

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

KIMIKA FAKULTATEA
FACULTAD DE QUÍMICA

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

Kimika Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

Elikagai zein edarrietako sulfitoen determinazioa irudi digitalen analisisan
oinarrituta.

Egilea: Izaro Oiarbide Beain

Zuzendaria: Ane Bordagaray Eizaguirre

Donostia, 2024ko ekaina

GIPUZKOAKO CAMPUSA
CAMPUS DE GIPUZKOA
Pº. Manuel de Lardizabal, 3
20018 DONOSTIA-SAN SEBASTIAN
GIPUZKOA

Aurkibidea

Aurkibidea	1
Laburpena	3
Abstract	3
Garapen iraunkorreko helburuen (GIH) identifikazioa eta gogoeta	4
1. Sarrera	6
1.1. Sulfitoak	6
1.2. Sulfitoen oreka	7
1.2. PRAn oinarritutako erreakzioa	8
1.3. Espektroskopia UM-Ikuskorra	10
1.4. Ripper metodoa	12
1.5 Irudi digitalen analisia	13
1.6. Adizio estandar metodoa	16
1.7. Metodoen balidazioa	17
1.7.1. Zehaztasuna	18
1.7.2. Prezisioa	18
1.7.3. Selektibitatea	19
1.7.4. Sentikortasuna	19
2. Helburuak	20
3. Atal esperimentala	21
3.1. Materiala	21
3.2. Ekipoak eta softwarea	22
3.3. Erreaktiboak eta disoluzioak	22
3.4. Laginak	23
3.5. Prozedura	23
3.4.1. Ultramore ikuskorra	23
3.4.2. Irudi digitalen analisia	23
3.4.3. Adizio estandar metodoa	25
3.4.4. Ripper metodoa	26
4. Emaitzak eta eztabaida	26
4.1. Kalibrazio-kurba	26
4.2. Argazki egoera egokienaren aukeraketa	29
4.3. Ripper metodoa	31
4.4 Laginen analisia irudi digital bidez	32
4.5. Adizio estandar metodoa irudien analisisian	34
Ondorioak	41
Conclusions	42
Bibliografia	43
Eranskinak	46

Laburpena

Ardoak eta ozpinak izan ditzaketen sulfito kontzentrazioak determinatzea izan da lan honen helburu nagusia. Horretarako, sulfitoek pararosanilina hidrokloruro (PRA) errektiboaren presentzian ematen duten erreakzio kolorimetrikoa hartu da oinarritzat. Erreakzio horren jarraipena irudi digitalen analisiaren bidez egin ahal izateko metodo bat garatu nahi izan da.

Irudi digitalen analisi metodoa balioztatzeko asmoarekin beste bi teknika erabili dira erreferentziazat. Alde batetik, ultramore ikuskorra, eta bestetik, Ripper metodoa, enologian sulfre dioxidoa determinatzeko oso erabiliak diren balorazioetan oinarritutakoa.

Teknika ezberdinekin lortutako emaitzak bat ez zetoze ikusirik, matrize efektu posible baten eragina planteatu da, hori ziurtatzeko adizio estandar metodoa erabiliz.

Abstract

The main objective of this work is to determine the amount of sulphites in wine and vinegar. For this purpose, the analysis has been based on the colorimetric reaction of sulphites in the presence of pararosaniline hydrochloride (PRA) reactive. The idea is to develop a method for monitoring this reaction through the analysis of digital images.

In order to validate the digital image analysis method, two other techniques have been used as a reference. On the one hand, the visible ultraviolet, and, on the other hand, the Ripper method, which is highly used for the determination of sulfur dioxide in enology.

Seeing that the results obtained from the various techniques were not consistent, the result of a possible matrix effect has been considered, using the standard additive method to ensure it.

Garapen iraunkorreko helburuen (GIH) identifikazioa eta gogoeta

Garapen Iraunkorrerako 17 helburuak pertsona orok etorkizun hobe eta jasangarriago bat bizi ahal izateko diseinatuak izan dira. Edozein proiektu txiki helburu hauekin lotuz planeta eta bertako populazioa babestearen alde egin daiteke. Helburu bakoitzaren arloan hobekuntzak proposatzea erronka zaila izan daiteke zenbait kasutan, baina eragin negatiborik ez egotea ere aurrerapauso txiki bat da, positiboki baloratua izan daitekeena.

Zaila da lan arlo guztietan helburu bakoitzarekin loturak ezartzea. Hau da, proiektu bakoitzak erlazio zuzenagoa izango du helburuetako batzuekin besteekin baino, eta horretan zentratzea da gakoa. Hasteko, aipatzekoa da lan honetako oinarrizko erreaktiboaren toxikotasuna. Egia da beharrezkoak diren neurriak hartu ezean, arriskutsua izan daitekeela. Hori da pixka bat arlo honetan “Osasuna eta ongizatea” (3. helburua) eta “Lan duina” (8. helburua) bezalako helburuekin aldarrikatzen dena; jakina da lan inguru guztiek ez dutela segurtasun maila bera, baina pertsona orok du segurtasun minimo baterako eskubidea, eta zorionez, gaur egun laborategietan baditugu segurtasuna bermatzen diguten baliabideak: garrantzitsua da eskuartean darabilgun produktua zer den jakitea (horretarako ditugu erreaktiboaren segurtasun fitxak), kontziente garen momentutik ingurune seguruago bat bermatuko diguten neurriak hartu ahal izateko.

Hala ere, ikerketa lan honek harremanik estuena 12. helburuarekin daukala esango nuke: “ekoizpen eta kontsumo arduratsuak”. Alde batetik, irudi digitalen analisia lagin eta erreaktibo kantitate txikiak erabiltzen dituen metodoa izanik, hondakinen murrizketaren alde egiten duelako. Bestetik, kontsumo arduratsuago bat bermatu nahiaren zentzutik ikus daiteke lan hau: kontziente al gara sulfitoek gure osasunean izan ditzaketen eraginetan? Proiektu honetan proposatutako metodoa guztiz garatuz gero, modu eraginkor eta simple batean elikagaien etiketetan sulfito kontzentrazioa adieraztea erraztu liteke, kontsumitzen dugunaren inguruko behar adina informazio edukitzeko eskubidea baitugu, gure osasunaren segurtasuna gertutik zaindu ahal izateko.

Hori gutxi balitz, badaude modu ez hain zuzenean lan honekin lotu daitezkeen beste helburu batzuk ere. Adibidez, irudi digitalen analisia mundu berri samarra izanik, 9. helburuak (“Industria, berrikuntza eta azpiegitura” deiturikoak) aldarrikatzen duen berrikuntzaren alde egiten du, indarra hartzen ari den ikerketa arlo bat sustatuz.

Laburbilduz, ikerketa lan hau hau kimikako proiektu bat izanik, argi dago badaudela ekidin ezin daitezkeen puntu batzuk; hondakinen ekoizpena, esaterako. Baina desabantaila horien barnean onenera joaten saia gaitzke, saihestezinak diren eragin negatibo horiek murrizteko helburuarekin. Orokorrean, lan honek GIH bat baino gehiagori positiboki eragiten diela esango nuke.

1. Sarrera

1.1. Sulfitoak

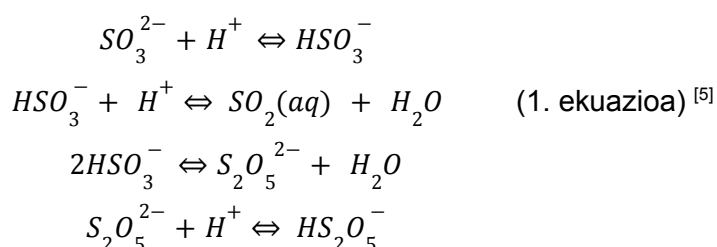
Sufre dioxidoa aspaldidanik izan da ezaguna bere ahalmen purifikatzaileagatik eta gaur egun bere deribatuak oso erabiliak dira kontserbatzaile gisa elikagai zein farmazia industrietan. Sodio sulfito, potasio sulfito, bisulfito eta metabisulfito bezalako konposatuek elikagaietan efektu antimikrobiano eta antioxidatzaileak dituzte; elikagaien marroitzea atzeratzeaz gain, haien hondatzea saihesten dutenak, denbora luzeagoz kontsumigarri mantendu daitezten. ^[1]

Elikagaietan ez ezik, edari ahalkoldunetan ere presentzia garrantzitsua dute sulfuren deribatu horiek. Ardoaren kasuan, adibidez, ezinbestekoak dira sulfitoak. Azetaldehidoa ardoari zaporea ematen dion konposatua da, baina garrantzitsua da haren kontzentrazioa kontrolatzea, kantitate handiegietan kaltegarria izan baitaiteke guretzat. Fermentazioaren ondoren, alkoholak atmosferako oxigenoarekin erreakzionatu dezake, gehiegizko azetaldehido kontzentrazioak emanez. Hori kontrolatzen laguntzen dute SO₂-ren deribatuak, azetaldehidoarekin lotura egonkorak osatuz. Sulfitoari lotutako azetaldehido hori inaktibo bihurtzen da. ^[2]

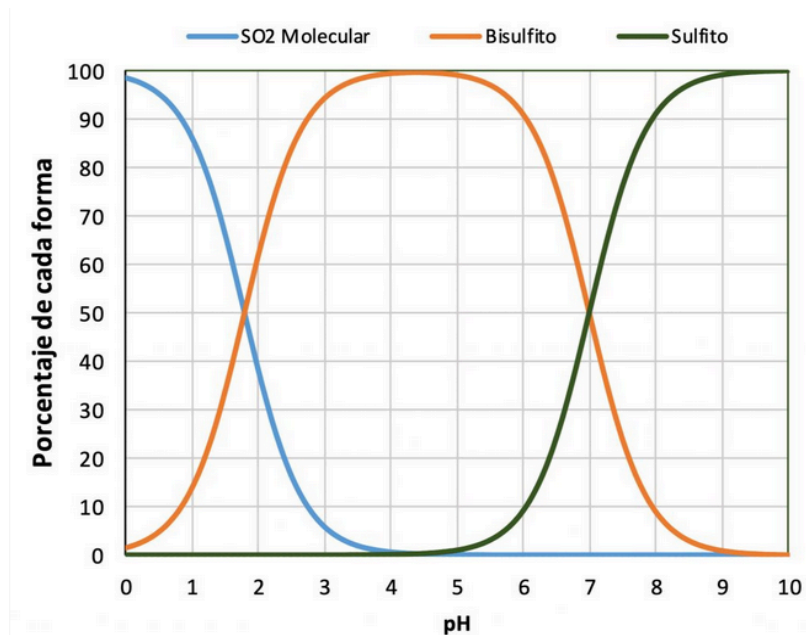
Itxuraz segurtasuna bermatzen diguten konposatuak badira ere, XX.mendeko 70.hamarkadaz geroztik segurtasun hori zalantzan jarri duten ikerketak martxan daude. Sulfitoak urtikaria, dermatitisa eta hipotentsioa bezalako zenbait sintomen eragile izan daitezkeela ikusi da. Hori gutxi baliz, paziente asmatikoetan ondorio are larriagoekin erlazionatu dira konposatu horiek, arnasbideak ixtea eragin baitezakete. ^[1] Horregatik, 1986an FDAk (United States Food and Drug Administration) derrigorrezkotzat jo zuen 10 mg/L-ko muga gainditzen duten produktuen etiketatzea, sulfito kontzentrazioari buruzko informazio zehatza ahalbidetuz. ^[3]

1.2. Sulfitoen oreka

Sufre dioxidoa (SO_2) ardoa bezalako ur-ingurune batean gehitzen denean, oreka kimiko konplexu bat osatzen duten forma kimiko desberdinak agertzen dira. 1.ekuazioan ikus daitezke presente egon daitezkeen espezie kimikoak: SO_2 molekularra, bisulfito ioia, sulfito ioia eta azido sulfurosoa (zaila da disoluzioan bere presentzia determinatzea ezegonkorra delako). Hori gutxi balitz, bisulfito ioiaren dimerizazioak disulfitoaren agerpena eragin dezake disoluzioan. Forma kimiko horiek sulfuroso askea deritzona osatzen dute, baina sulfitoak beste konposatu batzuekin elkarturik ere egon daitezke (azetaldehidoarekin, esaterako), aktibitate gutxiagoko konplexuak osatuz. Azken talde horri sulfuroso konbinatua deitzen zaio. Sulfito aske eta konbinatuen arteko baturak sulfuroso totala ematen du, legedirako erreferentzia bezala hartzen den parametroa. ^[4]



Oreka horien lerratzean eragina duen parametro garrantzitsuenetako bat pHa da, horrek baldintzatuko baitu inguruneke protoi kontzentrazioa. 1. Irudiak erakusten du inguruneke pHaren aldaketak zer nolako eragina duen espezie kimiko bakoitzaren kontzentrazioan. Ardoaren eta ozpinaren pHak 3,0-4,0 eta 2,5-3,0 tartetean kokatu ohi dira hurrenez hurrenez. Ondorioz, ikus daiteke bisulfitoa izango dela gailenduko den espeziea. ^[4]



1. Irudia. pHak sulfitoen orekan duen eragina. [4]

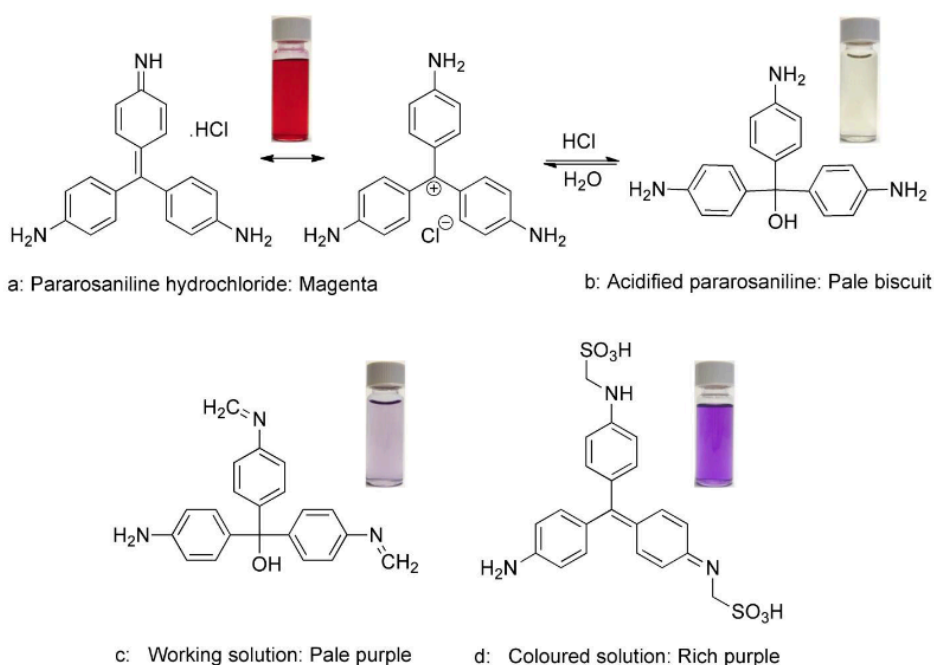
Sulfitoen oreka ulertzea garrantzitsua da elikagai eta edarien industrietan, non sulfitoak kontserbatzaile gisa erabili ohi diren. loi desberdinen presentziak eragina du produktuen zaporean, kolorean eta egonkortasunean; beraz, funtsezkoa da sulfito-mailak zaintzea eta kontrolatzea.

1.2. PRAn oinarritutako erreakzioa

Sulfito askeak determinatzeko erabilitako teknika kolorimetriko ezagunenetako bat pararosanilina hidrokloruroan (PRA) oinarritutakoa da. PRA konjokazio maila altuko amino gatz bat da, fuksina koloratzailearen osagaietako bat. Erreaktibo hori azido klorhidrikoarekin eta formaldehidoarekin nahastean more argi koloreko ur disoluzio bat lortzen da, sulfitoekin kontaktuan more intentsuago bilakatzen dena. Kolore aldaketa horrek ahalbidetzen du absortzio espektroskopikoan oinarritutako sulfitoen determinazio kuantitatorako erabilgarria izatea. [6]

Erreaktiboa azidoarekin eta aldehidoarekin nahastean hemiaminal (-NHCH₂OH) bat sortzen da, gero sulfitoek emango duten erreakzioan beharrezkoa izango den bitartekari aktiboa. Behin bitartekari hori sortua dagoenean, sulfitoen gehikuntza ondoren nahikoa dira 6-8 minutu kolore aldaketa antzemateko. [7]

2. Irudian ikus daitekeen bezala kolore aldaketa hori begibistakoa izango da: sulfitoei gehituko zaien disoluzioa more oso argia izango da (2c irudia) eta erreakzioaren ondorengoa, aldiz, erreaktibo molekularak sulfitoekin osatutako lotura dela medio, more iluna izango da (2d). Kolore aldaketa horrek sulfitoen presentzia ziurtatuko digu, eta aurrerago ikusiko dugun bezala, koloreak berak behar bezainbeste informazio kimiko eskainiko digu, analisi kuantitatibo bat egitea ahalbidetuko diguna.

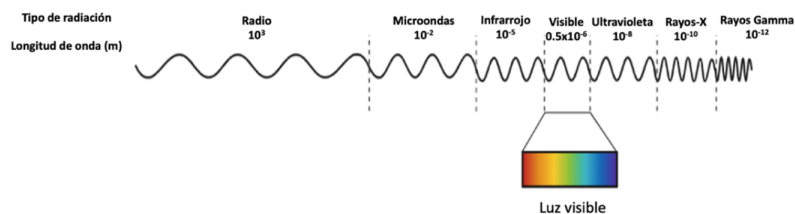


2. Irudia: PRA erreaktiboaren kolorea erreakzioaren puntu ezberdinetan. [6]

Sulfitoak ez dira oso egonkorak, atmosferako oxigenoaren presentzian oxidatuak izan baitaitezke. Disoluzio bat ordu betez airearekin kontaktuan edukiz gero sulfito kantitate totalaren %2 galdu dezake. Oxidazio prozesu hori are gehiago bizkortzen da metal ioien presentzian. Hori dela eta, PRA eta sulfitoen arteko erreakzio ingurune honetara EDTA gehitzen da, ioi hoiak maskaratu eta sulfitoen egonkortasuna pixka bat hobetze aldera. [5]

1.3. Espektroskopia UM-Ikuskorra

Espektrometriak analitoaren kontzentrazioak determinatzeko argiaz baliatzen diren teknikak biltzen ditu. Argia uhin moduan deskriba daiteke, uhin luzera (λ) eta maiztasuna (ν) bezalako parametroak zehaztuz. Espektroskopia mota desberdinak ezagutzen dira, erabilitako argiaren maiztasun eta uhin luzeraren arabera sailkatzen direnak. Hurrengo irudian (3. Irudia) espektro elektromagnetikoa ikus daiteke, zeinak eremu bakoitzeko argiaren ezaugarriak erakusten dituen. [8]



3. Irudia: Espektro elektromagnetikoa. [9]

Ikus dezakegunez, eremu ikuskorrek espektroaren frakzio txiki bat besterik ez du irudikatzen, 380 eta 780 nm arteko tartea, hain zuzen ere. Ultramoreari dagokion uhin-luzera tartea, berriz, 100 eta 400 nm artekoa da.

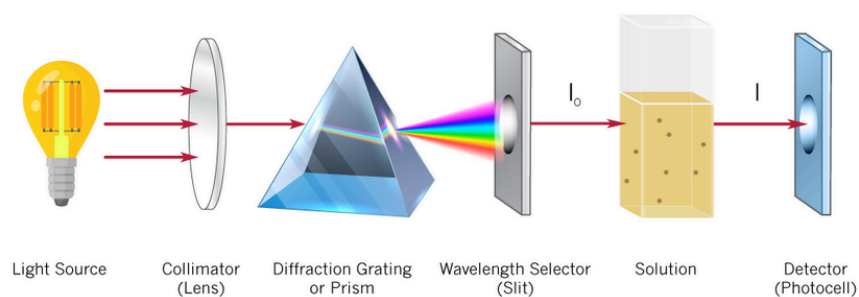
Substantzia batean argia xurgatzeko ahalmena duen molekularen zatia zatia kromoforoa deritza. Argi ikuskorra xurgatzen duen edozein substantzia koloreztatuta agertzen da gure begien bistan, kolore hori xurgatu gabeko uhin luzerei dagokiena izanik. Gure analitoak PRA erreaktiboarekin osatzen duen disoluzioaren kasuan, esaterako, absorbantzia maximoa 575nm-tan kokatzen da, eta 1. Taulan ikus daitekeenez, horrek ahalbidetzen du guk kolore morea ikustea. [8]

1.Taula: Argi ikuskorraren koloreak.

Wavelength of maximum absorption (nm)	Color absorbed	Color observed
380–420	Violet	Green-yellow
420–440	Violet-blue	Yellow
440–470	Blue	Orange
470–500	Blue-green	Red
500–520	Green	Purple
520–550	Yellow-green	Violet
550–580	Yellow	Violet-blue
580–620	Orange	Blue
620–680	Red	Blue-green
680–780	Red	Green

Uhin moduan ez ezik, partikula moduan ere defini daiteke argia, energia daramaten eta fotoi deritzen partikula elementalez osatua baitago. Erradiazio ikuskorrak zein ultramoreak elektroiek energia altuagoko orbitaletara jauzi egitea eragiten dute. Molekula batek fotoi bat absorbatzean, bere energia maila igo egiten da; kasu horretan molekula egoera kitzikatura igaro dela esaten da. Bestalde, molekulek fotoiak erradiazio bidez igortzeko ahalmena ere badute, molekularen energia maila txikiagotuz. Energia maila baxueneko egoera horri oinarrizko egoera deritzo.

Espektrofotometro orok monokromatzaile bat du, argi iturritik datorren erradiazioa aztertu, sailkatu eta analisirako interesekoa dena besterik ez du bideratzen laginerantz. Horri esker, optimoa den uhin luzera tarte estu bateko erradiazioa da laginera heltzen dena. Gero laginak irradiazio hori xurgatu dezake edo ez, eta hori da azkenean argi detektagailuak neurtzen duena: igorritako irradiaziotik zenbat izan den xurgatua. Jarraian dagoen 4. Irudiak eskematikoki azaltzen ditu ohiko espektrofotometro baten atalak:



4.Irudiak: Ohiko espektrofotometro baten atalak. ^[10]

Espektrofotometriaren emaitzak adierazteko bi parametro erabil daitezke:

- Transmittantzia: Lagina zeharkatuz absorbatua izan ez den irradiazioaren (P) eta hasieran igorritakoaren (P₀) arteko erlazioa.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2.\text{ekuazioa})$$

- Absorbantzia: Lagineko espezie absorbatzaileen kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala, laginak egoera kitzikatura igaro ahal izateko xurgatutako irradiazioa neurtzen baitu.

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (3.\text{ekuazioa})$$

Argi absorptzioaren Lambert-Beerren legea oso erabilia da kimika analitikoan. Ekuazioan argi ikus daiteke absorbantziaren eta analitoaren kontzentrazioaren arteko proportzionaltasun erlazioa:

$$A = \varepsilon * b * c \quad (4.\text{ekuazioa})$$

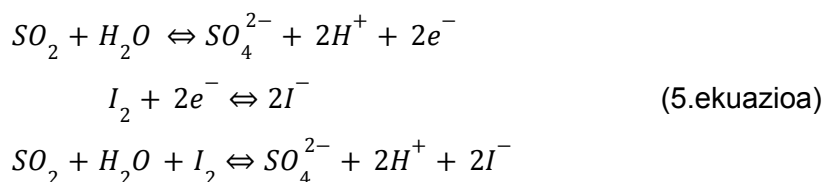
A: absorbantzia; ε : absorptibitate molarra (M⁻¹cm⁻¹); b: kubetaren zabalera (cm); c: laginaren kontzentrazioa

Ultramore-ikuskor espektroskopian lagin likidoak analizatu ohi dira kubeta izeneko ontzitxoetan. 1cm-ko luzera duten SiO₂-z egindako kubetak izan ohi dira erabilienak, beirazkoak ez baitira egokiak ultramorerako, beirak berak irradiazio ultramorea xurgatzen duelako.

1.4. Ripper metodoa

Ripper metodoa oso erabilia da enologian ardoen sulfuroso kantitatea determinatzeko. Sulfuroso hori askea izan daiteke (indar antiseptiko gehien duena), edo konbinatua, azetaldehidoarekin konplexu bat osatuz aurkitzen dena, esaterako. Bi sulfuroso horien arteko baturak sulfuroso totala ematen du.

Balorazio iodometriko honetan baliokidetza puntua metodo potentsiometriko baten bidez determinatzen da. Sulfito disoluzioari ioduro (I⁻) soberakina gehitzen zaio eta baloratzailer gisa iodatoa (IO₃⁻) erabiltzen da. Ioduroaren presentzian iodatoak I₂ ematen du, eta in situ sortutako iodo horrek berehala sufre dioxidoarekin erreazionatzen du, sulfato eta ioduroa emanez. ^[11]



Elektrodo moduan platinozko xafra erabiltzen da (elektrodo bikoitzekoa). ^[12] Bi elektrodoen artean korrante intentsitate konstante bat ezartzen da, eta hori konstante mantendu dadin potentsial diferentzia bat aplikatu beharko zaio sistemari. Aplikatu beharreko potentsial hori aldakorra izango da momentu bakoitzeko disoluzioaren konposizioaren arabera.

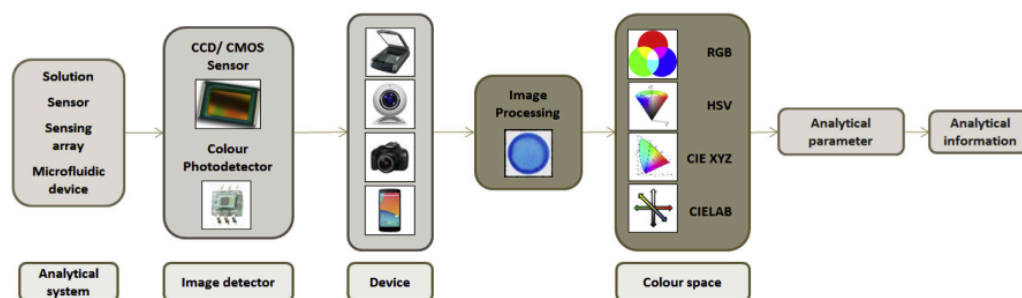
Baliokidetza puntuaren aurretik oxidatzen den espeziea ioduroa da. Disoluzioan sulfitoak, protoiak eta ura egongo dira nagusiki. Kontuan izanik horietako bakar batek ere ez duela izaera oxidatzaile sendoa, denbora tarte horretan kanpotik aplikatutako potentsiala handitzen joango da ura erreduzitu dadin. Baliokidetza puntura iritsi ostean, ordea, I₂ agertuko da, eta hau erraz erreduzitzen den espezie elektroaktiboa izanik, potentsial diferentziak beherakada nabarmena jasango du.

Potentsial aldaketaren beherakada hori nahikoa da balorazioa amaitutzat emateko, baina nahi izanez gero almidoia erabil daiteke adierazle bezala, I₂ -ak kolore marroi oso ilun bat hartzen baitu bere presentzian. ^[12] Xahututako IO₃⁻ bolumena erabiliko da SO₂ kontzentrazioa kalkulatu ahal izateko.

1.5 Irudi digitalen analisisa

Irudi digitalen analisisa azken urteetan garrantzia handia hartu duen analisi teknika da. Argazki gailu batekin argazki digital bat atera eta erreazio baten jarraipena egitea ahalbidetzen du, determinazio kolorimetriko bidez. Teknika merke eta azkartzat hartzen da, eta abantaila nagusia argazki gailuen eramangarritasuna da, in situ eta real time analisiak egiteko aukera eskainiz. ^[13]

Irudi analisiak interesekoak diren eremuak hautatzen ditu analisirako, erreakzio kolorometriko bateko koloredun disoluzioa, esaterako. 5. Irudian eskematikoki ikus daitekeen bezala, irudiaren prozesaketan kolorearen informazio kimikoa lortzen da, gero parametro analitikoa eraiki eta kalibrazio bidez informazio kuantitatiboa lortu ahal izateko. [13]

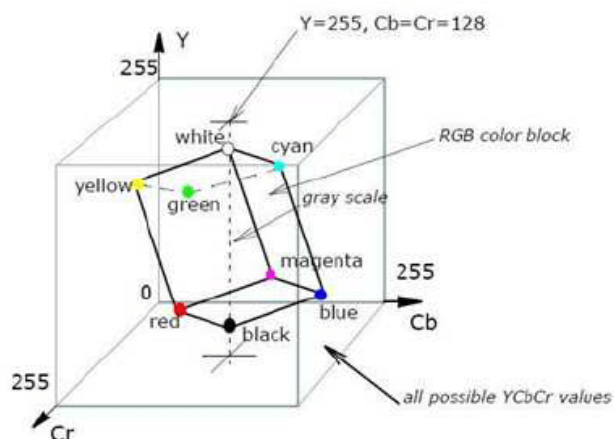


5. Irudia. Argazki bidez informazio analitikoa lortzeko prozesua. [13]

Dakigunez, kimika analitikoan kolorea behatzailearen begi bista hutsez analisi kualitatiborako erabili den propietate bat izan da aspalditik; balorazioetan, esaterako, amai-puntuari buruzko informazioa ematen du. Baina analisi digitalaren esparruan, analisi kuantitatiboa hain aurreratua dagoen honetan, analisi metodo hau espektrofotometroak ordezkatzera heldu da zenbait arlotan. [13]

Koloreen kuantifikaziorako nahitaezkoak dira kolore espazioak, koordenatu bidez koloreak irudikatzen dituzten sistema numerikoak. Kolore espazioak anitzak dira, eta analisi bakoitzaren helburu espezifikoak zein erabilitako gailuen muga teknologikoez zehazten dute zein den egokia une bakoitzerako. Ezagunena RGB espazio kolorea da, gizakiaren ikusmen sistemaren antzera lan egiten duelako. RGB siglek ingelesezko *red*, *green* eta *blue* hitzei egiten die erreferentzia, horiek baitira kolore espazioa oso-osorik zehazten duten hiru osagai primarioak. [13]

RGB kolore espazioak [R, G, B] erako koordenatuak ematen ditu, non kolore kanal bakoitzaren balioa 0 eta 255 artean kokatzen den, 6. Irudian ikus daitekeen gisan. [0,0,0] koordenatuak kolore beltzari dagozkio eta [255, 255, 255] koordenatuak, aldiz, zuriari. Tarte horretako koordenatuek giza begiaren ikusmen-sistemako edozein kolore deskriba dezakete. [13]



6. Irudia. RGB kolore espazioa. ^[14]

Telefono mugikorrarekin ateratako argazkietatik abiatuz interesekoak zaizkigun RGB balioak lortzeko Matlab softwarea erabili da. Algoritmo informatiko bidezko prozesaketa bidez irudiak koordinatu bihurtzen ditu.

Hiru osagai primarioak seinale analitikoarekin erlazionatzen dituen korrelazio ezberdinak ezagutzen dira. Erabiliena honako hau da ^[15]:

$$S_x = \log \left(\frac{X_0}{X} \right) \quad (6.\text{ekuazioa})$$

S_x: absorbantziaren seinalea X kanalean; X₀: zuriaren balioa X kanalean; X: laginaren balioa X kanalean

Horrela geratuko lirateke kanal bakoitzari dagozkion ekuazioak:

$$S = \log \left(\frac{R_0}{R} \right) \quad S = \log \frac{B_0}{B} \quad S = \log \frac{G_0}{G}$$

Hasiera batean hiru osagaien artean lortutako balioak erabiltzen dira aplikazio bakoitzari ondoen egokitzen zaion kanala zein den zehazteko. Kanal bakoitzeko koloreek ez dute argi guztia xurgatzeko ahalmenik, uhin luzera konkretu bateko argiak baizik: 400-500, 500-580 eta 580-700 nm kanal urdinak, berdeak eta gorriak, hurrenez hurren. ^[16] Aurrerago ikusiko dugun bezala, gure kasuan *Green* izan da gure datu multzoa egokien azaltzen duen kanala.

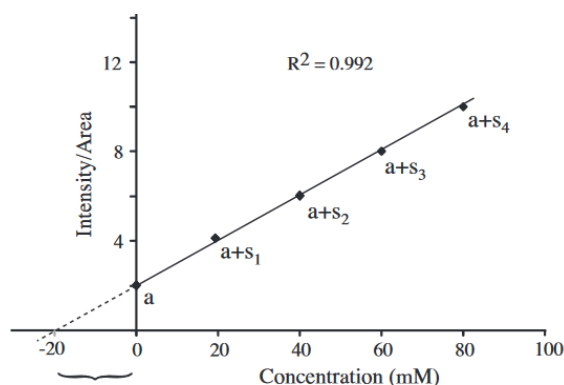
Ikusi bezala, irudi digitalen analisia tresna boteretsua da zientziaren zenbait alorretan. Hala ere, baditu bere desabantailak ere, koloreen intentsitatea aldakorra baita argazkia ateratzeko erabiltzen diren argi baldintzen arabera. Horregatik, kanpo kalibrazioa erabiltzean, laborategi batean neurtu den laginaren kolore intentsitatea ez litzateke konparatu behar beste laborategi batean prestatutako kalibrazio kurbarekin, emaitzaren zehaztasuna ez bailitzateke egokia izango.^[17]

Aurretik aipatu diren gainontzeko metodo analitikoekin alderatuz, irudi digitalen analisi bidezko metodo honek sortutako hondakin kantitatea askoz ere txikiagoa da. Iodometriarekin alderatuz, adibidez, ingurumenarekiko askoz ere arduratsuagoa den teknikatzat jotzen da.

1.6. Adizio estandar metodoa

Adizio estandar metodoa analisi instrumentalean oso erabilia den kalibrazio metodo bat da. Bereziki erabilia da aztertu beharreko sisteman matrize efektuak daudenean edo matrizearen konposizioa besterik gabe oso konplexua denean. Kanpo patroieta oinarritutako ohiko kalibraketarekin alderatuz, metodo honetan laginari analito kantitate ezagunak gehitzen zaizkio, progresiboki handitzen doazenak, eta ondoren seinale analitiko totala neurtzen da, laginari eta gehitutako analitoari dagokiona. Modu horretara, matrize efektuek seinalean izandako eragina analito kantitatearekiko proportzionala izango da, eta ondorioz, konpentsatua.^[18]

Prestatutako patroiek lagin kantitate bera dute, baina analito gehikuntzak desberdinak, gero kalibrazio zuzen bat lortu ahal izateko. Seinalea kontzentrazioaren aurrean irudikatzen da, eta kontzentrazioa handitu ahala seinalea ere proportzionalki handitzen da. Kontua da zuzen hori ez dela jatorri puntutik pasatzen, izan ere, patroia horretan analito gehikuntzarik egin ez arren, laginari dagokion analitoa presente dago disoluzio horretan. Kalibrazio zuzen horrek X ardatza mozten duen puntuan seinalearen balioa 0 izango da, eta horrek gure laginaren kontzentrazioa emango digu. Metodo honekin lortutako emaitza analitikoak kanpo patroiekin lortutakoak baino prezisoagoak kontsideratu ohi dira, matrize efektuak konpentsatzeaz gain, errore sistematikoak gutxiagotzen lagun dezakeelako.^[17,18]



7. Irudia: Adizio estandar metodo bidezko kalibrazio eredu. ^[19]

Irudi digitalen analisisian bereziki erabilgarria da kalibrazio metodo hau. Arestian aipatu bezala, kanpo kalibrazio metodo bat erabiltzen denean argazkia ateratzeko argi baldintzek emaitzetan eragin dezaketen aldakuntza handia da, baina adizio estandarrean, barne kalibrazio bat dugunez, emaitza kuantitatiboak argi baldintzekiko independenteak bihurtzen dira. ^[17]

1.7. Metodoen balidazioa

Balidazioa metodo bat egokia dela ziurtatzeko balio duten parametro analitikoaren analisia da. Helburu nagusia konfiantzazko informazioa lortzea da, koherentea eta prezisioa izango dena. Metodo analitiko bat balidatzea haren zehaztasuna, prezisioa, linealtasuna eta detekzio zein kuantifikazio mugak determinatzean datza. ^[20]

Balidazioa nahitaezkoa da metodo berri bat garatzen den momentuan, eta prozesu hori nolakoa izan behar duen zehazten duten argibideak eskuragarri daude, baina balidazio prozesua ez da hor amaitzen. Balidatutako metodoek ere mantentze jarraipen bat behar dute, noizbehinkako kalibrazioetan oinarritua eta helburu konkretuetara begira egokitze aldaketak jasan ditzakeena. ^[20]

Balidazio on bati esker helburu jakin baterako metodoa egokia dela ziurtatu daiteke, hurrengo neurketetan lortutako emaitza analitikoak optimoak izan daitezten. Horri esker, metodo garatzaileari ez ezik, metodo horren edozein erabiltzaileri konfiantza gradu bat eskaintzen dio prozesuak

1.7.1. Zehaztasuna

Lortutako emaitzak benetako baliora zenbat hurbiltzen diren adierazten duen parametroa. Zehaztasunaren neurketarako aukera desberdinak daude: ^[20]

- Erreferentziazko materiala: analitoa kontzentrazio ezagunean duen lagin baten neurketa egin, eta lortutako balioa erreferentziazko horrekin konparagarria dela ziurtatu.
- Lagin zuri bati analito kantitate ezaguna gehitu eta behar den analisia egin. Matrizeak berdina izan behar du, bestelako interferentziek eragin ez dezaten.
- Adizio estandar metodoa: metodo honetan, laginaren seinalea neurtu ondoren, analito kopuru ezagun bat gehitu eta neurketa errepikatzen da. Bien arteko diferentzia konparatzen da.
- Ziurtatutako beste metodo batekin alderatu balidatu beharreko metodoa.

1.7.2. Prezisioa

Zehaztutako baldintzen menpean dagoen lagin bati egindako zenbait neurketen arteko adostasuna. Askotan desbideratze estandar erlatibo gisan adierazten da:

$$\%RSD = \frac{\text{Desbideratze estandarra}}{\text{Batezbestekoa}} \quad (7.\text{ekuazioa})$$

Modu ezberdinetara baloratu daiteke prezisioa: ^[20]

- Errepikakortasuna: denbora tarte laburrean lan baldintza berdinetan neurtutako prezisioa adierazten du.
- Erreproduzigarritasuna: metodo berdinentzat laborategi ezberdinetan neurtutako prezisioa.
- Bitarteko doitasuna: Laborategi barruko prezisioa adierazten du, egun, analista eta ekipamendu ezberdinen eragina aztertuz.

1.7.3. Selektibitatea

Metodo baten selektibitatea analito matrizean dauden gainontzeko konposatuetatik bereizteko ahalmena da. Parametro hau determinatzeko, matrizean interferentzia eragiten duten espezieak gehituz egiten dira neurketak, eta emaitza horiek analito hutsarekin lortutakoekin alderatu. ^[20]

1.7.4. Sentikortasuna

Sentikortasun handiko metodo batek analito kontzentrazioan emandako aldaketa txikiei modu fidagarrian erantzuten die. Parametro hau erlazionatuta dago detekzio eta kuantifikazio mugekin, LOD eta LOQ, hurrenez hurren.

LODek detektagarria den analito kontzentrazio minimoa. Analisiaren prozedurak ez ezik, erabilitako instrumentuak ere eragina izango du. LOQ, aldiz, kuantifikagarria den analito kontzentrazio minimoa adierazten duen parametroa da. Horien neurketarako prozedura desberdinak daude: ^[20]

- Balorazio bisuala: analito kontzentrazioa ezaguna duten patroiak erabiliz egindako neurketa bidez bilatzen da balio minimo hori.
- Seinale/zarata ratio bidez hondoaren seinalea duten prozedura analitikoaren kasuan. Analito kontzentrazio ezagun baxuek eta lagin zuriek emandako seinaleak alderatuz lortzen da.
- Kalibraketaren desbideratze estandarra eta erregresioaren malda erabiliz:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (8.\text{ekuazioa})$$

non, σ = kalibrazioaren desbideratzea; S = erregresioaren malda

Linealtasunak kalibrazio kurba batek zenbaterainoko lerro zuzen izaera duen neurtzen du. Lerroa ia zuzena den tarte horretan metodoaren emaitzak analito kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak izango dira. Patroiak erabiliz lortutako erregresioak berak eskaintzen du linealtasun graduari buruzko informazioa:

- Korrelazio koefizientea (R^2)

$$R^2 = \frac{[\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (9. \text{ ekuazioa})$$

non: \bar{x} = analito kontzentrazioaren batezbestekoa eta \bar{y} = seinalearen batezbestekoa

Korrelazio koefiziente hori 1 baliotik hurbil duten tarte linealak determinaziorako egokitzat hartzen dira.

- Y ardatzeko ebakidura: analitorik ez dagoen patroiaren kasuan seinaleak 0 eman beharko luke, eta ondorioz, zuzenak jatorri puntutik pasa.

2. Helburuak

Lan honen helburu nagusia sulfitoak determinatzeko PRAn oinarritutako metodo bat garatzea izango da. Horretarako, PRA konposatu organikoak HCl ingurune batean formaldehidoarekin osatutako nahaste erreaktiboak sulfitoen presentzian ematen duen erreakzio kolorimetrikoaren jarraipena egingo da.

Lehenik eta behin, artikuluetan irakurritako erreakzio kolorimetriko hau laborategian ere ondo doala ziurtatuko da; horretarako erreferentzia metodo gisa ultramore-ikuskorra erabiliz. Hurrengo urratsa irudi digitalera pausua ematea izango da. Kasu honetan ere erreakzioa putzutxoetan behar bezala ematen dela ziurtatuko da. Ondoren, kalibratze metodo egoki bat erabiliz, kalibratua eraikiko da Matlab softwarearen bidezko datu tratamendua baliatuz. Kalibratu horri esker, proiektu honetako datu multzoari egokien doitzen zaion RGB kanala hautatu ahal izango da eta sulfitoen kuantifikaziorako behe eta goi mugak zehaztuta geratuko dira.

Bestalde, metodo hau optimizatzeko saiakera egingo da; irudi digitalen analisirako argazkia ateratzeko baldintzarik egokienak zein diren zehaztuko da. Horretarako, argazki ugari aterako dira mugikorraren eta laginaren arteko distantziak zein argi-plakaren intentsitatea aldatuz, ondoren zenbait parametro analitiko kalkulatu ahal izateko: %RSD eta detekzio zein kuantifikazio mugak, esaterako.

Azkenik, behin kalibratua zehaztuta eta metodoa optimizatuta, laginen neurketetara joko da. Bukaerako emaitzak kalibratuko tarte linealaren barruan egon daitezen, laginak diluitu beharko direla aurreikusten da. Diluzio horien ideia bat egiteko Ripper metodoa erabiliko da, aldez aurretik laginen gutxi gorabeherako sulfito kontzentrazioa ahalbidetuko diguna.

3. Atal esperimentalala

3.1. Materiala

- Beirazko material bolumetrikoa (matrazeak, hauspeakin ontziak eta pipetak)
- Mikropipetak (Eppendorf)
- Ultramore ikuskorrerako kubetak (kuartozkoak)
- Polipropilenoazko mikroplakak (96 putzutxo)

3.2. Ekipoak eta softwarea

- Mettler Toledo NewClassis MS204S balantza analitikoa.
- Hewlett Packard HP8453 espektrofotometroa.
- Kamera: iPhone 7
- Argi plaka (Stone TH)
- Metrohm 794 Basic Titrino baloratzaille automatikoa
- Metrohm 728 magnetic stirrer
- Crison Basic 20 pHmetroa
- MATLAB softwarea

3.3. Erreaktiboak eta disoluzioak

- NaHSO₃ stock patroia disoluzioa 0,1 g/L: 0,0105 g NaHSO₃ (Probus, 95%) 100 mL arte eraman ur birdistilatuekin.
 - Patroiak (0,75; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,0 eta 8,0 mg/L): stock disoluziotik dagokion μ L kopurua 25 mL-ra eraman (ikus 1. Eranskineko E1 taula)
 - Adizio estandarerako patroiak (0,0; 0,75; 1,5; 3,0; 4,5 eta 6,0 mg/L): stock disoluziotik dagokion μ L kopurua + 3 mL lagin 25 mL-ra eraman.
- MIXTURE disoluzioa:
 - Etanol purua (Panreac, AppliChem)
 - %0,25 (p/v) pararosanilina hidrokloruro P3750-25G (Sigma-Aldrich, CAS 569-61-9)
 - 1,2 M HCl (Panreac, %37)

%0,25eko PRA disoluzioa HCl disoluzioarekin 100 mL-ra eramanez, %0,1 PRA lortu.

- %0,1 Formaldehido (Panreac, AppliChem 35-40% p/v)

%0,1 PRA formaldehidoarekin 1:1 proportzioan nahastuz lortzen da MIXTURE erreaktibo.

- KIO_3 0,0026 M (Panreac, %98, Cód.: 141540)
- KI (Panreac, %99,5)
- H_2SO_4 %10 (v/v) (Panreac, AppliChem, %96, CAS: 7664-93-9)
- NaOH 1M (Panreac, AppliChem, CAS: 1310-73-2)
- Na_2EDTA 1 mmol/L (Panreac, AppliChem)
- Ur birdistilatua

3.4. Laginak

1.ardoa: Ardo zuria (Eroski)

2.ardoa: Ardo zuria (El Hombre Orquesta)

Ozpina: Ardo-ozpina (Eroski basic)

3.5. Prozedura

3.4.1. Ultramore ikuskorra

Erreakzioa saiodietan burutu da. Mixture erreaktibo nahastea sulfito disoluzioekin nahastu da. Erabilitako sulfito disoluzioak stock disoluzioa diluituz lortutako patriiak izan dira: 1,5 mg/L; 3,0 mg/L; 4,5 mg/L; 6 mg/L eta 7 mg/L (ikus 2. Taula). Erreakzioa eman dela ziurtatzeko 10-15 minutuz utzi dira disoluzioak saiodian, eta ondoren neurketak egin dira espektrofotometroan, absorbantzia uhin luzeraren aurrean irudikatuz (ikus 2. Eranskinean ageri den E2. Irudia)

2. Taula: ultramore ikuskorreko lehen neurketetarako disoluzioen prestaketa.

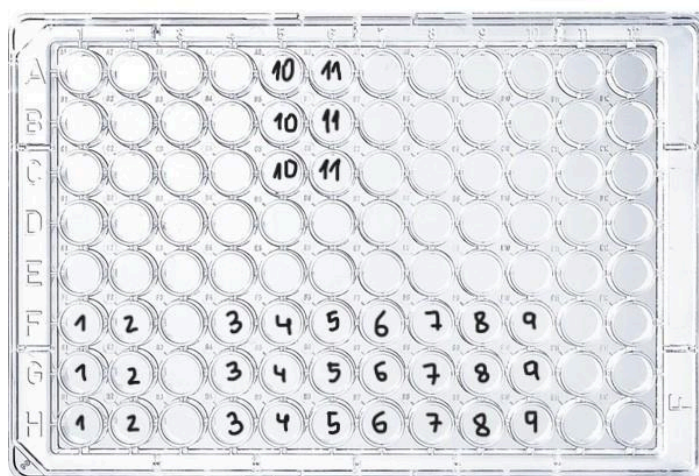
	SAIODIA 1	SAIODIA 2	SAIODIA 3	SAIODIA 4	SAIODIA 5
Mixture	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
NaHSO₃ disoluzio a	2 mL (1,5 mg/L pat)	2 mL (3 mg/L pat)	2 mL (4,5 mg/L pat)	2 mL (6 mg/L pat)	2 mL (7 mg/L pat)

Zuria bezala EDTA disoluzioa erabili da, sulfito disoluzioa diluitzeko erabilitako disolbatzailea izan baita.

3.4.2. Irudi digitalen analisia

Erreakzio bera mikroplakan burutzeko prozedura bi ataletan banatu da: kalibratua eraiki eta bere optimizazioa alde batetik, eta laginen analisia, bestetik.

- Kalibratua: ultramorearen prozeduran bezalaxe, EDTA, mixture disoluzioa eta NaHSO₃ patroiak izango dira putzutxoak betetzeko erabiliko ditugun erreaktiboak (ikus 8. Irudia eta 3. Taula) . Kasu honetan patroiak honakoak izango dira: 0,75; 1,5; 3; 4,5; 6; 7 eta 8 mg/L. Bestalde, metodoa balidatze aldera, tarte linealaren barruan kokatzen diren beste bi sulfito disoluzio prestatu dira, kontzentrazio ezagunekoak.



8. Irudia: Kalibraturako patroien eta kontzentrazio ezaguneko disoluzioen kokapena plakan.

3. Taula: Putzutxo bakoitzeko disoluzioa.

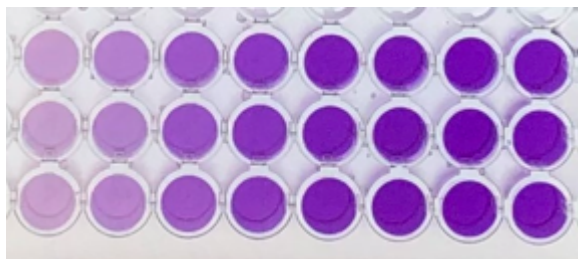
1	Zuria: 400 µL EDTA
2	Zuria: 200 µL EDTA + 200 µL mixture
3	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 0,75 mg/L)

4	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 1,5 mg/L)
5	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 3,0 mg/L)
6	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 4,5 mg/L)
7	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 6,0 mg/L)
8	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 7,0 mg/L)
9	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (patroia 8,0 mg/L)
10	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (kontz. ezaguna: 2,0 mg/L)
11	200 µL mixture + 200 µL sulfito disoluzio (kontz. ezaguna: 4,0 mg/L)

- Laginen analisia: atal honetan kalibrazio disoluzioez gain, EDTArekin diluitutako ardo zein ozpin laginak erabili dira. Honela bete dira laginei dagozkien putzutxoak: 200 µL mixture + 200 µL lagin. (1:10; 1:20 eta 1:50 diluzioak izan dira gehien erabilitakoak, Ripper metodoari esker ondorioztatutakoak)

Putzutxo bakoitza bete ondoren, 10-15 minutuz utzi da gutxienez erreakzioa gerta dadin. Sarreran aipatu bezala, disoluzioak kolore morea hartzen du, zeinaren intentsitate sulfito kontzentrazioaren arabera izango den. Plakari argazkia atera eta Matlaben prozesatu da informazioa.

Hurrengo 9. Irudian ikus daiteke nola sulfito kontzentrazioa igo ahala disoluzioaren kolorea geroz eta ilunagoa den:



9. Irudia: kolorearen intentsitate aldaketa sulfito kontzentrazioaren arabera.

3.4.3. Adizio estandar metodoa

Prozedura hau aurrekoaren berdina izan da, baina kasu honetan barne kalibraketa egin da; ondorioz, ez da kalibratutik kanpoko laginik jarri behar izan plakan. Analizatu beharreko lagina patroien barruan dago. Patroi bakoitzari 3 mL lagin gehitu zaizkio eta 25 mL-ra eraman. Patroi kontzentratuenak kalibratutik kendu dira, laginarekin nahastean seinalea gehiegizkoa izan ez dadin (erabilitako patroiak: 0; 0,75; 1,5; 3; 4,5; 6 mg/L)

3.4.4. Ripper metodoa

Lehenbizi baloratzailerak prestatu da. Horretarako, 0,5573g KIO_3 disolbatu dira ur birdistilatutan, 3,5g KI gehitu eta 1L-ra eraman.

Sufre dioxido askearen determinazioa

50 mL lagini 0,5 g EDTA gehitu zaizkio SO_2 askearen oxidazioa saihesteko. Ondoren, 5 mL H_2SO_4 eta 1g KI gehitu, nahastu eta balorazioa egin da hiru aldiz.

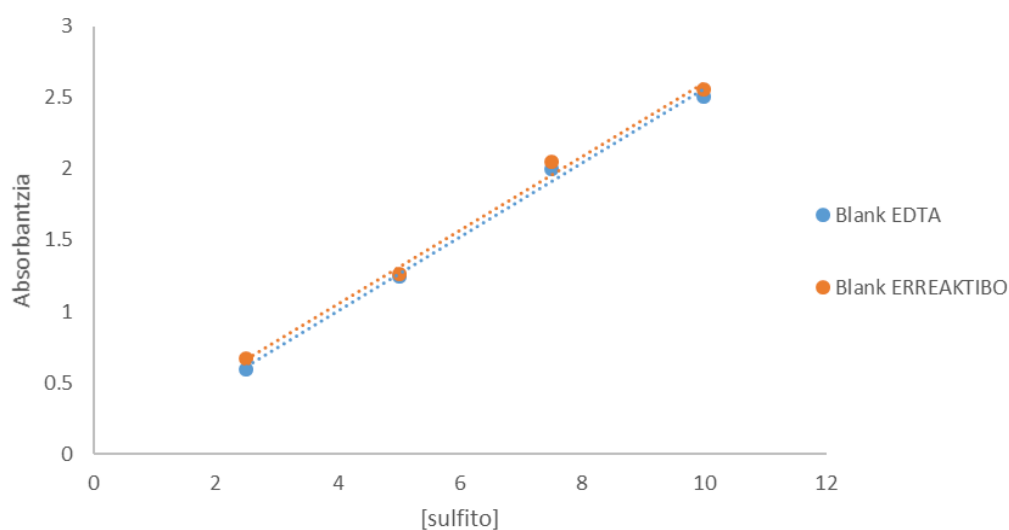
Sufre dioxido totalaren determinazioa

50 mL lagini 25 mL NaOH (1M) gehitu, nahastu eta kontaktuan utzi da disoluzioa sufre dioxido konbinatua askatzeko. Ondoren, 25 mL H_2SO_4 (%10 v/v), 0,5 g EDTA eta 1 g KI gehitu eta baloratu egin da hiru bider.

4. Emaitzak eta eztabaida

4.1. Kalibrazio-kurba

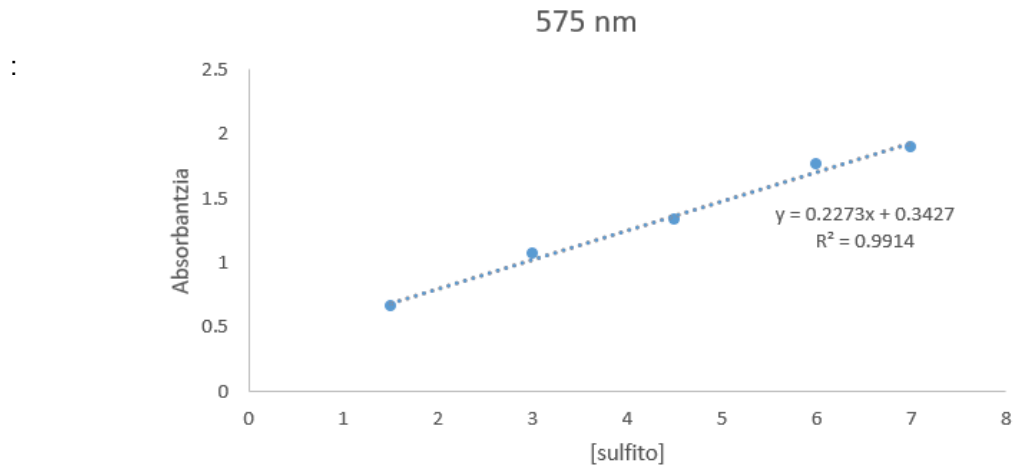
PRA erreaktiboa formaldehidoarekin nahastean lortutako mixture disoluzioa kolore more argikoa da. Sulfitoekin nahastu aurretik kolorea izate horrek ez duela interferentziarik eragiten ziurtatu nahi izan da. Horretarako, sulfito disoluzio berdinak erabiliz neurketak errepikatu dira, lagin zuri gisa erabilitak disoluzioa aldatuz: EDTA disoluzioa batetik, eta PRA erreaktiborekin nahastutako EDTA bestetik.



10. irudia: zuri gisa EDTA eta erreaktiboa bera erabiliz lortutako kalibrazio-zuzenak.

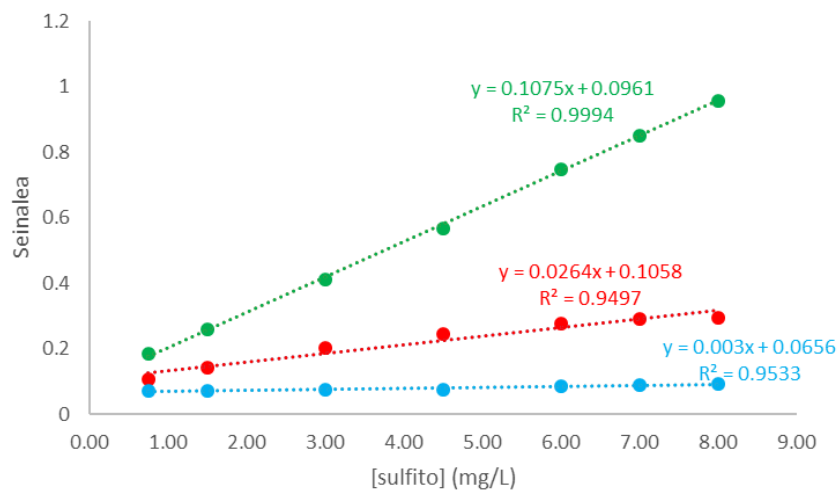
Ultramore-ikuskorrean lortutako absorbantzia maximoa 575 nm-tan kokatzen da. 10. Irudian ikus daitekeenez, erreaktiborearen berezko koloreak ia ez du eraginik azken seinalearen emaitzan, gainezarrita baitaude bi kalibratuak. Beraz, hemendik aurrera EDTA disoluzioa izango da lagin zuritzat erabiliko dena.

Hurrengo pausua ultramore ikuskorreko kalibratu tartea doitzea izan da, goi eta behe mugak zehaztea seinaleak 2tik gorako baliorik eman ez dezan; hortik aurrera kuantifikazioak arazoak eman baititzake. Hurrengo 11. irudian ikus daiteke uhin luzera horretan lortu den kalibrazio kurba, 1,5 eta 7 mg/L bitarteko sulfito kontzentrazioa duten laginen kuantifikazioa egitea ahalbidetuko diguna.



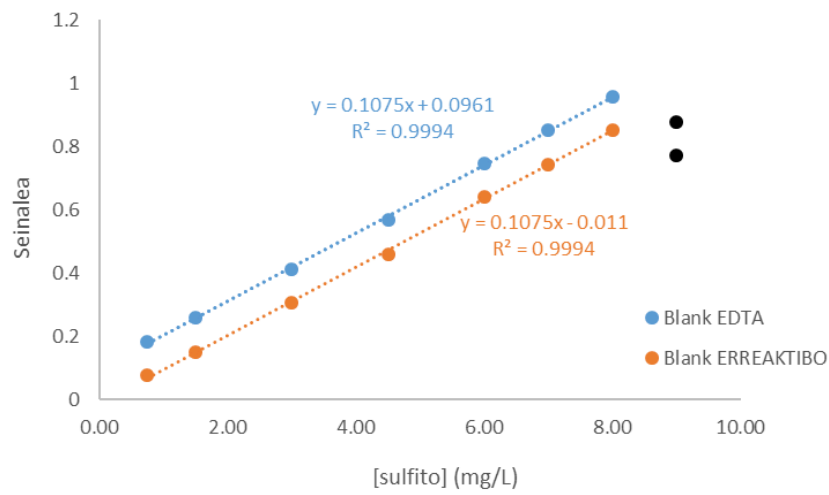
11. irudia: ultramore-ikuskor bidez lortutako kalibratua, sulfito kontzentrazioa eta seinalearen intentsitatea erlazionatzen dituena.

Irudi digitalen analisisan lortutako zenbakizko balioak seinale bihurtu dira $Sx = \log\left(\frac{X_0}{X}\right)$ korrelazioa erabiliz. 12. Irudian ikus daitekeen gisan, lan honetako datu multzoa hobekien deskribatzen duen kanala G da, linealtasun optimoena ematen duena izanik:



12.irudia: RGB espazioko kanal bakoitzarekin lortutako kalibratua, seinalea sulfito kontzentrazioarekin erlazionatuz.

Behin kanal egokia identifikatuta, kalibratu tartea zehaztea izan da hurrengo helburua. 13. Irudian ikus daiteke zein izan den tarte lineal hori. Beltzez ageri diren puntuak 9,00 mg/L-ko sulfito kontzentrazioari dagozkionak dira, eta ikus daiteke linealtasuna apurtzen duten lehen puntuak direla; horregatik, 8,00mg/L-tan ezarri da goi-muga. Ikus daiteke tarte lineal hau ez dela ultramorearen kasuan lortutakoaren berdina; kasu honetan goi eta behe muga desberdinak ditu (0,75-8,00 mg/L), lagin kopuru handiago bat kuantifikatzea ahalbidetzen duelarik.



13. Irudia: irudiaren analisirako zehaztutako kalibrazio tartea.

Bestalde, irudiaren kasuan ere frogatuta geratu da erreaktiboak berak ez duela eraginik amaierako seinalearen intentsitatean, zuri ezberdinei dagozkien zuzenak elkarren paraleloak baitira.

4.2. Argazki egoera egokienaren aukeraketa

Kalibrazio tartearen barnean sartzen diren kontzentrazio ezaguneko disoluzioak (2 eta 4 mg/L) erabili dira sarreran metodoen balidaziorako aipatutako zenbait parametro kalkulatu eta argazki baldintza optimoenak zein diren erabakitzeko. Argazki ugari atera dira, kamerak mikroplakarekiko duen distantzia eta argi iturriaren intentsitatea bezalako faktoreak aldatuz, denak egun berean.

Argazki bakoitzarentzat, alde batetik, LOD eta LOQ balioak kalkulatu dira. Horretarako, erregresioa bera erabili da, aparteko neurketarik egin gabe. Bestetik, kontzentrazio ezaguneko laginentzat lortutako emaitza esperimentalez baliatuz, metodoaren errorea eta %RSD baloreak kalkulatu dira.

Hurrengo 4. taulan ikus daitezke lau parametro horientzat lortutako balioak:

4. Taula: argazki egoera ezberdinetan LOD, LOQ, %RSD eta errorea parametroentzat lortutako balioak.

			LOD	LOQ	ERROREA		%RSD	
					2 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	4 mg/L
G E R T U T I K	INT BAXUA	EDTA	1.04	3.13	-7.25	-13.65	1.5	1.23
		ERREAKT	1.04	3.13	-7.25	-13.65	1.48	0.43
	INT ERTAINA	EDTA	0.69	2.06	-5.75	-10.51	2.76	0.45
		ERREAKT	0.69	2.06	-5.76	-10.52	3.38	0.31
	INT ALTUA	EDTA	0.24	0.73	-7.35	-6.6	2.28	1.7
		ERREAKT	0.24	0.73	-7.32	-6.59	2.62	2.05
G O I T I K	INT BAXUA	EDTA	0.55	1.64	-6.69	-11.77	1.21	1.04
		ERREAKT	0.55	1.64	-6.71	-11.77	1.45	1.34
	INT ERTAINA	EDTA	0.47	1.41	-11.24	-10.17	0.77	2.65
		ERREAKT	0.47	1.41	-11.23	-10.16	2.05	2.24
	INT ALTUA	EDTA	0.24	0.71	-14	-10.81	0.62	2.99
		ERREAKT	0.24	0.71	-14.02	-10.82	1.46	3.42
Mahaian		EDTA	1.05	3.16	-60.94	-35.98	4	3.21
		ERREAKT	1.05	3.16	-60.95	-35.99	9.73	2.83
Leiho ondoan		EDTA	1.79	5.36	-18.19	8.14	9.35	12.69
		ERREAKT	1.79	5.36	-18.18	8.15	15.33	15.38

Mahaian eta leiho ondoan ateratakoak Stone TH argi iturria erabili gabe ateratakoak izan dira. Argi ikusten da argi plaka horren eragina positiboa dela, erabili gabeko argazkien kasuan lortutako detekzio eta kuantifikazio mugak altuenak baitira.

Errore eta %RSD balioei dagokienez, ez da erraza baldintza egokienak hautatzea, kontzentrazio batetik bestera ere asko aldatzen baitira emaitzak. Baina, egoerarik sentsibleenak urdinez markatuta ageri direnak dira, eta hemendik aurrerako neurketetarako gertutik plakaren intentsitate altuenarekin ateratako argazkiak analizatuko dira.

Baldintza egokiak hautatzeko ez ezik, hautatutako baldintzetan lortutako balore horiek metodoaren baliogarritasuna aurrerako ere erabil daitezke:

- Zehaztasuna: %6 eta %7 artean dabilzan errorearen balioak onargarriak direla esan daiteke. Gainera, argiak emaitzetan izan dezakeen eragina kontuan izanik, errore balio horiek erlatiboki ona den zehaztasuna deskribatzen dute.
- Prezisia: %RSD-aren balioak %3ren azpitik dabilta, eta hori onargarria ez ezik, oso balio ona da.
- Sentikortasuna: LOD eta LOQ balioei 0,24 eta 0,71 mg/Lko baloreak dagozkie, hurrenez hurren. Lan honen helbururako behar bezain sentikorra da, eta aurreko atalean ikusi bezala, 8mg/L arteko sulfito kontzentrazioak determinatzea ahalbidetzen du.

4.3. Ripper metodoa

Nahitaezkoa da irudi digitalen analisiaren bidez neurtu nahi ditugun laginen sulfito kontzentrazioak tarte linealaren barruan egotea eta horretarako, lagin bakoitzari dagokion diluzio faktorea aplikatu behar zaio. Diluzio faktore hori aurkitzeko sulfitoak determinatzeko beste metodo hau erabili da: Ripper.

Balorazio hauetan gastatutako iodato kantitatea baloratzailan lortutako balorazio kurbetan irakur daiteke: potentziala vs iodato bolumena grafiketan, zehazki (ikus 3. Eranskina). Kantitate horri sarreran aipatutako erlazioa aplikatzen zaio. Teorikoki 10 zen biderkagaia baloratzaille kontzentrazio zehatzaren menpekoa izanik, pisatutako KIO_3 kantitate zehatza erabiliz kalkuluak egin, eta kasu honetan hau da erabili beharreko erlazioa (ikus 4. Eranskina):

$$SO_2 (mg/L) = \text{baloratzaille mL} * 9,79 \quad (10.\text{ekuazioa})$$

Hurrengo 5. Taulan biltzen dira hiru balorazio errepikaturen (n=3) batezbestekoak eta desbideratzeak ($\bar{x} \pm s$):

5.Taula: Ripper metodoa erabiliz egindako balorazioetan gastatutako iodato bolumena kontuan hartuz, laginetako sulfito kontzentrazioaren kalkulua.

SO₂ askea		
	1.ardoa	Ozpina
V (IO₃⁻) (mL)	5,77 ± 0,08	2,38 ± 0,17
SO₂ (mg/L)	56,51 ± 0,75	23,35 ± 1,73
SO₂ totala		
	1.ardoa	Ozpina
V (IO₃⁻) (mL)	9,05 ± 0,69	3,06 ± 0,02
SO₂ (mg/L)	88,69 ± 6,81	30,02 ± 0,15

Datu horiek kontuan hartuz, ozpinari aplikatu zaizkion diluzioak honakoak izan dira: 1:5; 1:10 eta 1:20. Ardoarentzat zehaztutako diluzioak esanguratsuagoak izan dira, sulfitoen presentzia ere handiagoa izanik: 1:10; 1:20 eta 1:50.

Kontua da oraindik ez dela ezaguna irudi digitalen analisiaren bidez determinatzen den sulfurosoa askea edo totala den; horregatik probatu dira diluzio faktore desberdinak lagin bakoitzarentzat. Gero, irudiko lehen neurketan lortutako emaitzen arabera erabakiko da zein diren egokienak.

4.4 Laginen analisia irudi digital bidez

Prozeduraren atal hau aurrekoarekin batera burutu da, hau da, egun berean lagin berdina analizatu da Ripper metodoa erabiliz, eta aldi berean irudi digitalen analisia eginez. Hori egitearen helburu nagusia, sulfitoen ezegonkortasuna kontuan harturik, emaitza

konparagarriak lortzea izan da, eta bide batez, irudian neurtzen den sulfito kantitatea zein sulfito motari dagokion ondorioztatu ahal izatea.

Lagin bakoitzari dagozkion diluzioak aplikatuz, 6. Taulan ikus daitezke lortutako emaitzak. Diluzio bakoitzarekin hiru putzutxo bete direnez, bakoitzaren seinalea erabili da hiru kontzentrazio kalkulatu eta ondoren emaitza $\bar{x} \pm s$ bezala eman ahal izateko:

6.Taula: irudiaren bidez 1. ardoa eta ozpina laginentzat lortutako sulfito kontzentrazioak

Sulfito kontzentrazioa laginean (mg/L)					
1. ardoa			Ozpina		
1:10	1:20	1:50	1:5	1:10	1:20
57,76 ± 0,80	59,32 ± 0,40	59,36 ± 1,09	54,23	61,01 ± 1,27	61,06 ± 1,79
Batezbestekoa				Batezbestekoa	
58,81 ± 0,92				61,03 ± 0,03	

Ozpinaren 1:5 diluzioa tarte linealeko goi mugatik kanpo dagoenez, balio hori ez da kontuan hartu batezbestekoa egiterako orduan.

Lortutako emaitza horiek gaineratik begiratuta, esan daiteke ardoaren kasuan Ripper metodoarekin sulfito askeentzat lortutako metodoak eta irudian lortutakoak ia bat datozela, baina ozpinaren kasuak ez du erlazio hori frogatzen, irudian kuantifikatutako sulfito kontzentrazioa askoz ere handiagoa baita.

Bi metodoen arteko bateraezintasun hori pHaren eragina izan daitekeela proposatu da. Azken finean, sarreran ikusi bezala, metodo bakoitzean pH desberdin batean ariko bagina lanean, determinatutako espezie kimikoa desberdina izango bailitzateke. Horregatik, metodo bakoitzean zein motatako ingurunean lan egiten den neurtu da pHmetro baten bidez. Hurrengo taulan ikus daitezke lortutako balioak:

7. Taula: erreakzio inguruneko pHaren neurtzea bi metodoetan.

RIPPER			
ARDOA		OZPINA	
Askea	Totala	Askea	Totala
50 mL ardo 0,5 g EDTA 5 mL H ₂ SO ₄ 1g KI	50 mL ardo 25 mL NaOH 25 mL H ₂ SO ₄ 0,5 g EDTA 1g KI	50 mL ozpin 0,5 g EDTA 5 mL H ₂ SO ₄ 1g KI	50 mL ozpin 25 mL NaOH 25 mL H ₂ SO ₄ 0,5 g EDTA 1g KI
pH = 0,99	pH = 0,69	pH = 0,76	pH = 0,61
IRUDIEN ANALISIA			
5 mL ardo (1:10 dil) 5 mL mixture disoluzio		5 mL ozpin (1:10 dil) 5 mL mixture disoluzio	
pH = 0,73		pH = 0,75	

Ikus daiteke kasu guztietan pHa 1 balioaren azpitik dagoela. Horrek esan nahi du bi metodoetan determinatzen den espezie kimikoa SO₂ molekularra dela, sulfito eta bisulfito ioien kontzentrazioa deuseztagarria izanik (ikus sarrerako 1. Irudia). Beraz, esan daiteke bi metodoekin lortutako emaitzak bat ez etortzearen arrazoia ez dagoela pHarekn erlazionatuta.

4.5. Adizio estandar metodoa irudien analisisian

Hurrengo susmoa matrize efektoren baten interferentzia izan da. Aukera hori deskartatu edo ziurtatzeko helburuarekin adizio estandar metodoa aplikatu da. Mikroplaka berean barne eta kanpo kalibratuak egin dira lagin bakoitzarentzat, gero kalibrazio zuzenak elkarren artean konparatu ahal izateko. Aldi berean, adizio kalibraturako erabilitako laginak

ultramore ikuskorrean ere neurtu dira erreferentzia gisa hartu eta mikroplakako erreakzioa behar bezala joan dela ziurtatzeko.

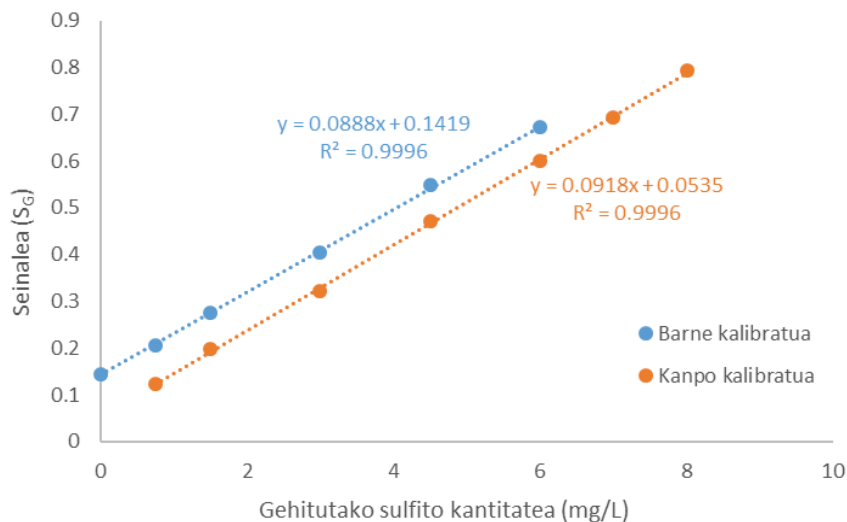
Kanpo kalibratuaren kasuan, lagin berdinen diluzio ezberdinentzat emaitza desberdinak lortu dira, begibistaz konparagarriak dirudi ez dutenak (ikus 8. Taula). Kalibrazio tartetik kanpo geratzen ziren diluzioak taulatik kendu dira. Kasu honetan ere aurrekoan bezala diluzio berdina hiru putzutxotan errepikatuta dagoenez, batezbestekoa eta desbideratzea kalkulatu dira ($\bar{x} \pm s$).

8. Taula: Kanpo kalibrazio bidez laginentzat lortutako sulfito kontzentrazioak.

Sulfito kontzentrazioa laginean (mg/L)						
1.ardoa			2.ardoa		Ozpina	
1:10	1:20	1:50	1:10	1:20	1:10	1:20
51,63 ± 0,26	72,91 ± 0,40	75,15 ± 6,94	7,22 ± 0,50	7,81 ± 1,36	11,36 ± 0,61	21,39 ± 0,27

Datu susmagarri horiei erantzun bat eman nahian, hurrengo grafiketan lagin bakoitzaren barne eta kanpo kalibratuak grafika berean irudikatu dira, konparaketa bat egin ahal izateko: matrize efektua deskartatu ahal izateko bi zuzenak elkarren paraleloak izan beharko lukete.

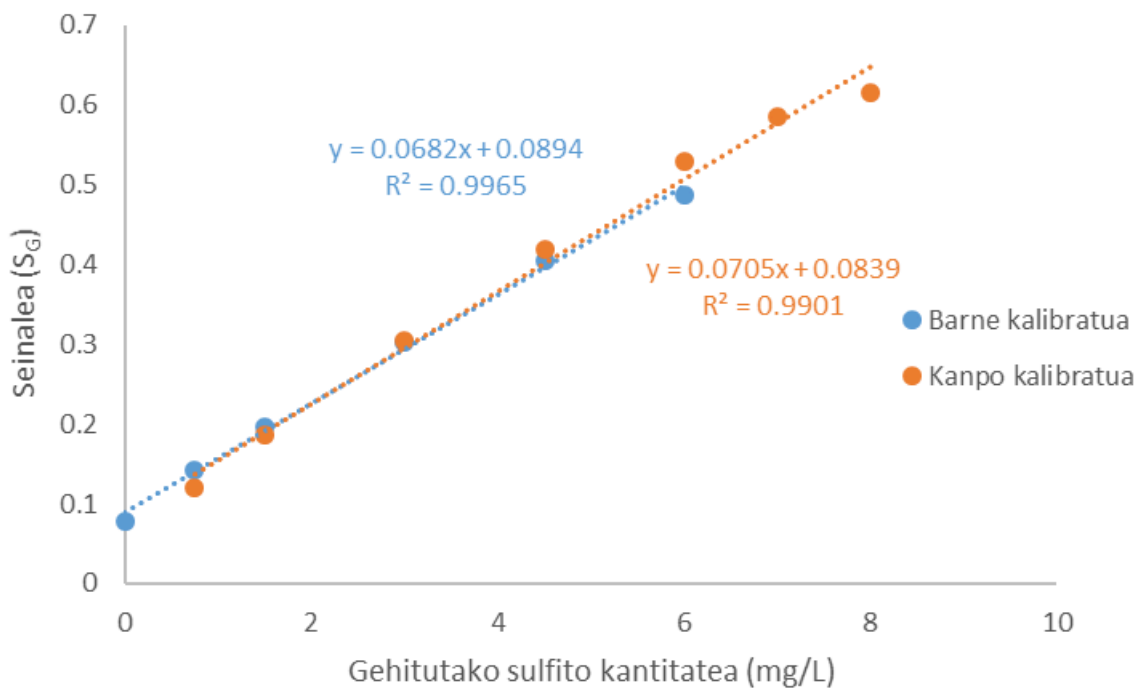
14. Irudian ageri den 1.ardoa laginaren kasuan, bi kalibratuak konparatuz gero, egia da ez dagoela begi bistako gurutzapenik, baina bi zuzenak ez dira guztiz paraleloak elkarrekiko. Barne kalibratuaren malda 0,0888 da eta kanpokoarena, berriz, 0,0918.



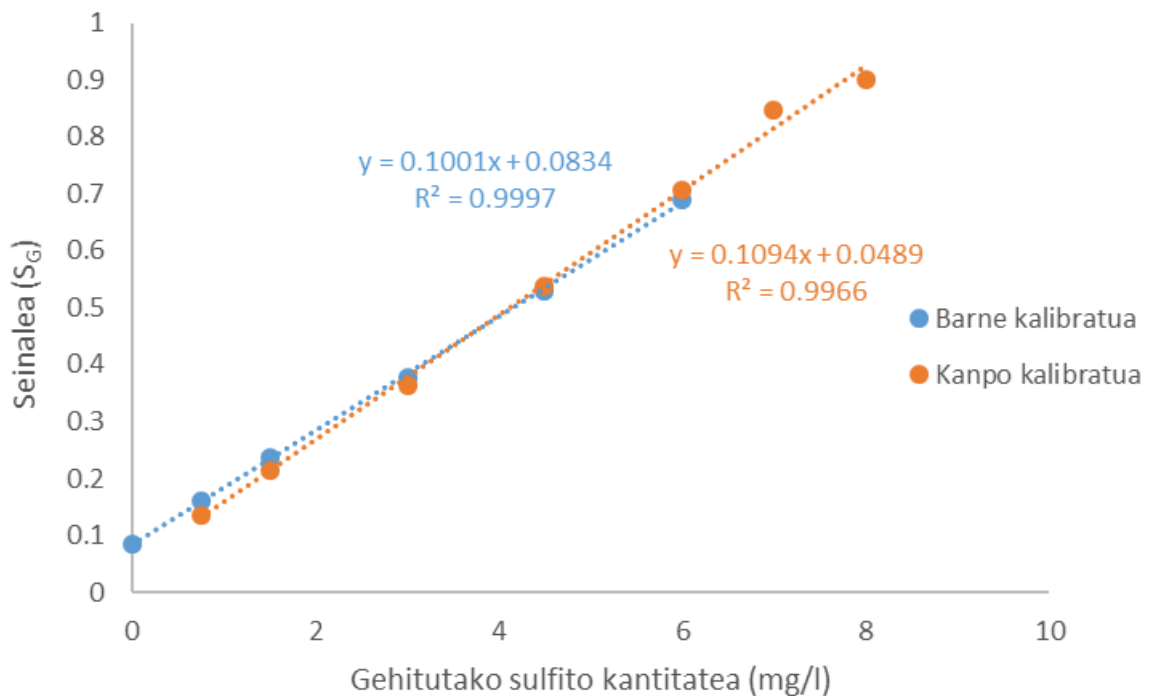
14.Irudia: 1.ardoa laginarentzat lortutako kanpo eta barne kalibratuak.

Student t froga egin da bi malda horien balioak estatistikoki berdinak diren edo ez jakiteko: $t_{kal}=2,36 > t_{tau}=2,26$ (ikus 5. Eranskina). Bi maldak ez dira alderagarriak, eta horrek matrize efektu baten presentzia frogatu ahalko luke.

Gainontzeko bi laginen kasuan ez da t frogaren beharrik izan, bi malden irudikapenean ikusten baita nola elkarren artean gurutzatzen diren. Ikusi 15 eta 16. Irudiak, 2.ardoa eta ozpin laginei dagozkienak, hurrenez hurren:



15. Irudia: 2. ardoa laginarentzat lortutako barne eta kanpo kalibratuak.



16. Irudia: Ozpin laginarentzat lortutako barne eta kanpo kalibratuak.

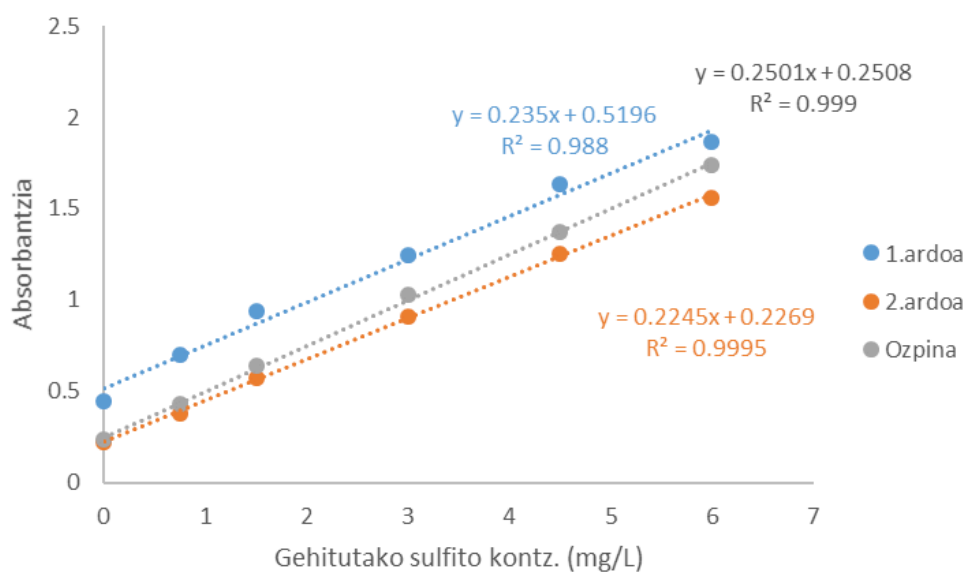
Lagineko sulfito kontzentrazioa jakiteko lagin bakoitzaren barne kalibratua oinarritu beharko liriteke kalkuluak, matrizearen interferentzia nulua baita kasu hortan. Kalibratu horrek X ardatza mozten duen puntua lortuz kalkulaturako kontzentrazioak ikus daitezke hurrengo 9. Taulan, diluzio faktoreak kontuan hartuz. Diluzio bakoitza hiru putzuxotan errepikatu dela kontuan izanik, hiru zuzen atera dira; horri esker emaitza hauek ere $n \pm$ moduan emanda daude:

9. Taula: barne kalibratua oinarrituz hiru laginentzat lortutako sulfito kontzentrazioak.

Lagina	m	b	C _{dil}	C _{lag} *
1.ardoa	0,088 ± 0,001	0,142 ± 0,008	1,596 ± 0,108	133,018 ± 8,974
2.ardoa	0,068 ± 0,001	0,089 ± 0,002	1,313 ± 0,034	109,404 ± 2,804
Ozpina	0,100 ± 0,001	0,083 ± 0,001	0,834 ± 0,009	69,461 ± 0,816

* Laginaren 1:10 diluzioko 3 mL 25mL-ra eramanez prestatu dira irudien analisirako disoluzioak. (Diluzio faktorea: 250/3)

Disoluzio berak ultramore ikuskorra erabiliz neurtu dira, irudiaren metodoa nolabait balidatze aldera. Teorian, aurreko taulako barne kalibratuaren emaitzekin bat egin beharko lukete erreferentziako metodo honen bidez lortutakoek:



17. Irudia: ultramore-ikuskor bidez laginentzat lortutako barne kalibratuak

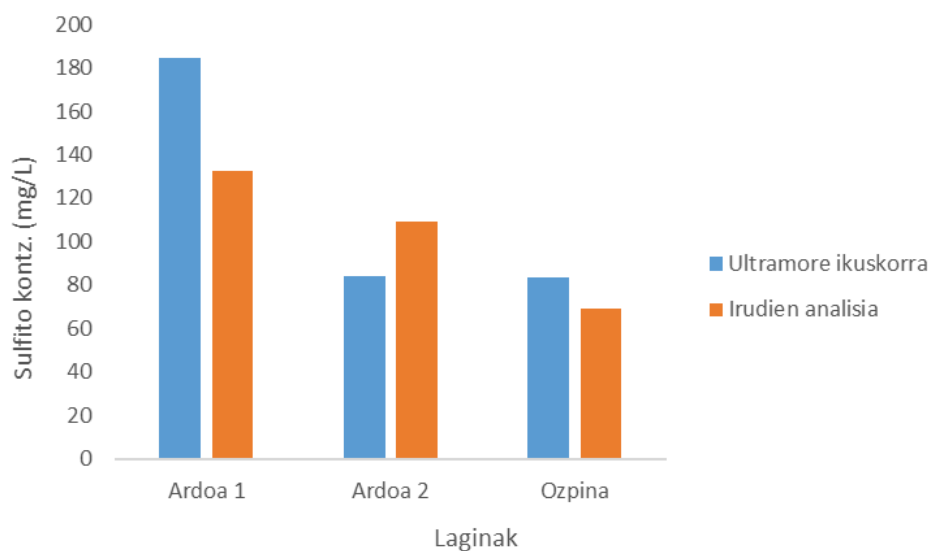
Jarraian 10. Taulan ikus daitezke kalibrazio zuzen horiek erabiliz laginentzat lortutako sulfito kantitateak zenbatekoak diren, diluzio faktoreak kontuan hartuz:

10. Taula: ultramore-ikuskor bidezko barne kalibratuekin lortutako sulfito kontzentrazioak.

Lagina	m	b	C _{dil}	C _{lag} *
1.ardoa	0,2350	0,5196	2,2111	184,2553
2.ardoa	0,2245	0,2269	1,0107	84,2242
Ozpina	0,2501	0,2508	1,0028	83,5666

* Laginaren 1:10 diluzioko 3 mL 25mL-ra eramanaz prestatu dira ultramorerako disoluzioak.
(Diluzio faktorea: 250/3)

Bi metodoekin lortutako emaitzak elkarren artean konparatzeko sortua izan da hurrengo 18. Irudia:



18. Irudia: ultramore eta irudiaren bidez laginentzat lortutako sulfito kontzentrazioen alderaketa.

Begi hutsez begiratuta, esan daiteke emaitzek antzekoak diruditela, 2. ardoa eta ozpin laginen kasuan gutxienez. Hala ere, zalantzak uxatzeko estatistikoki frogatu da bi metodoen artean emaitza adierazgarririk ez dela ziurtatzeko. Horretarako, binakako laginen konparaketa egiteko t froga aplikatu da (ikus 6. Eranskina), ondorengo erlazioa lortuz: $t_{\text{kalkulatua}}=0,61 < t_{\text{taula}}=4,30$.

Ondorioak

Behin baino gehiagotan aipatu bezala, ikerketa lan honen helburu nagusia sulfitoen determinaziorako metodo bat garatzea izan da. Ondorio nagusi gisa esan daiteke jatorrizko artikuluetan proposatutako metodoa laborategian aurrera eramatea lortu dela: erreakzio ingurunean gertatzen dena zehatz mehatz deskribatzea lortu ez bada ere, erreakzioaren nondik norakoak ezagutu dira.

Hasteko, erreaktiboak berak duen koloreak eman zitzakeen arazoen inguruko kezkak alboratzea lortu da. Gainera, ultramore ikuskorreko lehen neurketak nahikoa izan dira PRA eta sulfitoen arteko erreakzioa baliozkotzat jotzen duen kalibratua lortzeko. Irudi digitalen analisari dagokionez, LOD eta LOQ bezalako parametroak neurtuz, argazkiak ateratzeko erabilitako baldintzak egokiak direla esan daiteke, eta metodoa ere sentikorra, balio erlatiboki baxuak lortu baitira parametro horientzat.

Orain arteko guztia burutzeko laborategian prestatutako patroiak edo kontzentrazio ezaguneko disoluzioak erabili dira, baina laginen analisiarekin hasitakoan azaldu dira arazoak. Irudi digitalaren analisi bidez lortutako datuek Ripper metodoaren emaitzekiko bateragarritasun ezak sortutako susmoak adizio estandar metodo bidez matrize efektu baten presentzia ziurtatzea ekarri du.

Kontua da adizio estandar bidez lortutako sulfito kontzentrazioek ere ez dutela bat egiten Ripper metodo bidez lortutakoekin. Ingurunean pHaren neurketek erakutsitakoa kontuan hartuz, ustez irudiaren metodoak SO_2 molekularra determinatzen du, baina baliteke hain konplexua den sulfitoen orekan, pHak ez ezik, matrizean dagoen beste zerbaitek eragina izatea. Hori argitzea ez da lortu, beraz, erreakzio honen inguruan sakontzeko asko dago oraindik.

Conclusions

As has been mentioned more than once, the principal object of this research has been the development of a method for the determination of sulphites. The main conclusion is that it has been possible to carry out the method proposed in the original articles in the laboratory: although it has not been possible to describe exactly what is happening in the reaction environment, fixing several details allowed to determine the path of the reaction.

To begin with, it has been possible to dispel concerns about the problems that the reagent might have given due to the color it has before reacting with sulphites. In addition, the first measurements of visible ultraviolet have been sufficient to obtain a calibration that considers the reaction between PRA and sulphites valid. With regard to the analysis of digital image, by measuring parameters such as LOD and LOQ, it can be said that the conditions used for taking photographs are adequate and the method quite sensitive, since relatively low values have been obtained for those parameters.

Patterns or solutions of known concentration have been used in the laboratory to carry out all that has been done so far, but the problems have arisen when trying to analyze real samples. The incompatibility of the data obtained from the analysis of the digital image with the results of the Ripper method has led to the assurance of the presence of a matrix effect by standard additive method.

The point is that sulphite concentrations obtained by standard additions do not match those obtained by the Ripper method either. Taking into account the measurements of pH in the environment, the image method supposedly determines molecular SO_2 , but it is possible that the equilibrium of such complex sulphites is influenced not only by pH, but by something else in the matrix. This has not been clarified, so there is still much to be done about this reaction.

Bibliografia

1. Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(11), 1643–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>
2. Sheridan, M. K., & Elias, R. J. (2016). Reaction of acetaldehyde with wine flavonoids in the presence of sulfur dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(45), 8615–8624. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03565>
3. Almeida, P. L., Figueiredo do Bonfim, T. H., Cunha, F. A. S., Lima, K. M. G., Aquino, J. S., & Almeida, L. F. (2018). A rapid, sensitive and green analytical method for the determination of sulfite in vinegars using pararosaniline reaction with image detection. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*, 10(4), 448–458. <https://doi.org/10.1039/c7ay02155k>
4. Webmaster. Química del dióxido de azufre en el vino. TDI Tecnología Difusión Ibérica, SL. <https://t-d-i.es/quimica-del-dioxido-de-azufre-en-el-vino/> (2024ko maiatzean kontsultatua)
5. Beyad, Y., Burns, R., Puxty, G., & Maeder, M. (2014). A speciation study of sulfur(IV) in aqueous solution. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, 43(5), 2147–2152. <https://doi.org/10.1039/c3dt52890a>
6. Monro, T. M., Moore, R. L., Nguyen, M.-C., Ebendorff-Heidepriem, H., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2012). Sensing free sulfur dioxide in wine. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(8), 10759–10773. <https://doi.org/10.3390/s120810759>
7. Li, Y., & Zhao, M. (2006). Simple methods for rapid determination of sulfite in food products. *Food Control*, 17(12), 975–980. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.07.008>
8. Daniel C. Harris. Quantitative Chemical Analysis. Eighth edition. W. H. Freeman and Company.

9. Zarazua Aguilar, Yohuali, Velázquez-Herrera, Franchescoli Didier y Garzón Pérez, Amanda Stephanie. Las microondas en la síntesis de nanomateriales. *Revista Digital Universitaria (rdu)*, 24(5). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2023.24.5.2>

10. What is a UV-Vis spectrophotometer. Implen. <https://www.implen.de/uv-vis-spectrophotometer/> [2024ko maiatzean kontsultatua]

11. “Métodos oficiales de análisis” 2. atala, 197-204. Nekazaritza, Arrantza eta Elikadura Ministeritza, 1993.

12. N. Campillo Seva. *EQUILIBRIOS Y VOLUMETRÍAS DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN*. Wwww.um.es. (azken begiratua: 2024ko apirilaren 26a) <https://www.um.es/documents/4874468/11830096/tema-8.pdf/eee4b9f8-898f-4f94-bed3-315fafa02d87>

13. Capitán-Vallvey, L. F., López-Ruiz, N., Martínez-Olmos, A., Erenas, M. M., & Palma, A. J. (2015). Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 899, 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>

14. John, N., Viswanath, A., Sowmya, V., & Soman, K. P. (2016). Analysis of various color space models on effective single image super resolution. En *Advances in Intelligent Systems and Computing* (pp. 529–540). Springer International Publishing. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-23036-8_46

15. Albizu, G., Bordagaray, A., Dávila, S., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., & Vidal, M. (2020). Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 154(104600), 104600. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104600>

16. Choodum, A., Kanatharana, P., Wongniramaikul, W., & Nic Daeid, N. (2013). Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil. *Talanta*, 115, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.037>

17. Chaplan, C. A., Mitchell, H. T., & Martinez, A. W. (2014). Paper-based standard addition assays. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*, 6(5), 1296–1300. <https://doi.org/10.1039/c4ay00205a>
18. Kościelniak, P. (1999). Nonlinear calibration by the standard addition method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems: An International Journal Sponsored by the Chemometrics Society*, 47(2), 275–287. [https://doi.org/10.1016/s0169-7439\(98\)00215-9](https://doi.org/10.1016/s0169-7439(98)00215-9)
19. Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
20. Chavan, S. D., & Desai, D. M. (2022). Analytical method validation: A brief review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 16(2), 389–402. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1165>

Eranskinak

1. Eranskina: patroien prestaketa

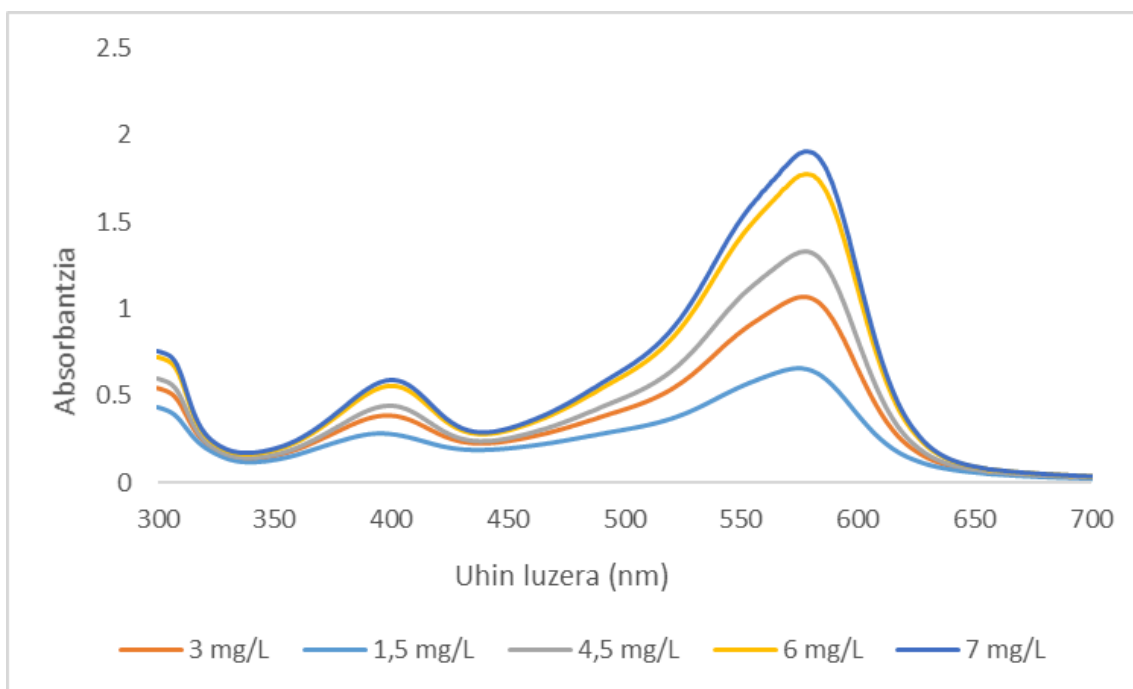
Hona hemen NaHSO₃ patroiak prestatzeko erabilitako stock disoluzioko bolumenak azaltzen dituen E1. Taula:

E1. Taula: patroien prestakuntza stock disoluziotik abiatuz.

NaHSO ₃ (mg/L)	0,75	1,5	3,0	4,5	6,0	7,0	8,0
STOCK (μL)	187,5	375	750	1125	1500	1750	2000
Kasu guztietan 25 mL arte eraman EDTA erabiliz							

2. Eranskina:

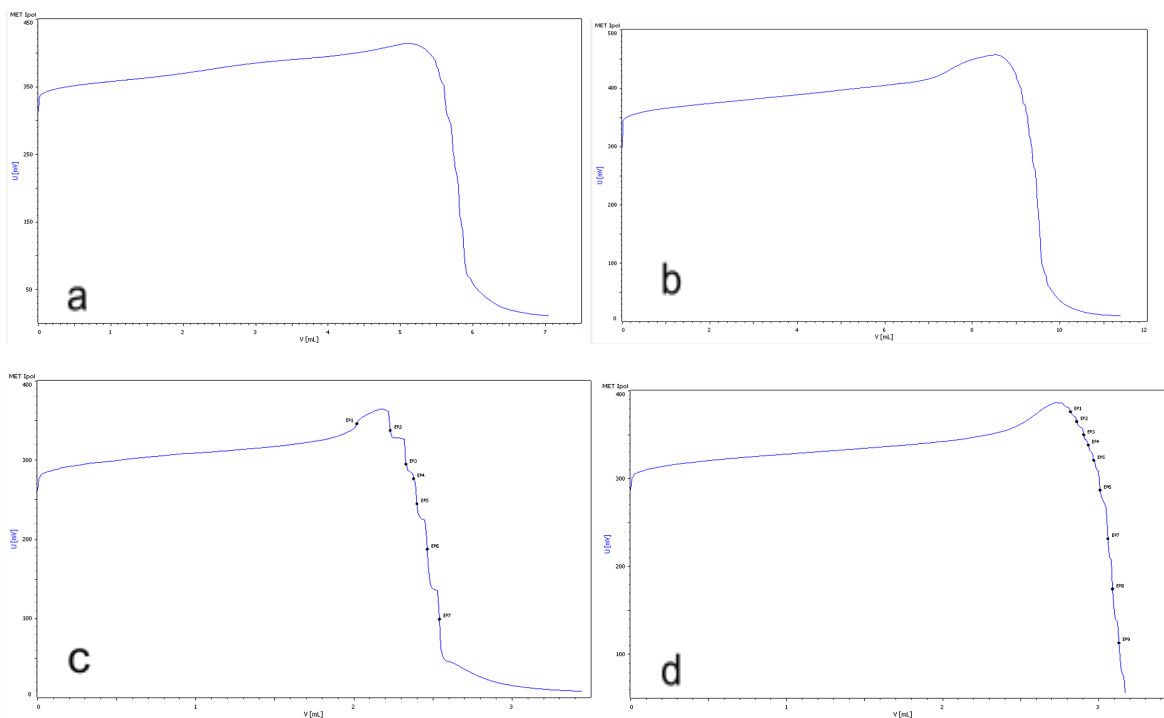
Hurrengo E2. Irudian ageri da ultramore-ikuskorrean lortutako espektroa. Sarreran aipatu bezala, ikus daiteke absorbantzia maximoa 575 nm inguruko uhin luzerari dagokiola eta seinale maximo hori 2 balioaren azpitik dagoela.



E2. Irudia: UV-Vis metodoaren bidez lortutako espektroa, absorbantzia uhin luzeraren aurrean irudikatuz.

Eranskina 3:

Jarraian E3. irudian ikus daitezke Ripper metodoaz lorturiko balorazio kurbak. Sarrerako Ripper-en metodoan aipatu bezala, hasieran potentzialaren balioa (y ardatza) altua da, baina baloratzailer gehiago gehitu ahala I_2 agertzen doan heinean bat-bateko jaitiera nabarmena jasaten du. Begibistakoa den jaitiera hori zein baloratzailer kantitaterekin ematen den X ardatzean irakur daiteke eta datu horrek ahalbidetzen digu sulfito kontzentrazioa kalkulatzeko.



E3. Irudia. Gehitututako iodato bolumenaren eta disoluzioan neurtutako potentzialaren arteko erlazioa. a) Ardoaren sulfito askea b) Ardoaren sulfito totala c) Ozpinaren sulfito askea d) Ozpinaren sulfito totala

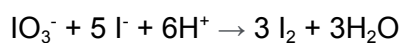
4. Eranskina: Ripper metodoko erlazioaren jatorria

Hurrengo hau da kalkuluetarako erabili den erlazioa:

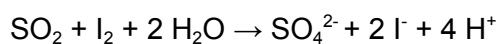
$$SO_2 \text{ (mg/L)} = \text{baloratzaille mL} * 9,79$$

Biderkatzen ageri den faktore hori estekiometriatik dator. Bibliografian gehienetan 10 agertzen bada ere, jarraian ikus daiteke nondik datorren biderkagai zehatz hori:

Baloratzailleak (KIO_3) I^- soberakinarekin ematen duen erreakzioa:



In situ sortutako iodo horrekin sulfitoek ematen duten balorazio erreakzioa:



Mol bat iodotok 3 mol iodo sortzen ditu, eta balorazioan sulfito mol bakoitzeko mol bat iodo xahutzen dela kontuan hartuz:

$$\text{mol SO}_2 = \text{mol I}_2 = 3 \text{ mol IO}_3^-$$

$$\text{mol SO}_2 = 3 [\text{IO}_3^-] V_{\text{IO}_3^-}$$

IO_3^- baloratzailerak laborategian prestatutako disoluzioa izanik, bere kontzentrazioa erraz kalkulatu daiteke pisatutako kantitatea erabiliz: 0,5567 g KIO_3 (%98) 1L uretan disolbatu direnez, $[\text{IO}_3^-] = 0,00254936 \text{ M}$

$$[\text{SO}_2] (\text{M}) = \frac{3 * 0,00254936 \text{ M} * \text{baloratzailerak mL}}{50 \text{ mL (lagin mL)}}$$

Hortik lortzen diren mol/L-ak mg/L-tara pasatzeko:

$$[\text{SO}_2] (\text{M}) * 64 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}} = \text{SO}_2 (\text{mg/L})$$

Faktore horiek guztiak biderkagai bakar batean jarritz:

$$\text{SO}_2 (\text{mg/L}) = 9,79 * \text{baloratzailerak mL}$$

5. Eranskina: Adizio estandar metodoan malden konparaketarako t froga

Adizio estandar metodo bidez matrize efektu baten presentzia ziurtatzeko garaian kanpo eta barne kalibratuaren maldak estatistiko konparatu nahi izan dira t froga erabiliz. Hona hemen jarraitutako prozedura:

1. F froga

$$F_{kal} = \frac{(S_{y/x})_1^2}{(S_{y/x})_2^2} \quad (\text{E5a. Ekuazioa})$$

non $S_{y/x}$ = erregresio kurbaren desbideratze estandarra.

Ekuazio honekin lortutako F kalkulatu F tabulatuarekin alderatu da, horretarako hurrengo taula erabiliz:

E5a taula. Balore kritikoak F-rentzako (%95)

$v_2 \backslash v_1$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30
2	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5
3	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,62
4	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,80	5,75
5	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50
6	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81
7	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38
8	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,22	3,15	3,08
9	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,01	2,94	2,86
10	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,85	2,77	2,70
15	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25
20	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04
30	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,01	1,93	1,84

v_1 : zatikizunaren askatasun graduak (n_1-2)
 v_2 : zatitzailearen askatasun graduak (n_2-2)

$F_{kal} < F_{tau}$: desbideratzeen artean ez dago diferentzia adierazgarririk.

$F_{kal} > F_{tau}$: desbideratzeen artean diferentzia adierazgarria dago.

Lan honetan, lagin guztien kasuan $F_{kal} < F_{tau}$ izan da. Hori jakinik, honela jarraitu du prozedurak:

- Ondorengo ekuazioa erabili da batezbesteko $S_{(y/x)_0}$ kalkulatzeko:

(E5b. Ekuazioa)

$$(s_{y/x})_0 = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)(s_{y/x}_1)^2 + (n_2 - 2)(s_{y/x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

- Hurrengo ekuazioaren bidez bi malden arteko diferentziaren desbideratze estandarra kalkulatu da ($S_{b_1-b_2}$):

(E5c. Ekuazioa)

$$s_{b_1-b_2} = (s_{y/x})_0 \sqrt{\frac{1}{\sum_i (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_i (x_{i2} - \bar{x}_2)^2}}$$

4. Ondorengo ekuazioarekin t balore bat kalkulatu da:

$$t_{kal} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_{b_1 - b_2}} \quad (\text{E5d. Ekuazioa})$$

5. Hurrengo taulatik t balore tabulatua lortu da %95eko konfiantza tartean ($n_1 + n_2 - 4$ askatasun graduarekin hartuta), aurreko balore kalkulatuarekin konparatua izan dena:

E5b. Taula: t-rentzako baloreak (%95)

Askatasu n graduak	t	Askatasu n graduak	t
1	12,71	8	2,31
2	4,30	9	2,26
3	3,18	10	2,23
4	2,78	15	2,13
5	2,57	20	2,09
6	2,45	25	2,06
7	2,36	∞	1,96

$t_{kal} < t_{\tau}$: ez dago diferentzia adierazgarririk, bi maldak estatistikoki berdinak.

$t_{kal} > t_{\tau}$: diferentzia adierazgarria dago, bi maldak estatistikoki ezberdinak.

Hiru laginen kasuan $t_{kal} > t_{\tau}$ izanik, kanpo eta barne kalibratuaren maldak estatistikoki desberdinak kontsideratu dira.

6. Eranskina: Binakako laginen konparaketa (t froga)

Metodo desberdina erabiliz lortutako emaitzak alderatzeko eginiko t froga binakako laginena izan da, ondorengo prozedura jarraituz:

1. Bi metodoekin lortutako emaitzen arteko diferentzia kalkulatu da.
(diferentzia = ultramorearen seinalearen balioa - irudi digital analisiaren seinalearen balioa)
2. Ondorengo ekuazioa erabiliz t balorea kalkulatu da.

$$t_{kal} = \frac{d\sqrt{n}}{S_d} \quad (\text{E6. Ekuazioa})$$

non:

n: lagin kopurua; d: binakako balioen arteko diferentzien batezbestekoa; S_d : binakako balioen arteko batezbesteko desbideratze estandarra

3. Kalkulatutako t balore hori t tabulatuarekin alderatu (horretarako ikus aurreko eranskineko E5b. Taula)

$t_{kal} < t_{tau}$: ez dago diferentzia adierazgarririk.

$t_{kal} > t_{tau}$: diferentzia adierazgarria dago.