

Glikozun Hızlı Kolorimetrik Tespiti İçin bir μ PAD ile Akıllı Telefonu Uygulamasının İntegrasyonu Integration of a Smartphone Application with a μ PAD for Rapid Colorimetric Detection of Glucose

Tansu Gölcez¹, Volkan Kılıç², Mustafa Şen¹

¹Biyomedikal Mühendisliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

²Elektrik-Elektronik Mühendisliği, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
y180204006@ogr.ikc.edu.tr, volkan.kilic@ikc.edu.tr, mustafa.sen@ikc.edu.tr

Özetçe —Bu çalışmada, kolorimetrik yöntem ile hızlı glikoz tespiti için, kağıt tabanlı mikroakışkan analitik bir cihaz (μ PAD) ile çevrimdışı (internet bağlantısı olmadan) görüntü işleme ve analiz yapabilen bir akıllı telefon uygulaması ile entegre edilmiştir. μ PAD'in üretiminde su emme verimliliğine göre diğer kağıtlara nazaran daha iyi bir performans sergileyen kağıt havlu tercih edilmiştir. Kağıt havlu üzerinde μ PAD üretimi için hidrofobik kanalların oluşturulmasında 3B yazıcı ile basılmış bir kalıp içeren kaşe kullanılmıştır. Mürekkep olarak ta hidrofobik özellikte ve ışık ile polimerize olabilen bir reçine kullanılmıştır. Analizde doğruluğun artırılması için sensör üzerinde ilgili alanın (ROI) çıkarımı için bir görüntü işleme algoritması geliştirilmiştir. Geliştirilen entegre platform, 0.1 ile 1 mM glikoz aralığında lineer bir cevap vermiş ve ölçüm limiti de 66.2 μ M olarak hesaplanmıştır. Tüm analiz işlemleri bir dakikanın altında tamamlanmıştır. Son olarak sistemi kullanıcı dostu yapmak için çevrimdışı görüntü işleme tabanlı renk değişim analizi yapabilen akıllı cep telefon uygulaması geliştirilmiştir. Uygulamayla entegre edilmiş sensör sistemi, taşınabilir, hızlı, kullanıcı dostu, ultra düşük maliyetli, herkes tarafından kullanılabilir, basit ve duyarlıdır.

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

Abstract—Paper-based sensors have great potential for use in many different fields so far. In this study, a paper-based microfluidic analytical device (μ PAD) was integrated with a smartphone application capable of offline (no internet access) image processing and analysis for rapid colorimetric glucose detection. A paper towel was preferred due to its better water absorption efficiency than other papers. A stamp containing a 3D printed mold was used to form hydrophobic channels on a paper towel for the production of μ PAD. A hydrophobic by nature and light polymerizable resin was used as the ink. In order to increase the accuracy of the analysis, an image processing algorithm has been developed for the extraction of the region of interest (ROI) on the μ PAD. The developed integrated platform gave a linear response in the range of 0.1 to 1 mM glucose and the limit of detection was calculated as 66.2 μ M. The whole analysis was completed in less than one minute. Finally, a smart mobile phone application capable of offline image processing was developed to make the system user friendly. The integrated sensor system is portable, fast, user-friendly, ultra-low cost, usable by everyone, simple and sensitive.

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

978-1-7281-2420-9/19/\$31.00 ©2019 IEEE

I. GİRİŞ

Kağıt tabanlı sensörler, çevresel izlemeden klinik ve bakım noktası testlerine kadar çeşitli alanlarda kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu sensörler tek kullanımlık, pratik, uygun maliyet ve kullanıcı dostu gibi belli avantajlardan dolayı son yıllarda bilimsel çalışmalarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bu sensörler farklı sistemlerle entegre edilebilir ve farklı alanlarda kullanılacak şekilde dizayn edilebilirler [1]. Son yıllarda kağıt üzerinde hidrofobik bariyerlerden mikro kanallar oluşturmak için çeşitli hidrofobik materyallerin (PDMS, katı balmumu, paraffin vb.) kullanımı ve bunların farklı üretim teknikleri (plazma uygulaması, baskı vb.) ile kağıda işlenmesi üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Önerilen bu yöntemlerin ve malzemelerin kendilerine özgü avantaj (ucuzluk, basitlik, pratiklik vb.) ve dezavantajları (düşük çözünürlük, hız, pahalılık vb.) mevcuttur. Mikroanalitik kağıt tabanlı sensor yapımında genellikle Whatman (No. 1) kağıdı kullanılmaktadır [2]–[4]. Mikroanalitik kağıt tabanlı sensörlerde birçok farklı tespit yöntemi kullanılabilmektedir. Bunlardan bazıları elektrokimyasal, kemilüminesans, floresans ve kolorimetrik yöntemlerdir. Son yıllarda en popüler ve sıklıkla kullanılan yöntem, basitlik, hızlılık, algılama kolaylığı ve uygulama ucuzluğu yönünden kolorimetrik yöntemdir. Algılama bölgesinde oluşan renk değişikliği görsel tespit sağlamak ve böylece pahalı ekipmanlara gerek duyulmamaktadır. Örneğin, ticari hale getirilmiş hamilelik ve idrar test çubuklarında analiz görsel olarak gerçekleştirilmektedir. Diyabet son yıllarda tüm dünyada yaygın olan ve gün geçtikçe artış gösteren bir hastalık haline gelmiştir. Diyabet hastalığı, göze, kan damarlarına, böbreklere, kalbe ve birçok organa zarar verebilmekte ve hatta ölüme bile sonuçlanabilmektedir [5]. Hastalığın düzenli kontrol edilmesi gerekmekte ve bu kontroler kandaki glikoz miktarını ölçerek yapılmaktadır. Hastalar genellikle invazif olarak elde edilen bir damla kandaki glikoz miktarını ticari olarak üretilmiş glikometrelerle ölçmektedir. Bu yöntem hem enfeksiyon riskini arttırmakta hem de acılı ve rahatsız edici olarak öne çıkmaktadır [6]. Son yıllarda araştırmacılar daha çok tükürük, ter ve gözyaşı gibi birçok vücut sıvısında invazif olmayan güvenilir ve hassas ölçüm yapabilen sensörlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır [7]. Akıllı telefonlarda bulunan kamera ve sensor sistemleri teknoloji-



lerin gelişmesi ile karanlık ortamda bile, yüksek işlemciler ve yüksek çözünürlüklü kameralar sayesinde görüntü analizleri son yıllarda etkili ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir [8]. Akıllı telefon kameralarının basit renk değişikliğini bile sayısal olarak analiz edilebilmesi bu cihazları kolorimetrik testler gibi çeşitli uygulamalarda cazip hale getirmiştir. Bu çalışmada temel olarak, hızlı ve basit glikoz ölçümü için kağıt tabanlı bir kolorimetrik sensör üretilmiş ve analiz, geliştirilen görüntü işleme sistemine dayalı akıllı cep telefonu uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Sensör üretimi için su emme özelliği Whatman (No. 1) 'e göre daha fazla olan kağıt havlu tercih edilmiştir. Hidrofobik bariyerler üç boyutlu yazıcı ile üretilmiş bir kaşe kalıbı ile bu kağıt üzerine geçirilmiştir. Hidrofobik bariyer malzemesi olarak ışık ile polimerize olabilen bir polimer kullanılmıştır. Daha sonra ölçüm için gerekli kimyasallar ve enzimler algılama alanına yerleştirilmiş ve bunların her birinin ölçüm üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Son olarak geliştirilen akıllı telefon platformu ile glikoz miktarı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre düşük bütçeli, hızlı ve hassas olan bu platformun kan harici vücut sıvılarında invazif olmayan glikoz ölçümünde kullanım potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

II. MATERYAL VE METOT

A. Mikroanalitik Kağıt tabanlı sensörün üretimi

SolidWorks (3D CAD dizayn yazılımı) kullanılarak kalıp dizaynı çizilmiş ve 3D baskı cihazı ile 1.7 mm kalınlığında termoplastik filaman ile basılmıştır. Basılan dizayn bir kaşenin baskı kısmına (baskı bölgesi 60 x 25 mm) yapıştırıcı yardımıyla monte edilmiştir. Kaşenin sıvı bölmesine hidrofobik bariyerlerin oluşturulması için hidrofobik ve ışıkla sertleşen metakrilik/akrilik reçine konulmuştur. Kağıt havlu üzerine hidrofobik bariyerler hazırlanan baskı ile basılmıştır. Baskı sonrası kağıdın iki tarafında da belirgin hale gelen reçine 20 saniyede ışıkla (dalga boyu 390 - 420 nm) sertleştirilmiştir.

B. Glikoz ölçümü

Mikroanalitik kağıt tabanlı sensörlerin tespit bölgeleri, glikozun kolorimetrik tespiti için modifiye edilmiştir. İlk olarak, 180 U / ml glikoz oksidaz (GOx), 50 U / ml yaban turpu peroksidazı (HRP), 3 mM potasyum iyodür (KI) ve % 1 (ağırlık / hacim) kitosan içeren bir algılama karışımı, pH 7'de PBS içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra sensörlerin algılama bölgesine bu karışımdan 5 µl kadar kolorimetrik ölçüm için enjekte edilmiştir. Sensörler daha sonra oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Algılama bölgeleri (numune yerleştirme bölgesi dışındaki her iki taraf) koruma amaçlı şeffaf bir bantla kapatılmıştır. Numune yerleştirme bölgelerine değişen konsantrasyonlarda (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 15 ve 25 mM) glikoz içeren 30 µl alikotlar eklenmiş ve yanal akış ile her iki analiz bölgesine de ulaşması sağlanmıştır. GOx, HRP ve kitosan'ın analiz bölgelerinde renk değişikliğine katkısı, hepsinin bulunduğu başlangıç karışımından tek tek çıkarılarak gösterilmiştir. Analiz ve kontrol bölgelerinde renk değişimi zamana bağlı olarak 1 dakika boyunca geliştirilen akıllı cep telefonu tabanlı platform aracılığıyla analiz edilmiştir.

C. Görüntü İşleme

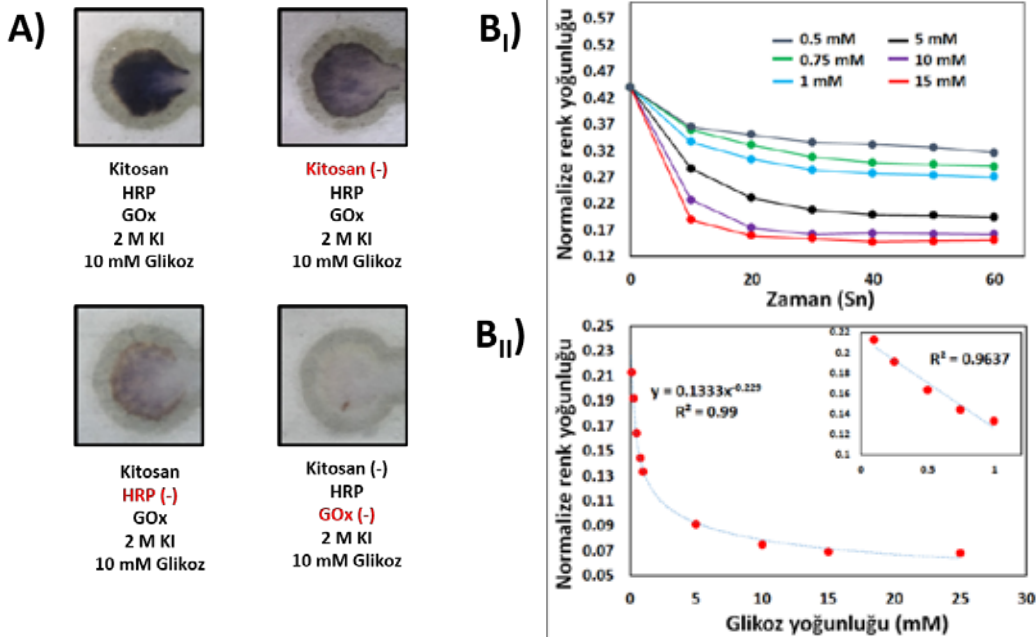
Görüntü işleme ve sayısal analiz için µPAD'in fotoğrafları 3B yazıcıda basılmış bir aparatın akıllı telefona entegre edilmesiyle sağlanan karanlık bir ortamda çekilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, değişik konsantrasyonlarda (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 15 ve 25 mM) 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 saniyelerde gerçekleşen renk değişimleri, bir akıllı telefon arka kamerası (1 / 2.6 inçlik sensör boyutu, 5312 2988 piksel çözünürlük ve 1.12 piksel boyutuna sahip LG G4 (LG, Güney Kore) ile "Joint Photographic Experts Group" (JPEG) formatında kaydedilmiştir. Görüntülerde tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği sağlamak için, akıllı telefon kamerası manuel modda 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. JPEG formatlarında elde edilen RGB görüntüler, aydınlatma değişimine daha dayanıklı olan HSV (Ton-Doygunluk Değeri) ve L* a* b* (Açıklık, Yeşil-Kırmızı, Mavi-Sarı) renkli kanallarına dönüştürülmüştür. Altı zaman noktasında dokuz konsantrasyon değerinin ölçülmesi ile oluşturulan görüntü veri seti, MATLAB (MathWorks, MA, USA) ortamında işlem yapmak için bir bilgisayara aktarılmıştır. Ölçüm sonrası gelişen renk değişimini kapsayan analiz bölgesindeki ilgili bölge (ROI), gri tonlama dönüşümü, eşikleme, binarizasyon, maskeleyme, kontur algılama ve gürültü giderme de dahil olmak üzere görüntü işleme algoritmasıyla çıkarılmıştır. Çıkarılan ilgi bölgesi 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.

D. Akıllı Telefon Uygulaması: GlucoSense

Burada, Android Studio'da yazılan ve GlucoSense olarak adlandırılan yazılım tarafından kontrol edilen glikozun hızlı kolorimetrik tespiti için akıllı telefon tabanlı entegre bir platform geliştirilmiştir. MATLAB'da kodlanan görüntü işleme algoritması, JAVA programlama dili ile Android platformu için Eclipse'de yeniden kodlanmıştır. Ardından, hızlı bir analiz gerektiğinde yerinde hızlı bir şekilde sayısal izleme sağlamak için basit ve kullanımı dostu bir arayüz tasarlanmıştır. GlucoSense uygulamasının ekran görüntüleri, çalışma akışını ve miktar tayin prosedürlerini sunmaktadır. Uygulama, görüntüleri akıllı telefon kamerasının galerisine (dahili depolama) erişerek veya yeni bir görüntü yakalamak için kamera ile almaktadır. Kullanıcı görüntüyü kırparak bir kare içerisine alır ve hesapla düğmesine dokunduğunda, görüntü işleme algoritması görüntü üzerinde çalıştırılır. Uygulamada ölçüm bilgisayardaki görüntü veri seti işlenerek elde edilen kalibrasyon eğrisi dayanmaktadır. Genel olarak bu uygulama ilgili bölgedeki en uygun kalibrasyon eğrisini veren R, V ve L* değerlerinde glikoz konsantrasyonunu hesaplamakta ve sonucu ekranda kullanıcıya sunmaktadır.

III. SONUÇLAR

İlk olarak hidrofobik kanallar hem filtre kağıdına (Whatman No. 1) hem de kağıt havluya metakrilik/akrilik reçine ile 3B yazıcı ile elde edilen bir kaşe baskısı kullanılarak hız testi için basılmıştır. Baskı için kullanılan reçine, doğası gereği hidrofobik ve rengi yeşildir. Kaşe ile bir veya iki kez



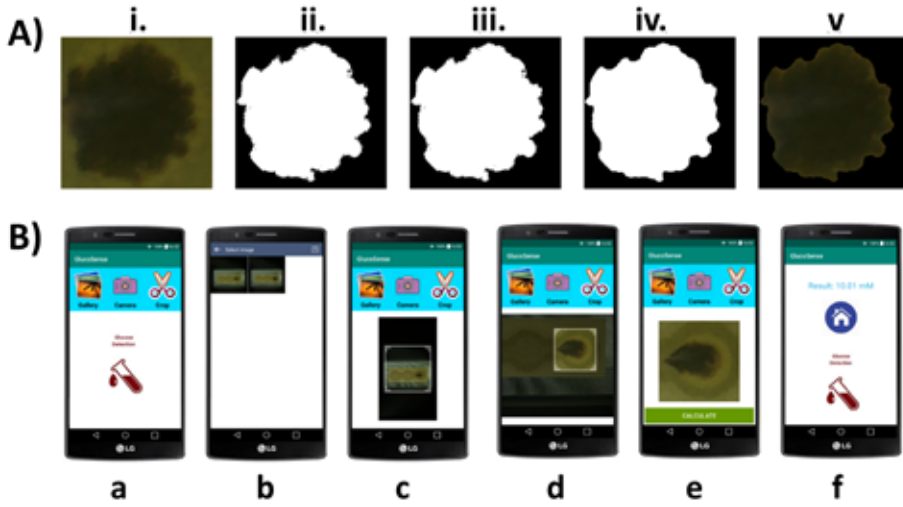
Şekil 1: Tespit karışımının bileşenlerinin renk değişimine etkisi (A). Farklı glikoz konsantrasyon değerlerinde μ PAD'lerde zamana bağlı değişim (B_I) ile 60. saniye verilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi (B_{II})

basılarak, her iki kâğıt türünde de hidrofobik kanallar oluşturulmuştur. Daha sonra, her iki tür kağıttan yapılmış cihazlarda renkli bir PBS'nin yanıl akış hızı değerlendirilmiştir. Her iki sensörün orta kısımlarında bulunan çözelti ekleme bölgesine 30 μ l renkli çözelti alikotları enjekte edilmiş ve yanıl akış bir kamera ile videoya kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar kâğıt havluda yanıl akışın filtre kağıdına göre çok daha hızlı olduğunu göstermiştir. Kâğıt havluda ve filtre kağıdında yanıl akış hızları sırasıyla 6.3 ve 1.2 mm/sn şeklinde ölçülmüştür. Kâğıt havluların gözenekliliğinin fazla olması nedeniyle suyu daha verimli emmesi glikozun hızlı ölçümünde bu kağıdın tercih edilmesinin ana nedenlerinden biridir.

Glikoz tespiti için GOx / peroksidaz yöntemi kullanılmıştır. Analiz için GOx, HRP, kitosan ve KI karışımı kullanılmıştır. Temel olarak, GOx, β -D-glikozun D-glucono-1,5-laktone oksidasyonunu katalizler ve ayrıca bir yan ürün olarak H₂O₂ üretir. HRP, KI'nin iyodine dönüşümünü katalize etmek için yan ürün H₂O₂'yi kullanır [9] ve böylece analiz bölgesinde kahverengine benzer bir renk değişimini tetikler. GOx, HRP ve kitosan'ın renk değişimine etkisi bunların karışımından birer birer çıkartılmasıyla değerlendirilmiştir. En yüksek görünür renk yoğunluğu bu üç bileşeni içeren tespit karışımı ile gözlemlenmiştir (Şekil 1A) ve bu da analiz için tüm bileşenleri içeren tespit karışımının daha duyarlı bir kolorimetrik analiz sağlayacağını göstermiştir. Kitosanın, tespit karışımının diğer bileşenleri ile birlikte kullanıldığında renk homojenliğini ve piksel yoğunluğunu arttırdığı bilinmektedir [10]. Üretilen μ PAD'lerin glikoz tespitindeki performansı, taşınabilir akıllı telefon tabanlı bir platform kullanılarak belirlenmiştir. Ortam ışığının analiz üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak için 3B yazıcı ile basılan bir aparat kullanılmıştır. Bir sonraki aşamada, glikoz tespitinde kullanılmak üzere kaydedilen JPEG formatındaki resimlerde bulunan ROI geliştirilen bir görüntü işleme

algoritması ile elde edilmiştir. İlk olarak, görüntünün yeşil kanalı kullanılarak gri tonlamalı bir görüntüye dönüştürülür. Daha sonra, otsu yöntemi tarafından hesaplanan bir eşik değeri ile binarize edilir. Binarize görüntü, gürültü içeren (siyah alanda beyaz noktalar ve beyaz alanda siyah noktalar), Şekil 2A_{ii}'de verilmiştir. Bu gürültüler, Şekil 2A_{iii} ve Şekil 2A_{iv}'de gösterildiği gibi morfolojik işlemlerle (görüntü işleme) iki adımda giderildi. Şekil 2A_{iv}'deki gürültüsüz görüntü daha sonra Şekil 2A_v'de gösterildiği gibi ROI'yi çıkarmak için Şekil 2A_{ii} ile maskelenir. ROI çıkarıldıktan sonra ortalama R, G, B değerleri hesaplanır. Aynı ROI, HSV ve L*a*b* görüntülerine uygulanır ve konsantrasyon değişikliklerine bağlı olarak renk değişimini dokuz renk değişkeniyle analiz edilir.

Zamana bağlı renk yoğunluğunun değişimini göstermek için, 0.5, 0.75, 1, 5, 10 ve 15 mM konsantrasyonlarda glikoz içeren numunelerine ait renk değişim görüntüleri 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 s zaman noktalarında kaydedilmiştir. Şekil 2A_i'de kolayca görülebildiği gibi, tüm örneklerin nispi renk yoğunluğu 30 saniyeden sonra neredeyse sabit hale gelmiş, bu da analizin 1 dakikadan daha az bir sürede tamamlanabileceğini göstermiştir. Geliştirilen entegre sensör 0 ile 1 mM arasında lineer bir cevap vermiş ($R^2 = 0.9637$) ve ölçüm limiti de 66.2 μ M olarak hesaplanmıştır. Son olarak platformun kullanıcı dostu olması için görüntü işleme yeteneğine sahip özel olarak tasarlanmış ve *GlucSense* olarak adlandırılmış bir Android uygulaması geliştirilmiştir (Şekil 2B). Uygulamada ölçüm MATLAB ile daha önceki deneylerden elde edilen kalibrasyon eğrisine dayanmaktadır. *GlucSense* uygulamasında, kullanıcının glikoz seviyesini ölçmek için bir resim seçmesi veya çekmesi gerekmektedir. Geliştirilen uygulama analiz için gerekli tüm işlemleri internet bağlantısı olmadan gerçekleştirmektedir. Yapılan testlerde uygulamanın glikoz tespiti doğru olarak gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Geliştirilen



Şekil 2: Görüntü işleme algoritmasının adımları (A) ve geliştirilen *GlucoSense* uygulaması ile glikoz ölçümü (B)

uygulamanın yüksek glikoz konsantrasyonlarında doygunluğa ulaşması nedeniyle glikozun daha düşük yoğunlukta bulunduğu ter, gözyaşı gibi diğer vücut sıvılarında kullanımının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

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] T. Akyazi, L. Basabe-Desmonts, and F. Benito-Lopez, "Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation," *Analytica chimica acta*, vol. 1001, pp. 1–17, 2018.
- [2] C. K. Camplisson, K. M. Schilling, W. L. Pedrotti, H. A. Stone, and A. W. Martinez, "Two-ply channels for faster wicking in paper-based microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 15, no. 23, pp. 4461–4466, 2015.
- [3] T. Akyazi, J. Saez, J. Elizalde, and F. Benito-Lopez, "Fluidic flow delay by ionogel passive pumps in microfluidic paper-based analytical devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 233, pp. 402–408, 2016.
- [4] Y. Sameenoi, P. N. Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry, and D. Nacapricha, "One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (μ pad) fabrication," *Analyst*, vol. 139, no. 24, pp. 6580–6588, 2014.
- [5] D. Bruen, C. Delaney, L. Florea, and D. Diamond, "Glucose sensing for diabetes monitoring: recent developments," *Sensors*, vol. 17, no. 8, p. 1866, 2017.
- [6] E. Gabriel, P. Garcia, F. Lopes, and W. Coltro, "Based colorimetric biosensor for tear glucose measurements," *Micromachines*, vol. 8, no. 4, p. 104, 2017.
- [7] Q. Liu, Y. Liu, F. Wu, X. Cao, Z. Li, M. Alharbi, A. N. Abbas, M. R. Amer, and C. Zhou, "Highly sensitive and wearable in2o3 nanoribbon transistor biosensors with integrated on-chip gate for glucose monitoring in body fluids," *ACS nano*, vol. 12, no. 2, pp. 1170–1178, 2018.

- [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] M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, H. Shiku, and T. Matsue, "Electrochemical evaluation of sarcomeric α -actinin in embryoid bodies after gene silencing using an lsi-based amperometric sensor array," *Analytical Methods*, vol. 6, no. 16, pp. 6337–6342, 2014.
- [10] E. F. Gabriel, P. T. Garcia, T. M. Cardoso, F. M. Lopes, F. T. Martins, and W. K. Coltro, "Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices," *Analyst*, vol. 141, no. 15, pp. 4749–4756, 2016.