

En español

## Estandarización y validación del método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica

Carlos Mario Zuluaga<sup>1</sup>, Amanda Consuelo Díaz<sup>2</sup>,  
Martha Cecilia Quicazán<sup>3</sup>

### RESUMEN

Una de las técnicas más novedosas en el análisis del aroma de alimentos y otras matrices es la nariz electrónica. Este dispositivo funciona como una imitación del sistema olfatorio humano por medio de sensores con sensibilidades solapadas para diferentes grupos de compuestos químicos volátiles que, mediante el uso de estadística multivariada, permite la diferenciación y clasificación de alimentos así como el establecimiento de parámetros de calidad y control de los procesos. Aunque la técnica cada día es más utilizada en la investigación y en la industria, son pocos los trabajos publicados en la literatura científica que hacen referencia a la validación de su uso como metodología analítica. El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar y validar el método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica para la diferenciación de productos apícolas: miel, polen y propóleo. La estandarización se logró modificando las condiciones de preparación de la muestra y las variables del sistema, mientras que la validación se realizó mediante el análisis de la repetibilidad, la repetibilidad intermedia del método y el cálculo de la incertidumbre. Los resultados obtenidos muestran que es posible determinar los parámetros adecuados de operación del instrumento para cada uno de los productos apícolas, mientras que los indicadores de validación mostraron que la técnica no presenta diferencias significativas en su respuesta, obteniéndose valores confiables para el uso de este equipo como una herramienta de análisis y control de calidad.

**Palabras clave:** repetibilidad, repetibilidad intermedia, incertidumbre, perfil aromático, alimentos.

**Recibido:** mayo 10 de 2010

**Aceptado:** julio 17 de 2010

### Introducción

Existe una continua necesidad por el desarrollo de métodos analíticos confiables para el análisis de alimentos que puedan ser evaluados con un procedimiento de validación. El *Diario Oficial de la Comunidad Europea* define validación como: "confirmación mediante examen y puesta a disposición de prue-

In English

## Standardising and validating aromatic profile analysis by an electronic nose

Carlos Mario Zuluaga<sup>1</sup>, Amanda Consuelo Díaz<sup>2</sup>,  
Martha Cecilia Quicazán<sup>3</sup>

### ABSTRACT

The electronic nose is one of the most innovative techniques which had been used in the analysis of food and other aroma matrices. This device imitates the human olfactory system through sensors which are partially specific for different groups of volatile chemicals and differentiating and classifying food (by involving multivariate statistics) and it is also used for establishing quality and control parameters. Although the technique has been increasingly applied in research and industry, few studies have been published in the scientific literature referring to validating its use as an analytical methodology. This work's main objective was to standardise and validate the aromatic profile analysis method for differentiating apiculture products: honey, pollen and propolis. Standardisation involved modifying sample preparation and system variables while validation involved analysis of repeatability and intermediate repeatability of the method and establishing its uncertainty. The results showed that it was possible to set suitable operational parameters for each apicultural product while validation data showed that this technique did not reveal significant differences as reliable values were obtained when using this device as an analysis and quality control tool.

**Keywords:** Repeatability, intermediate repeatability, uncertainty, aromatic profile, food.

**Received:** May 10th 2010

**Accepted:** July 17th 2010

### Introduction

There is an ongoing need for developing reliable analytical methods for food analysis which can be evaluated by validation. The Official Journal of the European Community defines validation as, "Confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specific in-

<sup>1</sup> Ingeniero Químico, Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia. Estudiante de doctorado de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. cmzuluagad@unal.edu.co

<sup>2</sup> Ingeniera de Alimentos, Universidad de la Salle. Doctora en Calidad, Seguridad y Tecnología de Alimentos, Universidad de Zaragoza, España. Profesora Asistente, Universidad Nacional de Colombia. amcdiazmo@unal.edu.co

<sup>3</sup> Ingeniera Química, Universidad Nacional de Colombia. Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. Profesora Asociada, Universidad Nacional de Colombia. mcquicazand@unal.edu.co

<sup>1</sup> Chemical Engineer, Master in Food Science and Technology, Universidad Nacional de Colombia. Ph.D. student of Chemical Engineering, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. cmzuluagad@unal.edu.co

<sup>2</sup> Food Engineering, Universidad de la Salle. Doctor Quality, Safety and Food Technology, Universidad de Zaragoza, Spain. Assistant Professor, Universidad Nacional de Colombia. amcdiazmo@unal.edu.co

<sup>3</sup> Chemical Engineering, Universidad Nacional de Colombia. Master in Food Science and Technology, Universidad de La Habana, Cuba. Associate Professor, Universidad Nacional de Colombia. mcquicazand@unal.edu.co

En español

bas efectivas, de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto" (CCE, 2002); en otras palabras, se refiere al proceso de evaluar el rendimiento de un instrumento o metodología cuyo fin último es proveer evidencia objetiva de que el método tendrá una reproducibilidad aceptable y precisa para ser aplicable (Walton, 2001).

Típicamente, cualquier procedimiento analítico debe considerar la siguiente información como un soporte para su evaluación: una descripción del método que incluya detalles de los parámetros operacionales, tales como la preparación de la muestra, el método de extracción, los estándares de referencia y la preparación de reactivos. De igual manera, las características más relevantes cuando se realiza la validación de una metodología analítica son: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, rango, límites de detección y cuantificación, y robustez, las cuales pueden ser aplicadas parcial o totalmente dependiendo de la naturaleza de la prueba (APVMA, 2004).

El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, desarrolla el proyecto de investigación Selección de indicadores fisicoquímicos mediante aplicación de nariz electrónica para la catalogación de productos apícolas, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, cuyo objetivo consiste en mejorar la competitividad de la cadena apícola por medio del establecimiento de las herramientas tecnológicas y científicas que se requieren para caracterizar sus productos, y en un futuro cercano promover un sello de calidad como lo es la denominación de origen para productos de la colmena diferenciados, considerando el gran potencial que tiene esta cadena productiva en el país.

En la primera etapa de desarrollo de este proyecto se estandarizó y validó la metodología de perfil aromático utilizando nariz electrónica para miel, polen y propóleo, cuyos resultados son presentados en este artículo. Una nariz electrónica está formada por cuatro elementos principales: una técnica de extracción de aroma o sistema de flujo de aire que transporta los compuestos volátiles de las muestras al siguiente paso, un arreglo de sensores químicos que transforman el aroma en señales eléctricas, un sistema de instrumentación y control que mide la señal de los diferentes sensores, y el control y automatización del sistema entero (Mannino *et al.*, 2007). El propósito de combinar un arreglo de sensores es proveer una señal global llamada "huella digital" como una respuesta simple que es un aroma característico de la muestra (López-Feria *et al.*, 2008).

El principio básico de funcionamiento de la nariz electrónica consiste en la inyección del *headspace* (espacio gaseoso ocupado por los compuestos volátiles en el vial) de la muestra colocada en un vial cromatográfico de 20 mL, cuya cantidad no debe exceder en ningún momento más de 1/3 del volumen del vial; la muestra se deja durante un tiempo y temperatura a determinar con el fin de lograr el equilibrio de la concentración de los compuestos volátiles. Una vez inyectado el *headspace* se obtiene un registro adimensional de relación de conductividades ( $G/G_0$ ) en función del tiempo por cada uno de los sensores de la nariz electrónica, dado por el valor reportado por el sensor en su estado natural ( $G_0$ ) y aquel registrado cuando pasa la sustancia gaseosa a través de él ( $G$ ) (ver figura 1), la condición esperada es aquella que permita una estabilidad en la respuesta en el menor tiempo.

In English

tended use have been fulfilled." (CCE, 2002) In other words, it refers to evaluating the performance of an instrument or methodology whose ultimate goal is to provide objective evidence that a particular method will have acceptable and accurate reproducibility to be applicable (Walton, 2001).

The following information should be considered as support for evaluating an analytical procedure: a description of such method including details re operational parameters such as sample preparation, extraction method, reference standards and reagent preparation. The most relevant characteristics when validating an analytical method are specificity, linearity, precision, accuracy, range, detection limits and quantification and robustness which can be partially or fully implemented depending on the nature of the test (APVMA, 2004).

The Universidad Nacional de Colombia's Institute of Food Science and Technology (ICTA) has been running a research project entitled, "Selecting physical-chemical indicators by applying an electronic nose for cataloguing bee products," (funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development). Its objective is to improve apicultural commercial chain competitiveness by developing the scientific and technological tools required for characterising bee products and in the near future to promote quality labels, such as Designation of Origin, for differentiated hive products considering this production chain's great potential in Colombia.

A methodology for obtaining honey, pollen and propolis' aromatic profile by using an electronic nose was standardised and validated during this project's first stage; its results are presented in this article. An electronic nose consists of four main elements, it has a technique for extracting aroma or air-flow system which transports volatile compounds to the next step, an array of chemical sensors which transform aroma into electrical signals, an instrumentation and control system for measuring the signal from different sensors and control and automation for the entire system (Mannino *et al.*, 2007). Combining an array of sensors provides a global signal called a "fingerprint" as a simple response (i.e. a characteristic aroma for a particular sample) (López-Feria *et al.*, 2008).

The basic principle of electronic nose operation consists of injecting the *headspace* (gas space occupied by volatile elements in a vial) with the sample placed in a 20 mL chromatographic vial. Sample amount should not exceed more than 1/3 of vial volume at any time; the sample is then left for an established time and temperature to reach volatile compound concentration equilibrium. A dimensionless conductivity ratio is obtained ( $G/G_0$ ) after injecting the *headspace* recording time for each electronic nose sensor; this data is related to the conductivity value reported by each sensor in its natural state ( $G_0$ ) and the recorded one when the gaseous substance passes through it ( $G$ ) (see Figure 1). The expected condition gives a stable response in the shortest time.

En español

In English

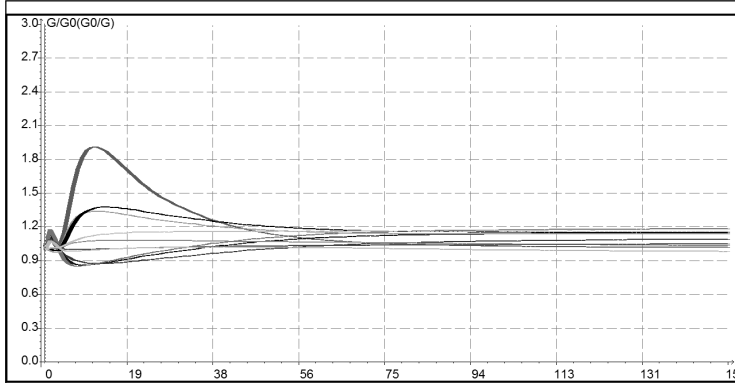


Figura 1. Respuesta típica de los sensores de nariz electrónica.

Figure 1. Typical electronic nose sensor response

A pesar de que en la literatura científica ha sido demostrada la utilidad de la nariz electrónica para clasificar y diferenciar de acuerdo con el origen, en el control de procesos y calidad de productos de la industria agroalimentaria (Aleixandre *et al.*, 2008; Ampuero *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2004; Cosio *et al.*, 2006; Lammertyn *et al.*, 2004), no se encuentran reportes sobre la estandarización y validación de la metodología de análisis del perfil aromático. La estandarización del método consiste en encontrar aquellos parámetros operacionales y de preparación de la muestra que garanticen una respuesta adecuada y reproducible por parte del equipo. Una vez estos parámetros son hallados, la validación permite evaluar si el método planteado es aplicable; considerando la naturaleza de valoración de esta técnica se estableció que las características más relevantes para la validación son las siguientes: la precisión, la repetibilidad y la repetibilidad intermedia, las cuales garantizan que los datos recolectados son confiables y reproducibles.

La precisión es la capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en diferentes mediciones llevadas a cabo en las mismas condiciones. La repetibilidad ( $r$ ) está relacionada al rango de valores en los cuales es posible obtener una respuesta del instrumento, al realizarse varias medidas bajo las mismas condiciones de material, equipo, medio ambiente y operador en un período de tiempo corto; su cálculo se realiza mediante la diferencia entre el resultado mayor y el menor del análisis hecho por cada operador y para cada uno de los sensores de la nariz electrónica (ecuación 1) (INS, 2005).

$$r = \text{resultado máximo del operador} - \text{resultado mínimo del operador} \quad (1)$$

Entre tanto, la repetibilidad intermedia ( $R$ ) está relacionada con el rango de valores en los cuales es posible obtener una respuesta del instrumento en el mismo laboratorio pero empleando diferentes operadores, días, equipos o lotes de reactivos; el cálculo es análogo al de repetibilidad, esta vez estableciendo la diferencia entre el resultado mayor y menor de todos los resultados obtenidos (ecuación 2) (INS, 2005).

$$R = \text{resultado máximo del instrumento} - \text{resultado mínimo del instrumento} \quad (2)$$

## Desarrollo experimental

### Materiales

Se utilizó una nariz electrónica Airsense Analytics GmbH PEN3 (Schwerin, Alemania); este equipo tiene un arreglo de diez sensores de óxido metálico (MOS), como se muestra en la tabla 1. Las muestras de miel, polen y propóleo fueron entregadas por las asociaciones de apicultores vinculadas al proyecto en men-

The usefulness of electronic noses for classifying and differentiating food industry process control and product quality according to geographical origin has been demonstrated in the scientific literature (Aleixandre *et al.*, 2008; Ampuero *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2004; Cosio *et al.*, 2006; Lammertyn *et al.*, 2004); however, no reports were found regarding the methodology's standardisation and validation for analysing an aromatic profile. The method was thus standardised by finding operating and sample preparation parameters for ensuring an appropriate and reproducible device response. Once such parameters had been found, validation led to evaluating whether the proposed method could be applicable; given the nature of assessing this technique, it was established that the most important characteristics for such validation were accuracy, repeatability and intermediate reproducibility, thereby guaranteeing that the data collected would be reliable and reproducible.

Precision is an instrument's ability to give the same result when different measurements are made in the same conditions. Repeatability ( $r$ ) is related to the range of values which may be obtained from an instrument's response when several measurements are made in the same material, equipment, environmental and operator conditions in a short period of time. It is calculated by subtracting the highest and lowest results of each operator's analysis and for each electronic nose sensor (equation 1) (INS, 2005).

$$r = \text{operator's maximum result} - \text{operator's minimum result} \quad (1)$$

Intermediate repeatability ( $R$ ) is related to the range of values obtained by an instrument's response within the same laboratory but using different operators, days, equipment and/or reagent lots. Its calculation is similar to that for repeatability but this time by subtracting the lowest from the highest result for all results obtained (Equation 2) (INS, 2005).

$$R = \text{maximum result of the instrument} - \text{minimum result of the instrument} \quad (2)$$

## Experimental procedure

### Materials

A PEN3 electronic nose (Airsense Analytics GmbH, Germany) was used; this device has a 10 metal oxide sensor (MOS) array (Table 1). Honey, pollen and propolis samples were provided by the beekeepers' associations involved in the aforementioned project.

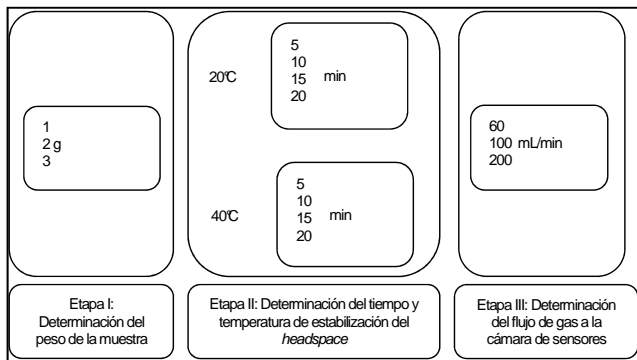
ción.

**Tabla 1. Simbología y grupos de compuestos detectados por cada uno de los sensores de la nariz electrónica**

NO. SENSOR	SÍMBOLO	GRUPO DE COMPUESTOS
1	W1C	Compuestos aromáticos
2	W5S	Amplio rango de compuestos, especialmente nitrogenados
3	W3C	Compuestos aromáticos
4	W6S	Principalmente hidrógeno
5	W5C	Compuestos aromáticos y alifáticos
6	W1S	Hidrocarburos de cadena corta
7	W1W	Compuestos azufrados
8	W2S	Alcoholes
9	W2W	Compuestos azufrados y clorados
10	W3S	Compuestos alifáticos de cadena corta

**Parámetros de estandarización**

Para cada producto apícola se siguió el mismo procedimiento, variando tanto las condiciones propias del producto (peso de muestra) como de operación del equipo (temperatura de acondicionamiento del vial, tiempo de estabilización del *headspace* y flujo de gas en la cámara de sensores), en tres etapas (figura 2). La primera evaluó el factor de peso de muestra con tres niveles (1, 2 y 3 g), la segunda valoró dos factores: tiempo y temperatura de estabilización del *headspace* con cuatro niveles cada uno (5, 10, 15 y 20 min) y la tercera consideró el factor de flujo de gas a la cámara de los sensores con tres niveles (60, 100 y 200 mL/min), y para cada nivel se realizaron tres réplicas; las condiciones más adecuadas se seleccionaron con base en la respuesta más estable y menor variabilidad de los sensores en el tiempo. Una vez obtenido el valor más adecuado en una etapa, se utilizó como parámetro en la siguiente.



**Figura 2. Etapas de estandarización del método de determinación del perfil aromático por nariz electrónica**

Se utilizó como factor de criterio en las etapas de estandarización el valor obtenido del coeficiente de variación (CV), el cual es una medida de dispersión útil para relacionar el promedio ( $\bar{X}$ ) con la desviación estándar (s), de acuerdo con la ecuación 3:

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} * 100\% \tag{3}$$

**Parámetros de validación**

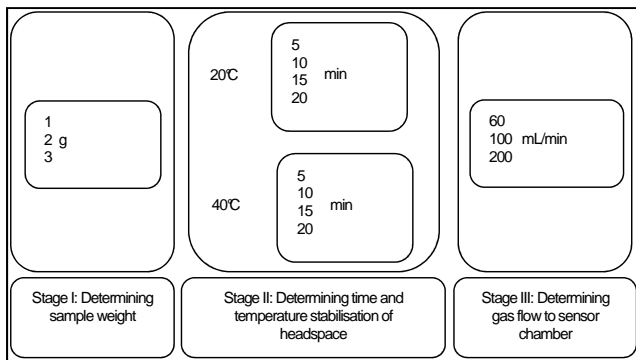
Para la validación de la metodología analítica se evaluó la repetibilidad y la repetibilidad intermedia de cada producto (miel, polen y propóleo), con diversos analistas y en diferentes días; estos parámetros fueron a su vez establecidos para cada uno de los sensores de la nariz electrónica. Se efectuaron cinco réplicas por ensayo; para la evaluación de la repetibilidad intermedia se

**Table 1. Symbols and groups of compounds detected by each electronic nose sensor**

SENSOR NUMBER	SYMBOL	GENERAL DESCRIPTION
1	W1C	Aromatic compounds
2	W5S	Wide range of compounds, especially nitrogen
3	W3C	Aromatic compounds
4	W6S	Mainly hydrogen
5	W5C	Aromatic and aliphatic compounds
6	W1S	Short chain hydrocarbons
7	W1W	Sulphur compounds
8	W2S	Alcohols
9	W2W	Sulphur-chlorine compounds
10	W3S	Short chain aliphatic compounds

**Standardisation parameters**

The same procedure was followed for each hive product, varying both product (sample weight) and equipment operation conditions (vial conditioning temperature, sensor chamber headspace and gas flow stabilisation time) during three stages (Figure 2). The first stage evaluated the sample weight factor with three levels (1, 2 and 3 g), the second assessed two factors (headspace time and stabilisation temperature) having four levels each (5, 10, 15 and 20 min) and the third considered gas flow to the sensor chamber having three levels (60, 100 and 200 mL/min). Three repeats were made for each level. The most appropriate conditions were selected based on the sensors’ most stable response and least variability. Once the best value at each stage had been selected it was used as a parameter in the next one.



**Figure 2. Standardisation stages for electronic nose aromatic profile analysis**

The coefficient of variation (CV) value was used as factor criteria during standardisation stages; this measurement of dispersion is useful for stating the mean ( $\bar{X}$ ) and standard deviation (s), according to equation 3:

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} * 100\% \tag{3}$$

**Validation parameters**

Honey, pollen and propolis values’ repeatability and intermediate repeatability were assessed to validate the analytical methodology with different analysts and on different days. These parameters were established for each electronic nose sensor. Five repeats were made per test. A Student’s t-test was performed for evaluating repeatability to find statistically significant differences

En español

In English

hizo la prueba *t-student* con la finalidad de conocer si las diferencias eran estadísticamente significativas entre analista y días distintos, para un valor de significancia  $\alpha = 0,05$ , utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel®. Se utilizó la ecuación 4 en el cálculo de la incertidumbre debido a la precisión (U) con los datos de desviación estándar (SD) y el número de veces que se analiza la muestra (N) (Maroto *et al.*, 2003; Reutemann y Huber, 2003):

$$U = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (4)$$

## Resultados

### Estandarización

Los resultados obtenidos en la etapa de estandarización para miel, polen y propóleo se muestran en las tablas 2, 3 y 4 respectivamente, de manera resumida, presentando únicamente los valores máximos y mínimos encontrados a partir de las respuestas de los diez sensores de la nariz electrónica. En miel (tabla 2), la variación en el peso de la muestra (etapa I) permitió establecer que a mayor cantidad de muestra, mayor el coeficiente de variación de respuesta en el último segundo de los sensores, también se observó que la estabilidad de respuesta de éstos a lo largo del tiempo era mayor, con un peso de muestra de 3g, por lo que se utilizó dicha cantidad en las etapas posteriores. La variación de la temperatura y tiempo de acondicionamiento del vial permitió establecer que la mejor respuesta era obtenida con un tiempo de 20 min a 40 °C, y que a pesar de no tener las respuestas de los sensores con la menor variabilidad, sí mostraba una respuesta estable en un tiempo de análisis inferior a las demás; esta etapa también permitió establecer que un tiempo de análisis de 150 s es suficiente para garantizar la estabilidad de respuesta. En la última etapa se encontró que la respuesta es afectada por la cantidad de gas que entra a la cámara; por lo tanto, en la espera de resultados confiables, una menor variabilidad es hallada cuando se trabaja con flujos bajos como 60 mL/min.

**Tabla 2.** Rangos de coeficientes de variación obtenidos en la etapa de estandarización para miel con respecto a los valores de conductancia de los sensores de la nariz electrónica

		COEFICIENTES DE VARIACIÓN	
		MÁXIMO (%)	MÍNIMO (%)
ETAPA I	1 g	3,28	0,41
	2 g	2,53	0,10
	3 g	4,52	0,17
ETAPA II	5 min - (1)	6,84	2,02
	10 min - (1)	5,11	0,22
	15 min - (1)	2,82	0,53
	20 min - (1)	10,42	0,26
	5 min - (2)	14,03	0,62
	10 min - (2)	18,20	0,25
	15 min - (2)	20,74	0,52
	20 min - (2)	8,8	0,44
ETAPA III	60 mL/min	10,48	1,30
	200 mL/min	12,73	0,41
	300 mL/min	14,36	0,63

(1): Ensayo a 20 °C, (2): Ensayo a 40 °C

En polen (tabla 3) la etapa I mostró una señal estable de sensores

between different analysts and different days. An  $\alpha = 0.05$  significance value was used. Microsoft Excel was used for statistical analysis. Equation 4 was used for calculating uncertainty due to precision (U) by relating standard deviation data (SD) and the number of times a sample was analysed (N) (Maroto *et al.*, 2003; Reutemann and Huber, 2003):

$$U = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (4)$$

## Results

### Standardisation

Tables 2, 3 and 4 summarise the results for the honey, pollen and propolis standardisation stage, respectively, showing just the maximum and minimum values from 10 electronic nose sensors' responses. Variation in sample weight (stage I) for honey (Table 2) established that the heavier the sample size, the higher the sensors' coefficient of variation response. It was also observed that these sensors' response stability was greater with a 3 g sample weight so that amount was used in the later stages. Headspace temperature and conditioning time variation revealed that the best response was obtained in 20 min at 40°C; a stable response was given in a shorter analysis time than others, even though not having responses from the sensors having the least variability. This stage also established that a 150 s analysis time was sufficient to ensure response stability. It was found that response was affected by the amount of gas entering the chamber in the last stage; therefore, lower variability was found when dealing with flows as low as 60 mL/min and this would lead to expecting reliable results.

**Table 2.** Ranges of coefficients of variation obtained in the standardisation stage for honey regarding electronic nose sensor conductance values

		COEFFICIENTS OF VARIATION	
		MAXIMUM	MINIMUM
STAGE I	1 g	3.28%	0.41%
	2 g	2.53%	0.10%
	3 g	4.52%	0.17%
STAGE II	5 min - (1)	6.84%	2.02%
	10 min - (1)	5.11%	0.22%
	15 min - (1)	2.82%	0.53%
	20 min - (1)	10.42%	0.26%
	5 min - (2)	14.03%	0.62%
	10 min - (2)	18.20%	0.25%
	15 min - (2)	20.74%	0.52%
	20 min - (2)	8.38%	0.44%
STAGE III	60 mL/min	10.48%	1.30%
	200 mL/min	12.73%	0.41%
	300 mL/min	14.36%	0.63%

(1): Test performed at 20°C, (2): test performed at 40°C

Stage I showed a stable sensor signal in pollen (Table 3) with a 2

En español

In English

a lo largo del tiempo con un peso de muestra de 2 g, de manera similar se encontró que la cantidad de muestra afecta considerablemente la repetibilidad en la respuesta. La etapa II permitió deducir que el calentamiento del vial no logra una reducción en el tiempo de análisis de manera considerable, comparada a temperatura ambiente, donde un tiempo de estabilización del *headspace* de 15 min es suficiente para obtener una respuesta adecuada, con poca variabilidad y en un tiempo corto de inyección, de 220 s. A diferencia de lo encontrado en el análisis de la miel, los flujos altos de gas a la cámara de sensores permiten obtener una respuesta más estable; valores superiores a 200 mL/min tienen una variabilidad mínima.

Tabla 3. Rangos de coeficientes de variación obtenidos en la etapa de estandarización para polen con respecto a los valores de conductancia de los sensores de la nariz electrónica

		COEFICIENTES DE VARIACIÓN	
		MÁXIMO (%)	MÍNIMO (%)
ETAPA I	1 g	5,79	1,53
	2 g	5,76	0,27
	3 g	46,37	1,99
ETAPA II	5 min - (1)	4,76	0,28
	10 min - (1)	6,71	1,15
	15 min - (1)	4,05	0,28
	20 min - (1)	15,06	1,08
	5 min - (2)	43,67	0,26
	10 min - (2)	32,05	0,37
	15 min - (2)	22,11	0,13
	20 min - (2)	8,35	0,09
ETAPA III	60 mL/min	15,15	0,55
	200 mL/min	4,31	0,28
	300 mL/min	5,21	0,71

(1): Ensayo a 20 °C, (2): Ensayo a 40 °C

En propóleo (tabla 4), la etapa I fue llevada a cabo con pesos de muestra de 1 y 2 g, ya que debido al tamaño de la matriz, cantidades superiores ocupaban más de 1/3 del tamaño del vial, y adicionalmente era poco factible la reducción del tamaño de la muestra, ya que partículas muy pequeñas causan daños severos a los sensores del equipo; se encontró que 2 g dan respuestas estables con menor variabilidad. La etapa II permitió observar que el calentamiento es innecesario para obtener una respuesta de señal estable, pues se obtuvieron valores de relación de conductividades similares a temperatura ambiente, siendo un tiempo de estabilización del vial de 15 min aquel que ofrecía una respuesta de señal menos variable a lo largo del tiempo; en esta misma etapa fue determinado que un tiempo de análisis equivalente a 180 s es suficiente para lograr una estabilidad total para los diez sensores.

Tabla 4. Rangos de coeficientes de variación obtenidos en la etapa de estandarización para propóleo con respecto a los valores de conductancia de los sensores de la nariz electrónica

		COEFICIENTES DE VARIACIÓN	
		MÁXIMO (%)	MÍNIMO (%)
ETAPA I	1 g	5,78	1,26
	2 g	6,46	0,46
ETAPA II	5 min - (1)	3,52	0,78
	10 min - (1)	3,49	1,03
	15 min - (1)	4,03	0,61
	20 min - (1)	3,65	0,79
	5 min - (2)	5,65	1,93
	10 min - (2)	3,35	0,77
	15 min - (2)	2,00	0,26
	20 min - (2)	5,24	0,47
ETAPA III	60 mL/min	5,50	0,25
	200 mL/min	11,84	0,47
	300 mL/min	24,42	1,74

(1): Ensayo a 20°C, (2): Ensayo a 40°C

g sample weight. It was found that the amount of sample greatly affected response repeatability. Stage II led to concluding that applying higher temperatures to the vial did not significantly reduce analysis time compared to room temperature; 15 min headspace stabilisation time was enough for obtaining a suitable response, with little variability and in a short injection time (220 s). Unlike the findings for honey analysis, high gas flows into the sensor chamber led to obtaining a more stable response; values greater than 200 mL/min had minimal variability.

Table 3. Ranges of coefficients of variation obtained in the standardisation stage for pollen regarding electronic nose sensor conductance values

		COEFFICIENTS OF VARIATION	
		MAXIMUM	MAXIMUM
STAGE I	1 g	5.79%	1.53%
	2 g	5.76%	0.27%
	3 g	46.37%	1.99%
STAGE II	5 min - (1)	4.76%	0.28%
	10 min - (1)	6.71%	1.15%
	15 min - (1)	4.05%	0.28%
	20 min - (1)	15.06%	1.08%
	5 min - (2)	43.67%	0.26%
	10 min - (2)	32.05%	0.37%
	15 min - (2)	22.11%	0.13%
	20 min - (2)	8.35%	0.09%
STAGE III	60 mL/min	15.15%	0.55%
	200 mL/min	4.31%	0.28%
	300 mL/min	5.21%	0.71%

(1): Test performed at 20°C, (2): test performed at 40°C

Stage I for propolis (Table 4) was conducted with 1 and 2 g weight samples due to the product's size; higher weights occupied more than 1/3 of the vial. Sample size could not be easily reduced because very small particles may have caused severe damage to the sensors; it was found that 2 g provided stable responses with less variability. Stage II led to observing that heating was unnecessary for obtaining a stable signal response since conductivity values were similar at room temperature; a 15 min stabilisation time offered a less variable response signal. It was determined during this same stage that a 180 s analysis time was sufficient for achieving total stability for the 10 sensors.

Table 4. Ranges of coefficients of variation obtained during the standardisation stage for propolis regarding electronic nose sensor conductance values

		COEFFICIENTS OF VARIATION	
		MAXIMUM	MAXIMUM
STAGE I	1 g	5.78%	1.26%
	2 g	6.46%	0.46%
STAGE II	5 min - (1)	3.52%	0.78%
	10 min - (1)	3.49%	1.03%
	15 min - (1)	4.03%	0.61%
	20 min - (1)	3.65%	0.79%
	5 min - (2)	5.65%	1.93%
	10 min - (2)	3.35%	0.77%
	15 min - (2)	2.00%	0.26%
	20 min - (2)	5.24%	0.47%
STAGE III	60 mL/min	5.50%	0.25%
	200 mL/min	11.84%	0.47%
	300 mL/min	24.42%	1.74%

(1): Test performed at 20°C, (2): test performed at 40°C

## Validación

Con los parámetros de análisis determinados en la etapa de estandarización para cada producto, se realizó la validación del método. Los resultados obtenidos en el cálculo del coeficiente de variación y repetibilidad son mostrados en la tabla 5 para miel, polen y propóleo respectivamente; se presentan los rangos de valores máximos y mínimos encontrados a partir de los resultados de los diez sensores de la nariz electrónica.

**Tabla 5. Resultados de coeficientes de variación y repetibilidad por analistas y días diferentes para la determinación del perfil aromático en miel, polen y propóleo**

PRODUCTO / PRODUCT	PARÁMETRO / PARAMETER	ANALISTA / ANALYST 1		ANALISTA / ANALYST 2		DÍA / DAY 1		DÍA / DAY 2	
		V/R MÁXIMO / MAXIMUM VALUE	V/R MÍNIMO / MINIMUM VALUE	V/R MÁXIMO / MAXIMUM VALUE	V/R MÍNIMO / MINIMUM VALUE	V/R MÁXIMO / MAXIMUM VALUE	V/R MÍNIMO / MINIMUM VALUE	V/R MÁXIMO / MAXIMUM VALUE	V/R MÍNIMO / MINIMUM VALUE
Miel / Honey	Coefficiente Variación / Coefficient of Variation (%)	31,195	0,317	24,585	0,585	18,844	0,290	19,867	3,222
	Repetibilidad / Repeatability	1,032	0,007	0,977	0,013	0,559	0,007	0,782	0,092
Polen / Pollen	Coefficiente Variación / Coefficient of Variation (%)	5,410	0,228	3,014	0,121	37,972	0,642	30,148	0,832
	Repetibilidad / Repeatability	0,209	0,005	0,237	0,003	1,848	0,016	1,706	0,021
Propóleo / Propolis	Coefficiente Variación / Coefficient of Variation (%)	8,442	0,251	4,888	0,362	16,321	0,481	9,351	0,578
	Repetibilidad / Repeatability	0,6258	0,007	0,135	0,009	0,357	0,009	0,206	0,014

Entre tanto, en la tabla 6 se presentan el rango de valores obtenidos para la repetibilidad intermedia, incertidumbre y estadístico *t* para el análisis de promedios, con un valor crítico de  $\pm 2,7764$ .

**Tabla 6. Resultados de repetibilidad intermedia, incertidumbre y estadístico *t* por analistas diferentes y días diferentes para la determinación del perfil aromático en miel, polen y propóleo**

Producto	Parámetro	Por analistas		Por días	
		Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo
Miel	Repetibilidad intermedia	1,2536	0,0223	1,0517	0,1070
	Incertidumbre (%)	13,5032	0,2043	11,6647	1,2753
	Estadístico <i>t</i>	1,2381	-0,9623	2,6576	-2,7648
Polen	Repetibilidad intermedia	0,2458	0,0056	1,8486	0,0293
	Incertidumbre (%)	2,3874	0,0551	21,5785	0,2747
	Estadístico <i>t</i>	2,0310	-2,1573	2,008	-1,3742
Propóleo	Repetibilidad intermedia	0,6702	0,0227	0,4646	0,0159
	Incertidumbre (%)	7,2775	0,2044	4,4485	0,2047
	Estadístico <i>t</i>	2,7555	-2,7076	2,5574	-2,5617

En términos generales, se observa que la repetibilidad en el análisis de compuestos volátiles por nariz electrónica tiene una reducida variabilidad. Algunos autores reportan valores de referencia para la evaluación de la precisión del método con base en los coeficientes de variación para métodos cromatográficos y volumétricos menores a 2% (Boqué *et al.*, 2008; Reutemann y Huber, 2003), espectrofotométricos menores a 3% (Perel *et al.*, 1978) y microbiológicos inferiores al 5% (Nguz, 2007). En promedio, los resultados obtenidos para el análisis de perfil aromático con nariz electrónica oscilan entre 7 al 10% para miel, 1 al 4% para polen y 2 al 7% para propóleo; esto permite establecer que las muestras líquidas presentan una mayor variabilidad en la respuesta.

Los resultados de la prueba *t* para el análisis de la precisión entre analistas diferentes y días diferentes muestra para todos los casos que no hay diferencias estadísticas entre ellos, permitiendo establecer que el análisis del perfil aromático de productos apícolas mediante el uso de una nariz electrónica ofrece resultados repetibles en cada uno de los sensores. Los valores de incertidumbre

## Validation

Once the analysis parameters from the standardisation stage had been established then they were validated. The results from calculating the coefficient of variation and repeatability are shown in Table 5 for honey, pollen and propolis; maximum and minimum values found from the 10 electronic nose sensors are shown.

**Table 5. Results for coefficients of variation and repeatability for different analysts and different days regarding honey, pollen and propolis aromatic profile analysis**

Table 6 shows the range of intermediate repeatability, uncertainty, and *t*-test values for mean analysis ( $\pm 2.7764$  critical value).

**Table 6. Intermediate repeatability, uncertainty and *t*-test results for different analysts and different days regarding honey, pollen and propolis aromatic profile analysis**

Overall, it appeared that volatile compound analysis repeatability when using an electronic nose had reduced variability. Some authors have reported less than 2% reference values when assessing the accuracy of methods based on volumetric and chromatographic coefficients of variation (Boqué *et al.*, 2008; Reutemann and Huber, 2003), less than 3% for spectrophotometric methods (Perel *et al.*, 1978) and less than 5% for microbiological methods (Nguz, 2007). Aromatic profile analysis using an electronic nose ranged from 7%-10% for honey, 1% to 4% for pollen and 2%-7% for propolis; this meant that liquid samples has a higher variable response.

*t*-test analysis results for accuracy between different analysts and different days revealed no statistical differences for all cases, meaning that bee product aromatic profile analysis results using an electronic nose were repeatable for each sensor. Different analysts' uncertainty values were especially low regarding pollen and propolis; uncertainty for honey exceeded 1% in most cases. Sensor response uncertainty was low in pollen and propolis on

En español

son especialmente bajos para analistas diferentes en polen y propóleo; en miel, la incertidumbre supera el 1% en la mayoría de casos. En días diferentes, la incertidumbre para la respuesta de los sensores en el caso de polen y propóleo vuelve a ser baja, pero en miel los valores superan el 5% en la mayoría de sensores.

Al comparar valores con otros métodos analíticos de alto grado de imprecisión, la metodología es confiable, teniendo en cuenta la especificidad y selectividad de este tipo de análisis en comparación con los métodos cromatográficos capaces de separar compuestos, mientras que esta metodología identifica patrones o "huellas digitales", las cuales son agrupaciones de sustancias con características comunes, detectados por los sensores mediante un cambio en una relación de conductividades; la nariz electrónica no funciona con respuestas lineales, es decir, sus respuestas están supeditadas a una serie de condiciones establecidas en la estandarización que permiten la respuesta más estable posible en el menor tiempo de análisis.

## Conclusiones

La estandarización de la metodología de determinación del perfil aromático en miel, polen y propóleo fue llevada a cabo, encontrándose que las condiciones más adecuadas de operación son:

	Miel	Polen	Propóleo
Tiempo de análisis	150 s	220 s	180 s
Peso de la muestra	3 g	2 g	2 g
Tiempo de estabilización	20 min	15 min	15 min
Temperatura de estabilización	40 °C	20 °C	20 °C
Flujo de gas a la cámara	60 ml/min	200 ml/min	60 ml/min

La validación de las metodologías analíticas permitió establecer que estadísticamente los métodos son precisos y repetibles, mediante el análisis de la medición del perfil aromático en días diferentes y con analistas diferentes; los valores de incertidumbre en la repetibilidad y repetibilidad intermedia para los sensores de la nariz electrónica en miel oscilan entre 1 al 10%, en polen entre 0,5 al 5% y propóleo entre 0,2 al 5%, lo cual permite concluir que la miel es la matriz con la que los sensores ofrecen la respuesta más variable; generalmente las muestras líquidas presentan este comportamiento, mientras que las matrices sólidas tienden a generar una incertidumbre menor. Estos resultados son un paso inicial para futuras aplicaciones de la nariz electrónica en varios campos, especialmente en el de control de calidad; varios laboratorios del mundo actualmente se enfocan en el desarrollo de nuevas tecnologías para la evaluación del comportamiento aromático de sustancias, con el objetivo de encontrar instrumentos que tengan respuestas más precisas, para lo que aún se requiere una mayor investigación.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo prestado para la realización de este trabajo al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; a la Asociación de Apicultores de la Región del Sumapaz; a la Asociación de Apicultores de Boyacá; a la Asociación Apícola Comunera; a la Asociación de Apicultores Conservacionistas de la Sierra

In English

different days but exceeded 5% in most sensors for honey.

Comparing values with other analytical methods having higher uncertainty, the aromatic profile methodology was reliable, given the specificity and selectivity of this type of analysis compared to chromatographic methods capable of separating compounds, while this approach identified patterns or "fingerprints", groups of substances having common characteristics detected by sensors through changes regarding conductivity. An electronic nose does not work with linear responses, i.e. responses are subject to certain conditions set forth in standardisation allowing more stable responses in the shortest possible analysis time.

## Conclusions

A methodology for aromatic profile analysis in honey, pollen and propolis was standardised, the following operating conditions being the most appropriate ones:

	Honey	Pollen	Propolis
Analysis time	150 s	220 s	180 s
Sample weight	3 g	2 g	2 g
Stabilisation time	20 min	15 min	15 min
Stabilisation temperature	40°C	20°C	20°C
Gas flow to the chamber	60 ml/min	200 ml/min	60 ml/min

Validating analytical methodologies established that methods were statistically precise and repeatable by analysing aromatic profile measurement on different days and by different analysts. Uncertainty values for repeatability and intermediate repeatability for electronic nose sensors in honey ranges from 1% to 10%, 0.5% - 5% in pollen and 0.2% - 5% in propolis meaning that it can be concluded that honey was the product where sensors provided the most variable response. Liquid samples usually have such pattern while solid matrices tend to have lower uncertainty. These results represent an initial step for future applications of the electronic nose in several fields, especially in quality control. Different laboratories around the world now focus on developing new technologies for assessing substances' aromatic behaviour to find instruments which are able to provide more precise responses. Further investigation is still required in this field.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support for carrying out this work provided by the Universidad Nacional de Colombia's Institute of Food Science and Technology (ICTA) in Bogotá, the Ministry of Agriculture and Rural Development, the Sumapaz Region Beekeepers' Association, the Boyacá Beekeepers' Association, the Comunera Beekeeping Association, the Association of Beekeepers from Sierra Nevada de Santa Marta, the Colom-



Nevada de Santa Marta; al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores, del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias); y al Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

## Referencias / References

- Aleixandre, M., Lozano, J., Gutiérrez, J., Sayago, I., Fernández, M., Horrillo, M., Portable e-nose to classify different kinds of wine., *Sensors and Actuators, B* 131, 2008, pp. 71 - 76.
- Ampuero, S., Bogdanov, S., Bosset, J., Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose, using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX., *European Journal of Food Research and Technology*, 218, 2004, pp. 198-207.
- APVMA., Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products., Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, Kingston, Australia, 2004.
- Benedetti, S., Mannino, S., Sabatini, A., Marcazzan, G., Electronic nose and neural network use for the classification of honey., *Apidologie* 35, 2004, pp. 397-402.
- Boqué, R., Maroto, A., Vander, Y., Assessment of accuracy in chromatographic analysis., *LCGC Europe* 21, 2008, pp. 15-21.
- CCE., Decisión de la Comisión por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados., *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2002.
- Cosio, M., Ballabio, D., Benedetti, S., Gigliotti, C., Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks., *Analytica Chimica Acta*, 567, 2006, pp. 202-210.
- INS., Selección y validación de métodos de ensayo., Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú, 2005.
- Lammertyn, J., Veraverbeke, E., Irudayaraj, J., Nose technology for the classification of honey based on rapid aromaprofiling., *Sensors and Actuators, B* 1, 2004, pp. 54 - 62.
- López-Feria, S., Cárdenas, S., García-Mesa, J., Valcárcel, M., Simple and rapid instrumental characterization of sensory attributes of virgin olive oil based on the direct coupling headspace-mass spectrometry., *Journal of Chromatography A* 1188, 2008, pp. 308 - 313.
- Mannino, S., Benedetti, S., Buratti, S., Cosio, M., Scampichio, M., Electrochemical sensors for food authentication., *Electrochemical Sensor Analysis*, Elsevier, 2007, pp. 1091-1098.
- Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, X., Cálculo de incertidumbre en medidas químicas: Análisis cromatográfico., *Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Instituto de Estudios Avanzados, Universitat Rovira i Virgili*, 2003, pp. 1-10.
- Nguz, A., Uncertainty associated with microbiological analysis., *Strengthening fishery products health conditions, Belgium*, 2007.
- Panigrahi, S., Balasubramanian, S., Gu, H., Logue, C., Marchello, M., Design and development of a metal oxide based electronic nose for spoilage classification of beef., *Sensors and Actuators, B* 119, 2006, pp. 2 - 14.
- Perel, M., Kiryanov, A., Krivut, A., Increase in accuracy of the spectrophotometric method of analysis as a result of the introduction of an instrumental correction., *Pharmaceutical Chemistry Journal* 12, 1978, pp. 1088-1091.
- Reutemann, G., Huber, H., Validation of titration methods., *Switzerland: Mettler-Toledo*, 2003, pp. 1-28.
- Walton, R., Validation of Laboratory Tests and Methods., *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10, 2001, pp. 59-65.