

Akıllı Telefon Tabanlı Kolorimetrik Analiz ile μ PAD kullanarak H_2O_2 Tespiti

Smartphone-based Colorimetric Analysis for the Detection of H_2O_2 Using a μ PAD

Volkan Kılıç¹ ve Mustafa Şen²

¹Elektrik-Elektronik Mühendisliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

²Biyomedikal Mühendisliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

volkan.kilic@ikc.edu.tr, mustafa.sen@ikc.edu.tr

Özetçe —Kâğıt kabanlı mikro-akışkan analitik araçlar (μ PAD) çevresel izlemeden klinik ve hasta başı testlere kadar çeşitli alanlarda büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bu tip araçlar genellikle tek kullanımlık, uygun maliyetli, pratik ve kullanıcı dostu olacak şekilde tasarlanmaktadır. Bu çalışmada su gibi şeffaf sıvılarda yüksek duyarlılıkta hidrojen peroksidin (H_2O_2) sayısal analizinde kullanılabilecek akıllı telefon tabanlı bir μ PAD geliştirilmiştir. μ PAD'lerin üretiminde katı mürekkep teknolojisi kullanılmıştır. Ölçümde kullanılan ve H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı gelişen renk değişimi (kolorimetrik) yaban turpu peroksidazı aracılığıyla katalizlenmiştir. Ayrıca, kitosanın ölçüm duyarlılığına etkisi de incelenmiştir. Elde edilen renk değişimleri özel bir aparat ile entegre akıllı bir cep telefonu kamerasıyla karanlık bir ortamda kaydedilmiş ve resimler MATLAB'da geliştirilen bir algoritmayla işlenerek renk değişimleri sayısal hale getirilmiştir. Sonuçlar üretilen μ PAD'lerin X ile Y arasında H_2O_2 'nin sayısal analizinde başarıyla kullanılabileceğini ve kitosanın duyarlılığı ciddi oranda arttırdığını göstermiştir.

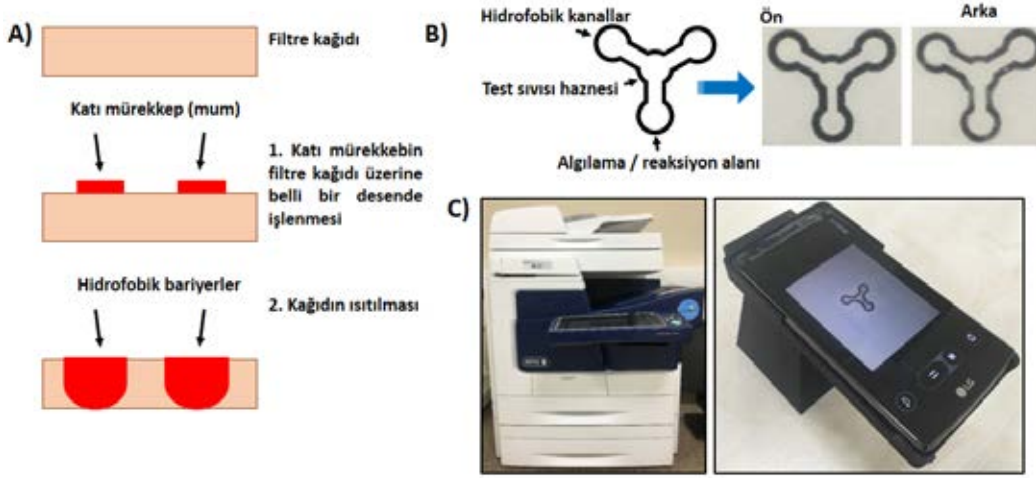
Anahtar Kelimeler— μ PAD, H_2O_2 , akıllı telefonla kolorimetrik analiz, görüntü işleme.

Abstract—Paper-based microfluidic analytical devices (μ PAD) have great potential for use in a variety of areas, from environmental monitoring to clinical and bedside testing. Such devices are generally designed to be disposable, cost effective, practical and user-friendly. In this study, a smartphone based μ PAD was developed which can be used in high sensitive quantitative analysis of H_2O_2 in transparent liquids such as water. Solid ink technology is used in the production of μ PADs. The H_2O_2 concentration dependent color change (colorimetric) used in the measurement was catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). In addition, the effect of chitosan on the measurement sensitivity was investigated. The resulting color changes were recorded in a dark environment with a special apparatus integrated smartphone camera and the color changes were digitized by an algorithm developed in MATLAB. The results showed that the produced μ PADs can successfully be used to quantitatively analyze H_2O_2 between X and Y, and the chitosan significantly increases the sensitivity.

Keywords— μ PAD, H_2O_2 , smartphone-based colorimetric analysis, image processing.

I. GİRİŞ

Kâğıt tabanlı sensörlerin birçok avantajları bulunmaktadır ve bunlardan en başta gelenler taşınabilir olma, tek kullanımlık, esnek ve kullanım kolaylığı şeklinde sıralanabilir. Bu tip sensörlerin geliştirilmesinde farklı teknikler kullanılmakla birlikte en çok tercih edilen yöntemlerin başında katı mürekkep (wax) yazıcısı kullanımıyla kâğıt kabanlı mikro-akışkan analitik araçlar (μ PAD) üretimi gelmektedir. İlk olarak 2007 yılında Whitesides ve meslektaşları tarafından ortaya konan bu yöntem katı mürekkep (wax) yazıcısı ile kâğıt üzerine geçirilen mordan desenlerin yüksek ısıda kâğıdın içine işlenmesiyle elde edilen mikro-akışkan kanalların üretimine dayanmaktadır [1]. Bu tip sensörlerde birçok farklı analitin yoğunluğu tek seferde ölçülebilmekte ve ölçüm de genellikle analitin konsantrasyonuna bağlı olarak renk yoğunluğunu tahmin eden kolorimetri tekniğine dayanmaktadır [1]. Bir hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde ilk adım teşhistir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, özellikle gelişmekte olan ülkelerde kullanılacak tanı cihazları "ASSURED" olarak kısaltılmış belli başlı şu kriterlere sahip olması beklenmektedir; uygun fiyat (affordable), yeterince duyarlı (sensitive), tespiti yapılacak analite özel (specific), kullanımı kolay (user-friendly), hızlı ve dayanıklı (rapid and robust), ekipmansız kullanım (equipment-free) ve son kullanıcılara ulaştırılabilir olma (deliverable to end users) [2]. Kâğıt tabanlı sensörlerin belirtilen kriterleri sağlayabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmekte ve bu yüzden çok sayıda araştırmacı bu tür sensörlerin geliştirilmesine yoğunlaşmaktadır. Kolorimetrik testlerin akıllı telefon tabanlı uygulamalarla birleştirilmesi akıllı telefonların günümüzde ne kadar yaygın olarak kullanıldığı düşünüldüğünde bu konuya olan ilgi her geçen gün artmaktadır [3], [4]. Bir akıllı telefonun, herhangi bir harici ekipman olmadan kolorimetrik test şeritlerini kolayca sayısal hale getirebileceği bir çok çalışmada gösterilmiştir [5], [6]. Kolorimetrik analizde, RGB, HSV ve $L * a * b$ [7]–[11] gibi farklı renk uzaylarındaki renk değişimlerini belirlemek için kâğıt tabanlı sensörler ile renk bilgisi elde edilebilir. Örneğin, Jung ve arkadaşları geliştirdikleri kolorimetrik testlerden elde ettikleri görüntülerin RGB renk uzayından dönüştürülen HSV renk uzayında tükürükte alkol konsantrasyonunun tespitini gerçekleştirmişlerdir. Bu, bir görüntüyü yakalamak ve işlemek için yalnızca bir akıllı telefon kamerasına ihtiyaç duyan basit ve geleneksel bir yaklaşımdır.



Şekil 1: Katı mürekkeple μ PAD'lerin üretiminde kullanılan üretim stratejisi (A) ve üretim için kullanılan μ PAD tasarımının genel görüntüsü (B). Çizilen dizaynın bir filtrekağıdına işlenmesinde kullanılan katı mürekkep yazıcısı ile algılama sonrasında gerçekleşen renk değişiminin karanlık bir ortamda JPEG formatında kaydedilmesinde kullanılan 3 boyutlu yazıcıyla üretilmiş aparata entegre akıllı cep telefonu (C).

Kâğıt tabanlı mikro akışkan veya test şeritleri gibi çok analitik sensörlerde her bir analitin renk değişiminin takibinde çoklu analitik modeller gerekmektedir. Bu nedenle önceden elde edilmiş görüntülerin öğrenilmiş modele çalıştırılması ile kolorimetrik testlerin otomatik gerçekleştirilmesi yeni data çıktıları olarak elde edilmesi, makine öğrenme algoritmaları kullanılarak üstesinden gelinebilir [12], [13]. Bu çalışmada su gibi transparan sıvılarda yüksek duyarlılıkta hidrojen peroksidin (H_2O_2) sayısal analizinde kullanılabilecek akıllı telefon tabanlı bir μ PAD geliştirilmiştir. İlk olarak bir katı mürekkep (wax) yazıcısı yardımıyla bir filtre kağıdı üzerine üç adet reaksiyon / algılama ve bir adet test sıvısı haznesi olan bir desen çizilmiş ve sonrasında işlenen desen yüksek ısıda kağıdın işlenmesi sağlanarak hidrofobik kanallar elde edilmiştir (Şekil 1A, B). Sonrasında algılama için yaban turpu peroksidazı (HRP) enzimi ile renk değişimi için gerekli kimyasallar bir solüsyon yardımıyla algılama alanına yerleştirilerek μ PAD'ler algılama için hazır hale getirilmiştir. En son aşamada farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 içeren PBS solüsyonlarında ölçüm bu μ PAD'ler aracılığıyla gerçekleştirilmiş elde edilen renk değişimleri bir aparat yardımıyla karanlık ortamda bir telefon aracılığıyla kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen μ PAD'lerin pratik kullanım için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

II. MATERYAL VE METOT

A. Materyal

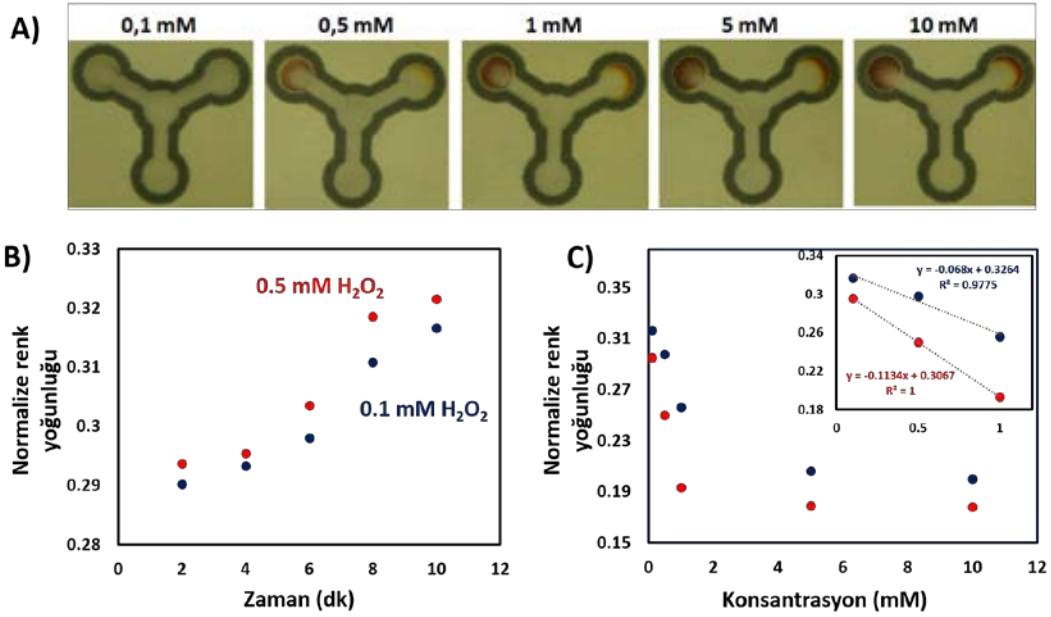
Fosfat tamponlu tuzlu çözeltisi (PBS) (Sigma Aldrich, ABD), yaban turpu peroksidazı (peroxidase from horseradish - HRP, 325 U / mg) (Sigma Aldrich, ABD), potasyum klorür (KCl) (Sigma Aldrich, ABD), potasyum iyodür (KI) (Sigma Aldrich, ABD), kitosan - düşük moleküler ağırlıklı (Sigma Aldrich, ABD), asetik asit - H_2O içinde % 2 (v / v) (Sigma Aldrich, ABD), D (+) - glukoz (C6H12O6) - ≥ 99.5 (GC) (Sigma Aldrich, ABD), Whatman nitel filtre kağıdı (Sigma

Aldrich, ABD).

B. μ PAD Üretimi

İlk olarak μ PAD'lerin basımı için test sıvısı haznesi ve 3 adet reaksiyon / algılama alanına sahip bir dizayn Şekil 1B'de gösterildiği gibi Microsoft PowerPoint programında çizilmiştir. Sonrasında çizilen bu dizayn bir katı mürekkep (wax printer) yazıcısıyla bir Whatman filtre kağıdına basılmıştır (Şekil 1B, C). Genel olarak katı mürekkep, erime noktası yaklaşık $120^\circ C$ olan hidrokarbon ve hidrofobik karbamatlardan oluşan bir karışımdır. Baskıdan sonra, katı mürekkep 3 dakika boyunca yaklaşık olarak $+150^\circ C$ 'de bir ısıtıcı üzerinde tutulmuştur. Sıcak levhadan kâğıda eşit ısı transferini ve eritilmiş katı mürekkebin kromatografi kâğıdının gözeneklerine nüfuz etmesini sağlamak için kâğıdın üzerine bir alüminyum folyo ve bunun da üzerine düzlemsel bir ağırlık (1-2 kg) yerleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda test sıvısının sadece belirlenen kanallar boyunca gitmesini sağlayacak kâğıdın her iki tarafına da geçmiş katı mürekkep bariyerlerinin eldesi sağlanmıştır (Şekil 1B).

Bir sonraki aşamasında algılama alanlarından birisi kontrol için boş bırakılmış ve diğer ikisine ise H_2O_2 algılamasına bağlı olarak renk değişimine neden olacak HRP enzimi ile 3 mM KI içeren $1.5 \mu L$ PBS çözeltisi konmuştur. Konan sıvının kuruması için yaklaşık 5 dk beklenmiş ve sonrasında üzerine çözelti konulan alanlardan birine % 1 (w/v) asetik asit içerisinde çözdürülmüş kitosan eklenmiş ve μ PAD'ler yaklaşık 5dk kadar kurumaya bırakılmıştır. Kolorimetrik ölçüm için hazır hale getirilen μ PAD'ler 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 mM H_2O_2 içeren PBS çözeltileri ile test edilmiştir. Bu işlem sırasında her bir konsantrasyon seviyesi için $30 \mu L$ kadar çözelti μ PAD'lerin çözelti haznesine koyulmuş ve elde edilen renk değişimleri cep telefonu kamerasıyla kaydedilmiştir.



Şekil 2: Farklı H_2O_2 konsantrasyon değerlerinde μ PAD'lerde 10. dakikada gözlemlenen renk değişimleri (sağ üst: kitosan + HRP + KI; sol üst: HRP + KI; alt: kontrol) (A). Kitosan içeren koşulda zamana bağlı gözlemlenen renk yoğunluğu değişimi (B). Kitosanlı (kırmızı) ve kitosansız (mavi) koşullarda elde edilen kalibrasyon eğrileri (C).

C. Görüntü İşleme

Çekimlerde, dış ortamdaki ışığın etkisini kaldırmak için 3B yazıcıda basılmış bir aparat kullanılmıştır. Şekil 1C'nin sağ tarafındaki resim cep telefonu ile aparat kullanarak fotoğraf çekimi göstermektedir. Kullanılan telefon LG G4 (LG, Güney Kore) olup 1/2.6 inç sensör boyutuna, 5312×2988 piksel çözünürlüğüne ve $1.12 \mu m$ piksel boyutuna sahiptir. Resimlerde tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği sağlamak için, akıllı telefon kamerası manuel moda kullanılmış ve ISO seviyesi (2200), poz süresi (shutter speed= 1/10 s), odak seviyesi (focus level= f1.8) ve beyaz ayarı (white balance= 700K) parametreleri çekimler sırasında sabit tutulmuştur.

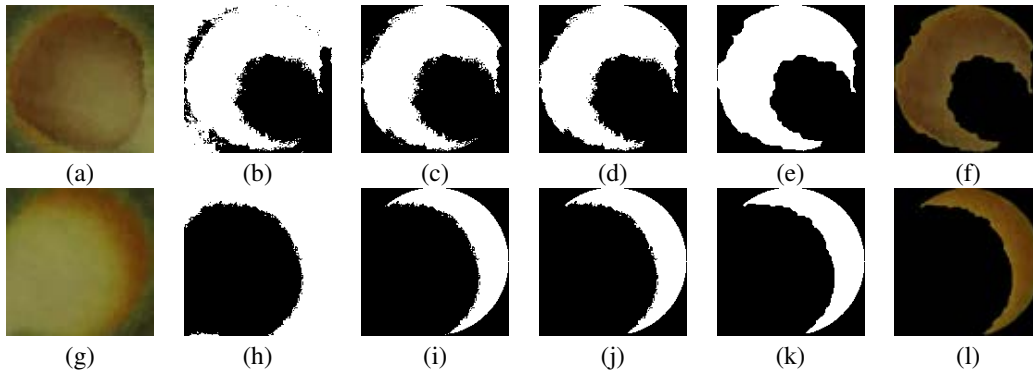
Çekimler, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 mM konsantrasyon değerleri için 0, 2, 4, 6, 8 ve 10'uncu dakikalarda yapılmış ve görüntüler JPEG olarak kaydedilmiştir. Daha sonra görüntüler MATLAB (MathWorks, MA, USA) ortamında işlemek için bilgisayara aktarılmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan renk değişiminin olduğu ilgi bölgesi (Region of interest, ROI), gri tonlama dönüşümü, eşikleme, binarizasyon, maskeleme, kontur algılama ve gürültü giderme de dahil olmak üzere görüntü işleme algoritmasıyla çıkarıldı. Çıkarılan ROI alanı daha sonra ortalama R, G, B, H, S, V, L^* , a^* , b^* değerlerini hesaplamak için orijinal görüntülerle maskelenmiştir. Bu değerler daha sonra konsantrasyon değerlerine göre kalibrasyon eğrisini çizmek için kullanılmıştır.

III. SONUÇLAR

Öngörülen stratejiyle μ PAD'ler başarıyla üretilmiş ve kanalların sıvıyı belirlenen şekilde taşıma özelliği PBS solüsyonu ile test edilmiştir. Yapılan testlerde üretilen μ PAD'lerin tamamında kanallardan sızma görülmemiş ve bu da üretim

metodunun bu işlem için uygunluğunu göstermiştir. Ayrıca, bir kâğıt üzerinde çok sayıda μ PAD'lerin tek seferde üretimi ve üretiminin oldukça kolay olması birim üretim maliyetini ciddi oranda düşürmüştür. Kullanılan enzim ve kimyasalların miktarının ($1.5 \mu L$) oldukça düşük olması da birim üretim maliyetini ciddi oranda düşürmektedir. Bir sonraki işlemde gerekli enzim ve kimyasallar algılama / reaksiyon alanlarına hapsedilmesi sağlanmıştır. Kâğıdın bu tip uygulamalarda göze çarpan özelliklerden bir tanesi molekülleri depolayabilme kapasitesidir. Gerekli enzimlerin ve kimyasalların belli hacimlerde algılama alanına koyulması ve taşıyıcı sıvının oda sıcaklığında kurutulmasıyla kolayca bu moleküllerin belirlenen bu alanlarda hapsedilmesi sağlamaktadır. Daha sonra kolorimetrik ölçüm için hazır hale getirilen μ PAD'lerin test solüsyonu haznesine 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 mM H_2O_2 içeren $30 \mu L$ kadar PBS çözeltileri koyulmuş ve algılama alanlarında zamana bağlı renk değişimi gözlemlenmiştir. Bu noktada yaban turpu peroksidadı H_2O_2 molekülleri kullanarak potasyum iyodürü renk değişimine neden olan potasyum iyodata (KIO_3) çevirmektedir. Renk değişimi analitin konsantrasyonuna bağlı olarak daha açık tonlardan daha kapalı tonlara dönüşmektedir.

Görüntüler MATLAB'da işlenerek kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Öncelikle görüntüler Şekil 3a'da gösterildiği üzere görüntü boyutunu küçültmek için kırıldı. Görüntü, renk uzaylarının konsantrasyona bağlı renk değişimi üzerindeki etkisini analiz etmek için HSV ve L^* , a^* , b^* formatlarına da dönüştürüldü. Kırılmış bu kare görüntü yeşil kanalı kullanılarak gri tonlamalı bir görüntüye dönüştürüldü. Daha sonra, Otsu metodu [14] tarafından hesaplanan bir eşik değeri ile binarize edildi. Binarize görüntü, gürültü içeren (siyah alandaki beyaz noktalar ve beyaz alandaki siyah noktalar) Şekil 3b'de verildi. Bu sesler, Şekil 3c, d ve e'de gösterildiği gibi morfolojik işlemler (görüntü işleme) ile giderildi. Şekil



Şekil 3: 1 mM konsantrasyonunda görüntü işleme aşamaları, kitosan için (a) ila (f) arasında verilirken, bu basamaklar kitosansızlar için (g) ila (l) arasında gösterilmektedir.

3e'deki gürültüden arındırılmış görüntü daha sonra, Şekil 3f'de gösterildiği gibi ROI'yi çıkarmak için Şekil 3a ile maskelenir. Bu adımlar 1mM konsantrasyonunda, kitosan içerener için Şekil 3a-f arasında verilirken, aynı konsantrasyonda kitosan içermeyen için Şekil 3g-l de verilmiştir. ROI çıkarıldıktan sonra ortalama R, G, B değerleri hesaplanır.

Şekil 2B RGB renk uzayında kitosanlı koşulda renkteki değişimi göstermektedir. RGB renk uzayı 0 ile 255 arasında değişmekte ve ölçülen değerin yüksekten düşüğe gitmesi renkte koyulaşmanın olduğu anlamına gelmektedir. Renkteki yoğunluk zamana bağlı olarak azaldığından ölçüm için en uygun ölçüm zamanının bu koşul 2. dakika olduğu sonucuna varılmıştır. Renkteki değişimin bu denli hızlı gelişmesindeki en büyük etmen HRP enziminin reaksiyonu katalizlemesidir. Şekil 2C'den anlaşılacağı üzere her iki durumda da üretilen μ PAD'ler 0 ile 1 μ M aralığında ölçülen renk değişimiyle konsantrasyon arasındaki ilişki lineerdir. Kitosan renkte ciddi bir koyulaşmaya neden olduğu elde edilen resimlerde kolayca anlaşılmaktadır. Ayrıca, 0.1 mM H_2O_2 seviyesinde kitosansız durumda gözle görülür bir değişim gözlemlenmezken, kitosanlı durumda renk değişiminin varlığı kolayca görülebilmektedir (Şekil 2A). Her iki koşulun algılama limiti 0 ile 1 mM aralığında elde edilen veriler kullanılarak şu formüle göre hesaplanmıştır; Algılama limiti = $3 * (\text{regresyon analizine göre hesaplanmış standart sapma} / \text{kalibrasyon eğrisinin eğimi})$. Kitosanlı koşulda algılama limiti (69 μ M) kitosansız duruma (212 μ M) göre çok daha yüksek çıkmıştır. Ayrıca, Şekil 2C'de görüldüğü gibi belirtilen aralıkta kitosanlı ölçümün eğiminin (0,1134) kitosansız ölçümün eğiminden (0,068) yüksek çıkması kitosanlı ölçümün daha duyarlı olduğu sonucunu desteklemektedir. Her iki koşulda da 1 mM H_2O_2 üzeri konsantrasyon seviyelerinde sinyalin değişmemesi üretilen μ PAD'lerle ölçülebilecek en yüksek H_2O_2 konsantrasyonunun 1 mM olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından (Proje No: 2019-ONAP-MUMF-0004) ve TÜBİTAK 116E934 projesi kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 8, pp. 1318–1320, 2007.
- [2] R. W. Peeling, K. K. Holmes, D. Mabey, and A. Ronald, "Rapid tests for sexually transmitted infections (stis): the way forward," *Sexually transmitted infections*, vol. 82, no. suppl 5, pp. v1–v6, 2006.
- [3] K. Grudpan, S. D. Kolev, S. Lapanantopakhun, I. D. McKelvie, and W. Wongwilai, "Applications of everyday it and communications devices in modern analytical chemistry: A review," *Talanta*, vol. 136, pp. 84–94, 2015.
- [4] J. C. Contreras-Naranjo, Q. Wei, and A. Ozcan, "Mobile phone-based microscopy, sensing, and diagnostics," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 22, no. 3, pp. 1–14, 2016.
- [5] L. Shen, J. A. Hagen, and I. Papautsky, "Point-of-care colorimetric detection with a smartphone," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 21, pp. 4240–4243, 2012.
- [6] J. I. Hong and B.-Y. Chang, "Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 10, pp. 1725–1732, 2014.
- [7] M.-Y. Jia, Q.-S. Wu, H. Li, Y. Zhang, Y.-F. Guan, and L. Feng, "The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 74, pp. 1029–1037, 2015.
- [8] V. Kılıç, N. Horzum, and M. E. Solmaz, "From sophisticated analysis to colorimetric determination: Smartphone spectrometers and colorimetry," in *Color Detection*. IntechOpen, 2018.
- [9] A. Bayram, N. Horzum, A. U. Metin, V. Kılıç, and M. E. Solmaz, "Colorimetric bisphenol-a detection with a portable smartphone-based spectrometer," *IEEE Sensors Journal*, vol. 18, no. 14, pp. 5948–5955, 2018.
- [10] A. Y. Mutlu, V. Kilic, G. Kocakusak, A. Bayram, N. Horzum, and M. Solmaz, "Smartphone based colorimetric detection via machine learning," *Analyst*, pp. –, 2017.
- [11] V. Kılıç, G. Alankus, N. Horzum, A. Y. Mutlu, A. Bayram, and M. E. Solmaz, "Single-image-referenced colorimetric water quality detection using a smartphone," *ACS Omega*, vol. 3, no. 5, pp. 5531–5536, 2018.
- [12] H. Karisen and T. Dong, "Illumination and device independence for colorimetric detection of urinary biomarkers with smartphone," in *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the*. IEEE, 2016, pp. 5184–5187.
- [13] H. Kim, O. Awofeso, S. Choi, Y. Jung, and E. Bae, "Colorimetric analysis of saliva-alcohol test strips by smartphone-based instruments using machine-learning algorithms," *Applied Optics*, vol. 56, no. 1, pp. 84–92, 2017.
- [14] H. J. Vala and A. Baxi, "A review on otsu image segmentation algorithm," *International Journal of Advanced Research in Computer Engineering & Technology (IJARCET)*, vol. 2, no. 2, pp. 387–389, 2013.