

# Irudi Digitalen Analisia: espektrofotometria ordezkatzan

(*Digital Image Analysis: replacing spectrophotometry*)

Gorka Albizu\*, Irati Berasarte, Ane Bordagaray, Sergio Dávila,  
Edurne Jaime-Barquero

Kimika Analitikoa, Donostiako Kimika Fakultatea  
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

**LABURPENA:** Irudi digitalen analisia (DIA) teknika multzo batek osatzen du eta helburu nagusia da aztergai den sistema bati buruzko informazio adierazgarria determinatzea sistema horren irudiak erabiliz. Metodoaren abantaila nagusiak bere abiadura, sinpletasuna eta beharrezko lagin kopuru txikia dira ( $400\ \mu\text{L}$ -tik behera mikroplakak erabiltzen bada), baita sortutako hondakin kopuru txikia ere. Lan honetan DIAren hiru aplikazio desberdin deskribatzen dira: nikel bainuetan aurki daitezkeen konposatu nagusien analisia eta kontrola, hala nola, nikela, amonioa eta sulfatoak; fosfatoen eta pH-aren aldibereko determinazioa malko artifizialetan eta tartrazina eta allura gorria koloratzaileen determinazioa jangaietan. Aplikazio hauetan, mahaigaineko eskanerra eta telefono mugikorra erabili dira irudiak eskuratzeko.

**HITZ GAKOAK:** irudi digitalen analisia, nikel bainuak, malko artifizialak, koloratzaileak.

**ABSTRACT:** *Digital Image Analysis (DIA) consists of a set of techniques that aim to obtain representative information about a system using images of that system. The main advantages of this method are its speed, simplicity and small amount of sample needed (below  $400\ \mu\text{L}$  if microplates are used), as well as the small amount of waste created. Three different applications are described for DIA in this work: the determination of some of the major compounds in a nickel electroplating baths, such as nickel, ammonium and sulfate ions; the simultaneous determination of phosphates and pH in different eye drops and the simultaneous determination of the color additives tartrazine and allura red in food products. In these applications, a flatbed scanner and a smartphone were used for image acquisition.*

**KEYWORDS:** *digital image analysis, nickel baths, eye drops, food colorants.*

\* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Gorka Albizu Martinez. Kimika Analitikoa, Donostiako Kimika Fakultatea, Manuel Lardizabal pasealekua, 3 (20018, Donostia). – [gorka.albizu@ehu.eus](mailto:gorka.albizu@ehu.eus) – <https://orcid.org/0000-0002-9573-0764>.

**Nola aipatu / How to cite:** Albizu, Gorka; Berasarte, Irati; Bordagaray, Ane; Dávila, Sergio; Jaime-Barquero, Edurne (2021). «Irudi Digitalen Analisia: espektrofotometria ordezkatzan»; *Ekaia*, 39, 2021, 189-209. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.21860>).

Jasoa: 2020, ekainak 29; Onartua: 2020, urriak 22.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2021 UPV/EHU



Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

## 1. SARRERA

Azken hamarkadetan teknologiak jasan duen garapena handia izan da. Horregatik, helburu orokor bat izan da zientziako atal ezberdinetan ezaugarri askotan hobeak izango diren teknikak bilatzea. Atal horietako bat Kimika Analitikoa izan da. Kimika Analitikoa materiaren kuantifikazioa, identifikazioa eta banaketa aurrera eramateko metodoak erabili eta aztertzen dituen diziplina zientifikoa da [1]. Aipatutako aurrerakuntza teknologikoaz baliatuz, analisi metodo azkarragoak, sinpleagoak, erreaktibo kantitate gutxiago behar dutenak, ingurumena errespetatzen dutenak eta, batez ere, emaitza fidagarriak ahalbidetzen dituztenak garatu daitezke.

Garapen handia jasan duen eremuetako bat irudiak lortzeko gailuen teknologia izan da. Gaur egun, kamera digital, telefono mugikor edo mahaigaineko eskaner batekin kalitate handiko argazkiak eskura daitezke, eta irudi hori ondo tratatuz, aztertzen ari den sistemari buruz informazio asko lor daiteke. Irudien eta ordenagailuen bilakaerari esker, azken urteotan irudi digitalaren analisiarekin (DIA, *Digital Image Analysis*) lotutako argitalpenak eta ikerketak esponentzialki ugariatu dira, ordenagailuek informazio asko prozesatzeko aukera ematen baitute. Baina zer da DIA? Hitz gutxitan, sistema batetik informazio analitikoa ateratzeko irudi digital bat erabiltzea.

Analisi-teknika batek bete behar dituen ezaugarri gehienak betetzen ditu teknika horrek; merkea eta azkarra izatea esaterako, merkea irudi digitalak lortzeko gailuak geroz eta eskuragarriagoak direlako, eta azkarra, aldi berean lagin asko analiza daitezkeelako eta kasu gehienetan, analisia sistematizatzeko aukera dagoelako. Gainera, analisi-teknika horrekin erabili beharreko lagin kantitatea oso txikia da, eta ondorioz, ingurumena gehiago errespetatzen laguntzen du. Metodoak eskaintzen dituen abantailak baliatuz eta kolorimetria oinarri hartuta, espektrofotometria bidezko analisiak ordezkatzeko da helburu nagusia.

Esan bezala, irudiaren analisirako aplikazio asko argitaratu dira. Kasu askotan elikagai laginekin lan egiten da; adibidez, pisto saltsa ezberdinak sailkatzea lortu da irizpide desberdinen arabera DIA erabiliz [2]. Beste artikulatu batzuetan etanola [3] edo fosfatoak [4] edarrietan kuantifikatu dira irudi digital batetik abiatuta, eta besteak beste, ur-laginetan merkurioa arrakastaz zehaztu da [5]. DIA behi-esne faltsua [6] edo boligrafo-tintak [7] identifikatzeko ere erabili da.

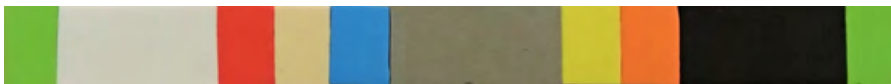
Ikusi da teknika honetan oinarritzen diren aplikazio ugari daudela, baina zertan datza zehazki DIAk? Nolakoa da metodo hauen prozedura orokorra?

## 2. IRUDI DIGITALEN ANALISIA

Teknika multzo batek osatzen du DIA eta aztergai den sistema bati buruzko informazioa lortzea du helburu. Esan den moduan, adierazgarria den informazioa determinatzeko sistemaren irudiak erabiliko dira. Analisi mota hori garatzeko argazki bat lortzen duen gailua bereziki garrantzitsua da. Lehenago aipatutako gailu guztien artean mugikorra da garapen handiena jasaten ari dena, izan ere, horren erabilerak abantaila batzuk eskaintzen ditu: txikia da, erraz garraiatzen da eta eskanerra baino eskuragarriagoa da. Bestalde, mugikorrek geroz eta kalitate handiagoko argazki kamerak dituzte; argazkiaren eskuratzea azkarragoa da eta fotodetektagailua barnertua dute. Eskanerra handiagoa eta garraiatzeko zailagoa den arren, faktore batzuk hobeto kontrolatzea ahalbidetzen du tresna horrek, hala nola, argiztapena [8, 9]. Aipatutako gailu guztiekin lortutako argazkia irudi digital bat izango da.

Hala ere, eskuratutako irudi guztiak onartu behar dira? Substantzia baten identifikazioa edo kuantifikazioa burutzea doitasun eta zehaztasun handia eskatzen dituen prozesua da. Horregatik, irudiaren kalitateak berebiziko garrantzia du. Kalitatearen kontrol hori egitea ezinbestekoa da, beraz. Izan ere, kalitate eskaseko irudi bat ontzat hartzen bada, emaitza desagokiak eta ez-fidagarriak lortuko dira. Irudiaren kontrola egiteko metodo desberdinak garatu dira. Bibliografian horien adibide desberdinak aurki daitezke [10-13]. Esaterako, Santos Benedetti eta lankideek [3] argiztapena kontrolatzeko beltzez margotutako kutxa itxi bat erabiltzen dute, homogeneotasuna 4 LED bonbilla bidez bermatuz. Bestalde, Moonrengsee eta lankideek [11] sistema desberdin bat proposatzen dute. Kasu horretan ere kutxa beltz bat erabiltzen dute, baina argiztapena 7 LED bonbilla erabiliz kontrolatzen da.

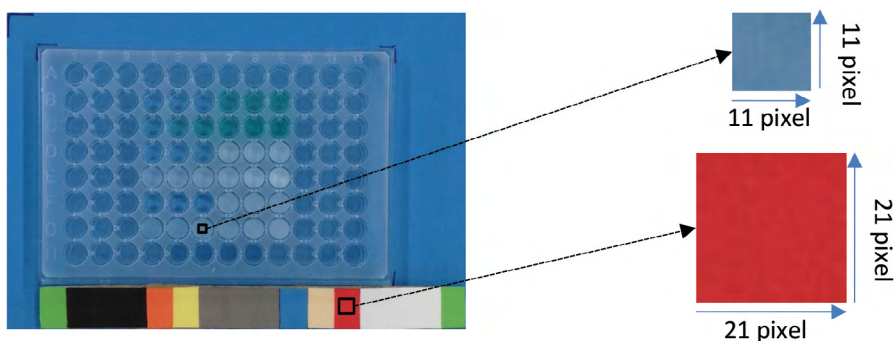
Dena den, badaude beste metodo batzuk. Beste lan batzuetan [14-18] kolore patroia bat erabili da argiztapenaren kontrola egiteko. Artikulu honetan aipatuko diren aplikazioetan kolore patroia eta horretatik eratorritako kontrol-grafikoak erabili dira. Kolore patroia 10 kolore desberdinetako gomazko (etilbinilazetatoa) piezatzoz osatuta dago (1. irudia). Horren helburua desagokiak diren irudiak identifikatu eta baztertzea da. Arrazoi hori dela medio, patroia hau argazki guztietan agertu behar da. Gomendagarria da argazkia beti leku berean ateratzea, bertako argiztapena kontrolatuz. Horrela, kontrolaezinak diren faktoreak besterik ez dira geratuko, esaterako, laborategiko argiztapena edota eguneko eguraldia.



**1. irudia.** 10 kolore desberdinez osatutako kolore patroia; honi esker argiztapenak eragindako aldaketak era adierazgarrian ebaluatu ahal izango dira.

Irudien kontrola era azkar eta grafikoago batean egiteko kolore patroiko kolore bakoitzarentzat kontrol grafiko bat sortzen da. Grafiko horietan mugak ezartzen dira, irudiaren egokitasunaren adierazle izango direnak [19].

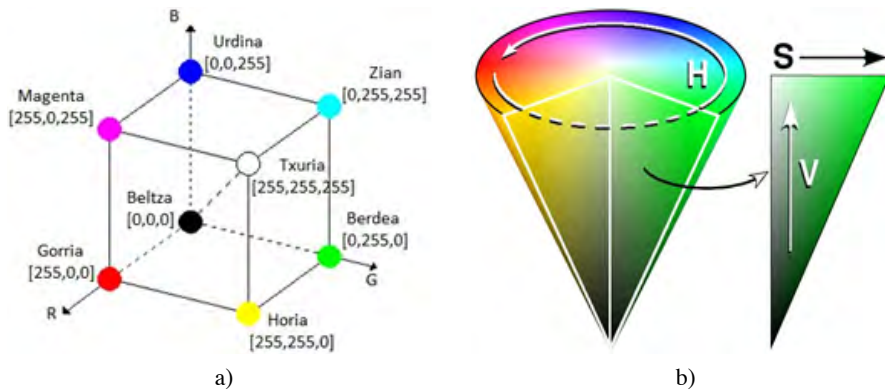
Irudia lortu eta kontrola egin ondoren, irudi digitalaren prozesaketa egiten da. Horretarako zenbait eragiketa egin daitezke, irudia hobetzeko edota bertatik informazioa lortzeko. Gehien erabiltzen den eragiketa irudiaren segmentazioa da: horren helburua irudiaren informazio analitikoa duen zatia aukeratzeko da (2. irudia). Zati horri ROI deritzo (*Region of Interest*) eta tamainaren aukeraketa pixeletan oinarrituz egiten da. Beste eragiketa batzuk ere badaude, hala nola, distira doitzea, leuntzea eta bereizmena hobetzea [8].



**2. irudia.** Argazki batetik intereseko gune desberdinak atera daitezke pixeletan oinarrituz (ROI). Kasu honetan, kolore patroiko kolore bakoitzarentzat  $21 \times 21$  pixeletako sekzio bat atera da, eta laginen kasuan, mikroplakaren zulotxo bakoitzetik  $11 \times 11$  pixeleko sekzioa.

Jarraian irudi digitalaren tratamendu matematikoa egiten da, irudiaren intereseko eskualdetik (ROI) informazio kimikoa (kontzentrazioa, adibidez) ateratzeko asmoz. Horretarako hainbat parametro erabil daitezke, Photoshop, ImageJ edo MatLab softwareak erabiliz lor daitezkeenak. Parametro horiek kolore sistema bakoitzaren araberakoak izaten dira. Kolore sistema bat, definizioz, koloreak numerikoki azaltzea ahalbidetzen duen modelo matematiko bat da [8]. Sistema ugari existitzen dira, hala nola, RGB (*Red*, gorria; *Green*, berdea; *Blue*, urdina), HSV (*Hue*, tonua; *Saturation*, saturazioa; *Value*, balioa), CMYK (*Cyan*, zian; *Magenta*, magenta; *Yellow*, horia; *Key*, beltza), CIELAB (International Commission on Illumination (*CIE*)-ek definitutako kolore sistema: L, argitasuna beltzetik zurira; a, kolore aldaketa berdetik gorrira eta b, kolore aldaketa urdinetik horira) eta  $Y C_B C_R$  (*Y*, *luminance*, luminantzia; *C<sub>B</sub>*, *blue-chroma*, kolore urdin mota; *C<sub>R</sub>*, *red chroma*, kolore gorri mota). Sistema bakoitzean irudi desberdinak lortzen dira, eta aztertu nahi denaren arabera bat ala beste erabiliko da.

Kontuan izanik giza begia trikromatiko delako, egungo teknologian erabiltzen diren kolore sistema ohikoek trikromia hori erabiltzen dute oinarritzat. Ondorioz, irudi digitaletan kolore bakoitza 3 balioen bitartez azaltzen da. Sistemarik ohikoena RGB sistema da, non R (*red*), G (*green*) eta B (*blue*) kanalen bidez kolore bakoitza azaltzen den. Hiru kanaletako bakoitzean balioak 0 eta 255 artean egongo dira [20]. Horrela, hiru balio horien konbinaketaren bitartez koloredun irudia lortuko da. Bestalde, eta aipatu moduan, helburuaren arabera beste sistema batzuk ere erabili daitezke. Horietako bat HSV sistema da. Kasu horretan, H (*hue, tono* edo *matiz*), S (*saturation*) eta V (*value*) baloreen bidez azaltzen da kolore bakoitza. HSV sistema honetan kanal bakoitzaren balioak 0 eta 1 artekoak dira. Hala ere, bi sistemak modu ezberdinean irudikatzen dira (3. irudia) eta horrela, haien arteko desberdintasunei errazago antzematen zaie.

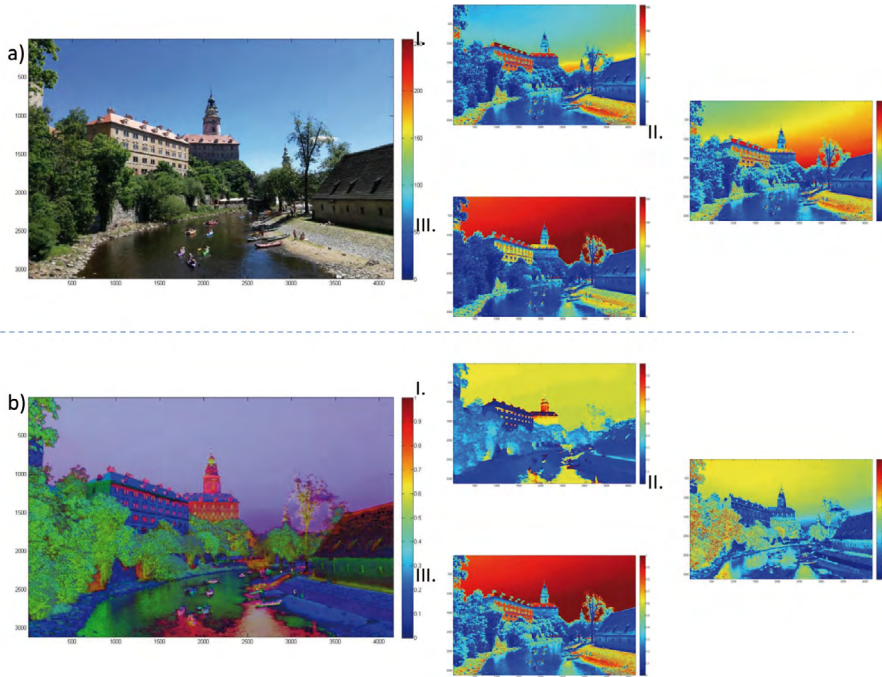


**3. irudia.** a) RGB sistemaren irudikapen kubikoa. Ardatzetako bakoitza (x,y,z) kolore kanal bati dagokio. Kolore bakoitzak 0 eta 255 bitarteko hiru balio izango ditu eta horien arabera kokatuko da kuboan. b) HSV sistemaren irudikapen konikoa. Konoaren angelu desberdinek koloreak definitzen dituzte, saturazioak kolorearen intentsitatea adierazten du eta balioak kolorearen argitasuna/iluntasuna.

Desberdintasun hauek direla medio, irudi bat modu desberdinetan ikusi eta deskonposatzen da, hurrengo irudian (4. irudia) antzeman daitezkeen bezala.

Irudia lortu ondoren, irudi horren informazioa erauzi behar da. Informazio hori lagin baten analisirako erabili nahi bada, irudiaren eta analitiko edukiaren arteko erlazio egokiena bilatu behar da, kolore sistema bakoitzak eskaintzen dituen kanalak analitiko kontzentrazioarekin erlazionatuz. Helburu nagusia kasurik sinpleena bilatzea da. Kalibrazio zuzena bilatzeko eta RGB kolore sistema adibidetzat hartuz, R, G edo B kanalen batez besteko balioa erauzi eta balio hori «absorbantzia» bihurtuko da [4]. Aldaketa

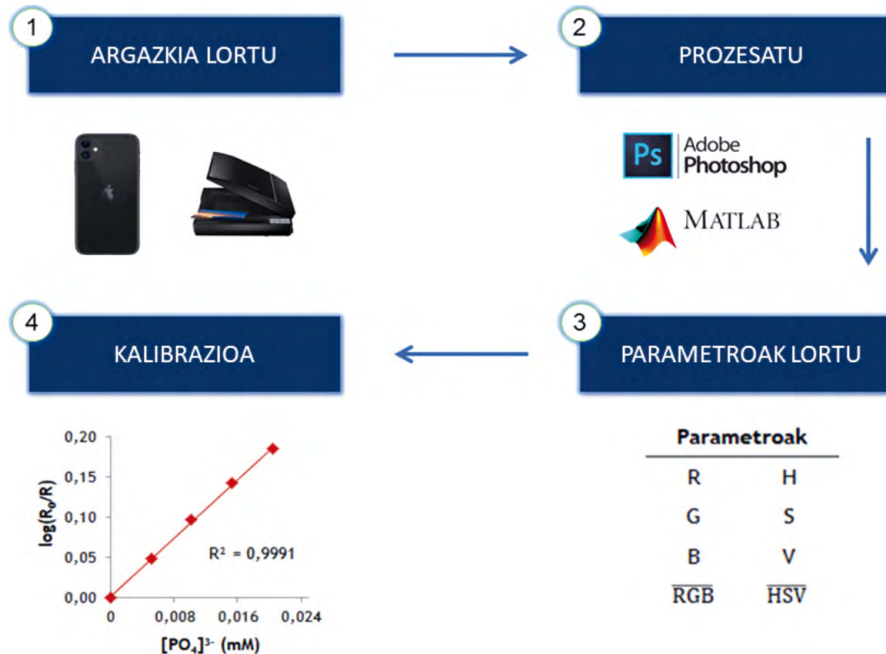
egiteko  $A = \log(I_0/I)$  ekuazioa erabiliko da, non  $I$  aztergai den disoluzioaren  $R$ ,  $G$  edo  $B$  balioa den eta  $I_0$  disoluzio zuriaren  $R$ ,  $G$  edo  $B$  balioa. Helburu nagusia kolore kanal bakar baten eta analitoaren arteko erlazio lineala lortzea izango da. Hasiera batean erlazio hau zuzena izatea espero da, normalean hori baita gertatzen dena.



**4. irudia.** Irudi bera bi sistema ezberdinetan adierazita eta bakoitzak bere hiru kanaletan banatuta. a) Irudia RGB sisteman; I) R Kanala; II) G Kanala; III) B Kanala. b) Irudia HSV sisteman; I) H Kanala; II) S Kanala; III) V Kanala.

Kasu askotan, ordea, ez da erlazio zuzena lortzen; irudiaren homogeneotasun falta dela eta, konposatu nahasteak determinatu nahi direlako edota kolore aldaketa bat aztertu nahi delako. Ondorioz, datu matrize konplexuagoak sortu beharko dira, iruditik erauzitako datu gehiago erabiliz. Horrela, patroi edo lagin bat definitzeko aldagai bat baino gehiago erabiliko dira. Aldagai hauek kasu bakoitzean kolore sistemen arteko konbinaketa hobereana bilatuz zehaztuko dira. Datu matrize hauen analisia egiteko ezinbestekoa da kimimetria erabiltzea. Kimiometriak teknika matematiko eta estatistikoak erabiltzen ditu datu konplexuetatik informazio kimiko eta fisikoa erauzteko [21]. Horrela, aldagai anitzeko datuen tratamendua ahalbidetzen duten algoritmoak erabili beharko dira.

5. irudiak prozesua laburtzen du. Lehenik eta behin, irudi digitala lortu behar da, horretarako bi aukera nagusi daudelarik, mugikorra eta eskanerra. Ondoren, irudi horren prozesaketa beharrezkoa da, software desberdinez baliatuz lortuko dena. Prozesaketa horrekin hainbat parametro lor daitezke, esaterako, RGB balioen batezbestekoa edo R, G edota B kanaletako balioak bakarrik. Parametro horiek kalibraziorako erabili daitezke, baina baita irudien kontrolerako ere. Azkenik, laugarren pausoa, irudiko seinalea absorbantzia bihurtu eta analito kontzentrazioarekin erlazionatzean datza.

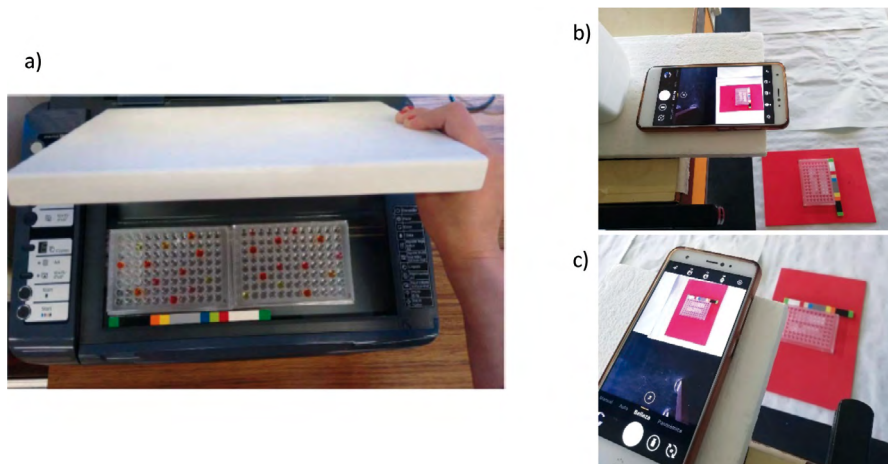


**5. irudia.** DIAren prozesu osoaren laburpena pausoz pauso azalduta.

### 3. ZEIN SEKTORETAN APLIKA DAITEKE IRUDI DIGITALAREN ANALISIA?

Azkeneko urteetan, EHUko Irudi Digitala eta Kimiometria Aplikatua (IdeKA) ikerketa taldeak DIAn oinarritutako aplikazio desberdinetan lan egin du. Jarraian azalduko diren aplikazioetan irudiak lortzeko erabili diren tresnak telefono mugikorra edo mahaigaineko eskanerra izan dira. Lagina likidoa den kasuetan polipropilenoazko mikroplaka gardenak erabili dira. Mikroplakek  $420 \mu\text{L}$  bitarteko gaitasuna duten 96 zulotxo dituzte, eta ondorioz, lagin ugariren aldibereko determinazioa egiteko aukera dago. Eskanerraren kasuan, mikroplaka inguruneke argitik babesteko neurrira egin-

dako tapa zuri bat erabili da, horrela argiztapena beti berdina izango dela ziurtatuz (6.a irudia). Dena den, kolore patroia irudi guztietan gehitu da, kontrola zorrotzagoa izan dadin. Irudiak mugikorrarekin eskuratu diren kasuetan ez da iluminazioa kontrolatzeko muntaketa berezirik erabili. Irudiak beti leku berean eta prozedura berari jarraituz lortu dira (6.b eta 6.c irudiak), guztietan kolore patroia gehituz, hau baita argiztapena kontrolatzen lagunduko duen erreminta.



**6. irudia.** a) Mahaigaineko eskanerrarekin irudiak lortzeko sistema. Polipropileno-  
zko mikroplakak, kolore patroia eta dena estaltzeko erabiltzen den tapa ikus dai-  
tezke. b) eta c) Mugikorrarekin irudiak lortzeko sistema. Mugikorra beti mikropla-  
katik distantzia berdinerara jartzen da.

### 3.1. DIA eta INDUSTRIA: nikel estaldura bainuen analisisa eta kontrola [18]

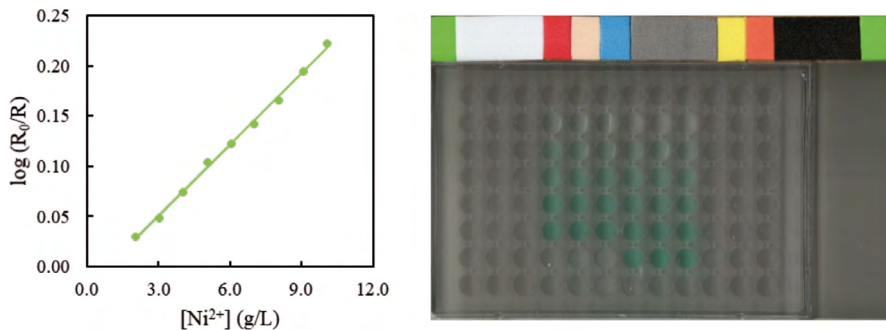
Nikela da estalduren industrian gehien erabiltzen den metaletako bat; korrosioarekiko eta urradurarekiko duen erresistentzia handiagatik, bere propietate ferromagnetikoengatik eta estaldurari eskaintzen dizkion propietate estetikoengatik [22]. Horregatik guztiagatik, nikelezko estaldurak hainbat sektoretan erabiltzen dira, hala nola, informatikan, elektronikan edo automobilgintzan [23].

Nikel estaldura prozesua deposizio bainuetan egiten da, non metala Ni(II)-tik Ni(0)-ra erreduzitzen den estali beharreko gainazalean ezartzeko. Emaiza egokia izan dadin, beharrezkoa da bainuaren parametroak kontrolatzea, esaterako, tenperatura, pH-a edo agitazioa. Era berean, oso garrantzitsua da bainua osatzen duten konposatu guztien kontzentrazioaren etengabeko kontrola izatea.



Oro har erabiltzen den nikel iturria nikel sulfato gatzak izaten dira. Beraz, bainuetan nikela eta sulfatoak dira kontzentrazio handiena duten konposatuak. Estalduren industrian nikela kuantifikatzeko espektroskopia atomikoa [24], EDTArekin egindako balorazioak edo Ultramore-Ikuskor (UV-Vis) espektrofotometria [25] erabiltzen dira. Azken hori disoluzioaren kolore berdean oinarrituta dago, Ni(II) kontzentrazioaren arabera aldatzen dena. Bestalde, sulfato anioien determinazioa ioi kromatografia bidez egin ohi da [26]. Bainu askotan agertzen den beste osagai bat amonioa da. Amonioa konplexatzaile bezala gehitzen da bainuaren deskonposaketa eragozteko eta pH tanpoi bezala jokatzen. Katioi horren determinazioa ere ioi kromatografia bidez egiten da [27].

Lehen aipatu diren teknika gehienak erabiltzeko ekipo garestiak eta sofistikuak beharrezkoak dira, edo bestela, balorazioaren kasuan, lagin kantitate asko. Horregatik, interes handikoa da analito hauek DIA bidez determinatzeko metodo berriak garatzea. Lan honetan deskribatzen den aplikazioetako bat hau da eta, kasu honetan, eskanerra erabili da irudiak lortzeko. Nikelaren determinazioa metal honek bere disoluzioei ematen dien kolore berdean oinarritu da, Ni(II) forma oxidatuan. Ikusi da  $\log(R_0/R)$  balioa eta  $\text{Ni}^{2+}$  kontzentrazioaren artean erlazio lineal bat dagoela; non  $R_0$  disoluzio zuriaren (kasu honetan ura) kanal gorriko batez besteko balioa den eta  $R$  laginaren edo patroiaren kanal gorriko batez besteko balioa da, 7. irudian ikus daitekeen den bezala.



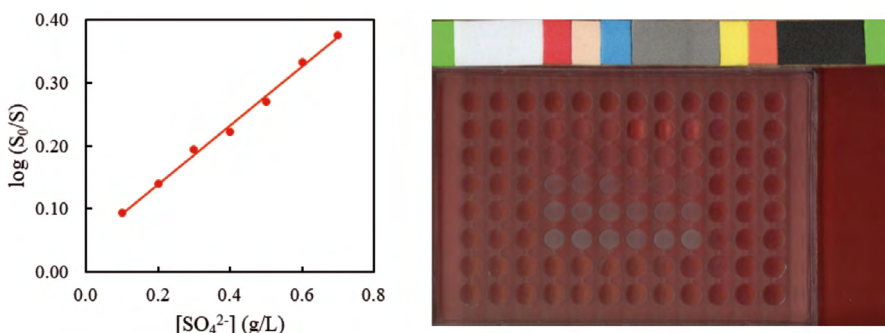
**7. irudia.** Ezkerrean ikus daiteke nikela determinatzeko erabilitako kalibratua. Eskubiko irudia eskanerraren bidez lortutako irudi digitala da. Mikroplakaren erdiko zuloetako nikel kontzentrazio ezberdinak jarri dira, eta, beraz, kolore berdeen intentsitatea aldatuz doa.

Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) eta amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ioien determinazioa konplexuagoa da, analitoek haien forma askean ez baitiote kolorerik ematen disoluzioari. Kasu hauetan, erreakzio kimikoak baliatuz ioi kontzentrazioarekin aldatzen den kolore bat lortzea beharrezkoa da. Sulfatoak neurtzeko hauspea-

tze erreakzio bat egin da. Horretarako, zuloxoetan sulfatoak zituzten lagin edo patroiari HCl (erreakzioa ingurune azidoan gertatzen delako), BaCl<sub>2</sub> eta 400 μL-ra iristeko beharrezkoa den ur birdestilatua gehitzen zaizkio. Horrela, hauspeakin zuri bat osatzen da, bario sulfatoa (BaSO<sub>4</sub>), honako erreakzio honetan ikusten den bezala (1. erreakzioa).

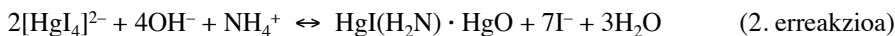


Erlazio lineala, oraingoan, HSV sistemako S kanala erabiliz lortzen da, eta beraz, log(S<sub>0</sub>/S) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> kontzentrazioaren aurrean irudikatu da (8. irudia).



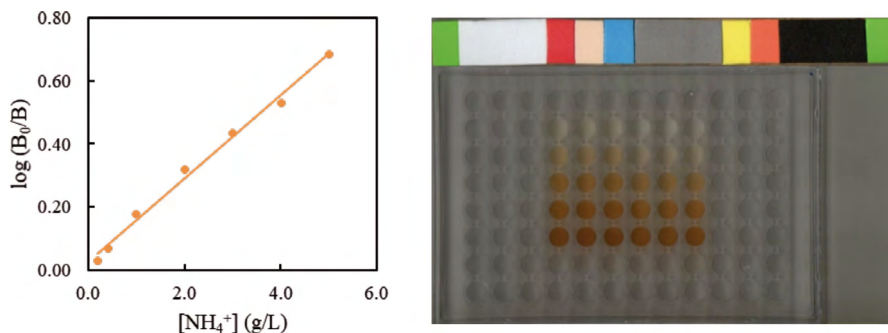
**8. irudia.** Ezkerrean ikus daiteke sulfatoak determinatzeko erabilitako kalibratua. Eskuineko irudia eskanerraren bidez lortutako irudi digitala da. Erdiko zuloxoetan sulfato kontzentrazio ezberdinak jarri dira, eta, beraz, lortutako hauspeakin kantitatea desberdina da. Kasu honetan, hauspeakina ikusteko, mikroplakaren atzean kartoi mehe gorri bat jarri da.

Bestalde, amonioa determinatzeko Nessler erreaktiboa (K<sub>2</sub>[HgI<sub>4</sub>] KOH-an) erabili da. Erreaktiboak kolore hori-laranja hartzen du amonioaren edo amonioaren presentzian, eta beraz, DIA bidez katioiaren kontzentrazioa zehaztea ahalbidetzen du [28]. Kalibraziorako patroiaz gain, NaOH, Nessler erreaktiboa eta ur birdestilatua ere gehitzen dira. Baldintza horietan gertatzen den erreakzioa hauxe da (2. erreakzioa):



### Kolore hori-laranja

Kasu honetan, amonio kontzentrazioaren aldaketarekin modu linealean erlazionatzen den kanala RGB sistemaren B kanala dela ikusi da, eta beraz, 9. irudian ikusten den bezala, log(B<sub>0</sub>/B) katioiaren kontzentrazioaren aurrean irudikatu da.



**9. irudia.** Ezkerrean ikus daiteke amonioa determinatzeko erabilitako kalibratua. Eskuineko irudia eskanerraren bidez lortutako irudi digitala da. Erdiko zulotxoetan amonio kontzentrazio ezberdinak jarri dira, eta, beraz, kolore laranja intentsitatez aldatzen doa.

Irudi digitalaren analisiaren bidezko metodo berria hiru analitoak zehazteko egokia den jakiteko, metodoaren balidazioa egin behar da. Horretarako, nikel-bainuen hainbat lagin aztertu dira, bai irudi digitalaren analisiaren bidez, bai erreferentziako teknikekin, eta emaitzak alderatu dira. Nikelaren determinazioaren kasuan, UV-Vis espektrofotometria erabili da erreferentzia bezala. Sulfatoak determinatzeko kromatografia ionikoa erabili da eta amonioa determinatzeko potentziometria, elektrodo selektibo bat erabiliz. Hiru kasuetan erreferentziako metodoaren eta DIA analisiaren arteko emaitzak estatistikoki konparagarriak dira eta ez dago desberdintasun adierazgarririk bi metodoen artean.

Horretaz gain, hiru analitoentzat DIA bidez lortutako zehaztasun eta doitasun balioak egokiak direla ikusi da. Doitasunari dagokionez, % 3,8 eta % 8,6 arteko desbideratze estandar erlatiboak (% RSD, *Relative Standard Deviation*) lortu dira nikelaren kasuan; % 7,4 eta % 12 artekoa sulfatoen kasuan eta % 7,4 eta % 14 artekoa amonioarentzat. Zehaztasunaren kasuan, ordea, errore erlatiboak % 9,2-% 12 artekoak nikelarentzat; % 6,5-% 10 artekoak sulfatoentzat eta % 7,5-% 13 artekoak amonioaren kasuan. Balio horiek DIA bidez lortutako emaitzak fidagarriak direla baieztatzen dute. Erreferentziako teknikekin lortutako zehaztasun eta doitasun balioak hobek izan arren (kasu guztietan errorea % 7,0 baina txikiagoa izan da), DIA azkarra, merkeagoa eta lagin kantitate gutxiago behar duen teknika da, eta beraz, metodo interesgarria nikelazko bainuetako analito hauen kontrola egiteko.

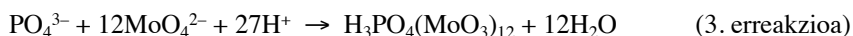
### 3.2. DIA eta MEDIKUNTZA: malko artifizialen analisia

Malko artifizialak, definizioz, malko naturalak ordezkatzeko sortutako produktu farmazeutikoak dira. Horretarako, malkoen ur-edukia eta ezauga-

rri fisiko-kimikoak (presio osmotikoa, pH-a, biskositatea eta gainazal-tentsioa) berdintzea bilatzen dute. Pazienteen artean daukaten tolerantzia onaren ondorioz eta erabiltzeko erraztasunari esker, begi-gaixotasun askoren tratamenduan erabiltzen dira [29].

Printzipio aktiboaz gain medikamentu guztiek eszipientek ere edukitzen dituzte. Horien artean testura, biskositatea eta kolorearen egonkortasuna mantentzen dituzten substantzia kimikoak aurki daitezke, baita pH-a mantentzeko tanpoi bezala jokatzeko duten beste konposatu batzuk ere. Kolirioen kasuan, eszipientek malkoaren pH-a mantendu behar dute; 7,3ren eta 7,4ren artean dagoena. Tanpoi disoluzio desberdinak existitu arren, erabilienak fosfato *bufferrak* izaten dira. Hala ere, azken urteetan fosfato kantitate altuak dituzten kolirioen erabileraren ondoriozko kaltzifikazio kasuak azaldu dira. Izatez, fosfatoa hidroxiapatita  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$  kristal moduan hauspeatzen dira. Fosfato tanpoiek eta pH-aren igoerak kristal honen eraketa handiagotzen dute, eta ondorioz, kornearen kaltzifikazioak [30].

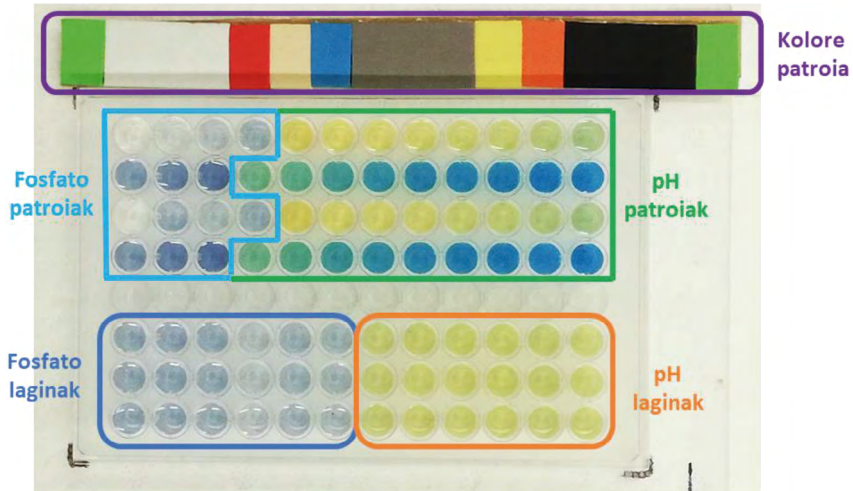
Fosfatoak determinatzeko forma desberdinak existitzen dira, hala nola, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, Bereizmen Handiko Likido Kromatografia) [31], ioi kromatografia [32] eta «molibdeno urdina erreakzioa» izenekoa. Metodo honetan fosfatoak molibdenoarekin osatzen duen konplexu urdinaren kolorea aztertzen da. Erreakzioa bi urratsetan gertatzen da: lehenengoan (3. erreakzioa) «Keggin ioi» bat osatzen da, eta bigarrenean (4. erreakzioa), horren erredukzioa ematen da kolore urdin sakona duen produktua sortuz [33]. Konplexuaren kolorea UV-Vis espektrofotometria bidez neur daiteke, baita kolorimetriari oinarritutako beste metodo batzuen bidez ere [34, 35].



Lagin mota hauen pH-a determinatzea ere oso garrantzitsua da. Honen determinazioa burutzeko metodorik erabiliena metodo potentziometrikoa [36, 37] izan arren, artikuluko honekin erlazionaturako irudi digitalen bidezko analisia aztertu eta garatu da [38, 39]. Horretarako, bromotimol urdina adierazlea erabili da, pH-aren arabera kolore aldaketa adieraziko baitu. Adierazlea horia da 6tik beherako pH-tan eta urdina 7,6tik gorakoetan. Balio horien artean erraz bereizten dira kolore berdearen hainbat tonalitate.

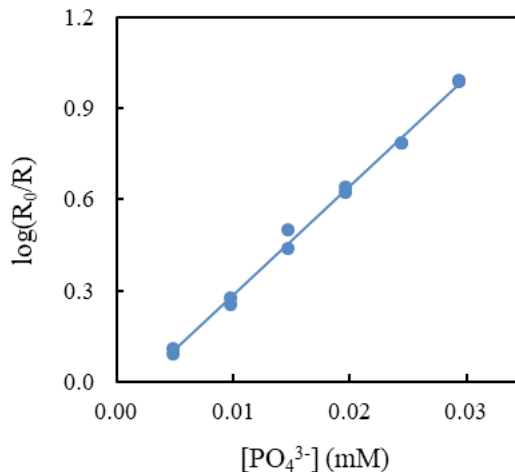
Lan honetan deskribatuko den bigarren aplikazioa da, DIA erabiliz, malko artifizialean pH eta fosfato kontzentrazioaren aldibereko determinazioa burutzeko metodoaren garapena. Lehenengo, mikropaketan ondorengo disoluzioen 400  $\mu\text{L}$  gehitu dira: fosfatoaren kalibrazioa egiteko patroiak eta ur disoluzioak, pH-aren kalibrazioa egiteko patroiak, fosfato kontzentrazioa neurtzeko laginak eta pH-a determinatzeko laginak. Argiz-

tapena kontrolatzeko kolore patroia ere gehitu da (10. irudia). Kasu honetan, irudiak telefono mugikor batekin eskuratu dira.



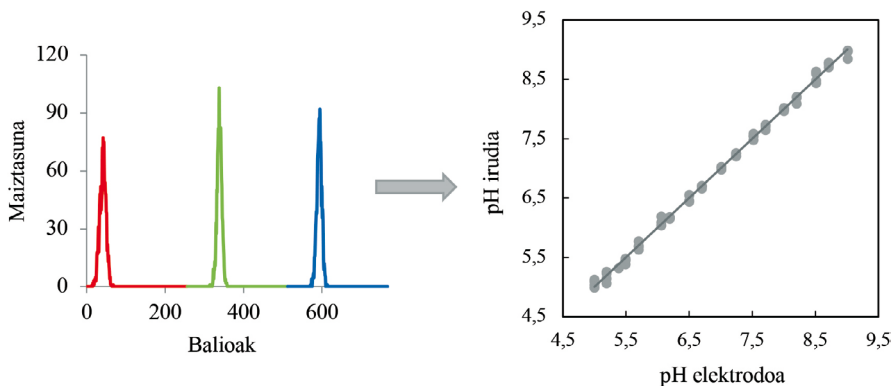
**10. irudia.** Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren aldebereko analisia burutzeko mikroplaka eta baita iluminazioa kontrolatzeko kolore patroia ere.

Fosfatoaren determinazioa aldagai bakarreko kalibrazio bidez egitea lortu da, erlazio lineala baitago fosfato kontzentrazioaren eta RGB sistemako R kanalaren artean, 11. irudian ikus daitekeen bezala.



**11. irudia.** Fosfato kontzentrazioa determinatzeko eraikitako kalibrazio zuzena: fosfato kontzentrazioa eta  $\log(R_0/R)$  parametroa zuzenki erlazionatzen dira.

Bestalde, pH-aren determinazioa azido-base adierazle baten kolore aldatetan oinarritzen denez, kolore kanal bakar baten aukeraketa eta kalibrazio lineala ez dira ondo egokitzen. Horregatik, pH patroia disoluzio bakoitzarentzat RGB sistemako histograma osoa hartu da kontuan seinale gisa, eta ondorioz, erregresio lineala baino modelo konplexuago bat osatu behar izan da, PLS motako aldagai anitzeko erregresioak eskaintzen duen bezala (12. irudia).



**12. irudia.** Ezkerrean, pH 7,24 disoluzio baten iruditik abiatuta lortutako histograma. X ardatzean kanal bakoitzeko balioak adierazten dira: 1 eta 256 artean R kanala, 257 eta 512 artean G kanala eta 513 eta 768 artean B kanala. Y ardatzean balio bakoitzaren maiztasuna. Eskuinean, PLS algoritmoa erabiliz eta aldagai guztiak kontuan hartuz lortutako erregresio modeloa. Bertan, DIA bidez lortutako balioak irudikatu dira pH elektrodoarekin lortutakoen aurrean.

PLS (*Partial Least Squares Regression*) edo Minimo Karratu Partzialen Bidezko Erregresioa aldagai anitzeko kalibrazio teknika bat da eta datu multzoen arteko erlazioak aurkitzeko balio du. Seinale kimikoa (pH-a) eta erreferentziatzko datuak (histograma) kontuan hartuz modelo bat sortzen da. pH ezezaguneko laginen pH-a kalkulatzeko, lagin bakoitzaren histograma sortzen da, patroiekin egin bezala. Histograma hau modeloan sartuz, laginaren pH balioa predikzioz kalkulaten da.

Guztira 10 malko artifizial desberdin analizatu dira. DIA bidez lortutako emaitzak erreferentziatzko metodoekin lortutakoen antzekoak dira. Fosfatoen determinaziorako UV-Vis espektroskopia eta ioi kromatografia erabili dira. DIA bidez lortutako doitasuna % 3,6-% 13 artekoa izan da; zehaztasuna, aldiz, % 1,8-% 15 artekoa. pH-aren kasuan erreferentziatzko metodoa potentziometria izan da. Doitasuna % 1,1 eta % 12 artekoa izan da. Zehaztasuna, ordea, % 0,2 eta % 20 artekoa. Bi kasuetan ikusi da DIAren eta erreferentziatzko metodoen arteko desberdintasunak adieraz-

garriak ez direla. Horregatik, metodo berri hau fosfatoaren eta pH-aren al-dibereko determinazioa egiteko arrakastaz aplika daiteke. Gainera, laginaren bolumena oso txikia denean, malko artifizialekin gertatzen den bezala, zailtasunak egon daitezke erreferentziazko teknikak aplikatzerako orduan. Lehenago aipatutako abantailez gain, metodo hau arazo horiek ere saihesteko baliagarria da.

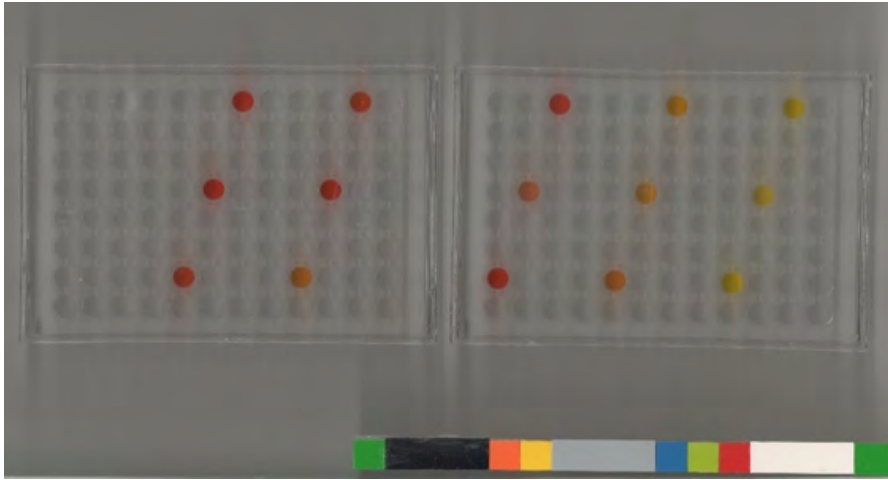
### 3.3. DIA eta ELIKADURA: koloratzaileen analisia

Merkatuan koloratzaile ugari daude eskuragarri. Horietako asko janarietan erabiltzen dira gehigarri moduan, gehienetan elikagaiaren itxura erakargarriagoa bihurtzeko helburuarekin, horien kolorea aldatuz edo dutena nabarmenduz. Gaur egun asko handitu da koloratzaile naturalen erabilpena, baina hala ere, ez dituzte koloratzaile sintetikoen propietate berdinak lortzen, askoz ezegonkorragoak baitira, eta gainera, produkzio kostua askoz handiagoa da [40].

Hirugarren aplikazio honetan elikadura arloan erabilienak diren bi koloratzailei buruz hitz egingo da: tartrazina (E102) eta allura gorria (E129). Koloratzaile sintetiko horiek oso kolore biziak ematen dizkiete elikagaiei, oso desiragarriak bihurtuz batez ere umeentzako. Hala ere, gehiegizko kontsumoak ondorioak ekar ditzakete [41, 42]. Bi koloratzaileek hiperaktibitatea eta arreta faltaren desoreka sor dezakete haurretan, eta gainera, E129k DNA kaltetu dezake. Bestalde, E102 odoleko linfozitoentzat toxikoa da [43, 44]. Kalte horiek direla eta, eguneroko kontsumoa mugatzeko Europar Batasunak dosi maximo bat ezarri du koloratzaile bakoitzarentzat; 7,5 mg/kg tartrazinarentzat eta 7 mg/kg allura gorriarentzat [45].

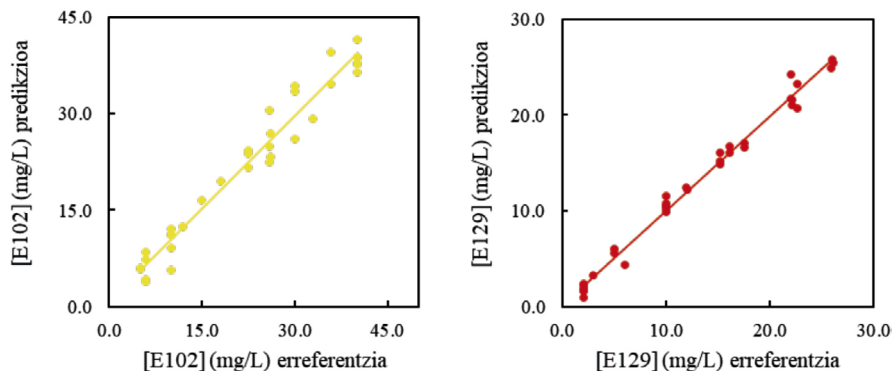
Koloratzaileak determinatzeko metodo tradizionalak HPLC, UV-Vis, TLC (*Thin Layer Chromatography*, Geruza Fineko Kromatografia) edo CE (*Capillary Electrophoresis*; elektroforesi kapilarra) dira. Kasu honetan koloratzaileen determinazioa era sinpleago batean egiteko, irudi digitalaren analisiaren metodoa garatu da.

Aipatutako bi koloratzaileak egoera likidoan determinatu dira, bai independenteki eta baita nahaste moduan ere. Analisia aurrera eramateko, bi koloratzaile horien nahaste disoluzio desberdinak prestatu dira. Koloratzaileak indibidualki determinatzea nahiko erraza da nahasteekin konparatuz gero, horiek modelo kimimetroko konplexuago bat behar baitute. Koloreak nahastean kolore guztiz berri bat lortzen da eta bi koloratzaile desberdinak determinatzearen ekintza zailagoa bihurtzen da [17]. Kasu honetan, argazkia eskuratzeko mahaigaineko eskaner bat erabili da (13. irudia).



**13. irudia.** Aztertutako koloratzaileen irudia eskaneatua. Irudian ikus daiteke nola zulotoetan kolorea gorritik (E129) horira (E102) aldatzen den, nahasteetan dagoen koloratzaile bakoitzaren proportzioaren arabera.

Esan bezala, bi koloratzaileen nahaste bat aztertu da. Koloratzaile bakoitza independenteki erregresio linealez determinatu daitekeen arren, nahasteetarako hurbilketa hori ez da egokia. Horregatik, aldagai anitzeko analisia beharrezkoa da. Bost kolore-sistema ezberdinetako balioak (RGB, HSV, CIELAB, CMYK eta  $Y C_B C_R$ ) kontuan hartuz, 16 aldagaiko datu matrize bat sortu da koloratzaile bakoitzarentzat. Sortutako matrizeak nahaste bakoitzaren hatz-marka gisa jokatzan du eta kalibrazio modeloak sortzeko erabili dira. Modeloak eraikitzeko PLS algoritmoa erabili da.



**14. irudia.** Ezkerrean, E102 koloratzailearentzat lortutako PLS kalibrazio modelo. Eskuinean, E129 koloratzailearentzat lortutakoa. Bi kasuetan 16 aldagaiko datu matrize bat erabili da, bost kolore-sistema ezberdinetako balioak erabiliz.



DIAren eta erreferentziako metodoaren (HPLC) arteko desberdintasunak adierazgarriak ez direla determinatu da, garatutako metodo hau kolortzaileen determinaziorako erreminta baliagarria dela ziurtatuz. Horrela, 8 lagin komertzialetan tartrazinak eta allura gorriak duten kontzentrazioaren predikzioa egin da, emaitza onak eta egokiak lortuz. Doitasunari dagokionez, % 5,9-% 11 eta % 4,1-% 7,2 arteko desbideratze estandar erlatiboak lortu dira tartrazina eta allura gorriarentzat, hurrenez hurren. Zehaztasuna berreskurapen probak eginez kalkulatu da. Proba mota horietan lagin bati kontzentrazio ezaguneko analito kantitate bat gehitzen zaio, eta horrela, berreskurapena gehitutakoaren eta neurtutakoaren arteko desberdintasunak emango du. Tartrazina eta allura gorriaren DIA bidezko analisisan berreskurapenak % 90-% 120 eta % 79-% 112 artekoak izan dira. Erreferentziako metodoaren kasuan, doitasuna bi kasuetan % 7 baino txikiagoa izan da, eta zehaztasuna % 92 eta % 112 artekoa. Hala ere, HPLC metodoa aplikatzeko aparatu oso garestia behar da, eta gainera, esperimentazio denborak oso altuak dira (12 min lagin bakoitzeko). Irudi digitalen analisi bidezko datuak egokiak direla ikusita, tartrazina eta allura gorriaren determinazioa egiteko alternatiba egokia dela ondoriozta daiteke.

#### 4. ONDORIOAK

Irudi digitalen analisia (DIA) erabiliz garatutako 3 aplikazioetan ikusi den moduan, metodo honek sinpletasuna eskaintzen du erreferentziako tekniken aurrean: azkarragoa da, izan ere, irudi berarekin parametro desberdinak determina daitezke aldi berean, eta merkeagoa da, beharrezko tresneria oso eskuragarria delako. Gainera, zulo txiki bakoitzean disoluzioaren 400  $\mu$ L bakarrik erabiltzen dira, hondakin kantitatea gutxituz. Sentsibilitate handikoa izan daitekeen metodoa dela ikusi da, erregresio onak lortu baitira landutako hiru aplikazioetan. Irudien egokitasuna ziurtatzeko ezinbestekoa da argiztapenaren kontrola egitea, kasu honetan kolore patroia erabiliz egin dena. Aipagarria da DIA hiru arlo oso ezberdinetan erabilgarria den teknika bat dela eta metodo errazak burutzeko aukera ematen duela.

Metodoaren abantailak eta aplikazio aukera guztiak ikusita, aipatutako aplikazioen garapen handiagoa egin daiteke. Izan ere, eta ikusi den bezala, DIA gai da espektrofotometria bidezko analisiak ordezkatzeko. Horrela, hurrengo urratsetako bat izango da kontzentrazio txikiagoan dauden analitoak determinatzea eta nikela bainuetan dauden tefloi partikulen kontrola burutzeko analisiak egitea. Bestalde, malko artifizialetan garrantzitsuak diren kaltzio eta magnesio ioiak determinatzeko ikerketak egingo dira. Mikroplaken erabileraz haratago, paper oinarria duten mikrogailuak (*Micro Paper Analytical Device*,  $\mu$ PAD) garatu nahi dira analisiak aurrera eramateko, non paperean erreakzioa burutzeko beharrezko errektiboak immobilizatzen diren.

## 5. ESKER ONAK

Artikulu hau Gipuzkoako Foru Aldundiak (DG 17/07 proiektua) eta Euskal Herriko Unibertsitateak (GIU 16/55 eta US 18/09 proiektuak) emandako dirulaguntzei esker eraman da aurrera.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, CA.
- [2] ANTONELLI, A., COCCHI, M., FAVA, P., FOCA, G., FRANCHINI, G.C., MANZINI, D., ULRICI, A. 2004. «Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm». *Analytica Chimica Acta*, **515**, 3-13.
- [3] DOS SANTOS BENEDETTI, L.P., DOS SANTOS, V.B., SILVA, T.A., FILHO, E.B., MARTINS, V.L., FATIBELLO-FILHO, O. 2015. «A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks». *Analytical Methods*, **7**, 4138-4144.
- [4] COLZANI, H., RODRIGUES, Q.E.A.G., FOGAÇA, C., GELINSKI, J.M.L.N., PEREIRA-FILHO, E.R., BORGES, E.M. 2017. «Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de Química». *Química Nova*, **40**, 833-839.
- [5] JARUJAMRUS, P., MEELAPSOM, R., PENCHAREE, S., OBMA, AP., AMATATONGCHAI, M., DITCHAROEN, N., CHAIRAM, S., TAMUANG, S. 2018. «Use of a smartphone as a colorimetric analyser in paper-based devices for sensitive and selective determination of mercury in water samples». *Analytical Sciences*, **34**, 74-81.
- [6] SANTOS, P.M., WENTZELL, P.D. 2012. «Scanner digital images combined with color parameters: a case study to detect adulterations in liquid cow's milk». *Food Analytical Methods*, **5**, 89-95.
- [7] VALDERRAMA, L., VALDERRAMA, P. 2016. «Nondestructive identification of blue pen inks for documentoscopy purpose using iPhone and Digital Image Analysis including an approach for interval confidence estimation in PLS-DA models validation». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **156**, 188-195.
- [8] 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.
- [9] ROCHE, P.J., FILION-CÔTÉ, S., CHEUNG, M.C.K., CHODAVARAPU, V.C., KIRK, A.G. 2011. «A camera phone localised surface plasmon bio-

- sensing platform towards low-cost label-free diagnostic testing». *Journal of Sensors*, **2011**, 1-8.
- [10] BOTELHO, B.G., DANTAS, K.C.F., SENA, M.M. 2017. «Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **167**, 44-49.
- [11] MOONRENGSEE, N., PENCHAREE, S., JAKMUNEE, J. 2015. «Colorimetric analyser based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil». *Talanta*, **136**, 204-209.
- [12] DOS SANTOS BENEDETTI, L.P., DOS SANTOS, V.B., SILVA, T.A., BENEDETTI-FILHO, E., MARTINS, V.L., FATIBELLO-FILHO, O. 2015. «A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages». *Analytical Methods*, **7**, 7568-7573.
- [13] PUNO, J.C., SYBINGCO, E., DADIOS, E., VALENZUELA, I., CUELLO, J. 2017. «Determination of soil nutrients and pH level using image processing and Artificial Neural Network». IEEE 9th International Conference, 1-6.
- [14] VIDAL, M., AMIGO, J.M., BRO, R., OSTRÁ, M., UBIDE, C., ZURIA-RRAIN, J. 2011. «Flatbed scanners as a source of imaging. Brightness assessment and additives determination in a nickel electroplating bath». *Analytica Chimica Acta*, **694**, 38-45.
- [15] VIDAL, M., AMIGO, J.M., BRO, R., VAN DER BERG, F., OSTRÁ, M., UBIDE, C. 2011. «Image analysis for maintenance of coating quality in nickel electroplating baths - real time control». *Analytica Chimica Acta*, **706**, 1-7.
- [16] VIDAL, M., OSTRÁ, M., IMAZ, N., GARCÍA-LECINA, E., UBIDE, C. 2015. «Feature descriptors from scanned images by chromium electrodeposits as predictor parameters of surface roughness and crystallographic texture». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **149**, 90-98.
- [17] VIDAL, M., GARCÍA-ARRONA, R., BORDAGARAY, A., OSTRÁ, M., ALBIZU, G. 2018. «Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis». *Talanta*, **184**, 58-64.
- [18] ALBIZU, G., BORDAGARAY, A., DÁVILA, S., GARCÍA-ARRONA, R., OSTRÁ, M., VIDAL, M. 2020. «Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis». *Microchemical Journal*, **154**, 104660.
- [19] UMBROUGH, S. E. 2005. *Computer Imaging: Digital Image Analysis and Processing*; Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- [20] HARRIS, D.C. 2007. *Quantitative Chemical Analysis*, 7th ed.; W. H. Freeman and Company, New York, NY.
- [21] ESBENSEN, K.H., SWARBRICK, B. 2018. *Multivariate Data Analysis*, 6th ed.; CAMO Software AS, Oslo, Norvegia.
- [22] KANANI, N. 2004. *Electroplating: Basic Principles, Processes and Practice*, Elsevier, Alemania.

- [23] MALLORY, G.O., HAJDU, J.B. 1990. *Electroless Plating: Fundamentals and Applications*, William Andrew, Orlando, FL.
- [24] WOJCIECHOWSKI, J., BARANIAK, M., PERNAK, J., LOTA, G. 2017. «Nickel coatings electrodeposited from watts type baths containing quaternary ammonium sulphate salts». *International Journal of Electrochemical Science*, **12**, 3350-3360.
- [25] OSTRA, M., UBIDE, C., VIDAL, M., ZURIARRAIN, J. 2011. «Process analytical chemistry in a nickel electroplating bath. Automated sequential injection for additive determination». *Analytical Methods*, **3**, 2726-2732.
- [26] LICATA, P., NACCARI, F., DI BELLA, G., LO TURCO, V., MARTORANA, V., MO DUGO, G. 2013. «Inorganic anions in goat and ovine milk from Calabria (Italy) by suppressed ion chromatography». *Food Additives and Contaminants, Part A*, **30**, 458-465.
- [27] ZAMORA MARTÍNEZ, O., MONTANO HILARIO, J.M., GALINDO ZAVALA, V.B., SIEBE GRABACH, C., PRADO PANO, B.L. 2016. «Determinación simultánea de cationes mayoritarios en muestras de agua residual por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica». *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **32**, 293-301.
- [28] BOE, Boletín Oficial del Estado. 1998. *Métodos Oficiales de Análisis Físico-Químicos Para Aguas Potables De Consumo Público: Tomo I*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- [29] BARANOWSKI, P., KAROLEWICZ, B., GAJDA, M., PLUTA, J. 2014. «Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods». *The Scientific World Journal*, **2014**, 1-14.
- [30] MARTÍNEZ-SOROA, I., DE FRUTOS-LEZAUN, M., OSTRA BELDARRAIN, M., EGÍA ZURUTUZA, A., IRASTORZA LARBURU, M.B., BACHILLER CACHO, M.P. 2016. «Determination of phosphate concentration in glaucoma eye drops commercially available in Spain». *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, **91**, 363-371.
- [31] HEBBI, V., CHATTOPADHYAY, S., RATHORE, AS. 2019. «High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products». *Journal of Chromatography B*, **1117**, 118-126.
- [32] PHATTHIYAPHAIBUN, K., SOM-AUM, W., SRISA-ARD, M., THREE-PROM J. 2010. «Determination of pheniramine enantiomers in eye drop by capillary electrophoresis using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector». *Journal of Analytical Chemistry*, **65**, 755-759.
- [33] NAGUL, E.A., MCKELVIE, I.D., WORSFOLD, P., KOLEV, S.D. 2015. «The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box». *Analytica Chimica Acta*, **890**, 60-82.
- [34] KNYAZEV, D.A., ZHEVNEROV, A.V., IVANOV, V.M., KNYAZEV, V.D. 2007. «Blister-colorimetric determination of phosphate ions in water, agricultural samples, and biological samples». *Journal of Analytical Chemistry*, **62**, 37-41.

- [35] POURREZA, N., SHARIFI, H., GOLMOHAMMADI, H. 2020. «A green chemosensor for colorimetric determination of phosphate ion in soil, bone and water samples using curcumin nanoparticles». *Analytical Sciences*, 20P101.
- [36] COLES, W.H., JAROS, P.A. 1984. «Dynamics of ocular surface pH». *British Journal of Ophthalmology*, **68**, 549-552.
- [37] KODYM, A., ZAWISZA, T., TABERSKA, J., KUKULA, H. 2006. «Physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime». *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **63**, 293-299.
- [38] LÓPEZ-RUIZ, N., CURTO, V.F., ERENAS, M. M., BENITO-LÓPEZ, F., DIAMOND, D., PALMA, A.J., CAPITÁN-VALLVEY, L.F. 2014. «Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices». *Analytical Chemistry*, **86**, 9554-9562.
- [39] DAMASCENO, D., TOLEDO, T.G., GODINHO, M.S., DA SILVA, C.P., DE OLIVEIRA, S.B., DE OLIVEIRA, A.E. 2015. «Análise multivariada de imagens na Química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis». *Química Nova*, **38**, 836-841.
- [40] YOSHIOKA, N., ICHIHASHI, K. 2008. «Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection». *Talanta*, **74**, 1408-1413.
- [41] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). 2010. «Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive». *EFSA Journal*, **8**, 1853.
- [42] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. 2009. «Scientific opinion on the re-evaluation of allura red AC (E 129) as a food additive». *EFSA Journal*, **7**, 1327.
- [43] MCCANN, D., BARRETT, A., COOPER, A., CRUMPLER, D., DALEN, L., GRIMSHAW, K., SONUGA-BARKE, E. 2007. «Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial». *The Lancet*, **370**, 1560-1567.
- [44] AMCHOVA, P., KOTOLOVA, H., RUDA-KUCEROVA, J. 2015. «Health safety issues of synthetic food colorants». *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **73**, 914-922.
- [45] ROVINA, K., SIDDIQUEE, S., SHAARANI, S.M. 2016. «Extraction, analytical and advanced methods for detection of allura red AC (E129) in food and beverages products». *Frontiers in Microbiology*, **7**, 798.