

## 휴대용 분광분석기를 이용한 알코올 중에 함유되어 있는 물의 측정

안지원 · 우영아 · 김효진\*

동덕여자대학교 약학대학

(2002. 10. 29 접수, 2003. 3. 18 승인)

### Determination of water content in alcohol by portable near infrared (NIR) system

Jhii-Weon Ahn, Young-Ah Woo, and Hyo-Jin Kim\*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University,  
Seoul 136-714, Korea

(Received Oct. 29, 2002, Accepted Mar. 18, 2003)

**요 약 :** 본 연구에서는 근적외선 분광분석법 (NIR)을 이용하여 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량을 비파괴적으로 측정하였다. Photo-diode array 방식의 휴대용 NIR system과 scanning 방식의 NIR spectrometer를 이용하여 두 기기 사이의 calibration 결과를 비교하였다. 알코올 혼합액 중의 물의 함량을 정량분석 하기 위해 부분최소자승회귀분석법 (PLSR : partial least squares regression)을 사용하였다. 그 결과 SEP (standard error of prediction)가 photo-diode array 방식을 사용하였을 때는 0.10%, scanning 방식을 사용하였을 때는 0.12%였다. Calibration 모델의 안정성을 확인하기 위하여 6일 동안 2%의 메탄올을 함유하고 있는 에탄올 용액 중의 물의 함량이 3%, 5% 및 7% 되도록 시료를 조제하여 측정하였다. 두 가지 방식의 NIR 모두 3%이내의 변동계수 (CV : coefficient of variation)로 좋은 결과를 나타내었다. 이번 연구를 통해서 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량 측정이 근적외선 분광분석법을 이용하여 성공적으로 수행되었고 photo-diode array 방식의 휴대용 NIR 시스템을 이용해서 scanning 방식의 NIR spectrometer를 이용한 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

**Abstract :** In this study, water content in the mixture of methanol and ethanol was nondestructively measured by near infrared (NIR) spectroscopy. Two types of NIR instruments, portable NIR system with a photo-diode array and scanning type NIR spectrometer were used and the calibration results were compared. Partial least squares regression (PLSR) was applied for the calibration and validation for the quantitative analysis. The calibration results from both instruments showed good correlation with actual values. The calibration with the use of PLS model predicted water concentration with a standard error of prediction (SEP) of 0.10% and 0.12% for photo diode array and scanning type, respectively. During 6 days, routine analyses for 3%, 5% and 7% water in ethanol solution with 2% methanol were

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-940-4305 Fax : +82+(0)2-943-9578

E-mail : hyojkim@dongduk.ac.kr

performed to validate the robustness of the developed calibration model. The routine analyses showed good results with coefficient of variation (CV) of within 3% for both types of NIR spectrometers. This study showed that the rapid determination of water in the mixture of methanol and ethanol was successfully performed by NIR spectroscopy and the performance of the portable NIR system with a photo diode array detector was comparable to that of the scanning type NIR spectrometer.

**Key words** : near-infrared (NIR), water in alcohol, partial least squares regression (PLSR)

## 1. 서 론

현재 수분측정 방법으로 Karl Fisher 법이 가장 널리 사용되고 있다. Karl Fisher 법은 알코올 및 염기 존재 하에 수분이 요오드와 정량적으로 반응하는 것을 이용한 수분 정량법으로 측정법에는 용량적정법과 전량적정법이 있다. 용량적정법은 반응에 필요한 요오드를 수분측정용 시액 중에 용해시켜 검체 중의 물과 반응하여 소비된 요오드의 적정량으로부터 수분을 측정하는 방법이다. 전량적정법은 요오드화물 이온을 혼합한 수분측정용 시액을 써서 전해에 의하여 요오드를 발생시킨다. 요오드가 정량적으로 물과 반응하는 것을 이용하여 전해에 필요한 전기량에서 수분을 측정하는 방법이다. Karl Fisher 법은 일반적으로 모든 시료의 수분 측정에 사용되지만 기기 조작에 있어 숙련자가 아니면 오차가 크고, 분석 시 시료가 파괴된다는 단점이 있다. 또한, 재현성이 좋지 않은 경우도 흔히 볼 수 있다. 이러한 단점을 극복하고자 본 실험에서는 유리로 된 바이알에 담긴 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량을 근적외선 분광분석법 중 투과법을 이용하여 신속하고 비파괴적으로 정량분석 하였다. 이는 천연물질 성분을 추출하여 기능성 제품이나 약제를 만드는 생산현장에서 사용되는 알코올을 회수하여 재활용을 할 때 알코올에 대한 품질검사를 하는데 필요로 한다.

근적외선 분광분석법은 유기물을 확인하는데 사용되는 분석기술로서, 유기화합물을 구성하는 C-H, N-H, O-H 및 S-H 등의 기본 분자진동 에너지의 결합대와 1~4차 배음대로 인한 흡수대가 700~2500 nm의 근적외선 영역에서 압축되어 나타나므로 시료의 물리·화학적 특성 등 많은 정보를 얻을 수 있다.<sup>1</sup> 근적외선 분광분석법은 물, 알코올, 지방산 같은 분자들의 수소결합이나 hydration 연구를 위해 오랫동안 사용되어 왔다.<sup>2-7</sup> 근적

외선 분광분석법은 수소결합이나 hydration 연구에 있어서 몇 가지 이점을 가지고 있다. 첫째로 OH와 NH stretching bands는 단량체와 중합체가 근적외선 영역에서 분리가 잘 된다는 것이다. 두 번째로 단량체에서 OH와 NH에 의해 나타나는 1차 배음대의 강도가 중합체의 경우 보다 높게 나타나기 때문에 중합체에서 단량체로의 해리 과정을 모니터링 함에 있어서 적외선 영역보다 근적외선 영역이 더 적당하다.<sup>8-9</sup> 세 번째로, 모든 경우에 그런 것은 아니지만 몇몇 경우에서 화합물에서 기인하는 OH band와 물에서 기인하는 OH band가 따로 분리되어 관찰된다. 그러므로 수소결합과 hydration을 독립적으로 연구할 수 있다. 1980년 이후 다중선형회귀분석(multiple linear regression: MLR)<sup>10</sup>, 부분최소자승회귀분석(partial least squares regression: PLSR)<sup>11-14</sup>, 주성분회귀분석(principal components regression: PCR)과 같은 다변량 모델 분석방법이 개발되어 근적외선 분광기와 접목되면서 근적외선 분광분석법을 이용한 연구에 더욱 유용하게 되었다.

근적외선 분광분석법은 약제 샘플의 전처리 없이 다성분을 동시에 신속하게 측정, 분석할 수 있는 장점이 있고, 이러한 연구는 최근에 보고되고 있다. Kamat 등이 쓴 논문에 보면 동결건조 시킨 sucrose의 수분량을 유리로 된 바이알에 직접 근적외선 분광분석법을 사용하여 측정한 내용을 보고하였다.<sup>15</sup> 그리고 플라스틱 병에 담겨 있는 에탄올, 프로필렌 글리콜, 물을 동시에 측정하는 방법이 Broad 등에 의해 발표되었다.<sup>16</sup>

본 연구에서는 시료를 전처리하지 않으며 신속하고 비파괴적으로 측정할 수 있는 근적외선 분광분석법의 이점에 착안하여 생산현장에서 근적외선 분광분석기를 이용한 제품관리 가능성을 제시하고자 한다. 또한 고가이고 부피가 크며 중량이 많이 나가고 움직임에 매우 예민하여 실험실에서 고정시켜 사용하는 table-top 형식

의 scanning type NIR spectrometer와 움직임에 안정한 portable 형식의 photo-diode array type NIR system을 이용하여 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량을 측정하고 그 결과를 비교하여 생산현장에서의 휴대용 기기를 이용한 간편한 제품관리 가능성을 알아보고자 한다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 기기 및 시약

#### 2.1.1. Portable NIR system

휴대용 근적외선 분광분석기는 NearIRSTA HN1100 (SpectronTech Co., Ltd, Kwangju-city, Korea)을 사용하였다. 이 system은 광원으로 tungsten-halogen lamp를 사용하였고, InGaAs photo-diode array를 검출기로 사용하였다. 휴대용으로 충전하여 사용가능 하도록 DC 12 V 배터리가 내장되어 있다. 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물을 측정하기 위해 dip-probe를 이용하였다. 광원에서 나온 빛이 probe를 통하여 액체를 통과한 후 맞은편의 거울에 반사되어 빛이 나온 경로를 다시 거슬러 올라가 검출기에 도달하면 검출기에서 흡수된 빛이 산출되어 스펙트럼으로 나타난다. 검출기 온도는 30 °C로 설정하였고 1100~1750 nm의 파장 범위에서 30번 측정하여 이것을 평균하여 한 개의 스펙트럼으로 나타내도록 설정하였다. 스펙트럼은 2 nm 간격으로 정보를 수집하도록 설정하였다. 스펙트럼의 수집과 데이터 분석은 ChemoHN1100 ver 1.7et software (SpectronTech Co., Ltd, Kwangju-city, Korea)를 이용하였다.

#### 2.1.2. Scanning type NIR spectrometer

Scanning type NIR spectrometer는 NIRSystems model 6500 spectrometer (Foss NIRSystems Inc., Silver Spring, MD)를 사용하였다. 이 system은 광원으로 quartz halogen lamp를 사용하였고, silicon과 PbS 검출기를 이용하였다. 1 mm quartz cuvette cell을 이용하여 400~2500 nm 파장 범위에서 스펙트럼을 얻었다. 스펙트럼은 2 nm 간격으로 정보가 수집되었다. 각각의 샘플 스펙트럼은 32번 측정하여 이것을 평균하여 얻었다. 수집된 스펙트럼의 데이터 분석은 WinISI II (Foss NIRSystems/TECATOR, Infrasoft international, LLC.)을 이용하여 이루어졌다.

#### 2.1.3. 시약

메탄올과 에탄올은 99.9% 시약 (anhydrous)을 실험에 사용하였다. 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함

량의 모델 개발 및 평가를 위해서 물의 함량 1~19% (v/v)까지 샘플을 조제하였다. 1~10 %까지는 1% 간격으로 조제하였고, 10% 이후로는 2% 간격으로 조제하여 총 15개의 시료를 준비하였다. 실제 적용을 위해서 6일 동안 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 3%, 5% 및 7% 물의 함량을 가진 세 가지 시료를 측정 전, 새로 조제하여 실험하였다.

### 2.2. NIR 모델 평가

측정한 스펙트럼은 모델을 만들기 위한 calibration set과 만들어진 모델을 평가하기 위한 prediction set으로 소프트웨어상의 선택기능을 이용하여 무작위로 나누었다. Prediction set에는 calibration에 사용되지 않은 스펙트럼을 사용하였다. 각각의 NIR 모델은 calibration set의 오차인 SEC (standard error of calibration), prediction set의 오차인 SEP (standard error of prediction)에 의해 평가된다.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{pred,i} - C_{ref,i})^2}{n - k}}$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{pred,i} - C_{ref,i})^2}{p}}$$

위의 수식에서  $n$ 은 calibration set의 개수,  $k$ 는 PLS factor의 개수,  $p$ 는 predicted set의 개수,  $C_{pred,i}$ 는  $i$ 번째 샘플의 predicted 농도,  $C_{ref,i}$ 는  $i$ 번째 샘플의 reference 농도이다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. NIR Spectra

#### 3.1.1. Portable NIR system

Fig. 1은 물, 메탄올, 에탄올 각각의 스펙트럼이다. 물의 스펙트럼에서 1450 nm 부근의 큰 OH peak를 볼 수 있다. 그리고 메탄올과 에탄올의 1600 nm 부근에 보여지는 broad한 peak도 OH에 의한 것이다. 메탄올과 에탄올의 1700 nm 부근의 peak는 CH<sub>3</sub>의 first overtone에 의한 것이고 에탄올의 1720 nm 부근의 작은 peak는 CH<sub>2</sub>의 first overtone에 의한 특징이다. Fig. 2 (a)는 메탄올, 에탄올, 물의 혼합액 시료를 측정된 스펙트럼이다. 알코

을 중의 물의 함량은 1~19%로 물의 함량이 높아질수록 1450 nm 부근의 peak가 증가함을 볼 수 있다. 이 peak는 Fig. 1에서 본 것과 같이 물의 OH기에 의한 band이다. 그렇기 때문에 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량 변화에 따라 이 파장의 흡수가 변화하는 것이 확실하게 관찰된다. 1580 nm 부근의 peak는 메탄올, 에탄올의 OH기에 의한 것이다. 1200 nm, 1700 nm 그리고 1720 nm의 peak는 CH기에 의해 나타나는 특징이다.

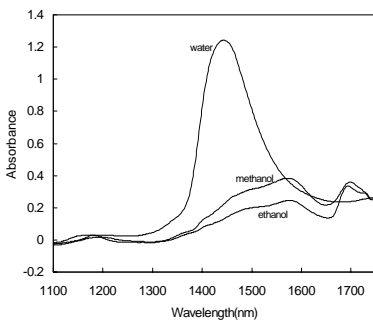


Figure 1. NIR spectra of water, methanol and ethanol by using portable NIR system.

Fig. 1. NIR spectra of water, methanol and ethanol by using portable NIR system.

### 3.1.2. Scanning type spectrometer

Portable NIR system과 비교하여 일반적으로 사용되고 있는 scanning type spectrometer는 400~2500 nm의 넓은 파장영역을 가진다. Fig. 2 (b)는 scanning type spectrometer를 사용하여 측정된 스펙트럼이다. 1450 nm 부근에 나타나는 peak는 O-H stretching의 first overtone에 의해 나타나는 특징이고, 그 이외의 영역에서 나타나는 peak는 C-H에 의해 나타나는 것이다.

## 3.2. 정량모델 작성 및 결과

### 3.2.1. Portable NIR system

총 15개의 시료에 대한 스펙트럼 중에서 9개를 무작위 선택하여 calibration model을 작성하고, calibration model 작성에 사용하지 않은 6개를 model 평가를 위한 prediction data로 사용하였다. 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량에 대한 calibration model을 작성함에 있어 부분최소사승회귀분석법 (Partial Least Squares Regression : PLSR)을 사용하였다. PLS modeling을 수행함에

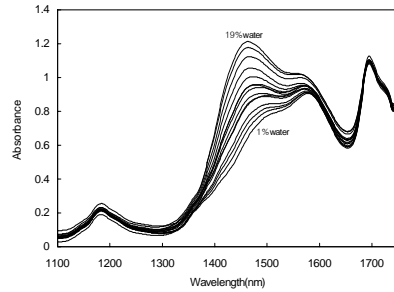


Figure 2. (a) NIR spectra of different concentration of water samples in methanol and ethanol mixtures by using portable NIR system.

Fig. 2. (a) NIR spectra of different concentration of water samples in methanol and ethanol mixtures by using portable NIR system.

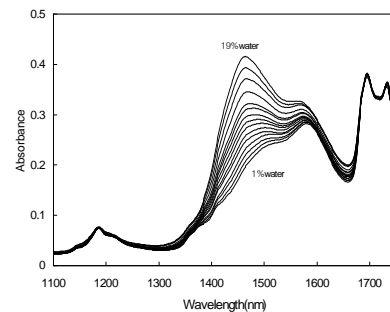


Figure 2. (b) NIR spectra of different concentration of water samples in methanol and ethanol mixtures by using scanning type spectrometer.

Fig. 2. (b) NIR spectra of different concentration of water samples in methanol and ethanol mixtures by using scanning type spectrometer.

있어 baseline shift를 없애고 스펙트럼 정보를 정확히 표현하기 위해 미분법을 사용하였다. Modeling에 사용한 파장영역은 1120~1730 nm이다. 1120~1730 nm의 흡광도 (absorbance) 스펙트럼과 1차 미분, 2차 미분 스펙트럼을 사용하여 PLS model을 작성한 결과를 Table 1에 나타내었다. SEC는 factor가 커짐에 따라 계속 감소하는 반면 SEP는 적당한 factor 이상이 되면 값이 다시 증가한다. 따라서 최적의 PLS factor는 SEP가 최소값을 가지는 factor로 하였다. Fig. 3 (a)는 SEC, SEP와 PLS factor와의 영향을 도식화한 것이다. factor가 증가함에 따라 SEC가 계속 감소하는 반면 SEP는 factor가 6일 때 최소값을 갖고 factor가 7이 되면 값이 다시 증가하기 시작한다. SEP를 기준으로 하여 over-fitting을 피하는 최적

Table 1. Calibration modeling of water in methanol and ethanol mixtures in the 1120~1730 nm wavelength range using the portable and scanning type NIR spectrometer

spectrometer	spectral treatment	no. factor	SEC(%)	SEP(%)
portable type	none	6	0.04	0.10
	first derivative	3	0.11	0.15
	second derivative	2	0.24	0.22
scanning type	none	5	0.03	0.12
	first derivative	5	0.01	0.15
	second derivative	5	0.01	0.14

의 factor를 구할 수 있다. 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량에 대한 PLS modeling을 수행함에 있어 흡광도 스펙트럼을 사용하였을 때 SEC 0.04%, SEP 0.10%의 calibration, prediction 결과를 얻었다. Fig. 4 (a)는 가장 양호한 PLS model을 이용하여 NIR predicted value와 물의 함량사이의 상관관계를 나타내는 그래프이다. Calibration과 prediction data는 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량과 좋은 상관관계를 보여준다 (Table 2 참조). 전반적으로 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량에 대한 calibration은 portable NIR system에 의해 성공적으로 수행되었다.

### 3.2.2. Scanning type spectrometer

Scanning type spectrometer를 이용한 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량에 대한 calibration은 portable NIR system을 이용하여 수행한 방법과 동일하다. Calibration model을 작성함에 있어서 portable NIR system과 결과를 비교하기 위해서 같은 파장영역, 즉 1120~1730 nm를 사용하였다. 이에 따른 결과는 Table 1에서 보여주고 있다. 최적의 PLS factor는 portable NIR system에서 적용한 것과 마찬가지로 최소값을 가지는 SEP를 기준으로 선택하였다 (Fig. 3 (b)). 1120~1730 nm의 흡광도 스펙트럼을 이용하여 calibration model을 작성한 것이 SEC 0.03%, SEP 0.12%로 가장 좋은 결과를 나타내었다. 가장 양호한 PLS model을 사용하여 NIR predicted value와 물의 함량 사이의 상관관계를 나타내는 그래프를 Fig. 4 (b)에 나타내었다. Calibration과 prediction data는 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량과 좋은 상관성을 가지는 것을 볼 수 있다 (Table 2 참조).

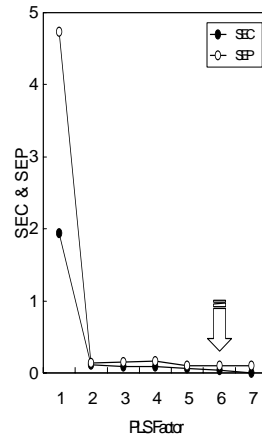


Figure 3 (a) Effect of the number of PLS factors on the SEC and SEP (portable NIR system).

Fig. 3. (a) Effect of the number of PLS factors on the SEC and the SEP (portable NIR system).

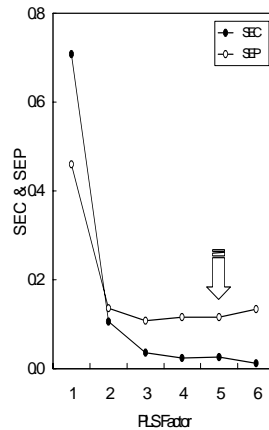


Figure 3 (b) Effect of the number of PLS factors on the SEC and the SEP (scanning type NIR spectrometer).

Fig. 3. (b) Effect of the number of PLS factors on the SEC and the SEP (scanning type NIR spectrometer).

## 3.3. Routine analysis

### 3.3.1. Portable NIR system

위에서 portable NIR system을 이용하여 얻은 스펙트

Table 2. Prediction results for water content in methanol and ethanol mixture using the portable and scanning type NIR spectrometer

sample name	actual value (%)	NIR predicted value(%)	
		portable type	scanning type
calibration	2%	2	2.0
	4%	4	4.0
	6%	6	6.0
	7%	7	7.0
	8%	8	8.0
	13%	13	13.0
	15%	15	15.0
	17%	17	17.0
	19%	19	19.0
validation	1%	1	1.1
	3%	3	3.0
	5%	5	4.8
	9%	9	9.1
	10%	10	9.9
	11%	11	11.1

럼을 통해 작성한 calibration model을 적용하여 6일 동안 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 3%, 5% 및 7% 물의 함량을 가진 시료를 조제하여 측정하였다. 농도의 정확성을 위해 측정 전 새롭게 각각의 시료를 조제하였다. Calibration model을 적용하여 6일간의 일상분석을 실시한 결과를 Table 3에 나타내었다. 각 시료 별 CV가 모두 3% 이하로 좋은 결과를 나타내어 calibration 모델의 안정성을 확인할 수 있었다.

3.3.2. Scanning type spectrometer

본 실험에서 scanning type spectrometer를 이용하여 수집한 스펙트럼을 통해 calibration model을 작성하고 이를 적용하여 6일 동안 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 3%, 5% 및 7% 물의 함량을 가진 시료를 조제하여 측정하였다. Portable NIR system에 적용한 것과 마찬가지로 농도의 정확성을 위하여 측정 전 새롭게 각각의 시료를 조제하였다. 이에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. Portable NIR system에서의 결과와 비교하여 3% 시료는 CV가 0.4% 높게 나타났으며 5% 시료는 CV가 0.6% 낮고, 7% 시료는 동일한 CV를 나타내었다.

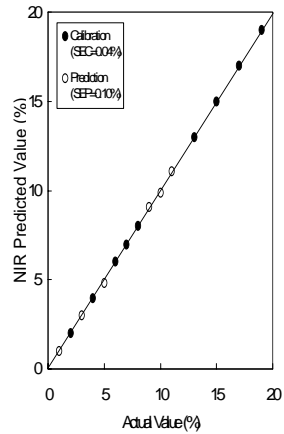


Figure 4 (a) Scatter plot showing the correlation between the NIR predicted value and actual value using the 1120-1730 nm range (portable NIR system).

Fig. 4. (a) Scatter plot showing the correlation between the NIR predicted value and actual value using the 1120~1730 nm range (portable NIR system).

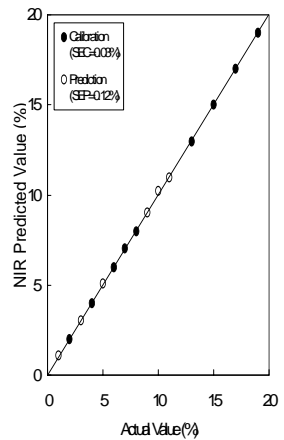


Figure 4 (b) Scatter plot showing the correlation between the NIR predicted value and actual value using the 1120-1730 nm range (scanning type NIR spectrometer).

Fig. 4. (b) Scatter plot showing the correlation between the NIR predicted value and actual value using the 1120~1730 nm range (scanning type NIR spectrometer).



Table 3. Routine analysis results for water content in methanol and ethanol mixtures using portable and scanning type NIR spectrometer over six days period

spectrometer	sample\day	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	SD <sup>1)</sup>	CV <sup>2)</sup> (%)
portable type	3%	3.0	3.1	3.2	3.2	3.2	3.1	0.08	<b>2.6</b>
	5%	5.0	5.0	4.9	5.0	5.1	5.1	0.07	<b>1.4</b>
	7%	6.9	7.1	6.9	6.9	6.9	7.0	0.07	<b>1.0</b>
scanning type	3%	3.2	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0	0.09	<b>3.0</b>
	5%	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	5.0	0.04	<b>0.8</b>
	7%	7.1	6.9	6.9	6.9	7.0	6.9	0.07	<b>1.0</b>

<sup>1)</sup>Standard deviation

<sup>2)</sup>Coefficient of variation

#### 4. 결 론

Portable NIR system을 이용하여 메탄올과 에탄올 혼합액 중의 물의 함량을 측정한 결과, SEC 0.04%, SEP 0.10%로 scanning type spectrometer를 이용하여 얻은 결과인 SEC 0.03%, SEP 0.12%와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 6일간에 걸친 일상분석을 통해서 두 기기 모두 CV 3% 이내의 결과로 calibration model의 안정성을 확인 할 수 있었다.

렌즈, 반사경 등이 움직여서 스펙트럼을 얻으며 table-top형식인 scanning type spectrometer와 렌즈, 반사경 등이 고정된 상태로 한번에 정보를 읽어들이는 diode array 방식의 휴대용 NIR system의 실험 결과가 유사하게 나타났다. 이번 연구를 통해서 휴대용 NIR system을 이용한 신속하고 정확하며, 사용방법이 간단한 정량법에 대한 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 참고 문헌

- European Pharmacopoeia, Near-infrared spectrometry, 3rd ed., 43(1997).
- P. Williams and K. Norris, Eds., "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries", 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, 1990.
- D. A. Burns and E. W. Ciurczak, Eds., "Handbook of Near-Infrared Analysis", Dekker, New York, 1992.
- T. Hirschfeld, *Appl. Spec.*, **39**, 740(1985).
- A. Grant, A. M. C. Davies, and T. Silverstone, *Analyst*, **114**, 819(1989).
- J. Lin and C. W. Brown, *Appl. Spec.*, **47**, 1720(1993).
- H. Maeda, Y. Ozaki, M. Tanaka, N. Hayashi, and T. Kojima, *J. Near Infrared Spec.*, **3**, 191(1999).
- I. Noda, Y. Liu, Y. Ozaki, and M. A. Czarnecki, *J. Phys. Chem.*, **99**, 3068(1995).
- Y. Liu, Y. Ozaki, and I. Noda, *J. Phys. Chem.*, **100**, 7362(1996).
- K. Beebe, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* **59**, 1007A (1987).
- H. Mark, *Anal. Chem.* **58**, 2814(1986).
- P. Gelade, B. R. Kowalski, *Anal. Chem. Acta.* **185**, 1 (1986).
- D. M. Haaland, E. V. Thomas, *Anal. Chem.* **60**, 1202(1988).
- M. A. Sharaf, D. L. Illmam, B. R. Kowalski, "Chemometrics", John Wiley and Sons, New York, 1986.
- M. S. Kamat, R. A. Lodder and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.* **6**(11), 961(1989).
- N. W. Broad, R. D. Jee, A. C. Moffat, M. J. Eaves, W. C. Mann and W. Dziki *Analyst*, **125**, 2054(2000).