

Gıda Bileşen Analizine Yönelik Düşük Maliyetli Kolorimetrik Ölçüm Cihazı Geliştirilmesi ve Performansının Belirlenmesi: Glukoz ve Protein Tayini ile Model Çalışma

Deniz Baş 

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çankırı

Geliş Tarihi (Received): 19.11.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 28.07.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): denizbas@gmail.com (D. Baş)

☎ 0 376 218 95 35 / 8354 📠 0 376 218 95 36

ÖZ

Gıda bileşen ve bulaşanlarının hassas ve güvenilir bir şekilde analiz edilmeleri modern toplum için vazgeçilmez bir gerekliliktir. Gıda endüstrisinin günümüz koşulları düşük analiz ve yatırım maliyetine sahip, yerinde (in-situ) ve hızlı analizlere gereksinim duymaktadır. Bu çalışma kapsamında, konvansiyonel spektrofotometrelere alternatif olacak taşınabilir ve düşük maliyetli LED tabanlı optoelektronik bir cihaz geliştirilmiştir. LED-tabanlı cihazın performans testlerinde kolorimetrik analizler içerisinde yaygın olarak kullanılan glukoz ve protein analizleri model olarak seçilmiştir. Bu iki kolorimetrik analiz, konvansiyonel spektrofotometre ile eşzamanlı olarak gerçekleştirilmiş ve LED-tabanlı cihazın performansı belirlenmiştir. LED-tabanlı cihazda tayin limiti değerleri glukoz analizi için 1.25 mM glukoz, protein analizi için 0.084 mg/mL protein olarak saptanmıştır. Konvansiyonel spektrofotometrede elde edilen tayin limiti değerleri sırasıyla 0.70 mM glukoz ve 0.101 mg/mL protein olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen optoelektronik cihazın maliyet ve performans açısından konvansiyonel cihaza önemli bir alternatif olabileceği görülmüş, model analizlerde kullanılabilirliği diğer analizlere de uygulanabilirliğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Gıda bileşeni, Glukoz, Protein, Optoelektronik, Kolorimetrik analiz

Development of a Low-cost Colorimetric Measurement Device for Food Component Analysis and Determination of its Performance: A Model Study for Glucose and Protein Assays

ABSTRACT

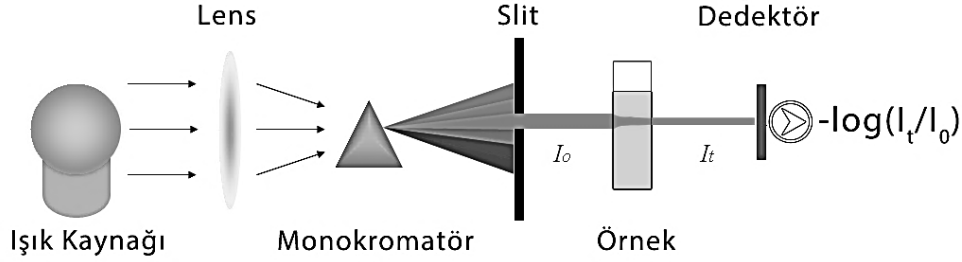
Reliable determination of food components and contaminants is a crucial necessity for a modern society. Moreover, Current food industry demands in-situ and rapid methods with low analysis and investment costs. In this study, a portable and low-cost LED-based optoelectronic device was developed as an alternative to conventional spectrophotometric methods. The performance of a LED-based device was determined by performing two common colorimetric assays as a model, namely glucose and protein. These two colorimetric assays were performed simultaneously with a conventional spectrophotometer, and the analytical performance of a LED-based device was determined. Limit of detection (LOD) values of the LED-based analysis were 1.25 mM for glucose and 0.084 mg/mL for protein determinations. LOD values of a conventional spectrophotometer were 0.70 mM glucose and 0.101 mg/mL protein. As a result, this low-cost optoelectronic device has a potential as a competitive and promising alternative to conventional spectrophotometers, and performance analysis on model assays indicates that it can be also used for assays other than glucose and protein.

Keywords: Food component, Glucose, Protein, Optoelectronic, Colorimetric assay

GİRİŞ

Spektrofotometrik analiz; başta klinik tanı olmak üzere gıda ve çevre analizlerinde kullanılan nitel ve nicel ölçüme olanak tanıyan dolaylı bir analiz yöntemidir. Söz konusu yöntem, molekül veya atomların yaydığı veya absorbladığı (soğurduğu) ışık miktarının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Ölçüm Beer-Lambert yasası olarak adlandırılan absorpsiyon yasasına uygun olarak gerçekleştirilmektedir. Beer-Lambert Yasası, ışığın örnek içinde kat ettiği yol ve analit derişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta ve nicel analizin temelini

oluşturmaktadır. Bu yasa uyarınca, analit ile etkileşen ışık demetinin şiddeti örnek içerisinde azalmaktadır. Işık şiddetindeki azalma analit derişimi ile doğru orantılı olarak gerçekleşmekte, böylece nicel analize olanak tanımaktadır [1]. Konvansiyonel anlamda, spektroskopik analiz spektrofotometre adı verilen cihazlar ile gerçekleştirilmektedir. Spektrofotometrik cihazlar beş ana kısımdan oluşmaktadır: (1) kararlı bir ışık kaynağı (2) dalga boyu seçici, (3) numune kabı, (4) ışık dedektörü (ışık enerjisini ölçülebilir sinyale dönüştürür) ve (5) sinyal işleyici (Şekil 1).



Şekil 1. Konvansiyonel spektrofotometrenin bileşenleri (I_0 : örneğe ulaşan ışığın şiddeti, I_t : detektöre ulaşan ışığın şiddeti, $-\log(I_t/I_0)$: absorbans değeri)

Şekil 1'de şematik olarak gösterilen bileşenler içerisinde işlevselliği ve maliyeti açısından en önemli kısım, hedef analitin soğurduğu dalga boyu aralığında ışığın elde edilmesine olanak tanıyan dalga boyu seçicidir. Dalga boyu seçici, geniş spektrumlu (polikromatik) kararlı ışık kaynağından gelen ışın demetini bir prizma yardımıyla sınırlı sayıda dalga boyunda (dar bantlı) ışın ihtiva eden ışığa dönüştüren cihaz veya düzeneklerdir.

Spektrofotometrik analiz açısından bakıldığında, her bir analiz yöntemi belirli bir dalga boyunda gerçekleştirilmekte ve hedef analitin absorbladığı dalga boyundaki ışığın şiddetindeki azalma ile nicel analiz yapılmaktadır. Bu noktada hedef analite özel düşük maliyetli, taşınabilir cihazların geliştirilmesi için belirli bir bant genişliğinde kararlı ve devamlı ışın demeti oluşturan, yarıiletken teknoloji ile geliştirilmiş olan Işık Yayan Diyotların (Light Emitting Diodes, LED) kullanılması önemli avantajlar yaratmaktadır. Işık yayan diyotların kullanılması ile ışık kaynağı maliyetinin azaltılmasının yanı sıra dalga boyu seçici gibi maliyeti oldukça yüksek düzeneklere olan gereksinim de ortadan kalkmaktadır. Böylece oldukça basit bir düzeneğe sahip ölçüm cihazının geliştirilmesi mümkün olabilmektedir. Bunlara ek olarak, LED ışık kaynakları yüksek verimleri, uzun ömürleri ve düşük maliyetli olmaları açısından son yıllarda oldukça popülerdir ve gelecek vaat etmektedirler.

Yapılan literatür incelenmesinde, LED tabanlı spektrofotometrelerin geliştirilmesi açısından sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmaların pek çoğunda ışık kaynağı olarak kullanılan LED'e ek olarak ikinci bir LED, fotodiyot veya diğer bir deyişle dedektör olarak kullanılmıştır. O'Toole ve arkadaşları, biri ışık kaynağı diğeri dedektör olarak kullanılan iki farklı LED içeren bir sistem geliştirmişler ve kolorimetrik akış analizi ile bromkresol yeşili varlığında spektrofotometrik

titrasyon yapmışlardır [2]. Benzer şekilde, Lau ve arkadaşları bromkresol yeşili indikatörü ile performans testi gerçekleştirmişlerdir [3]. Model çözeltiler ile gerçekleştirilen çalışmalara ek olarak, hemoglobin analizi [4], serum alkalın fosfotaz aktivite tayini [5] ve pestisit miktarı ve asetil kolin esteraz aktivitesi [6] üzerine çalışmalar rapor edilmiştir. İkinci LED'in dedektör amacıyla kullanılması maliyetin düşürülmesi açısından faydalı olsa da ışık kaynağı olarak tasarlanmış olan LED'ler ışık sensörü olarak kullanıldığında kararlı ve yüksek performans gösterememektedirler. Bu noktada, dedektör olarak ışık-frekans dönüştürücülerin kullanılması önemli bir alternatif yaratmaktadır. Literatürde ışık-frekans dönüştürücülerin kullanıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır [7, 8]. Yeh ve arkadaşları, timol mavisi, bromkresol yeşili ve fenol kırmızısı gibi indikatörler ile performans testi gerçekleştirmişlerdir [7]. Diğer bir çalışmada ise glukoz analizi yapılarak performans karşılaştırılması yapılmıştır [8]. Performans testi kapsamında dört farklı glukoz derişimi için yüzde hata hesaplanmış ancak analitik olarak önem taşıyan tespit limiti değeri hakkında bilgi verilmemiştir.

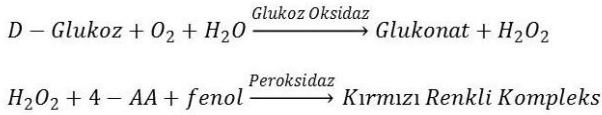
Bu çalışma kapsamında, konvansiyonel spektrofotometrelere alternatif olarak bir veya birkaç dalga boyunda ışık yayan diyotların ışın kaynağı olarak kullanıldığı LED tabanlı optoelektronik ölçüm cihazı endüstriyel işbirliği ve teknoloji transferi kapsamında geliştirilmiştir. Cihaz gıda analizleri ve klinik tanı açısından önemli bir yere sahip olan glukoz ve protein analizlerinin kolorimetrik olarak gerçekleştirilmesine olanak tanıyacak şekilde tasarlanmıştır. Bilindiği üzere kolorimetrik glukoz tayini nişasta (toplam nişasta/zedelenmiş nişasta/dirençli nişasta) ve disakkarit (laktöz/sukroz/maltoz) analizlerinin temelini oluşturmakta ve standart yöntemler (AACC, AOAC ve ICC gibi) arasında yer almaktadır. Kolorimetrik protein analizi ise

düşük maliyeti, uygulama kolaylığı ve yaygınlığı nedeniyle önem taşımaktadır. Glukoz ve protein analizleri, konvansiyonel bir spektrofotometre ve geliştirilen cihaz ile eşzamanlı olarak gerçekleştirilmiş, böylece cihazın spektrofotometre ile karşılaştırılması mümkün olmuştur. Sonuç olarak; geliştirilen optoelektronik ölçüm cihazı, düşük güç gereksinimi dolayısıyla taşınabilir olacağından yerinde (in-situ) analize olanak tanıyacaktır. Buna ek olarak, düşük yatırım maliyeti nedeniyle gelişmekte olan ekonomiler ve KOBİ'ler için önemli bir alternatif analiz yöntemi sunacağı düşünülmektedir.

MATERYAL ve METOT

D-Glukoz, sıvır serum albümin (BSA), glukoz oksidaz (*A. niger*), peroksidaz (yaban turbu), 4-aminoantipirin, fenol, coomassie brilliant blue protein analiz çözeltisi, sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edilmiş ve tüm çözeltiler MilliQ kalite deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

Glukoz analizi Trinder tarafından ortaya konulan ve iki aşamada gerçekleşen kolorimetrik reaksiyon ile yapılmıştır [9]. Yöntemin ilk aşaması; D-glukozun glukoz oksidaz enzimi katalizöründe O_2 ve H_2O varlığında oksitlenmesi sonucunda glukonat ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmasıdır. Oluşan H_2O_2 , ikinci aşamada peroksidaz enzimi katalizöründe 4-aminoantipirin (4-AA) ve fenol ile reaksiyona girerek 505 nm'de maksimum absorbans yapan kırmızı renkli bir kompleks (Quinoneimine) oluşturmaktadır (Şekil 2). Oluşan kırmızı renkli bileşiğin miktarı, glukoz miktarı ile doğru orantılıdır.

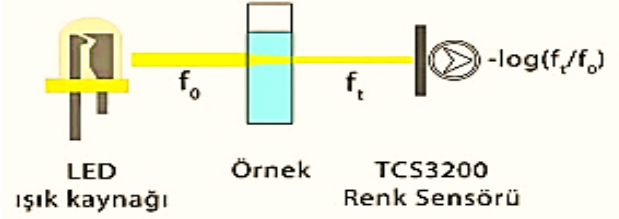


Şekil 2. Glukoz ölçümü reaksiyon mekanizması

Protein analizi, Bradford protein analiz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [10]. Yöntem kısaca; coomassie brilliant blue G-250 isimli boyanın proteinler ile etkileşimi sonucunda absorbans spektrumundaki kaymanın saptanması esasına dayanmaktadır. Asidik koşullarda kırmızı renkli olan boyanın rengi protein ile kompleks oluşturması sonucunda mavime dönüşmektedir ve 595 nm'de absorbans yapmaktadır. Artan protein miktarı ile 595 nm'deki absorbans değeri artmakta ve örnekte protein miktarı nicel olarak belirlenebilmektedir.

Optoelektronik sistem Hacettepe Teknokent A.Ş. bünyesinde faaliyet gösteren ARTEC İleri Araştırma Teknolojileri ve Ticaret Ltd. Şirketi ile birlikte yürütülen endüstriyel işbirliği çerçevesinde tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Sistem temelde ışık kaynağı olarak cyan ($\lambda_{max} = 500 \text{ nm}$) ve turuncu ($\lambda_{max} = 590 \text{ nm}$) LED'ler ve TCS3200 renk sensöründen oluşmaktadır (Şekil 3). Renk sensörü, ışık şiddetini frekansa dönüştürmekte ve kırmızı, yeşil, mavi ve nötral olmak üzere dört farklı

frekans değeri elde edilmektedir. Cihazın güç beslemesi ve veri aktarımı USB bağlantısı ile yapılmaktadır.



Şekil 3. LED tabanlı optoelektronik ölçüm cihazının bileşenleri (f_0 : örneğe ulaşan ışığın frekansı, f_t : detektöre ulaşan ışığın frekansı, $-\log(f_t/f_0)$: absorbans eşdeğeri)

Glukoz analizi cyan LED, protein analizi ise turuncu LED aktif iken gerçekleştirilmiş, böylece dalga boyu seçici kullanılmasına gerek kalmamıştır. Fotodetektör tarafından üretilen kırmızı kanala ait frekans değerleri glukoz analizi, mavi kanala ait frekans değerleri de protein analizi için kullanılmıştır. Örneklerdeki analit miktarının artması, absorblanan ışığın miktarını arttırmakta böylece ilgili kanaldaki frekans değerinde azalma olmaktadır. Bu durum spektroskopik analiz temel olgusu transmittans (geçirgenlik) kavramı ile tamamen aynı olup, nicel analize olanak tanımaktadır.

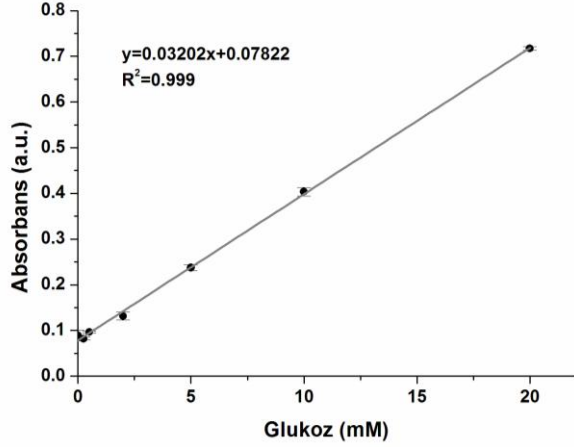
Performans Testleri: Optoelektronik sistem ile yapılan glukoz ve protein analizleri eş zamanlı olarak konvansiyonel spektrofotometre ile gerçekleştirilmiş ve cihazın performansı incelenmiştir. Bu amaçla Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies, Santa Clara, California) kullanılarak glukoz analizi 505 nm'de, protein analizi de 595 nm'de absorbans ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

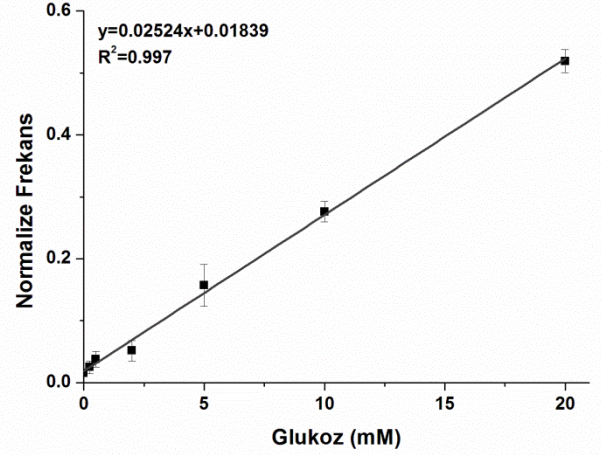
Glukoz Analizi

Trinder tarafından önerilen enzimatik glukoz analiz yöntemi [9] kullanılarak glukoz analizi gerçekleştirilmiştir. Ölçümler konvansiyonel spektrofotometre ve LED tabanlı ölçüm cihazı ile eşzamanlı olarak yapılmıştır. Konvansiyonel spektrofotometre ile elde edilen glukoz kalibrasyon grafiği Şekil 4'te verilmektedir. Grafik 0.25 mM ve 20 mM glukoz derişim aralığında doğrusaldır ve R^2 değeri 0.999 olarak hesaplanmıştır. Konvansiyonel spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilen glukoz analizinin tespit limiti 0.70 mM glukoz olarak saptanmıştır.

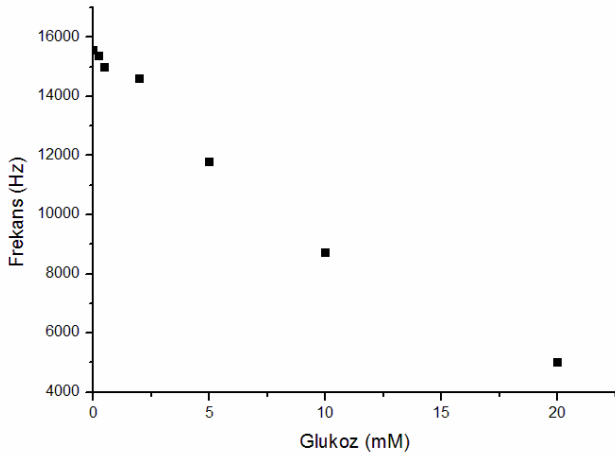
LED tabanlı ölçüm cihazı ile kullanılarak glukoz örneklerinde yapılan eşzamanlı okuma sonucunda ışığın frekansının artan glukoz derişimi ile azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 5). Elde edilen frekans değerleri, glukoz içermeyen kontrol örneğinde elde edilen frekans değerine bölünmüş ve eksi logaritması hesaplanmıştır. Hesaplanan değer normalize frekans değeri olarak adlandırılmıştır. Normalize frekans değeri, absorbans eşdeğeri olarak kullanılarak, glukoz derişimine karşı grafiğe geçirilmiş (Şekil 6) ve elde edilen glukoz kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.997 olarak hesaplanmıştır. Glukoz tespit limiti ise 1.25 mM olarak saptanmıştır.



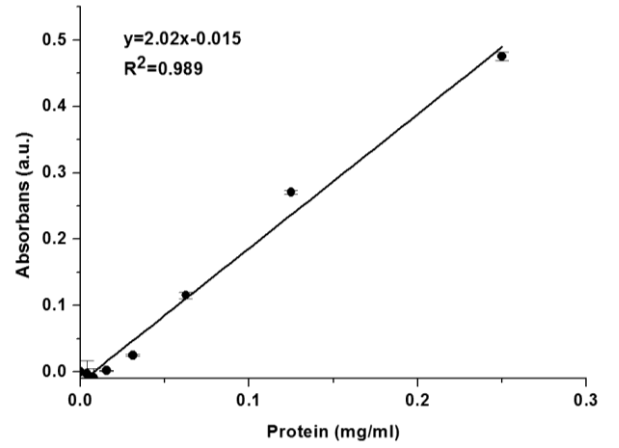
Şekil 4. Konvansiyonel spektrofotometre ile gerçekleştirilen glukoz analizi kalibrasyon grafiği (n=2)



Şekil 6. Glukoz derişimi – normalize frekans grafiği: LED tabanlı ölçüm cihazı ile elde edilen kalibrasyon grafiği (n=2)



Şekil 5. Glukoz derişimi-frekans grafiği: artan glukoz ile ışığın frekansındaki azalma (n=2)

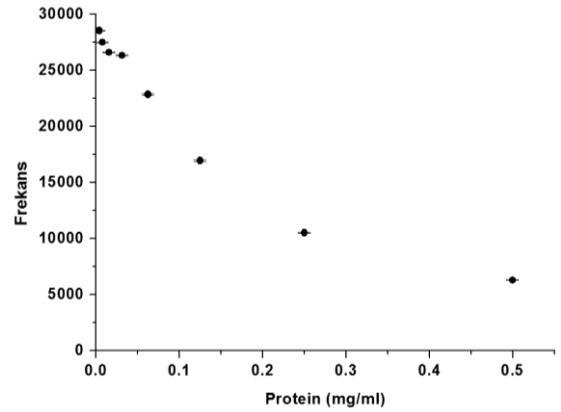


Şekil 7. Konvansiyonel spektrofotometre ile gerçekleştirilen protein analizi kalibrasyon grafiği (n=2)

Protein Analizi

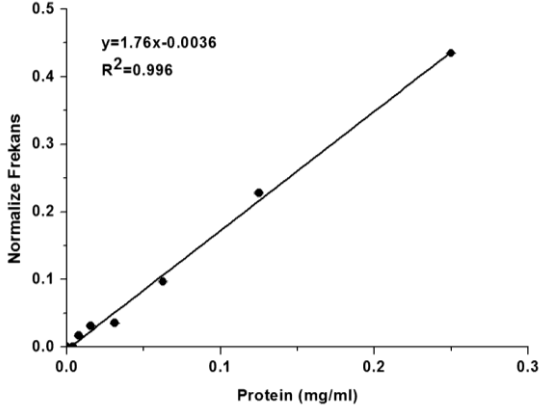
Konvansiyonel spektrofotometre ile elde edilen protein kalibrasyon grafiği Şekil 7'de verilmektedir. Analiz 0.004 mg/mL ve 0.5 mg/mL albümin derişimi aralığında gerçekleştirilmiş olup, grafik 0.25 mg/mL albümin derişimine kadar doğrusaldır ve R^2 değeri 0.989 olarak hesaplanmıştır. Konvansiyonel spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilen protein analizinin tespit limiti 0.101 mg/mL olarak saptanmıştır.

LED tabanlı ölçüm cihazı ile kullanılarak protein örneklerinde yapılan eşzamanlı okuma sonucunda ışığın frekansının artan albümin derişimi ile azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 8). Elde edilen frekans değerleri, protein içermeyen kontrol örneğinde elde edilen frekans değeri kullanılarak daha önce anlatıldığı gibi normalize frekans değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan normalize frekans değerleri, absorbans eşdeğeri olarak kullanılarak, albümin derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 9). Normalize frekans değeri ile elde edilen albümin kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.996 olarak hesaplanmıştır. Albümin tespit limiti ise 0.084 mg/mL olarak saptanmıştır.



Şekil 8. Protein derişimi-frekans grafiği: artan protein ile ışığın frekansındaki azalma (n=2)

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LED tabanlı ölçüm cihazının gıda bileşeni olan glukoz ve protein tayininde başarıyla kullanılabileceği gözlemlenmiştir. LED tabanlı ölçüm cihazı, yatırım maliyeti oldukça yüksek olan konvansiyonel spektrofotometre ile kıyaslandığında glukoz ve protein analizlerinde düşük maliyeti ve karmaşık olmayan yapısıyla rekabetçi bir performans göstermiştir.



Şekil 9. Protein derişimi – normalize frekans grafiği: LED tabanlı ölçüm cihazı ile elde edilen kalibrasyon grafiği (n=2)

Cihaz modüler ve basit yapıya bir yapıya sahiptir ve farklı dalga boylarında LED ışık kaynakları ile kolaylıkla konfigüre edilebilme potansiyeli taşımaktadır. Böylece, 400-700 nm dalga boyu aralığında ölçüm alınan kolorimetrik analizlerin tamamının bu cihazla gerçekleştirilmesi mümkün olabilecektir. Kolorimetrik analizlerin önemli bir kısmı enzimatik reaksiyonlar kullanılarak gerçekleştirildiği için geliştirilen cihazın konvansiyonel spektrofotometre karşısında dezavantaja sahip olması söz konusu değildir. Bilindiği üzere, kolorimetrik analizler dolaylı analiz yöntemleri sınıfına girmekte ve seçicilik enzimatik reaksiyonların kullanılması veya spesifik renkli komplekslerin oluşması ile sağlanmaktadır. Nişasta, laktoz, sukroz, maltoz, hidrojen peroksit, etanol, beta-galaktozidaz aktivitesi, alfa-amilaz aktivitesi ve peroksidad aktivitesi tayini gibi pek çok analiz glukoz tayin yöntemi ile aynı prensibe dayandığından 500-510 nm aralığında dalga boyunda ölçüm alınması gerekmektedir. Bunlara ek olarak, laktik asit ve malik asit gibi dehidrogenaz enzimlerinin substratlarının kolorimetrik olarak tayini 430-450 nm aralığında gerçekleştirilmektedir. Bu bilgiler doğrutusunda, geliştirilen cihazın konvansiyonel spektrofotometrelerde olduğu gibi geniş spektrumlu ışık kaynaklarına gereksinimi yoktur. Bu nedenlerden ötürü, cihaz kolorimetrik analizlerin gerçekleştirilmesi için önemli bir alternatif olabilecektir. Devam eden Ar-Ge çalışmalarını kapsamında cihazın performansında artışın ortaya konulması hedeflenmiş olup, güvenilir sonuç veren düşük maliyetli bir cihazın, öncelikli olarak ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması beklenmektedir.

SONUÇ

Geliştirilen LED tabanlı optoelektronik ölçüm cihazının, sıklıkla kullanılan glukoz ve protein analizlerinin yanı sıra diğer kolorimetrik analiz yöntemlerine de uyarlanması hedeflenmektedir. Böylece, düşük yatırım maliyeti ile KOBİ'ler ve gelişmekte olan ekonomiler için kolaylıkla temin edilebilir bir cihaz arz edilmiş olacaktır. Cihaz düşük maliyetine ek olarak taşınabilir olması sebebiyle, saha analizlerinde de kullanılabilme

potansiyeli taşıdığından, gerek süreç kontrolü gerekse de gıda kontrolü (kalite ve güvenlik) için önemli bir kullanım alanı bulacaktır. Günümüz gıda endüstrisi, otoriteler tarafından getirilen kısıtlamalar nedeniyle sürecin hızlı ve güvenilir bir şekilde takip edilmesi zorunluluğu ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu nedenle taşınabilir, düşük maliyetli ve güvenilir ölçüm cihazlarına olan gereksinim ve talep artmaktadır. Sonuç olarak geliştirilen cihaz, güvenilir analitik performans, düşük maliyet ve taşınabilirlik gibi özellikleri ile denetim otoritesi ve sektörün ihtiyaçlarını karşılayabilecek niteliktedir.

TEŞEKKÜR

Yazar, ARTEC İleri Araştırma Teknolojileri San. ve Tic. Ltd. Şirketi Teknik Müdürü ve Kurucu Ortağı olan Elektrik-Elektronik Yüksek Mühendisi Sayın Turan ŞENCİL'e katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gündüz, T. (2007). İnrümental Analiz. Gazi Kitabevi, Ankara.
- [2] Toole, M.O., Lau, K.T., Diamond, D. (2005). Photometric detection in flow analysis systems using integrated PEDDs. *Talanta*, 66, 1340-1344.
- [3] Lau, K.-T., Baldwin, S., O'toole, M., Shepherd, R., Yerazunis, W.J., Izuo, S., Ueyama, S., Diamond, D. (2006). A low-cost optical sensing device based on paired emitter-detector light emitting diodes. *Analytica Chimica Acta*, 557, 111-116.
- [4] Mieczkowska, E., Koncki, R., Tymecki, Ł. (2011). Hemoglobin determination with paired emitter detector diode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 3293-3297.
- [5] Strzelak, K., Koncki, R., Tymecki, Ł. (2012). Serum alkaline phosphatase assay with paired emitter detector diode. *Talanta*, 96, 127-131.
- [6] Bueno, D., Alonso, G., Muñoz, R., Marty, J.L. (2014). Low-cost and portable absorbance measuring system to carbamate and organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 203, 81-88.
- [7] Yeh, T.-S., Tseng, S.-S., 2006. A low cost LED based spectrometer. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53, 1067-1072.
- [8] Mohammad, K.A., Zekry, A., Abouelatta, M. (2015). LED Based Spectrophotometer can compete with conventional one. *International Journal of Engineering & Technology*, 4(2), 399-407.
- [9] Trinder, P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, 22(2), 158-161.
- [10] Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.