



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Fosfato kontzentrazioaren eta pH-
aren determinazioa kolirio
laginetan irudi digitalen analisia
erabiliz**

*Irati Berasarte, Ane Bordagaray,
Rosa Garcia-Arrona, Miren Ostra
eta Maider Vidal*

241-248 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.32>



Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren determinazioa kolirio laginetan irudi digitalen analisisa erabiliz

Berasarte, I., Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Vidal, M.

*Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, 20018 Donostia
irati.berasarte@ehu.eus*

Laburpena

Irudi digitalen analisisian (DIA) oinarritutako metodo bat garatu da pH-a eta fosfato kontzentrazioa kuantifikatzeko kolirio laginetan. Analisiak 96 putzuko mikroplakak eta *smartphone* batekin lortutako irudiak erabiliz egin dira. Fosfatoen determinazioa molibdeno urdina erreazioan sortzen den konplexu urdinaren kolorea RGB kolore-sistemako R kanalarekin erlazionatuz egin da. pH-aren determinazioa horiaren eta urdinaren arteko kolore aldaketa ematen duen bromotimol urdina adierazlearekin egin da, PLS eredu baten bidez irudiaren histograma eta pH balioa erlazionatuz. Lortutako emaitzak erreferentziako metodoak erabiliz balidatu dira, kromatografia ionikoa fosfatoentzat eta potentziometria pH-arentzat.

Hitz gakoak: irudi digitalen analisisa, kolirio, fosfato, koloregrama

Abstract

A method based on digital image analysis (DIA) is described for the quantification of pH and phosphate concentration in eye drops. Analysis were carried out using 96-well microplates and images obtained with a smartphone. The determination of phosphate was made by relating the color of the blue complex formed in the reaction to the R channel of the RGB color system. The pH was measured using bromothymol blue indicator, which gives a color change between yellow and blue. The information of the pH measurement was extracted from histograms of the pictures and a PLS model was performed to quantify the values. The results obtained were validated using reference methods, ion chromatography for phosphates and potentiometry for pH.

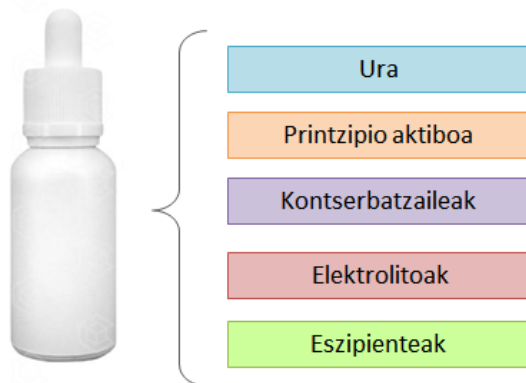
Keywords: digital image analysis, eye drops, phosphates, color fingerprint

1. Sarrera eta motibazioa

Medikamentu oftalmikoak oso garrantzitsuak dira industria farmazeutikoan eta azken hamarkadetan gehien aztertu den ataletako bat izan da. Izan ere, medikamentu hauek efektu lokal onuragarria eragin behar dute inolako efektu kaltegarririk gabe, ez begietan ezta organismoan ere. Kolirioak, definizioz, gatza duten eta zuzenean begietako administrazio-bide gisa erabiltzen diren medikamentuak dira. Horretarako, malkoen ur-edukia eta ezaugarri fisiko-kimikoak (presio osmotikoa, pH-a, biskositatea eta gainazal-tentsioa) berdintzea bilatzen da. Pazienteen artean daukaten tolerantzia onaren ondorioz eta erabiltzeko erraztasunari esker, begi-gaixotasun askoren tratamenduan erabiltzen dira. Gainera, forma askotan daude eskuragarri: disoluzio akuoso edo olio modura, emulsioak, suspentsioak, *spray*-ak, gelak... (Baranowski et al., 2014).

Osagai nagusia ura izaten da (% 97 eta % 99 bitarteko kontzentraziotan egoten da) eta honez gain, printzipio aktiboa, kontserbatzaileak, elektrolitoak eta eszipienteak ere edukitzen dituzte.

1. irudia. Kolirioen konposizio orokorra azaltzen duen eskema.



Printzipio aktiboa gaixotasunaren araberakoa da; kontserbatzaileak medikamentuaren baldintza egokiak mantentzeko gehitzen dira eta elektrolitoak oreka egokian egon behar dira, begiaren osasunaren adierazle baitira. Eszipientetan arreta jarritz, hauen artean testura, biskositatea eta kolorearen egonkortasuna mantentzen dituzten substantzia kimikoak aurki daitezke, baita pH-a mantentzeko tanpoi bezala jokatzen 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 fosfatoz osatutakoak izaten dira. Hala ere, azken urteetan fosfato kantitate altuak dituzten kolirioen erabileraren ondoriozko kaltzifikazio kasuak azaldu dira. Hau horrela, fosfatoa hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] kristal moduan hauspeatzen da. Fosfato tanpoiek eta pH-aren igoerak kristal honen eraketa handiagotzen dute, eta ondorioz, kornearen kaltzifikazioak (Martínez-Soroa et al., 2016).

Egoera arrunt batean fosfato kontzentrazioa oso txikia da; 1,45 mM ingurukoa. Epe motzez erabiltzen diren medikamentuen kasuan eszipientekin dagoen kontaktua minimoa da, baina gaixotasun jakin batzuetan eguneroko pilaketek eszipiente kontzentrazioa nabarmenki handitu dezakete, kaltzio fosfato hauspeakinak areagotuz (Martínez-Soroa et al., 2016). Arazo hau saihesteko beharrezkoa da begi-tantetan dagoen fosfato kontzentrazio zehatza ezagutzea. Fosfatoak determinatzeko forma desberdinak existitzen dira, hala nola, Bereizmen Handiko Likido Kromatografia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (Hebbi et al., 2019) eta ioi-kromatografia (Phatthiyaphaibun et al., 2010).

Aipatutako metodoez gain, fosfato kontzentrazioa “molibdeno urdina erreakzioa” izenekoaren bitartez ere determina daiteke. Metodo honetan fosfatoak molibdenoarekin osatzen duen konplexu urdinaren kolorea aztertzen da. Erreakzioa bi urratsetan gertatzen da: lehenengoan (1) “Keggin ioi” bat osatzen da, eta bigarrenean (2), horren erredukzioa ematen da kolore urdina duen produktua sortuz (Nagul et al., 2015). Konplexuaren kolorea UV-Vis espektrofotometria bidez neur daiteke, baita kolorimetrian oinarritutako beste metodo batzuen bidez ere (Knyazev et al., 2007; Pourreza et al., 2020).



Bestalde, eta lagin mota hauen pH-a ezagutzea ere oso garrantzitsua izanik, determinazioa burutzeko metodorik erabiliena metodo potentziometrikoa dela ikusi da (Kodym et al., 2006). Dena den, pH-aren determinazioa adierazleak erabiliz ere egin daiteke, bromotimol urdina izeneko azido-base adierazlearekin adibidez: kolore horia dauka 6tik beherako balioetan eta urdina 7,6tik gorakoetan. Balio horien artean kolore berdearen hainbat tonalitate bereizi daitezke.

Hau horrela, bi determinazioak erreakzio kolorimetroetan oinarrituz egin daitezke, hau da, kolore aldaketa aztertuz. Kolorearen intentsitatea analito kontzentrazioarekin erraz erlaziona daitekeen propietatea da. Izan ere, Lambert-Beer legea horretan oinarritzen da, absorbantzia analito kontzentrazioarekiko proportzionala baita. Disoluzio baten irudi digital bat analizatuz analitoaren kolorea kuantifika daiteke. Azken urteetan, irudi digitalen analisia (DIA, *Digital Image Analysis*) asko garatu da, metodo azkar, simple eta merkea izanik, egoera jakin batzuetan kolorearen intentsitatea analito kontzentrazioarekin erlazionatzen baitu (Lopez-Molinero et al., 2013; Santos Benedetti et al., 2015; Damasceno et al., 2015).

DIA teknika multzo batek osatzen du eta helburua aztergai den sistemari buruzko informazio analitikoaren lortzea da, horretarako irudi digital bat erabiliz. Definizioz, irudi digital bat bi dimentsioko funtzio bat da (x, y) non x eta y balioek pixel (*picture element*) bakoitzaren kokapena adierazten duten. Pixel bat irudi baten osagairik txikiena da eta balio numerikoak edo intentsitateak izango ditu, kolore-sistema bakoitzean desberdinak izango direnak. Sistemarik ezagunena RGB kolore-sistema da, non irudia 0 eta 255 arteko balioetan banatzen den hiru kanaletako bakoitzean, hau da, kanal gorrian, berdean eta urdinean. Horrela, existitzen den koloretako bakoitza kanalen arteko konbinazio bidez azaltzen da. Antzera funtzionatzen duten beste sistema batzuk ere existitzen dira, hala nola, HSV, CIE_{Lab} edo YC_bC_r (Umbaugh, 2005). Sistema hauetatik erauzitako informazioa informazio analitiko kuantifikagarri bihurtu ahal izango da. Horrela, DIA freskagarrietan fosfatoak kuantifikatzeko, uraren gogortasuna ezagutzeko edota ur-laginetan merkurioa determinatzeko erabili da (Colzani et al., 2017; Damasceno et al., 2016; Jarujamrus et al., 2018).

Kasurik sinpleenean, analitoaren kontzentrazioa kanal indibidual batekiko zuzenki proportzionala izango da. Beste kasu batzuetan, ordea, iruditik erauzitako hainbat datu elkartzat datu-matrize konplexuagoak sortu beharko dira, konposatu nahasteak determinatu nahi direnean edo kolore aldaketa bat aztertzerako orduan, adibidez. Horrela, patroik edo lagin bat definitzeko aldagai bat baina gehiago erabiliko dira eta datu-matrize hauen analisia egiteko kimimetriaren erabilera ezinbestekoa bihurtuko da. Kimimetriak teknika matematiko eta estatistikoak erabiltzen ditu datu konplexuetatik informazio kimiko eta fisikoa erauzteko (Esbensen eta Swarbrick, 2018). Horrela, aldagai anitzeko datuen tratamendua ahalbidetzen duten algoritmoak erabili beharko dira, hala nola, Osagai Nagusi Bidezko Analisia (PCA, *Principal Component Analysis*), datu multzoan aldagaien arteko erlazioak eta joerak aurkitzeko edo Minimo Karratu Partzialen Bidezko Erregresioa (PLS, *Partial Least Squares Regression*), aldagaien eta kontzentrazioaren matrizeak aldi berean erabiliz aldagai anitzeko kalibrazioa egin ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

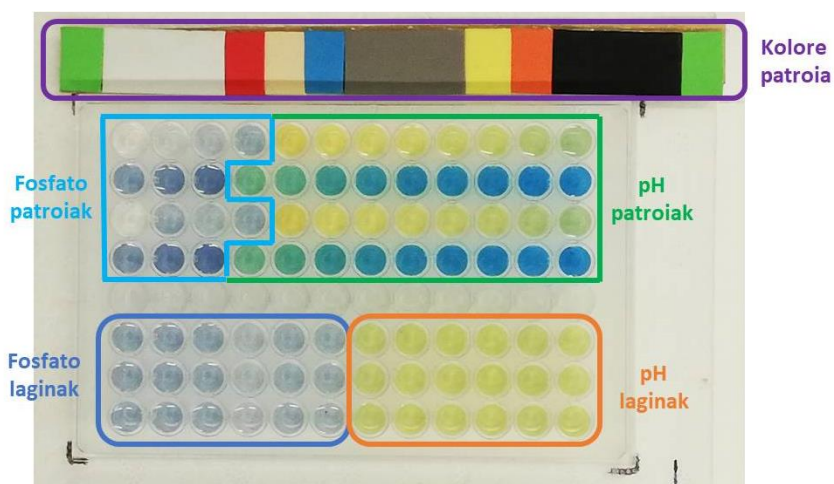
Printzipio aktiboek, eszipienteez eta kontserbatzaileek eragindako efektu kaltegarriak modu zabalean ikertu dira (Baranowski et al., 2014, Walsh eta Jones 2019, Agarwal et al., 2021). Esan bezala, fosfato kontzentrazio handiek kaltzifikazioak eragin ditzakete begietan, eta gainera, arazoa areagotu egiten da pH igoerarekin. 2019ko azarotik eta 2001/83/EC dekretuaren arabera, derrigorrezkoa da medikamentu oftalmikoez dauzkaten eszipiente guztiak etiketan agertzea, baina ez hauen kontzentrazioa (DIRECTIVE 2001/83/EC). Fosfato kontzentrazio zehatza eta pH-a ezagutzeak tratamenduaren aukeraketan eragin dezakeenez, ezinbestekoa da bi parametro hauek determinatzeko metodo simple bat garatzea, erreferentziazko metodoek aurkezten dituzten zailtasunak (ekipoen kostu handia, analisi-denbora luzeak...) gainditzeko.

Lan honen helburu nagusia kolirio laginetan fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren determinazioa burutzeko metodo azkar, simple eta merke bat garatzea da, oinarritzat erreakzio kolorimetroak hartuz eta kolore aldaketak aztertzeko baliagarria eta aproposa den irudi digitalen analisia erabiliz (Berasarte et al., 2021).

3. Ikerketaren muina

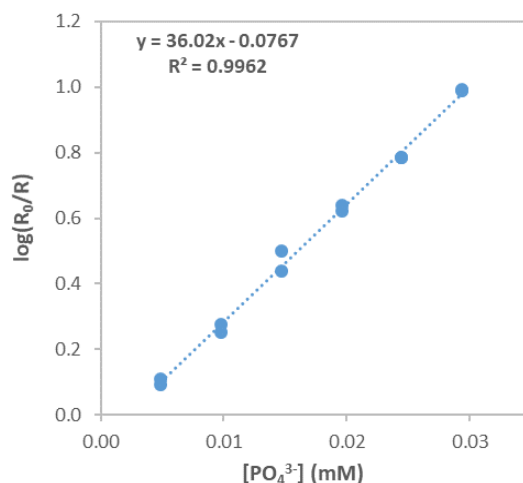
Esan bezala, garrantzitsua da kolirioetan pH-a eta fosfato kontzentrazioa ezagutzea. Determinazio horiek burutzeko 96 putzu dituzten mikroplakak erabili dira eta bi kasuetan kalibrazioa egiteko patroï disoluzioak eta laginak gehitu dira. Disoluzio bakoitzaren 400 μL erabili dira, argiztapena kontrolatzeko kolore patroïa gehitu da eta irudiak telefono mugikor batekin eskuratu dira. Mugikorraren kameraren bereizmena 16 Mpx da eta argazkiak eskuratzeko parametro batzuk finkatu dira (ISO 200, irekidura 1/50 S eta “zurien balantzea” argi fluoreszentearentzat). Datuen erauzketa Matlab® softwarea erabiliz egin da.

2. irudia. Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren aldibereko analisia burutzeko mikroplaka non bi analisientzako patroïak eta laginak gehitu diren. Iluminazioa kontrolatzeko kolore patroïa ere gehitu da.



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

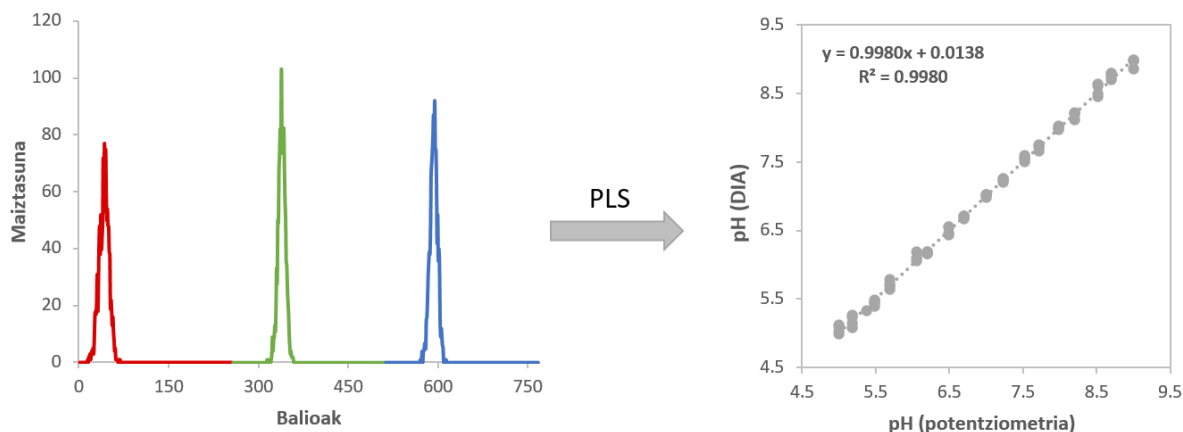
3. irudia. Fosfato kontzentrazioa determinatzeko eraikitako kalibrazio zuzena: fosfato kontzentrazioa eta $\log(R_0/R)$ parametroa zuzenki erlazionatzen dira.



Bestalde, pH-aren determinazioa bromotimol urdina azido-base adierazlearen kolore aldaketan oinarritzen da. Horregatik, kolore kanal bakar baten bidez eraikitako kalibrazioa ez da ondo egokituko eta patroï disoluzio bakoitzarentzat RGB sistemako histograma osoa hartuko da kontuan seinale gisa. Histograma hau sortzeko 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) eta y ardatzean balio bakoitzaren maiztasuna.

Ondorioz, erregresio lineala baino eredu konplexuago bat osatu behar izan da, PLS motako aldagai anitzeko erregresioak eskaintzen duen bezala (4. irudia). PLS-ak oinarritzat hartzen dituen hipotesiak (korrelazioak, zarata eta modulazio erroreak) beste algoritmoetan hartzen direnak baina errealistagoak dira, emaitza hobekia lortuz. Horregatik, pH-aren determinazioa egiteko erreminta egokiena da. Seinale kimikoa (histograma) eta erreferentziazko datuak (pH-a) kontuan hartuz eredu bat sortzen da. pH ezezaguneko laginen pH-a kalkulatzeko, lagin bakoitzaren histograma sortzen da, patroiekin bezala. Histograma hau ereduaren sartuz, laginaren pH balioa predikzioz kalkulaten da.

4. irudia. Ezkerrean, pH 7,24 disoluzio baten iruditik abiatuta lortutako histograma. Eskuinean, PLS algoritmoa erabiliz lortutako erregresio ereduaren non DIA bidez lortutako balioak irudikatu diren pH elektrodoarekin lortutakoaren aurrean.



Metodoaren zuzentasuna egiaztatzeko, honen balidazioa egiten da. Metodoaren balidazioa analisi desberdinen bitartez sistemak emaitza analitiko egokiak ematen dituela balioztatzeko prozedura da (Thompson et al., 2002). Horretarako hainbat ezaugarri aztertzen dira, desberdinak aldagai bakarreko eta aldagai anitzeko analisisetan. Parametro guztiak hurrengo taulan laburbildu dira.

1.taula. Fosfatoaren kontzentrazioa eta pH-a determinatzeko garatutako metodoaren balidazioan lortutako parametroak.

Fosfato kontzentrazioa		pH-a	
Datuak	R kanala	Datuak	Histograma
Erregresioa	Lineala	Erregresioa	PLS
Linealtasuna (mM)	$5,0 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2}$	Tartea	4,99 – 9,02
LOD (mM)	$1,8 \cdot 10^{-3}$	RMSEC	0,1
LOQ (mM)	$5,6 \cdot 10^{-3}$	RMSEV	0,46

Fosfatoaren kontzentrazioa aldagai bakarreko analisi bidez egin denez, linealtasuna, detekzio- eta kuantifikazio-mugak aztertu dira. Kalibratioak linealtasun ona aurkezten du $5,0 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2}$ mM kontzentrazio tartean, erregresio koefizientea (R^2) 0,9962 izanik. Detekzio-muga edo LOD (*Limit of detection*), fidagarritasunez detekta daitekeen kontzentrazioarik txikiena, maldaren desbideratzearekin kalkulatu da, $1,8 \cdot 10^{-3}$ mM balioa lortuz. Kuantifikazio-muga edo LOQ (*Limit of quantification*), fidagarritasunez kuantifika daitekeen kontzentrazioarik txikiena, detekzio-mugaren hirukoitza dela suposatu da, $5,6 \cdot 10^{-3}$ mM balioa lortuz. Aldagai anitzeko analisisia egiten denean, ordea, beste parametro batzuk aztertzen dira. PLS erregresio ereduaren erabiltzeko pH 4,99 eta 9,02 arteko 17 tanpoi disoluzio erabili dira eta hori balidatzeko beste 5 tanpoi disoluzio ezberdin. Kalibratioaren eta balidazioaren erroreak RMSE (*Root Mean Square Error*, batezbesteko errore koadratikoaren erroa) parametroen bidez ematen dira. Kasu honetan RMSEC (kalibratio) 0,1 eta RMSEV (balidazio) 0,46 balioak lortu dira, antzeko magnitude-ordenakoak, ereduaren ondo egokitua dagoela adierazten duena.

Bi kasuetan balidazioan lortutako emaitzak egokiak dira, eta hortaz, garatutako metodoa laginetan aplika daiteke. Guzтира 10 kolirio lagin desberdin analizatu dira eta DIA bidez lortutako emaitzen zehaztasuna eta doitasuna ebaluatu dira. Ebaluazio hau bi modu desberdinetan egin da: egun bereko argazkiak konparatuz eta egun desberdinen arteko argazkiak konparatuz. Lortutako emaitzak, errore erlatibo ehunekotan, 2.taulan adierazi dira.

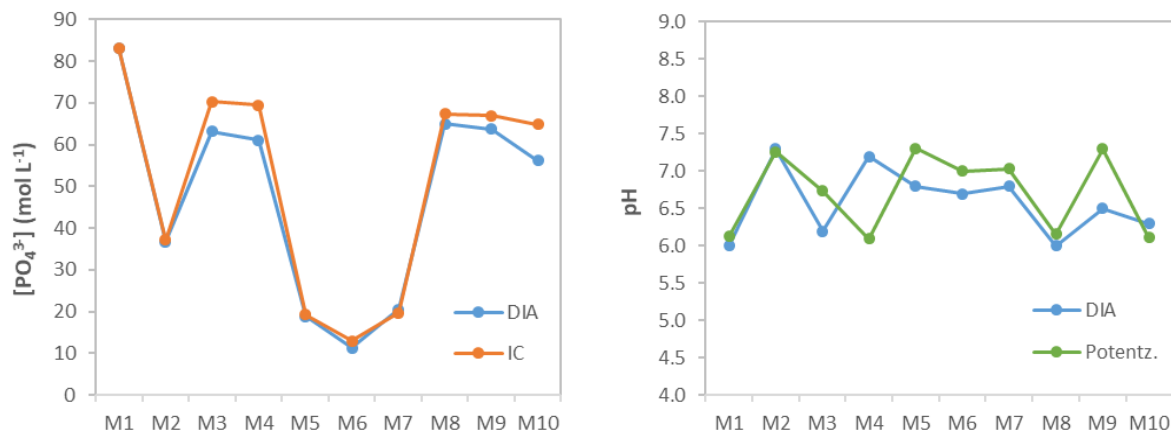
2.taula. DIA bidez lortutako emaitzen zehaztasuna eta doitasuna laburbiltzen dituen taula.

	Zehaztasuna		Doitasuna	
	[PO ₄ ³⁻]	pH	[PO ₄ ³⁻]	pH
Egun bera	% 5,5 – 15,0	% 0,2 – 18,8	% 3,6 – 4,4	% 7,3 – 12,2
Egun desberdinak	% 1,8 – 5,6	% 1,0 – 19,6	% 9,5 – 12,8	% 1,1 – 6,1

Fosfato kontzentrazioarentzat lortutako balioak egokiak dira, % 15eko errore erlatiboaren azpitik baitaude. pH-aren determinazioan, ordea, doitasunaren balioak egokiak izan arren, zehaztasunaren erroreak onartutako balioetatik kanpo daude. Esan beharra dago balio horiek muturreko tanpoi disoluzioei dagozkiela. Hori horrela, ikusi da pH balio baxuenetan eta altuenetan ereduak egiten dituen predikzioak ez direla guztiz egokiak, eta hortaz, nahiz eta pH tartea 4,99 eta 9,02 artean egon, metodoa tarteko pH-tan erabiltzea da zuzenena.

Bukatzeko, DIA bidez lortutako emaitzak erreferentziako metodoekin lortutakoekin konparatu dira, ioi-kromatografia fosfatoen kasuan eta potentziometria pH-arentzat. Hurrengo irudian irudikatu dira eskuratutako emaitzak.

5.irudia. DIA eta erreferentziako metodo bidez lortutako emaitzen konparaketa: ezkerrean, fosfato kontzentrazioa; eskuinean, pH-a.



Bi kasuetan ikusi da DIAren eta erreferentziako metodoen arteko desberdintasunak adierazgarriak ez direla. Horregatik, metodo berri hau fosfatoaren eta pH-aren aldibereko determinazioa egiteko arrakastaz aplika daiteke. Gainera, laginaren bolumena oso txikia denean, kolirioekin gertatzen den bezala, zailtasunak egon daitezke erreferentziako teknikak aplikatzerako orduan. Lehenago aipatutako abantailez gain, metodo hau arazo horiek ere saihesteko baliagarria da.

4. Ondorioak

Irudietatik ateratako kolorearen propietate ezberdinak, R kanala fosfatoaren determinaziorako eta histograma pH-aren kasuan, hurrenez hurren, [PO₄³⁻] eta [H⁺] kontzentrazioekin erlaziona daitezkeela frogatu da, horretarako erregresio lineala eta PLS motako aldagai anitzeko erregresioa erabiliz. Azpimarratu behar da garatutako prozedurak 400 µL baino ez dituela behar, eta gainera, lagin mota desberdinetan aplika daitezkeela. Alde batetik, lagin-bolumenaren arazoari irtenbidea jartzen zaio: lagin gutxi dagoenean, begi-tantekin gertatzen den bezala, zaila izan daiteke prozedura edo determinazio batzuk aurrera eramatea

erreferentziatzeko teknikekin. DIA eta mikroplakak erabiliz arazo hori saihestu egiten da. Bestalde, kimika berdearen hondakinak gutxitzeko eskakizunekin bat datorren metodoa da, eta gainera, mikroplakak berrerabiltzeko aukera dago. Sentsibilitate handikoa izan daitekeen metodoa dela ikusi da, erregresio onak lortu baitira landutako bi aplikazioetan. Irudien egokitasuna ziurtatzeko ezinbestekoa da argiztapenaren kontrola egitea, kasu honetan kolore patroia erabiliz egin dena. Metodo honek sinpletasuna eskaintzen du erreferentziatzeko tekniken aurrean: azkarragoa da, irudi berarekin parametro desberdinak determina daitezke aldi berean eta merkeagoa da, beharrezko tresneria oso eskuragarria delako.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Metodoaren abantailak eta aplikazio aukera guztiak ikusita, aipatutako aplikazioaren garapen handiagoa egin daiteke, DIA gai baita espektrofotometria bidezko analisiak ordezkatzeko. Horrela, hurrengo urratsetako bat izango da kolurioetan garrantzitsuak diren elektrolitoak kuantifikatzea, hau da, sodio, potasio, kaltzio eta magnesio kontzentrazioak ezagutzea. Horretarako, zilar nanopartikulekin eman dezaketen kolore aldaketa aztertuko da. Gainera, eta mikroplakak erabileraz haratago, paper oinarria duten mikrogailu (*Micro Paper Analytical Device*, μ PAD) baten garapena ikertuko da, non paperean erreakzioa burutzeko beharrezko erreaktiboak immobilizatzen diren.

6. Erreferentziak

- Agarwal, P., Craig, J.P., Rupenthal, I.D. (2021). Formulation considerations for the management of dry eye disease. *Pharmaceutics*, 13, 207
- Baranowski, P., Karolewicz, B., Gajda, M., Pluta, J. (2014). Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. *The Scientific World Journal*, 1–14.
- Berasarte, I., Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Vidal, M. (2021). pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis. *Microchemical Journal*, 162, 105854.
- Colzani, H., Araujo Garces Rodrigues, Q.E., Fogaça, C., Lafayette Neves Gelinski, J.M., 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.
- 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.
- Damasceno, D., Toledo, T.G., da Silva Soares, A., Botelho de Oliveira, S., Elcana de Oliveira, A. (2016). CompVis: a novel method for drinking water alkalinity and total hardness analysis, *Analytical Methods*, 8, 7832–7836.
- DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
- Esbensen, K.H., Swarbrick, B. (2018). *Multivariate Data Analysis*, 6th ed.; CAMO Software AS, Oslo, Norvegia.
- Gilbard, J.; Pardo, D. (2005). Lubricant eye drops, the electrolyte factor. *Optometry today*.
- Hebbi, V., Chattopadhyay, S., Rathore, A.S. (2019). High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products. *Journal of Chromatography B*, 1117, 118-126.
- 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.

- 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.
- Kodym, A., Zawisza, T., Taberska, J., Kukula, H. (2006). Physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63, 293-299.
- Lopez-Molinero, A., Tejedor Cubero, V., Domingo Irigoyen, R., Sípiera Piazuelo, D. (2013). Feasibility of digital image colorimetry—Application for water calcium hardness determination, *Talanta*, 103, 236-244.
- Martínez-Sorosa, 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.
- 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.
- Phatthiyaphaibun, K., Som-Aum, W., Srisa-Ard, M., Threeprom J. (2010). Determination of pheniramine enantiomers in eye drop by capillary electrophoresis using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *Journal of Analytical Chemistry*, 65, 755-759.
- Santos Benedetti, L.P., Bezerra dos Santos, V., 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.
- 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.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Applied Chemistry*, 74, 835-855.
- Torras, J.; Moreno, S. (2006). Lágrimas Artificiales. *Annals d' Oftalmologia*, 14, 70-84.
- Umbaugh, S.E. (2005). *Computer imaging: digital image analysis and processing*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra, M., Albizu, G. (2018) Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis, *Talanta*, 184, 58-64.
- Walsh, K., Jones, L. (2019). The use of preservatives in dry eye drops. *Clinical Ophthalmology*, 13, 409-425.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Euskal Herriko Unibertsitatearen proiektu ezberdinen bidez finantzatu da (GIU 16/55, GIU 19/13 eta US 18/09 proiektuak). Erabilitako laginak Donostiako Ospitaleko Itziar Martinez Sorosa medikuari esker lortu dira.