una analit k , $(\text{SEN})_k$, definida per Lorber ve donada per:

$$(\text{SEN})_k = \left\| \mathbf{s}_k^* \right\| \quad (2.7)$$

En l'apartat (4.2.1) hom ha parlat breument de la relació existent entre la sensibilitat d'un analit k i el grau de colinearitat entre la seva resposta i les respostes dels altres constituents presents. Bauer *et al.* [12] van demostrar de manera elegant que la sensibilitat de Lorber es pot expressar també com:

$$(\text{SEN})_k = \frac{1}{\left\| \mathbf{S}_{k\text{-fila}}^+ \right\|} = \frac{1}{\left\{ (\mathbf{S}^T \mathbf{S})_{kk}^{-1} \right\}^{1/2}} \quad (4.39)$$

Els elements diagonals de la matriu $(\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1}$ s'anomenen coeficients de variància i estan directament relacionats amb l'error de predicció [12]. Si existeix un solapament gran entre els espectres dels diferents analits es produeix un augment en la dependència lineal entre les columnes de \mathbf{S} (els elements de les quals són els coeficients d'absortivitat molar per cada longitud d'ona mesurada), i això es tradueix en uns coeficients de variància elevats. A mesura que el solapament va disminuint, la matriu $(\mathbf{S}^T \mathbf{S})$ s'assembla cada vegada més a una matriu diagonal, la qual té unes propietats de propagació d'errors ideals. El principal avantatge de la definició de sensibilitat multivariant feta per Lorber és que, a través d'un concepte analític, pot interpretar-se, de forma simple, un concepte estadístic que proporciona informació sobre el grau de colinearitat del sistema, com són els coeficients de variància.

Autors com Kalivas [13] defineixen la sensibilitat local per un analit k simplement com la norma del vector columna de la matriu S corresponent a Panalit:

$$(\text{LSEN})_k = \|s_k\| \quad (4.40)$$

La diferència clara entre aquesta darrera definició i la postulada per Lorber, eq. (2.7), és que aquesta té en compte tota la intensitat d'absorbància de l'espectre de Panalit k , mentre que en la primera només M intervé aquella part de l'espectre que és independent dels espectres dels altres analits presents a la mostra.

Per altra banda, la selectivitat d'un analit k , $(\text{SEL})_k$, definida per Lorber s'expressa com el quocient:

$$(\text{SEL})_k = \frac{\|s_k^*\|}{\|s_k\|} \quad (2.8)$$

Els valors de $(\text{SEL})_k$ oscil·len entre 0 (selectivitat nul·la) i 1 (màxima selectivitat). Òbviament, la selectivitat òptima s'assoleix quan el senyal net de l'analit k és igual al senyal mesurat. En la Fig. 4.5 es pot observar la interpretació geomètrica del concepte de selectivitat en relació al senyal net de Panalit. La selectivitat definida per Lorber és el sinus de l'angle format entre el vector de sensibilitats parcials de Panalit, s_k , i la seva projecció en l'espai definit pels altres constituents presents a la mostra.

Amb totes aquestes definicions, l'expressió del límit de detecció simplificada (després d'assumir que els errors en la calibració són negligibles), eq. (4.38), pot escriure's com:

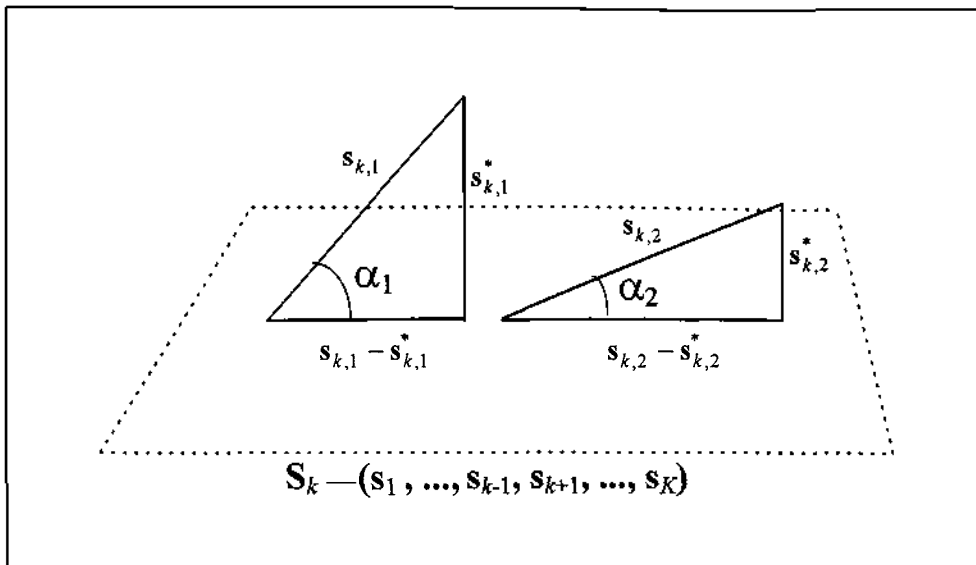


Fig. 4.5. Representació gràfica del concepte de selectivitat d'un analit. Es pot comprovar que la selectivitat de l'analit 1 és major que la de l'analit 2, ja que $\sin(\alpha_1) > \sin(\alpha_2)$.

$$(\text{LOD})_k = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}})^{1/2}}{\|s_k^*\|} = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}})^{1/2}}{(\text{SEN})_k} \quad (4.41)$$

o bé:

$$(\text{LOD})_k = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}})^{1/2}}{(\|s_k^*\| / \|s_k\|) \|s_k\|} = \frac{\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{\text{un}})^{1/2}}{(\text{SEL})_k (\text{LSEN})_k} \quad (4.42)$$

Es pot observar que el límit de detecció per a un analit depèn de manera indirecta de la seva selectivitat; és a dir, depèn d'una contribució conjunta entre selectivitat i sensibilitat local, contribució recollida en la sensibilitat 'neta' de Lorber.

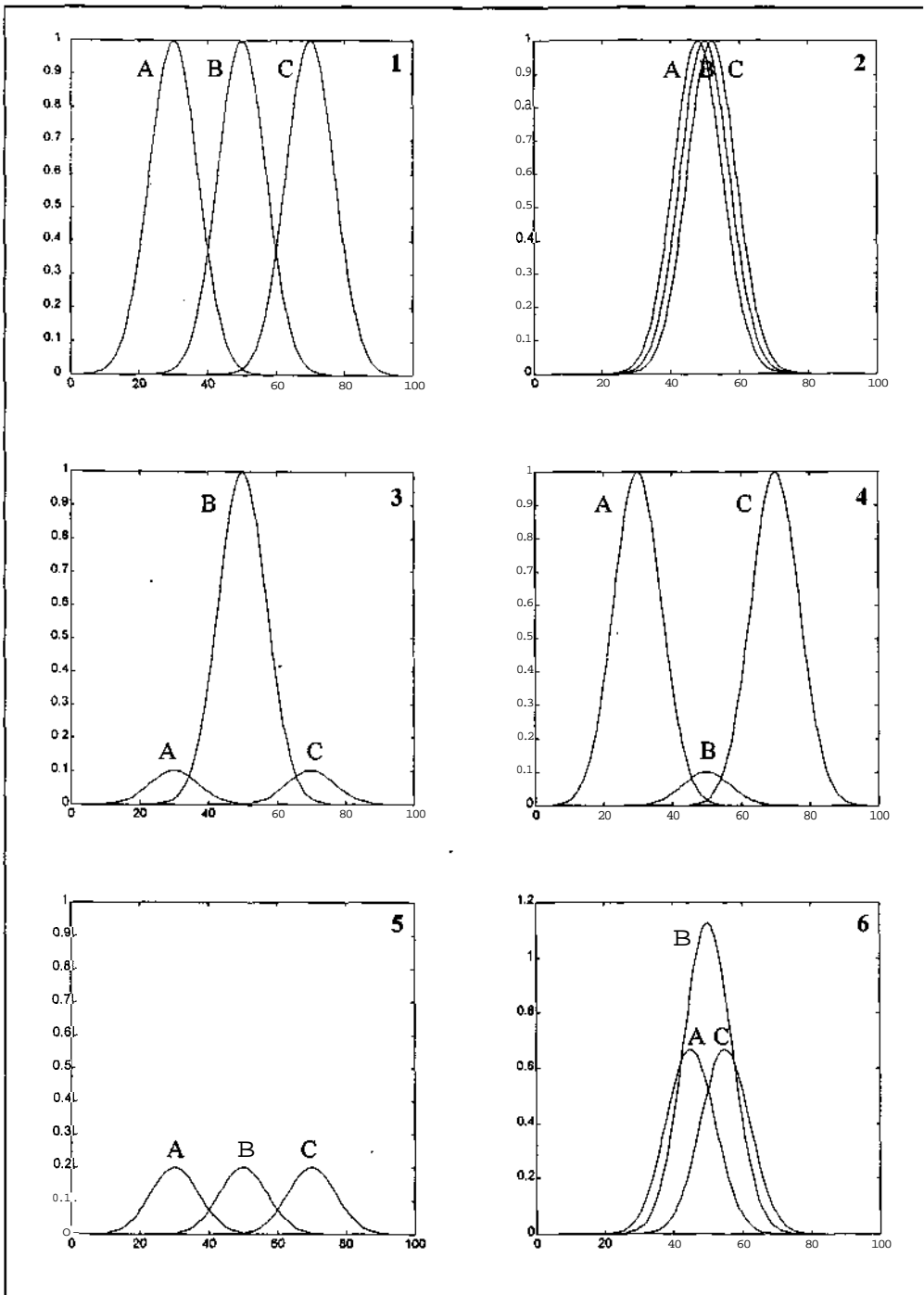


Fig. 4.6. Columnes de la matriu S a partir dels perfils espectrals gaussianos simulats de tres constituents purs (situacions 1-6).

Per veure els efectes d'aquests paràmetres de qualitat sobre els valors dels límits de detecció, es van simular els espectres de tres constituents purs i es van crear sis matrius S pels analits en estudi. Cadascuna d'elles recollia diferents valors de selectivitat i sensibilitat. Els espectres dels analits, normalitzats a concentració unitat (columnes de la matriu S), per a cadascuna de les situacions es mostren a la Fig. 4.6.

La Taula IV.2 mostra la comparació dels valors de sensibilitat i selectivitat, així com dels límits de detecció obtinguts per a les sis situacions. El càlcul del límit de detecció s'ha efectuat a partir de l'eq. (4.38), suposant un valor constant igual a la unitat pel terme $\Delta(\alpha, \beta) \text{var}(r_{un})^{1/2}$.

Analits		$(SEN)_k$	$(LSEN)_k$	$(SEL)_k$	$(LOD)_k$
Situació 1	A	3.5071	3.5402	0.9906	0.2851
	B	3.4748	3.5402	0.9815	0.2878
	C	3.5071	3.5402	0.9906	0.2851
Situació 2	A	0.1944	3.5402	0.0549	5.1446
	B	0.1001	3.5402	0.0283	9.9901
	C	0.1944	3.5402	0.0549	5.1446
Situació 3	A	0.3507	0.3540	0.9906	2.8514
	B	3.4748	3.5402	0.9815	0.2878
	C	0.3507	0.3540	0.9906	2.8514
Situació 4	A	3.5071	3.5402	0.9906	0.2851
	B	0.3475	0.3540	0.9815	2.8779
	C	3.5071	3.5402	0.9906	0.2851
Situació 5	A	0.7014	0.7080	0.9906	1.4257
	B	0.6950	0.7080	0.9815	1.4389
	C	0.7014	0.7080	0.9906	1.4257
Situació 6	A	0.7014	2.3776	0.2950	1.4257
	B	0.6950	3.9822	0.1745	1.4389
	C	0.7014	2.3776	0.2950	1.4257

Taula IV.2. Comparació de les mesures de **colinearitat** i límit de detecció per a les situacions descrites a la Fig. 4.6.

Es pot apreciar en la taula que la situació clarament més favorable és la n° 1, amb valors de sensibilitat i selectivitat elevats, mentre que la més desfavorable (situació n° 2) ve molt influenciada per uns valors de selectivitat baixos. Es pot comprovar també que, tot i tenir valors de selectivitat elevats, això no garanteix uns límits de detecció baixos, tal com s'aprecia en les situacions n° 3 i 4; es requereixen, a més a més, uns valors de sensibilitat local elevats. El cas més clar que els dos paràmetres es combinen el trobem en les situacions n° 5 i 6, on s'obtenen els mateixos valors de límit de detecció amb sistemes clarament més colinears, però que tenen elevades sensibilitats.

Finalment, cal esmentar que en tota aquesta discussió no ha intervingut per a res la resposta de la mostra desconeguda, encara que té una importància fonamental en el valor final dels límits de detecció. Recordem que en l'estimador del límit de detecció, eq. (4.17), apareix implícitament aquesta mostra desconeguda, ja que d'ella se'n deriva el senyal nul de l'analít k i d'aquí les concentracions $c_{n,H0}$.

4.2.3. Validació de l'estimador desenvolupat

Amb l'objectiu de comprovar la seva validesa, l'estimador es va aplicar en l'anàlisi mitjançant un sistema d'injecció en flux (*Flow Injection Analysis*, FIA) amb detecció espectrofotomètrica de quatre pesticides de la família dels carbamats: el carbaryl (1-naftilmetil-carbamat), el carbofurà (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-*N*-metilcarbamat), el propoxur (2-isopropoxifenil-metil-carbamat) i Pisoprocarb (*o*-cumenilmetil-carbamat). En la Fig. 4.7 es mostren els espectres dels quatre pesticides purs en una concentració de 10 ppm.

L'estimador del límit de detecció ha de ser útil en condicions multivariants pròpiament dites o, el que és el mateix, quan l'analít es determina en presència

d'interferents. És per aquest motiu que el pesticida triat per a validar l'estimador va ser l'isoprocarb, degut al seu solapament accentuat amb el carbofurà i el propoxur.

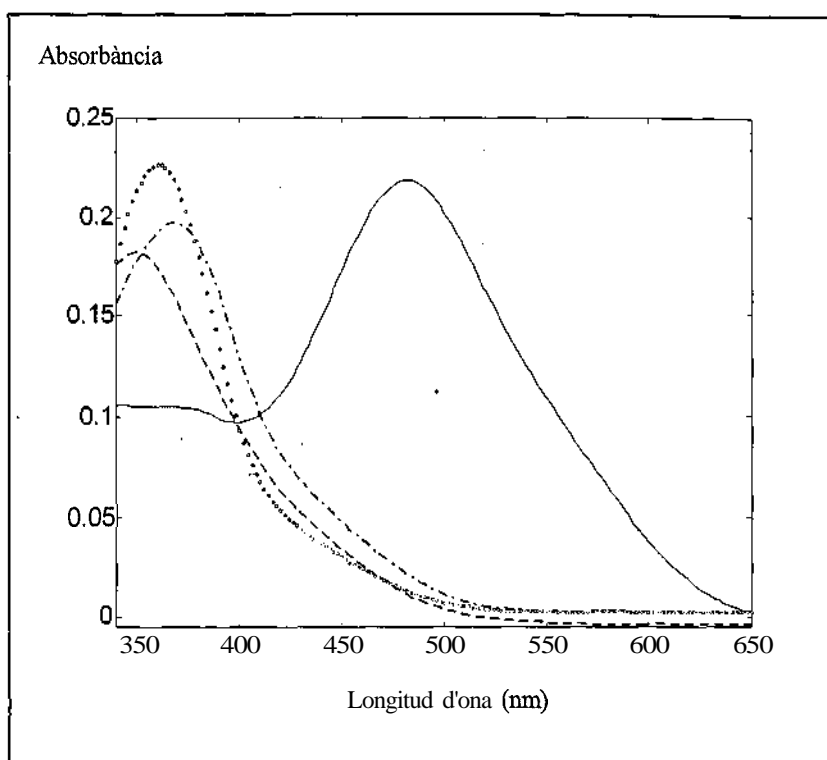


Fig. 4.7 Espectres dels pesticides purs: (-) carbaryl, (- -) carbofurà, (- · - ·) propoxur i (·) isoprocarb.

La metodologia de validació ideada va consistir en construir una sèrie de mostres amb diferents concentracions conegudes de l'analit en estudi (en uns nivells prou baixos com per pensar que estan propers al límit de detecció de l'analit), i diferents nivells de concentració dels altres analits presents. Per a cada nivell de concentració es va preparar un nombre elevat de mostres. Després d'analitzar-se es va obtenir una distribució de valors de concentració predits pel model de

calibració. Aquestes concentracions predites es van comparar amb el nivell crític, $c_{L,k}$, calculat amb un nivell de significació α . Si existís alguna concentració per sota d'aquest nivell, s'adoptaria la decisió de dir que l'analit no es troba present en aquella mostra, quan en realitat hi és i en un nivell perfectament conegut. Hom estaria cometent, per tant, un fals negatiu. El nombre de vegades que això succeís, sobre el total de mostres analitzades, seria un bon indicador del percentatge experimental de falsos negatius que es trobarien. La segona etapa del procés de validació consisteix en la comparació d'aquest percentatge experimental amb el teòric. Per a cada nivell de concentració de l'analit k , el paràmetre de descentrat es pot calcular com:

$$\Delta(\alpha, \beta) = \frac{c_k}{\hat{\text{var}}(c_k|H_0)^{1/2}} \quad (4.43)$$

Un cop calculat el paràmetre de descentrat, mitjançant les taules és possible, per a un nivell de significació α fixat i uns determinats graus de llibertat, trobar el valor de la probabilitat de cometre un error de 2a espècie, β . Aquesta probabilitat teòrica s'ha de comparar amb l'experimental trobada anteriorment.

El desenvolupament de l'estimador, així com els resultats de la seva validació, es presenten en la part final del capítol, dins l'article titulat *Detection Limits in Classical Multivariate Calibration Models*, que ha estat acceptat per a publicació a la revista *Journal of Chemometrics*.

4.2.4. Aplicacions

L'estimador del límit de detecció desenvolupat es va aplicar al càlcul dels límits de detecció de quatre pesticides de la família dels carbamats (Fig. 4.5), determinats

mitjançant un mètode FIA amb detecció espectrofotomètrica. Els límits de detecció es van calcular a partir de l'expressió simplificada, eq. (4.38), obtenint-se també les corbes característiques de detecció per a cadascun dels pesticides. Els resultats obtinguts es descriuen al final del capítol, en el treball titulat *Figures of Merit in Multivariate Calibration. Determination of Four Pesticides in Water by FIA and Spectrophotometric Detection*, que es troba pendent de publicació a la revista *Analytica Chimica Acta*.

En tots els casos, el paràmetre de descentrat, $A(a,P)$, es va calcular a partir d'un algorisme de creació pròpia, programat en llenguatge Matlab (MATLAB Ver 4.0. Mathworks Inc. 1993) i incorporat en un programa general de càlcul de límits de detecció. L'algorisme està basat en l'aproximació feta per Sarabia i Ortiz [14]. La descripció del programa general i de l'algorisme en concret es presenta al final del present capítol, en l'article titulat *Computing Determination Limits in Multicomponent Spectroscopic Analysis*, i que ha estat acceptat per a publicació a la revista *Trends in Analytical Chemistry*. En aquest darrer treball també es presenta una comparació entre els límits de detecció obtinguts amb el nostre algorisme i els calculats a partir de l'aproximació de Lorber [1] modificada, eq. (2.9).

4.3. Referències

1. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167.
2. G. Bauer; W. Wegscheider; H.M. Ortner, *Fres. J. Anal. Chem.*, 340 (1991) 135.
3. A. Lorber; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 93.
4. A. Lorber, *Comunicació personal*.
5. K. Faber; B.R Kowalski, *Comunicació personal*.
6. D.B. Owen, *J. Am. Stat. Assoc.*, 60 (1965) 320.

7. C.A. Clayton; J.W. Hiñes; P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506.
8. CETAMA. *Statistique Appliquée à l'Exploitation des Mesures*. 2^a ed. Masson Paris, 1986.
9. F.P. Zscheile Jr.; H.C. Murray; G.A. Baker; R.G. Peddicord, *Anal. Chem.*, 59 (1962) 1776.
10. A. Lorber; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 67.
11. F.E. Satterhwaite, *Biom. Bull*, 2 (1946) 110.
12. G. Bauer; W. Wegscheider; H.M. Ortner, *Spectrochim. Acta*, 46B (1991) 1185.
13. J.H. Kalivas; P.M. Lang, *Chemom. Intell. Lab. Syst*, 32 (1996) 135.
14. L. Sarabia; M.C. Ortiz, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 1.

Detection Limits in Classical Multivariate Calibration Models

R. BOQUE^{*}, F. X. RIUS

Departament de Química, Universitat Rovira i Virgili.

Pça. Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Catalonia, SPAIN.

ABSTRACT

This work presents a new approach for calculating multivariate detection limits for the commonly used classical or direct calibration models. The derived estimator, which is in accordance with latest IUPAC recommendations, accounts for the different sources of error related to the calibration and prediction steps. Since the multivariate detection limit for a given analyte is influenced by the presence of other components in the sample, a different detection limit is calculated for each analyte and analysed sample, at the chosen significance levels α and p . The methodology has been experimentally validated by determining four pesticides in water using a FIA method with diode-array detection. The results also compare favourably with the ones obtained using other estimators found in the literature.

INTRODUCTION

The international standards concerning the activities of analytical laboratories indicate that, in order to give confidence to users, analytical results have to define basic figures of merit such as traceability, uncertainty and limits of application¹. Two of these important performance characteristics are the inferior limits of application, *i.e.* the limits of detection and quantification. Apart from the above normative reasons, calculation of these figures is also important for selecting or developing measurement processes that can meet specified needs, such as the detection of a certain level of hazardous substances²

Adopting the work originally developed by Currie³, *the International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), in its latest recommendations², has redefined the concept of detection limit in the univariate domain on the basis of the theory of hypothesis testing and considering the probabilities of false positives, α , and false negatives, β .

Multivariate calibration techniques, increasingly used in laboratories, are of course included within the sphere of international standards and, consequently, reliable estimators of the different figures of merit have to be developed. IUPAC has not issued yet a recommendation for evaluating detection limits in multivariate calibration; however, any estimator which is to be presented should be developed in accordance to present definitions and taking into account false positive and false negative decisions. This has also been pointed out in a recent review on multivariate detection limits⁴.

This work provides a multivariate detection limit (MDL) estimator in methods that use direct or classical multivariate calibration models. These models are usually

used for determining the unknown concentration of analytes in well characterised samples, i.e. their qualitative composition must be well determined and there must be no effects which have not been provided for, such as the non-additivity of the responses or interactions among analytes.

In the literature, some references to the estimation of MDLs in this kind of model can be found. Lorber⁵ introduced the concept of *net analyte signal* for calculating the first MDL estimator, as three times the relative total error in the predicted concentration. Later, Bauer *et al.*⁶ applied the error propagation theory to develop an expression for the MDL, as three times the standard error in the predicted concentration. Although these estimators assume a fixed value for α and P probabilities of error, the expressions could be modified to account for different errors of first and second kind, choosing, for example, a multiple different from three.

The methodology discussed here goes further, since the p probabilities of committing errors of the second kind (false negatives) are quantified. This is done by applying the non-central *t*-test approach introduced by Clayton *et al.*⁷ in the context of univariate calibration. In this paper, this approach has been transferred to the multivariate field to test whether the analyte is present or not in the unknown sample and whether it is detectable or not with a confidence acceptable to the user.

To test the presence versus the absence of analyte, the variance at zero concentration level must be known. This concentration is derived from a multivariate instrumental response obtained from the unknown sample, but without the contribution of the analyte to be determined. This response is the so called *null analyte signal*, as opposed to the *net analyte signal*, defined by Lorber⁵ as the part of the spectrum of the unknown sample that is unique for the k th analyte. The

expression of the variance of the concentration derived from the null signal includes the different sources of error in the process, both in calibration and prediction steps, so the final estimator can provide more realistic values of the detection limits.

To prove the validity of the estimator, the detection limit of four pesticides in water were determined by means of a FIA method with spectrophotometric detection. The performance of the new estimator was assessed by calculating the percentage of false negative detections found experimentally at different low levels of concentration for a pesticide which gave severely overlapped spectrum; these values closely agree with the ones predicted theoretically using the derived MDL estimator. The calculated MDL were also compared with the ones obtained by other known estimators, that have statistical constraints that limit their application to restricted operating conditions.

THEORY

Variance of the predicted concentration. Spectrophotometric analysis of several components using direct calibration models is based on measuring absorbances at selected wavelengths according to Beer's law (eq 1)

$$r = S c + e_r \quad (1)$$

where the vector r represents the absorbances measured at J wavelengths, S ($J \times K$) is the matrix of molar absorptivities for J wavelengths and K components, c is the concentration vector for K components and e_r is the vector of error terms. In the

prediction step, the unknown concentrations of the different analytes contained in a sample whose spectrum is \mathbf{r}_{un} are derived using eq (2).

$$\hat{\mathbf{c}}_{\text{un}} = \hat{\mathbf{S}}^+ \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (2)$$

The superscript + designates the pseudoinverse of a matrix, which is used instead of the normal inverse when S is a non-square or an overdetermined matrix. When the columns of S are linearly independent, the pseudoinverse can be calculated as $\hat{\mathbf{S}}^+ = (\hat{\mathbf{S}}^T \hat{\mathbf{S}})^{-1} \hat{\mathbf{S}}^T$, the ordinary least-squares solution. The matrix S is estimated in the calibration step by recording the spectra of standard solutions of individual components or mixtures, eq (3)

$$\hat{\mathbf{S}}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{R} \quad (3)$$

where T means transposed. \mathbf{C} ($I \times K$) is the concentration matrix consisting of I samples (pure components or mixtures) and K components and \mathbf{R} ($I \times J$) is the absorbance matrix for I samples at J wavelengths.

Several expressions have been derived to estimate the variance of the predicted concentration, attempting to include all the possible sources of variation in the data⁸⁻¹⁰. We used the expression proposed by Bauer *et al.*⁶, because it has been shown, with real data, that it gives good results. By applying error propagation to prediction equation (2), and under the assumption that experimental errors in determining \mathbf{R} , \mathbf{C} and \mathbf{r}_{un} are heteroscedastic and uncorrelated, an expression for the variance of the predicted concentration can be obtained (eq 4), using the procedure described by the authors¹¹:

$$\begin{aligned} \hat{\text{var}}(c_{\text{un},k}) &= \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (\hat{S}_{k,j}^+ C_{i,n}^+ \hat{c}_{\text{un},n})^2 \hat{\text{var}}(R_{ji}) + \\ &+ \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{i,n}^+ \hat{c}_{\text{un},n})^2 \hat{\text{var}}(C_{ki}) + \sum_{j=1}^J (\hat{S}_{k,j}^+)^2 \hat{\text{var}}(r_{\text{un},j}) \end{aligned} \quad (4)$$

where $\hat{\text{var}}(r_{\text{un},j})$ is the variance of the unknown sample's response, $\hat{\text{var}}(R_{ji})$ is the error associated to the response matrix in the calibration step and $\hat{\text{var}}(C_{ki})$ is the variance of the concentrations of the calibration samples. The only difference with the original expression is that a constant background term has been assumed and incorporated into matrix R and vector r_{un} . From eq (4), it can be observed that the variance in the predicted concentration depends on the way the errors in the measured signals and the calibration concentrations are estimated. It is recommended to estimate variances from experimental replicates of calibration and prediction samples. This, however, may be a problem in routine analysis, due to cost and time requirements, so estimating variances from the residuals of the calibration model could be an alternative. However, this procedure is not encouraged, as the model parameters have also been estimated in the calibration step and, consequently, carry an uncertainty. Acceptable estimates of the signal error might be based on previous knowledge of the measurement technique¹¹. On another hand, the variance of the concentrations of the calibration samples, $\text{var}(C_{k,i})$, can be estimated from replicate measurements or by error propagation, taking into account the uncertainties associated to the whole process of sample preparation.

Multivariate detection limit estimator. The problem of calculating the limits of detection in multivariate calibration can be treated as a hypothesis test on the concentration axis of the classical multivariate model. So, for a k th analyte, the null hypothesis, $H_0: c_{\text{un},k} - c_{0,k}$, and the alternative hypothesis, $H_1: c_{\text{un},k} > c_{0,k}$, can be defined, being $c_{\text{un},k}$ the true but unknown concentration of the analyte in the sample

and $c_{0,k} = 0$. This treatment is directly related to the statistical theory of hypothesis tests^{3,12} and has previously been applied by Clayton *et al.*⁷ in the response domain to calculate the limits of detection in univariate calibration. This latter methodology has recently been made available as a computer program by Sarabia *et al.*¹³.

Assuming that a normal distribution holds for predicted concentrations, when the null hypothesis is true ($c_{un,k} = c_{0,k}$), the statistic $t = (\hat{c}_{un,k} - c_{0,k}) / \hat{v}\hat{a}r(c_{0,k})^{1/2}$ is assumed to follow a Student's *t*-distribution with v degrees of freedom. $\hat{c}_{un,k}$ is the estimated value of $c_{un,k}$ and $\hat{v}\hat{a}r(c_{0,k})$ is the estimated variance at 'zero concentration level'. There is a critical value, $c_{p,k}$, above which the null hypothesis will not be accepted:

$$c_{p,k} = t_{1-\alpha,v} \hat{v}\hat{a}r(c_{0,k})^{1/2} \quad (5)$$

where α is the probability of committing a type I error (false positive). This critical value is identical to the *decision limit*, as defined by Massart *et al.*¹⁴, and the *critical level*, as defined by the IUPAC². On the other hand, if the alternative hypothesis is true ($c_{un,k} > c_{0,k}$), there is a probability P of committing an error of the second kind. The limit of detection can be defined as the concentration for which the probability that the estimated value, $\hat{c}_{un,k}$, does not exceed $c_{p,k}$ is β . This can be expressed as:

$$\text{pr} \{ \hat{c}_{un,k} \leq c_{p,k} \mid c_{un,k} > c_{0,k} \} = P \quad (6)$$

Assuming constant variance between the predicted concentrations under the null and the alternative hypothesis, the expression of the limit of detection is given by:

$$(\text{MDL})_k = \Delta(\alpha, \beta) \hat{\text{var}}(c_{0,k})^{1/2} \quad (7)$$

where $\Delta(\alpha, \beta)$ is the non-centrality parameter of a non-central t -distribution, with ν degrees of freedom. For a fixed value of β , $\Delta(\alpha, \beta)$ can be calculated, either numerically¹⁵ or by means of statistical tables^{7,12}. Eq (7) enables the detection limit to be calculated for the k th analyte, with fixed α and β probabilities.

From Eq (7), it can be seen that $(\text{MDL})_k$ depends on $\hat{\text{var}}(c_{0,k})^{1/2}$, the standard deviation of the predicted concentration under the null hypothesis, the value of which can be estimated in the way described below. The approach presented assumes, then, that the distributions of the concentrations predicted at the level of the limit of detection and at "zero concentration level" are comparable (the condition of homoscedasticity), which is often true. Should the variances be different, however, the methodology would have to take into account the calculation of the non-centrality parameter in these conditions. The problem might then be approached by using the Welch test¹⁶, but no references have been given to date. This would only affect the value of the limit of detection, since the critical value, $c_{p,k}$, depends only on the null hypothesis distribution. Otherwise, and only if $c_{\text{un},k}$ is normally distributed with known variance, the limit of detection should be calculated by means of the Currie's expression³, $\text{LD} = z_{1-\alpha}\sigma_0 + z_{1-\beta}\sigma_D$, where $z_{1-\alpha}$ and $z_{1-\beta}$ represent the $(1-\alpha)$ th and $(1-\beta)$ th percentage points of a normal distribution and σ_0 and σ_D are the standard deviations under the null hypothesis and at the level of the limit of detection, respectively.

Estimation of $\text{var}(c_{0,k})$. If there are a sufficient number of blanks available, that is to say, samples with no presence of the k th analyte or in a very small quantity, then the squared standard deviation of the concentration values for the k th analyte predicted by the model provides a good estimation of $\text{var}(c_{0,k})$. In this case, the degrees of freedom used to calculate $t_{1-\alpha}$ and $\Delta(\alpha, \beta)$ are $(n_{\text{bl}} - 1)$, n_{bl} being the

number of blank repetitions. More frequently, however, there are no blanks available, or there are not enough, and it is for this reason that a new strategy has been developed.

Having obtained \mathbf{r}_{un} , the response of the unknown sample, the part of its spectrum without the contribution of the k th analyte can be calculated. This can be done by expressing \mathbf{r}_{un} as:

$$\mathbf{r}_{\text{un}} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+) \mathbf{r}_{\text{un}} + \hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+ \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (8)$$

where $\hat{\mathbf{S}}_k$ is the matrix of molar absorptivities from all constituents except the k th analyte. The first term is denoted as $\mathbf{r}_{\text{un},k}^*$, the *net analyte signal*⁵. $\mathbf{r}_{\text{un},k}^*$ is the part of \mathbf{r}_{un} that is unique for the k th analyte, since it is orthogonal to the spectra of all other components in the sample. The second term can be denoted as $\mathbf{r}_{\text{D},k}$, the *null analyte signal*. It is the part of the spectrum of the k th analyte in the unknown sample that can be derived by a linear combination of the spectra of the other pure constituents.

$$\mathbf{r}_{\text{un}} = \mathbf{r}_{\text{un},k}^* + \mathbf{r}_{\text{D},k} \quad (9)$$

If we multiply \mathbf{r}_{un} by the projection matrix $\hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+$, the part of \mathbf{r}_{un} that is not contained in the space spanned by $\hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+$ will be eliminated. Likewise, the projection matrix $(\mathbf{I} - \hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+)$ covers the space that is orthogonal to the one spanned by $\hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+$. Fig. 1 geometrically shows the meaning of these concepts.

So, if the null analyte signal, $\mathbf{r}_{\text{D},k}$, is introduced into the prediction model, eq (2), a concentration equivalent to zero for the k th analyte will be obtained:

$$\hat{c}_{0,k} \sim \mathbf{r}_{D,k}^{\top} (\hat{\mathbf{S}}^+)^{k\text{-row}} \quad (10)$$

$(\hat{\mathbf{S}}^+)^{k\text{-row}}$ is the k th row vector of the matrix $\hat{\mathbf{S}}^+$. Since the null analyte signal is obtained by an estimated projection matrix, it can be expected that $c_{0,k}$ is a biased estimate of the 'null concentration'. This can be verified from simulation studies, by calculating null analyte signals from both true $(\mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+ \mathbf{r}_{\text{un}})$ and estimated $(\hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+ \mathbf{r}_{\text{un}})$ projection matrices, and then calculating the values of $c_{0,k}$ by using eq (10).

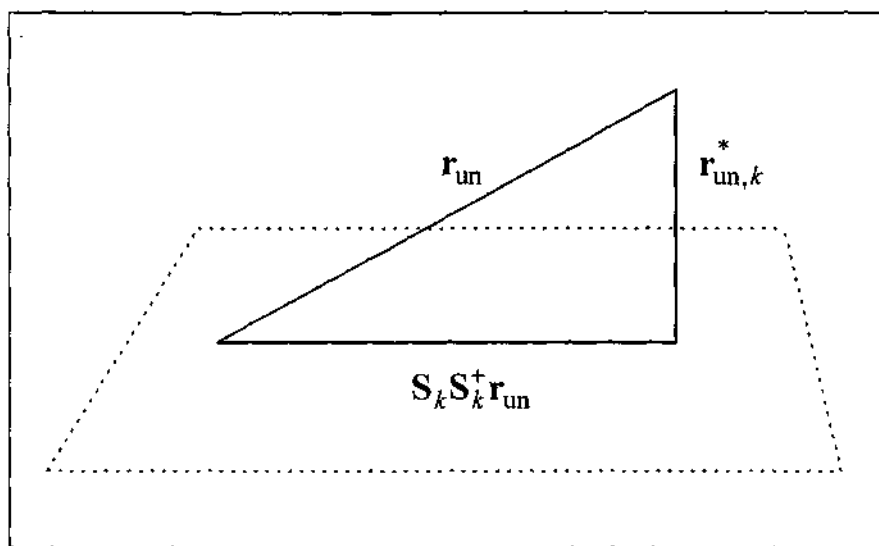


Figure 1. Geometrical diagram of the concepts of net analyte signal and null analyte signal.

The variance associated to $c_{0,k}$ is assumed to be adequately approximated by the variance of the original responses; therefore, it is calculated using eq (4), substituting \mathbf{r}_{un} for $\mathbf{r}_{D,k}$, and finally obtaining eq (11):

$$\begin{aligned} \hat{\text{var}}(c_{0,k}) = & \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (\hat{S}_{k,j}^+ C_{i,n}^+ \hat{c}_n)^2 \hat{\text{var}}(R_{ji}) + \\ & + \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^K (C_{i,n}^+ \hat{c}_n)^2 \hat{\text{var}}(C_{ki}) + \sum_{j=1}^J (\hat{S}_{k,j}^+)^2 \hat{\text{var}}(r_{D,j}) \end{aligned} \quad (11)$$

c_n are the predicted concentrations for the response $r_{D,k}$. Therefore, $c_n = \hat{c}_0 k$ when $n = k$.

Assessing the detection of low concentrations of analytes. The detection limit for the k th analyte can be estimated by using eq (7), with $\hat{\text{var}}(c_{0,k})$ calculated by using eq (11). In this case, as the variance estimate is a linear combination of different independent terms associated to errors in concentration and spectral data, the exact number of degrees of freedom needed in the calculation of the non-centrality parameter, $\Delta(\alpha, \beta)$, is unknown. Instead, an effective number of degrees of freedom can be estimated according to the Satterthwaite rule¹⁷. For a variable y , whose estimated variance is expressed as:

$$\hat{\text{var}}(y) = \sum_{i=1}^N \hat{\text{var}}(x_i) \quad (12)$$

the effective number of degrees of freedom needed for any significance test is calculated as:

$$v_{\text{eff}} = \text{int} \left[\frac{\hat{\text{var}}(y)^2}{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\hat{\text{var}}(x_i)^2}{v_i} \right)} \right] \quad (13)$$

where v_i are the degrees of freedom of each individual term and $\text{int}[\cdot]$ indicates that v_{eff} must be approached by truncation to the nearest integer.

It should be noted that \mathbf{r}_{un} intervenes in the expression of $\mathbf{r}_{\text{D},k}$ (Eqs 8 and 9), in the derived c_n values and consequently in the final magnitude of $\hat{\text{var}}(c_{0,k})$. Thus, a different MDL for each unknown sample will be expected.

Only if the errors in the responses and concentrations of the calibration set are small compared with the error in the response of the unknown sample, can the MDL be expressed according to Eq (14):

$$(\text{MDL})_k = A(a, f\beta) \left[\sum_{j=1}^J (\hat{S}_{k,j}^+)^2 \hat{\text{var}}(r_{\text{D},j}) \right]^{1/2} \quad (14)$$

Additionally, if homoscedasticity is assumed (we consider that the error in the response \mathbf{r}_{D} is constant throughout all the sensors and equivalent to the error in \mathbf{r}_{un}), the term $\hat{\text{var}}(r_{\text{D},j})$ may be placed outside the summation and, by applying the norm to the k th row vector of the matrix \mathbf{S}^+ , the MDL estimator can be obtained as:

$$(\text{MDL})_k = \Delta(\alpha, \beta) \hat{\text{var}}(\mathbf{r}_{\text{un}})^{1/2} \left\| (\hat{\mathbf{S}}^+)_{k\text{-row}} \right\| \quad (15)$$

The assumption of homoscedasticity can indeed be valid in some cases, but it has to be thoroughly validated; otherwise, a systematic error in the magnitude of the prediction variance might be produced, which could consequently affect the value of the detection limit. If Eq (15) is used to calculate the MDL, then the number of degrees of freedom needed to calculate the non-centrality parameter, $\Delta(\alpha, \beta)$, depends on the way the value of the spectral errors, $\hat{\text{var}}(\mathbf{r}_{\text{un}})$, is estimated. If it is obtained from the residuals of the calibration model (see remarks above), then the

resulting degrees of freedom are given by $(J-K)$. If $\hat{\text{var}}(\mathbf{r}_{\text{un}})$ is calculated from experimental replications, then the number of degrees of freedom is derived from the number of sensors and replications.

Choosing probabilities α and P such that $A(\alpha, P) = 3$, the conventional definition for MDL is arrived at, which is three times the error divided by $1/\|(\mathbf{S}^+)_{k\text{-row}}\|$. This term is equivalent to $\| \mathbf{s}_k^* \|$, the Lorber's multivariate sensitivity¹⁸, where \mathbf{s}_k^* is the net spectrum of the k th analyte at unit concentration, calculated as $\mathbf{s}_k^* = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{S}}_k \hat{\mathbf{S}}_k^+) \mathbf{s}_k$. So, eq (15) can be expressed as:

$$(\text{MDL})_k = \frac{3 \hat{\text{var}}(\mathbf{r}_{\text{un}})^{1/2}}{\| \mathbf{s}_k^* \|} \quad (16)$$

This equation is equivalent to the one proposed by Lorber⁵, in case of neglecting the errors in the calibration spectra and concentrations. Additionally, if we consider the selectivity for the k th analyte, defined by Lorber and Kowalski¹⁸ as $(\text{SEL})_k = \| \mathbf{s}_k^* \| / \| \mathbf{s}_k \|$, then eq (16) can be rewritten as:

$$(\text{MDL})_k = \frac{3 \hat{\text{var}}(\mathbf{r}_{\text{un}})^{1/2}}{(\text{SEL})_k \| \mathbf{s}_k \|} \quad (17)$$

The term $\| \mathbf{s}_k^* \|$ has been defined by Kalivas and Lang¹¹ as the local sensitivity for the k th analyte. From eq (17), it can be observed that the MDL for an analyte depends on a joint contribution between its selectivity and its local sensitivity. Connection between selectivity measures and prediction errors have also been discussed in the literature¹¹.

According to IUPAC, the $(MDL)_k$ is the concentration for which the probability that the estimated concentration value, $c_{un,k}$, does not exceed the critical value, $c_{p,k}$, is β . So, for a given sample, the concentration of analyte will be detected, with fixed α and β probabilities, as long as $c_{un,k} > (MDL)_k$.

The expression (eq 7) found for the MDL shows that the estimator depends on the assumed probabilities of false positive and false negative and also on the variance at 'zero concentration level'. This variance includes information about the sources of error in both calibration and quantitation steps, so, the less we control the possible sources of variation in the data (errors in the concentrations of the calibration standards, errors in the responses of these standards, goodness of fit), the less likely it will be to obtain low limits of detection. What is more, the MDL is different for every sample analysed since it depends on the species that coexist in solution with the analyte k .

EXPERIMENTAL SECTION

Spectroscopic data set. The derived estimator was applied to determine four pesticides of the carbamate family: carbaryl (1-naphthylmethyl-carbamate, RYL), carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl-N-methyl-carbamate, CBF), propoxur (2-isopropoxyphenyl-methyl-carbamate, PPX) and isoprocarb (o-cumenylmethyl-carbamate, IPC) in water using a FIA method with diode-array detection²⁰. The spectra recorded between 340 and 650 nm consist of 156 wavelengths every 2 nm. The spectra of the pure pesticides are shown in Figure 2. The calibration set used to build the classical multivariate model consists of four replicates of eight mixtures, designed according to a Hadamard matrix, each of

which contains the four pure carbamates in concentrations ranging between 2 and 8 ppm.

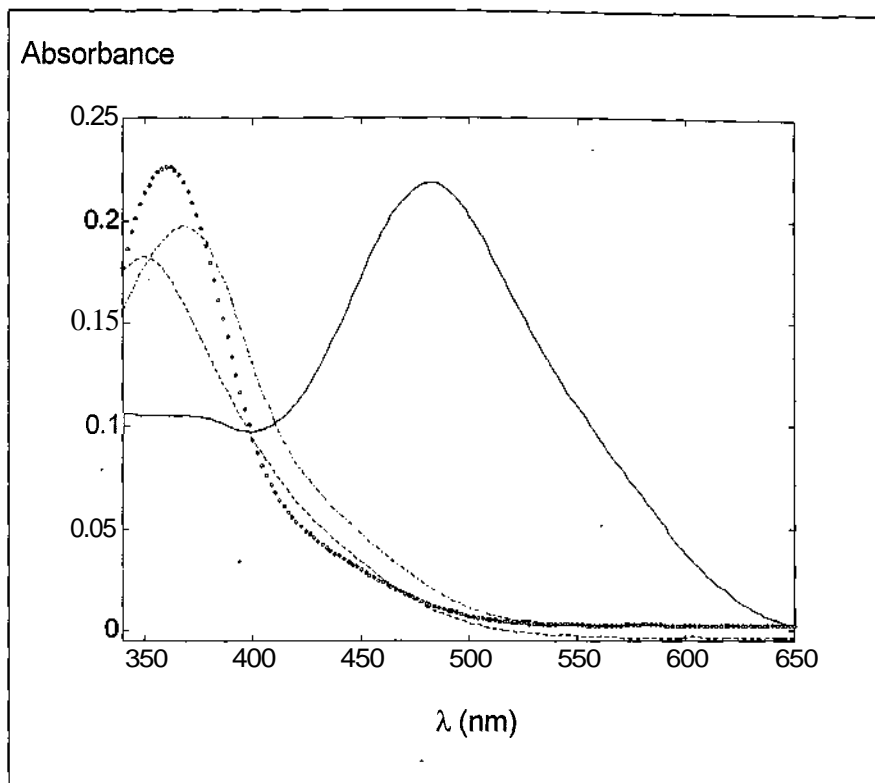


Figure 2. Pure spectra of the pesticides studied, obtained from the calibration model made with mixtures: (-) carbaryl, (--) carbofuran, (-•) propoxur and (•) isoprocarb.

The classical multivariate model was validated by means of a set of samples consisting of three replicates of nine mixtures of the four pesticides between 2 and 8 ppm (validation set 1). The mixtures correspond to a three level Hoke design. The mixtures that had already been used in the Hadamard matrix were not considered here. Root mean squared error of prediction (RMSEP) was used to evaluate the prediction ability²⁰.

Given the similarity between the isoprocarb spectrum and the other analytes and its clear overlapping with the carbofuran and propoxur spectra, it was chosen to experimentally validate the MDLs. Three groups of four samples were prepared, each group containing a fixed concentration of the three pesticides carbaryl, carbofuran and propoxur, and four different spiked levels of isoprocarb. The scheme of the experimental design is shown in Table 1. Ten replicate measurements for each of the validation mixtures were carried out so that 120 spectra were recorded overall. These data make up validation set 2. Furthermore, 38 samples with no isoprocarb content (validation set 3), were also prepared, in order to check the validity of the estimator at zero concentration of the analyte to be determined.

	[RYL]	[CBF]	[PPX]	[IPC]
Sample 1	2	5	5	0.5
	2	5	5	1.0
	2	5	5	1.5
	2	5	5	2.0
Sample 2	5	7	2	0.5
	5	7	2	1.0
	5	7	2	1.5
	5	7	2	2.0
Sample 3	5	3	8	0.5
	5	3	8	1.0
	5	3	8	1.5
	5	3	8	2.0

Table 1. Scheme for the matrix of experiments for the validation of the MDL estimator. (RYL=Carbaryl, CBF=Carbofurane, PPX=Propoxur, IPC=Isoprocarb).

Finally, the MDL obtained by applying eq (7) were compared with the ones calculated by three other estimators: 1) the conventional one, i.e. three times the error in the data divided by the Lorber's multivariate sensitivity (described in eq 16), 2) the one developed by Lorber⁵ and 3) the one developed by Bauer *et al.*⁶. These latter two estimators do propagate the error in the calibration step to the

final uncertainty, so they are expected to provide results that closely agree with the ones provided by our estimator.

All calculations were carried out with Matlab home-made routines (MATLAB for Windows, ver 4.0. The Mathworks Inc., Massachusetts, USA.). The source code for the developed estimator is available from the authors on request.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the MDL estimator. The theoretical rate of false negative results, for each concentration level of isoprocarb in the validation scheme shown in Table 1, was calculated by operating in the expression of the MDL, eq (7), as:

$$\hat{A}(a,p) = \frac{c_{IPC}}{\hat{\text{var}}(c_{0,IPC})^{1/2}} \quad (18)$$

For a given isoprocarb level, c_{IPC} , and taking the estimated variance at zero concentration level of the analyte, $\hat{\text{var}}(c_{0,IPC})$, an estimation of the non-centrality parameter is calculated first from eq (18). Subsequently, the probability of error p can be calculated, for a given number of degrees of freedom, by fixing the probability of error a . However, as the variance at zero concentration level, calculated from eq (11), varies from sample to sample, it is difficult to get a global estimation of the P error at a given level of isoprocarb. It was preferred to calculate $\hat{\text{var}}(c_{0,IPC})$ from 38 blank samples, i.e. samples with no isoprocarb content (validation set 3), by following the procedure described in the theoretical section.

Then, using eq (2), the concentrations of isoprocarb in every validation sample and at every spiked level were predicted. These predicted concentrations were compared with $c_{p,IPC}$, eq (5), and the analyte was regarded as being detectable if $\hat{c}_{un,IPC} > c_{p,IPC}$. So, the percentage of times (out of a total of 30 samples) that $\hat{c}_{un,IPC}$ is lower than $c_{p,IPC}$ can be considered as an estimation of the rate of false negatives. This percentage was compared with the one calculated theoretically from eq (18) and the theoretical probability of making a false negative error, for every concentration level and a fixed a probability, was established.

The variance at zero concentration in eq (5) for $c_{p,IPC}$ was estimated individually for each sample by applying eq (11). In this equation, $\text{var}(\mathbf{r}_{D,IPC})$ was assumed to be equal to $\text{var}(\mathbf{r}_{un})$, the variance of the response of the unknown sample. The assumption of equality of variances in null analyte signals and original responses was verified with simulated data. Moreover, experimental replications on samples with no content of isoprocarb and samples containing 10 ppm of the pesticide showed non significant difference among variances. $\text{var}(\mathbf{r}_{un})$ in eq (11) was calculated from ten replicate measurements for each of the validation mixtures, being the number of degrees of freedom in this case, $\nu_r = 146$. The variance of the responses of the calibration set was also estimated from ten experimental repetitions, with $VR = 146$ degrees of freedom. Finally, the error in the concentrations of the calibration matrix was estimated from the residuals of the calibration model, assuming the absence of any systematic error derived from lack of fit. The number of degrees of freedom is then $\nu_C = 20$.

Table 2 shows theoretical probabilities of committing false negatives, calculated from eq (18), for the different concentration levels of isoprocarb in samples of validation set 2. The same table shows the number of times, as a percentage, that the pesticide was not experimentally detected at the concentration level indicated. This value, as has been mentioned above, is an experimental measure of the type II

error committed. A close agreement between the experimental and theoretical probabilities can be observed.

Furthermore, the result of analysing the 38 samples with no isoproc carb content was that the estimator did not detect in a single case the presence of the pesticide at the a levels of significance specified in Table 2, which shows a slightly overoptimistic performance of the estimator at zero concentration level of the analyte of interest.

	a = 0.01		a = 0.05		a = 0.10	
	P theor.	P exp.	P theor.	p exp.	P theor.	p exp.
[IPC] = 0.5	0.96	1.00 (30/30)	0.85	0.87 (26/30)	0.75	0.80 (24/30)
[IPC] = 1.0	0.88	0.97 (29/30)	0.68	0.63 (19/30)	0.54	0.37 (11/30)
[IPC] = 1.5	0.72	0.77 - (23/30)	0.45	0.53 (16/30)	0.31	0.23 (7/30)
[IPC] = 2.0	0.50	0.67 (20/30)	0.24	0.27 (8/30)	0.14	0.10 (3/30)

Table 2. Theoretical and experimental rates of type n error.

The theoretical relationship between the probability of committing type n errors and the concentration of the analyte of interest is known as *characteristic curves of detection*, which can be built from eq (7). Fig. 3 shows the characteristic curve for a sample with a content of 2 ppm of the pesticide isoproc carb and for different levels of type I error, a.

It can be seen that, for a fixed probability of committing a false positive, a, the concentration of isoproc carb in the sample can be detected depending on the probability of false negatives that one is prepared to accept. Clearly, for any given MDL, the lower the value of the probability a of committing an error of the first

kind, the higher the probability p of committing an error of the second kind. Furthermore, these curves can help analysts to modify some experimental designs of the measurement process in order to reach specific characteristics of detection.

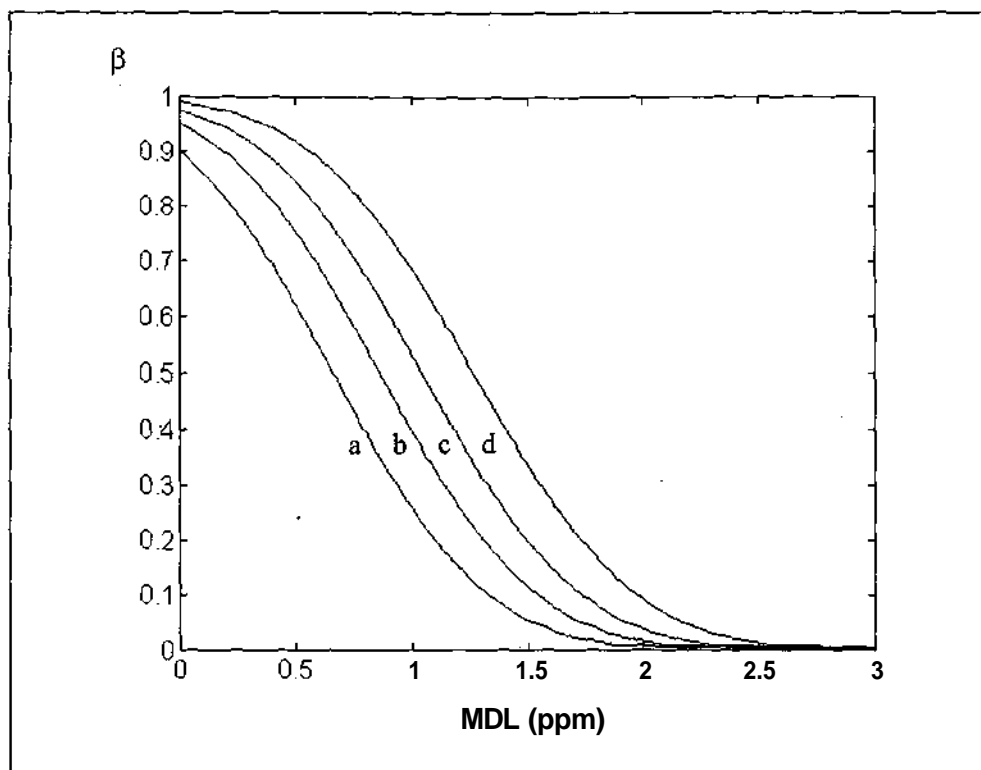


Figure 3. Characteristic detection curve of a sample containing 2 ppm of isoprocarb and for different probabilities of error a. (a) 0.10, (b) 0.05, (c) 0.025 and (d) 0.01.

Finally, the MDL found for a sample containing 2 ppm of each of the pesticides were compared with the ones provided by three other estimators found in the literature. For purposes of comparison, a value of $\Delta(\alpha, \beta) = 3$ in eq (7) was chosen. Both in the present approach and the one developed by Bauer *et al.*, 2% errors in spectral signals and calibration concentrations were assumed in the calculation of $\hat{v}ar(R)$, $\hat{v}ar(r_{un})$ and $\hat{v}ar(C)$ terms, respectively. The results obtained for the four pesticides are shown in Table 4.

	<i>RYL</i>	<i>CBF</i>	<i>PPX</i>	<i>IPC</i>
MDL1 (conventional definition)	0.08	1.10	0.79	0.75
MDL2 (Lorber, 1987)	0.08	1.15	0.82	0.78
MDL3 (Bauer <i>et al.</i> 1991)	0.22	1.56	1.13	1.08
MDL (present work)	0.67	1.76	1.38	1.53

Table 3. MDLs of the four pesticides studied obtained with different estimators. Sample contains 2 ppm of each pesticide.

Logically, the MDLs provided by our estimators and the one proposed by Bauer *et al.* are higher, since they take into account the error in the calibration and prediction steps. Their difference lie in the approach used to calculate the values of $\hat{c}_{un,n}$ in eq (4). Bauer *et al.* use a recursive approach, consisting in the calculation of $\hat{v}\hat{a}r(c_{un,k})$ and $\hat{c}_{un,k}$ for decreasing concentration values and, finally, they obtain a limit concentration, $c_{L,k}$, so that $c_{L,k} = 3\hat{v}\hat{a}r(c_{L,k})^{1/2}$. In our case, the variance of the predicted concentration is evaluated under the null hypothesis, by using eq (11). The first estimator of Table 1 only takes into account the error in the prediction samples. In the Lorber's estimator, the errors in the responses of the calibration and prediction samples are considered to be equal, and the errors in the concentrations of the calibration samples are not considered. This error is taken into account when using our estimator, and this explains why a noticeable increase in the MDL value for the pesticide carbaryl is observed. The fact that MDL values for carbaryl are so low compared to other pesticides if the estimator is calculated using the first two approaches is due to its high selectivity in comparison with the other three pesticides (see figure 2); the carbaryl spectrum overlaps only slightly with the other spectra.

CONCLUSIONS

A new approach for calculating limits of detection in multivariate methods that used direct calibration models has been developed. The estimator, which is in accordance with the recommendations of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), enables the probabilities of committing false negatives to be assessed. So, the operating characteristic detection curves can be plotted by giving the user the chance of choosing the most suitable statistical conditions. However, users can choose if they want to be more or less restrictive when controlling the sources of error associated to the predicted concentration. The final values of the derived MDL will depend on this degree of restriction. A strict approach to calculating MDL involves taking into account all the causes of error, which supposes an increase in experimental work when calculating the associated variances. These errors can be estimated, either by replicate measurements, by assuming realistic error values (based on a previous knowledge of the technique) or by calculating the residuals of both the calibration and the prediction responses. Because the values of the errors of prediction are used to estimate the variance of the calibration sample concentrations, it is clear from eq (12) that to obtain trustworthy MDL which match reality, well validated models have to be available.

Bearing in mind all these considerations and applying them to the multivariate domain, we propose a new definition of MDL, complementing the existing ones. For an analyte, coexisting with other species in a sample, its *multivariate detection limit is the concentration that can be differentiated from zero with known α and β probabilities of error.*

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICYT project BP93-0366) is gratefully acknowledged. The authors appreciate the suggestions made by an anonymous reviewer, which have greatly contributed to the improvement of the paper.

LITERATURE CITED

- (1) CEN, *General Criteria for the Operation of Testing Laboratories* (European Standard 45001), CEN/CENELEC, Brussels, Belgium, 1989.
- (2) L.A. Currie, IUPAC Commission on Analytical Nomenclature, *Pure & Appl. Chem.* **67**, 1699 (1995).
- (3) L.A. Currie, *Anal. Chem.* **40**, 586 (1968).
- (4) R. Boque and F.X. Rius, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **32**, 11 (1996).
- (5) A. Lorber, *Anal. Chem.* **58**, 1167 (1986).
- (6) G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, *Fresenius J. Anal. Chem.* **340**, 135 (1991).
- (7) C.A. Clayton, J.W. Hiñes and P.D. Elkins, *Anal. Chem.* **59**, 2506 (1987).
- (8) A. Lorber and B.R. Kowalski, *J. Chemometrics*, **2**, 93 (1988).
- (9) T.V. Karstang, J. Toft and O.M. Kvalheim, *J. Chemometrics*, **6**, 177 (1992).
- (10) K. Faber and B.R. Kowalski, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **34**, 283 (1996).
- (11) G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, *Spectrochim. Acta*, **46B**, 1185 (1991).
- (12) D.B. Owen, *J. Am. Stat. Assoc.* **60**, 320 (1965).
- (13) L. Sarabia and M.C. Ortiz, *Trends Anal. Chem.* **13**, 1 (1994).
- (14) D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, Chap. 7, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- (15) R. Boque and F.X. Rius, *Trends Anal. Chem.*, submitted.

- (16) CETAMA. *Statistique Apliquée a l'Exploitation des Mesures*. 2nd ed. Masson, Paris, 1986. Pàg. 192.
- (17) F.E. Satterthwaite, *Biom. Bull* **2**, 110 (1947).
- (18) A. Lorber and B.R. Kowalski, *J. Chemometrics*, **2**, 67 (1988).
- (19) J.H. Kalivas and P.M. Lang, *Chemometrics. Intell. Lab. Syst.*, **32**, 135 (1996).
- (20) B.S. Fernández-Band, J. Ferré, R. Boque, M.S. Larrechi and F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta*, in press.

Figures of Merit in Multivariate Calibration. Determination of Four Pesticides in Water by FIA and Spectrophotometric Detection

J. FERRÉ, R. BOQUE, B.FERNÁNDEZ-BAND¹, M.S. LARRECHI*, F.X. RIUS

Departament de Química. Universitat Rovira i Virgili de Tarragona

Pça Imperial Tàrraco, 1, 43005 Tarragona, Spain

¹ On leave from Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Argentina

ABSTRACT

The accuracy, trueness and determination limit of a FIA method are evaluated in the simultaneous determination of the pesticides Carbaryl (RYL), Carbofuran (CBF), Propoxur (PPX) and Isoprocarb (IPC) in water by multicomponent analysis. Calibration is based both on the spectra of artificially made samples according to the experimental design theory and the spectra of pure pesticides. Prediction errors in the range 0.1-1.4 evaluated as RMSEP are obtained. The absence of bias is evaluated from the joint confidence interval test for the regression line obtained from measured and predicted concentrations taking into account errors in both axes. Multivariate determination limits were found to be between 0.03 and 1.0 ppm.

INTRODUCTION

Pesticides of the carbamate family are widely used in agriculture because of their powerful biological activity [1]. Since they are also serious environmental pollutants, a considerable number of analytical procedures have been proposed to determine and control their presence in surface waters [2-12]. Of these procedures, the spectrophotometric methods use the reaction between the pesticide, previously hydrolysed to its naphthol, and different reagents to produce strongly coloured species. These methods have also been used coupled with a FIA system, due to the simple instrumentation and high analysis speed. Khalaf *et al.* developed a flow system with initial liquid-liquid extraction to spectrophotometrically determine Carbaryl [13] and Propoxur [14] with *p*-aminophenol in natural waters. Fernández-Band *et al.* [15] simultaneously determined three pesticides using a FIA system with in-situ pre-concentration in a C18 stationary phase of the complexes formed. Espinosamansilla *et al.* [16-17] also describe a stopped-flow detection system for the determination of Carbaryl, which is based on the degradation speed of the pesticide in an alkaline medium. Garcia *et al.* [18] describe the simultaneous determination of Propoxur, Carbaryl, Ethiofencarb and Formetanate by using *p*-aminophenol and partial least-squares regression.

In the above mentioned papers, the figures of merit determined are not associated to the multivariate nature of the analysis but to the response of the analytes measured on a single channel. So, the limits of detection are either associated to the lower limit of the linearity obtained for each pesticide at a single wavelength or calculated as the concentration derived from a response equivalent to three times the standard deviation of the method. Also, precision is evaluated in terms of standard deviation calculated in conditions of repeatability and associated to replicated analyses of samples with the same concentration of analytes. In

addition, the absence of systematic errors is usually detected by measuring the recovery percentage in samples which have been spiked with the analyte under study.

In this paper the accuracy, trueness and determination limit of a FIA method are evaluated when it is used to determine four pesticides (Carbaryl, Carbofuran, Propoxur and Isoprocarb) in water with the classical least-squares regression method (also called the K-matrix approach). Calibration is based on the spectra of artificially made samples, either the pure pesticides or mixtures prepared according to the experimental design theory. The methodology has been validated with 9 artificially prepared drinking waters and 6 samples of ground and river waters spiked with pesticides.

THEORETICAL BACKGROUND

Calibration model. The classical least-squares model in spectrophotometric analysis of several components is based on measurements of absorbances at selected wavelengths according to Beer's law (Eq 1)

$$\mathbf{r} = \mathbf{S} \mathbf{c} + \mathbf{e} \quad (1)$$

where the vector $\mathbf{r}_{J \times 1}$ represents the absorbances measured at J wavelengths, $\mathbf{S}_{J \times K} = [\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2, \dots, \mathbf{s}_K]$ is the matrix of molar absorptivities for J wavelengths and K components, $\mathbf{c}_{K \times 1}$ is the concentration vector for K components and $\mathbf{e}_{J \times 1}$ is the vector of error terms. The unknown concentrations of the various analytes contained in a sample whose spectrum is \mathbf{r}_{un} can be obtained by using Eq 2.

$$\mathbf{c}_{un} = (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \mathbf{S}^T \mathbf{r}_{un} \quad (2)$$

where T means transposed. The variance associated to the estimated concentrations is given by:

$$\text{var}(\mathbf{c}_{un}) = \sigma^2 (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad (3)$$

where σ^2 is the variance of the spectral measurements, evaluated as:

$$\sigma^2 = \mathbf{r}_{un}^T (\mathbf{I} - \mathbf{S} \mathbf{S}^+) \mathbf{r}_{un} / (J - K) \quad (4)$$

where + means pseudoinverse. The matrix S is determined by recording the spectra of standard solutions of individual components or mixtures:

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{R} \quad (5)$$

where $\mathbf{C}_{j \times K}$ is the concentration matrix of the K components in / standard solutions of individual components or mixtures and $\mathbf{R}_{j \times J}$ is the absorbance matrix of the standard solutions with J wavelengths (columns) and / rows. If pure component samples are used, $(\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1}$ is a diagonal matrix.

Application of equation 2 requires matrix S to be error-free. This is not so because the matrix is estimated from equation (5); however, the error can be decreased by selecting the mixtures according to a designed plan. A Hadamard matrix can be used since it provides minimum variance estimators for a given number of samples. Its performance can later be compared with the one evaluated from the pure component spectra.

Selectivity and sensitivity measures. The spectral selectivity and sensitivity in the S matrix are known to influence the prediction ability of the model. The following measures were considered here:

Selectivity for the k th component [19] is evaluated from equation (6):

$$SEL_k = \|\mathbf{s}_k^*\| / \|\mathbf{s}_k\| \quad (6)$$

where $\mathbf{s}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+) \mathbf{s}_k$ is the net analyte signal and $\|\cdot\|$ denotes the Euclidean norm. \mathbf{S}_k is the matrix of the spectra of the pure constituents except the k analyte, $\mathbf{S}_k \mathbf{S}_k^+ \mathbf{s}_k$ is the null component of \mathbf{s}_k , i.e. the part of spectrum \mathbf{s}_k that is contained in the spectra of the other constituents present in the sample. This measure has been shown to be equivalent to the variance inflation factors (VIFs) [20] often used as multicollinearity performance characteristics. Low selectivity values are associated to unstable estimations of the concentrations and large prediction errors for new samples.

Sensitivity for the k th component [19] refers to how large the analyte responses are at each sensor in terms of net analytical signal. It is defined as:

$$SEN_k = \|\mathbf{s}_k^*\| \quad (7)$$

This measure is directly related to the confidence interval for the estimated concentrations in CLS [22].

Accuracy. In order to take into account all the causes of variability of the method, accuracy in the concentrations was assessed by root-mean-squared error of prediction (RMSEP) of a set of I validation samples not included in the calibration set, which were analysed in reproducible conditions:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_{i,\text{known}} - c_{i,\text{un}})^2}{I}} \quad (8)$$

Trueness. The absence of bias in the model [23] was assessed by performing a joint statistical test for the slope and the intercept in the regression of c_{un} versus c_{known} for the test samples taking into account the errors in both axes [24]. This test needs to know the variance of the true concentrations, which was considered to be constant for all samples and was evaluated by error propagation in the preparation of the standard solutions, and the variance of the predicted concentrations, evaluated from Eq 3.

Limits of determination. The limits of determination were calculated with the expression derived by Boque and Rius [25], which is based on the theory of the hypothesis tests applied to the concentration domain. The null hypothesis, $H_0: c = 0$ (analyte not present in the sample) is tested against the alternative hypothesis, $H_1: c > 0$ (analyte present in the sample), where c is the true but unknown concentration of the analyte in the sample.

The procedure is to reject H_0 when the statistic $t = (\hat{c} - c_0) / \hat{\text{var}}(c_0)^{1/2}$ is higher than t_α , the α -percentage point of the Student's t -distribution with v degrees of freedom. \hat{c} is the estimated value of c and $\hat{\text{var}}(c_0)$ is the estimated variance at 'zero concentration level'.

The power of the above Student's t -test is given by $1 - P = \text{pr} \{ t(\Delta) > t_\alpha \}$, where P is the probability of committing a false negative (i.e. erroneously accepting H_0)

and A is the noncentrality parameter of the noncentral t -distribution, $t(\Delta)$, with ν degrees of freedom.

If the probabilities a and P are fixed then the noncentrality parameter can be computed and a multivariate determination limit, MDL, for the k th analyte can be calculated:

$$(\text{MDL})_k = A(a,p) \text{var}(c_{0,k})^{1/2} \quad (9)$$

The noncentrality parameter, $\Delta(\alpha,\beta)$, can either be computed or obtained from the tables [26]. The variance at 'zero concentration level', $\text{var}(c_{0,k})$, can be estimated from any expression of the variance of the predicted concentration (Eq 3), but only under the null hypothesis, i.e. the k th analyte is not present in the sample. If this equation is used to estimate $\text{var}(c_{0,k})$, the degrees of freedom in the calculation of t_α and $\Delta(\alpha,\beta)$ are $\nu = J - K$, where J is the number of wavelengths and K is the number of analytes. σ^2 is in this case the variance of the spectral measurements at zero concentration level. However, if the measurement errors are assumed to be homoscedastic, σ^2 can be estimated from Eq (4) or calculated from replicates on different samples.

EXPERIMENTAL SECTION

Instrumentation. The following equipment was used to build the FIA system: a Hewlett-Packard 8452A diode array spectrophotometer controlled by an HP Vectra 386s/20 computer equipped with an HP-IB IEEE 488 interface for communications, two Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps, a Rheodyne 5041

injection valve, a Hellma 178.713 QS (10 mm optical path) flow cell and OMNIFIT tubing.

Reagents. Standard solutions of Carbofurane, Propoxur, Carbaryl and Isoprocarb (from Riedel-deHaën) were prepared by dilution of stock solutions with Millipore water. Aqueous solutions of 0.2% NaNO_2 , 2M NaOH and 0.2% sulfanilic acid in 30% of acetic acid were used. Millipore water was used as carrier.

Manifold. The FIA system is shown in Fig 1, according to the optimal parameters described in reference 15. The time for measuring the spectrum at the FIA peak maximum was found to be 85 seconds. The spectrum of a blank sample was recorded and subtracted from each sample spectrum.

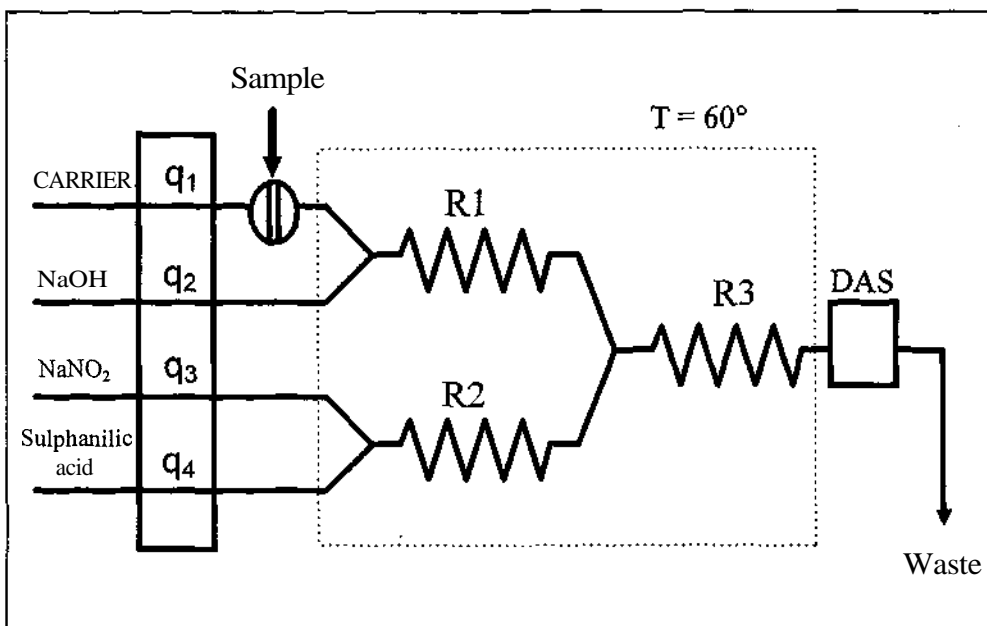


Figure 1. FIA manifold used for on-line determination of carbamate compounds based on hydrolysis of the analytes and dye formation. (q = peristaltic pump, R = reactor, DAS = diode array spectrophotometer).

Procedure for determining the pesticides. The sample was inserted into the carrier merging with a basic stream to favor hydrolysis of the analytes along reactor R1. Solutions of NaNO_2 and sulfanilic acid were also merged to facilitate formation of diazotized sulfanilic acid along reactor R2. The subsequent confluence of R1 and R2 resulted in the formation of the corresponding dyes along R3. Hydrolysis and derivative reactions were boosted by immersing the reactors in a thermostated bath at 60°C . The colour appears instantaneously and, in the flow conditions used [15], the reaction is developed enough for the signal recorded in the detection cell to be perfectly quantifiable.

Software. All calculations were made using Matlab home-made subroutines.

Samples. Data were collected to enable the model built from the pure component spectra and the spectra of the mixtures to be compared. Spectra were recorded between 340-650 nm every 2 nm and grouped into the following calibration and validation sets:

- *Calibration set 1* consisted of 5 replicates of the pure pesticide spectra at a concentration of 10 ppm of each pesticide. The value of 10 ppm was chosen in order to obtain high sensitivity.
- *Calibration set 2* consisted of 4 replicates of mixtures designed according to a Hadamard matrix of 4 variables and 8 samples between 2 and 8 ppm
- *Validation set 1* consisted of 3 replicates of 9 mixtures of the spiked four pesticides in tap water between 2 and 8 ppm. The mixtures correspond to a 3 level Hoke design D1 plus a point in the centre. This design was selected because it covered the experimental domain with 3 levels of concentrations and required a small number of samples. The mixtures that had already used in the Hadamard matrix were not considered here.

- *Validation set 2* consisted of the spectrum of 6 real samples from ground and river waters spiked with 5 ppm of each pesticide.

The designed mixtures (ppm of each pesticide) are shown in Table 1.

Sample Number	A) Calibration set 1				B) Calibration set 2				C) Validation set 1			
	RYL	CBF	PPX	IPC	RYL	CBF	PPX	IPC	RYL	CBF	PPX	IPC
1	10	0	0	0	8	8	8	2	8	5	5	5
2	0	10	0	0	8	8	2	8	5	8	5	5
3	0	0	10	0	8	2	8	2	5	5	8	5
4	0	0	0	10	2	8	2	2	5	5	5	8
5					8	2	2	8	8	2	8	8
6					2	2	8	8	8	8	2	2
7					2	8	8	8	2	8	8	2
8					2	2	2	2	2	8	2	8
9									5	5	5	5

Table 1. Experimental designs. A) Calibration set 1 Each sample was prepared 5 times. B) Calibration set 2. Hadamard design. Each sample was prepared 4 times. C) Validation set according to the Hoke design D1 plus a point in the centre. Each sample was prepared 3 times. Concentrations of each pesticide in ppm. (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocarb).

RESULTS AND DISCUSSION

Two models were built with calibration set 1 (pure component samples) and calibration set 2 (mixture samples) according to Eq 5. Figure 2 shows the pure component spectra for each pesticide at 10 ppm evaluated from the two calibration sets. The considerable difference for the spectra of carbaryl (RYL) at low wavelengths estimated from both calibration sets may be because of interactions between the analytes, which cannot be detected from the pure analyte samples, and kinetical effects. The same can be said of propoxur (PPX). Because several analytes are present in real samples, calibration from the samples of mixtures using

the Hadamard matrix is expected to give estimates of S with less uncertainty than the ones estimated from the pure component samples.

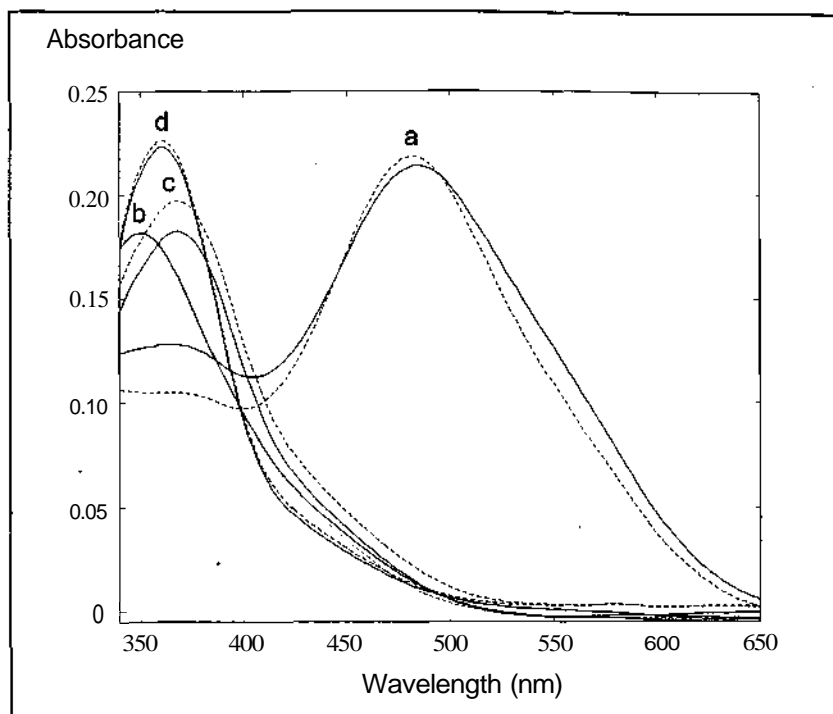


Figure 2. UV absorption spectra of the four pesticides: (a) **Carbaryl**, (b) Carbofurane, (c) **Propoxur** and (d) **Isoprocarb**, measured from solutions of 10 ppm of the pure pesticides (solid line) and calculated from the calibration mixtures (dashed line).

Table 2 shows the selectivity and sensitivity values associated to the matrix S (calculated from Eq 5) for the calibration sets. As it is expected from the Figure 2, Carbaryl is the component with highest selectivity and sensitivity while Carbofurane, Propoxur and Isoprocarb have lower values due to their similar spectra (collinearity). Collinearity can also be assessed from the variance-decomposition proportions [27] given in Table 3, where each column decomposes the variance of each pesticide as a function of the eigenvalues of the $S^T S$ matrix. 90.4% (0.202+ 0.702) of the variance of RYL (first and second rows of Table 3) is associated to the first and second largest eigenvalues and has no important

collinearity with the other pesticides since in these rows the contributions from the other pesticides are practically zero. This agrees with the selectivity observed in the RYL spectra with respect to the other pesticides. The fourth row in the table shows that the smallest eigenvalue considerably contributes to the variance of CBF (99.8%), PPX (38.1%) and IPC (40.1%). These large variance proportions associated to this small eigenvalue are due to the collinearity between the three pesticides. Similarly, the third row indicates that a considerable part of the PPX and IPC variance (61.6% and 59.4% respectively) is only due to collinearity between them.

	Calibration set 1		Validation Set 1	Calibration set 2		Validation Set 1
	SEN _k	SEL _k	RMSEP	SEN _k	SEL _k	RMSEP
RYL	0.122	0.764	0.38	0.135	0.797	0.41
CBF	0.011	0.117	2.29	0.010	0.111	0.46
PPX	0.015	0.144	0.74	0.014	0.142	0.32
IPC	0.014	0.137	2.08	0.015	0.138	0.82

Table 2. Individual values of sensitivity, SEN_k, and selectivity, SEL_k for the pesticides in calibration sets 1 and 2 and accuracy values (RMSEP) for validation set 1. (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocab).

eigenvalue	RYL	CBF	PPX	IPC
0.0446	0.2020	0.0003	0.0007	0.0009
0.0131	0.7024	0.0010	0.0023	0.0035
0.0002	0.0659	0.0006	0.6163	0.5941
0.0001	0.0297	0.9981	0.3807	0.4014

Table 3. Variance-decomposition proportions evaluated from the calibration matrix (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocab)

According to the sensitivity and selectivity values as well as the variance-decomposition proportions, the estimated concentrations for RYL should be more accurate than the estimations for CBF, PPX and IPC.

Table 2 shows the RMSEP values for validation set 1. RMSEP values are considerably smaller for the models based on mixtures than for the models evaluated from pure components (except for a slight increase in the prediction error of RYL that cannot be considered significant). This can be explained by the effect of the Hadamard matrix on the calibration step and the effect of interactions that cannot be taken into account when calibrating with pure pesticide samples. The prediction results from calibration set 1 are in agreement with the pesticides' sensitivity and selectivity values, since the lowest prediction error corresponds to RYL, which has the largest SEN and SEL values. The large prediction errors of CBF and PC may therefore be associated to spectral collinearity. Although this is true for calibration set 1, the results from calibration set 2 cannot be explained so straightforwardly from their sensitivity and selectivity values, suggesting that these measures alone do not explain the final prediction error. This has already been noticed in previous works [28]. Nevertheless, due to its better prediction ability, the calibration model made with the mixtures was used to calculate the figures of merit in the following sections.

Table 4 shows the values of the different parameters of the straight lines obtained by regressing the actual concentrations on the predicted ones for each of the pesticides taking into account uncertainties in both axes. The individual variance values calculated for the true concentrations are considered constant at 10^{-3} ppm while the mean values of the variances for the predicted concentrations, calculated from the multivariate calibration model using Eq (3), were 10^{-3} (RYL), 2×10^{-1} (CBF), 10^{-1} (PPX) and 10^{-1} (IPC) respectively.

	Slope	s.d. slope	Intercept	s.d. intercept	r
RYL	0.95	0.03	0.24	0.18	0.9847
CBF	1.02	0.04	-0.31	0.23	0.9849
PPX	1.00	0.02	-0.05	0.12	0.9921
IPC	0.95	0.05	0.59	0.26	0.8600

TABLE 4. Values of intercepts, slopes, corresponding standard deviations and correlation coefficients for the regression lines of true concentrations versus predicted concentrations for each pesticide. (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocarb)

The joint confidence interval test of the slope and the intercept, taking into account errors in both axes, proved that the methodology is free from bias for the four pesticides, at a 90%, 97.5%, 90% and 99.99% level of significance for RYL, CBF, PPX and IPC respectively. Figure 3 shows the confidence ellipse for the pesticide Carbaryl, where the centre corresponds to the coordinates intercept = 0.24 and slope = 0.95 (see Table 4). It can be seen that the theoretical point (0,1) is within the joint confidence interval of the ellipse for $\alpha = 0.10$.

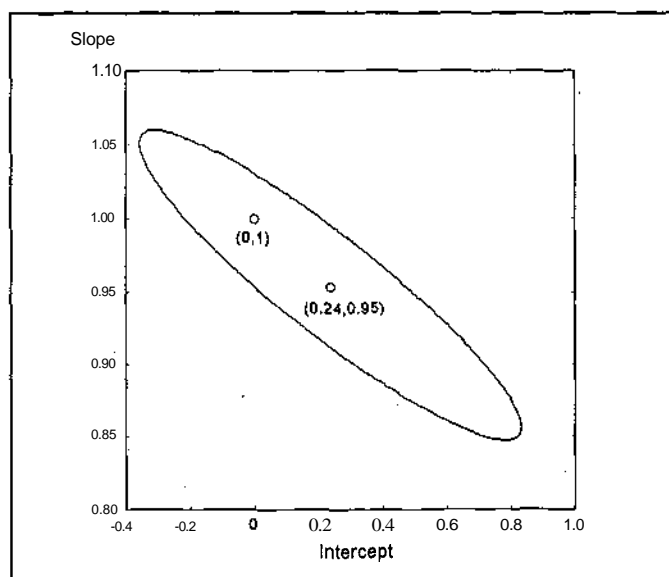


Figure 3. Confidence ellipse for the slope and the intercept of the straight line obtained regressing c_{un} on c_{known} taking into account the uncertainties in both axes for the pesticide Carbaryl.

The limits of determination, MDL, for each pesticide were computed according to Eq (9). The term σ^2 was obtained experimentally using validation set 2 by calculating the variance of the spectra of the 10 replicates and selecting the maximum in order to estimate the error in the response vector. Table 5 shows the MDL's calculated with different α and P probabilities of error. It can be observed that the MDL values are highly correlated with the selectivity values so that for a given value of α and P , Carbaryl has the lowest determination limits and Carbofurane has the highest values.

	$\alpha = 0.05$				$\alpha = 0.10$			
	$P = 0.05$	$p = 0.10$	$P = 0.20$	$P = 0.50$	$P = 0.05$	$p = 0.10$	$P = 0.20$	$P = 0.50$
RYL	0.08	0.07	0.06	0.04	0.07	0.06	0.05	0.03
CBF	1.04	0.92	0.78	0.52	0.91	0.80	0.66	0.40
PPX	0.75	0.67	0.56	0.37	0.66	0.58	0.47	0.29
IPC	0.71	0.63	0.53	0.35	0.62	0.54	0.45	0.27

Table 5. Limits of determination (ppm) of the 4 pesticides computed according to Eq (8) for different α and p probabilities of error. (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocarb).

Figure 4 shows, as an example, the characteristic curve of determination for Isoprocarb, i.e. the representation of MDL as a function of the p probability of error at different probabilities of a type I error. It can be observed that for a given probability, the MDL increases when a probabilities decrease. On the other hand, given a fixed probability of type I error, α , low MDL can only be obtained by increasing the p probabilities of error.

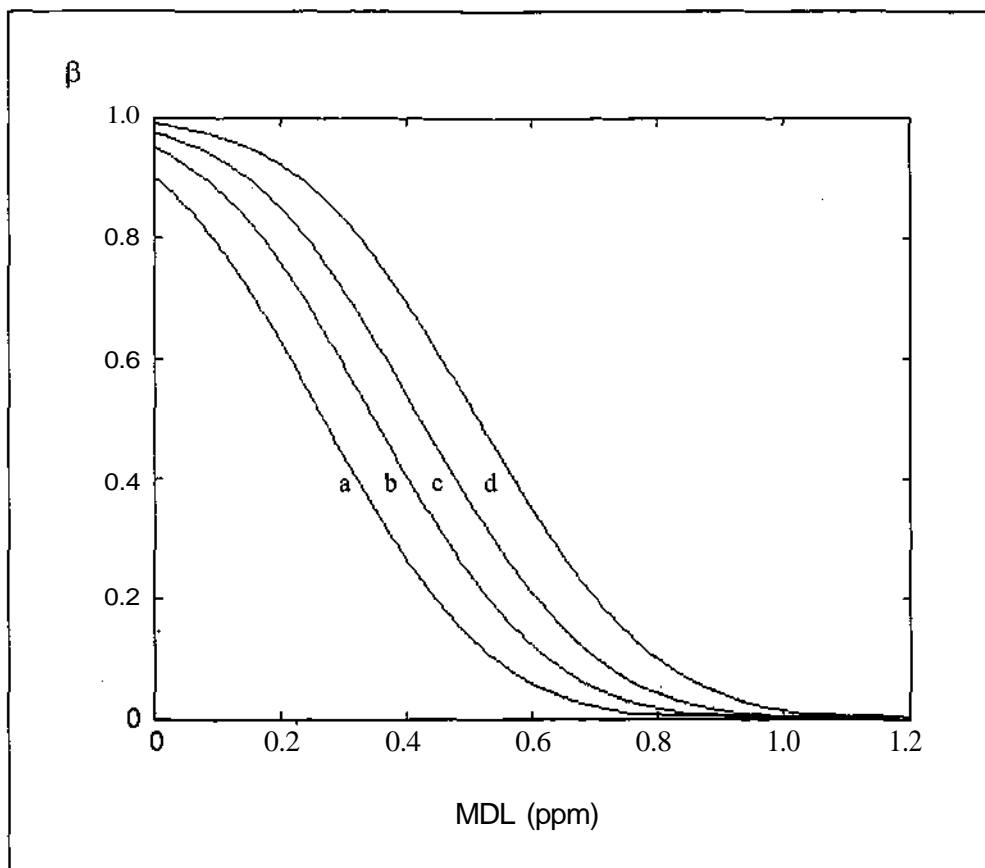


Figure 4. Characteristic curve of determination of the pesticide isoprocarb (IPC) at different probabilities of type I error, a: (a) 0.10, (b) 0.05, (c) 0.025 and (d) 0.01.

Validation with real data

The method has also been validated using real river and ground water samples spiked with 5 ppm of each pesticide. The mean concentrations found for three replicated measurements per sample and the percentages of resulting recoveries are shown in Table 6. It can be observed that the RMSEP values calculated according to Eq (8) are correlated with the values obtained from validation set 1 (Table 2).

Propoxur gives rise to the most accurate results while Isoprocarb can be determined with a certain degree of inaccuracy.

	[RYL]	%R	[CBF]	%R	[PPX]	%R	[IPC]	%R
F1 - river	5.19	103.8	4.65	92.9	4.95	99.0	6.05	120.9
F2 - river	5.12	102.3	4.70	93.8	5.04	100.8	6.31	126.1
VE - river	5.46	109.1	4.47	89.4	5.16	103.3	6.47	129.3
J1 - ground	5.70	114.0	3.93	78.6	5.04	100.8	6.81	136.2
J2 - ground	5.44	108.9	4.45	89.0	4.97	99.5	6.14	122.7
J3 - ground	5.57	111.4	4.52	90.4	5.09	101.9	6.59	131.8
RMSEP (global)	0.49		0.61		0.13		1.43	

Table 6. Mean value of the concentrations found from 3 replicates and percentage of recovery (% R) for the six river samples and ground water spiked with 5 ppm of each pesticide (validation set 2). (RYL = Carbaryl, CBF = Carbofurane, PPX = Propoxur, IPC = Isoprocarb).

CONCLUSIONS

Multivariate analysis is gaining importance nowadays and methods using this technique should be validated accordingly. In the present paper, important performance characteristics such as accuracy, trueness and determination limits are reported for a FIA method using classical least squares regression. The calculation and interaction of these figures of merit with other performance measurements of the calibration model such as selectivity, sensitivity and the variance-decomposition proportions are shown. The main problem found was collinearity. The specific methodology proposed to determine pesticides in water requires a preconcentration step to reach the concentration level necessary for spectrophotometric determination of real samples within the legal limits. By

accepting a global error of approximately 10%, and considering that 60% of the error corresponds to the previous steps of the analysis and 40% to the instrumental determination itself, the statistical tests performed indicated that only 3 of the four pesticides could be determined with acceptable accuracy.

ACKNOWLEDGMENTS

J. Ferré thanks the Comissionat per a Universitats i Recerca of Generalitat de Catalunya, for providing a doctoral fellowship (FI/94-7001). B. Fernandez-Band thanks the Spanish Ministry of Education and Science for the Intercampus fellowship received.

LITERATURE CITED

1. J.H. Ruzicka, *Proc. Soc. Anal. Chem.*, 10 (1973) 32.
2. E. Ballesteros, M. Gallego and M. Valcárcel, *J. Chromatography*, 633 (1993) 169.
3. Y. Daghbouche, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 314 (1995) 203.
4. D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martínez, J.S. Salau and M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 352.
5. M.T. Tena, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *J. Chromatographic Science*, 30 (1992) 276.
6. M.R. Driss, M.C. Hennion and M.L. Bouguerra, *J. Chromatography*, 639 (1993) 352.
7. J.A. Pérez López, A. Zapardiel, E. Bermejo, E. Arauzo and L. Hernandez, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 620.
8. A. Guiberteau, T.G. Diaz, F. Salinas and J.M. Ortiz, *Anal Chim. Acta*, 305 (1995) 219.
9. M.C. Quintero, M. Silva and D. Pérez-Bendito, *Talanta*, 36 (1989) 717.

10. K. M. Appaiah, R. Ramakrishna, R.R. Sabbarao and O. Kapur. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 65 (1982) 32.
11. C.S.P. Sastry and D. Vijaya, *Talanta*, 34 (1989) 372.
12. C.S.P. Sastry, D. Vijaya and D.S. Mangala, *Analyst*, 112 (1987) 75.
13. K.D. Khalaf, J. Sancenón and M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 266 (1992) 119.
14. K.D. Khalaf, A. Morales Rubio and M. de la Guardia, *Anal. Chim Acta*, 280 (1993) 231.
15. B. Fernandez Band, P. Linares, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1672.
16. A. Espinosamansilla, F. Salinas and A. Zamoro, *Mikrochim. Acta*, 113 (1994) 9.
17. A. Espinosamansilla, F. Salinas and A. Zamoro, *Analyst*, 119 (1994) 1183.
18. J.M. Garcia, A.I. Jimenez, J.J. Arias, K.D. Khalaf, A. Morales Rubio and M. de la Guardia, *Analyst*, 120 (1995) 313.
19. A. Lorber and B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 67.
20. J. Ferré and F.X. Rius, *Química Analítica*, 15 (1996) 259.
21. J.H. Kalivas and P.M. Lang, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 32 (1996) 135.
22. J. Ferré and F.X. Rius, in preparation.
23. J. Fleming, B. Neidhart, H. Albius and W. Wegscheider, *Accred. Qual. Assur.*, 3 (1996) 135.
24. J. Riu and F.X. Rius, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1851.
25. R. Boque and F.X. Rius, *J. Chemom.*, submitted for publication.
26. C.A. Clayton, J.W. Hiñes and P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506.
27. J.H. Kalivas. *J. Chemom.*, 3 (1989) 409.
28. G. Bauer, W. Wegscheider and H.M. Ortner, *Spectrochim. Acta*, 46B (1991) 1185.

Computing detection limits in multicomponent spectroscopic analysis

R. BOQUE *, F.X. RIUS

Departament de Química. Universitat Rovira i Virgili.

Pça. Imperial Tàrraco, 1, 43005 - Tarragona. Catalonia. SPAIN.

Statement of the problem

Although international standards concerning the performance of analytical laboratories, such as ISO 25 or EN 45001, indicate that the limits of application of analytical methodologies must be established, the calculation of detection limits in multivariate analysis is made more difficult in practice for two reasons: on the one hand, the theoretical problem of obtaining the appropriate estimators [1] and on the other, the lack of suitable calculation programmes. This paper discusses a new algorithm for calculating detection limit estimators in multicomponent analysis, where the direct calibration models are used. The methodology developed is based on the statistical theory of hypothesis tests applied to the concentration domain [2] and takes into account the p probability of falsely accepting the absence of analyte, something which has been systematically ignored in the approaches developed so far. The performance of the new estimator is assessed by comparing of the results with the ones obtained with two previously developed approaches.

The algorithm and computer program

The program is written in Matlab language (M-file). Figure 1 shows the flow-diagram of the program. The inputs of the program are the calibrations set's matrices of responses and concentrations (\mathbf{R} and \mathbf{C} respectively), the unknown sample's vector (or matrix) of responses (\mathbf{r}_{un}) and their respective associated errors, $\text{var}(\mathbf{R})$, $\text{var}(\mathbf{C})$ and $\text{var}(\mathbf{r}_{un})$. The user can choose whether these variances are to be supplied, estimated from the residuals of the calibration model or neglected. The α and P probabilities of committing false positive and false

negative decisions should also be input by the end user either from a previously defined file or from the keyboard.

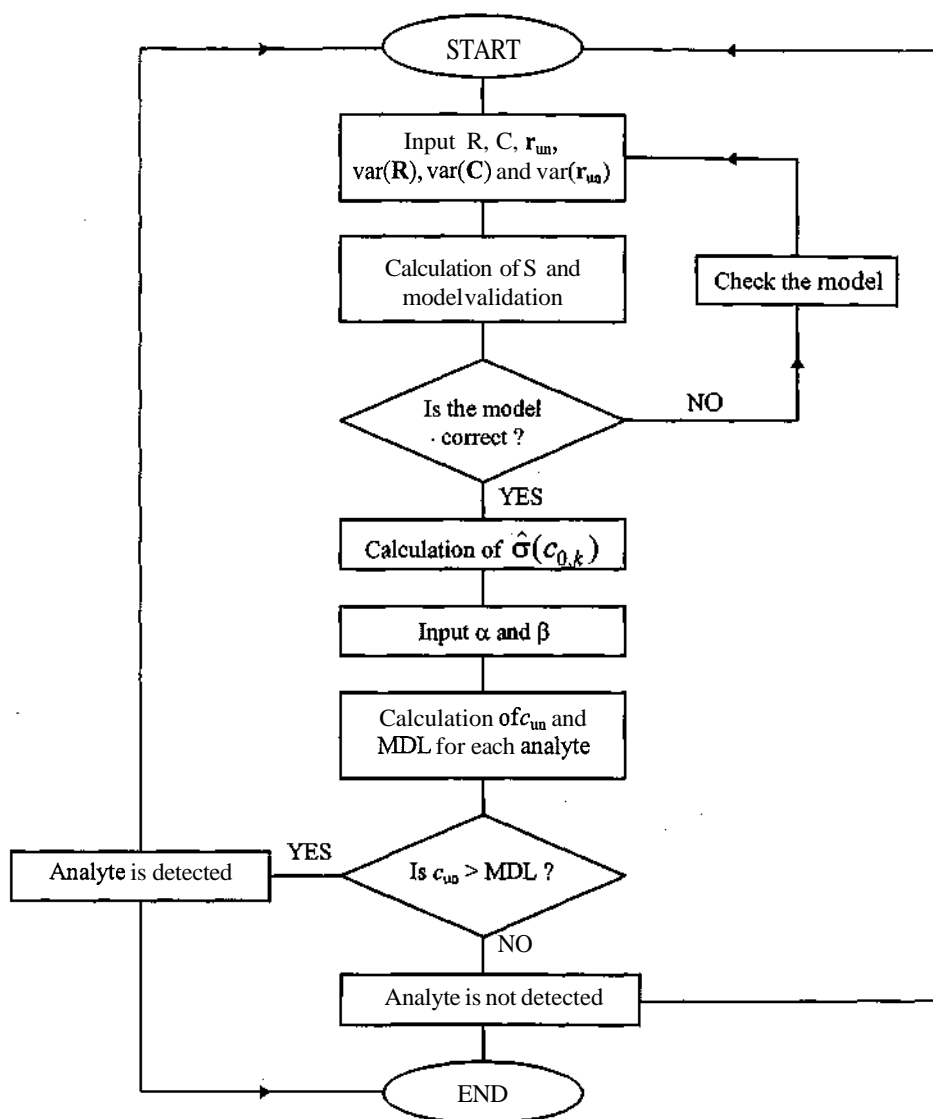


Figure 1. Flow-diagram of the algorithm developed.

The multivariate limit of detection (MDL) is calculated from the following equation:

$$(\text{MDL})_k = \Delta(\alpha, \beta) \hat{\sigma}(c_{0,k}) \quad (1)$$

where $\hat{\sigma}(c_{0,k})$ is the estimated standard deviation of the predicted concentration under the null hypothesis, which is calculated by using the data supplied by the user. $A(a, P)$ is the non-centrality parameter of a non-central t -distribution, which depends on the a and p probabilities, as well as on the number of degrees of freedom, v , given by $\hat{\sigma}(c_{0,k})$. $A(a, p)$ is calculated by following the procedure developed by Cooper [3] and described by Sarabia and Ortiz [4]. The source code for its calculation is shown in Figure 2.

The outputs of the program are the analyte predicted concentration, c_{un} and the multivariate limit of detection, MDL. Finally, these two values are compared and the detection decision is established at the levels of significance fixed by the user.

Comparison of results

Spectroscopic data set. The algorithm developed was used to calculate the MDL for each of the four constituents of a mixture of RNA nucleotides analysed by means of UV-Vis spectroscopy. The experimental data consist of the matrix of molar absorptivities $\mathbf{S}(36 \times 4)$ of the nucleotides, calculated from the pure spectra recorded between 220 and 290 nm, and a diagonal matrix $\mathbf{C}_0(4 \times 4)$ of molar concentrations of the pure analytes. The spectra of the four nucleotides is shown in Fig. 3, where highly overlapped signals can be seen.

```

function [delta] = td(proba,probb,v);

% Calculation of the non-centrality parameter of a non-central t-distribution
% with given alfa and beta probabilities of error
%
% Based on Cooper's AS5 algorithm
% Source: "Applied Statistical Algorithms", Ellis Horwood, Chichester, 1985.
%
% proba : probability of type I error
% probb : probability of type II error
% v : degrees of freedom
% deltaO : initial value of the noncentrality parameter
% Called functions : norminv, tinv, tdes

x = norminv(proba);
t = tinv(proba,v);
t1 = x + 2*t;
deltaO = t1*(1 - 1/(4*v)) - x*sqrt(1 + t1^2/(2*v));

prob = tdes(t,v,deltaO);

if (1-prob) - probb < 0
    while prob < probb - 0.00001
        if abs(prob - probb) > 0.0011
            deltaO = deltaO + 0.01;
        else
            deltaO = deltaO + 0.0001;
        end
        prob = 1 - tdes(t,v,deltaO);
    end
elseif (1-prob) - probb > 0
    prob = 1 - prob;
    while prob > probb + 0.00001
        if abs(prob - probb) > 0.0011
            deltaO = deltaO - 0.01;
        else
            deltaO = deltaO - 0.0001;
        end
        prob = 1 - tdes(t,v,deltaO);
    end
end

delta = deltaO;

```

Figure 2. Source code for the calculation of the non-centrality parameter of a non-central t -distribution.

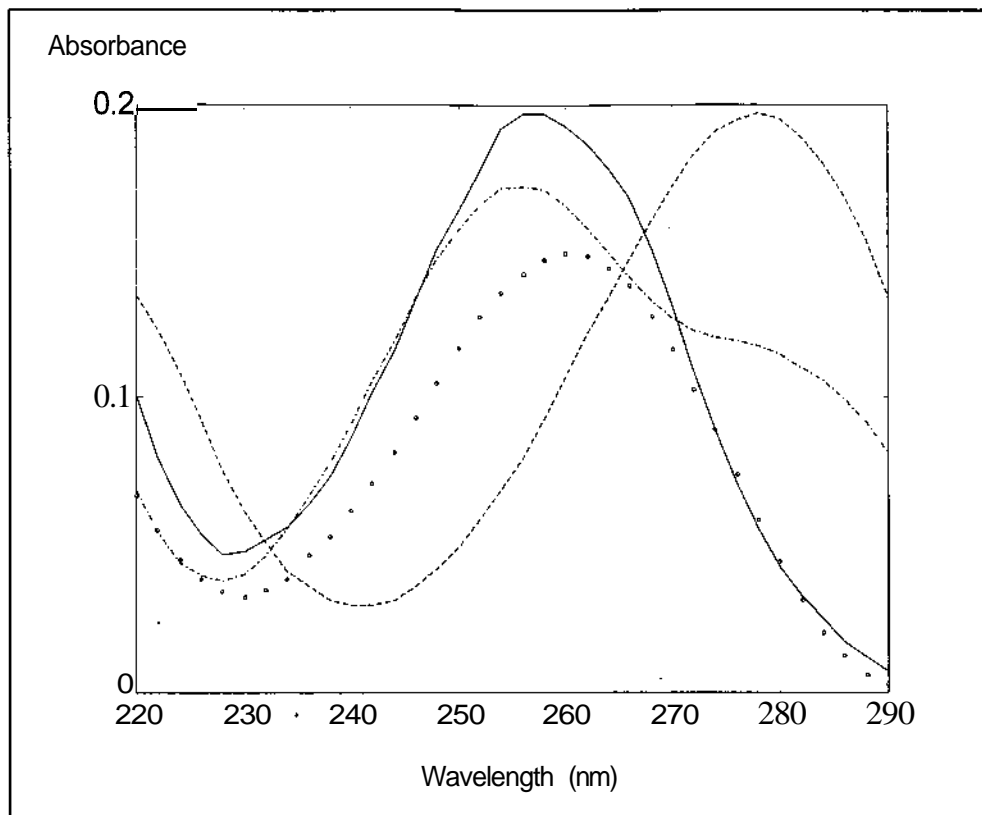


Figure 3. Pure spectra of the four RNA nucleotides: (-) adenylic acid, (--) cytidylic acid, (-·-) suanylic acid and (·) uridylic acid.

Detection limits. A mixture of the four analytes was used to calculate the MDL. The results were compared with the ones derived from the conventional definition of MDL (Eq 26, Ref 5), and the ones provided by Lorber (Eq 39, Ref 6). However, for comparison purposes, the component due to error in the concentrations of the analytes in the calibration samples has not been taken into account and the non-centrality parameter, $\Delta(\alpha, \beta)$, was given a value of 3. The results are shown in Table 1.

	Conventional definition	Lorber 1986	Boqué & Rius 1996
Adenylic	0.42	0.60	0.46
Cytidylic	0.09	0.10	0.12
Suanylic	0.18	0.20	0.19
Uridylic	0.56	0.87	0.62

Table 1. Comparison of the multivariate detection limits for the four constituents ($\times 10^{-5}$ M)

It can be observed that the values obtained are of the same order as those of the approaches described above. Cytidylic acid has the smallest MDL and this effect is related to the selectivity of its pure constituent spectrum, as can be seen in Fig 3.

However, the main advantage of our program is that it enables the user to select the α and β probabilities of both types of error, always present in chemical analysis. The MDL for the four nucleotides and different values of α and β are shown in Table 2.

	$\alpha = 0.10$			$\alpha = 0.05$			$\alpha = 0.01$		
	$\beta=0.10$	$\beta=0.05$	$\beta=0.01$	$\beta=0.10$	$\beta=0.05$	$\beta=0.01$	$\beta=0.10$	$\beta=0.05$	$\beta=0.01$
Adenylic	0.38	0.44	0.54	0.45	0.51	0.62	0.62	0.68	0.80
Cytidylic	0.24	0.27	0.34	0.28	0.32	0.38	0.39	0.43	0.50
Suanylic	0.34	0.39	0.48	0.41	0.46	0.55	0.56	0.61	0.72
Uridylic	1.01	1.15	1.42	1.19	1.34	1.62	1.63	1.80	2.12

Table 2. MDL for the four constituents at different levels of significance ($\times 10^{-5}$ M)

The graphical representations of the MDL as a function of the β probability of error, or as a function of the α and β probabilities together (tridimensional representations) are called *characteristic curves of detection* [4]. Fig. 4 shows both types of curves for the cytidylic acid.

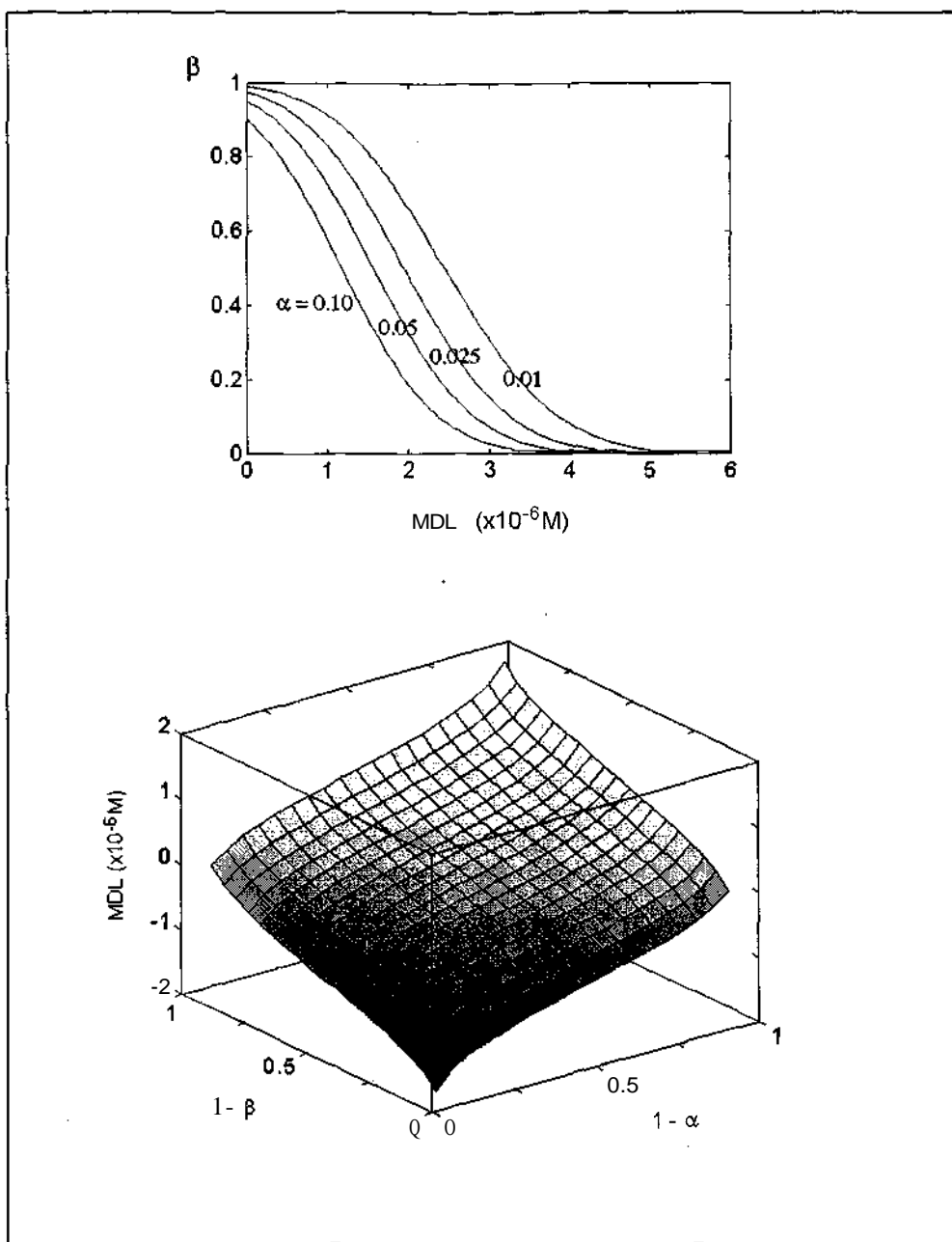


Figure 4. Characteristic curves of detection for the cytidylic acid. (a) MDL versus p error for different probabilities of a error. (b) MDL versus both a and P errors.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICYT project BP93-0366) is gratefully acknowledged.

References

- [1] R. Boque and F.X. Rius, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 32 (1996) 11.
- [2] R. Boque and F.X. Rius, *J. Chemom.* (submitted).
- [3] B.E. Cooper, in P. Griffiths and I.D. Hill (Editors), *Applied Statistical Algorithms*, Ellis Horwood, Chichester, 1985. (<http://lib.stat.cmu.edu/apstat/>)
- [4] L. Sarabia and M.C. Ortiz, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 1.
- [5] K.S. Booksh and B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [6] A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167.

Capítol 5

Límits de detecció en models de calibració inversos

Els models inversos són els més àmpliament utilitzats en els mètodes d'anàlisi que fan servir la calibració **multivariant**. En ells, la concentració de l'analit d'interès es modela en funció de les mesures instrumentals segons una relació que sovint és lineal. Es tracta, doncs, de models empírics que no tenen el suport teòric de cap llei fisicoquímica, com ara la llei de Lambert-Beer en el cas dels models **espectroscòpics** clàssics. L'avantatge més important que incorporen és que, a l'hora de construir el model, hom només ha de conèixer la concentració de l'analit en estudi en l'etapa de calibració. Per tant, són extremadament útils quan es tracta d'analitzar mostres amb matrius complexes, on el coneixement que es té de la concentració de tots els constituents presents és insuficient. Per contra, com el que hom pretén és que el model sigui útil per predir, tots els constituents presents en les mostres i que contribueixen a la resposta global han d'estar suficientment representats i han de modelar-se implícitament en l'etapa de calibració.

En aquest tipus de models, l'estudi dels límits de detecció ha estat menys desenvolupat que en els models de calibració clàssics, essent l'aproximació desenvolupada per Lorber i Kowalski [1] la més remarcable (veure apartat 2.3). En ella, els autors construeixen els intervals de confiança de la concentració predita pel model de calibració i estableixen que si aquest interval inclou el valor de concentració zero, llavors l'analit en la mostra es troba per sota del límit de detecció. Recentment, Faber i Kowalski [2] han ampliat el treball inicial, derivant expressions per l'error de predicció en models de calibració inversos utilitzant diferents mètodes de regressió i incorporant termes d'error experimental, tant en les variables dependents com en les independents. En tots els casos, s'observa clarament que no s'estableix per a un mètode determinat un límit de detecció fix, sinó que aquest és dependent de la mostra que s'està analitzant. Aquest aspecte, que ja ha estat comentat amb anterioritat, és d'una importància transcendental, ja que s'abandona el concepte d'un límit de detecció únic en el cas de la calibració

univariant per a donar pas a un concepte de detecció variable, motivat per l'especificitat de les mostres en anàlisi.

Totes les aproximacions presentades fins ara a la bibliografia estan protegides respecte a la probabilitat α de cometre un error de la espècie (fals positiu); *i.e.* afirmar erròniament que l'analit es troba present a la mostra. No es fa menció en cap moment de la probabilitat existent d'afirmar erròniament que l'analit no es troba present a la mostra. Aquesta probabilitat P de cometre un error de 2a espècie (o fals negatiu) ha estat sistemàticament obviada en el tractament dels límits de detecció en aquest tipus de models. És per aquest motiu que ens vam plantejar l'objectiu de desenvolupar estimadors dels límits de detecció que tinguessin en compte ambdues probabilitats d'error i que alhora fossin capaços d'incorporar els diversos termes d'error experimental, tant en l'etapa de calibració com en la de predicció.

En el primer apartat es presenta un estimador del límit de detecció desenvolupat a partir d'una aproximació univariant i basat en els intervals de confiança del model de calibració. A continuació, i seguint les darreres recomanacions fetes per la IUPAC sobre la capacitat de detecció i quantificació dels mètodes d'anàlisi, es presenta un estimador basat en la teoria dels tests d'hipòtesi.

5.1. Estimador basat en els intervals de confiança del model de calibració

En una primera aproximació, i aprofitant el treball de Lorber i Kowalski [1], hom va plantejar ampliar la definició del límit de detecció a partir dels intervals de confiança de la concentració predita pel model de calibració. La primera part de

l'aproximació no presenta variacions respecte de la proposada per Lorber i Kowalski: a partir de la resposta d'una determinada mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} , és possible obtenir la concentració de l'analit k predita pel model, així com el corresponent interval de confiança ($\hat{c}_{un,k} \pm y$), construït amb un nivell de significació $(1 - \alpha)$, i on $\gamma = t_{\alpha} \hat{v}\hat{a}r(c_{un,k})^{1/2}$. El criteri per decidir si l'analit és detectable o no consisteix en comprovar si el valor ($\hat{c}_{un,k} - \gamma$) inclou el valor de concentració zero. En cas negatiu, es pot concloure que la concentració d'analit en la mostra està per sobre del límit de detecció del mètode, amb una probabilitat α de cometre un fals positiu.

Per a desenvolupar la segona part de la metodologia i incorporar la probabilitat d'error P en l'estimador del límit de detecció, hom va recórrer al treball dut a terme per Hubaux i Vos [3] en el camp univariant (veure apartat 1.2). En ell, els autors deriven un límit de decisió en l'àmbit de les respostes i un límit de detecció en l'àmbit de les concentracions, a partir dels intervals de confiança de la corba de calibració. El límit de decisió, o nivell crític, s'estableix com el mínim senyal per damunt del qual un senyal enregistrat és considera degut a la presència de l'analit en la mostra. Aquesta resposta correspon a la intersecció de la banda superior de confiança de la corba (construïda amb un nivell de significació $1-\alpha$) amb l'eix d'ordenades, o el que és el mateix, a un nivell zero de concentració. Aquesta resposta pot ésser transformada, mitjançant el propi model de calibració, en el corresponent límit de decisió en l'espai de les concentracions. Si es desitja, però, un límit de detecció que tingui en compte la probabilitat de cometre un fals negatiu, es pot propagar la resposta crítica sobre la banda inferior de confiança (construïda ara amb un nivell de significació $1-\beta$). Traslladant aquestes consideracions a un model multivariant, el problema radica també en l'obtenció de la resposta corresponent al límit de decisió i de la concentració corresponent al límit de detecció.

Un cop establertes les bases de treball, el procediment general dut a terme per a establir els límits de detecció en models de calibració inversos s'esquemmatitza tot seguit:

1. Construcció i validació del model a partir de les matrius de respostes i concentracions de l'etapa de calibració, \mathbf{R} i \mathbf{c} . Càlcul del rang químic òptim del model.
2. Enregistrament de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} , i càlcul de la concentració predita pel model, $c_{un,k}$.
3. Càlcul de la variància de la concentració predita, $\hat{\text{var}}(c_{un,k})$, a partir de l'expressió adoptada.
4. Càlcul de la resposta multivariant crítica, \mathbf{r}_D , resposta instrumental corresponent a una concentració nul·la d'analit, amb una probabilitat α de cometre un fals positiu.
5. Càlcul de la concentració c_D , a partir de la resposta de detecció, \mathbf{r}_D , amb una probabilitat β fixada de cometre un fals negatiu.
6. Comparació de c_D amb $c_{un,k}$ i adopció del criteri de detecció.

La principal dificultat és, sens dubte, el càlcul de la resposta multivariant crítica, \mathbf{r}_D , *i.e.* la resposta corresponent a una mostra amb concentració d'analit zero. Matemàticament, aquesta resposta pot obtenir-se a partir de la intersecció de la banda inferior de confiança del model amb el pla J -dimensional de respostes corresponents a una concentració d'analit zero, de manera anàloga al procediment descrit per Hubaux i Vos (Fig 5.1), com:

$$\hat{c}_{un} - \gamma = 0 \quad (5.1)$$

o el que és el mateix:

$$\hat{c}_{un,k} = t_{\alpha} \text{vâr}(c_{un,k})^{1/2} \quad (5.2)$$

Tant el costat esquerre com el costat dret de l'Eq (5.2) inclouen la resposta de la mostra desconeguda. Per la seva banda, el terme $\text{vâr}(c_{un,k})$ pot ser més o menys complex, depenent de si incorpora o no totes les fonts d'error experimental associades al mètode. El problema en regressió multivariant, però, és el fet que existeixen infinites respostes crítiques, \mathbf{r}_D , que compleixen l'Eq (5.2). Això es pot il·lustrar clarament amb l'exemple: si imaginem un model bivariant expressat en notació escalar, la concentració ve donada per:

$$c = b_0 + b_1 r_1 + b_2 r_2 \quad (5.3)$$

Si es relacionen les equacions (5.1) i (5.3) i hom suposa per un moment que l'interval de confiança de la concentració predita és un terme constant, llavors s'obté:

$$b_0 + b_1 r_1 + b_2 r_2 = cte \quad (5.4)$$

Es pot deduir que, per uns coeficients del model donats, fy , existeix un conjunt infinit de parells (r_1, r_2) que compleixen l'equació anterior. Les mateixes conclusions s'extreuen si no es considera el terme γ constant i es desenvolupa extensament d'acord amb l'Eq (5.2).

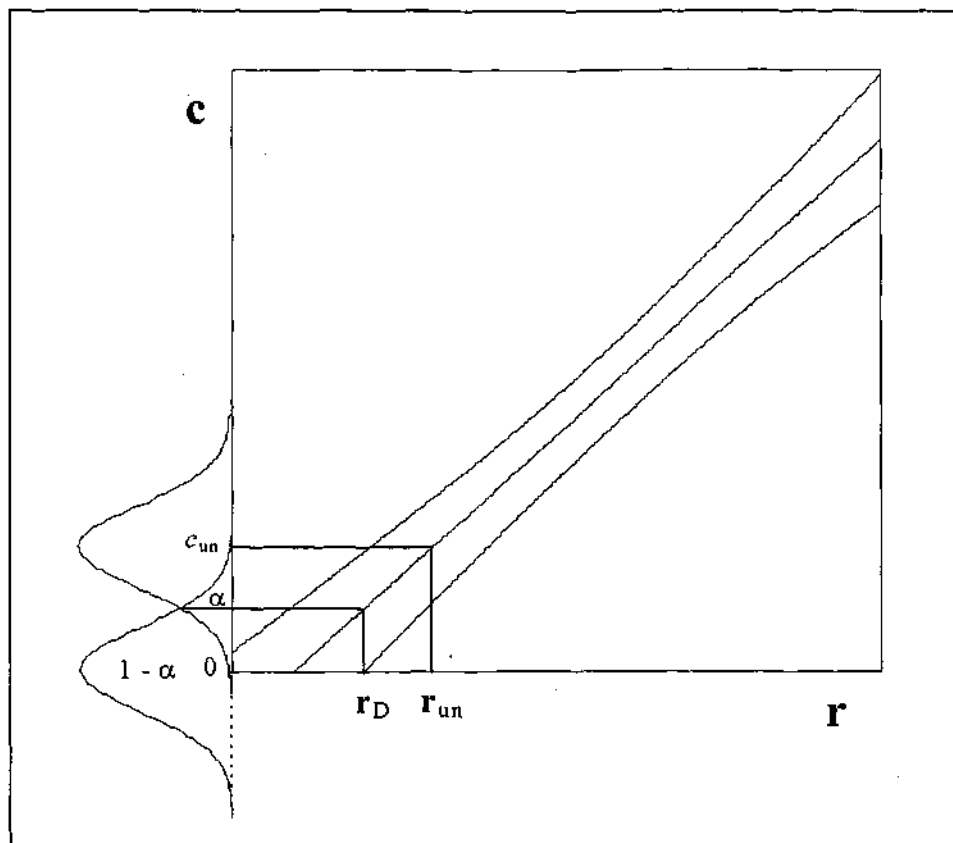


Fig. 5.1 Representació gràfica de la resposta multivariant crítica, r_D . Per tal de facilitar la visualització, el model invers s'ha representat en una sola dimensió.

El fet que existeixin múltiples respostes multivariants crítiques, r_D , té una interpretació experimental clara, ja que poden ser obtingudes a partir de diferents mostres sense contingut de l'analit en estudi, però amb diferents concentracions de les substàncies interferents. Cadascuna d'aquestes mostres dóna lloc a una resposta multivariant diferent, encara que el model predigui una concentració zero per l'analit en qüestió,

A partir d'aquest punt, el problema esdevé l'obtenció d'una resposta crítica, r_D , única per a una mostra desconeguda donada. La solució plantejada en aquest

primer treball consisteix en trobar la resposta crítica a partir de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} , a partir d'una aproximació geomètrica. Si hom defineix una recta, en l'espai J -dimensional, que uneixi la resposta de la mostra desconeguda (\mathbf{r}_{un}) amb l'origen de coordenades del model, la intersecció d'aquesta recta amb l'interval inferior de confiança ($\tilde{c}_{un,k} - y$), quan la concentració d'analít és zero, proporcionarà una resposta \mathbf{r}_D única. La interpretació química d'aquesta resposta és una mostra amb unes concentracions d'interferents proporcionals a les de la mostra desconeguda (matriu química similar), però sense la presència de l'analít d'interès. Trobar una resposta exactament equivalent a la resposta de la mostra desconeguda, però sense la presència de l'analít, suposaria calcular la contribució neta d'aquest analít i després restar-la de la resposta total. Aquest darrer procediment, molt més relacionat amb el concepte de senyal net de Lorber [4], es descriu amb més detall en l'apartat 5.2.

La resposta crítica (\mathbf{r}_D) és, doncs, el punt de l'espai J -dimensional que pertany a la recta definida anteriorment i que compleix l'eq. (5.1). L'algorisme de càlcul de \mathbf{r}_D pot ser més o menys llarg en funció de la complexitat de l'expressió de la variància de la concentració predita, $\text{vâr}(c_{un,k})$. Un cop trobada la resposta crítica, al nivell de significació $(1 - \alpha)$, la concentració derivada, c_L , pot obtenir-se a partir del model de calibració, eq. (2.21), com:

$$c_L = \mathbf{r}_D^T \mathbf{b}_k \quad (5.5)$$

Degut als errors aleatoris en les mesures experimentals podria succeir, però, que si s'analitzés a l'atzar una mostra amb aquest nivell de concentració, la resposta instrumental obtinguda donés lloc, a través del model de calibració, a una concentració per sota de la concentració crítica. Per tal de tenir controlada també la probabilitat P de cometre un fals negatiu, la concentració corresponent al límit

de detecció, c_D , es troba finalment projectant la resposta r_D , sobre l'interval superior de confiança, construït ara amb un nivell de significació $(1 - P)$. Matemàticament, aquesta concentració, c_D , es pot expressar com:

$$c_D = c_L + t_\beta \hat{\text{var}}(c_L)^{1/2} \tag{5.6}$$

La Fig. 5.2 recull gràficament el procediment de càlcul del límit de detecció.

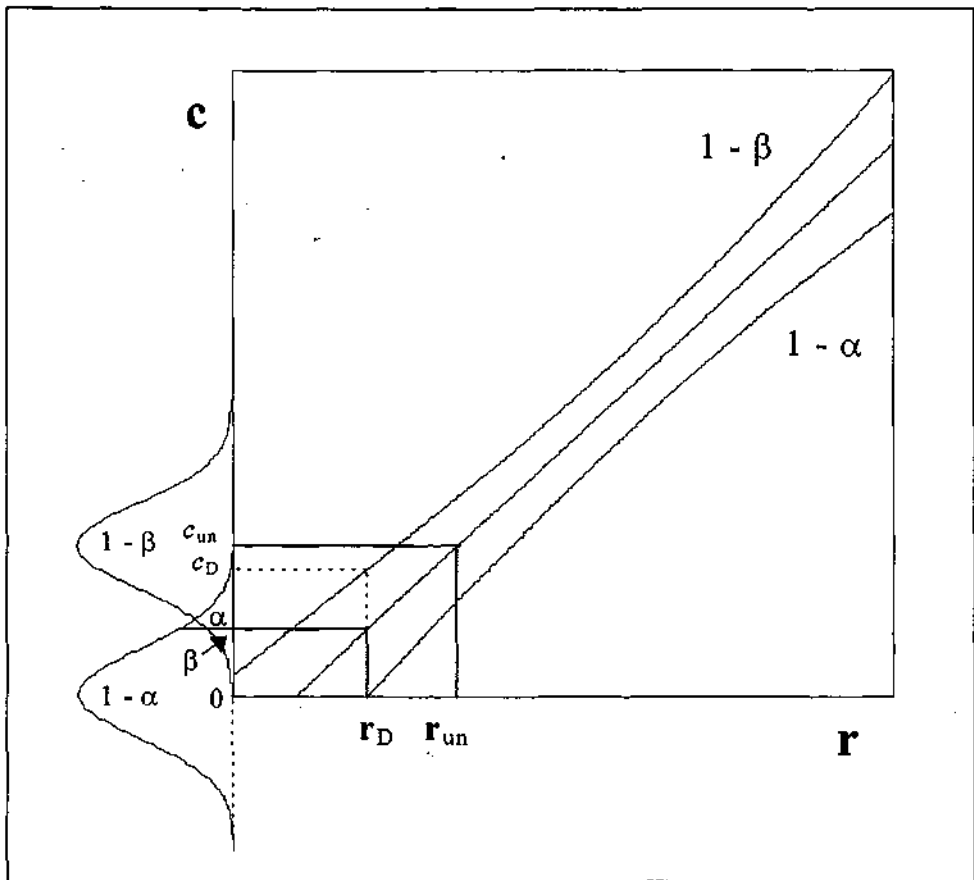


Fig. 5.2 Representació gràfica univariànt del càlcul del límit de detecció, c_D . En aquest cas, $c_{un} > c_D$ i en conseqüència l'analít és detectable, amb probabilitats α i β predefinides. Per facilitar la visualització, el vector multidimensional de respostes, r , s'ha reduït a una sola dimensió.

Finalment, el criteri de detecció es modifica sensiblement. Per una resposta donada, r_{un} , el fet que l'interval de confiança de la concentració predita pel model no inclogui el valor de concentració zero ja no és condició única per decidir que Panalit és detectable. Per establir si un analit es troba present a la mostra, amb probabilitats d'error α i β perfectament establertes, el valor de la concentració predita ha de ser superior al valor de la concentració, c_D , corresponent al límit de detecció.

L'estimador desenvolupat es va aplicar al càlcul dels límits de detecció en dades reals, consistents en l'anàlisi del contingut de Ca^{2+} i Mg^{2+} en mostres d'aigües naturals, mitjançant un mètode d'anàlisi per injecció en flux (*Flow Injection Analysis*, FIA) amb detecció espectrofotomètrica. Es van estudiar també els diversos factors experimentals que tenen influència sobre els valors dels límits de detecció, a partir de simulacions fetes sobre les dades originals.

El desenvolupament teòric de l'estimador derivat, així com els resultats obtinguts, tant en el càlcul dels límits de detecció com en l'estudi de la influència dels diferents paràmetres experimentals, es presenten al final del capítol, en l'article titulat *Multivariate Detection Limits with Fixed Probabilities of Error*, enviat per a la seva publicació a la revista *Analytica Chimica Acta*.

5.2. Estimador basat en els tests d'hipòtesi

La dificultat de càlcul de l'estimador derivat en l'apartat anterior, així com l'ús d'una aproximació geomètrica per a la obtenció de la resposta crítica de detecció, r_D , ens va motivar a intentar desenvolupar un altre estimador pels límits de detecció en models de calibració inversos. Aprofitant la recerca duta a terme en els

models de calibració directes i tenint presents les darreres recomanacions de la IUPAC en el camp de la detecció [5], hom va plantejar fer un tractament del problema a partir de la teoria dels tests d'hipòtesi. De la mateixa manera que en el capítol 4, es pot definir una concentració crítica, per damunt de la qual es considera que l'analit es troba present a la mostra, com:

$$c_{L,k} = t_{\alpha} \hat{\text{vâr}}(c_{k|H_0})^{1/2} \quad (5.7)$$

on t_{α} és el valor de la distribució t d'Student d'una cua amb v graus de llibertat i nivell de significació $(1-\alpha)$, i $\hat{\text{vâr}}(c_{k|H_0})$ és la variància estimada de la concentració predita pel model sota la hipòtesi nul·la. Per la seva banda, el límit de detecció per l'analit k es pot expressar com:

$$(\text{LOD})_k = \Delta(\alpha, \beta) \hat{\text{vâr}}(c_{k|H_0})^{1/2} \quad (5.8)$$

on $\Delta(\alpha, \beta)$ és el paràmetre de descentrat d'una distribució t d'Student descentrada amb v graus de llibertat i té en compte les probabilitats de cometre falsos positius i falsos negatius.

Utilitzant aquesta metodologia, el problema radica en el càlcul del terme $\hat{\text{vâr}}(c_{k|H_0})$. Hi ha una sèrie d'autors que han proposat expressions per a la variància de la concentració predita, vàlides per a qualsevol mètode de regressió [1,6]. Fins i tot s'han introduït expressions per a la incertesa en programes informàtics de calibració multivariant [7]. Recentment, Faber i Kowalski [2] han criticat aquestes expressions i n'han derivat d'altres a partir del mètode de la propagació d'errors i basats en els models d'errors en les variables (*errors-in-variables*, EIV), els quals difereixen lleugerament dels models de regressió clàssics en el sentit que es tenen en compte els errors experimentals de mesura,

tant en les variables predictorres (respostes) com en les variables predites (concentracions). Aquests models venen regits per l'eq. (2.14):

$$\mathbf{c}_k = \mathbf{R} \mathbf{b}_k + \mathbf{e}$$

amb

$$\tilde{\mathbf{c}}_k^* = \mathbf{c}_k + \Delta \mathbf{c}_k$$

$$\tilde{\mathbf{R}} = \mathbf{R} + \mathbf{A} \mathbf{R}$$

on els vectors o matrius amb el símbol “~” són variables mesurades (observades) i el símbol "A" indica el corresponent error de mesura de la variable en qüestió (el qual no es pot observar). En conseqüència, i combinant les tres darreres expressions, s'obté el vector de concentracions mesurades de l'analit k , que s'expressa com:

$$\tilde{\mathbf{c}}_k = \tilde{\mathbf{R}} \mathbf{b}_k - \Delta \mathbf{R} \mathbf{b}_k + \mathbf{e} + \Delta \mathbf{c}_k \quad (5.9)$$

on \mathbf{b}_k és el vector de coeficients de regressió, estimat per ILS, PCR o PLS (veure apartat 2.1). Aquests tipus de models són molt útils quan les concentracions de l'analit k en les mostres de calibració es determinen mitjançant un mètode de referència amb una imprecisió no menyspreable. L'exemple més típic és la determinació del percentatge de proteïna en mostres de blat mitjançant espectroscopia NIR; en aquest cas el contingut de proteïna en les mostres de calibració s'estableix a partir del mètode Kjeldahl, mètode que habitualment produeix errors del 0.2% a nivells del 10% de proteïna en blat.

De la mateixa manera, en l'etapa de predicció, la resposta mesurada de la mostra desconeguda es pot expressar com $\tilde{\mathbf{r}}_{\text{un}} = \mathbf{r}_{\text{un}} + \Delta\mathbf{r}_{\text{un}}$, on \mathbf{r}_{un} és la resposta real (no observable) i $\Delta\mathbf{r}_{\text{un}}$ és l'error de mesura en \mathbf{r}_{un} . Finalment, l'equació general de l'error de predicció, per a un model centrat, s'expressa com [2]:

$$\text{vâr}(c_{\text{un}}) = (I^{-1} + h_{\text{un}}) \left[\sigma_e^2 + \sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \sigma_{e_{\text{un}}}^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{r_{\text{un}}}^2 \quad (5.10)$$

En aquesta darrera expressió, σ_c^2 , CTR i $\sigma_{\mathbf{r}_{\text{un}}}^2$ són les variàncies dels errors experimentals en les concentracions i les respostes de calibració i en la resposta de la mostra desconeguda, respectivament. σ_e^2 i $\sigma_{e_{\text{un}}}^2$ són les variàncies residuals corresponents a la part no modelada de les mostres de calibració ($\mathbf{e} = \mathbf{c}_k - \mathbf{R}\mathbf{b}_k$) i de predicció ($e_{\text{un}} = c_{\text{un}} - \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{b}_k$), respectivament. El terme entre claudàtors de l'eq. (5.10) s'anomena en la literatura estadística *variància efectiva*, σ_{ef}^2 , i s'obté experimentalment a partir dels residuals de les concentracions del model de calibració [8]. Finalment, el terme h_{un} és el *leverage* de la mostra desconeguda, el qual proporciona la posició de l'esmentada mostra en l'espai de calibració. Aquest terme s'expressa, de forma general, com:

$$h_{\text{un}} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+ (\mathbf{R}^+)^T \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (5.11)$$

La diferència entre els diferents mètodes de regressió respecte el càlcul de h_{un} radica en la forma d'estimar la matriu \mathbf{R}^+ (veure apartat 2.1).

S'observa que l'eq. (5.10) consta de tres termes. La naturalesa de cadascuna de les contribucions i la seva influència sobre la incertesa global es pot apreciar en la Fig. 5.3.

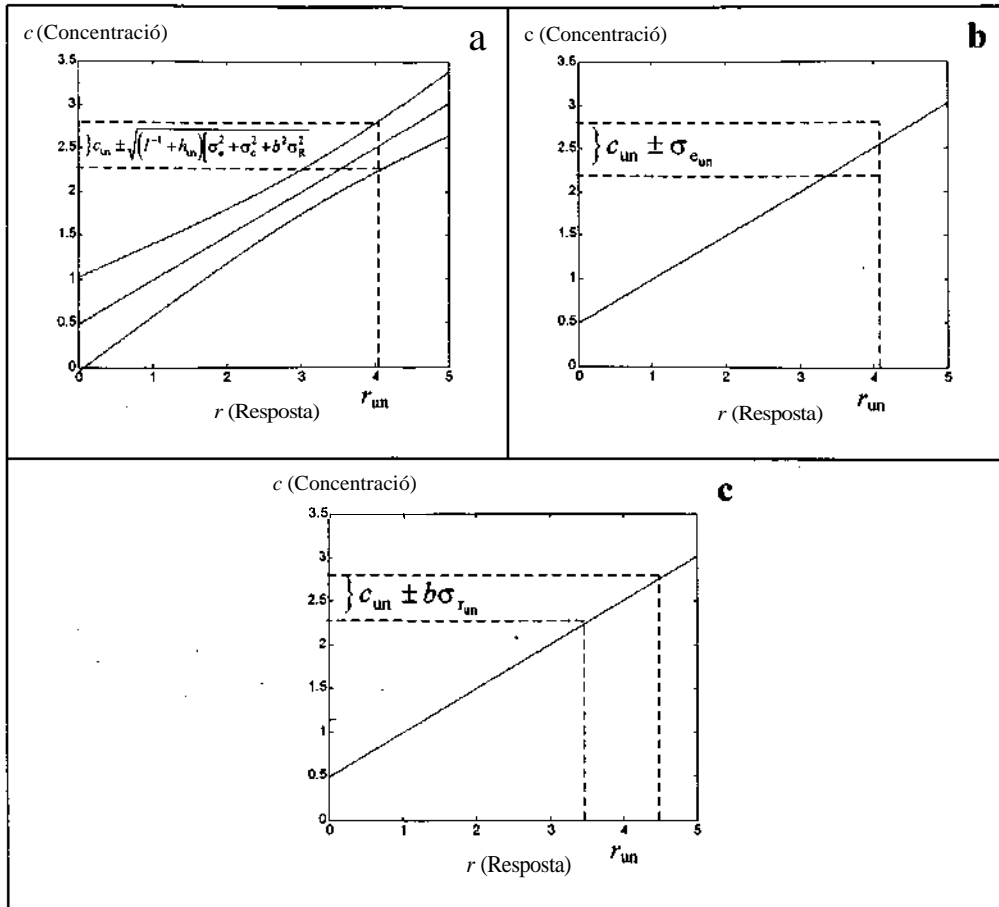


Fig. 5.3. Diferents contribucions a la variància de predicció per a un model de calibració invers i en l'espai unidimensional. La contribució del model que es mostra en (a) depèn de la posició de la mostra desconeguda en l'espai de calibració i és, evidentment, menor prop del centre del model. La contribució del residual de la mostra desconeguda, e_{un} , que es mostra en (b) és la raó de que fins i tot en absència d'errors de mesura i utilitzant el model vertader, no es pugui predir la concentració sense incertesa. Finalment, la contribució en (c) és deguda a l'error de mesura en la resposta de la mostra desconeguda i depèn del pendent de la recta. (Extret de la Ref. 2).

El primer terme és degut a la incertesa en l'estimació dels coeficients del model i conté les contribucions de l'error residual (σ_e) i l'error en les concentracions (σ_c) i respostes (σ_R) de calibració, respectivament. El segon terme és degut a la part de c_{un} que no ha estat modelada (contribució de la variància residual $\sigma_{e_{un}}^2$).

Finalment, el tercer terme és degut a la incertesa en la mesura de la resposta desconeguda ($\sigma_{\epsilon_n}^2$).

A partir de l'eq. (5.10) poden deduir-se diferents expressions per a la variància de la concentració predita, en funció de les assumpcions fetes. Així, si es negligeixen les contribucions degudes a la falta d'ajustatge, tant en les mostres de calibració com de predicció, l'eq. (5.10) esdevé:

$$\hat{\text{var}}(c_{un}) = (I^{-1} + h_{un}) \left[\sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{\epsilon_n}^2 \quad (5.12)$$

Aquesta darrera assumptió pot fer-se si el procés de calibració està basat en una llei física que descriu una relació exacta entre les respostes i les concentracions. En espectroscopia, l'exemple més clar i representatiu és la llei de Lambert-Beer.

Si es negligeixen els errors de mesura de les respostes instrumentals, l'equació anterior esdevé:

$$\hat{\text{var}}(c_{un}) = \sigma_c^2 (I^{-1} + h_{un}) \quad (5.13)$$

L'expressió equivalent a l'eq. (5.13) per als models de regressió clàssics s'obté substituint el terme I^{-1} per $(I^{-1} + 1)$ i σ_c^2 per σ_{ϵ}^2 [9]. En el cas d'incloure els errors en les respostes instrumentals, la solució equivalent per mínims quadrats a l'eq. (5.12), sota el model de regressió estàndard, s'obté inclouent un terme degut a la falta d'ajustatge del model (σ_{ϵ}^2) i substituint σ_c^2 per σ_{ϵ}^2 [8].

D'acord amb el procediment desenvolupat al capítol 4, hom està interessat en l'expressió de la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la, *i.e.*

quan no hi ha analit present a la mostra. Per tant, les equacions (5.10) i (5.12) es transformen respectivament en:

$$\hat{\text{vâr}}(c_{k|H0}) = (I^{-1} + h_{\text{un}|H0}) \left[\sigma_e^2 + \sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \sigma_{e_{\text{un}|H0}}^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{r_{\text{un}|H0}}^2 \quad (5.14)$$

$$\hat{\text{vâr}}(c_{k|H0}) = (I^{-1} + h_{\text{un}|H0}) \left[\sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{r_{\text{un}|H0}}^2 \quad (5.15)$$

El símbol "HO" indica que les quantitats corresponents s'han de calcular sota condicions d'hipòtesi nul·la. Així, el terme corresponent al *leverage* s'expressa com:

$$h_{\text{un}|H0} = \mathbf{r}_{\text{un}|H0}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{R}^{-1} \mathbf{r}_{\text{un}|H0} \quad (5.16)$$

Cal indicar que, en les eqs. (5.14) i (5.15) tots els termes, exceptuant / (el nombre de mostres de calibració) s'han de substituir per les seves corresponents estimacions. El terme $\mathbf{r}_{\text{un}|H0}$ s'ha d'estimar a partir de la resposta de la mostra desconeguda, \mathbf{r}_{un} , extraient-ne la contribució de l'analit k . En el cas dels models de calibració directes, aquesta resposta s'obtenia fent ús del concepte de senyal nul d'un analit. Es obvi doncs que aquest mateix concepte s'ha de traslladar als models de calibració inversos.

El mes de juny de 1996, dins el marc de la VI Conferència sobre Quimiometria en la Química Analítica (CAC'96), el Prof. Lorber [10] va presentar la generalització del concepte del *senyal net* d'un analit per a models inversos i per a mètodes que utilitzen instruments de segon ordre o ordres superiors. En el cas dels models inversos, si disposem de la matriu de respostes de les mostres de calibració, \mathbf{R} , i del vector de les concentracions de l'analit d'interès, \mathbf{c}_k , en cadascuna d'aquestes mostres de calibració, és també possible eliminar la contribució de l'analit k dels

espectres de la matriu R . Això es pot aconseguir mitjançant el mètode de l'anihilació del rang (RAM, *Rank Annihilation Method*) [11,12].

La filosofia del RAM es basa en el fet que el nombre d'espècies químiques presents en una mostra real és igual al rang químic de la matriu de la mostra. En el cas de la calibració de segon ordre, el principi de funcionament del RAM consisteix en relacionar la matriu de l'estàndard de l'analit pur en estudi (S) amb la matriu d'una mostra real (X). La matriu de l'estàndard es multiplica per un escalar k i, posteriorment, el producte es resta de la matriu de la mostra, obtenint-se una matriu diferència ($M = X - kS$). En el moment en què l'escalar k és igual al quocient entre la concentració de l'analit en la mostra i la concentració de l'analit en l'estàndard, la matriu M tindrà un rang químic inferior en una unitat al rang de la matriu X . Imaginem el cas, per exemple, que la concentració de l'analit és la mateixa en l'estàndard i en la mostra. Llavors, quan k valgui la unitat, la diferència ($X - S$) equivaldrà a una matriu en la qual s'ha eliminat la contribució de l'analit en qüestió.

De la mateixa manera, en calibració multivariant, la nova matriu, sense la contribució de l'analit k es pot expressar com:

$$\mathbf{R}_{-k} = \mathbf{R} - \kappa \mathbf{c}_k \mathbf{r}^T \quad (5.17)$$

essent \mathbf{r}^T una combinació lineal arbitrària de la matriu R (la qual ha d'incloure forçosament informació de l'espectre de l'analit K) i K un escalar. Encara que en el marc habitual de l'anihilació del rang, el vector \mathbf{r}^T ha de ser l'espectre de l'analit k pur, el fet de triar diferents combinacions lineals només afectarà el valor de l'escalar K . Aquest escalar pot calcular-se com:

$$\hat{K} = \frac{1}{\mathbf{r}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k} \quad (5.18a)$$

o el que és el mateix:

$$\hat{K} = \frac{1}{\hat{c}_k} \quad (5.18b)$$

on c_k és la concentració predita pel model corresponent a la resposta \mathbf{r}^T . \mathbf{R}^+ és la matriu pseudoinversa construïda només amb els A factors significants i $\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$ és el vector de coeficients de regressió estimats (\mathbf{b}_k) del model de calibració invers.

En el cas que \mathbf{r}^T sigui l'espectre de l'analític k pur, el terme $\mathbf{r}^T I c_k$ no és res més que el vector de sensibilitats, \mathbf{s}_k^T , de l'analític k , o el que és el mateix, l'espectre de l'analític k pur a concentració unitat. Finalment, si es multiplica \mathbf{s}_k^T pel vector de concentracions de l'analític k en cadascuna de les mostres de calibració, s'obté la matriu \mathbf{R}_0 dels espectres de l'analític k pur a diferents concentracions. Si es resta aquesta matriu de la matriu original de respostes de calibració, \mathbf{R} , el resultat és una matriu, \mathbf{R}_k , sense la contribució de l'analític d'interès. Cal notar que \mathbf{R}_k té la mateixa dimensió ($I \times J$) que la matriu inicial \mathbf{R} .

El problema es presenta quan no es disposa de l'espectre de l'analític k pur. En aquest cas, tal com s'ha esmentat abans, \mathbf{r}^T pot ser qualsevol combinació lineal de la matriu \mathbf{R} , sempre que contingui la contribució de l'espectre de l'analític k . Evidentment, \mathbf{r}^T també contindrà informació dels restants constituents de la mostra. Si es multiplica aquest vector per l'escalar K , calculat a partir de l'eq. (5.18), el que s'obté és una resposta que conté l'espectre de l'analític k pur a concentració unitat i altres contribucions degudes als interferents presents a \mathbf{r}^T .

Finalment, si es multiplica aquest darrer vector per \mathbf{c}_k , la matriu resultant $\kappa \mathbf{c}_k \mathbf{r}^T$ contindrà informació de l'espectre de l'analit k pur a les diferents concentracions de l'etapa de calibració. La diferència entre aquesta darrera matriu i \mathbf{R} (la matriu de respostes original) dóna lloc a la matriu \mathbf{R}_{-k} , la qual està exempta de la contribució de l'espectre de l'analit en estudi, però també de certa part dels espectres d'altres constituents presents a la mostra.

Un cop trobada la matriu \mathbf{R}_{-k} , el senyal net de l'analit k per a una mostra desconeguda qualsevol es pot calcular en el nou espai com:

$$\mathbf{r}_{\text{un},k}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_{-k}^+ \mathbf{R}_{-k}) \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (5.19)$$

on $(\mathbf{I} - \mathbf{R}_{-k}^+ \mathbf{R}_{-k})$ és una matriu de projecció; si la multipliquem per un vector determinat, la part d'aquest vector ortogonal a l'espai definit per \mathbf{R}_{-k} quedarà retinguda. La matriu \mathbf{R}_{-k} , a diferència de la matriu \mathbf{S}_k en els models de calibració directes, manté la dimensió original ($I \times J$) de la matriu \mathbf{R} . Per la seva banda, el senyal nul, *i.e.* la part de la resposta sense la contribució de l'analit k , s'obté com:

$$\mathbf{r}_{\text{un}|H_0} = \mathbf{R}_{-k}^+ \mathbf{R}_{-k} \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (5.20)$$

Un cop trobades l'expressió de $\text{var}(\mathbf{c}_k|H_0)$ i la resposta de la mostra desconeguda en condicions d'hipòtesi nul·la ($\mathbf{r}_{\text{un}|H_0}$), el principal problema que es planteja és l'estimació dels diferents termes de variància ($\sigma_e^2, \sigma_c^2, \sigma_R^2, \sigma_{\mathbf{c}_{\text{un}}|H_0}^2$ i $\sigma_{\mathbf{r}_{\text{un}}|H_0}^2$), així com els graus de llibertat per al càlcul del paràmetre de descentrat, $\Delta(\alpha, \beta)$.

Les variàncies dels errors de mesura experimentals (σ_e^2, σ_R^2 i $\sigma_{\mathbf{r}_{\text{un}}|H_0}^2$) s'han d'estimar a partir de replicats. En el cas de σ_c^2 , això suposa determinar la incertesa del mètode de referència a diversos nivells de concentració de l'analit en

estudi. En aquest cas, el nombre de graus de llibertat es pot deduir fàcilment a partir del nombre de nivells i de repeticions. Aquest procediment, però, pot no ser viable en la pràctica, ja que implica un treball experimental important. Una altra possibilitat, en el cas que els errors en les mesures de les respostes siguin negligibles (Eq. 5.13), és estimar aquest terme a partir dels residuals del model de calibració, segons l'equació:

$$\sigma_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^I (\tilde{c}_i - \hat{c}_i)^2}{\nu} \quad (5.21)$$

on c_i són les concentracions mesurades pel mètode de referència i \hat{c}_i són les concentracions predites pel model. En el cas de ILS, quan el nombre de mostres, I , és superior al nombre de variables, J , el nombre de graus de llibertat, ν , ve donat per $(I-J)$ o $(I-J-1)$, el darrer en el cas que les dades hagin estat centrades. En el cas de PCR i PLS, els graus de llibertat venen donats per $(I-A)$, o $(I-A-1)$ en cas de dades centrades, essent A la dimensió del model, *i.e.* el nombre òptim de factors escollits. Cal indicar que, en estimar σ_c^2 a partir de l'eq. (5.21), hom assumeix, de manera implícita, que no existeix biaix en el model de calibració. Recentment, Faber i Kowalski [13] han fet un tractament rigorós sobre el problema del biaix en els diferents mètodes de regressió multivariants. Hom no s'estendrà més en aquest concepte, doncs el lector pot trobar en la citada referència tota la informació al respecte.

Com ja s'ha comentat anteriorment, quan les variàncies dels errors en les respostes no són negligibles i hom utilitza les eqs. (5.10) o (5.12) per avaluar l'error de predicció, llavors els residuals del model de calibració no produeixen una estimació de σ_c^2 , sinó de la variància efectiva (σ_{ef}^2).

Per la seva banda, la variància dels errors en les respostes (σ_R^2 i $\sigma_{r_{\text{cal}}|H_0}^2$) també ha d'estimar-se a partir de repeticions, en aquest cas instrumentals. En molts casos, pot assumir-se que els errors en la mesura de les respostes de calibració i predicció són iguals ($\sigma_R^2 = \sigma_{r_{\text{cal}}}^2 = \sigma_{r_{\text{cal}}|H_0}^2$), tot i que és aconsellable que aquesta assumpció es verifiqui. Els graus de llibertat en l'estimació d'aquests termes es calcula a partir del nombre de sensors, J , i de repeticions dutes a terme.

El terme σ_e^2 , corresponent a la falta d'ajust del model vers les dades de calibració, pot estimar-se a partir del càlcul de la variància efectiva, sempre que es disposi d'estimacions independents de σ_e^2 i σ_R^2 .

Finalment, si hom utilitza les eqs. (5.14) o (5.15) per a estimar la variància de la concentració predita sota la hipòtesi nul·la, el nombre de graus de llibertat totals, per a l'estimació del paràmetre $A(a,p)$ en l'eq. (5.8), es pot calcular aplicant la regla de Satterthwaite, eq. (1.38).

L'estimador desenvolupat es va aplicar al càlcul dels límits de detecció en dades reals, consistents en l'anàlisi del contingut en PIONA (parafines, isoparafines, olefines, naftens i aromàtics) en mostres de nafta, mitjançant l'espectroscòpia NIR. Els resultats obtinguts es presenten al final del capítol, en l'article titulat *Multivariate Detection Limits in Inverse Calibration Models*, i que ha estat enviat per a publicació a la revista *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*.

5.3. Referències

1. A. Lorber; B.R. Kowalski, *J. Chemom.*, 2 (1988) 93.
2. K. Faber; B.R. Kowalski, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 34 (1996) 283.

3. A. Hubaux; G. Vos, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 849.
4. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167.
5. L.A. Currie, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (1995) 1699.
6. T.V. Karstang; J. Toft; O.M. Kvalheim, *J. Chemom.*, 6 (1992) 177.
7. The Unscrambler User's Guide, Versió 4.0, CAMO A/S, Trondheim (1992).
8. S.D. Hodges; P.G. Moore, *Appl. Stat.*, 21 (1972) 185.
9. T. Naes; H. Martens, *J. Chemom.*, 2 (1988) 155.
10. A. Lorber; K. Faber; B.R. Kowalski, VI Chemometrics in Analytical Chemistry Conference. Tarragona (Espanya). 1996.
11. C.-N. Ho; G.D. Christian; E.R. Davidson, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1108.
12. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2395.
13. K. Faber; B.R. Kowalski, *comunicació personal*.

Multivariate Detection Limits with Fixed Probabilities of Error

R BOQUE *, F. X. RIUS

Departament de Química, Universitat Rovira i Virgili.

Pça. Imperial Tàrraco 1, 43005 - Tarragona, Catalunya, SPAIN.

ABSTRACT

In this paper a new approach to calculating multivariate detection limits, MDL, for the commonly used inverse calibration model $c = Rb + e$ is discussed. The derived estimator, which takes into account the probabilities of false positive and false negative decisions, is based on the confidence intervals associated to the predicted concentrations of the multivariate model for the measured instrumental response. As the MDL is affected by the presence of other analytes in the sample to be analyzed, it is different for each sample and so the approach proposed attempts to find whether the concentration derived from a given response is detectable or not at the levels of significance chosen. The incidence of factors which affect the detection limit are also studied and a series of guidelines are given about how to decrease the errors in the calibration and prediction steps and so determine lower concentrations. The new methodology developed has been applied to the calculation of the detection limits of Ca and Mg in natural waters using a SIA (sequential injection analysis) method with multivariate spectrophotometric detection.

INTRODUCTION

As instrumental techniques get more and more sophisticated and capable of generating multivariate data, the study of different figures of merit, among which are detection limits, has become very important, not only to characterize the different associated analytical methods but also to serve as a guide for the design of new instruments. The study of detection limits in multivariate regression only dates back a few years and has been reviewed very recently¹. The approaches described and the derived estimators are very varied; Lorber² was one of the first to calculate a multivariate detection limit starting from the definition of *net analyte signal*. Subsequently, Lorber and Kowalski³ defined this estimator as a function of the confidence intervals associated to the predicted concentration. Bauer *et al.*⁴ obtained an estimator that is a function of the error in the predicted concentration with the theory of error propagation. Kvalheim *et al.*⁵ defined a detection limit for minor components in the presence of other major species and noise level which is often used in chromatographic techniques. Delaney⁶ and later Singh⁷ use principal components analysis (PCA) to reduce the dimensionality of the multivariate response and to apply the classical univariate approaches of limits of detection.

All the aforementioned estimations are protected against false positive decisions but there is no mention of the probability of their taking false negative decisions. In the definition of limit of detection proposed for individual signals (zero-order calibration) in Love Canal Study⁸, Hubaux and Vos⁹ or Clayton *et al.*¹⁰, these two error types are perfectly established. It seems then that a more complete approach to MDL is needed.

In this paper, we propose a new method for calculating these limits for the commonly used multivariate inverse calibration model, $c = Rb + e$, using an approach which is similar to the one used by Hubaux and Vos⁹ in classical

univariate regression. The method has the advantage that the calculation of the confidence intervals is associated to the predicted concentrations of a multivariate model and takes into account the probabilities of false positive and false negative decisions. In multivariate calibration, the detection limit does not only depend on the mathematical model and the calibration sets used but also on the presence of other analytes in the sample to be analyzed, so each sample has a different MDL and, as a result, what has to be found is whether the concentration derived from a given response is detectable or not at the chosen significance levels. A single MDL is not fixed for an analytical method, not even for specific operating conditions, but depends on the response of each unknown sample that is analyzed. This paper studies the incidence of the experimental parameters that affect the final estimator, starting from the derived expressions, and discusses a series of considerations to minimize the prediction errors and so detect lower analyte concentrations in the sample.

Finally and by way of an example, the method described is applied to the calculation of the detection limits of Ca^{2+} and Mg^{2+} in samples of natural waters using Sequential Injection Analysis (SIA) with a UV-Vis diode-array detector.

THEORY

Building and Validating the Multivariate Model. Assuming an inverse calibration model, the vector of the analyte concentrations in the samples is given by $c = Rb + e$, where the concentrations are a linear function of the responses (sensors). If we have I calibration samples and we obtain their responses in J different sensors, the R matrix is obtained. Assuming that the data are mean centered, the model coefficients for an analyte k , \hat{b}_k , are estimated in the

calibration step using $\hat{\mathbf{b}}_k = \hat{\mathbf{R}}^+ \mathbf{c}_k$, where \mathbf{R}^+ is the pseudoinverse matrix of matrix \mathbf{R} ($I \times J$) of the responses of the calibration set of samples and \mathbf{c}_k is vector ($I \times 1$) of analyte concentrations in the samples mentioned. The difference between the different regression methods simply lies in the various ways of inverting matrix \mathbf{R}^{11} .

For multiple linear regression (MLR), matrix \mathbf{R}^+ is equivalent to $(\mathbf{R}^T \mathbf{R})^{-1} \mathbf{R}^T$, the least squares solution. For principal components regression (PCR) and partial least-squares regression (PLS), however, the calculation of the pseudoinverse matrix is a three step procedure: decomposition of matrix \mathbf{R} , determination of the number of optimal factors (pseudo or chemical rank) of the matrix and subsequent calculation of its pseudoinverse. One of the most used algorithms for calculating \mathbf{R}^+ is the *singular value decomposition* (SVD)¹². To select the chemical-rank of the model there are several criteria and validation procedures¹³ which generally form a part of the calculation of the pseudoinverse matrix. The normal procedure is to divide the calibration set into training and test sets, build several models with a different number of factors and find the optimal model by cross-validation¹⁴, from statistics such as RMSECV (root mean square error of cross validation).

Prediction Step. Finally, if we measure the response of an unknown sample as a row vector, \mathbf{r}_{un}^T , the expression which predicts the concentration of the analyte k is given by the scalar, Eq (1):

$$\hat{c}_{\text{un},k} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \hat{\mathbf{R}}^+ \mathbf{c}_k = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \hat{\mathbf{b}}_k \quad (1)$$

The uncertainty associated to this predicted concentration must be expressed in terms of the difference between the value predicted by the model and the real value (and not the measured value if we want to ensure the traceability of the results). In

the literature on statistics, the calculation of this uncertainty only include the errors in the concentration values and assumes that there are no errors in the measurement of the instrumental responses or in the model under consideration. According to this and assuming that the errors are normally distributed, with zero mean and σ^2 variance, the expression of $\text{var}(c_{\text{un}})$ for an observed value of \mathbf{r}_{un} is given by Eq. (2)¹⁵:

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) = \frac{c_{\text{r}}^2}{f-1} + \mathbf{r}_{\text{un}}^{\text{T}} \text{var}(\mathbf{b}) \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (2)$$

where $\text{var}(\mathbf{b}) = \sigma^2 (\mathbf{R}^{\text{T}} \mathbf{R})^+$. The first term of the equation takes into account the error in the data centering (for a centered model), while the second is the squared Mahalanobis distance¹⁶ and measures the distance of the unknown sample from the center of the model. The value of σ^2 is unknown and can be substituted by its estimator $\hat{\sigma}^2$, which in turn is calculated from the residuals of the calibration model.

To derive an expression which includes the various error terms for the variance of the predicted concentration, Eq (1) has to be rewritten to include the experimental errors in the response and concentration measurements², thus obtaining:

$$c_{\text{un}} \pm \delta c_{\text{un}} = (\mathbf{r}_{\text{un}} \pm \delta \mathbf{r}_{\text{un}})^{\text{T}} (\mathbf{b} \pm \delta \mathbf{b}) \quad (3)$$

Disregarding the covariances between two terms and the products of two terms containing errors, and changing the differentials into variances, Eq (4) is obtained¹⁵:

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) = \sum_{j=1}^J \hat{b}_j^2 \text{var}(r_{\text{un},j}) + \hat{\sigma}^2 \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 \quad (4)$$

where b_j are the regression coefficients, elements of the vector $\mathbf{b} = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}$, $\text{var}(r_{\text{un},j})$ is the variance of the response of the unknown sample in sensor j , and $h_{i,\text{un}}$ are the elements of $\mathbf{h} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+$. For a model constructed with r principal components, CT is calculated according to Eq (5):

$$\hat{\text{CT}} = \left[\frac{\mathbf{c}^T (\mathbf{I} - \mathbf{R}\mathbf{R}^+) \mathbf{c}}{I - r} \right]^{1/2} \quad (5)$$

$\text{var}(r_{\text{un},j})$, however, can be evaluated experimentally from replicates of the unknown samples, assuming error models or using the response residuals of the unknown sample, calculated as $\delta \mathbf{r}_{\text{un}} = (\mathbf{I} - \mathbf{R}^+ \mathbf{R}) \mathbf{r}_{\text{un}}$.

Subsequently, Lorber and Kowalski³, using simulations carried out on real data, obtained a slightly modified expression which fitted the experimental data results better. So the equation was formulated empirically, and subsequently the mathematical justification to back it up was developed¹⁵. The expression is general for any regression method and takes into account the sources of error for the responses and concentrations of the calibration samples and for the response of the unknown sample. For a model constructed with r principal components, $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$ is given by Eq (6):

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) \cong \sum_{j=1}^J \hat{b}_j^2 \text{var}(r_{\text{un},j}) + \kappa \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 \text{var}(c_i) \quad (6)$$

where $\text{var}(c_i)$ is the variance of the concentrations of the calibration samples. K is a scalar which takes into account the error of the responses in the calibration step. Its value can be estimated from the relation between $\hat{\sigma}^2$, the overall estimation of the variance of the concentration errors in the calibration set and the sum of the variances of the individual concentrations¹⁷. Subsequently, Lorber¹⁵ derived a theory for the calculation of the term K , based on a new estimation of the variance of the regression coefficients. K becomes a scalar which includes the errors in the calibration sample responses and concentrations, as well as the error due to the model misfit:

$$\kappa = \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_r^2 + \frac{I}{r} \hat{\sigma}_{\text{fit}}^2 \quad (7)$$

Therefore, the final derived expression is:

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) \cong \sum_{j=1}^J b_j \text{var}(r_{\text{un},j}) + \kappa \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 \quad (8)$$

which, apart from the term $\hat{\sigma}^2$ which has been substituted by K , is equivalent to Eq (4). This equation can be simplified depending on which of the terms in Eq (7) is the predominant one, which means that the governing error sources in our model must be known. So, if the predominant error source is the error in the estimation of the calibration sample concentrations, the final expressions becomes exactly like Eq (4), in which $\hat{\sigma}_c^2$ is known or can be estimated from the residuals of the calibration model.

Confidence intervals associated to the predicted concentration, $c_{un} \pm y$, can be derived from any expression for $\hat{v}ar(c_{un})$, independently of the error sources. From Eq (8) we can express y as:

$$y = \left(t_{J-r, 1-\alpha/2}^2 \sum_{j=1}^J b_j^2 \delta r_{un,j}^2 + t_{I-r, 1-\alpha/2}^2 K \sum_{i=1}^I h_{i,un}^2 \right)^{1/2} \quad (9)$$

where each of the terms of the confidence interval y has an associated t statistic, with its own degrees of freedom at the chosen significance level.

Figure 1 is a chart of the confidence intervals which are deduced according to expression (9) for an MLR model constructed from a data set of 25 objects and 2 variables¹⁸. For the sake of simplicity, it was assumed that $K = \sigma^2$, which was estimated from the residuals of the model. It can be seen that the intervals are hyperbolic and that they increase as the responses move away from the center of the model.

Throughout this process, it can be seen that the chosen model directly relates the original responses to the concentrations, through the b_j coefficients. We could also relate the principal components to the predicted concentration and use a $\hat{v}ar(c_{un})$ expression depending on these principal components. To this effect, Naes and Martens¹⁴ derived an expression similar to Eq (2) but which does not take into account the error sources that affect the model.

Equations (4) and (8) are important because, as well as serving as a base for deriving the detection limit, they give information about the various error sources that are involved in the model and so directly influence the parameters that affect it, both in the calibration and prediction steps.

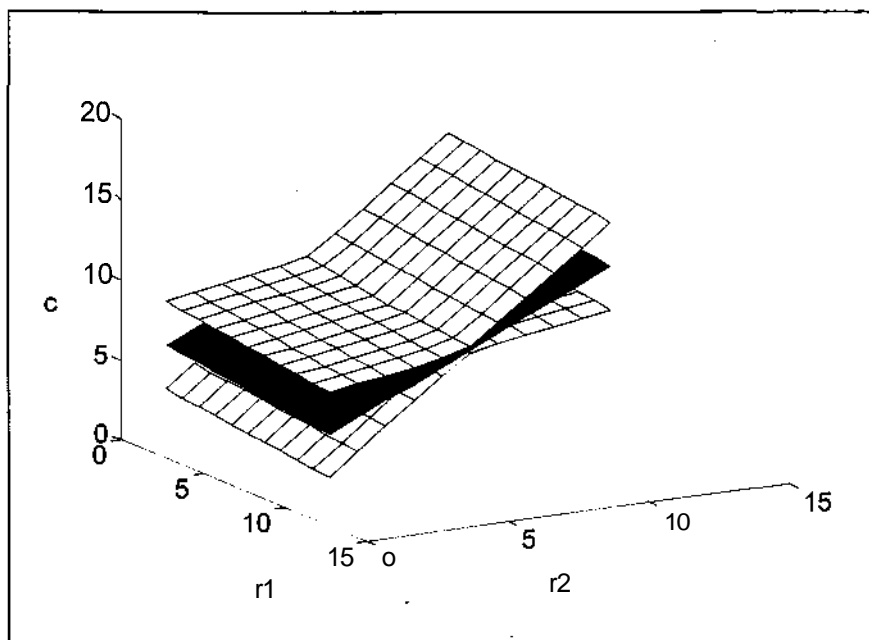


Figure 1. Confidence intervals associated to the concentration of the unknown sample for an MLR model with 25 objects and 2 variables.

Strategy for Calculating Multivariate Detection Limits, MDL. The predicted concentration and its confidence intervals can be calculated in the prediction step from the response of the unknown sample. The criterion for establishing if an analyte is detectable consists of seeing whether the value $c_{\text{un}} - y$ (where y is constructed for a significance level of $1-\alpha$) includes the concentration value zero. If it does not, it can be concluded that the analyte is over the detection limit of the method, with an a probability of committing a type I error. So, this approach does not set a value for MDL for the established procedure. Instead, this value varies according to the response of the unknown sample. From a practical point of view, it can be approached from the other way round: given a measured response for a problem sample, the methodology proposed is capable of calculating, with an a

probability of committing a type I error, whether the derived concentration of this response statistically differs from the value zero or not.

This latter approach, however, does not take into account the probability of a type II error, that's to say, the error that would be committed when stating that there is no analyte present when in fact there is. To assess this probability of false negative we have developed a new approach in the multivariate field that does take into account this type of error. This approach uses criteria discussed by Hubaux and Vos⁹ and subsequently developed by Garner and Robertson¹⁹ in the field of classical univariate regression, where the limit of detection corresponds to the concentration (calculated with a P probability of error) derived from the instrumental response to concentration zero (calculated with an a probability of error).

In multivariate calibration the process consists of the following steps:

1. Modelling and validation of the multivariate regression model.
2. Measuring the multivariate response for the unknown sample, \mathbf{r}_{un} .
3. Adopting the expression which gives the variance of the concentration estimated from a given instrumental response (e.g. Eq (8)).
4. Calculating the detection response, \mathbf{r}_D , i.e, the instrumental response for a sample with an analyte concentration of zero, with an a probability of committing a type I error (Fig. 2).
5. Calculating the concentration, c_D , for the detection response, \mathbf{r}_D , with a β probability of committing a type II error.
6. Calculating c_{un} , from \mathbf{r}_{un} and the model developed in 1.

7. Comparing c_{un} i c_D and deducing whether the measured response, r_{un} , is for a sample with an analyte concentration which is higher than the detection limit with α and P fixed probabilities of error.

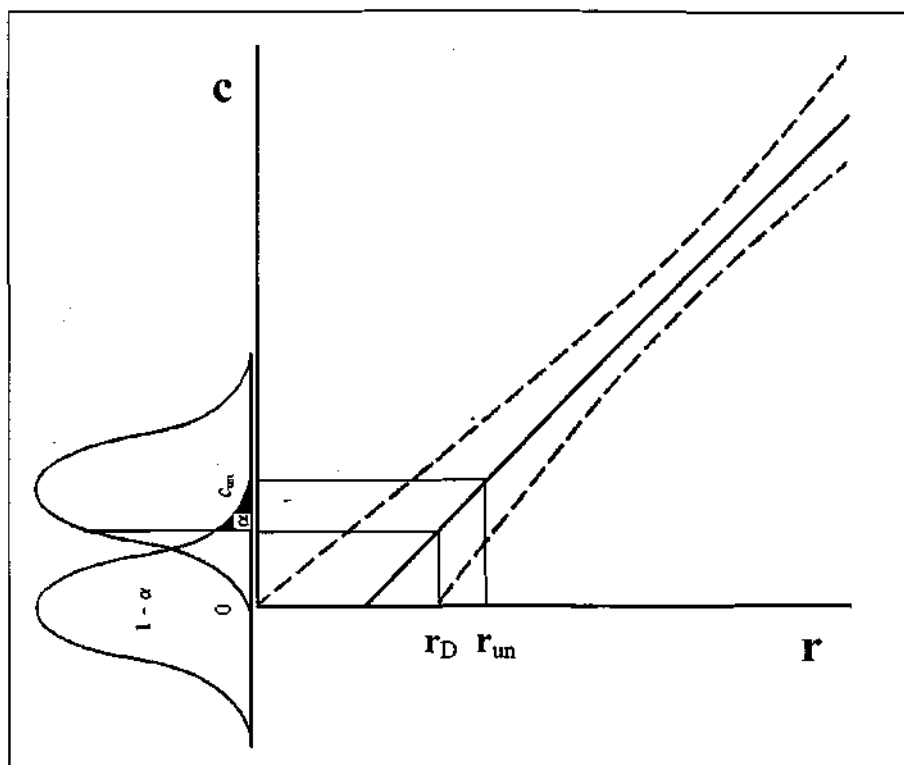


Figure 2. Projection of a **multivariate** calibration model on the plane formed by the axis of concentrations and a single instrumental response. The probability of committing a type I error is shown in black, i.e. the probability that a response corresponding to an unknown sample, r_{un} , can be given a concentration higher than zero, when the analyte is not even present.

After the first three steps with the regression models and the expressions for the variances of the concentration chosen by the user, it should be pointed out that, for an instrumental response of the unknown sample, r_{un} , which is the same as or higher than r_D , there is an a probability of committing a type I error, i.e. erroneously conclude that the analyte is present in the sample. This detection

response, \mathbf{r}_D , corresponds to the intersection of the lower confidence interval of the multivariate model with the plane of responses for an analyte concentration zero. Mathematically, this can be obtained from Eq (10):

$$\hat{c}_{\text{un}} - \gamma = 0 \quad (10)$$

Likewise, using the expression of the confidence intervals, Eq (11) is obtained:

$$\sum_{j=1}^J r_{\text{un},j} b_j = \left(t_{J-r,1-\alpha}^2 \sum_{j=1}^J b_j^2 \delta r_{\text{un},j}^2 + t_{J-r,1-\alpha}^2 \kappa \sum_{i=1}^I h_{i,\text{un}}^2 \right)^{1/2} \quad (11)$$

where the t statistics are for a significance level $1-\alpha$.

In multivariate regression there are multiple detection responses, \mathbf{r}_D , which are the result of the intersection of the lower confidence interval of the calibration model with the hyperplane in dimension J of the instrumental responses, that is to say, different samples, all of which have the same concentration of problem analyte but with a different matrix, and so, with different spectra. To unequivocally define the \mathbf{r}_D , the approach adopted in this paper consists of defining a straight line joining \mathbf{r}_{un} and the origin of the co-ordinates. The intersection of this straight line with the lower confidence interval gives the \mathbf{r}_D that can be seen in Figure 3. Chemically, this means that this \mathbf{r}_D is of an instrumental response which would correspond to a sample with a matrix composition proportional to that of the unknown sample, but without the presence of the analyte under study (with an a probability of error).

Furthermore, for the same instrumental response, \mathbf{r}_{un} , there is a p probability of committing a type n error, i.e. erroneously concluding that the analyte is not present in the sample. In order to well-define both probabilities of error, the

detection response, r_D , is projected onto the top edge of the hyperbola which defines the confidence interval of the multivariate model and which is constructed in this case with a significance level of $1-P$, so obtaining the concentration, c_D , which corresponds to a single detection limit for each unknown sample (Figure 4).

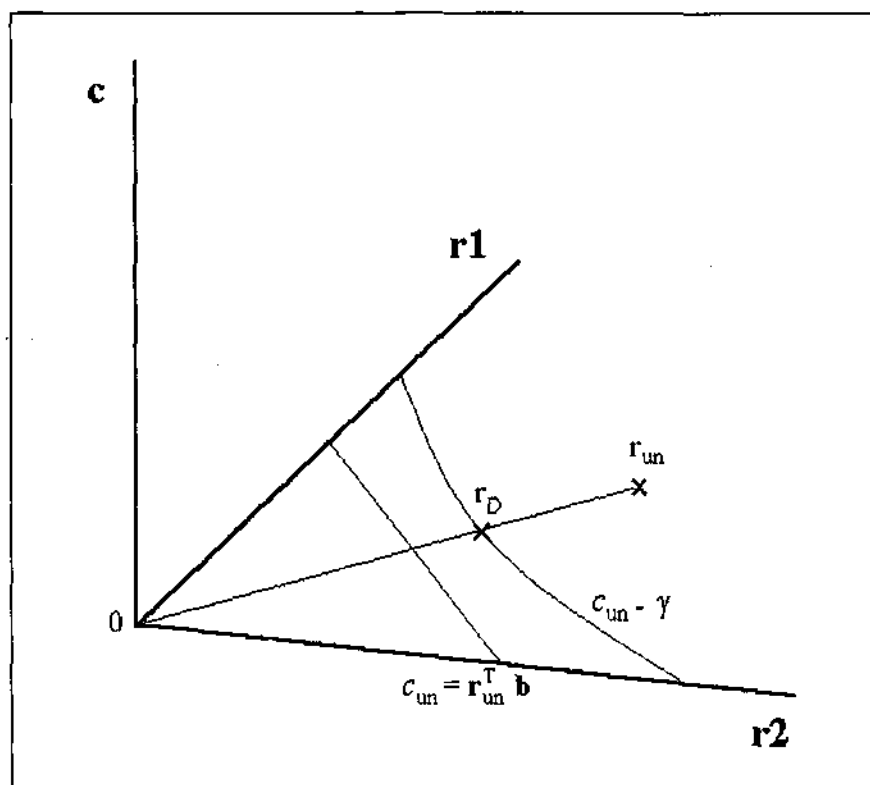


Figure 3. Plot of the geometrical estimation of the detection response, r_D .

The concentration value found is compared with the one found from the model for the response of the unknown sample. So the criteria for detection is:

If $c_{un} < c_D \Rightarrow$ *Non detectable analyte*

If $c_{un} > c_D \Rightarrow$ *Detectable analyte*

So it may happen that for one instrumental response, r_{un} , the analyte concentration found, c_{un} , is detectable or not depending on the α and β probabilities of error chosen, as can be seen in Figure 4.

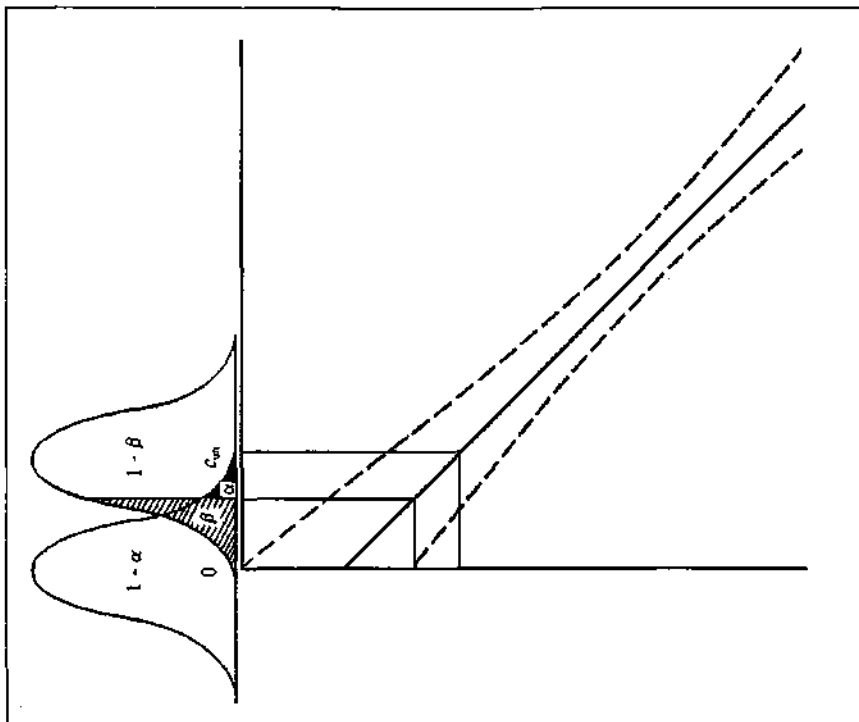


Figure 4. Comparison of the concentration, c_{un} , derived from a response, r_{un} , with the detection limit, c_D , derived from the detection response, r_D . In this case, as $c_{un} < c_D$, the analyte would not be detectable, with an α probability of committing a type I error and a β probability of committing a type II error. It can be seen that in terms of the magnitude of the confidence intervals (constructed with significance levels of $1-\alpha$ and $1-\beta$ respectively), the analyte may actually be detectable.

Mathematical Derivation of the Detection Limit Estimator. Assuming that the n -dimensional space is formed of n orthogonal axes X_1, X_2, \dots, X_n and that the values x_1, x_2, \dots, x_n are the coordinates for a point on each of the axes X_1, X_2, \dots, X_n respectively, a straight line that passes through two points, $\mathbf{P}_1(x_{11}, x_{21}, \dots, x_{n1})$ and $\mathbf{P}_2(x_{12}, x_{22}, \dots, x_{n2})$ in the n -dimensional space, is expressed according to Eq (12):

$$\frac{x_1 - x_{11}}{x_{11} - x_{12}} = \frac{x_2 - x_{21}}{x_{21} - x_{22}} = \dots = \frac{x_n - x_{n1}}{x_{n1} - x_{n2}} \quad (12)$$

Continuing this development, the equation must be deduced for the straight line which passes through the instrumental response of the unknown sample, $\mathbf{r}_{\text{un}}(r_{\text{un},1}, r_{\text{un},2}, \dots, r_{\text{un},J})$, and the origin of co-ordinates of the model, in the space which is now J-dimensional and formed format by the variables (or sensors).

For a centered model, defining $\mathbf{r}_m(r_{m,1}, r_{m,2}, \dots, r_{m,J})$ as the vector of means of the responses for each sensor, the origin of co-ordinates is given by the point $\mathbf{P}_1(-r_{m,1}, -r_{m,2}, \dots, -r_{m,J})$ and the response of the unknown sample by point $\mathbf{P}_1(r_{\text{un},1} - r_{m,1}, r_{\text{un},2} - r_{m,2}, \dots, r_{\text{un},J} - r_{m,J})$. The equation of the straight line which passes through these two points is given by Eq (13):

$$\frac{r_1 - (-r_{m,1})}{-r_{m,1} - r_{\text{un},1} - r_{m,1}} = \frac{r_2 - (-r_{m,2})}{r_{m,2} - r_{\text{un},2} - r_{m,2}} = \dots = \frac{r_J - (-r_{m,J})}{-T_{m,J} - r_{\text{un},J} - T_{m,J}} \quad (13)$$

where r_1, r_2, \dots, r_J are the co-ordinates of the response in the J-dimensional space. Reordering and simplifying we finally obtain Eq (14):

$$\frac{r_1 + r_{m,1}}{r_{\text{un},1}} = \frac{r_2 + r_{m,2}}{r_{\text{un},2}} = \dots = \frac{r_J + r_{m,J}}{r_{\text{un},J}} \quad (14)$$

The intersection of this straight line with the lower confidence interval at zero concentration, defined by the equation $c_{\text{un}} - y = 0$, is given by the point which belongs to the previous straight line and which complies with Eq (15):

$$\sum_{j=1}^J r_j b_j = \left(t_{J-r,1-\alpha}^2 \sum_{j=1}^J b_j^2 \delta r_j^2 + t_{J-r,1-\alpha}^2 \kappa \sum_{i=1}^I h_i^2 \right)^{1/2} \quad (15)$$

Expressing all the r_j co-ordinates as a function of r_1 using Eq (14) and introducing these values into (15), we get a second degree equation in r_1 . Once solved, substituting the numerical value of r_1 into Eq (14) gives $r_D(r_{D,1}, r_{D,2}, \dots, r_{D,J})$, the detection response at the $1-\alpha$ significance level chosen. Substituting this response in the higher confidence interval (constructed with a significance level of $1-\beta$), enables the detection limit which we are looking for, c_D , to be found:

$$c_D = \sum_{j=1}^J r_{D,j} b_j + \left(t_{J-r,1-\beta}^2 \sum_{j=1}^J b_j^2 \delta r_{D,j}^2 + t_{J-r,1-\beta}^2 \kappa \sum_{i=1}^I h_{i,D}^2 \right)^{1/2} \quad (16)$$

Comparing this value with the concentration value predicted by the model will enable us to decide if the analyte in the sample is detectable or not, with pre-set α and β probabilities of error.

EXPERIMENTAL SECTION

Samples and Software. To validate the proposed approach for the calculation of the detection limits, and also to study the various parameters which affect the derived estimator, a data set was used consisting of the UV spectra of real samples. Ruisánchez *et al.*²⁰ determined Ca and Mg by using the absorbance data of their complexes with Arsenazo III in 29 samples of natural waters. The spectra consist of 101 wavelengths, recorded in the interval 450-650 nm. The true concentration of Ca and Mg in the samples was determined by atomic absorption spectroscopy

(AAS) and ranges between 0.9 and 40.6 ppm for Ca and 0.4 and 9.0 ppm for Mg. The accuracy of the method was validated with certified reference material (SLRS-2, National Research Council, Canada).

To calculate an estimation of the experimental variance of the responses, 7 replicates were carried out on the same sample, for which the mean response and variance for each sensor was calculated.

The concentrations of the calibration samples were determined using a reference method, the accuracy of which was validated with certified reference material (CRM). The variance associated to these concentrations is given by the uncertainty in the calculation of the value of the reference material over several days, that is to say, in conditions of reproducibility. For Ca, 24 determinations were carried out in several days, getting a $\text{var}(c) = 0.494$. For Mg, 21 determinations were made, and a $\text{var}(c)$ value of 0.105 was obtained.

Two regression models were constructed, one for Ca and the other for Mg. The regression method used was PCR, from the SVD algorithm incorporated into the MATLAB software for Windows, ver 4.0. (The Mathworks Inc., Massachusetts, USA.).

Computer Simulations. To study the influence of the errors in the responses and concentrations of the calibration samples, as well as the error in the response of the unknown sample, a series of simulations were carried out, introducing errors normally distributed in the calibration sample concentration vectors and the unknown samples' response vectors, as well as in the calibration step response matrix. The errors were added gradually, until the third decimal place in the responses was affected (a 1% of error) and up to 5% of error in the concentration values. The corresponding values for $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$ and the detection limit, c_D , were

obtained, being the result of the mean values of all the simulations carried out. All the simulations subroutines were computed with the software MATLAB.

RESULTS

Variance of the Unknown Sample's Response. Figure 5 shows the $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$, Eq (4), and the multivariate detection limit, Eq (16), for Ca, as a function of the variances of the unknown sample's responses and expressed as a percentage of error with respect to the value of the responses. Figure 5 also shows the main terms of the equation for $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$ so that its evolution can be appreciated. Each point on the graph is the average of 100 simulations. The unknown sample used was from the calibration set with a low content of Ca ($[\text{Ca}]=5.6$ ppm), for which the experimental variance, expressed as the summation of the variances for each sensor, is 0.0032. The regression model used was a 4-factor PCR and the α and P significance level, for the calculation of the confidence intervals, was 0.05 in both cases.

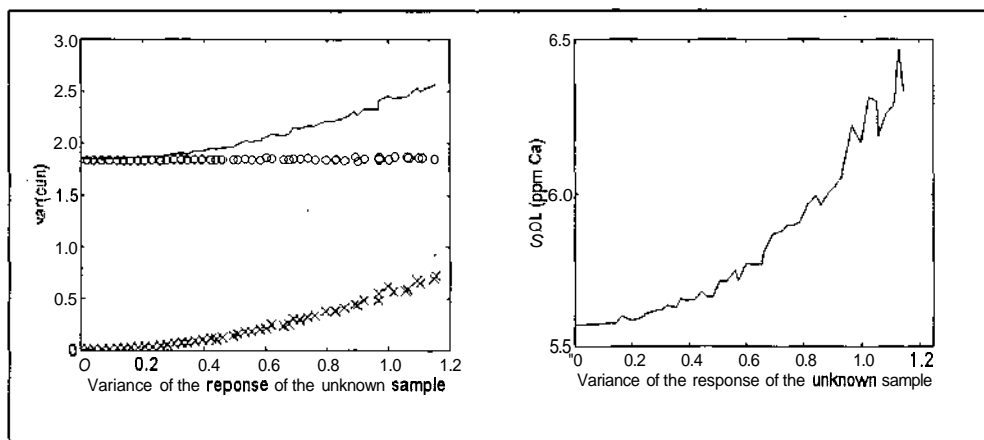


Figure 5. Variance of the predicted concentration (a) and multivariate detection limit (b) versus the variance of the response of the unknown sample (expressed as the percentage of error introduced into the data). In Fig 5a (x) corresponds to the first term of Eq (4) and (o) to the second term of Eq (4).

It can be seen quite clearly that $\text{var}(c_{\text{un}})$ rises substantially with the increase in noise of the unknown sample's response, mainly due to the rise in the first term in Eq (4). The multivariate detection limit (Fig 5b) also shows a clear tendency to rise as the variance of the unknown sample increases. The slight oscillations that can be seen are due to the randomness of the simulated data.

Variance of the Calibration Sample Concentrations. Figure 6a shows the $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$ and Fig 6b the detection limit, MDL, as a function of the variance of the calibration sample concentrations (expressed as a percentage of error with respect to the concentration values). The unknown sample used was again a sample from the calibration set with a low content of Ca ($[\text{Ca}]=5.6$ ppm). The regression model used was a 4-factor PCR and the α and P significance level, for the calculation of the confidence intervals, was 0.05 in both cases. The error in the concentrations of the calibration standards was not estimated from the residuals of the model but from the simulated data itself.

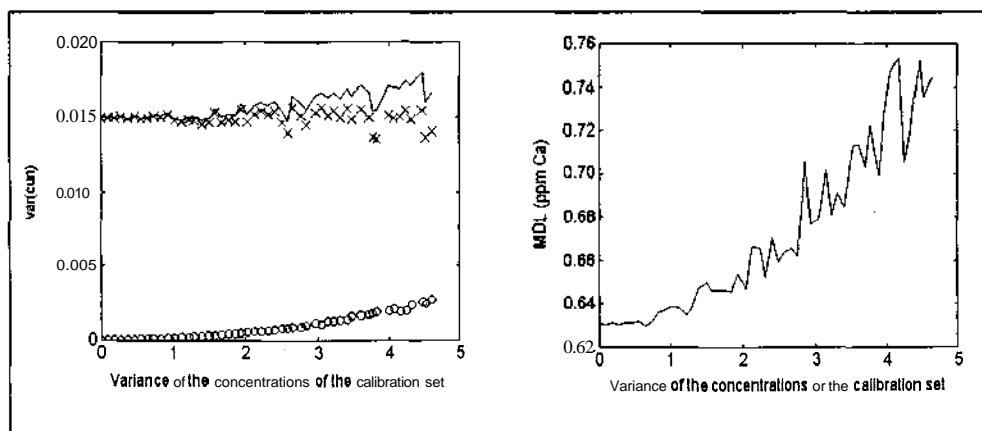


Figure 6. Variance of the predicted concentration (a) and multivariate detection limit (b) versus the variance of the concentrations of the calibration set (expressed as the percentage of error introduced in vector c). In Fig 6a (x) corresponds to the first term of Eq (4) and (o) to the second term of Eq (4).

Just as was observed in the previous case, there is a logical rise in the variance of the unknown sample's concentrations when the variance of the calibration standard concentrations increases. As far as the MDL are concerned, they clearly tend to have high values when the uncertainty of the concentrations of the calibration set increases. The oscillations that can be seen in Figure 6b have to be attributed to the random nature of the errors introduced into the simulation phase.

The abnormally low value of the MDL in the graph are due to the fact that in the calculation of Eq (4) only the error in the calibration sample's concentrations was taken into account, using the simulated data, and not the error due to the lack of fit of the model, which is really the most important.

Variance of the Calibration Matrix Responses. Figure 7a shows the $\hat{\text{var}}(c_{\text{un}})$ and Figure 7b the MDL as a function of the variance in the responses of the calibration set. The magnitude of the errors introduced into R is the same as the magnitude of the errors in the unknown sample's response, r_{un} . The value of the error in the concentrations of the calibration set's samples was estimated from the residuals of the model, as was the error in the unknown sample's response. The regression model used was also a 4-factor PCR and the α and P levels of significance were 0.05.

It can clearly be seen that both the $\text{var}(c_{\text{un}})$ and the MDL increase, the latter much more than the former, when errors in the calibration sample responses are introduced.

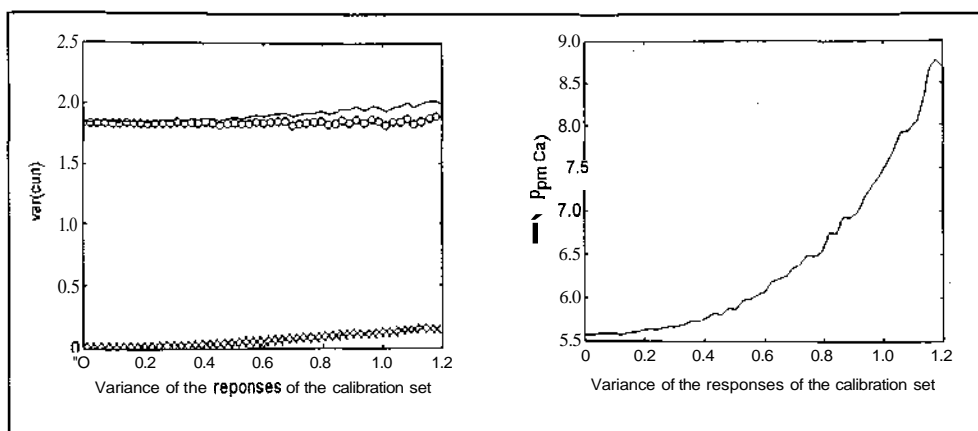


Figure 7. Variance of the predicted concentration (a) and **multivariate** detection limit (b) versus the variance of the responses of the calibration set (expressed as the percentage of error introduced in the matrix R). In Fig 7a (x) corresponds to the first term of Eq (4) and (o) to the second term of Eq (4).

DISCUSSION

Influence of the Different Parameters on the Detection Limits. A study of Eq (16) enables the experimental aspects which affect establishing the detection limit to be discovered. It goes without saying that all the factors which affect the prediction error^{3,17,21} have a direct bearing on the MDL. So, MDL is a function of the error in the concentrations and in the responses of the calibration samples, and of the model's lack of fit through the term K, of the number and type of samples used in the construction of the model (experimental design) through h and the number and type of variables used through the components of vector b.

What's more, MDL depends on the detection response, r_D , which in turn depends on the response of the unknown sample, r_{un} , on the linear relation established between r_{un} and r_D , on the lower confidence interval of the model constructed with an a significance level, according to Eq (8) and, finally, MDL also depends on the higher confidence interval of the model constructed with a (3 significance level).

Below, there is a brief review of the effect of all these factors on the calculation of the confidence intervals and finally on the estimator of c_D .

Variance of the Unknown Sample's Response. This factor is directly involved in calculating the detection response through Eq (15). To experimentally assess the error in the responses of the unknown samples, a series of instrumental measures should be replicated on the sample and the different standard deviations for each of the J variables calculated. Alternatively, a model error in the responses can be assumed, based on previous information of the instrumental technique. The residuals, $\delta \mathbf{r}_{un} = (\mathbf{I} - \mathbf{R}^+ \mathbf{R}) \mathbf{r}_{un}$, can also be used as estimators of the response variance for each sample. The advantage of so doing is that error sources which have not been previously modelled can be found and, as a result, the presence of outlier samples can be diagnosed³. Once the detection response, \mathbf{r}_D , has been found, its variance explicitly intervenes in the calculation of CD (Eq 16). This variance can also be estimated from the residuals of \mathbf{r}_D , $\delta \mathbf{r}_D = (\mathbf{I} - \mathbf{R}^+ \mathbf{R}) \mathbf{r}_D$. This value basically depends on the methodology used for its calculation and on the response of the unknown sample.

Variance of the Calibration Sample's Concentrations. This variance represents the error associated to the concentrations of the calibration samples, normally obtained by chemical analysis. To ensure the absence of systematic errors between the measured and true values, traceability has to be evaluated using reference materials or other reference systems. The uncertainty associated to the concentration of the calibration samples can be calculated from repeated analysis, normally in terms of reproducibility, of the reference material (ENAC, Entidad Nacional de Acreditación, 1990) and $\hat{v}ar(c_i)$ is obtained using Eq (17) in the cases in which no other terms are required:

$$\hat{\text{var}}(c_i) = \frac{\sum_{n=1}^N (\bar{c}_{\text{RM}} - \hat{c}_{\text{RM},n})^2}{N-1} \quad (17)$$

being $c_{\text{RM},n}$ the estimated value of the reference material in each of the repeated analysis and c_{RM} the mean value of the reference material found for the N analysis. However, if we assume that $\hat{\text{var}}(c_i)$ is constant throughout the whole concentration interval, it is equal to $\hat{\text{var}}(c)$. On the other hand, if, as we have mentioned above, the error in the concentrations of the calibration samples is the most important contribution to the overall error (as it usually is in spectroscopic techniques), term K becomes $\hat{\text{var}}(c)$ (or $\hat{\sigma}_c^2$ which amounts to same thing) in Eq (8) for the variance of the predicted concentration.

Variance of the Calibration Samples' Responses. It appears in the second term of the K scalar and it is the most difficult factor to estimate. This variance is related to the variance of the response of the unknown sample and so we may assume that their values are comparable. Experimentally, then, the variance of the calibration samples' responses could be calculated from replicates made on the same sample.

Model Misfit. It appears in third place in Eq (7) and is mainly due to non-linearity of the data. If it is the most important error term, it can be estimated from the residuals of the calibration model (Eq (5)). It is a term that is considerably affected by a series of parameters related to the experimental design, such as the number of samples, l , used in the calibration step, the interval of concentrations, the distribution of the samples in this interval, the presence of outliers in the model and, according to Eq (8), it is dependent on the number of principal components, r , used to build the model. It is clear, then, that the process of model validation is a key step if low detection limits are to be obtained.

Number and Type of Variables. As well as the factors mentioned, the MDL can also be minimised by reducing the value of the b_j coefficients which is the same as minimising the vector length $\|\mathbf{b} \hat{\mathbf{I}} = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}\|$. As was reported by Lorber and Kowalski¹⁷, \mathbf{b} is different for each analyte and is affected only by the information in the variable space. This means that its value can be optimised by reducing the number of variables, J , as long as they do not supply important information to the model. If, then, we have a good method of variable selection, which reduces or eliminates collinearity and which detects the variables which provide only noise, we shall be able to obtain lower values for MDL²².

Variable selection is closely connected to the concepts of *selectivity* and *net analyte signal*² which measure the degree of overlapping of the response of the k th constituent compared with the responses of the other constituents of the sample. It is important, therefore, to choose selective variables for the analytes being studied. The higher the net signal of the analyte (selectivity close to 1) is, the better since its regression coefficient vector will be correspondingly lower and, as a result, we shall obtain a lower prediction error in the concentration. Ideally, we would have spectral regions of the specific unknown samples of the pure analytes, with no interference or matrix effects. Completely selective methods are not very common (one example would be atomic absorption for some elements) and in the presence of interferences there is a reduction in the net analyte signal, the selectivity and finally the detection limits. So, choosing selective zones of the spectrum prevails as a criterion for minimising the error in the prediction.

Number and Type of Calibration Samples. Lorber and Kowalski¹⁷ showed that having more calibration samples in a model reduces the prediction error. Normally, however, the number of samples is conditioned by economic factors and there are cases in which choosing the best set of calibration samples may be important²³. Different sets, all of which have the same number of calibration samples may

behave differently with respect to the prediction error and the MDL. The effect of the distribution in the experimental domain of the samples used to establish the regression model can be seen if we focus on the summation of the third term of Eq (16). What has to be found is the optimum set of calibration samples which give a minimum value for $\|\mathbf{h}_{\text{un}}\|^2$. This vector is given by $\mathbf{h}_{\text{un}}^T = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+$ and depends, therefore, on the response of the unknown sample and on the experimental design of the matrix \mathbf{R} .

The value of the summation of the $h_{i,\text{un}}^2$ terms is the squared Mahalanobis distance and measures the distance of the unknown sample from the center of the calibration set. So, samples which are further from the center give larger prediction errors and MDL. On the other hand, the value of \mathbf{h}_{un}^T is a good indicator of whether the unknown sample contains any constituents which have not been previously modelled since if it does, its value considerably increases.

Furthermore, a good design and selection of calibration samples have recently been shown to favour lower MDL²². The selection of calibration samples which have a high \mathbf{h}^T value, that is to say, which are a long way from the center of the model, will undoubtedly produce a greater effect on the prediction error than if the same sample is at the center of the calibration set.

Number and Type of Principal Components Used. Like the samples and the variables selected for calibration, the number and type of principal components selected have a considerable influence both on the calculation of the model coefficients, through matrix \mathbf{R}^+ , and on the error due to model misfit, which appears in the third term of Eq (7). Boqué *et al.*²² have shown the influence of the principal components used on the final estimation of MDL.

Probabilities of Type I and II Errors. We have seen above that the a probability of error affects the value of the detection response, r_D , while the p probability of error also intervenes in the calculation of the estimator of the detection limit, c_D . So, an analyte may or may not be detectable depending on the magnitude of these errors. On the other hand, if we were to be interested in setting values for a and p , we would have to be able to modify the aforementioned experimental parameters to minimise CD. The dependence of CD on the statistical probabilities of error can be plotted. Liteanu and Rica²⁴ defined what is known as characteristic curves of detection, in univariate calibration. These curves relate the a and p probabilities of error to the minimum concentration of analyte to be determined, but they also enable their dependence on the calibration parameters to be seen, which is most useful when modifying aspects of the experimental design in the calibration step (number of samples, interval of concentrations, distribution of the samples in this interval) to reach pre-set detection characteristics.

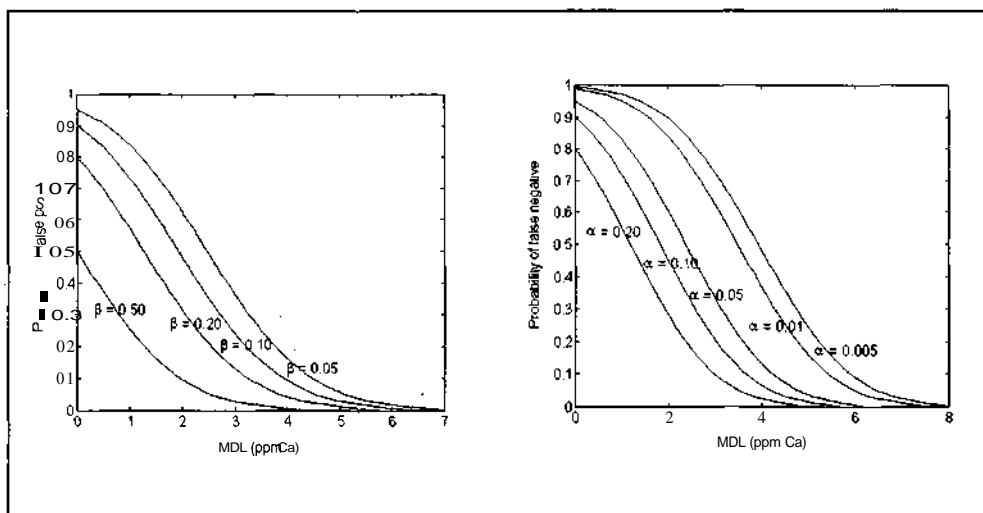


Figure 8. Characteristic curves of detection. (a) MDL versus a probability of error for different values of p . (b) MDL versus P probability of error for different values of a .

In the same way, we can define the *multivariate characteristic curves of detection*, which will relate the probabilities of type I and II errors to the concentrations of analyte in terms of any experimental parameter. Figures 8a and 8b show the MDL versus type II error for several a probabilities of error and the MDL versus type I error for several P probabilities of error. (The predicted sample in both cases has a $[Ca] = 5.6$ ppm).

CONCLUSIONS

We have discussed a new approach to calculating limits of detection which, as well as considering all the experimental factors that are involved, also takes into account the probabilities of committing type I and type n errors. Several components are involved in the deduction of MDL which can be well differentiated in the process of calculation (such as the individual variances associated to the estimated concentrations of analyte in the unknown sample, the type of pretreatment that is carried out on the data or the calculation of the detection response, r_D). This modular strategy will, in the future, enable the overall estimation of the calculated MDL to be improved, in terms of an improvement in the calculations of the individual components, without having to change the overall concept of the proposed approach.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICyT project BP93-0366) is gratefully acknowledged.

LITERATURE CITED

1. Boque, R.; Rius, F.X. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1996**, 32, 11-23.
2. Lorber, A. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1167-1172.
3. Lorber, A.; Kowalski, B.R. *J. Chemom.* **1988**, 2, 93-109.
4. Bauer, G.; Wegscheider, W.; Ortner, H.M. *Fres. J. Anal. Chem.* **1991**, 340, 135-139.
5. Kvalheim, O.M.; Liang, Y.-z. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 936-946.
6. Delaney, M.F. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1988**, 3, 45-51.
7. Singh, A. *Anal. Chim. Acta.* **1993**, 277, 205-214.
8. CH2M-Hill, *Love Canal emergency declaration area habitability study, final report*, CH2M-Hill, Reston, VA, 1988.
9. Hubaux, A.; Vos, G. *Anal. Chem.* **1970**, 42, 849-855.
10. Clayton, C.A.; Híñes, J.W.; Elkins, P.D. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2506-2514.
11. Sánchez, E.; Kowalski, B.R. *J. Chemom.* **1988**, 2, 247-263.
12. Press, W.H.; Flannery, B.P.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, New York, 1989, pp 52-64.
13. Kowalski, B.R.; Seasholtz, M.B. *J. Chemom.* **1991**, 5, 129-145.
14. Naes, T.; Martens, H. *J. Chemom.* **1988**, 2, 155-167.
15. Lorber, A. personal communication.
16. Weisberg, S. *Applied Linear Regression*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1985, pp 112.
17. Lorber, A.; Kowalski, B.R. *J. Chemom.* **1988**, 2, 67-79.
18. Draper, N.; Smith, H. *Applied Regression Analysis*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1966, pp 9.
19. Garner, F.C.; Robertson, G.L. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1988**, 3, 53-59.
20. Ruisánchez, I.; Rius, A.; Larrechi, M.S.; Callao, M.P.; Rius, F.X. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1994**, 24, 55-63.
21. Booksh, K.S.; Kowalski, B.R. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 782A-791A.
22. Boqué, R.; Ferré, J.; Rius, F.X. in preparation.
23. Ferré, J.; Rius, F.X. submitted for publication.
24. Liteanu, C.; Rica, I. *Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis*, Ellis Horwood, Chichester, 1980, pp 208-214.

Multivariate Detection Limits in Inverse Calibration Models

R. BOQUÉ^{*}; F. X. RIUS

Departament de Química, Universitat Rovira i Virgili.

Pça. Imperial Tàrraco 1, 43005-Tarragona, Catalonia, SPAIN.

ABSTRACT

A new approach to calculating multivariate detection limits for the commonly used inverse calibration model, $c = Rb + e$, is discussed. The derived estimator, which follows the latest IUPAC recommendations, takes into account the probabilities of false positive and false negative decisions and is based on the variance associated to the predicted concentrations of the multivariate model for the measured instrumental response. The new methodology has been used to calculate the detection limits of the aromatic content in real pseudo-gasoline samples, analysed by near-infrared spectroscopy.

INTRODUCTION

As instrumental techniques get more and more sophisticated and capable of generating multivariate data, the study of different figures of merit, among which are detection limits, has become very important, not only to characterise the different associated analytical methods but also to serve as a guide for the design of new instruments. The study of detection limits in multivariate regression only dates back a few years and has been reviewed very recently [1]. The approaches described and the derived estimators are very varied. However, only a few of these estimators have been derived for the commonly used inverse calibration models. Lorber [2] was one of the first to calculate a multivariate detection limit (MDL) for this type of model, starting from the definition of *net analyte signal*. Subsequently, Lorber and Kowalski [3] defined this estimator as a function of the confidence intervals associated to the predicted concentration.

The aforementioned estimators are protected against false positive decisions but there is no mention of the probability of their taking false negative decisions. In the latest definition of limit of detection for univariate calibration proposed by the *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, it is stated that this figure of merit must be derived in the presence of known (or assumed) distributions and based on the theory of hypothesis testing, taking into account the probabilities of false positives (α) and false negatives (β) [4]. It seems, then, that a more complete approach to MDLs is needed.

This paper proposes a new approach for calculating MDL in analytical methods that use inverse calibration models. The derived estimator is based on the variance of the predicted concentrations, which is calculated taking into account the different sources of error, in both the calibration and prediction steps. Moreover, this approach has the advantage that the probabilities of both false positive and

false negatives can be quantified, and this gives the user the chance of deciding the degree of confidence in the analysis. In multivariate calibration, the detection limit does not only depend on the mathematical model and the calibration sets used, but also on the presence of other analytes in the sample to be analysed. Consequently, each sample has a different MDL and, as a result, what has to be found is whether the concentration derived from a given response is detectable or not at the chosen significance levels. A single MDL is not fixed for an analytical method, not even for specific operating conditions, but depends on the response of each unknown sample that is analysed.

The methodology described has been used to calculate the detection limits of the aromatic content in real pseudo-gasoline samples. The results were compared with the ones obtained by replicating samples with low concentration of the analyte to be studied.

THEORY

Building and Validating the Multivariate Model. In inverse calibration models, the vector of the analyte concentrations in the samples is given by $\mathbf{c} = \mathbf{R}\mathbf{b} + \mathbf{e}$, where the concentrations are a linear function of the responses (sensors). If we have I calibration samples and we obtain their responses in J different sensors, the \mathbf{R} matrix is obtained. Assuming that the data are mean centered, the model coefficients for an analyte k , \mathbf{b}_k , are estimated in the calibration step using $\mathbf{b}_k = \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$, where \mathbf{R}^+ is the pseudoinverse matrix of matrix \mathbf{R} ($I \times J$) of the responses of the calibration set of samples, and \mathbf{c}_k is vector ($I \times 1$) of the analyte concentrations in the samples mentioned, normally estimated with a reference

method. The difference between the regression methods simply lies in the various ways of inverting matrix \mathbf{R} [5].

For inverse least-squares regression (ILS), matrix \mathbf{R}^+ is equivalent to $(\mathbf{R}^T \mathbf{R})^{-1} \mathbf{R}^T$, the least-squares solution. For principal components regression (PCR) and partial least-squares regression (PLS), however, the calculation of the pseudoinverse matrix is a three step procedure: decomposition of matrix \mathbf{R} , determination of the number of optimal factors (pseudo or chemical rank) of the matrix and subsequent calculation of its pseudoinverse. One of the most used algorithms for calculating \mathbf{R}^+ is the *singular value decomposition* (SVD) [6]. To select the chemical-rank of the model there are several criteria and validation procedures [7] which generally form a part of the calculation of the pseudoinverse matrix. The normal procedure is to divide the calibration set into training and test sets, build several models with a different number of factors and find the optimal model by cross-validation [8], from statistics such as RMSECV (root mean square error of cross validation).

Prediction Step. Finally, if we measure the response of an unknown sample as a row vector, \mathbf{r}_{un}^T , the expression which predicts the concentration of the analyte k is given by the scalar, eq (1):

$$\hat{c}_{un,k} = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k = \mathbf{r}_{un}^T \mathbf{b}_k \quad (1)$$

The uncertainty associated to this predicted concentration can be evaluated by several approaches. Recently, Faber and Kowalski [9] have derived expressions for the variances of the predicted concentrations using the method of error propagation and taking into account measurement errors both in dependent and independent variables. The general equation for a mean-centered model is given by eq (2)

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) = (I^{-1} + h_{\text{un}}) \left[\sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{r_{\text{un}}}^2 \quad (2)$$

where \mathbf{b}_k can be estimated either by ILS, PCR or PLS, σ_c^2 , σ_R^2 and $\sigma_{r_{\text{un}}}^2$ are the variances of the measurement errors in the concentrations and responses of the calibration set and in the response of the unknown sample, respectively. Finally, h_{un} is the leverage of the unknown sample, which measures the position of this sample in the calibration space. It can be written, in a general way, as:

$$h_{\text{un}} = \mathbf{r}_{\text{un}}^T \mathbf{R}^+ (\mathbf{R}^+)^T \mathbf{r}_{\text{un}} \quad (3)$$

There will be a different value of h_{un} for ILS, PCR and PLS, since \mathbf{R}^+ is estimated differently for each method of regression. Eq (2) is important because, as well as serving as a base for deriving the detection limit, it gives information about the various error sources in the model and so directly influence the parameters that affect it, both in the calibration and prediction steps.

Finally, if errors in instrumental responses are neglected, then eq (2) can be expressed as:

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un}}) = \sigma_c^2 (I^{-1} + h_{\text{un}}) \quad (4)$$

Strategy for Calculating Multivariate Detection Limits. The predicted concentration and its two-sided confidence interval, y , can be calculated in the prediction step from the response of the unknown sample (see Faber and Kowalski [10] for the assumptions about the distribution of the regression coefficients in PCR and PLS models). The criterion for establishing whether or not an analyte is detectable consists of seeing whether the value $c_{\text{un},k} - \gamma$ (in this case the prediction

interval y is one-sided) includes the concentration value zero. If it does not, it can be concluded that the analyte is over the detection limit of the method, with an a probability of committing a type I error (false positive). So, this approach does not set a value for MDL for the established procedure. Instead, this value varies according to the response of the unknown sample. From a practical point of view, it can be approached from the other way round: given a measured response for a problem sample, the methodology proposed is capable of calculating, with an a probability of committing a type I error, whether the derived concentration of this response statistically differs from the value zero or not.

This latter approach, however, does not take into account the probability of a type II error (false negative), that's to say, the error that is committed when stating that there is no analyte present when in fact there is. To assess this probability of false negative we have developed a new approach in the multivariate field. The problem of calculating the MDL can be treated as a hypothesis test in the concentration axis of the multivariate model. So, a null hypothesis $H_0: c = c_0$ and an alternative hypothesis $H_1: c > c_0$ can be defined, with c being the true but unknown concentration of the analyte in the sample, and $c_0 = 0$. This treatment is directly related to the statistical theory of hypothesis testing and has previously been applied by Clayton *et al.* [11] in the response domain, to calculate the limits of detection in univariate calibration. This methodology has recently been applied to the calculation of MDL for direct calibration models [12].

If a normal distribution is assumed for the predicted concentrations, when the null hypothesis is true ($c = CQ$), the statistic $t = (c - c_0) / \hat{\text{var}}(c_0)^{1/2}$ follows a Student's t -distribution with v degrees of freedom. c is the estimated value of c and $\hat{\text{var}}(c_0)$ is the estimated variance under the null hypothesis. So, there is a critical value, c_p (also called *decision limit* in the literature), above which the null hypothesis will not be accepted (eq 5):

$$c_p = t_\alpha \hat{\text{var}}(c_0)^{1/2} \quad (5)$$

where α is the assumed probability of committing a type I error (false positive). On the other hand, if the alternative hypothesis is true ($c > c_0$), the minimum detectable value is the concentration for which the probability that the estimated value, \hat{c} , does not exceed c_p , is β . This definition can be expressed as:

$$\Pr \{ \hat{c} \leq c_p \mid c > c_0 \} = \beta \quad (6)$$

where β is the probability of committing a type II error. If $\text{var}(c_0)$ is not known and has to be estimated, then the expression of the limit of detection (assuming constant variance in the concentration domain) is given by:

$$(\text{MDL})_k = A(a, P) \hat{\text{var}}(c_0)^{1/2} \quad (7)$$

where $A(a, P)$ is the non-centrality parameter of a non-central t -distribution, with ν degrees of freedom. For a fixed value of β , the non-centrality parameter $A(a, P)$ can be calculated, either numerically [13] or by means of statistical tables [11,14]. On the other hand, the value of $(\text{MDL})_k$ depends on $\text{var}(c_0)^{1/2}$ which may be estimated, $\hat{\text{var}}(c_0)^{1/2}$, in the way described below.

Finally, the $(\text{MDL})_k$ value found is compared with the one found from the model for the response of the unknown sample and the criterion for detection is established. So it may happen that for one instrumental response, \mathbf{r}_{un} , the analyte concentration found, c_{un} , is detectable or not depending on the α and β probabilities of error chosen.

Calculation of $\text{var}(c_{0,k})$. This variance can be estimated by replicating several samples that do not contain the analyte of interest or by using eq (2) under the null hypothesis. So, this equation becomes:

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un},0}) = (I^{-1} + h_{\text{un},0}) \left[\sigma_c^2 + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_R^2 \right] + \|\mathbf{b}_k\|^2 \sigma_{r_{\text{un},0}}^2 \quad (8)$$

or (neglecting the uncertainties in instrumental responses):

$$\hat{\text{var}}(c_{\text{un},0}) = \sigma_c^2 (I^{-1} + h_{\text{un},0}) \quad (9)$$

where $\sigma_{r_{\text{un},0}}^2$ denotes the variance of the errors when estimating of the unknown sample response, under the null hypothesis, i.e. without the presence of analyte k . $h_{\text{un},0}$ is the leverage of the unknown sample under the null hypothesis, (equivalent to eq 3 but substituting \mathbf{r}_{un} by $\mathbf{r}_{\text{un},0}$). Whereas σ_R^2 and $\sigma_{r_{\text{un},0}}^2$ can be calculated from replicate measurements, $\mathbf{r}_{\text{un},0}$ must be estimated from the unknown sample response, \mathbf{r}_{un} , by extracting the contribution of analyte k . This procedure has been applied to direct calibration models, in which the pure component spectra are known or can be estimated [12]. The procedure, however, is sensibly different for inverse models.

Lorber *et al.* [15] have proposed that a matrix \mathbf{R}_k , free from the contribution of the analyte k , can be calculated from matrix \mathbf{R} , by solving the rank annihilation problem below:

$$\mathbf{R}_k = \mathbf{R} - \kappa \mathbf{c}_k \mathbf{r}^T \quad (10)$$

In eq (10), \mathbf{r}^T is an arbitrary linear combination of \mathbf{R} that must necessarily include some information about the spectrum of the ML analyte. The scalar K can be estimated as:

$$\hat{K} = \frac{1}{\mathbf{r}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k} \quad (11)$$

where \mathbf{R}^+ is the pseudoinverse matrix, built with A significant factors, and $\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k$ is the vector of estimated regression coefficients (\mathbf{b}_k) of the inverse calibration model.

Once matrix \mathbf{R}_k has been obtained, the net and null signal contributions from the unknown sample response are calculated as:

$$\mathbf{r}_{un,k}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_k^T (\mathbf{R}_k^T)^+) \mathbf{r}_{un} \quad (12)$$

$$\mathbf{r}_{un,0} = \mathbf{R}_k^T (\mathbf{R}_k^T)^+ \mathbf{r}_{un} \quad (13)$$

Substituting $\mathbf{r}_{un,0}$ in eq (8) or (9), $\text{var}(c_{0,k})$ can be estimated. If eq (8) is to be applied, where there are several components of variance, the degrees of freedom in the calculation of t_α and $\Delta(\alpha, \beta)$ are obtained according to the Satterthwaite rule [16]. On the other hand, if eq (9) is used to estimate $\text{var}(c_{0,k})$, then the degrees of freedom in the calculation of CT^\wedge_0 are obtained, preferably, by replicating the concentrations of the k th analyte with the reference method.

EXPERIMENTAL SECTION

Samples. 38 gasoline samples were used for building the calibration model. First, 7 samples were produced by Repsol Petróleo (Spanish Oil Company) in the refinery of Tarragona, and the remaining 31 were prepared from the originals by a mixing process. Their content in aromatic compounds, together with the content of paraffins, isoparaffins, olefines and naphthenes (PIONA index), was determined by capillary gas-chromatography in the Plant Laboratory of Repsol. Aromatic contents ranging between 2 and 6% were found.

All gasoline samples were stored in tightly stoppered bottles and kept at 5°C in the dark. Samples were removed from storage and warmed to room temperature just before spectral analysis.

Spectroscopy. NIR spectra were collected on a UNICAM-Massó Model Galaxy scanning spectrophotometer, at 2 cm^{-1} resolution in the wavelength range of 869-1613 nm. A plot of all the spectra is shown in Fig. 1. The instrument was equipped with a tungsten light source and a SePb detector and quartz 1 cm path length cuvettes were used. So, the data set consists on 2749 variables (individual spectral channels). Later, this number was reduced to 687, since it was observed that the number of wavelengths did not affect the predictions of the calibration models.

Statistical methodology. Two regression methods were used, PCR and PLS. The calculations were carried out using the PLS-Toolbox for MATLAB (The Mathworks Inc., Massachusetts, USA.). Mathematical treatments of the data, prior to regression analysis, such as baseline correction, smoothing and first and second derivatives, were studied to determine the optimal conditions for modelling. Finally, detection limit calculations were performed with home-made MATLAB routines.

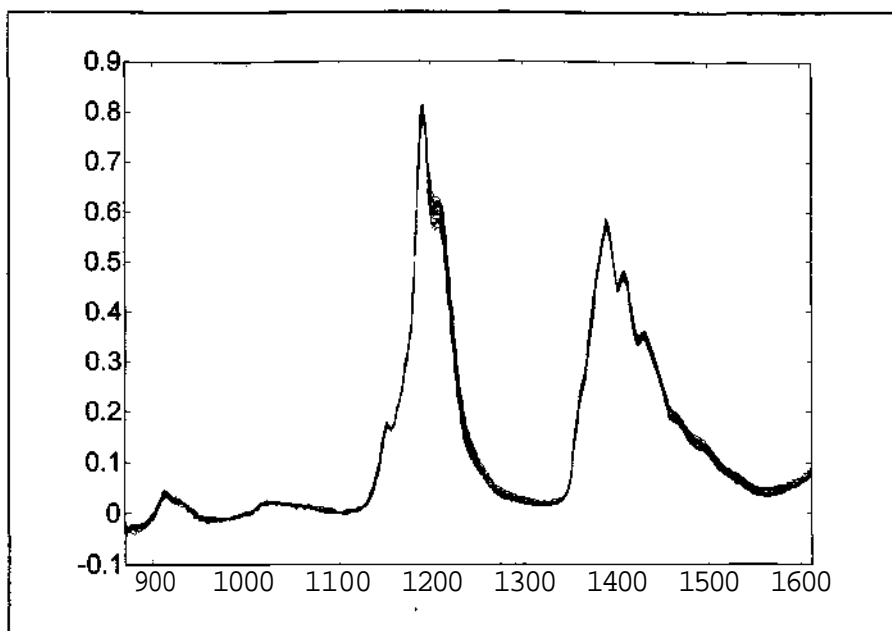


Fig. 1 NIR spectra of the 38 calibration samples. Spectra have been base-line subtracted, using 1100nm as reference wavelength.

RESULTS AND DISCUSSION

Among all **pre-treatments** explored, only constant baseline correction was found to slightly improve prediction results. Consequently, spectra were base-line subtracted by using the absorbance values at 1100 nm as offset. For PCR with mean-centered data, a model with 8 factors was found to be optimal, with a root mean squared error of cross-validation, $RMSECV = 0.46$. For PLS, 6 factors were enough to predict the aromatic content, with $RMSECV = 0.38$. These values are smaller than the tolerance permitted for the reference **chromatographic** method, which was estimated in 1%. The corresponding root mean squared errors of calibration (RMSEC) were 0.31 and 0.08, respectively.

The estimation of the uncertainty in the reference concentration values (σ_c) was calculated by carrying out ten replications at one level of concentration, and a value of 0.2% was found.

To calculate an estimation of the experimental variance of the responses (σ_R^2), 10 replicate measurements were carried out on the same sample, in conditions of reproducibility, for which the mean response and variance for each sensor was calculated. A pooled variance value of $4.85 \cdot 10^{-5}$ was obtained. Several samples, with different aromatic contents, were also analysed, but no substantial changes in response variances were found. As a consequence, it is reasonable to assume that $CT_R = CT_{L0}$ in Eq (8).

The variance of the predicted concentration under the null hypothesis was calculated from Eq (8) and for six samples, ranging between 3 and 4% of aromatic compounds. The results are shown in Table 1.

Aromatic content (%)	PCR	PLS
3.25	0.0844	0.1145
3.98	0.0561	0.0915
3.46	0.0719	0.0904
3.81	0.0561	0.0952
3.49	0.0502	0.0849
3.35	0.0560	0.0997

Table 1. Variance of the predicted concentrations under the null hypothesis for both PCR and PLS models.

An experimental variance was calculated by analysing a sample at the low end of the calibration range over the course of several days. The standard deviation of the 11 concentration values predicted by the model was 0.15 for PCR and 0.28 for PLS, giving variances of 0.02 and 0.08, respectively. These values are of the same order of magnitude, but slightly smaller, than the ones presented in Table 1. This can be explained by the fact that a sample within the calibration range was used to carry out the experimental replications. Prediction errors and confidence intervals are expected to be higher at the 'zero concentration level'.

It can be seen that variances are higher in the case of PLS. This is in contradiction with its smallest prediction errors, and can only be explained by studying the different terms of Eq (8). Table 2 shows the leverage terms for the unknown sample's responses (h_{un}) and for the unknown sample's responses under the null hypothesis ($h_{un,0}$):

Sample number	PCR		PLS	
	h_{un}	$h_{un,0}$	h_{un}	$h_{un,0}$
1	0.5607	0.5519	0.2640	0.3625
2	0.1389	0.1344	0.1058	0.1401
3	0.3735	0.3429	0.0995	0.1297
4	0.1475	0.1363	0.1216	0.1762
5	0.0816	0.0830	0.0908	0.0756
6	0.1407	0.1441	0.1643	0.2210

Table 2. Leverage values of the six predicted samples

No substantial differences can be seen in values of Table 2 that explain the greatest prediction variance for PLS. On the other hand, the length of the vector of regression coefficients ($\|\mathbf{b}\|^2$) takes a value of 889 and 1537, for PCR and PLS, respectively. It seems, then, that the magnitude of the regression vector influences in a great extent the value of the variance of the predicted concentrations.

Finally, the MDLs were calculated for the six predicted samples. Since Eq (8) is a complex variance estimate, the effective number of degrees of freedom for the calculation of the non-centrality parameter, $A(a,p)$, is obtained by applying Satterthwaite rule [16]. The individual degrees of freedom in the estimation of σ_c^2 are easily obtained from the number of replications carried out, giving a value of $\nu_c = 9$. In the case of σ_R^2 , the degrees of freedom are obtained from the number of sensors (J) and replications (n_{rep}), as $\nu_R = J(n_{rep} - 1)$. As it has been yet pointed out, CTR and CT^{\wedge}_0 were assumed to be equal in Eq (8).

Table 3 shows the MDLs for the six samples at different probabilities a and p of error, calculated from Eq (7).

Sample number	PCR			PLS		
	$a = 0.05$			$a = 0.05$		
	$P = 0.50$	$(3 = 0.10)$	$P = 0.05$	$P = 0.50$	$p = 0.10$	$P = 0.05$
1	0.48	0.85	0.96	0.54	0.97	1.09
2	0.37	0.68	0.77	0.42	0.80	0.91
3	0.44	0.79	0.88	0.41	0.80	0.91
4	0.37	0.68	0.77	0.42	0.82	0.93
5	0.31	0.60	0.68	0.40	0.77	0.88
6	0.37	0.68	0.77	0.43	0.84	0.96

Table 3. Multivariate detection limits for the samples predicted by both PCR and PLS models

Also, detection limits were calculated from the experimental variances given above. Values of 0.55 (PCR) and 0.99 (PLS) were obtained (at significance levels $a = p = 0.05$), which are in accordance with results of Table 3. In all cases, the aromatic content in the gasoline samples was detected, at the chosen a and P probabilities of error.

CONCLUSIONS

A new approach to calculating limits of detection for multivariate inverse calibration models has been discussed. The estimator takes into account the probabilities of committing type I and type n errors, as well as the different sources of experimental errors that are involved in the model building. The influence of different terms, such as the position of the unknown sample in the calibration space (given by its leverage value) or the size of the regression vector for the analyte in study, in the detection limits has been discussed. This suggests that a deeper study of experimental factors that affect these terms must be carried out, in order to minimise multivariate detection limits. Also, a reliable estimation of the individual uncertainties is necessary to have good variance estimate. Finally, generalisation of the approach to the case of non-constant variance between zero concentration and the level of the limit of detection should be developed.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (DGICyT project BP93-0366) is gratefully acknowledged.

LITERATURE CITED

- [1] R. Boque and F.X. Rius, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 32, (1996) 11-23.
- [2] A. Lorber, *Anal. Chem.* 58 (1986), 1167-1172.

- [3] A. Lorber and B.R. Kowalski, *J. Chemom.* 2 (1988) 93-109.
- [4] L.A. Currie, *Pure & Appl. Chem.* 67 (1995) 1699-1723.
- [5] E. Sánchez and B.R. Kowalski, *J. Chemom.* 2 (1988) 247-263.
- [6] W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky and W.T. Vetterling, *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, New York, 1989, pp 52-64.
- [7] B.R. Kowalski and MB. Seasholtz, *J. Chemom.* 5 (1991) 129-145.
- [8] T. Naes and H. Martens, *J. Chemom.* 2 (1988) 155-167.
- [9] K. Faber and B.R. Kowalski, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 34 (1996) 283-292.
- [10] K. Faber and B.R. Kowalski, *personal communication.* (*J. Chemom.*, submitted)
- [11] C.A. Clayton, J.W. Hiñes and P.D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506-2514.
- [12] R. Boque and F.X. Rius, *J. Chemom.* accepted for publication.
- [13] R. Boque and F.X. Rius, *Trends Anal. Chem.* submitted for publication.
- [14] D.B. Owen, *J. Am. Stat. Assoc.* 60 (1965) 320-333.
- [15] A. Lorber; K. Faber and B.R. Kowalski, VI Chemometrics in Analytical Chemistry Conference. Tarragona (Espanya). 1996.
- [16] F.E. Satterthwaite, *Biom. Bull.* 2 (1947) 110.

Conclusions

El principal objectiu dels estimadors dels límits de detecció en la calibració multivariant és avaluar de manera fiable la mínima concentració d'una espècie química que coexisteix amb altres espècies en una mostra. Aquesta fiabilitat s'aconsegueix mitjançant la diferenciació satisfactòria entre el senyal (o concentració) corresponent a una mostra que conté l'espècie en estudi i el senyal (o concentració) corresponent a una mostra sense contingut de l'espècie, considerant les probabilitats d'error α i P associades.

És important ressaltar la diferència entre els límits de detecció en el camp univariant i multivariant. Mentre en el cas univariant el límit de detecció s'estableix com un valor fix a partir del qual, i *a priori*, la concentració d'un analit en la mostra és indicativa de la seva presència, en la calibració multivariant aquest paràmetre es presenta com un valor variable, ja que depèn de la mostra que s'està analitzant (a través dels diferents termes d'error de la variància de la concentració predita). Conseqüentment, en diferents condicions experimentals un analit en una mateixa mostra pot ésser detectat o no. La metodologia presentada és capaç d'establir, per a una mostra analitzada, si la concentració predita de l'analit en estudi està per damunt o no del límit de detecció del mètode, segons les probabilitats d'error α i p fixades amb anterioritat.

En aquesta línia, hom s'ha atrevit a formular una nova definició de límit de detecció en la calibració multivariant, complementant les ja existents. *El límit de detecció multivariant per un analit en una mostra és la mínima concentració que pot diferenciar-se del zero amb probabilitats d'error α i p conegudes.* Aquestes probabilitats α i P han d'estar sempre presents en qualsevol avaluació de la concentració, i més en el cas del límit de detecció.

Les principals dificultats que s'han hagut de superar en aquest treball, a l'hora de desenvolupar els estimadors dels límits de detecció, han estat degudes als diferents models i mètodes de regressió emprats, la naturalesa diversa de les dades analítiques, originades a partir de diferents tècniques analítiques, i la manca en alguns casos d'una base estadística suficientment sòlida en les etapes de construcció del model i de predicció. Aquesta problemàtica s'ha traduït, en ocasions, en la necessitat de fer una sèrie d'assumpcions, respecte per exemple a la distribució que segueixen les concentracions predites pel model, o a la distribució que segueix la variància de les respostes i les concentracions de les mostres utilitzades en la calibració (condicions d'homoscedasticitat o heteroscedasticitat).

L'assumpció d'homoscedasticitat (variància constant), tant en les respostes com en les concentracions de calibració, pot ser vàlida en alguns casos, però ha d'estar validada de forma rigorosa. En cas contrari, es podria produir un error sistemàtic en la magnitud de la variància de la concentració predita, la qual cosa podria afectar, en conseqüència, al valor del límit de detecció.

Tots els estimadors presentats en aquest treball de recerca es basen en l'assumpció de que la distribució de la concentració predita al nivell de concentració zero és equivalent a la distribució de la concentració al nivell del límit de detecció. Això és perfectament assumible en la majoria de situacions, però no en totes. El tractament del problema és diferent en cas que la variància de la concentració predita no sigui constant. Es planteja, doncs, com un objectiu de futur el poder ampliar els estimadors derivats en aquest sentit. La limitació que hom pot trobar té un caire estadístic, doncs no existeixen taules corresponents a la t descentrada quan les variàncies són diferents.

Una de les dificultats pràctiques més importants en l'avaluació dels límits de detecció en la calibració multivariant radica en el càlcul dels components

individuals de la variància de la concentració predita, deguts a l'error en les respostes i concentracions de l'etapa de calibració i a l'error en la resposta de la mostra desconeguda. Si el límit de detecció ha de ser representatiu de tot el procediment analític (incloent les etapes prèvies a la mesura instrumental), la variància en les respostes, tant de l'etapa de calibració com de predicció, no es pot avaluar a partir de la incertesa instrumental pròpia de l'aparell de mesura. Ben al contrari, la variància de les respostes s'ha d'avaluar a partir de rèpliques experimentals de les mostres, en condicions de reproductibilitat.

Molt important també és tenir en compte l'error associat a les concentracions en l'etapa de calibració, sobretot en models inversos, on aquestes concentracions són avaluades a partir d'un mètode de referència, el qual, per sí sol, ja comporta una incertesa determinada.

Els analistes són, a la llarga, qui poden escollir si volen ser més o menys restrictius a l'hora de controlar les fonts d'error associades a la concentració predita pel model de calibració. Els valors finals dels límits de detecció dependran d'aquest grau de restricció. Una aproximació estricta al càlcul dels límits de detecció ha de tenir en compte totes aquestes causes d'error, la qual cosa suposa un increment en el treball experimental quan es calculen les variàncies associades. Una solució a aquest problema pot consistir en estimar uns determinats errors, a partir del coneixement previ que hom pugui tenir de la tècnica instrumental utilitzada. En el cas de les respostes i concentracions de l'etapa de calibració i les respostes de les mostres desconegudes, hom pot recórrer també a estimar la seva incertesa a partir dels residuals del propi model de calibració. Cal tenir en compte, en tots els casos, que el nombre de graus de llibertat implicats en el càlcul dels estadístics depèn de l'estimació que es faci d'aquests termes individuals de variància. D'altra banda, sempre que s'utilitzin els residuals per estimar la variància de les concentracions de les mostres de calibració, és clar que per obtenir límits de detecció fiables i que

responguin a la realitat, s'ha de disposar de models perfectament validats. Si s'utilitzen altres aproximacions per estimar aquesta incertesa, com el mètode de la propagació d'errors aplicat a l'etapa de preparació dels estàndards, els límits de detecció del mètode poden resultar **infraestimats**.

Un problema important que també es planteja és el de la validació dels **estimadors** dels límits de detecció. La IUPAC, en el seu darrer document sobre les capacitats de detecció i quantificació dels mètodes d'anàlisi, també en fa esment i recomana que els límits de detecció calculats es verifiquin **experimentalment**. Aquesta verificació ha de passar, necessàriament, per la mesura repetida de mostres amb nivells de concentració zero (o molt propers a aquest valor) de l'**analit** en qüestió. Altres tipus de validacions, com la utilització de dades simulades o la comparació amb altres estimadors, tenen, doncs, un caràcter més complementari que alternatiu.

Conclusions del capítol 3

L'estimador desenvolupat en el capítol 3 (Eq 3, Pàg 121) es basa en la reducció a una sola dimensió de la matriu multidimensional de respostes original i la posterior aplicació del mètode **univariant** de Clayton *et al.* per calcular el límit de detecció. Aquest estimador pot ésser aplicat a qualsevol tècnica de detecció **multivariant** acoblada a una tècnica de separació, com la **cromatografia** de gasos, la **cromatografia** líquida d'alta eficàcia o l'**electroforesi** capilar, sempre que els senyals enregistrats siguin específics i no apareguin pics **solapats** o, en general, substàncies **interferents** que donin lloc a senyals convolucionats. D'altra banda, ha d'existir una correlació considerable entre les dades obtingudes per a que el primer component principal expliqui pràcticament la totalitat de la **variància** continguda en les dades.

La metodologia proposada proporciona límits de detecció lleugerament inferiors als límits de detecció univariants, degut a l'efecte de promig de senyal que es duu a terme en el mètode de regressió per components principals (PCR). D'altra banda, s'ha demostrat que aquest efecte de promig és molt més important a mesura que el soroll de fons en les dades s'incrementa. La situació esdevindria ben diferent en presència de senyals solapats, ja que en aquests casos la calibració univariant fallaria completament. El potencial de detecció de l'aproximació multivariant proposada es veu, doncs, en part restringit en presència d'aquests senyals solapats. En aquest sentit, un estudi posterior dels límits de detecció en la tècnica CG-EM hauria d'incloure necessàriament la presència de substàncies interferents que donessin lloc a pics solapats en el cromatograma d'ions total (TIC).

Un altre aspecte a considerar seria l'avaluació dels límits de detecció en la tècnica CG-EM a partir de mostres reals addicionades amb l'analit en estudi, i establir d'aquesta manera les característiques de detecció de la metodologia global, la qual ha de contemplar etapes com el pretractament de la mostra.

Conclusions del capítol 4

En la comparació dels límits de detecció en models de calibració directes (Taula 3, Pàg 185) s'observa que els valors obtinguts pel nostre estimador són sensiblement superiors als calculats per les altres aproximacions trobades a la literatura. Això és raonable si es té en compte que l'expressió del límit de detecció aplicada té en compte totes les possibles fonts d'error que afecten la concentració predita. La diferència respecte els resultats proporcionats per l'estimador de Bauer *et al.* radica simplement en l'estratègia utilitzada en el càlcul de la variància de la concentració predita en condicions d'hipòtesi nul·la.

En el cas de l'aplicació de l'estimador al càlcul del límits de detecció de quatre pesticides comercials, desenvolupat en l'article *Figures of merit in multivariate calibration. Determination of four pesticides in water by FIA and spectrophotometric detection*, del capítol 4, cal notar que en aquest treball els límits de detecció es van calcular a partir de l'expressió de Bauer *et al.* simplificada, sense tenir en compte els errors en les respostes i concentracions de les mostres de calibració. Utilitzant aquesta expressió simplificada, la qual és equivalent a l'expressió de mínims quadrats clàssica, s'observa una relació inversa entre els límits de detecció i la selectivitat dels **analits** en estudi. Aquesta relació no s'observa, però, entre els valors de selectivitat i/o sensibilitat espectral i els errors de predicció dels diferents pesticides en estudi (expressats a través del seu RMSEP), tal com seria de suposar. Això fa intuir que la utilització d'una expressió simplificada pel càlcul del límit de detecció pot portar a resultats menors dels que realment caldria esperar. Com a conclusió es dedueix, doncs, que cal tenir informació completa de l'error comès en les diferents etapes del mètode, destacant sobretot l'error degut a les concentracions de l'**analit** en l'etapa de calibració.

Pel que fa al programa de càlcul desenvolupat, el seu principal avantatge és que permet fixar les probabilitats de cometre errors de la 1a i 2a espècie. Una altra de les seves característiques és que pot incorporar les diverses fonts d'error que tenen lloc en el procés, com la incertesa en les respostes instrumentals i la incertesa en les concentracions de calibració. Això permet a l'analista una estimació molt més fiable dels límits de detecció **multivariants**, així com la possibilitat d'**incidir** en etapes experimentals per tal de millorar el mètode d'anàlisi.

El programa permet també dibuixar les corbes característiques de detecció de Panalit en estudi. Un estudi futur d'aquestes corbes es pot encaminar a veure com varien els límits de detecció en funció de la probabilitat d'error P i els paràmetres relacionats amb el model de calibració, com el nombre de mostres i variables

utilitzades o el repartiment de les mostres en l'interval de concentracions. Les corbes també es poden utilitzar per establir una relació entre els límits de detecció i els paràmetres de qualitat d'un analit en concret, com ara la seva selectivitat o sensibilitat parcial respecte els restants **analits** presents.

Conclusions capítol 5

En models de calibració inversos, la dificultat pel que fa a l'establiment dels límits de detecció radica en la pròpia naturalesa de les dades experimentals. El fet que es tracti de mostres reals, on la concentració de l'**analit** (o analits) d'interès es determina a partir d'un mètode de referència, dificulta el coneixement de les possibles substàncies interferents presents i limita en gran manera la possibilitat de controlar l'interval de concentracions de treball (incloent el poder disposar de mostres amb un contingut zero de Panalit en estudi). És per aquests motius que els estimadors del límit de detecció que es derivin han d'estar fermament arrelats en el model de calibració obtingut.

Tant en el primer com en el segon estimador presentats en el capítol cinquè existeixen diversos components que influeixen en la deducció del límit de detecció: **variàncies** individuals associades a la l'error de predicció de Panalit en la mostra, tipus de **pretractament** de les dades o el càlcul de la resposta de detecció, **r_D** .

Una de les principals dificultats en l'avaluació dels límits de detecció en models inversos és disposar d'una expressió de la **variància** de la concentració predita que sigui general per a qualsevol mètode de regressió emprat (ILS, PCR o PLS). Des de l'expressió derivada per Lorber i Kowalski i utilitzada en el primer estimador presentat, s'há avançat substancialment i diversos autors han proposat alternatives

diverses, essent les més recents les presentades per Faber i Kowalski . La seva aplicació, però, no és universal i, en cada cas, es requereix un perfecte coneixement de les dades. A més a més, quan el mètode PLS s'utilitza per a construir el model, s'ha de tenir molta més cura pel que respecta a les diferents assumpcions estadístiques que regeixen les dades. L'evolució en l'estimació dels límits de detecció en models de calibració inversos està, per tant, estretament lligada amb el desenvolupament d'expressions cada cop més rigoroses per a la variància de la concentració predita.

Malgrat la problemàtica descrita, les estratègies modulars desenvolupades poden permetre, en el futur, una millora en l'estimació global del límit de detecció a través dels diferents termes individuals, sense necessitat de canviar el concepte global de les aproximacions proposades.

Perspectives de futur

Com a perspectiva de futur, i dins un objectiu global que consistiria en **verificar** la validesa dels **estimadors** desenvolupats en diferents tècniques d'anàlisi amb detecció **multivariant**, hom preveu que la recerca pot enfocar-se vers l'aprofundiment en les tècniques individuals d'anàlisi. Un millor coneixement de les diferents tècniques pot ser de gran utilitat a l'hora d'establir la relació existent entre els diferents paràmetres instrumentals i els termes d'error de l'expressió del límit de detecció. Fins ara, l'avaluació dels components individuals de variància s'ha dut a terme a partir de repeticions experimentals o dels residuals del model. No s'ha dut a terme un estudi exhaustiu de com afecten les característiques pròpies d'una tècnica d'anàlisi en el valor dels límits de detecció. Aquest estudi pot permetre, en un futur proper, un millor coneixement d'aquests factors influenciadors que, a la llarga, es pot traduir en una rebaixa dels termes d'error

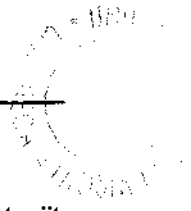
corresponents i, en definitiva, dels límits de detecció. Cal ser conscients, però que altres factors de la metodologia analítica previs a la mesura instrumental, com la presa o el pretractament de la mostra, tenen una influència decisiva en el procés de detecció. L'error degut a aquestes etapes supera en molts casos l'error instrumental. L'estudi de la variància de les etapes prèvies és, per tant, molt important i requereix un tractament apart, tractament on entrarien en joc altres branques com l'automatització i/o robotització dels sistemes d'anàlisi química.

Encara que els estimadors del límit de detecció derivats en la present Tesi Doctoral són aplicables únicament en procediments d'anàlisi que utilitzen la calibració multivariant, és també cert que en moltes de les tècniques analítiques que han anat apareixent la instrumentació utilitzada presenta el que hom anomena *avantatge de segon ordre*. Això vol dir que, per una mostra determinada, la concentració d'un analit és pot predir, fins i tot, en presència d'una substància interferent que no ha estat prèviament modelada en l'etapa de calibració. En els instruments de segon ordre, la resposta d'una mostra concreta no ve donada per un vector (com per exemple un espectre), sinó que es pot expressar en forma matricial. Un exemple clar d'aquests tipus de tècniques és l'acoblament CG-EM, on la resposta de cada mostra pot expressar-se com una matriu amb dimensió (*temps de retenció vs. relació m/z*). Altres exemples que han aparegut són els sistemes FIA amb detecció espectrofotomètrica. En ambdós casos, la resposta de la mostra es pot veure de dues maneres: a) com una sèrie d'espectres per unitat de temps o b) com un cromatograma (o fiagrama) a una longitud d'ona seleccionada.

Els mètodes de calibració de segon ordre són conceptualment diferents dels mètodes de calibració multivariant (o de primer ordre) i, per tant, també és diferent el tractament que es pugui fer de certs paràmetres de qualitat associats a la metodologia analítica, com poden ser els límits de detecció. Recentment, Lorber i Kowalski, en un treball anàleg al fet per Lorber en calibració multivariant, han

estès l'estudi dels diversos paràmetres de qualitat als mètodes de calibració de segon ordre. En ell, es presenta el concepte de límit de detecció, però deixant clar que es requereix un estudi molt més profund del terme. És en aquest sentit, doncs, que cal avançar en el desenvolupament d'estimadors adequats per a l'avaluació d'aquest paràmetre de qualitat en procediments d'anàlisi que utilitzin la calibració de segon ordre.

Apèndixs



APÈNDIX I

Derivació de l'expressió del límit de detecció per a un model clàssic construït amb els espectres dels analits purs

Lorber defineix el límit de detecció, per un analit k , com la concentració que correspon a tres vegades l'error relatiu total en l'estimació de la seva concentració.

Aquest error relatiu s'expressa com:

$$\frac{\Delta c_{\text{total}}}{c_k} = \frac{\Delta c_{\text{cal}}}{c_k} + \frac{\Delta c_{\text{un}}}{c_k} \quad (\text{I.1})$$

on Δc_{cal} és l'error degut a l'etapa de calibrado i Δc_{un} és l'error degut a l'etapa de mesura de la mostra desconeguda. L'error relatiu en la concentració és igual a l'error relatiu en el senyal net mesurat, tant en l'etapa de calibració com en la de predicció. Per tant, l'equació (I.1) és equivalent a:

$$\frac{\Delta c_{\text{total}}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{\|\mathbf{r}_k^*\|} + \frac{\varepsilon_{\text{un}}}{\|\mathbf{r}_{\text{un},k}^*\|} \quad (\text{I.2})$$

on $\|\mathbf{r}_k^*\|$ i $\|\mathbf{r}_{\text{un},k}^*\|$ són els senyals nets, en forma escalar, de l'analit k , en l'estàndard de calibració i en la mostra desconeguda, respectivament. L'equació (I.2) és equivalent a:

$$\frac{\Delta c_{\text{total}}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{\|\mathbf{r}_k^*\|} + K_{\text{un}} \frac{\varepsilon_{\text{un}}}{\|\mathbf{r}_{\text{un}}\|} \quad (\text{I.3})$$

on κ_{un} és el terme de propagació d'error de l'analit k en la mostra, és a dir, la relació entre l'error relatiu en la concentració i l'error relatiu en la resposta instrumental. S'expressa com [Lorber, 1986]:

$$\kappa_{un} = \frac{\|\mathbf{r}_k^*\| \|\mathbf{r}_{un}\|}{\mathbf{r}_{un}^T \mathbf{r}_k^*} \quad (I.4)$$

El límit de detecció és, doncs, el valor de concentració que compleix la condició:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{cal}}{\|\mathbf{r}_k^*\|} = \kappa_{un} \frac{\varepsilon_{un}}{\|\mathbf{r}_{un}\|} \quad (I.5)$$

La concentració de l'analit ha d'aparèixer de forma explícita en l'eq. (I.5). Si hom pensa que l'equació de predicció d'una analit k determinat ve donada per [Lorber, 1986]:

$$c_{un,k} \sim c_{0,k} \frac{\mathbf{r}_{un}^T \mathbf{r}_k^*}{\|\mathbf{r}_k^*\|^2} \quad (I.6)$$

llavors, combinant (I.4) i (I.6) i substituint el valor de κ_{un} en (I.5) s'obté:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{cal}}{\|\mathbf{r}_k^*\|} = \frac{\varepsilon_{un} c_{0,k}}{\|\mathbf{r}_k^*\| c_{un,k}} \quad (I.7)$$

Operant en aquesta equació hom arriba al límit de detecció buscat:

$$(\text{LOD})_k = \frac{\varepsilon_{\text{un}} c_{0,k}}{\|\mathbf{r}_k^*\| \left(\frac{1}{3} - \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{\|\mathbf{r}_k^*\|} \right)} \quad (\text{I.8})$$

Finalment, simplificant aquesta darrera expressió s'obté:

$$(\text{LOD})_k = \frac{3\varepsilon_{\text{un}} c_{0,k}}{\|\mathbf{r}_k^*\| - 3\varepsilon_{\text{cal}}} \quad (\text{I.9})$$

APÈNDIX II

Derivació de l'expressió del límit de detecció per a un model clàssic construït amb els espectres de les mescles

Reprement la definició de Lorber de límit de detecció per un analít k , l'error relatiu en la concentració estimada és ara:

$$\frac{\Delta c_{\text{total}}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{\|s_k^*\|} + \kappa_{\text{un}} \frac{\varepsilon_{\text{un}}}{\|r_{\text{un}}\|} \quad (\text{II.1})$$

on s_k^* és la sensibilitat neta de l'analít k o, el que és el mateix, l'espectre de Panalít k pur normalitzat a concentració unitat. El terme de propagació d'error de Panalít k en la mostra, κ_{un} , s'expressa com :

$$\kappa_{\text{un}} = \frac{\|s_k^*\| \|r_{\text{un}}\|}{r_{\text{un}}^T s_k^*} \quad (\text{II.2})$$

Si hom utilitza el concepte de selectivitat per un analít, definit pel mateix Lorber, l'expressió (II.1) esdevé:

$$\frac{\Delta c_{\text{total}}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{(\text{SEL})_k \|s_k\|} + \kappa_{\text{un}} \frac{\varepsilon_{\text{un}}}{\|r_{\text{un}}\|} \quad (\text{II.3})$$

El límit de detecció és el valor de concentració corresponent a tres vegades el valor de $\Delta c_{\text{total}}/c_k$ i, per tant:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{(\text{SEL})_k \|s_k\|} + \kappa_{\text{un}} \frac{\varepsilon_{\text{un}}}{\|r_{\text{un}}\|} \quad (\text{II.4})$$

La concentració d'analit no apareix en l'eq. (n.4), però si es té en compte que l'equació de predicció d'un analit k s'expressa com [Lorber i Kowalski, 1988]:

$$c_{un,k} = \frac{\mathbf{r}_{un}^T \mathbf{s}_k^*}{\|\mathbf{s}_k^*\|^2} \quad (\text{II.5})$$

llavors, combinant (II.2) i (II.5) i substituint el valor de κ_{un} en (n.4) s'obté:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{cal}}{(\text{SEL})_k \|\mathbf{s}_k\|} + \frac{\|\mathbf{r}_{un}\| \varepsilon_{un}}{c_k \|\mathbf{s}_k^*\| \|\mathbf{r}_{un}\|} \quad (\text{II.6})$$

Suposant que l'error relatiu en la mesura de les respostes de les mostres de calibració i predicció és el mateix, l'eq. (II.6) es simplifica, obtenint-se:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{un}}{KJ} \left(\frac{1}{(\text{SEL})_k} + \frac{\|\mathbf{r}_{un}\|}{c_k \|\mathbf{s}_k^*\|} \right) \quad (\text{II.7})$$

Reorganitzant aquesta expressió s'obté el límit de detecció buscat:

$$(\text{LOD})_k = \frac{3 \|\mathbf{r}_{un}\|}{\|\mathbf{s}_k^*\| \left(\frac{\|\mathbf{r}_{un}\|}{\varepsilon_{un}} + \frac{3}{(\text{SEL})_k} \right)} \quad (\text{n.8})$$

APÈNDIX III

Derivació de l'expressió del límit de detecció per a un model invers construït amb els espectres dels analits purs

En aquest tipus de models, el senyal net d'un analit k , en forma escalar, ve donat per l'expressió:

$$r_{un,k}^* = \frac{\mathbf{r}_{un}^T \mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k}{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|} = \frac{c_{un,k}}{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|} \quad (\text{III.1})$$

o bé:

$$r_k^* = \frac{c_{0,k}}{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|} \quad (\text{III.2})$$

en la mostra desconeguda i en l'estàndard de l'analit k pur, respectivament. $\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|$ és la inversa de la sensibilitat de l'analit k . L'error relatiu en la concentració estimada de la mostra desconeguda és ara:

$$\frac{\Delta c_{un}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{un}}{r_{un,k}^*} = \frac{\varepsilon_{un} \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|}{c_{un,k}} = \frac{\varepsilon_{un} \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_{un}\|}{c_{un,k} \|\mathbf{r}_{un}\|} \quad (\text{III.3})$$

El terme de propagació d'error, κ_{un} , que és la relació entre l'error relatiu de la resposta mesurada de la mostra i l'error relatiu en la concentració predita de l'analit k , s'identifica com:

$$\kappa_{un} = \frac{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_{un}\|}{c_{un,k}} \quad (\text{III.4})$$

De la mateixa manera, l'error relatiu en l'estimació de la concentració en l'etapa de calibració ve donat per:

$$\frac{\Delta c_{cal}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{cal}}{r_k^*} = \frac{\varepsilon_{cal} \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|}{c_{0,k}} \quad (\text{III.5})$$

Per la seva banda, Lorber defineix la selectivitat, $(\text{SEL})_k$, com el quocient entre el senyal net de l'analit k pur i el seu espectre pur:

$$(\text{SEL})_k = \frac{r_k^*}{\|\mathbf{r}_k^{\text{pur}}\|} = \frac{c_{0,k}}{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_k^{\text{pur}}\|} \quad (\text{III.6})$$

Combinant les equacions (III.5) i (III.6), l'error relatiu en l'etapa de calibració es pot expressar-se en funció de la selectivitat de l'analit k . Finalment, si es sumen les equacions (III.3) i (III.5), s'obté que l'error relatiu total és:

$$\frac{\Delta c_{total}}{c_k} = \frac{\varepsilon_{cal}}{(\text{SEL})_k \|\mathbf{r}_k^{\text{pur}}\|} + \frac{\|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\| \|\mathbf{r}_{un}\|}{c_{un,k}} \frac{\varepsilon_{un}}{\|\mathbf{r}_{un}\|} \quad (\text{III.7})$$

El límit de detecció és el valor de concentració corresponent a tres vegades el valor de $\Delta c_{total}/c_k$ i, per tant:

$$\frac{1}{3} = \frac{\varepsilon_{cal}}{(\text{SEL})_k \|\mathbf{r}_k^{\text{pur}}\|} + \frac{\varepsilon_{un} \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|}{c_{un,k}} \quad (\text{III.8})$$

Reorganitzant aquesta expressió s'obté el límit de detecció buscat:

$$(\text{LOD})_i = \frac{\varepsilon_{\text{un}} \|\mathbf{R}^+ \mathbf{c}_k\|}{\frac{1}{3} + \frac{\varepsilon_{\text{cal}}}{(\text{SEL})_k \|\mathbf{r}_k^{\text{pur}}\|}} \quad (\text{III.9})$$

GLOSSARI



CLS	Mínims quadrats clàssics <i>Classical Least Squares</i>
FIA	Anàlisi per injecció en flux <i>Flow Injection Analysis</i>
GC-MS-SIM	Cromatografia de gasos - espectrometria de masses amb monitorització d'ions seleccionats <i>Gas Chromatography- Mass Spectrometry with Selected Ion Monitoring</i>
HPLC-DAD	Cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció per díodes en fila <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>
ICP-OES	Espectroscopia d'emissió òptica amb plasma acoblat per inducció <i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy</i>
ILS	Mínims quadrats inversos <i>Inverse Least Squares</i>
LOD	Límit de detecció • <i>Limit of Detection</i>
MDL	Limit de detecció multivariant <i>Multivariate Detection Limit</i>
NAS	Senyal net d'un analit <i>Net Analyte Signal</i>
NIR	Infraroig proper <i>Near infrared</i>
PCA	Anàlisi de components principals <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Regressió per components principals <i>Principal Component Regression</i>
PLS	Mínims quadrats parcials <i>Partial Least Squares</i>
RAM	Mètode de l'anihilació del rang <i>Rank Annihilation Method</i>
RMSECV	Arrel quadrada de l' error mitjà de la validació creuada al quadrat <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>
RMSEP	Arrel quadrada de l'error mitjà de predicció al quadrat <i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
SVD	Descomposició en valors singulars <i>Singular Value Decomposition</i>
TIC	Cromatograma d'ions totals • <i>Total Ion Chromatogram</i>