

# Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

## Kimika Zientzien Fakultatea

### *Kimikako gradua*

#### GRADU AMAIERAKO LANA

Koloratzaileen determinazioa aldagai anitzeko analisiaren bidez.

**Egilea:** Sergio Davila Brun

**Zuzendariak:** Rosa Garcia Arrona eta Ane Bordagaray Eizaguirre

Donostia – San Sebastian, 2017ko Uztaila



# AURKIBIDEA

---

1- Laburpena.....	5
1- Abstract .....	7
2- Sarrera.....	9
2.1- Tartrazina eta Allura gorria koloratzaileak .....	9
2.2- Metodo baten balidazioa .....	15
2.3- Ultramore – ikuskor espektrofotometria.....	17
2.4- Aldagai anitzeko analisisa .....	19
3- Helburuak.....	23
4- Prozedura esperimental.....	25
4.1- Erreaktiboak eta materialak.....	25
4.2- Ekipoak eta softwareak.....	25
4.3- Laginak .....	25
4.4- Koloratzaileen azterketa indibiduala.....	27
4.4.1- Uhin luzeraren aukeraketa .....	27
4.5- Koloratzaile nahasteen analisisa .....	28
4.6- Laginen prestaketa .....	30
5- Emaitzak eta eztabaida.....	33
5.1- pH-aren efektua koloratzaileetan .....	33
5.2- Absorbantzia maximoak definitu eta kontzentrazio tartea aukeratu .....	34
5.3- Koloratzaileen analisi unibariantea .....	35
5.4- Koloratzaile nahasteen analisisa .....	41
5.4.1- MLR modeloa sortu .....	41
5.4.2- Metodoaren balidazioa .....	44

5.5- Lagin errealen aplikazioa.....	50
5.6- Laginen osagai nagusien analisia.....	67
6- Ondorioak.....	69
6- Conclusions.....	71
7- Bibliografia.....	73

# 1 LABURPENA

---

Elikadura-koloratzaileak elikaduraren industrian erabilitako gehigarriak dira, jaki eta edariei kolore eta itxura erakargarria emateko erabiltzen direnak. Baina bere erabilera legez mugatuta dago, batez ere haurren osasunean izan ditzaketen eragin negatiboen ondorioz. Beste askoren artean, Tartrazina (E-102) eta Allura gorria (E-129) oso erabiliak dira kolore horia eta gorria emateko elikagaiei. Konposatu hauek determinatzeko, batez ere banaketa teknikak erabili izan dira, hala nola erresoluzio handiko likido kromatografia (HPLC) eta elektroforesi kapilarra (CE).

Metodo hauen eragozpen nagusia, analisirako behar diren denbora luzeak dira. Beraz, lan honen helburua Tartrazina eta Allura gorriaren determinazioa egiteko metodo azkar baten garapena da, UM-Ikuskor espektrofotometria eta aldagai anitzeko erregresioa (*Multiple Linear Regression, MLR*) erabiliz. 0.9999-ko korrelazio koefizienteak, 2 – 20 mg/L kontzentrazio tartean, eta 0.08 – 0.10 mg/L tarteko LOD baloreak lortu dira bi analitoentzat. Metodoa arrakastatsuki aplikatu da lagin likido errealekin, hala nola, sukaldaritzan erabilitako koloratzaileekin, edari ez-alkoholikoekin eta gozokiekin.



# 1 ABSTRACT

---

Food coloring are additives used in food industry to give desirable colors and appearance to food and drinks. Their use is legally limited, because of their negative effects in health, especially in infants. Among many others, Tartrazine (E-102) and Allura red (E-129) are very used to provide yellow and red color to foodstuff. Quantification of the analytes is usually performed by separation techniques, such as high performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis (EC).

The main disadvantage of these methods is the large times of analysis. Therefore, the objective of this work is the development of a fast method to determinate Tartrazine and Allura red in different matrices using UV-Vis spectrophotometry and Multiple Linear Regression (MLR). Correlation coefficients of 0.9999 in 2 to 20 mg/L concentration range and LODs between 0.08 and 0.10 mg/L were obtained for both analytes. The method has been successfully applied to real liquid samples, such as colorants used in cookery, non-alcoholic drinks and confectionery.





# 2 SARRERA

---

## 2.1 Tartazina eta Allura gorria koloratzaileak

Elikadura-gehigarriak balore nutritiborik ez duten sustantziak dira, baina nahita gehitzen dira jaki eta edarrietan, kantitate oso txikietan, ezaugarri organoleptikoak hobetzeko edota elaborazio eta kontserbazio prozesuak erraztu edo hobetzeko.

Historikoki, orain dela denbora asko erabili izan dira. Paleolitikoan, kearen bidez lortzen zen haragiaren kontserbazio denbora luzatzea <sup>1</sup>. Honetarako, gatza ere erabilia izan zen, baita haragiaren bereizgarriko kolore gorria mantentzeko ere. Antzinako Egipton, landare eta intsektuetatik deribatuko koloreak (azafran eta kotxinila) erabiltzen ziren janariaren itxura hobetzeko. Azukrearen erabilera fruta kontserbatzeko, eta beste adibide gehiago ere aurki daitezke.

Baina ezin dira konparatu gaur egun dauden milaka elikadura-gehigarriekin, jaten ditugun ia elikagai guztietan aurki baitaitezke. Esaterako, Espainian produktu gutxi batzuk daude legez ezin zaiela sustantziarik gehitu: esnea, eztia, jogurt naturalak, ur naturala, barazki eta fruta freskoa, lekaleak, ... Honek esan nahi du ez zaiela gehigarriak ipintzen manufaktura prozesuan, baina gehigarri kontsideratzen diren sustantziak berez izan ditzakete. Baina produktu hauek oso gutxi dira, beraz, beste askok gehigarriak izan ditzakete. Horregatik, XX. mendetik aurrera, Europar Batasunean E zenbakia erabiltzen da, gehigarri guztiak identifikatzeko eta sailkatzeko balio duten kodeak, eta derrigorrezkoa da elikagaien etiketan gehigarriaren izena edo E zenbakia azaltzea.

Elikadura-gehigarrien funtzio nagusiak hauek dira:

- Segurtasuna eta osasungarritasuna bermatzea.
- Produktuaren egonkortasuna handitzea.
- Karbono oxidorik gabeko produktuen eskuragarritasuna ahalbidetzea.
- Elikagaiaren balore nutritiboa mantendu edo aseguratzea.
- Kontsumitzailearen onarpena indartzea.

- Elikagaiaren fabrikazioa, prestakuntza, garraioa edota biltegiatzea erraztea.
- Produktuari homogeneotasuna ematea.

Elikadura-gehigarri mota asko daude, eta bere funtzioen arabera sailkatu eta talde desberdinetan biltzen dira, funtzio berdina dutenei E zenbaki antzekoa emanez,<sup>1</sup>. Taulan ikus daitezkeen bezala.

Horien artean, elikadura koloratzaileak daude, hauek, jaki edo edari batean gehitzen direnean kolorea ematen dioten edozein tindagai edo pigmentuak dira. Kantitate oso txikietan ere kolorea eman ohi dute (ppm gutxi batzuetan), eta hau elikagaiei kolore erakargarriagoak emateko erabiltzen da elikadura-industrian.

**1. Taula.** Elikadura-gehigarri mota desberdinen E zenbakiaren sailkapena.

<b>E zenbakia</b>	<b>Funtzioa</b>
100 – 199	Koloratzaileak
200 – 299	Kontserbatzaileak
300 – 399	Antioxidatzaileak, azidotasanaren erregulatzaileak
400 – 499	Lodigarriak, egonkortzaileak, emulsionatzaileak
500 – 599	Azidotasanaren erregulatzaileak, antiaglomeratzaileak
600 – 699	Zaporea areagotzeko agenteak
700 – 799	Antibiotikoak
900 – 999	Edukoratzaileak, estaldura agenteak
1000 – 1599	Beste batzuk

Koloratzaileak, beste gehigarri motak bezala, bi taldetan bereizten dira; alde batetik konposatu naturalak edo iturri naturaletatik isolatutakoak, eta bestetik, konposatu kimiko sintetikoak<sup>2,3</sup>.

Azken urteetan, elikadura-koloratzaile naturalen erabilera handitu izan da, kontsumitzailearen hobespeneraren ondorioz. Hala ere, naturalak koloretzeko ahalmen txikiagoa dute sintetikoak baino, egonkortasun baxuagoa baitute; argia, tenperatura, pH eta oxigenoarekiko sentikortasun handiagoa dutelako<sup>3</sup>.

Koloratzaile sintetikoen barruan ere hainbat talde desberdinetan banatzen dira, koloratzaile azoikoak, trifenilmetano koloratzaileak, xantano koloratzaileak eta kinolina koloratzaileak <sup>3</sup>. Hauek, lehen aipatutako faktoreen aurrean egonkortasun altuagoa azaltzen dute, eta orokorrean, produkzio kostu baxuagoak izaten dituzte. Hori dela eta, koloratzaile sintetikoak naturalak baino gehiago erabiltzen dira <sup>2</sup>.

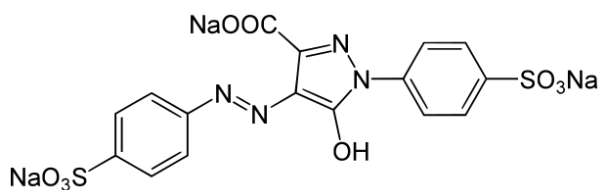
Elikadura-industrian oso erabiliak diren Tartrazina (E-102) eta Allura gorria (E-129) koloratzaile azoikoak dira <sup>3,4</sup>, hau da, talde kromoforo bezala bi nitrogenu atomoen arteko lotura bikoitz bat dute beren egituran (R-N=N-R'), eta R talde moduan ariloak dituzte. Beraz,  $\pi$  lotura deslokalizatuaren ondorioz, koloratzaile azoiko ariloak kolore biziak izaten dituzte, batez ere gorri, laranja eta horiak. 2. Taulan elikadura-koloratzaileen sailkapena ikus daiteke, beren koloreen arabera.

2. Taula. Elikadura koloratzaileen kolore sailkapena.

E zenbakia	Koloreak
100 – 109	Horiak
110 – 119	Laranjak
120 – 129	Gorriak
130 – 139	Urdinak eta moreak
140 – 149	Berdeak
150 – 159	Marroiak eta beltzak
160 – 199	Kolore anitzak

### Tartrazina (E-102)

Tartrazinaren IUPAC izena hurrengoa da: Trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulfonatophenyl)-4-[(E)-(4-sulfonatophenyl)diazenyl]-1H-pyrazole-3-carboxylate, eta bere estruktura molekularra 1. Irudian ikus daiteke.

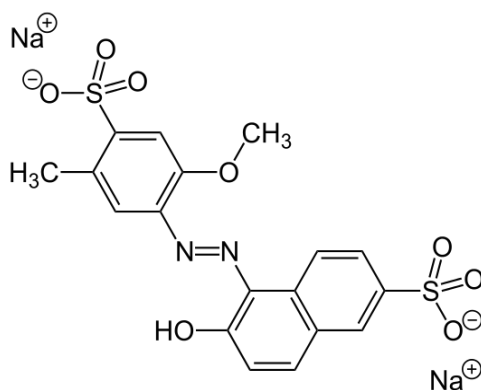


1. Irudia. Tartrazina (E-102) koloratzailearen estruktura molekularra.

Beraz, bere formula molekularra  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  da, 534.36 g/mol-ko pisu molekularrekin. Tartrazina hauts hori-laranja moduan aurkezten da, uretan oso disolbagarria dena, 20 g/100 mL 25°C-tan. Disolbatzean, kolore horia hartzen du, tonalitate argiagoak hartuz ur kopurua handitzen denean. Etanolean, berriz, 0.8 g/100 mL-ko disolbagarritasuna du. Ur disoluzioan 425 nm inguru erakusten du absorbantzia maximoa. Fusio puntua 300°C baino altuagoa da<sup>4</sup>.

### Allura gorria (E-129)

Allura gorria edo Disodium 6-hydroxy-5-[(2-methoxy-5-methyl-4-sulfophenyl)azo]-2-naphthalenesulfonate, eta 2. Irudian azaltzen den estruktura molekularra du:



### 2. Irudia. Allura gorria (E-129) koloratzailearen estruktura molekularra.

Bere formula molekularra  $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$  da eta bere pisu molekularra 496.42 g/mol. Allura gorria hauts gorri ilun moduan aurkezten da, eta oso disolbagarria da uretan ere, 22 g/100 mL 25°C-tan. Partzialki disolbagarria etanoletan. Ur disoluzioaren absorbantzia maximoa 504 nm inguruan aurki daiteke. Fusio puntua 300°C baino altuagoa da kasu honetan ere<sup>3</sup>.

### Toxikologia

Esan bezala, bi koloratzaile hauek oso kolore biziak dituzte, ondorioz, oso erabiliak dira umeentzako goxoki eta zukuetan. Baina beste erabilera asko ere badituzte. Paellak egiteko koloratzaileak Tartrazina izaten dute beren konposizioan. Allura gorria, berriz, jogurt eta haragietan erabiltzen da.

Ikus daitekeen bezala, oso zabalduak dauden elikagaietan erabiltzen dira. Arazoa bigarren mailako eraginekin dator.

Hainbat ikerketen ondorioz frogatua izan da, koloratzaileak, kopuru handietan kontsumitzean, alergiak, urtikariak edota asma sor ditzaketela<sup>3, 4</sup>. Gainera, amina eta amida aromatikoen presentzia frogatu da koloratzaile azoikoen degradazio produktuen egituretan. Hauek urdail-hesteetan absorbatuak izaten dira odolera zeharkatuz, non proteinek elkartzen da, hauen garraio eta metabolismo prozesuetan. Amina aromatikoek minbizia sor dezaketela frogatu da<sup>5, 6, 7</sup>. Azken honek, gizaki eta animalien portaeran eragin dezake, bereziki ume eta gazteetan hiperaktibitatea handituz.

Honen ondorioz, elikadura-koloratzaile azoikoen erabilera oso kontrolatua dago, Tartrazina eta Allura gorria barne. Izan ere, koloratzaile hauek dituzten produktuen etiketan abisu bat dator, umeen arretan eta jardueran eragin negatiboak ekar dezaketela ohartaraziz. Adibidez, 2016ko irailean Dalsy medikamenduarekin eman zen polemika honen ondorio izan zen. Dalsy medikamenduak E-110 koloratzaile azoikoa darama, baina ez zituen bere bigarren mailako efektuak aipatzen erabilera-orrian<sup>8, 9</sup>. Horretaz jabetu zirenean, guraso askok bere seme alabekin Dalsy erabiltzen utzi zuten. Baina, benetan kezagarria al da umeek koloratzaile hauek dituzten elikagaiak hartzea? Zenbat koloratzaile kantitate hartu behar da horretarako?

*Joint FAO/WHO Exoert Comimittee on Food Additives (JECFA)* eta *EU Scientific Committee for Food (SCF)* behin baino gehiagotan ebaluatu dituzte Tartrazina eta Allura gorria, beraien Eguneroko Ahoratze Onargarria zehazteko (*Acceptable Daily Intake, ADI*). Tartrazinaren kasuan, ADI balioa 7.5 mg/kg bw/day zehaztu da; hau da, gorputzeko kilogramo bakoitzeko, 7.5 miligramo Tartrazina hartu daiteke egunero arriskurik gabe. Bestalde, Allura gorriarentzat 7 mg/kg bw/day balioa ezarri da<sup>3</sup>.

### **Baimendutako maila maximoa**

Horregatik, hainbat elikagaietan erabil daitezkeen koloratzaile kantitateak legez mugatuta daude. *European Parliament and Council Directive 94/36/EC*-ren arabera, baimendutako koloratzaile maila maximoa 50-500 mg/kg

tartekoa da, elikagaiaren arabera<sup>4</sup>. 3. Taulan adibide batzuk azaltzen dira Tartrazina eta Allura gorriarentzat<sup>10</sup>.

**3. Taula.** Tartrazina eta Allura gorriaren baimendutako maila maximoak produktu desberdinetan.

<b>Produktuak</b>	<b>Tartrazina</b>	<b>Allura gorria</b>
Arrain eta marisko deribatuak	250 mg/kg	500 mg/kg
Edari alkoholikoak	200 mg/L	200 mg/L
Edari ez alkoholikoak	100 mg/L	100 mg/L
Fruta eta barazki kontserbak	100 mg/kg	200 mg/kg
Gaztak	150 mg/kg	-
Gozokiak	300 mg/kg	300 mg/kg
Haragiak	-	25 mg/kg
Izozki eta esnekiak	150 mg/kg	150 mg/kg
Nutrizio-gehigarri likidoak	100 mg/L	100 mg/L
Nutrizio-gehigarri solidoak	300 mg/kg	300 mg/kg
Opil, pastel eta gailetak	200 mg/kg	200 mg/kg
Postreak	150 mg/kg	150 mg/kg
Salda eta zopak	50 mg/kg	50 mg/kg
Saltsak	500 mg/kg	500 mg/kg
Snak eta fruitu lehorrak	100 mg/kg	100 mg/kg
Txikleak	300 mg/kg	300 mg/kg

Elikadura-koloratzaileak determinatzeko, analisi metodo desberdinak erabili izan dira, hala nola: geruza meheko kromatografia (TLC), voltametria, polarografia, espektrofotometria, ioi kromatografia, elektroforesi kapilarra (CE) eta erresoluzio handiko likido kromatografia (HPLC). Espektrofotometria, voltametria eta polarografia metodo sinple eta azkarrak dira, baina ez dira erabiltzen koloratzaile nahasteak determinatzeko elikagai matrize konplexuetan. Bestalde, HPLC metodoetan, emaitza onak lortzen dira, baina analisi denbora luzeagoak behar dira (20-50 min)<sup>2,11</sup>.

Hala ere, ikerketa lan honetan, matrize desberdinetan koloratzaile nahasteak determinatu izan dira espektrofotometria metodoak erabiliz, aldagai anitzeko analisisian oinarrituz.

## 2.2 Metodo baten balidazioa

Metodo analitiko baten balidazioan, azterketa bidezko konfirmazioa eta froga objektiboak erabiltzen dira aurreikusitako erabilera zehatzen baldintza espezifikoak betetzen direla baieztatzeko.

Beraz, ofizialak ez diren metodoak edota edozein metodo berrientzako, hainbat kalitate parametro neurtu behar dira, tarte onargarri baten barruan sartzen direla konprobatuz, aurreikusitako emaitzak lortzen direla frogatzeko.

Metodo baten balidazioan honako parametroak neurtzen dira: sentsibiltatea, selektibitatea, linealtasuna, tarte lineala eta dinamikoa, zehaztasuna, prezisioa, detekzio muga eta kuantifikazio muga.

**Sentsibiltatea:** Hurbil dauden kontzentrazioak bereizteko ahalmena da, eta kalibrazio zuzenaren maldaren bitartez adierazten da. Beraz, analito kontzentrazio unitatearen aldaketari dagokion seinale aldaketa da.

**Selektibitatea:** Laginean dauden beste konposatuek sortzen dituzten interferentzien eragina adierazten du. Metodo bat selektiboa dela esaten da analitoa ez diren beste konposatuen eragina arbuiagarria denean. Horrela ez bada, interferentziak sortzen dituzten konposatuak banatu edo maskaratu egin behar dira.

**Linealtasuna:** Analitoaren kontzentrazioa eta seinale analitikoaren arteko proportzionaltasuna edo erlazio zuzena adierazten du, eta orokorrean kalibrazio zuzenaren  $R^2$  adierazten du. Beste era batera esanda, kalibrazio kurbak lerro zuzen batekin duen hurbiltasuna da.

**Tarte lineala:** Linealtasuna mantentzen den kontzentrazio tarteari deritzo.

**Tarte dinamikoa:** Kontzentrazio eta seinalearen arteko erlazioa mantentzen den kontzentrazio tarte da.

**Zehaztasuna:** Neurtutako balore bat zenbat hurbiltzen den benetako baliora. Zenbat eta gehiago hurbildu, metodoa zehatzagoa izango da. Hau errore sistematikorik ez daudenean ematen da. Hainbat modu daude zehaztasuna neurtzeko:

1. **Ziurtatutako erreferentziako materiala** erabiltzea (ez dago beti eskura edo garestia izan daiteke).

2. **Erreferentziazko beste metodo batekin** lortutako emaitzekin konparatzea.

3. **Berreskurapen frogak** egitea (*Recovery test*).

Matrize antzeko lagin bati, kontzentrazio ezaguneko analitoa gehitzen zaio, eta gero neurketak egiten dira. Neurtutako kontzentrazioa eta jarritakoaren arteko desberdintasuna kalkulaturaz adierazten da:

$$\% \text{ Berreskuratua} = \frac{\text{Neurtutako kontzentrazioa}}{\text{Jarritako kontzentrazioa}} \times 100 \quad (1)$$

Kontzentrazio desberdinetan egin ohi da, tarte lineal osoa aztertzeko.

Balio egokitzat %90-110 hartu ohi dira analitoaren kontzentrazioa 1 – 100 ppm tartean dagoen bitartean, AOAC International elkarteak dioen arabera <sup>12</sup>.

**Prezisia:** Neurketa errepikatuen arteko dispersioa adierazten du. Prezisia zehazteko disoluzio estandarren determinazio errepikatuak egiten dira. Modu desberdinak daude honetarako ere:

1. **Errepikakortasuna:** Egun berean egindako analisi errepikatuak, baldintza guztiak berdinak izanda.
2. **Erreproduzigarritasuna:** Metodo berdina erabiliz errepikatu analisiak, baina beste baldintzak aldatuz: analista, laborategia, erreaktiboak, instrumentazioa, etab.
3. **Bitarteko doitasuna:** Aurrekoen bitarteko bat da, erreproduzigarritasuna lortzea zaila izan daitekeelako. Beraz, analisiak denbora luzeagoan errepikatzen dira, 2 aste adibidez.

Orokorrean, prezisioaren datuak ehunekotan ematen dira, *Relative Standard Deviation* (RSD), desbideratze estandarra eta bataz bestekoa erabiliz kalkulatu dena:

$$\% \text{ RSD} = \frac{s_x}{\bar{x}} \quad (2)$$

Non  $s_x$  kontzentrazioen desbiazio estandarra da eta  $\bar{x}$  bataz bestekoa.

1 – 100 ppm kontzentrazio tartean, RSD balore onargarri bezala %5-11 tarteko balioak hartzen dira, AOAC International elkartearen arabera <sup>12</sup>.



**Detekzioa muga (Limit of detection, LOD):** Metodo analitiko batek fidagarritasunez detekta dezakeen analito kantitate edo kontzentrazio minimoa.

Askotan oso neketsua izan daiteke, beraz, definizio eta modu ugari daude metodo baten LOD zehazteko. Erabiliena honako hau da:

$$y_{LD} = y_B + 3.3 s_B \quad (3)$$

Non  $y_{LD}$  detekzio mugari dagokion seinalea,  $y_B$  txuriaren seinalea eta  $s_B$  txuriaren desbiazio estandarra diren.

Excel programarekin lanean aritzean, errazago kalkulatu da hurrengo ekuazioarekin, aurrekoaren jatorri bera duena:

$$c_{LD} = 3.3 \cdot \frac{s_{y/x}}{b_1} \quad (4)$$

Non  $c_{LD}$  detekzio mugari dagokion analito kontzentrazioa,  $s_{y/x}$  erregresioaren errore tipikoa eta  $b_1$  erregresioaren malda dira.

**Kuantifikazio muga (Limit of quantification, LOQ):** Metodo analitiko batek fidagarritasunez kuantifikatu dezakeen analito kantitate edo kontzentrazio minimoa. Normalean onartutako balorea hurrengoa da:

$$LOQ = 3 \cdot LOD \quad (5)$$

## 2.3 Ultramore-ikuskor espektrofotometria

Molekula batek fotoi bat absorbatzen duenean, bere maila energetikoa handitzen da. Molekula kitzikatu dela esaten da. Molekulak fotoia emititzen duenean, energia murrizten da. Maila energetiko txikienari oinarrizko egoera deitzen zaio. Uhin luzera desberdineko erradiazioak era desberdinean eragiten dute molekularen kitzikatzea. Argi ikuskorak eta erradiazio ultramoreak molekularen elektroiek energia handiagoko orbitaletara pasatzea eragiten dute.

Molekula batek argia absorbatzen duenean, argi izpiaren irradantzia (edo intentsitatea) murriztu egiten da. Beraz, argi izpiaren intentsitatea desberdina izango da lagina zeharkatu ondoren. Absorbantzia intentsitate diferentzia horrekin honela erlazionatzen da:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (6)$$

Non,  $A$  absorbantzia,  $I_0$  transmititutako intentsitatea eta  $I$  lagina zeharkatu ondoren argiak duen intentsitatea diren. Bi hauek berdinak badira, analito molekulek argirik ez dutela xurgatzen esan nahi du, eta absorbantziaren balorea 0 izango litzateke.

### Beer-Lambert legea

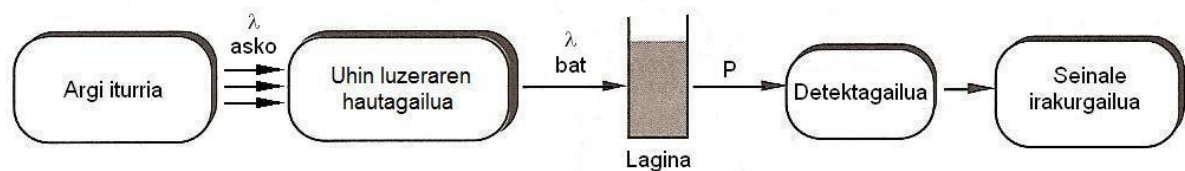
Lege hau, Kimika Analitikoan aplikatzen den bezala, espektrofotometriaren oinarria da, eta argiaren absortzioa, uhin luzera finko batean, eta analitoaren kontzentrazioa erlazionatzen ditu:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (7)$$

$A$  absorbantzia da, unitaterik gabekoa.  $c$  analitoaren kontzentrazioa adierazten du, eta orokorrean mol/L (M) unitatetan adierazten da, baina beste edozein kontzentrazio unitate erabil daiteke.  $l$  argiak zeharkatzen duen distantzia laginean zehar, cm-tan. Azkenik,  $\varepsilon$  konstantea analitoaren absortibitate molarra da, analito bakoitzarekiko espezifikoa dena uhin luzera bakoitzean, eta  $M^{-1}cm^{-1}$  unitatetan adierazi ohi da. Ikusten den bezala, absorbantzia eta kontzentrazioa zuzenki proportzionalak dira, analito molekula kopurua handiagoa izanez gero, absorbantzia ere berdin handituko litzateke.

Ultramore-ikuskor (UV/Vis) espektrofotometria honetan oinarritzen den teknika bat da, analito baten kontzentrazioa determinatzen du, laginak absorbatutako erradiazio elektromagnetikoaren arabera. Absorbatutako argi kopurua, Beer-en legea betetzen bada, kontzentrazioarekiko proportzionalki lineala da.

Honetarako espektrofotometro izeneko ekipoa erabiltzen da, eskematikoki 3. Irudian azaltzen dena. Gailu honetan emititutako erradiazioaren uhin luzera aukera daiteke, lagina zeharkatzen duena. Absortzioaren ondoren, detektorera iritsitako erradiazioaren intentsitatearekin, analitoak xurgatutako erradiazioa zehaztu dezake, eta ondorioz, analitoaren kontzentrazioa determinatu.



### 3. Irudia. Espektrofotometro baten osagaien eskema.

UV/Vis espektrofotometrian, ikuskor eta hurbileko ultramore frekuentzietako erradiazioa erabiltzen da (200 – 800 nm uhin luzera tartea, gutxi gorabehera). Ultramorean sustantzia askok absorbatzen dutenez, orokorrean argi ikuskorraren eremua da erabilgarriena <sup>13</sup>.

## 2.4 Aldagai anitzeko analisisa

Aldagai anitzak dituzten lagin multzo handiak erabiltzen direnean, hauek guztiak aztertzea lan neketsua izaten da, baina badaude teknika estatistiko batzuk lan hau errazten dutenak.

### Aldagai anitzeko erregresioa

Lagin bakoitza hainbat aldagairen funtzioan dagoenean, maiz erabiltzen den erregresio linealak ez du balio. Kasu horietan, absorbantzia espektro osoen kasuan bezala, aldagai anitzeko erregresio lineala (*Multiple Linear Regression* ingelesez, oraindik aurrera MLR siglekin adieraziko dena) erabiltzen da, emaitza aldagai bakarra lortuz,  $y$ ; aldagai iragarleren funtzioan,  $x_1, x_2, x_3$ , etab. Adibidez,  $y$  nahaste baten absorbantzia balorea izango da, non  $x_1, x_2, x_3, \dots$  osagaien kontzentrazioak diren. Beraz, erregresio linealaren ekuazioa, aldagai anitzeko erregresioari aplika daiteke <sup>14</sup>:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots$$

Behin kalibratua eginda, lagin guztien aldagaiak modeloak lortutako koefizienteekin biderkatuak izango dira,  $b_1, b_2, b_3, \dots$ . Hauek eta jatorrizko ordenatua batuz,  $b_0$ , modeloak kalkulaturako emaitza aldagaia lortzen da <sup>15, 16</sup>.

Lan honetan, alderantzizko erregresioa erabiltzen da, beraz, kontzentrazioa absortzioaren funtzioan adierazten da. Hau da, emaitza aldagaia analitoaren kontzentrazioa da, eta aldagai iragarleak, analitoaren absorbantziak uhin luzera desberdinak dira.

MLR aplikatua izan da maiz, erabilera desberdinetan, kalibrazio modeloak lortzeko, erregresio linealaren ordezeko metodotzat. Emaitza onak lortu izan dira metodo hau emaitzak aurreratzeko erredutzat erabili denean nahaste askoren aldibereko analisisian, erabilera farmazeutikoetan <sup>17</sup>.

### Osagai nagusien analisisa

Aldagai anitzeko analisiaren (*Principal Component Analysis*, PCA aurrerantzean) arazo handiena datuen kopuru gordina da, hauen arteko erlazioen eta patroien azterketa (*pattern recognition*) zailduz. Lan honetan ikusiko den bezala, absorbantzia espektroak, orokorrean ehunka intentsitate neurketak izaten dituzte. Beraz, aldagai anitzeko analisiaren metodo askoren helburuetako bat datuen murrizketa izan ohi da. Askotan ematen da korrelazioen bat aldagaien artean, informazio errepikatua emanez. PCA datu kopurua murrizteko teknika da, korrelazioa azaltzen denean. Argi dago ez dela teknika erabilgarria aldagaien artean korrelaziorik ez dagoenean <sup>14</sup>.

PCA-ren helburua osagai nagusiak bilatzea da, lagin bakoitza deskribatzen duten jatorrizko aldagaien konbinazio linealak eginez. Beraz:

$$\begin{aligned} Z_1 &= a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + a_{13}x_3 + \dots + a_{1n}x_n \\ Z_2 &= a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + a_{23}x_3 + \dots + a_{2n}x_n \\ &\text{etab.} \end{aligned}$$

Non  $Z_1, Z_2, \dots, Z_n$  osagai nagusiak (PC) dira;  $X_1, X_2, \dots, X_n$  jatorrizko aldagaien balioak; eta  $a_{11}, a_{12}, \dots$  etab. PCA-k ezarritako koefizienteak dira, aukeraturako aldagai berriak beraien artean korrelaziorik ez izateko.

Osagai nagusiak aukeratzean, lehenengo osagai nagusia (PC1) datuen bariantza handiena jasotzeko moduan egiten da. Bigarrenak (PC2), lehenengoak azaldu gabe utzitako bariantza handiena jasotzen du, eta horrela hurrenez hurren. Baina PC-ak beraien artean ortogonalak izango dira beti, eta denak jatorritik pasako dira. Horrela, jatorrizko aldagaien artean korrelazio nabarmena dagoenean, beharrezkoa izango den PC kopurua aldagai kopurua baino askoz txikiagoa izango da.

Baina prozesu hau nola ematen da? Demagun  $m$  lagin ditugula, bakoitza neurtutako  $n$  aldagaiekin. Kasu honetan,  $m$  lerro eta  $n$  zutabe izango dituen datu matrize bat osatzen da. PCA algoritmoak honako pausu hauek jarraituko ditu:

1. Datuak  $n$  dimentsiotako espazio batean irudikatu. Irudikapen horretan, ardatz bakoitza aldagai bateri dagokio.
2. Lagin bakoitza,  $m$ , dagokion lekuan ipintzen dira espazio horretan. Lagin kopuru bezain puntu egonez.
3. Aldagai berriak, edo, osagai nagusiak bilatzen ditu.  
Datuen bariantza maximoko norabideari PC1 deituko dio.  
Halaber, bigarren bariantza maximoko norabideari, PC2.
4. Koordenatu ardatza aldatu, jatorrizko aldagaien espaziotik, osagai nagusien espaziora.

Garrantzitsua da ere laginak eta aldagaiak erlazionatzen jakitea datuak aztertzerako momentuan. Behin PCA bat eginda, programak *Scores* eta *Loadings* izeneko datuak emango dizkigu.

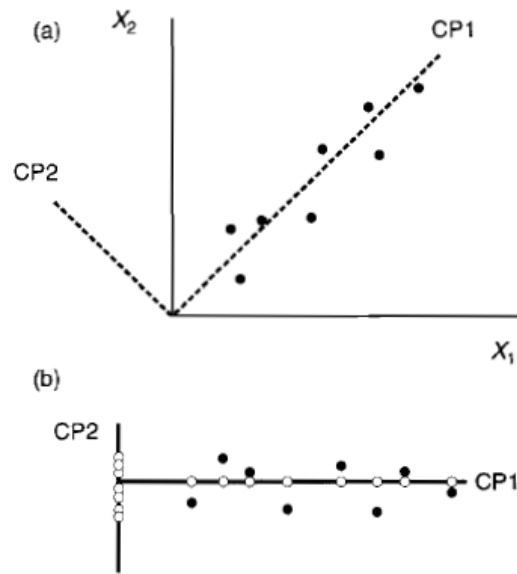
*Scores* = Laginen koordenatuak ardatz berrietan.

*Loadings* = Jatorrizko aldagaien ardatz zaharrak eta PC ardatz berrien arteko erlazioa.

Adibide bezala, 4. Irudian, metodoa aplikatzen da soilik bi aldagai daudenean, beraz, bi PC ere egongo dira. 4a Irudian PC-ak marra ez-jarraituekin adierazten dira, beraien artean perpendikularrak izanez, eta jatorrizko aldagaien ardatzekin gainezartzen dira. 4b Irudian ardatz berri hauek soilik ikusten dira, eta bertan proiektatutako datuak. Nabarmendu daiteke kasu honetan PC1-ekin soilik lan egin daitekeela, bi dimentsiotan egin beharreen <sup>14</sup>.

Hiru dimentsio baino gehiagotan ezinezkoa da grafikoki irudikatzea, baina ordenagailuak antzeko prozesua egiten du. Kasu askotan, PC1 eta PC2-k jasotzen dute datuen bariantza gehiena, datuak 2 dimentsiotan irudikatzeko modukoak izanez, jatorrizko  $n$  dimentsiotan ordez.

PCA bat egin baino lehen, jatorrizko datuak edo estandarizatuak erabiliko diren erabaki behar da. Aldagaiak ez badira estandarizatzen eta batek oso bariantza handia badu, aldagai honek PC1 kontrolatuko du. Estandarizazioak hau saihesten du, aldagai guztiak pisu berdina izan dezaten <sup>15, 16, 18</sup>.



**4. Irudia.** (a) PC1 eta PC2 irudikatzen dituen grafikoa,  $X_1$  eta  $X_2$  aldagaiarentzat.  
 (b) Datuen balioak PC1 eta PC2-n proiektatuak.

Behin bi talde edo gehiago identifikatzen direnean PCA erabiliaz, hauen arteko desberdintasunak azaltzea erraztu egiten da, kontzentrazioarekiko, konposizioarekiko, ...

PCA-ren dimentsioen murrizketaren erabilera nagusiak <sup>19</sup>:

- Aldagai anitzeko datuen irudikapen grafikoa dispersio grafikoetan,
- Korrelazioa duten aldagaien kopurua murriztea korrelaziorik ez duten aldagaietan,
- Garrantzizko informazioa eta zarata banatzea,
- Prozesu kimiko-teknologiko bat karakterizatzen duten zenbait aldagaien konbinazioa, aldagai adierazgarri bakar bat edo gutxi batzuetan.

## 3 HELBURUAK

---

Lan honetan, metodo espektrofotometrikoen erabilera proposatzen da sustantzia batzuen kontzentrazioa determinatzeko. Sustantzia horiek Tartrazina eta Allura gorria dira, bi elikadura-koloratzaile azoikoak, bere erabilera oso polemikoa izan dena osasun arazoak sor ditzaketelako, batez ere haurretan.

Horretarako, espektrofotometrotik lortutako datuak aldagai anitzeko erregresioa (MLR) erabiliz landuko dira, Microsoft Office Excel programa informatikoarekin, lortutako absorbantzia datuak, kontzentrazio datuak bihurtzeko.

Proposatutako metodo honen balidazioa egingo da ere, hainbat kalitate parametro neurtuz, hala nola, linealtasuna, errepikakortasuna, erreproduzigarritasuna, zehaztasuna, LOD eta LOQ.

Azkenik, garatutako metodoa lagin errealekin frogatuko da; hala nola, sukaldaritzan erabilitako koloratzaileekin, edari ez-alkoholikoekin eta gozokiekin.





# 4 PROZEDURA ESPERIMENTALA

---

## 4.1 Erreaktiboak eta materialak

Ikerketa hau egiteko Roha Epsa, S.L. enpresako Tartrazina eta Allura gorria koloratzaile sintetikoak erabili izan dira. Hauen disoluzioak egiteko, beti ur birdistilatua erabili da.

pH-aren aldakuntzak egiteko, Scharlau enpresak administratutako amoniakoa eta Panreac administratutako azido klorhidrikoa erabili izan dira. Azkenik, laginak iragazteko, poro tamaina 0.45 µm-ko zelulosa azetato iragazkiak erabili ziren, Filter-Lab markakoak.

## 4.2 Ekipoak eta softwareak

Erabilitako espektrofotometroa Agilent 8453 modeloa izan da. Bertan lortutako absorbantzia datuak Microsoft Office Excel programa informatikoarekin tratatu izan dira, MLR modeloa eraikitzeke. Baita ere The Unscrambler programa informatikoa ereabilia izan da PCA egiteko.

## 4.3 Laginak

Lagin bezala, hainbat produktu komertzial erabili ziren; elikadura-koloratzaileak, gozokiak eta edariak. Zehazki, hurrengo hauek erabili ziren, 5. Irudian ikus daitezkeenak:

- Elikadura-koloratzaile solidoen disoluzioak; Ducros, Kania eta Hacendado marka komertzialetakoak.
- Vahiné markako elikadura-koloratzaile likidoak.
- Zapore desberdin guztietako kantinplorak, Zumrok markakoak.
- Kojak markako kantinplora.
- Rives markako edari freskagarri ez alkoholikoa.
- Mayerling markako alkoholik gabeko melokotoi likorea.
- Kelia markako flash-ak.
- Auchan markako edulkoratzaile likidoa.



5. Irudia. (a) Ducros koloratzaile solidoa, (b) Vahiné koloratzaile likidoak, (c) Zumrok kantinplorak, (d) Kojak kantinplora, (e) Rives freskagarria, (f) Mayerling melokotoi likorea, (g) Kelia markako flashak.

Irudian ikus daitekeen bezala, denak likidoak dira, 5a argazkian azaltzen dena izan ezik. Baina azken hau oso erraz disolbatzen da uretan. Beraz, 5f eta 5h argazkietako laginak izan ezik, beste guztiak berez koloratzaileak daramate.

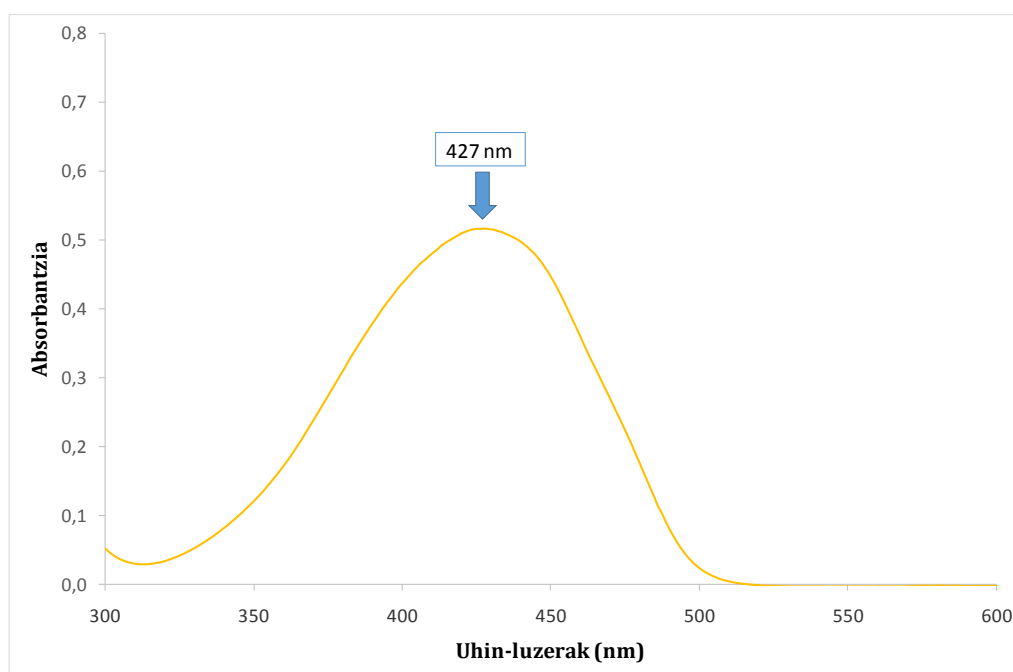
## 4.4 Koloratzaileen azterketa indibiduala

Lehenik eta behin, koloratzaile bakoitzeko 0.1 g/L kontzentrazioko stock disoluzioak prestatu ziren, 0.1012 g Tartrazina eta 0.1008 g Allura gorri hartuz eta ur birdistilatu litro batean disolbatuz, bakoitza bere aldetik. Aurreratzean aipatutako disoluzio guztiak, bi stock disoluzio hauetatik lortutakoak izango dira.

### 4.4.1 Uhin luzeraren aukeraketa

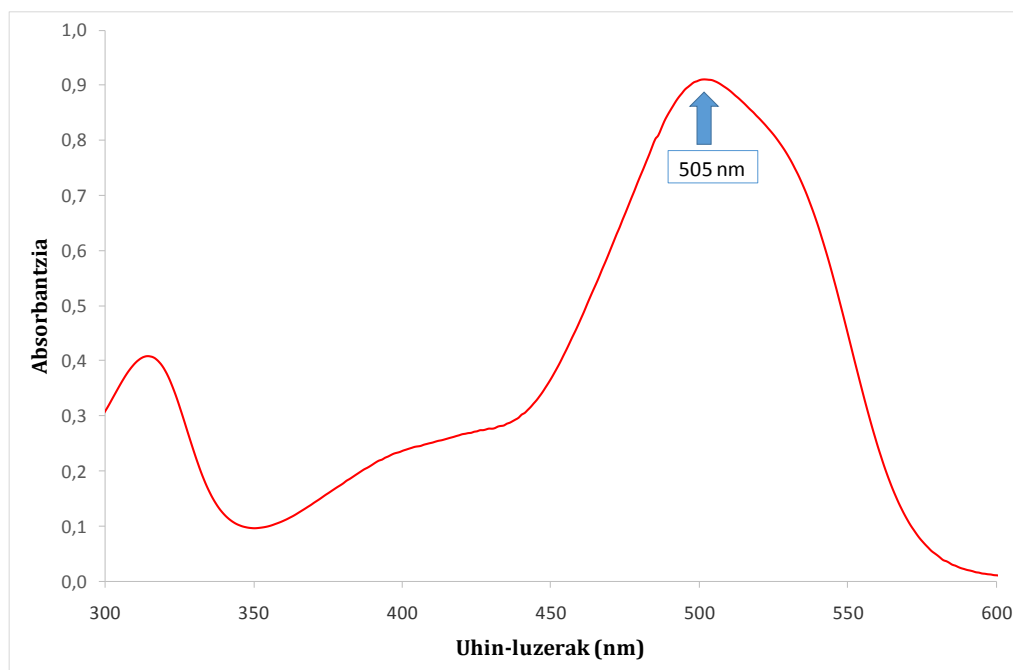
#### Tartrazina

Tartrazinaren absorbantzia maximoko uhin-luzera zein den zehazteko, stock disoluziotik, gero eta diluituagoak zeuden disoluzioak prestatu ziren, hauen absorbantzia neurtuz, espektrofotometroaren seinalea asetzen ez zen arte. Aztertzeko uhin luzera tarte egokien bezala 300 – 600 nm tartea aukeratu zen. Azkenean, 6. Irudiko absorbantzia espektroa lortu, eta Tartrazinaren uhin-luzera optimo bezala 427 nm zehaztu zen.



## Allura gorria

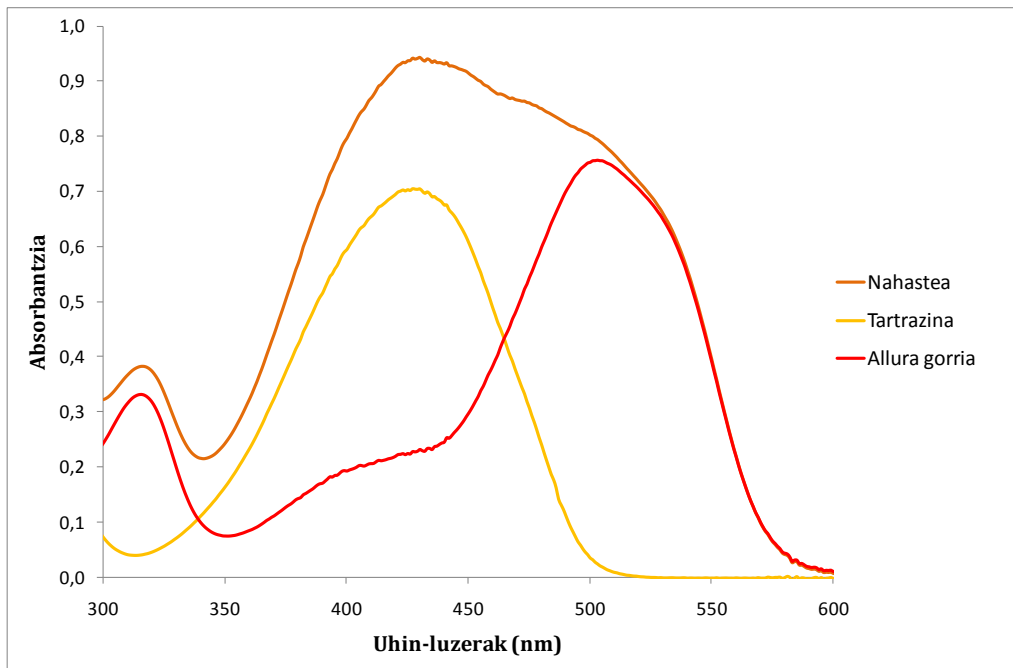
Allura gorriaren uhin-luzera optimoa aukeratzeko, berriz ere stock disoluzioaren diluzioak egin ziren, espektrofotometroaren seinalea asetzea saihesteko, eta 7. Irudiko absorbantzia espektroa lortu zen. Kasu honetan, absorbantzia maximoko uhin-luzera 505 nm izan zen.



7. Irudia. Allura gorriaren absorbantzia espektroa.

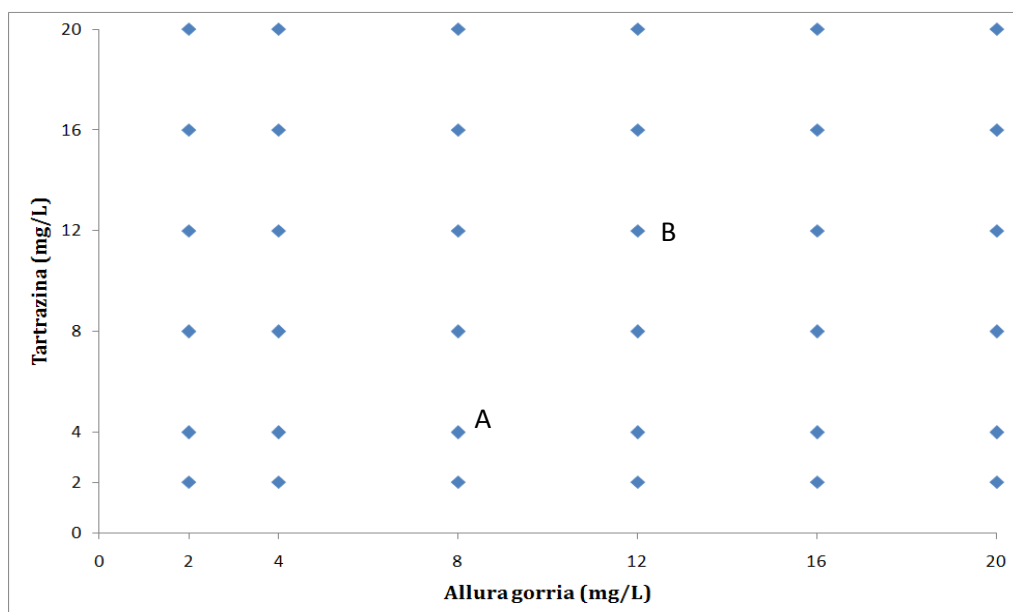
## 4.5 Koloratzaile nahasteen analisia

Lagin errealak bi koloratzaileen nahasteak izan ditzaketenez, Tartrazina eta Allura gorria nahasteen nolako elkarreragina duten aztertu zen. Horretarako, bi koloratzaile hauek nahasi ziren, bien kontzentrazioa berdina zuen disoluzio batean. Beraz, Tartrazina 16 mg/L disoluzio bat, Allura gorri 16 mg/L beste disoluzio bat eta bien 16 mg/L disoluzio bat prestatu ziren. Hauen espektroak 8. Irudian ikus daitezke, non oso ondo ikusten da nola bi koloratzaileen absorbantzia batu egiten den nahasteen daudenean



**8. Irudia. Tartrazina eta Allura gorria nahastearen absorbantzia espektroa.**

Horren ondoren, bi dimentsiotako matrize bat prestatu zen bi koloratzaileen kontzentrazio desberdinetako disoluzioekin, 9. Irudian ikusten den bezalakoa. 6 x 6 matrizea denez, 41 disoluzio prestatu ziren, 36 puntuak eta erpin guztiak eta erdiko bat errepikatuak.



**9. Irudia. Patroi disoluzioen matrizea.**

Y ardatzean Tartrazina kontzentrazioa irudikatzen da, eta X ardatzean Allura gorriarena. Beraz, adibide bezala, A puntuko disoluzioak, 4 mg/L Tartrazina eta 8 mg/L Allura gorri ditu. B puntukoak, berriz, 12mg/L Tartrazina eta Allura gorri ditu, eta horrela gainontzeko guztiak.

Behin patroi guztiak prestatu eta neurtuta, MLR modeloa sortu zen Excel programarekin.

## 4.6 Laginen prestaketa

Laborategian bertan prestatutako disoluzioak ez dituzte beste koloratzaile edo matrizearen interferentziarik aurkezten. Beraz, metodoa frogatzeko interferentziadun matrizeetan, aurreko atalean aipatutako produktu komertzialak erabili ziren.

Sukaldaritzan erabiltzen diren elikadura-koloratzaile solidoak, lehendabizi uretan disolbatu behar izan ziren, bakoitza bere aldetik, 0.01 mg/L-ko kontzentrazio disoluzioak lortuz. Hauen 1 mL-ko alikuotak hartu ziren, bakoitzari Tartrazina eta Allura gorri kontzentrazio ezaguneko gehikuntzak egin zitzaien eta 10 mL arte diluitu ziren. Bi adizio maila egin ziren koloratzaile bakoitzarekin, eta nahaste bakoitza 3 aldiz errepikatu ziren.

Gozogintzan erabiltzen diren koloratzaile likidoen kasuan, zuzenean 50 µL-ko alikuotak hartu ziren, Tartrazina eta Allura gorri gehikuntzak egin eta 50 mL arte diluitu ziren. Gehikuntzak ere bi maila desberdinetan egin ziren eta disoluzio bakoitza 3 aldiz prestatu eta neurtu ziren.

Zumrok kantinploren kasuan, 3 mL-ko alikuotak hartu ziren, Tartrazina eta Allura gorri bi adizio maila gehitu zitzaien, pHa neutralizatu zitzaien amoniako tanta batzuk gehituz, 10 mL-ra eraman ziren ur birdistilatuz eta espektrofotometroan absorbantziak neurtu ziren. Kantinplora beltza eta gorriaren kasuan, kalibratuaren gainetik azaltzen zirenez, kontzentrazioa

murriztu behar izan zen. Bi kasu horietan, alikuota txikiagoak hartu behar izan ziren, 1 mL-koak, eta besteen prozedura berdina jarraitu zuten.

Kojak markako kantinplorarekin, Zumrok kantinplora gorriarekin gertatutakoa saihesteko, zuzenean 1 mL-ko alikuota hartu zen, eta besteekin bezala, Tartrazina eta Allura gorri bi gehikuntza maila egin ziren, pHa neutralizatu amoniako tanta batzuekin, 10 mL-ra diluitu, eta absorbantzia neurtu zitzaion. Disoluzio hauek ere hiru aldiz prestatu ziren.

Rives freskagarriarekin era desberdinean egin zen, lehendabizi kontzentrazio ezaguneko Tartrazina eta Allura gorri adizioak elkartu ziren, eta 10 mL arte freskagarriarekin bete ziren matrizeak, pH neutroa lortzeko beharrezkoa zen amoniakoa gehituz. Hala ere, bi maila desberdineko adizioak egin ziren eta bakoitza 3 aldiz errepikatu zen, besteen kasuan bezala.

Flash-aren kasuan, aurrekoekin bezala egin zen, kalibratuaren goiko aldetik ez ateratzeko, 1 mL-ko alikuota hartu zen, bi koloratzaileen adizioak egin ziren, pH neutralizatu amoniako tanta batzuk erabiliz eta 10 mL arte diluitu zen ur birdistilatua erabiliz. 3 aldiz errepikatu eta denak neurtu egin ziren.

Azkenik, melokotoi likorea eta edulkoratzaille likidoarekin prozedura berdina jarraitu zen, biak gardenak baitira. Freskagarriaren kasuan bezala, lehendabizi Tartrazina eta Allura gorri adizioak matrizean elkartu ziren, ondoren 10 mL arte laginarekin betetzeko. Beti bezala, pH neutroa ezarri zitzaien amoniakoa erabiliz, bi maila desberdineko adizioak egin ziren koloratzaile bakoitzarekin eta disoluzio bakoitza 3 aldiz errepikatu zen.

Lagin guztien disoluzioak espektrofotometroan neurtu baino lehen, 0.45  $\mu\text{m}$ -ko zelulosa azetato iragazkien bitartez iragazi ziren. Hasieran nylon iragazkiak erabili ziren, baina disoluzioak kolorea galdu egiten zuten iragazte prozesuan. Gainera, galdutako kolore kopurua ez zen konstantea iragazte

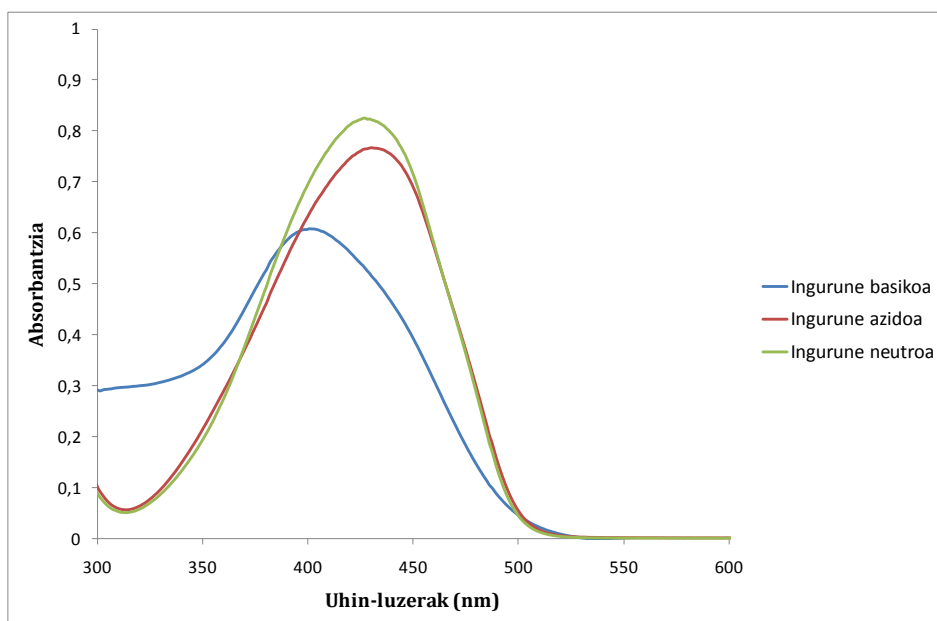
prozesu batetik bestera, nahiz eta kontzentrazio berdineko laginak erabili. Ondorioz, iragazkiak aldatu egin ziren, zelulosa azetato iragazkien ordezt. Hauek behin eta berriro erabiltzean, kolore pixka bat hartzen zuten, baina disoluzioak ez zuten kolorerik galtzen, eta absorbantzia neurtzerakoan ez zen desberdintasun adierazgarririk nabaritzen. Beraz, efektu hau baztergarria zela onartu zen.



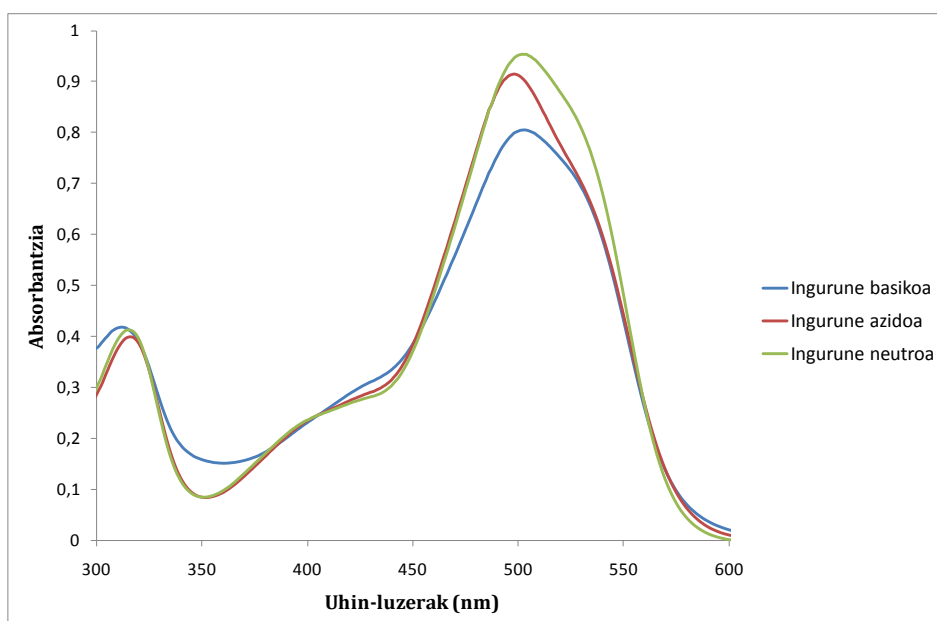
# 5 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

## 5.1 pH-aren efektua koloratzaileetan

Aurretik esan den bezala, laginekin lan egiterakoan, pH-a neutralizatu behar da, kalibratua egiteko edo MLR modeloa sortzeko erabili diren patrioiak neutroak zirelako. 10. eta 11. Irudietan azaltzen da pH aldaketak duen eragina Tartrazina eta Allura gorriaren absorbantzia espektroetan.



10. Irudia. Tartrazinaren absorbantzia espektroa pH desberdinetan.



11. Irudia. Allura gorriaren absorbantzia espektroa pH desberdinetan.

Orokorrean, ingurune basikoak du eragin nabariena, espektroen itxura ere aldatzen baitu, baina ingurune azidoak absorbantzia maximoan ere eragiten du, balore hau murriztuz.

Beraz, hemendik aurrera landutako datu guztiak, pH neutroa zuten disoluzioetatik lortutakoak izango dira.

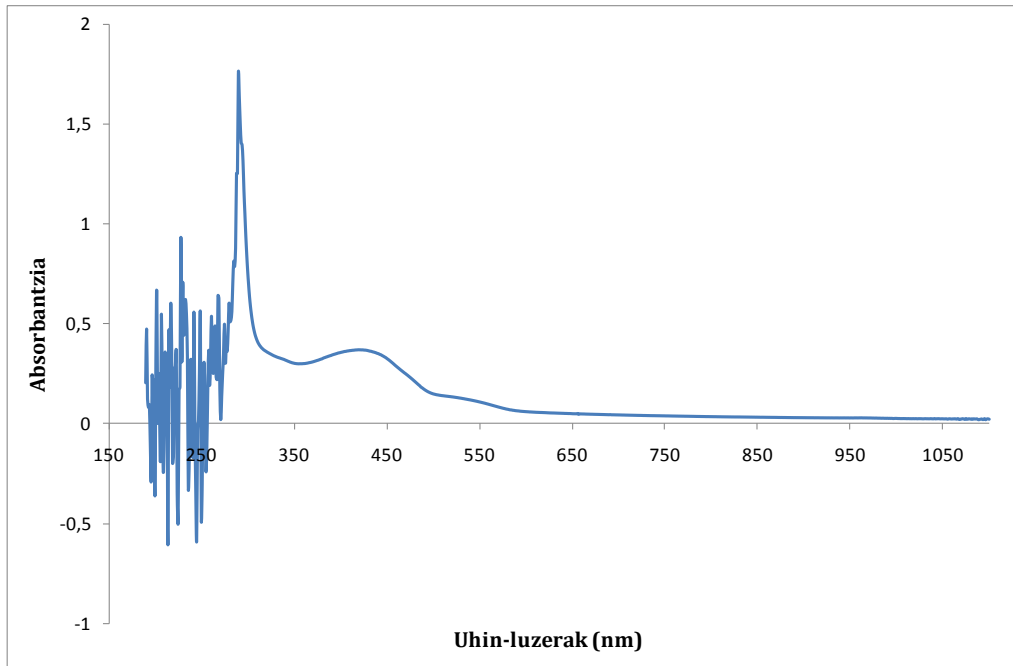
## 5.2 Absorbantzia maximoak definitu eta kontzentrazio tartea aukeratu

Lehenik eta behin, Tartrazina, Allura gorriaren eta hauen nahastearen absorbantzia espektroak aztertu dira. 6. eta 7. Irudietan ikusi den bezala, esperimentalki 427 nm eta 505 nm finkatu dira koloratzaile bakoitzaren absorbantzia maximoko uhin-luzerak bezala. Bestalde, 8. Irudian ikus daiteke bi koloratzaileen nahasteak ematen duen absorbantzia espektroa. Argi nabaritzen da bi koloratzaileen absorbantziak batukorrak direla, beharrezko baldintza datu espektrofotometrikoen aldagai anitzeko analisisa egiteko. Hainbat gune adierazgarri daude espektro hauetan:

- 320 nm inguruko Allura gorri absorbantzia maximo erlatiboa.
- 350 - 450 nm tarteko Allura gorriaren espektroak duen "sorbalda". Absorbantzia ez da zuzenean handitzen maximora arte, pixka bat handitzen da, ondoren gutxi gorabehera mantendu egiten da, eta azkenik, absorbantzia maximora zuzenean handitzen da.
- 427 nm-tan Tartrazinaren absorbantzia maximoa.
- 505 nm-tan Allura gorriaren absorbantzia maximoa.

Tartrazinaren absorbantzia ez du eragin handirik Allura gorriaren maximoan, baina aipatutako Allura gorriaren "sorbalda" Tartrazinaren maximoaren leku berean dago, bi absorbantziak batuz, eta horren ondorioz, nahastearen absorbantzia handiagoa da Tartrazinaren maximoaren inguruan Allura gorriaren maximoaren inguruan baino.

Espektro hauek ikusita, koloratzaileen kontzentrazioaren gune adierazgarritzat 350 - 530 nm tartea aukeratu da. 320 nm-ko maximoa baztertu da, hurbileko ultramore gunean laginen azukre askoren absorbantziak eragin dezaketen interferentziak saihesteko. Adibide bezala, 12. Irudian ikus daiteke kantimplora laranja azaltzen duen absorbantzia espektro osoa.



12. Irudia. Kantinplora laranjaren absorbantzia espektro osoa.

Esan den bezala, uhin luzera baxuetan, hurbileko ultramorean, absorbantzia balore handiak eta irregularrak azaltzen dira, laginek dituzten osagaien ondorioz, azukreak nagusiki.

### 5.3 Koloratzaileen analisi unibariantea

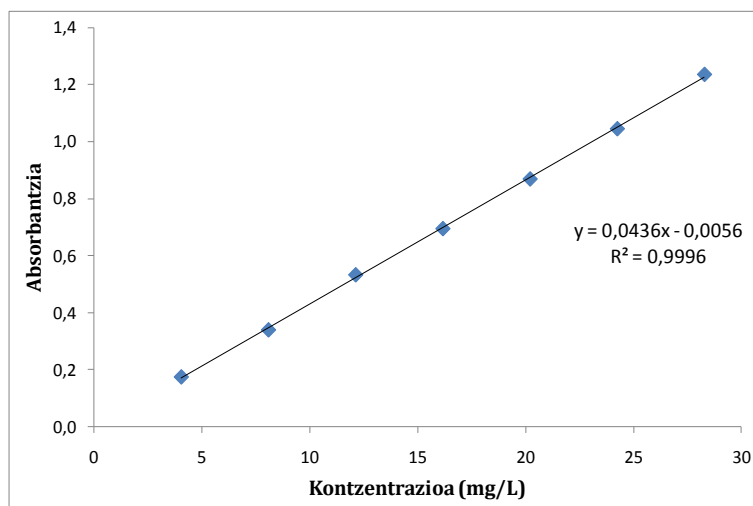
Tartrazina eta Allura gorriaren azterketa indibidualak egin ziren lehendabizi, bakoitzaren kasuan kalitate parametroak neurtuz.

#### Tartrazina

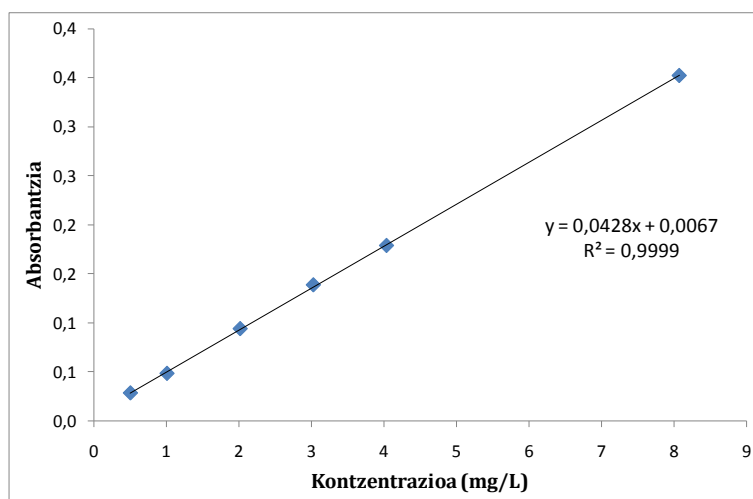
Tartrazinaren analisi indibiduala egiteko, aurretik esan den bezala, uhin-luzera bakarreko absorbantzia erabili zen, absorbantzia maximokoa, esperimentalki 427 nm-tan finkatu dena. Hori kontuan hartuz, kalitate parametroak banan-banan aztertuko dira.

- Linealtasuna: 0.5 – 28 mg/L kontzentrazio tarteko hainbat disoluzio erabili ziren honetarako. Kontzentrazio zehatzak hurrengoak izan ziren: 0.505, 1.010, 2.020, 3.030, 4.040, 8.080, 12.120, 16.160, 20.200, 24.240 eta 28.280 mg/L. Disoluzio hauen 427 nm-ko absorbantzia baloreak, kontzentrazioen aurrean irudikatu ziren linealtasuna aztertzeko.

Baina bitan banatu ziren, bi linealtasun tarte indibidualak aztertzeko. 13. Irudian 4.040 – 28.280 mg/L kontzentrazio tarteko linealtasuna, eta 14. Irudian, berriz, 0.505 – 8.080 mg/L kontzentrazio tartearena.



**13. Irudia.** Tartrazinaren linealtasuna kontzentrazio tarte altuan.



**14. Irudia.** Tartrazinaren linealtasuna kontzentrazio tarte baxuan.

Kontzentrazio tarte altuan lortutako erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0.0436x - 0.0056$  da, eta korrelazio koefizientea 0.9996. Kontzentrazio tarte baxuan, berriz,  $y = 0.0428x - 0.0067$  eta 0.9999 izan dira.

Honi esker, 0.505 – 28.280 mg/L kontzentrazio tartean linealtasuna mantentzen dela baieztatzen da.

- Detekzio eta kuantifikazio mugak: Kontzentrazio tarte baxuko erregresioa erabiliz kalkulatu ziren, sarreran azaldutako (4) eta (5) ekuazioak erabiliz.

Errore tipikoarentzat ( $s_{y/x}$ ) eta maldarentzat lortutako balioak 0.0015 eta 0.0428 izan ziren hurrenez hurren. Ekuazioan ordezkaturaz, 0.115 mg/L balorea lortu zen LOD-rentzat eta 0.346 mg/L balorea LOQ-rentzat.

- Errepikakortasuna: Egun berean 12.12 mg/L kontzentrazioko 6 disoluzio prestatu eta neurtu ziren. Hauen 427 nm-ko absorbantzia baloreak kontzentrazio tarte altuko erregresioan lortutako ekuazioan ordezkatu ziren, bakoitzaren kontzentrazioa lortzeko, 4. Taulan ikus daitezkeenak.

**4. Taula.** Tartrazinaren errepikakortasun datuak.

	<b>Absorbantzia</b>	<b>Kontzentrazioa (mg/L)</b>
1	0.52257	12.11
2	0.52441	12.16
3	0.52864	12.25
4	0.53066	12.30
5	0.52064	12.07
6	0.52965	12.28

Behin datu hauek lortuta, RSD balorea erraz kalkulatu daiteke batuz bestekoa eta desbiazio estandarra (2) ekuazioan ordezkatur.

Lortutako batuz bestekoa 12.19 mg/L eta desbiazioa 0.09 mg/L izan ziren, beraz, emaitza % 0.78 lortu zen.

- Erreproduzigarritasuna: Aurreko kasuan bezala, 12.12 mg/L kontzentrazioko disoluzioak prestatu eta neurtu ziren, baina egun batzuk pasa ondoren, eta 5. Taulan agertzen dira.

**5. Taula.** Tartrazinaren erreproduzigarritasun datuak.

<b>2. eguna</b>		<b>3. eguna</b>	
<b>Abs.</b>	<b>Kontz.</b>	<b>Abs.</b>	<b>Kontz.</b>
0.51652	12.0	0.53598	12.4
0.51090	11.8	0.53508	12.4
0.51593	11.9	0.53024	12.3

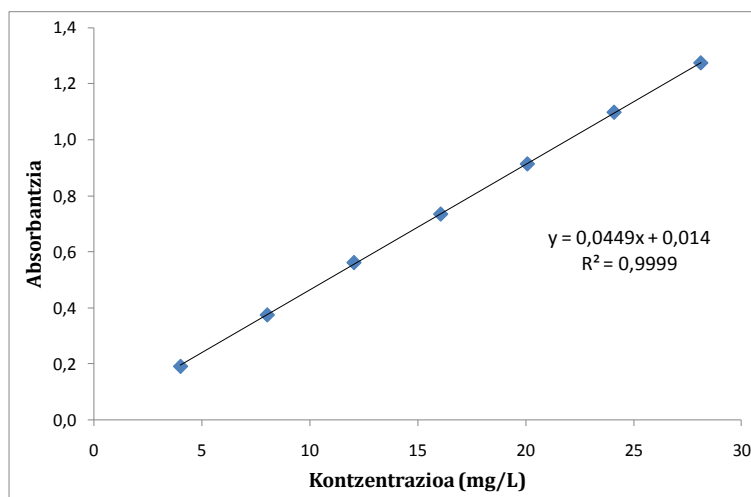
Errepikakortasuneko datuak erabili ziren honetarako baita ere, beraz, datu guztien artean lortutako batuz bestekoa 12.2 mg/L eta desbiazio estandarra 0.2 mg/L izan ziren. Hauek berriz ere (2) ekuazioan ordezkatur lortutako RSD balorea % 1.50 izan zen.

## Allura gorria

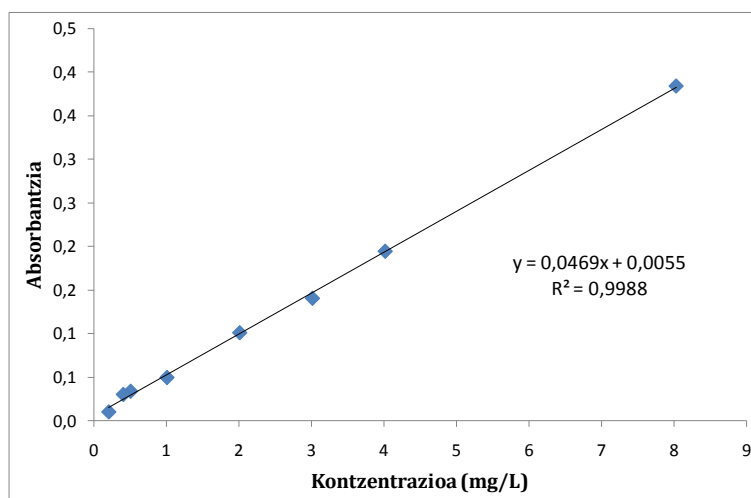
Tartrazinaren kasuan egindako pausu guztiak errepikatu ziren Allura gorriarekin ere, 505 nm-ko absorbantzia baloreak erabiliz.

- Linealtasuna: Linealtasuna aztertzeko erabili ziren disoluzioen kontzentrazioak honako hauek izan ziren: 0.201, 0.402, 0.502, 1.004, 2.008, 3.012, 4.016, 8.032, 12.048, 16.064, 20.080, 24.096 eta 28.112 mg/L. . Disoluzio hauen 505 nm-ko absorbantzia baloreak, kontzentrazioen aurrean irudikatu ziren linealtasuna aztertzeko.

Baina bitan banatu ziren kasu honetan ere, bi linealtasun tarte indibidualak aztertzeko. 15. Irudian 4.016 – 28.112 mg/L kontzentrazio tarteko linealtasuna, eta 16. Irudian, berriz, 0.201 – 8.032 mg/L kontzentrazio tartearena.



15. Irudia. Allura gorriaren linealtasuna kontzentrazio tarte altuan.



16. Irudia. Allura gorriaren linealtasuna kontzentrazio tarte baxuan.

Kontzentrazio tarte altuan lortutako erregresio linealaren ekuazioa  $y = 0.0449x - 0.014$  da, eta korrelazio koefizientea 0.9999. Kontzentrazio tarte baxuan, berriz,  $y = 0.0469x - 0.00557$  eta 0.9988 izan dira.

Honi esker, 0.201 – 28.112 mg/L kontzentrazio tartean linealtasuna mantentzen dela baieztatzen da.

- Detekzio eta kuantifikazio mugak: Kontzentrazio tarte baxuko erregresioa erabiliz kalkulatu ziren, (4) eta (5) ekuazioak erabiliz berriz ere. Kasu honetan errore tipikoarentzat ( $s_{y/x}$ ) eta maldarentzat lortutako balioak 0.0047 eta 0.0449 izan ziren hurrenez hurren. Formuletan ordezkaturaz, 0.331 mg/L balorea lortu zen LOD-rentzat eta 0.994 mg/L balorea LOQ-rentzat.
- Errepikakortasuna: Egun berean 12.048 mg/L kontzentrazioko 6 disoluzio prestatu eta neurtu ziren. Hauen 505 nm-ko absorbantzia baloreak kontzentrazio tarte altuko erregresioan lortutako ekuazioan ordezkatu ziren, bakoitzaren kontzentrazioa lortzeko, 6. Taulan ikus daitezkeenak.

**6. Taula.** Allura gorriaren errepikakortasun datuak.

	<b>Absorbantzia</b>	<b>Kontzentrazioa (mg/L)</b>
1	0.54406	11.80
2	0.54892	11.91
3	0.55399	12.03
4	0.55017	11.94
5	0.54624	11.85
6	0.55168	11.97

Behin datu hauek lortuta, RSD balorea erraz kalkulatu daiteke (2) ekuazioan batuz bestekoa eta desbiazio estandarra ordezkaturaz. Lortutako batuz bestekoa 11.92 mg/L eta desbiazioa 0.08 mg/L izan ziren, beraz, RSD % 0.68 lortu zen.

- Erreproduzigarritasuna: Lehen bezala, 12.048 mg/L kontzentrazioko disoluzioak prestatu eta neurtu ziren, baina egun batzuk pasa ondoren, eta 7. Taulan agertzen dira.

**7. Taula.** Allura gorriaren erreproduzigarritasun datuak.

2. eguna		3. eguna	
Abs.	Kontz.	Abs.	Kontz.
0.55812	12.1	0.55989	12.1
0.55620	12.1	0.55448	12.0
0.55085	12.0	0.55636	12.1

Errepikakortasuneko datuak erabili ziren honetarako baita ere, beraz, datu guztien artean lortutako batz bestekoa 12.0 mg/L eta desbiazio estandarra 0.1 mg/L izan ziren. Hauek berriz ere (2) ekuazioan ordezkatzuz lortutako RSD balorea % 0.89 izan zen.

Laburpen bezala, 8. Taulan biltzen dira Tartrazina eta Allura gorriaren analisi unibariantean neurtutako kalitate parametroen baloreak.

**8. Taula.** Koloratzaileen analisi indibidualaren laburpena.

Parametroak	Tartrazina	Allura gorria
Tarte lineala (mg/L)	0.505 – 28.280	0.201 – 28.112
Linealtasun altua (R <sup>2</sup> )	0.9996	0.9999
Linealtasun baxua (R <sup>2</sup> )	0.9999	0.9988
LOD (mg/L)	0.115	0.331
LOQ (mg/L)	0.346	0.994
Errepikakortasuna (%RSD)	0.78	0.68
Erreproduzigarritasuna (%RSD)	1.50	0.89

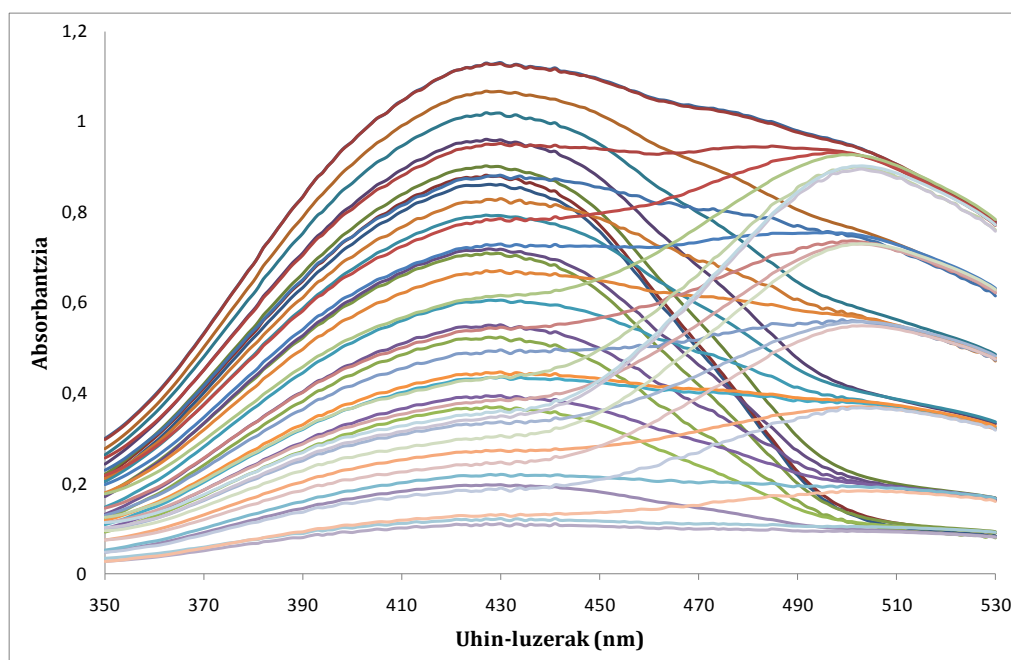
Erabilitako kontzentrazio tarteak oso antzekoak dira, bien kasuan tarte linealak izanez, lortutako linealtasunak oso onak baitira, bereziki Tartrazinaren kasuan. LOD eta LOQ balore hobek lortu dira Tartrazinaren kasuan baita ere. Prezisioa, berriz, hobegoa izan da Allura gorriaren kasuan, batez ere erreproduzigarritasunean.



## 5.4 Koloratzaile nahasteen analisisia

### 5.4.1 MLR modeloa sortu

Behin 7. Irudian ikusi den matrizeko 41 patroi disoluzio guztiak (36 puntu + erpin bakoitza eta erdiko bat errepikatuak) prestatuta eta espektrofotometroan neurtuta, MLR modeloa osatu zen. Horretarako, lehenengo gauza, lortutako datu guztien uhin-luzera kopurua murriztu behar da, soilik aurretik erabakitako tartea hartuz, 350 – 530 nm tartea. Hauek guztiekin, datu matrize bat osatu zen, zutabetan uhin-luzerak eta lerroetan disoluzioak jarrita. Matrize hau, MLR modeloaren oinarria izango da, eta bere adierazpen grafikoa 17. Irudian aurki daiteke. Modeloa Microsoft Office Excel programarekin egin denez, erregresio anizkoitza soilik 16 aldagairekin egin daiteke. 16 horiek ausaz har daitezke, edo adierazgarrienak aukeratu. Kasu honetan, hartutako uhin-luzera tartea 16 zatitan banatu zen, eta zati bakoitzetik uhin-luzera bat hartu zen. Horrela, lortutako uhin-luzerak 350, 362, 374, 386, 398, 410, 422, 434, 446, 458, 470, 482, 494, 506, 518 eta 530 nm izan ziren. Honela banatuta ere, Tartrazina eta Allura gorriaren maximoen oso gertu dauden uhin-luzerak hartu ziren, 422 nm oso gertu dago 427 nm-tik (Tartrazinaren maximoa), eta 506 nm oso gertu dago 505 nm-tik (Allura gorriaren maximoa). Beraz, ausaz hartutako uhin-luzerak adierazgarriak ere badira.



17. Irudia. Patroi disoluzio matrizearen adierazpen grafikoa.

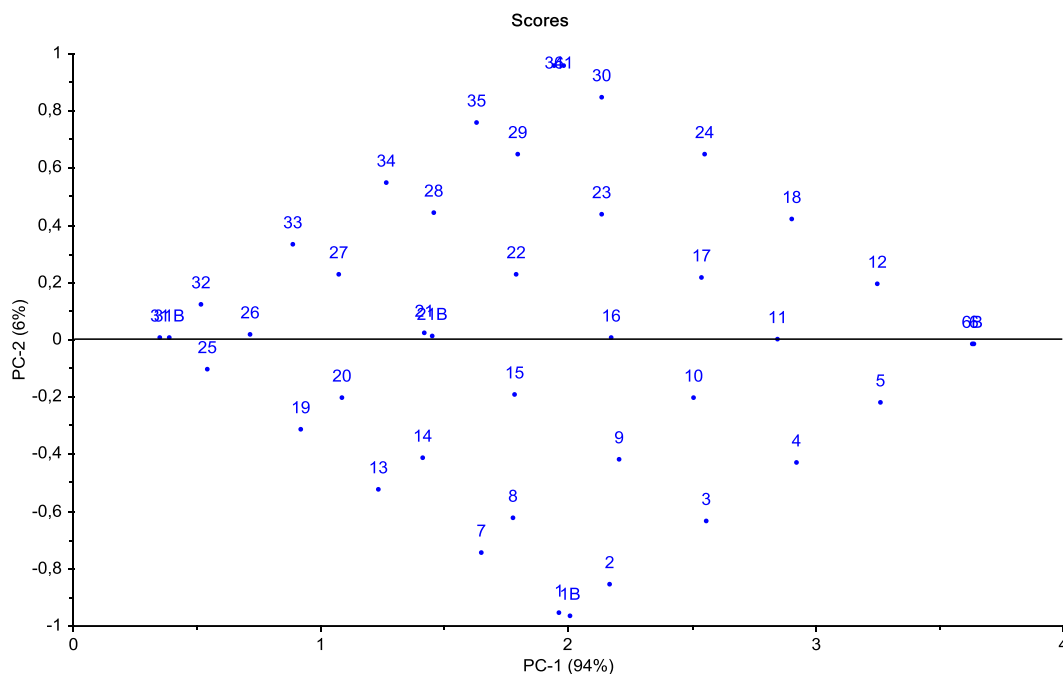
Behin 16 uhin-luzerak aukeratuak, aldagai anitzeko erregresioa egin zen. Baina aurretik aipatu den bezala, alderantzizko erregresioa egin zen, beraz, Excel programari y ardatzean disoluzioen kontzentrazioa sartu zitzaion, eta x ardatzean, aukeratutako uhin-luzera guztien absorbantziak. Horrela eginda, 9. Taulan azaltzen diren modeloak lortu ziren, bat koloratzaile bakoitzarentzat. Hauek sarreran azaldutako  $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots$  ekuazioaren  $b_0, b_1, b_2, b_3, \dots$  koefizienteak izango dira.

Eredu hauek izanda, edozein disoluzioaren absorbantziak modeloan sartuz, Tartrazina eta Allura gorriaren kontzentrazioak lortu daitezke. Horretarako, disoluzio berrien (edo laginen) uhin-luzera berdinetako absorbantzia baloreak dagokien modeloaren koefizientearekin biderkatzen da, eta guztiak batuz, kontzentrazioa lortzen da.

**9. Taula.** MLR modeloak Tartrazina eta Allura gorriarentzat.

<b>Tartrazina</b>	<b>Coefficientes</b>	<b>Allura gorria</b>	<b>Coefficientes</b>
Intercepción	-0,056	Intercepción	-0,041
350	34,143	350	12,473
362	-186,552	362	-125,350
374	133,857	374	85,128
386	78,194	386	38,813
398	-47,921	398	-4,891
410	41,999	410	51,303
422	-98,090	422	-34,747
434	1,675	434	-56,706
446	44,787	446	5,379
458	26,417	458	13,450
470	-8,856	470	4,055
482	9,043	482	-7,054
494	-13,707	494	31,862
506	-22,854	506	1,429
518	20,244	518	6,545
530	-5,401	530	-17,357

Bestalde, hasieran egin den datu matrizea The Unscrambler programa informatikora esportatu zen, bertan patroia disoluzioen matrizea aztertzeko. Lortutako irudikapena 18. Irudian ikus daiteke.



**18. Irudia.** Patroi disoluzioen matrizearen PCA irudikapena.

Argi ikusten da matrizearen forma berdina duela eta ez dagoela punturik bere lekutik kanpo. Honek matrizeko patroia disoluzioak ondo prestatu direla konfirmatzen du. PC1 ardatzak bariantzaren % 94 azaltzen du, eta gainontzeko % 6 PC2 ardatzak.

PC1 ardatzaren balore txikietan koloratzaile kontzentrazio baxuak dituzten patroiak azaltzen dira, eta balore handietan, berriz, kontzentrazio altuak dituztenak.

PC2 ardatzaren kasuan, balore positiboetan Tartrazina kopuru txikiak eta Allura gorri kopuru handiak dituzten patroiak azaltzen dira. Kontrakoa gertatzen da balore negatiboetan, Tartrazina kantitate handiak eta Allura gorri kantitate txikiak dituzten patroiak.

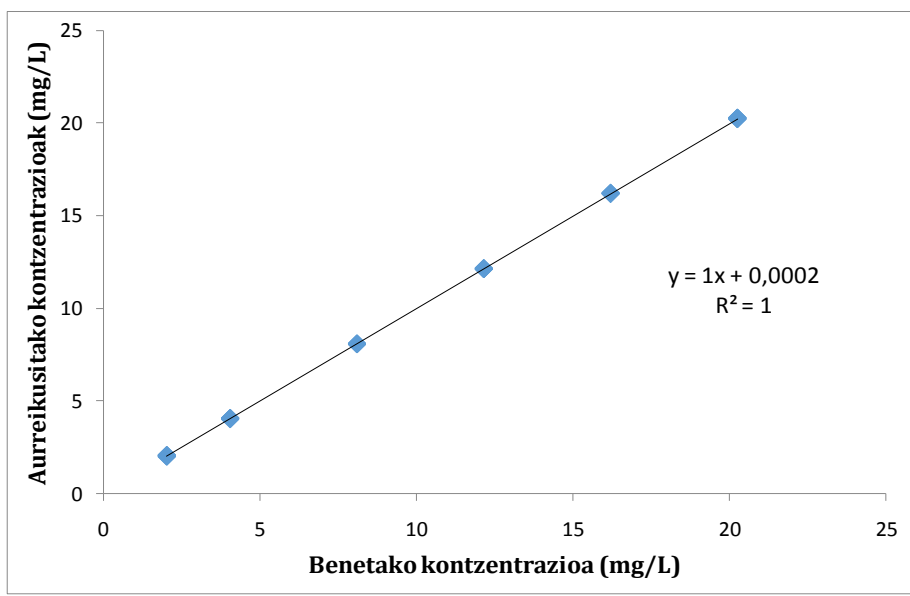
## 5.4.2 Metodoaren balidazioa

Lehen bezala, kalitate parametro guztiak aztertuko dira, baina orain bi koloratzaileen nahasteekin eta 350 – 530 nm uhin-luzera tarte osoarekin.

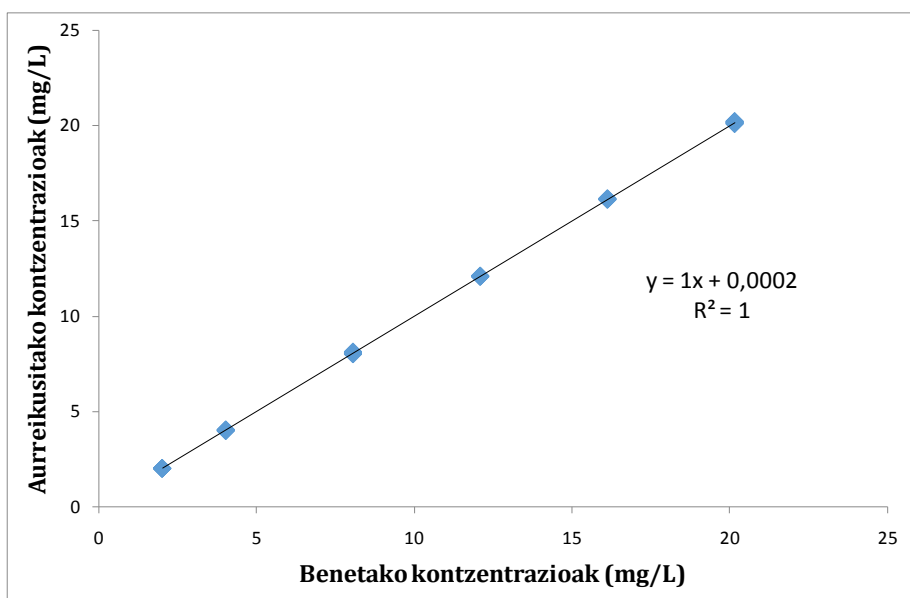
- Linealtasuna: Aztertutako kontzentrazio tartean, 2.024 – 20.240 mg/L tartearen kasuan eta 2.016 – 20.160 mg/L Allura gorriaren kasuan, linealtasuna mantentzen dute, indibidualki aztertu direnean bezala, 0.9999-ko korrelazio koefizienteak lortuz bakoitzarentzat.
- Detekzio eta kuantifikazio mugak: LOD kalkulatzeko ez da lehen bezain erraza, erregresio anitzak ez dituelako erregresio linealak bezala datuak ematen. Beraz, bi era desberdinetara kalkulatu zen.

Alde batetik, 10 txuri disoluzio neurtu eta absorbantziak MLR modeloan sartu ziren. Horrela bakoitzaren kontzentrazioa lortu zen, 0 ingurukoa, eta hauen media eta desbiazio estandarrarekin, LOD-ak kalkulatu ziren, (3) ekuazioa erabiliz. 0.083 eta 0.074 mg/L balioak lortuz Tartrazina eta Allura gorriarentzat, hurrenez hurren. LOQ, beti bezala, hiru aldiz LOD biderkatuz lortu ziren. Kasu honetan 0.250 eta 0.223 mg/L izanez.

Bestalde, Excel programarekin, erregresio anizkoitza egiterakoan, erresidualak eta aurreikusitako balorek ateratzea eskatu zitzaion. Horrela, koloratzailearen aurreikusitako kontzentrazioa irudikatuz koloratzailearen benetako kontzentrazioaren aurrean eta erregresio lineala eginda, LOD aurretik kalkulatu den bezala lortu daiteke. Tartrazinaren kasuan lortu zen irudikapena azaltzen da 19. Irudian, eta Allura gorriarena 20. Irudian.



19. Irudia. Tartrazinaren aurreikusitako kontzentrazioen grafikoa.



20. Irudia. Allura gorriaren aurreikusitako kontzentrazioen grafikoa.

Tartrazinaren kasuan lortutako errore tipikoa eta malda  $3 \cdot 10^{-5}$  eta 0.9999 izan ziren, Allura gorriaren kasuan lortutako berdinak. Beraz, (4) eta (5) formuletan ordezkaturik, metodo honekin lortutako LOD eta LOQ hurrengoak dira; Tartrazinarentzat 0.102 eta 0.306 mg/L, eta Allura gorriaren kasuan 0.104 eta 0.313 mg/L.

Erabilitako bi metodoak konparaturik, txuriekin lortutako LOD hobeagoak dira, balore pixka bat txikiagoak lortzen baitira. Beste lanetan lortutako emaitzekin konparaturik, 10 ppb Tartrazinarentzat eta

50 ppb Allura gorriarentzat<sup>10</sup>, lan honetan lortutako baloreak handiagoak dira. Baina bestearen kasuan, HPLC bidez lortutako emaitzak dira, banaketa teknika bat, beraz logikoa da balore txikiagoak izatea, beste konposaturen interferentziak eliminatzen baitira.

- **Errepikakortasuna:** Bi nahaste prestatu ziren Tartrazina eta Allura gorri kontzentrazio ezagunak zituztenak. Zehazki, lehenengo disoluzioak 8.042 mg/L Tartrazina eta 8.006 mg/L Allura gorri zituen. Bigarrenak, berriz, kontzentrazio altuagoak zituen; 16.083 mg/L Tartrazina eta 16.013 mg/L Allura gorri. Disoluzio hauek beste 5 aldiz prestatu eta neurtu ziren egun berean eta 10. Taulako kontzentrazioak lortu ziren MLR modeloan sartuz.

**10. Taula.** MLR modeloak lortutako Tartrazina eta Allura gorriaren errepikakortasun datuak.

	Tartrazina (mg/L)		Allura gorria (mg/L)	
	Baxua	Altua	Baxua	Altua
1	8.364	16.60	8.017	16.06
2	8.371	16.39	7.976	15.83
3	8.382	16.51	8.002	15.84
4	8.307	16.53	7.984	15.85
5	8.270	16.72	7.972	16.04
6	8.324	16.49	8.072	15.95

Hauen RSD kalkulatzeko, bakoitzaren batz bestekoa eta desbiazio estandarra atera behar dira eta (2) ekuazioan ordezkatu behar dira.

Tartrazinarentzat, maila baxuan lortutako baloreak 8.37 eta 0.04 mg/L izan ziren, ondorioz, RSD % 0.52 lortu zen. Kontzentrazio maila altuan, berriz, 16.5 eta 0.1 mg/L izan ziren, beraz, % 0.67-ko RSD lortu zen.

Allura gorriaren kasuan, kontzentrazio maila baxuan batz besteko kontzentrazioa 8.00 mg/L eta desbiazio estandarra 0.04 mg/L izan ziren. Hauekin % 0.47-ko RSD balorea lortu zen. Bestalde, kontzentrazio maila altuan lortutako datuak 15.93 eta 0.10 mg/L izan ziren, beraz, RSD % 0.65 lortu zen.

- Erreproduzigarritasuna: Errepikakortasunean erabilitako kontzentrazio berdineko disoluzioak prestatu eta neurtu ziren, bi egun desberdinetan, 3 disoluzio bakoitzean. Lortutako kontzentrazioak 11. Taulan azaltzen dira.

11. Taula. MLR modeloak lortutako Tartrazina eta Allura gorriaren erreproduzigarritasun datuak.

	Tartrazina (mg/L)				Allura gorria (mg/L)			
	1. eguna		2. eguna		1. eguna		2. eguna	
	Baxua	Altua	Baxua	Altua	Baxua	Altua	Baxua	Altua
1	8.31	16.33	8.22	16.35	8.03	15.84	7.96	16.11
2	8.24	16.32	8.29	16.49	7.99	15.81	7.99	15.97
3	8.26	16.23	8.33	16.38	7.98	15.84	7.96	16.05

Erreproduzigarritasuna kalkulatzeko errepikakortasun datuak ere erabili ziren, hau da, 10. eta 11. tauletako datuak erabili ziren batz besteko kontzentrazioa eta desbideratze estandarra kalkulatzeko.

Tartrazinarentzat, maila baxuan lortutako baloreak 8.31 eta 0.05 mg/L izan ziren, ondorioz, RSD % 0.63 lortu zen. Kontzentrazio maila altuan, berriz, 16.4 mg/L eta 0.1 izan ziren, beraz, % 0.83-ko RSD lortu zen.

Allura gorriaren kasuan, kontzentrazio maila baxuan batz besteko kontzentrazioa 7.99 mg/L eta desbiazio estandarra 0.03 mg/L izan ziren. Hauekin % 0.40-ko RSD balorea lortu zen. Bestalde, kontzentrazio maila altuan lortutako datuak 15.9 eta 0.1 mg/L izan ziren, beraz, RSD % 0.69 lortu zen.

- Zehaztasuna: Azkenik, konprobazio disoluzio batzuk prestatu, neurtu eta modeloan sartu ziren, metodoaren zehaztasuna frogatzeko. Lortutako kontzentrazioa eta benetako kontzentrazioa berdina badira, zehaztasuna ona dela onar daiteke. 12 eta 13. Tauletan ikusten dira lortutako emaitzak.

**12. Taula.** MLR modeloak lortutako Tartrazina kontzentrazioen eta benetako kontzentrazioen arteko konparaketa.

Disoluzioak	Tartrazina		
	Lortutakoa (mg/L)	Jarritakoa (mg/L)	Berreskuratu (%)
1	9.933	10.120	98.15
2	11.990	12.144	98.73
3	14.120	14.168	99.66
4	4.124	4.021	102.57
5	10.323	10.052	102.69
6	16.354	16.083	101.68
7	6.142	6.031	101.84
8	8.274	8.042	102.89
9	20.399	20.104	101.47

**13. Taula.** MLR modeloak lortutako Allura gorri kontzentrazioen eta benetako kontzentrazioen arteko konparaketa.

Disoluzioak	Allura gorria		
	Lortutakoa (mg/L)	Jarritakoa (mg/L)	Berreskuratu (%)
1	10.092	10.800	100.12
2	18.159	18.144	100.08
3	6.127	6.048	101.30
4	5.920	6.005	98.58
5	3.900	4.003	97.42
6	1.917	2.001	95.82
7	16.019	16.013	100.04
8	11.995	12.010	99.88
9	7.788	8.006	97.27

Kontzentrazioak begiraturaz, disoluzioak matrizearen barnean kokatzen direla eta metodoak determinatutako kontzentrazioak oso antzekoak direla



ondorioztatzen da. Lortutako berreskurapenak nahiko onak dira, guztiak % 95 eta % 103 tartean sartzen baitira

Amaitzeko, Ultramore-Ikuskor espektrofotometria – aldagai anitzeko erregresioa (MLR) metodoaren kalitate parametroetan lortutako baloreak laburbiltzeko, 14. Taula osatu da.

14. Taula. Metodoaren kalitate parametroen laburpena.

		Tartrazina	Allura gorria
Tarte lineala		2.024 – 20.24	2.016 – 20.16
Linealtasuna		0.9999	0.9999
<b>Txuriak</b>	LOD (mg/L)	0.083	0.074
<b>erabiliz</b>	LOQ (mg/L)	0.250	0.223
<b>Erresidualak</b>	LOD (mg/L)	0.102	0.104
<b>erabiliz</b>	LOQ (mg/L)	0.306	0.313
<b>Prezisiao</b> <b>(1. maila)</b>	Errepikakortasuna (%RSD)	0.52	0.47
	Erreproduzigarritasuna (%RSD)	0.63	0.40
<b>Prezisiao</b> <b>(2. maila)</b>	Errepikakortasuna (%RSD)	0.67	0.65
	Erreproduzigarritasuna (%RSD)	0.83	0.69
<b>Zehaztasuna</b>	Berreskurapenak (%)	98.15 – 102.89	95.82 – 101.30

Aztertutako kontzentrazio tarteak oso antzekoak dira, eta hauetan lortutako korrelazio koefizienteak 0.9999-koak izanez, linealtasuna mantendu egiten dela baieztatzen da. Analisi unibariantearekin konparatuz, aztertutako kontzentrazio tarte pixka bat txikiagoa da, baina emaitzak berdintsuak dira.

Lortutako LOD eta LOQ baloreak, hobegoak dira txuriak neurtuz lortutakoak, eta oso antzekoak dira bi koloratzaileetan. Analisi unibariantean ez da berdina izan, lehen Tartrazinaren kasuan lortutako baloreak Allura gorriarekin lortutakoak baina hobegoak ziren.

Prezisiao neurtzerakoan, antzeko RSD baloreak lortu dira baita ere, bi kasuetan handiagoak dira kontzentrazio maila altuan. Aipagarria da, bi kontzentrazioetan, balore hobekoak lortu direla erreproduzigarritasunean errepikakortasunean baino, normalean alderantziz izaten baita. Analisi unibariantearekin konparatuz, orokorrean ere balore hobekoak lortu dira lan honetan proposatutako metodoarekin.

Azkenik, zehaztasunean, oso balore onak eta antzekoak lortu dira bi kasuetan, % 100-etik oso gertu baitaude guztiak.

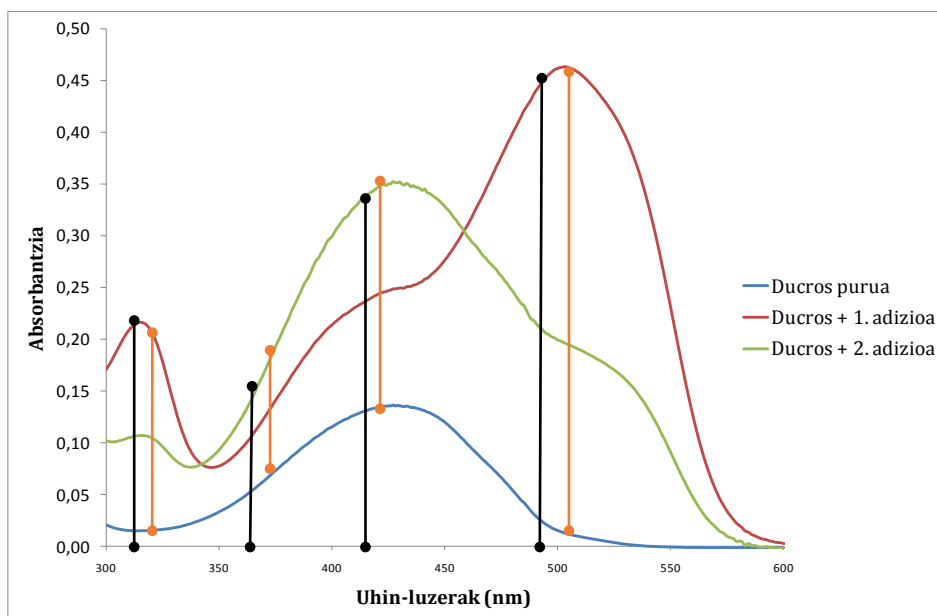
## 5.5 Lagin errealeen aplikazioa

Lehen esan den bezala, zehaztasuna lagin errealekin ere aztertu egin zen, matrize konplexuen interferentzien presentzian MLR modeloaren eraginkortasuna frogatzeko.

Lagin guztien kasuan, lagin purua eta koloratzaile bakoitzaren bi gehikuntza maila desberdineko disoluzioak neurtu ziren. Beraien absorbantzia datuekin aurretik azaldutako tratamendu orokorra jarraitu zen kasu guztietan, baina lagin batzuen tratamenduetan espezifikotasun txikiak aldatu behar izan ziren. Jarraian lagin bakoitzari buruz hitz egingo da, banan-banan.

### Ducros koloratzailea

Beste osagai batzuen artean, bi elikadura-koloratzaile ditu bere konposizioan, Tartrazina (E-102) eta Sunset horia (E-110), baina etiketan ez du hauen kopurua zehazten. Azken honek interferentziak sor dezake, beraz, gehikuntzak dituzten disoluzioen absorbantziei, lagin puruaren absorbantzia baloreak kendu behar zaizkie. Orduan, lagin puruaren absorbantzia espektroa base lerroa (*baseline*) izango da. 21. Irudian ikus daitezke lagin puruaren eta gehikuntzekin lortutako absorbantzia espektroak.



**21. Irudia.** Ducros koloratzailearen absorbantzia espektoak.

Kasu honetan, kurba gorri eta berdeari, kurba urdina kendu zaie, beraz, lerro urdina da base lerroa. Honekin lortzen dena hurrengo da: lerro laranja adierazten duten absorbantzien kontzentrazioa kalkulatzeko, eta ez lerro beltzenak. Horrela laginak izan ditzaketen interferentzien eraginak ezabatzen dira.

Prozedura hau lagin guztietan jarraitu da, beste osagaien absorbantzien efektua baztertzeko

Behin kenketa eginda, gehikuntzak duten disoluzioen absorbantzia datu berriak MLR modeloan sartu ziren, eta 15. Taulako batz besteko berreskurapen baloreak lortu ziren.

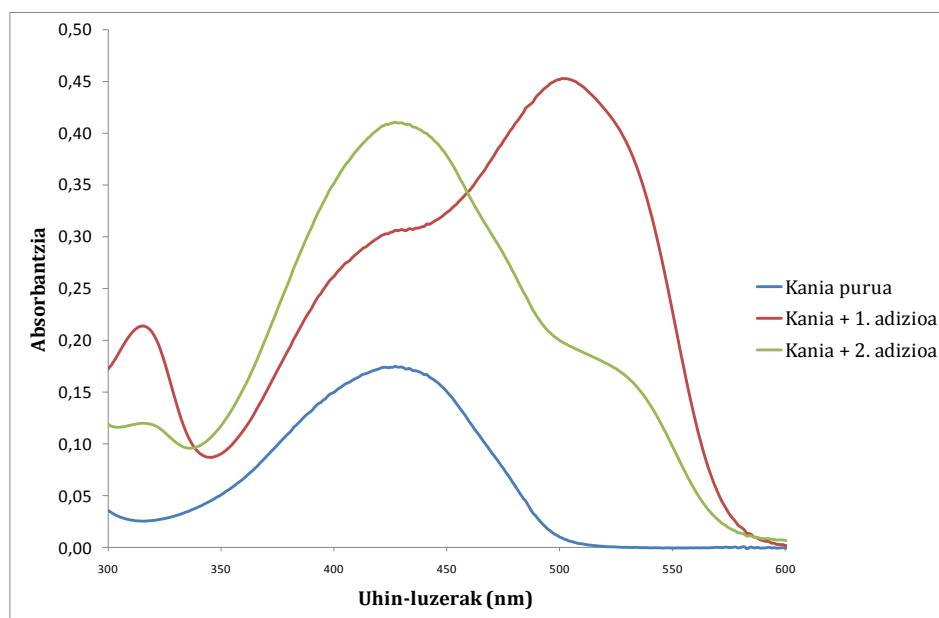
**15. Taula.** Ducros koloratzailearekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	101.45	94.95
<b>2. adizio maila</b>	104.05	96.33

## Kania koloratzailea

Kasu honetan, bere osagaien artean dagoen elikadura-koloratzaile bakarra Tartrazina da, % 7.2-ko proportzioan. Konparatzeko balore bat badagoenez, lehendabizi laginaren Tartrazina proportzioa kalkulatu zen. Honetarako, lagin solidoaren disoluzioak prestatu, espektrofotometroan neurtu eta MLR modeloan sartuta kontzentrazioa lortu zen. Dagozkion kalkuluak eginda, Tartrazina proportzioa laginean % 7.1 dela zehaztu zen, desbiazioa 0.3 delarik.

Ondoren, aurreko kasuan bezala, lagin puruaren disoluzioaren absorbantzia espektroa base lerro bezala erabilia (22. Irudiko kurba urdina), gehikuntza zuten disoluzioen kontzentrazioa kalkulatzeko da (kurba gorri eta berdea), eta teorikoki jarritako kontzentrazioekin zatituz, 16. Taulako batz besteko berreskurapenak lortu ziren.



22. Irudia. Kania koloratzailearen absorbantzia espektroak.

Espektroak begiratu erraz ikusten da adizio bakoitzean zein koloratzaile gehitu da kontzentrazio handiagoan, bere uhin luzera optimoaren inguruan maximo handiagoak azaltzen baitira.

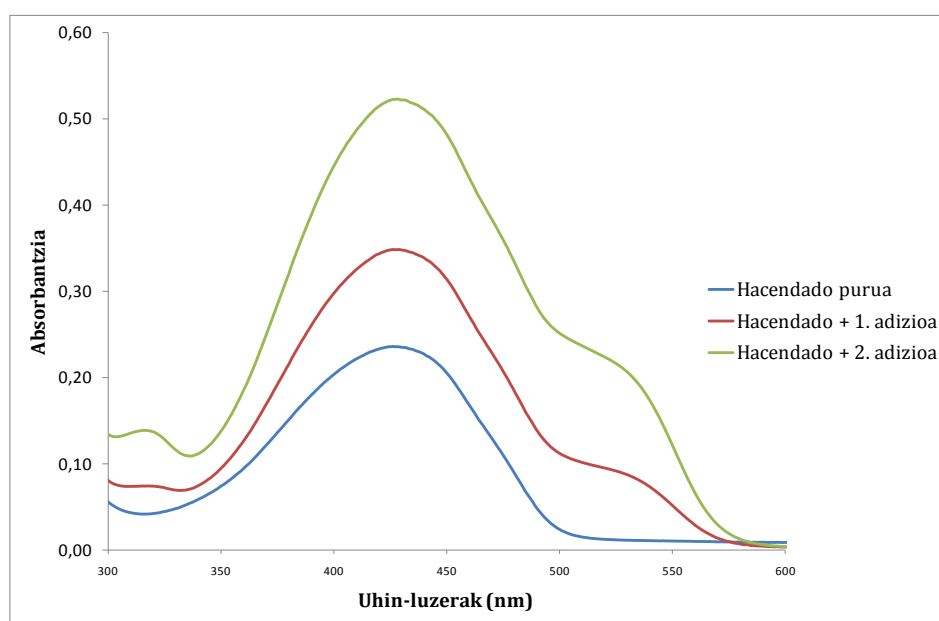
16. Taula. Kania koloratzailearekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
1. adizio maila	109.90	95.20
2. adizio maila	111.00	97.99

## Hacendado koloratzailea

Kania koloratzailearen kasuan bezala, etiketan Tartrazina kopurua adierazita zegoen, % 20; aurreko kasuan bezala, lagin puruen disoluzioak erabiliz, MLR modeloak esperimentalki lortutako balorea, berriz, % 23.0 izan zen, 0.1eko desbiazioarekin.

Besteetan bezala, 23. Irudian azaltzen diren espektroak lortuta, lagin puruaren absorbantzia kendu zitzaien gehikuntza zuten disoluzioei, eta 17. Taulan azaltzen diren berreskurapenak kalkulatu ziren.



**23. Irudia.** Hacendado koloratzailearen absorbantzia espektroak.

Kasu honetan, gehikuntza bakoitzean Tartrazina eta Allura gorri kopuru berdina gehitu ziren, bi adizioen espektroak ez baitira gurutzatzen.

**17. Taula.** Hacendado koloratzailearekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

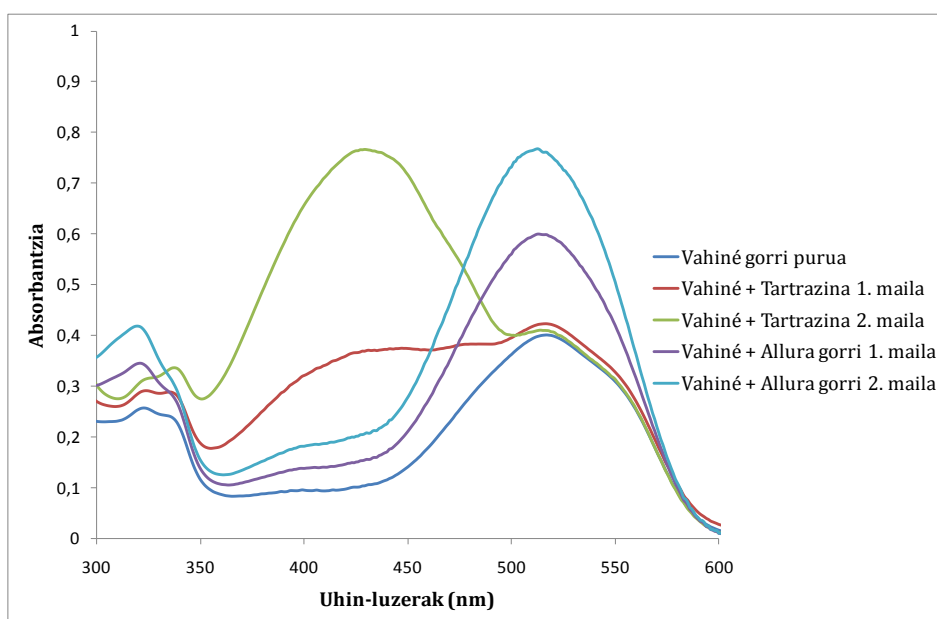
	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	112.01	95.80
<b>2. adizio maila</b>	101.07	96.92

## Vahiné koloratzaileak

Vahiné koloratzaileak postreak koloratzeko erabiltzen dira, 3 koloratzaile hodi datoz, kolore horia, gorria eta urdina dutenak. Horiak Tartrazina darama, baina gorriak, Allura gorria eraman beharrean, Azorubina (E-122) darama. Urdinak E-133 darama. Gainera, etiketan ez dator koloratzaileen kontzentrazioa, beraz ezinezkoa da lortutako kontzentrazioak eta benetakoak konparatu. Beraz, beste kasuetan bezala, koloratzaile puruaren absorbantzia base lerro bezala erabiliz (24, 25 eta 26. Irudietako absorbantzia espektroak), gehikuntzen kontzentrazioa eta berreskurapenak kalkulatu ziren, 18. Taulan azaltzen direnak.

**18. Taula.** Vahiné koloratzaileekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

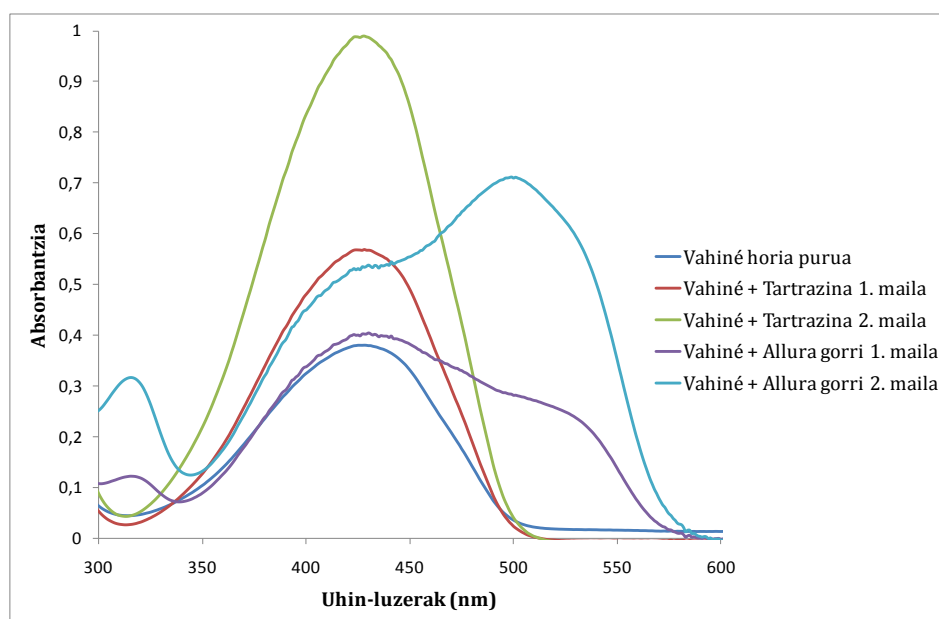
Vahiné	Adizioak	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
Gorria	1. adizio maila	99.52	104.82
	2. adizio maila	100.92	103.18
Horia	1. adizio maila	92.84	100.14
	2. adizio maila	95.42	99.92
Urdina	1. adizio maila	106.09	101.62
	2. adizio maila	103.32	100.44



**24. Irudia.** Vahiné koloratzaile gorriaren absorbantzia espektroak.

Aurreko kasuetan ez bezala, irudian ikus daitekeen bezala Vahiné markako koloratzaileetan, adizioak banaka egin ziren, nahasteak gehitu beharrean. Beraz, koloratzaile bakoitzeko bi adizio analizatzeko, disoluzio gehiago prestatu behar izan ziren.

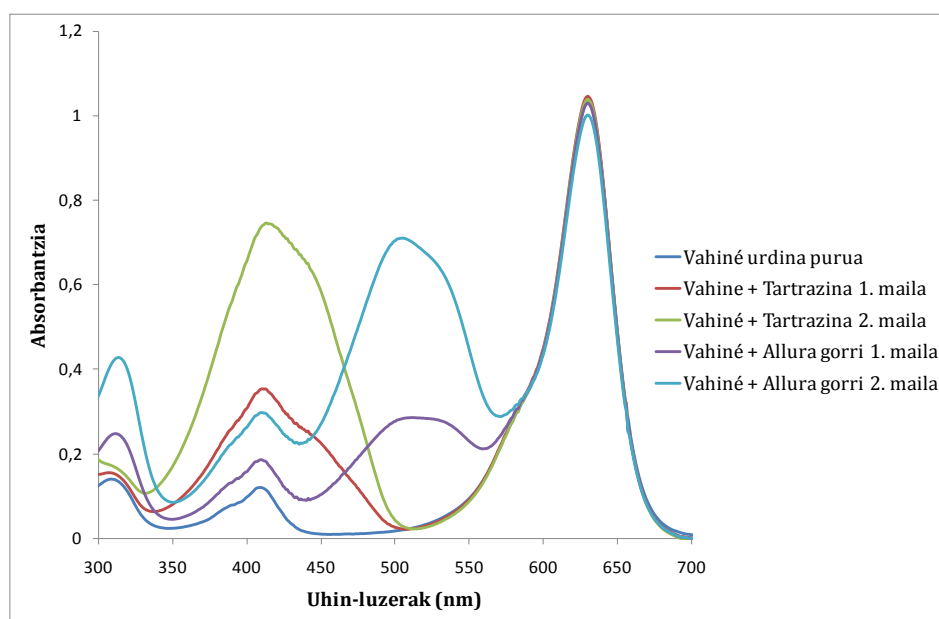
Ondoren Vahiné horiaren azterketa ikusiko da, 25. Irudian azaltzen diren espektroekin batera.



**25. Irudia.** Vahiné koloratzaile horiaren absorbantzia espektroak.

Kasu honetan oso adierazgarria da Allura gorria gehitzean 427 nm inguruko absorbantzia nabarmenki handitzen dela. Baina kontrako kasuan ez, nahiz eta Tartrazina kontzentrazioa handitu, 505 nm inguruko absorbantzia berdin mantentzen da.

Azkenik, vahiné urdina aztertuko da 26. Irudian.



**26. Irudia.** Vahiné koloratzaile urdinaren absorbantzia espektroak.

Atentzioa deitzen duen lehenengo gauza irudi honetan Vahiné urdinaren absorbantzia maximoa da. Nahiz eta beste koloretako koloratzaileen kontzentrazio berdinean egon, bere absorbantzia maximoa askoz altuagoa da. Baina hau MLR modelo egiteko uhin luzera tartetik kanpo dagoenez, ez du eragin handirik. Baina Tartrazinaren maximoa azaltzen den inguruan maximo bat du baita ere.

Hemen azaltzen dira metodoaren lehenengo akats garrantzitsuak:

- Alde batetik, MLR modeloan Vahiné urdina puruaren absorbantzia espektroa sartzean, Tartrazina eta Allura gorri kontzentrazio baxuak ematen ditu, nahiz eta analito hauek ez izan. Hala ere, Tartrazina eta Allura gorri adizioak dituzten disoluzioen absorbantziei, Vahiné urdina puruaren absorbantziak kendu zaizkienez, akats hori saihesten da.
- Beste aldetik, Vahiné gorria purua aztertzean, metodoak Allura gorritzat hartzen du eta kontzentrazio altua adierazten du. Hau da, metodo honek analitoen oso antzekoak diren interferentziak ezin ditu ezabatu.



## Zumrok kantinplorak

Kasu honetan, zapore desberdineko kantinplorak zeudenez, bakoitzak koloratzaile desberdinak zituzten. Etiketan Tartrazina (E-102), Azorubina (E-122), Allura gorria (E-129), Urdin distiratsua (E-133) eta Caramel koloratzailea (E-150d) aipatzen ziren, baina ez ziren kontzentrazioak aipatzen. Aurreko kasuen prozedura jarraituz, lagin puruaren absorbantziak kenduz gehikuntza duten laginen absorbantziei, 19. Taulako batz besteko berreskurapenak lortu ziren.

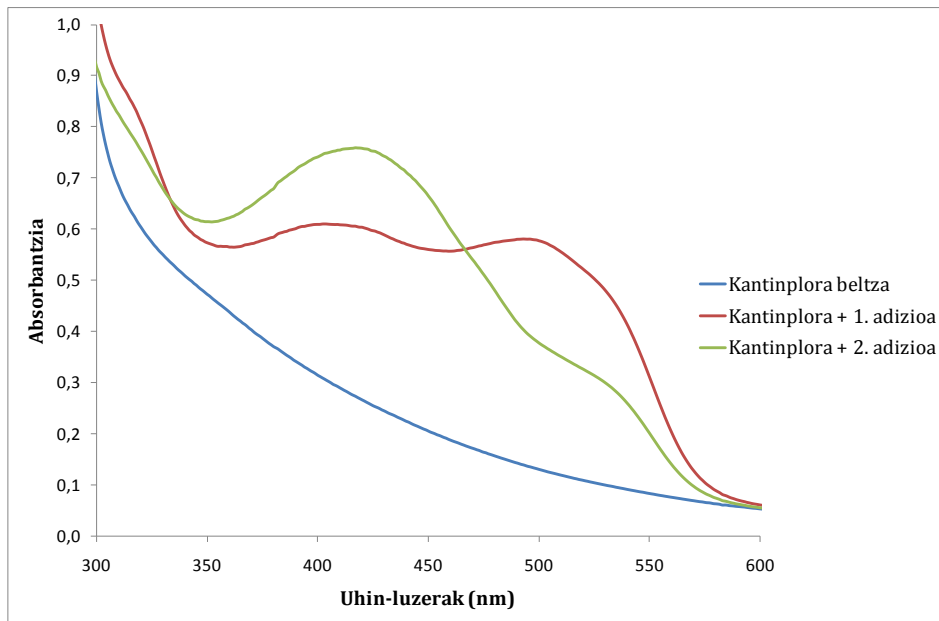
19. Taula. Zumrok kantinplorekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

		Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>Beltza</b>	1. adizio maila	101.61	98.70
	2. adizio maila	102.15	95.02
<b>Berdea</b>	1. adizio maila	95.83	96.25
	2. adizio maila	99.02	93.94
<b>Gorria</b>	1. adizio maila	94.16	92.76
	2. adizio maila	99.97	96.82
<b>Horia</b>	1. adizio maila	104.57	90.43
	2. adizio maila	98.72	100.86
<b>Laranja</b>	1. adizio maila	98.36	80.97
	2. adizio maila	94.60	53.69
<b>Urdina</b>	1. adizio maila	99.87	95.84
	2. adizio maila	99.55	92.50

Balore guztiak % 90 – 105 tarte onargarrian sartzen dira, kasu batean ezik, Kantinplora laranja egindako Allura gorri adizioetan. Hau aurrerago azalduko da, 31. Irudiarekin batera, kantinplora laranjaaren espektroak komentatzen direnean.

27, 28, 29, 30, 31 eta 32. Irudietan kolore desberdinetako kantinplorak banan-banan aztertuko dira, eta kasu bakoitzean azalduko diren irregulartasunak komentatuko dira.

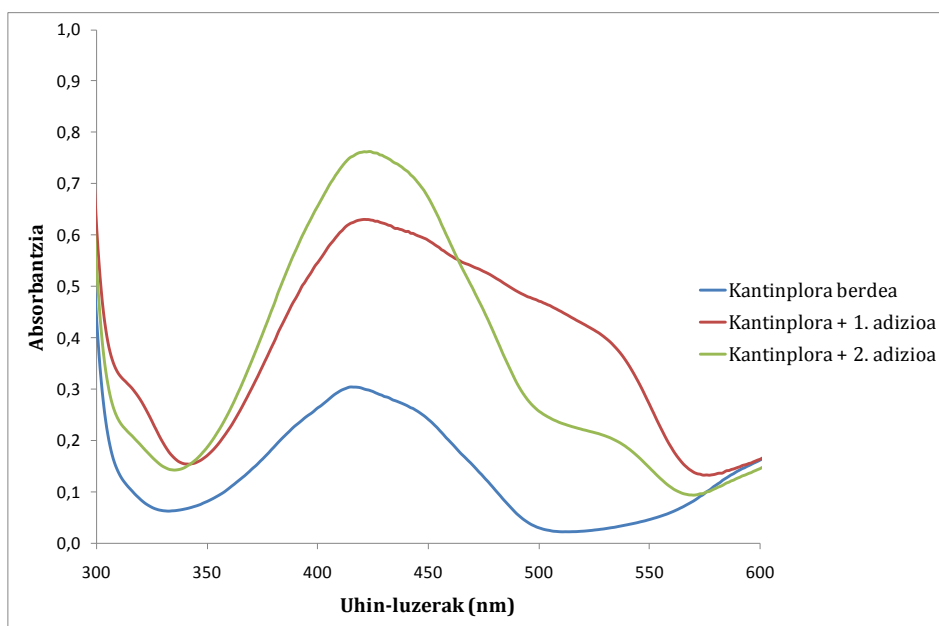
Lehendabizi, kantinplora beltza aztertuko da, 27. Irudian bere espektroak ikus daitezke.



**27. Irudia.** Kantinplora beltzaren absorbantzia espektroak.

Kantinplora beltzaren kasuan, lagin puruak absorbantzia handia du 350 nm inguruan, eta ondoren txikituz joaten da. Hau orain arteko joeraren kontrakoa da, orokorrean 350 nm ondoren handitzen zihoala. Horren ondorioz, metodoak kontzentrazio negatiboak adierazten ditu Tartrazina eta Allura gorriarentzat. Baina lagin puruaren absorbantzia kendu denez gehikuntza duten disoluzioen absorbantziei, akats hau saihesten da.

Bigarrena kantinplora berdea izango da, 28. Irudian aztertuko dira.

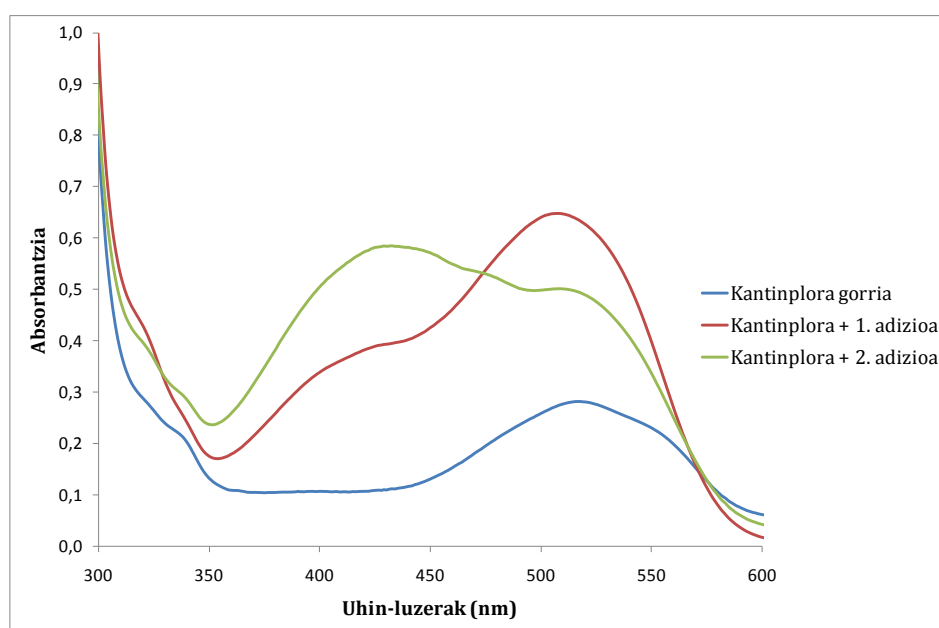


**28. Irudia.** Kantinplora berdearen absorbantzia espektroak.

Kantinplora berdearentzat, MLR modeloak Tartrazina kontzentrazio altua lortzen du, baina hau logikoa da, kolore berdea lortzeko etiketan aipatzen diren koloratzaileekin, Tartrazina (E-102) eta Urdin distiratsua (E-133) nahasi behar direla uste delako.

Allura gorri kontzentrazio oso gutxi adierazten du baita ere, baina Vahiné urdinaren kasua bezalakoa da, biak E-133 koloratzailea erabiltzen baitute.

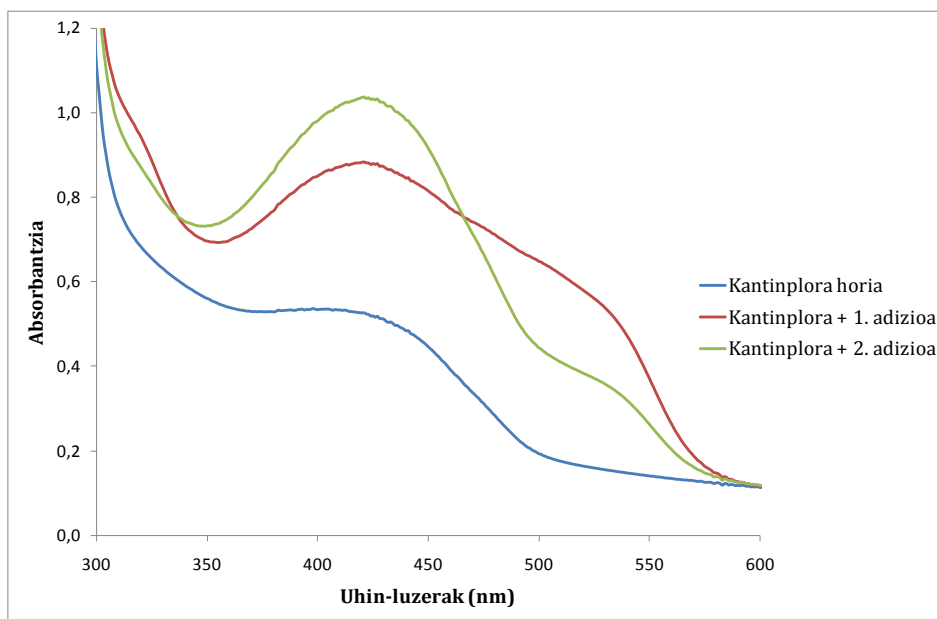
Hurrengoa kantinplora gorria izango da, 29. Irudian bere espektroak ikus daitezke.



**29. Irudia.** Kantinplora gorriaren absorbantzia espektroak.

Etiketan Allura gorria (E-129) eta E-122 koloratzaile gorriak aipatzen direnez, ezin da jakin bat bakarra edo biak erabili diren kantinplora gorrian. Vahiné gorriaren kasuan ikusi denez bi koloratzaile hauek bereiztezinak direla metodo honekin, ezin da jakin Allura gorriarentzat lortutako baloreak egokiak diren, edo E-122 koloratzailearen ondorioz aldatu diren.

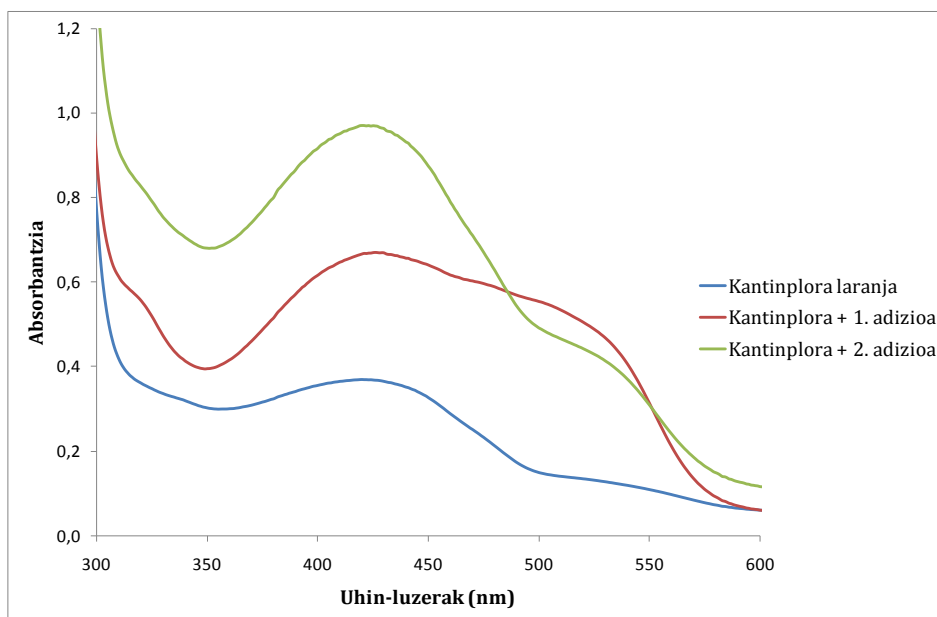
Ondoren, 30. Irudian kantinplora horia aztertuko da.



**30. Irudia.** Kantinplora horiaren absorbantzia espektoak.

Kantinplora horiaren kasuan ez ziren irregulartasunik azaldu, nahiz eta absorbantzia altua izan 350 nm inguruan, kantinplora beltzak bezala. Arrazoa izan daiteke kasu honetan ez dela zuzenean murrizten puntu horretatik aurrera.

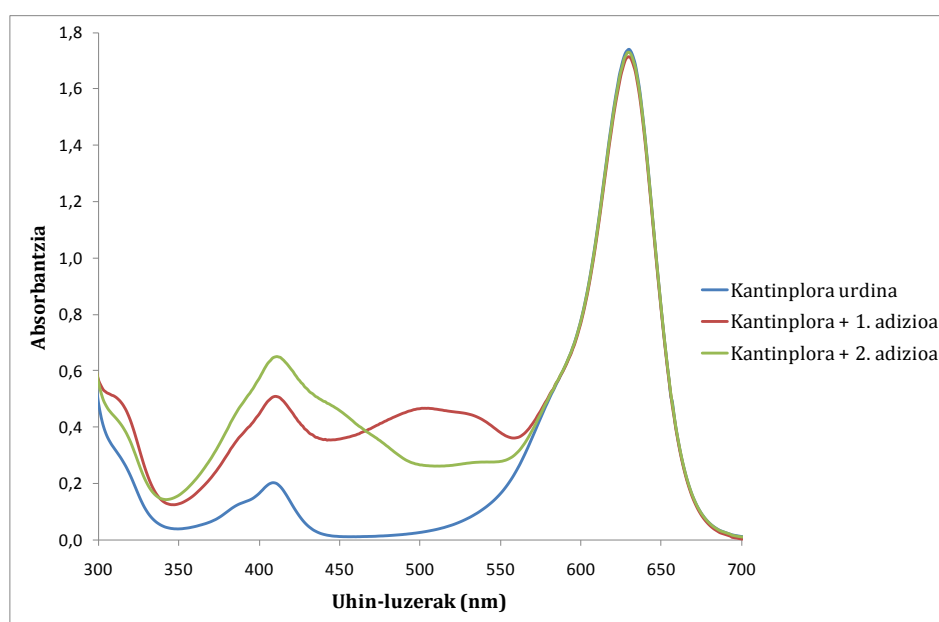
Orain kantinplora laranja aztertuko da, 31. Irudiko espektoekin batera.



**31. Irudia.** Kantinplora laranjaren absorbantzia espektoak.

Kasu honetan, kantinplora gorriaren kasuan bezala, ezin da jakin etiketan azaltzen diren bi koloratzaile gorrietatik zein erabili den, beraz, Allura gorriarentzat lortutako datuak ez dira guztiz fidagarriak. Gainera, 18. Taulan ikusi den bezala, emaitza kaxkarrak lortu dira Allura gorriaren adizioak egitean kantinplora laranja.

Azkenik, kantinplora urdina aztertuko da 32. Irudiarekin batera.



**32. Irudia.** Kantinplora urdinaren absorbantzia espektroak.

Kantinplora urdinean, Vahiné urdinean gertatzen zen bezala, Tartrazina eta Allura gorriaren kontzentrazio txikiak lortzen dira MLR modeloan, nahiz eta ez lukeen eman behar. Kolore desberdinetako kantinplorak leku berean egiten badira, izan daiteke beste koloratzaileen arrastoak gelditzea kantinplora urdinean

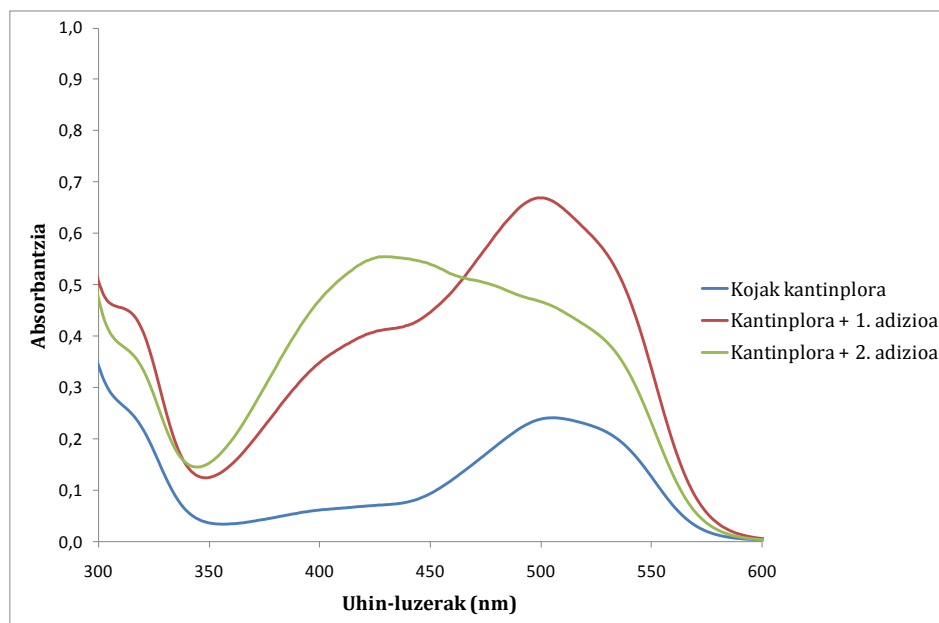
### Kojak kantinplora

Kojak kantinploraren etiketan Allura gorria duela adierazten da, baina kopurua ez duenez zehazten, ezin da lortutakoarekin konparatu. Beraz, aurretik esan den bezala, lagin puruaren absorbantzia kendu zitzaien adizioa zuten disoluzioen absorbantziari, espektrofotometroan neurtu ziren (33.

Irudian azaltzen dira absorbantzia espeketroak) eta 20. Taulako batz besteko berreskurapenak lortu ziren.

**20. Taula.** Kojak kantinplorarekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	105.33	98.62
<b>2. adizio maila</b>	103.30	97.60



**33. Irudia.** Kojak kantinploraren absorbantzia espeketroak.

Zumrok kantinplora gorrian ez bezala, kasu honetan ez ziren arazorik azaldu Allura gorriaren gehikuntzetan. Hau Zumrok kantinplora gorria E-122 koloratzailea izan dezakeelako izan daiteke, Kojak kantinplora soilik Allura gorria baitarama.

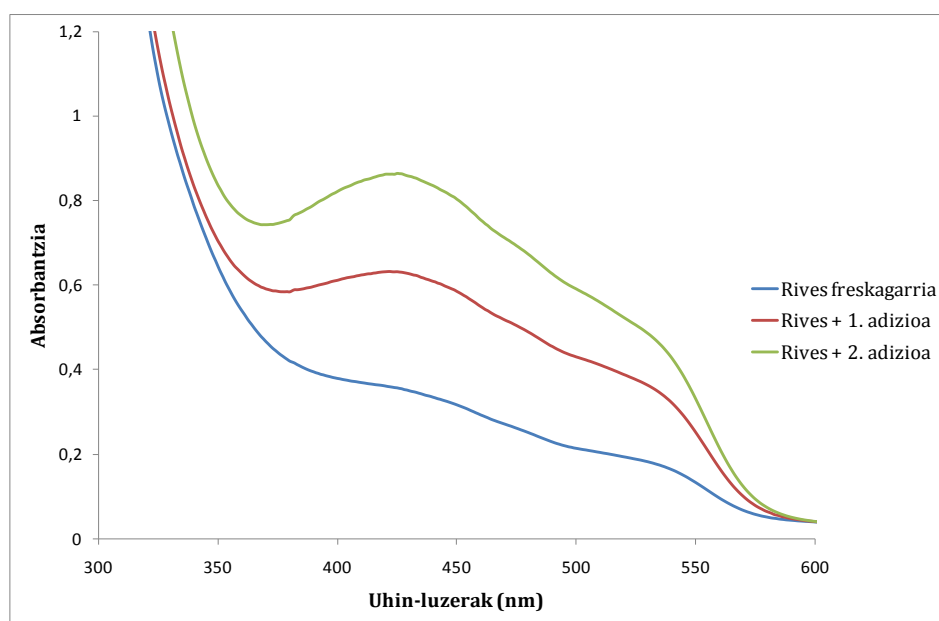
### Rives freskagarria

Rives freskagarria kolore laranja du, eta hori lortzeko Tartrazina eta Allura gorria erabiltzen dira, etiketan dionaren arabera. Kontzentrazioa ez da zehazten, beraz, zuzenean 21. Taulako batz besteko berreskurapenak kalkulatu ziren. Horretarako, orain arte bezala, gehikuntza duten disoluzioei lagin puruaren absorbantzia kendu zitzaien, eta MLR modeloan sartu ziren.

**21. Taula.** Rives freskagarriarekin lortutako bataz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	109.50	74.59
<b>2. adizio maila</b>	99.05	76.95

Baina kasu honetan, arazo berri bat aurkeztu zen. Freskagarriak Tartrazina eta Allura gorria zituen arren, MLR modeloak bien kontzentrazio negatiboak lortu zituen. Hau freskagarriak 350 nm-tan duen absorbantzia altuaren ondorio izan liteke, 34. Irudian ikus daitekeen bezala.



**34. Irudia.** Rives freskagarriaren absorbantzia espektrouak.

Kantimplora beltzaren kasuan ez bezala, lugin puruaren absorbantziaren efektua ezabatzean lortutako emaitzak oso txarrak ziren. Beraz, 20. Taulako emaitzak lortzeko, beste MLR modelo bat sortu zen, 400 – 550 nm tarteko uhin luzerak erabiliz. Behin modelo berria sortu zenean, luginen ohiko tratamendua jarraitu zen freskagarriarekin, bi koloratzaileentzat kontzentrazio positiboak lortuz.

Hala ere, Allura gorriaren berreskurapen datuak kaxkarrak dira, baina ez da aurkitu beste uhin luzera tarterik modelo berriak sortzeko eta emaitza horiek hobetzeko.

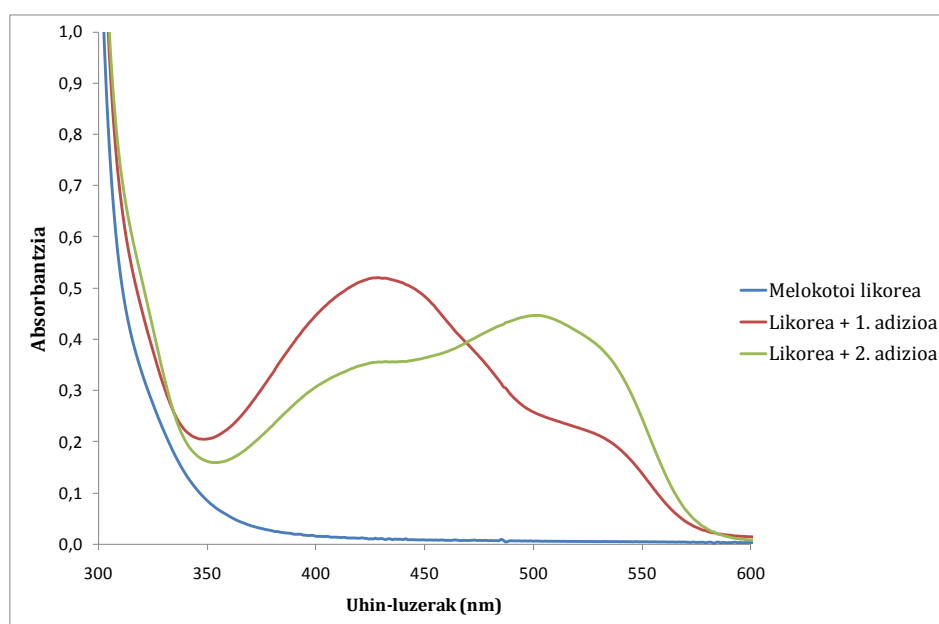
## Mayerling melokotoi likorea

Alkoholik gabeko likore hau ez du kolorerik, beraz ez ditu interferentziarik sortuko dituzten beste koloratzailerik. Hala ere, betiko prozedura jarraitzerakoan, irregulartasun bat azaldu zen: lagin puruaren absorbantzia oso baxua da, 0 ingurukoa, 35. Irudian ikus daitekeen bezala, eta kontzentrazioa kalkulatzean, Tartrazina eta Allura gorri kantitate negatiboak lortu ziren, baita berreskurapen balore baxuak ere.

Lehen prestatutako MLR modelo berriarekin saiatzean, berreskurapen balore hobetoak lortu ziren, 22. Taulan ikus daitezkeenak. Hala ere, Allura gorri berreskurapen baloreak oraindik pixka bat baxuak lortu ziren.

**22. Taula.** Mayerling likorearekin lortutako bataz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	105.32	86.11
<b>2. adizio maila</b>	97.69	85.21



**35. Irudia.** Melokotoi likorearen absorbantzia espektroak.

Lagin puruaren absorbantzia oso baxua da, kolorega delako. Horren ondorioz, adizioen eragina absorbantzia espektroetan oso nabarmena da. Hala ere MLR modeloak aipatutako arazoak izan ditu kontzentrazioak kalkulatzekoan.



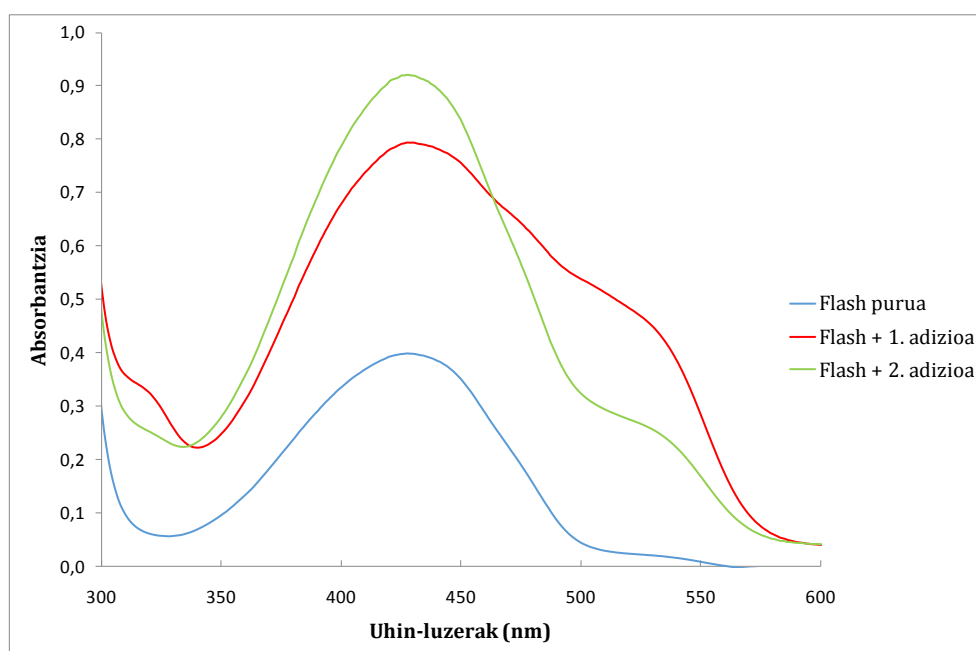
## Kelia flashak

Flash hauen etiketan Tartrazina, Allura gorria eta E-122 koloratzaileak aipatzen dira beste batzuen artean. Laranja zaporeko flashak erabili ziren, beraz koloratzaile horia eta gorria zituzten bere barnean, baina ezin izan zen jakin zein koloratzaile gorri zuten zehazki.

Beti bezala, absorbantzia espektroak lortu ziren, 36. Irudikoak, eta behin lagin puruaren absorbantziak kenduta, 23. Taulan azaltzen diren berreskurapenak kalkulatu ziren MLR modeloa erabiliz.

**23. Taula.** Kelia flashekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	104.88	95.89
<b>2. adizio maila</b>	97.11	87.53



**36. Irudia.** Kelia flashen absorbantzia espektroak.

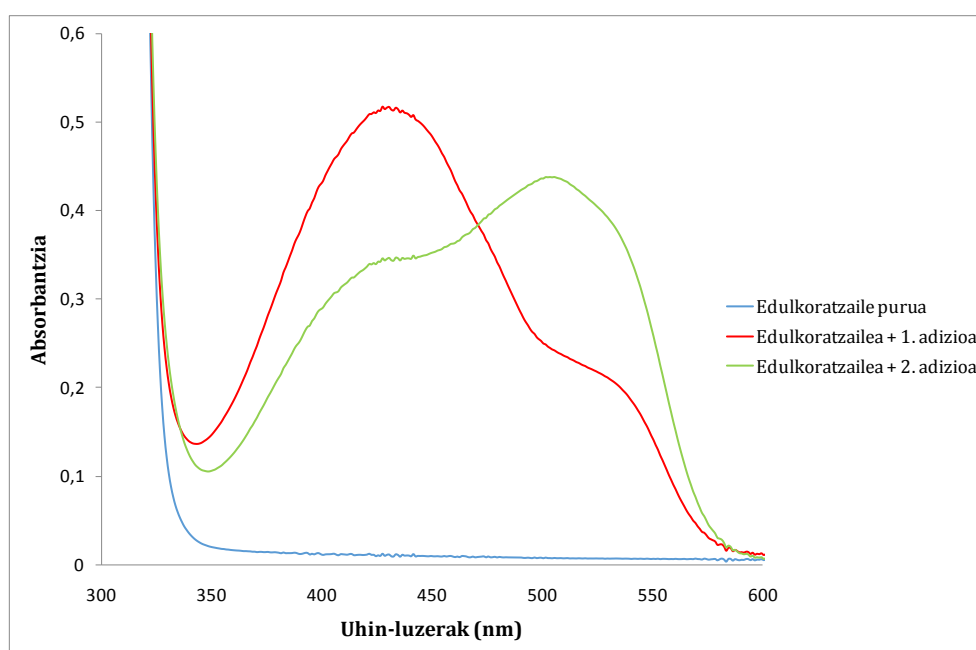
## Auchan edulkoratzaile likidoa

Edulkoratzaile likido hau ere kolorea da, melokotoi likorea bezala, eta oso absorbantzia gutxi adierazten du 37. Irudian ikus daitekeen bezala. Baina ez ditu kontzentrazio negatiboak ematen Tartrazina eta Allura gorriarentzat, baizik eta 0 mg/L ingurukoak.

Horregatik, lehendabizi sortu zen MLR modeloa erabili zen berreskurapenak kalkulatzeko, eta emaitzak 24. Taulan azaltzen dira.

**24. Taula.** Auchan edulkoratzailearekin lortutako batz besteko berreskurapenak.

	Tartrazina (%)	Allura gorria (%)
<b>1. adizio maila</b>	106.59	87.19
<b>2. adizio maila</b>	104.38	86.94



**37. Irudia.** Edulkoratzaile likidoaren absorbantzia espektroak.

Edulkoratzaileak, likoreak ez bezala, bere kontzentrazioa ia 0 bihurtzen da 350 nm aurretik, beraz, aztertutako tartean, 350 – 530 nm tartean, absorbantzia nahiko konstantea da. Hau izan daiteke modelo berria erabili behar ez izatearen arrazoia.

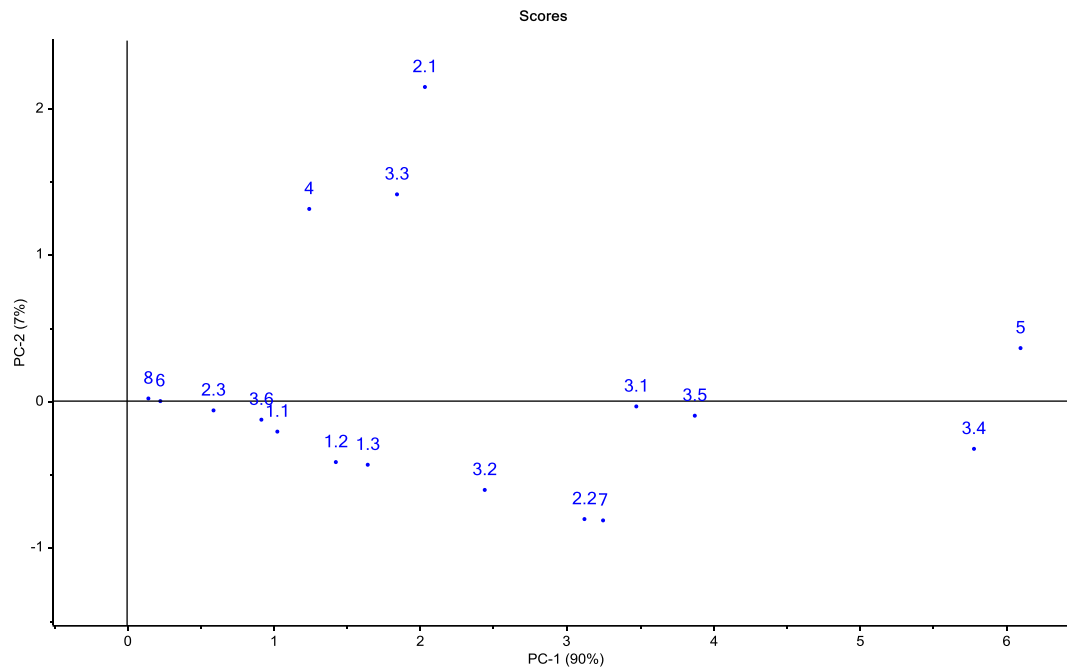
## 5.6 Laginen osagai nagusien analisisia

Atal hau amaitzeko, lagin guztiekin PCA bat egin zen, hauek nola banatzen ziren aztertzeko. Erabilitako laginak erabilera eta ezaugarri desberdinak dituztenez, hauek sailkatzeko tresna egokia baita. Lortutako Scores grafikoa 38. Irudian ikus daiteke.

Lagin guztien izenak jarrita, ez ziren argi ikusten irudian, beraz, zenbakiak jarri ziren hauen ordeiz. Zenbaki bakoitza lagin bateri lotuta dago, 25. Taulan ikus daitekeen bezala.

25. Taula. Lagin puruen PCA zenbakiak.

PCA zenbakiak	Lagina
1.1	Ducros koloratzaile solidoa
1.2	Kania koloratzaile solidoa
1.3	Hacendado koloratzaile solidoa
2.1	Vahiné gorria
2.2	Vahiné horia
2.3	Vahiné urdina
3.1	Kantimplora beltza
3.2	Kantimplora berdea
3.3	Kantimplora gorria
3.4	Kantimplora horia
3.5	Kantimplora laranja
3.6	Kantimplora urdina
4	Kojak kantimplora
5	Rives freskagarria
6	Melokotoi likorea
7	Kelia flashak
8	Edulkoratzaile likidoa



### 38. Irudia. Lagin puru guztiekin egindako PCA.

PCA grafikoa aztertzerakoan, lehendabiziko gauza PC bakoitzak adierazten duen bariantza aztertzea da. Kasu honetan, PC-1 % 90 azaltzen du, eta PC-2 % 7, beraz, grafiko honekin azaldu gabe geratu den bariantza kopurua soilik % 3 da.

Laginen kokalekua aztertzean, atentzioa deitzen duen lehenengo puntuak 2.1, 3.3 eta 4 puntuak dira, beste guztietatik oso urrun daudelako. 25. Taula ikusiz, hauek Vahiné gorria, kantinplora gorria eta Kojak kantinplorari dagozkien zenbakiak dira. Hau da, guztiz gorriak diren hiru lagin bakarrak. Beraz, PC-2 kolore gorriaren intentsitatea azaltzen du batez ere.

Orduan, suposa daitekeen bezala, PC-1 aztertzerakoan, kolore horiaren intentsitatea azaltzen duela baieztatze da. PC-1 balore txikietan, 8, 6 eta 2.3 zenbakiak azaltzen dira, hau da, edulkoratzailea, likorea eta Vahiné urdina. Hiru hauek ez dute ez Tartrazina, ez Allura gorriarik, beraz zentzua du 0 inguruko baloreetan azaltzea. PC-1 balore handietan berriz, 5 eta 3.4 laginak azaltzen dira, hauek Rives freskagarriari eta kantinplora horiari dagozkie. Hauek kolore horia edo laranja argia dute, beraz zentzuzkoa da balore handietan azaltzea.

## 6 ONDORIOAK

---

Lan honen hasieran adierazi den bezala, helburu nagusia Tartrazina eta Allura gorriaren kontzentrazioa determinatzea izan da. Horretarako metodo unibariantea eta anizkoitza garatu da ultramore – ikuskor espektrofotometria teknika erabiliz. Datuen tratamendurako aldagai anitzeko erregresio lineala (MLR) erabili da, absorbantzia datuak kontzentrazio datuak bihurtzeko. Ondoren, metodoaren kalitate parametro analitiko garrantzitsuenak aztertu dira.

Behin metodoa garatuta, kalitate parametroak aztertzean bi analitoentzat, emaitza arrakastatsuak lortu izan dira; hala nola, 0.9999-ko korrelazio koefizienteak 2 – 20 mg/L kontzentrazio tartean, eta 0.08 – 0.10 mg/L tarteko LOD baloreak.

Lagin errealekin ere emaitza onak lortu izan dira, kasu batzuetan izan ezik. Analitoen antzeko absorbantzia duten interferentziak daudenean, analitoaren determinazioa eragozten du; adibidez, Azorubina (E-122) eta E-129 Allura gorria (E-129). Horretarako, datu tratamendu aurreratuago eta sendoago bat erabili beharko litzateke.



## 6 CONCLUSIONS

---

As explained at the beginning of this work, the main objective was to determine Tartrazine and Allura red concentrations. For that, a univariate and multivariate method has been developed using ultraviolet – visible spectrophotometry technique. For the data processing Multiple Linear Regression (MLR) has been used, to convert absorbance data into concentration data. Then, the most important analytical quality parameters were studied.

Once the method was developed, quality parameters were measured for both analytes, where successful data were obtained, such as 0.9999 correlation coefficients in 2 to 20 mg/L concentration range and LODs between 0.08 and 0.10 mg/L.

With real samples satisfactory results have been obtained too, except in some cases. When there are interferences with absorbance that resembles analytes absorbance, hinders the determination of the analyte; for example, Azorubine (E-122) and Allura red (E-129). For that, it would have to use a more advanced and robust data treatment.





# 7 BIBLIOGRAFIA

---

- 1 F. C. Ibañez, P. Torre, A. Irigoyen. "Aditivos alimentarios" **2003**. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad Publica de Navarra.
- 2 N. Yoshioka, K. Ichihashi. "Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection" **2007**. *Talanta* Vol 74 (1408-1413).
- 3 K. Rovina, S. Siddiquee, S. M. Shaarani. "Extraction, Analytical and advanced methods for detection of Allura red AC (E 129) in food and beverages products" **2016**. *Frontiers in Microbiology* Vol 7.
- 4 K. Rovina, S. Siddiquee, S. M. Shaarani. "A review of extraction and analytical methods for the determination of Tartrazine (E 102) in foodstuffs" **2017**. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*.
- 5 S. W. Oh, M. N. Kang, C. W. Cho, M. W. Lee. "Detection of Carcinogenic Amines from Dyestuffs or Dyed Substrates" **1997**. *Dyes and Pigments* Vol 33, Issue 2 (119-135).
- 6 H.M. Pinheiroa, E. Touraudb, O. Thomas. "Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters" **2004**. *Dyes and Pigments* Vol 61 (121-139).
- 7 A. Pielesz, I. Baranowska, A. Rybak, A. Włochowicz. "Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes" **2002**. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol 53 (42-47).
- 8 Diario Vasco (**2016**ko iraila). Los efectos secundarios del Dalsy.
- 9 El Mundo (**2016**ko iraila). Facua reclama una advertencia en el prospecto de Dalsy sobre los efectos secundarios de su colorante.
- 10 Commission regulation (EU) N° 1129/2011. (12.11.2011). Commission regulation (EU) N° 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing Union list of food additives. *Off. J. Eur. Union*, (L 295/1-177).

- 11 Y. Shen, X. Zhang, W. Prinyawiwatkul, Z. Xu. "Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products" **2014**. *Food Chemistry* 157 (553-558).
- 12 AOAC International; Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. **2012**. AOAC Official Methods of Analysis.
- 13 D. C. Harris. "Análisis químico cuantitativo" Ed 3. **2003**. Editorial Reverté.
- 14 J. N. Miller, J. C. Miller. "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry" Ed 4. **2005**. Prentice Hall.
- 15 C. Mongay. "Quimiometria" **2005**. Publicaciones de la Universidad de Valencia.
- 16 N. Kumar, A. Bansal, G.S. Sarma, R. K. Rawal. "Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview" **2014**. *Talanta* 123 (186-199)
- 17 J. M. Rodriguez-Nogales, F. Vázquez. "Application of electrophoretic and chemometric analysis to predict the bovine, ovine and caprine milk percentages in Panela cheese, an unripened cheese" **2007**. *Food Control* 18 (580-586).
- 18 M. Otto. "Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry" 2. Ed. **2007**. Wiley-VCH
- 19 K. Varmuza, P. Filzmoser. "Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics". **2009**. CRC Press.