

Kağıt Tabanlı Kolorimetrik Yöntemle Askorbik Asit (Vitamin C) Tayini

Akif Göktuğ BOZKURT¹

¹Ardahan Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, 75002, Ardahan, Türkiye

e-posta: akifgoktugbozkurt@ardahan.edu.tr.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2954-2132>

Geliş Tarihi: 28.10.2021

Kabul Tarihi: 17.05.2022

Öz

Askorbik asit (AA), birçok yiyecek ve içeceklerde C vitamini olarak bilinen ve antioksidan özelliği olan en önemli suda çözünür organik biyomoleküldür. Gıdaların antioksidan özelliklerinin belirlenmesine yönelik geliştirilen farklı yöntemlerin sayısı giderek artmaktadır. Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (μ PAD'ler), son yıllarda hızlı, basit ve uygun maliyetli saha analizlerinin geliştirilmesinde uygulanmaktadır. Geliştirilen bu analizler, laboratuvar donanımlı kalitatif ve kantitatif analizlere alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında, askorbik asit tayini için kağıt tabanlı kolorimetrik bir yöntemin uygulaması yapılmıştır. Whatman filtre kağıtları üzerinde vaks kalem yardımıyla hidrofobik bariyerli geometrik şekiller oluşturulmuştur. Bu şekillerin içerisinde $AgNO_3$ çözeltisinin antioksidan varlığında indirgenmesi prensibi kullanılarak meydana gelen renk dönüşümlerinin görüntüleri akıllı telefon kamerası yardımıyla kaydedilmiştir. Standart AA çözeltilerinin konsantrasyonlarının tespiti için ImageJ yazılımı, görüntü işleme prosesinde kullanılmıştır. 0,2 ile 1,0 mM aralığında AA konsantrasyonları için doğrusal kalibrasyon eğrileri gri ölçek ve RGB (Kırmızı-Yeşil-Mavi) değerlerinde elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin determinasyon katsayısı (R^2) sırasıyla; gri ölçek için 0,9389, Kırmızı, Yeşil ve Mavi kanallar için 0,9728, 0,9628 ve 0,8859 olarak hesaplanmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) standart bir yöntem olarak kağıt tabanlı yöntem ile karşılaştırmak için kullanılmıştır. Gerçek gıda örneğinde askorbik asit tayini için taze sıkılmış portakal suları kullanılmıştır. HPLC yöntemiyle kolorimetrik yöntem sonucu portakal sularında belirlenen askorbik asit değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler

Antioksidan aktivitesi;
Askorbik asit; Kağıt tabanlı analizler;
Görüntü işleme

Determination of Ascorbic Acid (Vitamin C) with Paper Based Colorimetric Method

Abstract

Ascorbic acid (AA) is the most important water-soluble organic biomolecule with antioxidant properties, known as vitamin C in many foods and beverages. The number of different methods developed for the determination of antioxidant properties of foods is increasing. Paper-based microfluidic analytical devices (μ PADs) have been applied in the development of fast, simple, and cost-effective field analyzes in recent years. These developed analyzes are used as an alternative to laboratory-equipped qualitative and quantitative analyzes. In this study, a paper-based colorimetric method was applied for the determination of ascorbic acid. Geometric shapes with hydrophobic barrier were created on Whatman filter papers with the help of a wax pen. Using the principle of reduction of the $AgNO_3$ solution in the presence of antioxidants in these shapes, the images of the color transformations were recorded with the help of a smartphone camera. ImageJ software was used in the image processing to determine the concentrations of standard AA solutions. Linear calibration curves for AA concentrations in the 0,2 to 1,0 mM range were obtained in grayscale and RGB (Red-Green-Blue) values. The coefficient of determination of the calibration curves (R^2), respectively; 0,9389 for grayscale, 0,9728, 0,9628, and 0,8859 for Red, Green, and Blue channels. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used as a standard method to compare with the paper-based method. Freshly squeezed orange juice was used for the determination of ascorbic acid in the real food sample. The ascorbic acid value determined in orange juices by HPLC and colorimetric methods were statistically compared.

Keywords

Antioxidant activity;
Ascorbic acid; Paper based assays; Image processing

1. Giriş

İnsan sağlığı açısından; antioksidanların belirlenen miktarlarının düzenli olarak tüketilmesi sonucunda; reaktif oksijen gruplarının yol açabileceği pek çok

nörolojik, kardiyovasküler, kanser ve diyabetik hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu belirtilmektedir (Maritim *et al.* 2003). Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak iki ana grupta toplanmıştır. Enzimatik antioksidanlara;

endojen katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) örnek olarak gösterilebilir (Jeeva *et al.* 2015). Enzimatik olmayan antioksidanlar birçok besinsel kaynaktan elde edilebilmekte olup en yaygın olarak bulunanları polifenolik bileşiklerdir. Diğer örnekleri ise; vitaminler (A,E,C), karotenoidler, organosülfür ve minerallerdir (Ratnam *et al.* 2006).

Vitamin C olarak da bilinen askorbik asit (AA), oksidanlar ve serbest radikaller ile reaksiyona girerek onları sönmülendiren önemli bir antioksidandır. Gıdalarda doğal olarak bulunur ve esas kaynağı ağırlıklı olarak meyve ve sebzelerden oluşmaktadır (Carr and Vissers 2013). Demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığı, oksijen, ışık, ezme, kesme, doğrama, yıkama, pişirme veya konserve işlemleri gıdalarda AA'da önemli kayıplara neden olur. Askorbik asidin, enfeksiyon, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, göz, kemik, deri ve üreme hastalıkları mücadelesinde rol aldığı ve olumlu etkileri bilinmektedir (Uğur *et al.* 2020). İnsan vücudu L-askorbik asidi sentezleyememektedir ve dışarıdan alınması elzemdir (Lykkesfeldt and Tveden-Nyborg 2019). Gıdalarda AA içeriğinin belirlenmesine yönelik; spektrofotometrik, elektrokimyasal ve kromatografik analizlerin de içerisinde olduğu farklı yöntemler geliştirilmiştir (Dennison *et al.* 1981, Washko *et al.* 1989, Washko *et al.* 1992, Lykkesfeldt *et al.* 1995, Güçlü *et al.* 2005, Kapur *et al.* 2012, Pisoschi *et al.* 2014).

Laboratuvar ortamlarında yapılan analizler; kurulum maliyetleri, uzman personel ihtiyacı, analizler için gereken kimyasal sarfının fazlalığı ve depolama koşulları, pahalı analiz enstrüman ve cihazların gerekliliği gibi pek çok maliyetli bileşeni bir arada içermektedir. Gıda, tıbbi, kimyasal ve biyolojik analizler için alınan numunelerin laboratuvar ortamında analizi için buldukları yerden taşınmaları, fazla miktarda alınmaları gerekliliği gibi durumlar yapılacak analizlerin sürelerini artırmakta ve uygulanabilirliklerini zorlaştırmaktadır (Pinchuk *et al.* 2012). Son zamanlarda, taşınabilir analiz platformlarının geliştirilmesine yönelik artan seviyede bir ilgi oluşmuştur. Fonksiyonel olarak bir

araya getirilmiş sıralı laboratuvar işlemlerini tek bir taşıyıcı üzerinden laboratuvar dışında ve sahada uygulanabilir hale getiren bu platformlar aynı zamanda; düşük kimyasal kullanımı, dışarıdan enerji kaynağına ihtiyaç duymaması ve uzmanlık gerektirmeden hızlı ve hassas analiz sonuçlarının alınmasını sağlamışlardır (Whitesides 2006, Hawkins and Weigl 2010, Hu *et al.* 2014).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) gelişmekte olan ülkeler için öngördüğü analitik teşhis ve tanı yöntemlerinin; düşük maliyetli, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve tekrarlanabilir, ekipman gerektirmeyen ve son kullanıcıya sonuç verebilir (ASSURED) olması beklenmektedir (Mabey *et al.* 2004). Bu özelliklere sahip kağıt üzerine hidrofobik bariyerlere sahip hidrofilik kanallar ile oluşturulan platformlara kağıt tabanlı mikroakışkan analitik sistemler (μ PADs) denilmektedir. μ PADs; taşınabilirlikleri, düşük maliyetli olmaları ve kolay uygulanabilirlikleri sayesinde az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler açısından analizin saha koşullarında hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını sağlamaktadırlar (Martinez *et al.* 2010). Kağıt tabanlı mikroakış sistemler, laboratuvarlardaki karmaşık ve pahalı analiz yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilirler. Gıda, içecek ve sulardaki patojen ve toksinlerin belirlenmesinde etkili ve hızlı sonuçlar alınabilir. Bu sayede üreticiler ve tüketiciler olası tehditlere karşı önceden önlemlerini alabildikleri gibi, olumsuz durumlarda sorumlu merciler de geç olmadan uyarılmış olurlar (Busa *et al.* 2016, Hua *et al.* 2018).

Gıdalarda ve içeceklerde bulunan askorbik asit miktarının insan sağlığı, gıda güvenliği ve kalitesi açısından yüksek hassasiyetle analiz edilmesi kritik öneme sahiptir. Bundan dolayı çabuk tüketilmesi gereken veya raf ömrü kısa olan gıda maddelerinde hızlı ve maliyeti düşük analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasına yönelik yapılan çalışmaların sayısı son zamanlarda artış göstermiştir. Bu çalışma kapsamında; düşük maliyetli, hızlı ve hassas, laboratuvar ve enstrüman kullanımı gerektirmeden saha analizlerinde kullanılacak, kağıt tabanlı analitik sistem üzerinden askorbik asit tayini için bir yöntem geliştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Sodyum Hidroksit (NaOH), Fosforik asit (H₃PO₄), 2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat (MES), Bromkresol yeşili, gümüş nitrat (AgNO₃), L-Askorbik asit, saf etanol (ACS reagent) Sigma-Aldrich (Merck) firmasından, Whatman 1, Whatman 4, Whatman 5, Whatman 40, Whatman 41, Whatman 42, Whatman 44 numaralı filtre kağıtları Whatman® markasından temin edilmiştir. Bütün çözeltiler ultra saf su (18 MΩ.cm) ile hazırlanıp kullanılmıştır.

MES tamponu (0,05 M, pH 6,5) 2-morfolinoetanesulfonik asit mono hidrat ile hazırlanmış olup pH'sı derişik NaOH ile ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler 0,45'lik mikrofiltreden geçirilerek yabancı maddelerden ve istenmeyen safsızlıklardan arındırılarak kullanılmıştır.

2.1 Kağıt Tabanlı Kolorimetrik Yöntem

Geliştirilecek olan kağıt tabanlı kolorimetrik yöntem için Whatman filtre kağıtları kullanılmıştır. Bu amaçla Whatman 1, Whatman 4, Whatman 5, Whatman 40, Whatman 41, Whatman 42, Whatman 44 numaralı yedi farklı filtre kağıdı kullanılarak üzerlerine hidrofobik daire ve kare şekiller çizilmiştir. Dairelerin çapları 10 mm ve 18 mm olacak şekilde, karelerin ise bir kenar uzunluğu 10 mm olacak şekilde vaks kalemiyle çizimler yapılmıştır. Kağıt üzerine oluşturulacak hidrofobik bariyerli geometrik şekillerin farklı çap ve kenar uzunluklarında ıslanabilirlik ve kapiler etkileri incelenmiştir.

Hidrofobik bariyerlerin oluşturulmasında vaks kalemi ve Sharipe® China markör kalemler kullanılmıştır. Her bir kağıt 100 °C'de 1 dakika boyunca ısıtıcı plakada bekletilmiştir. Bu sayede yüzeyde oluşturulan hidrofobik bariyerlerin kağıt kesit kalınlığında daha derin katmanlara nüfuz etmesi sağlanmıştır.

Kağıt üzerine hazırlanan çözeltiler 20 µl olarak damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Görüntü işleme ve renk analizleri için ImageJ programı kullanılmıştır. Bu programlarda görüntüleri alınan kağıt yüzeylerdeki analitik hücrelerin renk

dönüşümü sonucu RGB ve Gri ölçek (Grayscale) değerleri elde edilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Her reaksiyon hücresi tanımlanırken üç paralel çalışılacak şekilde üretilmiştir. Renk analizleri için her hücrede üç tekrarlı çalışılmış ve ortalama değeri alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır.

2.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi

Askorbik asidin belirlenmesinde referans yöntem olarak HPLC cihazı kullanılmıştır. Standart askorbik asit çözeltileri 0,2-1,0 Mm konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Kromatografi koşulları olarak Ultra Aqueous C-18 250 mm X 4,6 mm X 5µm kolonu ve sıcaklığı 25 °C, 1 ml/dak. Akış hızı, 10 µl enjeksiyon hacmi, PDA dedektör 245 nm'de ölçüm yapacak şekilde ayarlanmıştır. İzokrotik sistemde hareketli faz olarak %0,1 formik asit sulu çözeltisi kullanılmıştır (de Quirós *et al.* 2009). Elde edilen kromatogramlardan "Shimadzu LC Solution" programı kullanılarak askorbik asidin kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Gerçek örnek denemeleri için taze sıkılmış portakal suyu kullanılmıştır. Hazırlanan portakal suları oda sıcaklığında kapalı ve ışık geçirmez bir ortamda kaba filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Elde edilen süzüntüde bulunan askorbik asit miktarları; kağıt tabanlı kolorimetrik yöntem ve HPLC yöntemi kullanılarak tespit edilmiş ve sonuçları karşılaştırılmıştır.

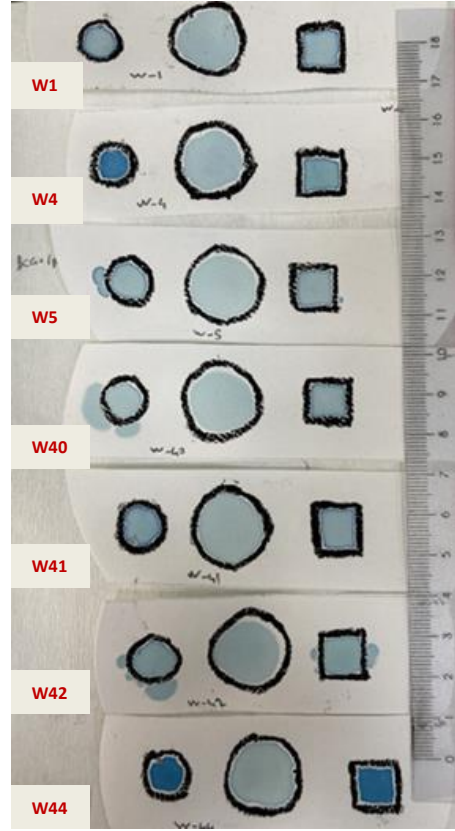
Çizelge 1. Whatman filtre kağıtlarının fiziksel özellikleri

Filtre Sınıfı	Şekil ve Boyutları	Teknik Özellikleri
Whatman 1	Dairesel Çap: 110 mm	Parçacık tutma: 11µm Kesit Kalınlık: 180 µm Birim Ağırlık: 87 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 150s/100 mL
Whatman 4	Dairesel Çap: 90 mm	Parçacık tutma: 25 µm Kesit Kalınlık: 210 µm Birim Ağırlık: 92 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 37s/100 mL
Whatman 5	Dairesel Çap: 110 mm	Parçacık tutma: 2,5 µm Kesit Kalınlık: 200 µm Birim Ağırlık: 100 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 1420s/100 mL
Whatman 40	Dairesel Çap: 110 mm	Parçacık tutma: 2,5 µm Kesit Kalınlık: 200 µm Birim Ağırlık: 100 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 1420s/100 mL

Whatman 41	Dairesel Çap: 90 mm	Parçacık tutma: 20-25 µm Kesit Kalınlık: 220 µm Birim Ağırlık: 85 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 54s/100 mL
Whatman 42	Dairesel Çap: 90 mm	Parçacık tutma: 2,5 µm Kesit Kalınlık: 200 µm Birim Ağırlık: 100 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 1870s/100 mL
Whatman 44	Dairesel Çap: 90 mm	Parçacık tutma: 3 µm Kesit Kalınlık: 180 µm Birim Ağırlık: 80 g/m ² Süzme-Ayırma Hızı: 975s/100 mL

3. Bulgular ve Tartışma

Askorbik asit miktarının tayini için gerekli olan kağıt tabanlı sistem için Whatman Filtre kağıtları kullanılmıştır. Filtre kağıtlarına ait teknik özellikler Çizelge 1.'de gösterilmiştir. Tabloda gösterilen yedi farklı Whatman filtre kağıdına, vaks kalemleri kullanılarak üzerlerine hidrofobik desenler oluşturulmuştur. Farklı derecelerdeki filtre kağıtlarına daire ve kare şekiller çizilmiştir. Dairelerin çapları 10 mm ve 18 mm olacak şekilde, karelerin ise bir kenar uzunluğu 10 mm olacak şekilde yedi farklı Whatman filtre kağıdına vaks kalemiyle çizilmiştir. Her bir kağıt 100 °C'de 1 dakika boyunca ısıtıcı plakada bekletilmiştir. Bu sayede yüzeyde oluşturulan hidrofobik bariyerlerin kağıt kesit kalınlığında daha derin katmanlara nüfuz etmesi sağlanmıştır. Bu sayede analit olarak kullanılacak çözeltilerin ve örneklerin kağıdın belirlenen alanı içerisinde yayılmaları ve hidrofobik bariyerin dışına taşmaması sağlanır. Hazırlanan filtre kağıtlarına daha önceden hazırlanmış olan 1 mM bromkresol yeşili indikatörü 20 µl damlatılarak, kağıtların hidrofobik bariyer oluşturma ve sıvı yayılma-ayırma etkinliği karşılaştırılmıştır. Yedi farklı Whatman filtre kağıdına oluşturulan desenler ve bromkresol yeşili indikatörünün yayılması Şekil 1.'de gösterilmiştir.

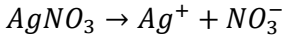


Şekil 1. Whatman filtre kağıtları üzerinde hidrofobik bariyerli geometrik şekillerin oluşturulması ve test edilmesi (Yukarıdan aşağıya sıralı No;1,4,5,40,41,42,44)

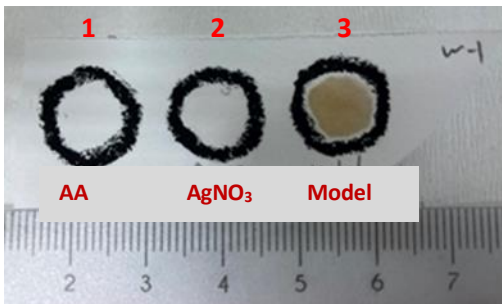
Whatman 5, 40, 42 filtre kağıtlarında oluşturulan hidrofobik bariyerlerin 10 mm çaplı dairesel şekillerde sızıntı yaptıkları görülmektedir. Bu durum analit kaybına ve reaksiyonun istenen hücrede gerçekleşmeden dışarı sızarak renk dönüşümüne dayalı ölçümlerde hataya sebep olacaktır. Sızıntının gözlemlendiği filtre kağıtlarının fiziksel özellikleri incelendiğinde kağıt kesit kalınlığı, birim ağırlıklarının yüksek ve süzme-ayırma hızlarının ise düşük olduğu ve bu sebeple yeterli vaksın kağıdın gözeneklerini dolduramamasından dolayı bromkresol yeşili çözeltilerinin bariyerlerin dışına sızma yaptığı düşünülmektedir. Whatman 4 filtre kağıdı kesit kalınlığı yüksek olmasına rağmen sızıntı olmadan; ayırma-süzme hızının 37s/100mL ile en yüksek filtre kağıdı olmasından dolayı; eriyen vaksın gözenekleri doldurarak hidrofobik bariyer oluşturabildiği gözlenmiştir. 10 mm çapa sahip dairesel şekilde, reaksiyona girecek analitlerin seyrelmesi önleneyeceği, düşük hacimlerde çalışılabileceği ve birim alanda daha fazla miktarda etken maddenin bulunmasını sağlayacağı için seçilmiştir. Sızıntı yapmayan filtre kağıtları

içerisinden Whatman 1 filtre kağıdı; ucuz, kolay bulunabilirliği ve uygulamalarda iyi performans gösterdiği için seçilerek bundan sonraki denemelerde kullanılmıştır.

Elektron transferine (ET) dayalı reaksiyon modeli geliştirilen kağıt tabanlı analitik yöntemde kullanılmak için seçilmiştir. Elektron transferi için $AgNO_3$ çözeltisi hazırlanarak burada bulunan Ag^+ iyonlarının antioksidan varlığında indirgenmesi sonucu yüksüz Ag atomlarının oluşması prensibinden yararlanılmıştır. Denklem (1)'de gösterilen elektron transferinde, çözelti halinde oksidatif radikal olarak davranan Ag^+ iyonları askorbik asit tarafından indirgenerek bulunduğu ortamında kolloidal gümüş nanoparçacıklar oluşturmaktadır. Bu sırada renksiz olan $AgNO_3$ çözeltisi indirgenen gümüş iyonları sayısına göre açık sarıdan koyu gri-sarı renklere dönüşmektedir.



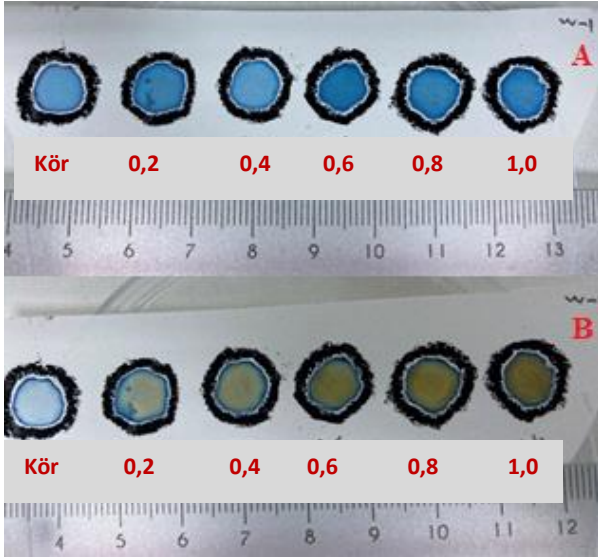
Geliştirilen yöntemde renk dönüşümünün antioksidan olarak askorbik asit ve radikal olarak Ag^+ iyonlarından gerçekleştiğini test etmek için bir deney düzeneği oluşturulmuştur. Şekil 2.'de hidrofobik bariyerli 10 mm çapındaki dairesel test hücrelerinden ilk hücreye sadece 1 mM askorbik asit çözeltisi, ikinci hücreye 10 mM $AgNO_3$ 20 µl olacak şekilde damlatılmıştır. Başlangıçta her iki çözelti de berrak ve renksizdir. Üçüncü test hücresinde ise $AgNO_3$ üzerine askorbik asit çözeltisi damlatılmış ve renk dönüşümü 1 dakika içerisinde gerçekleşmiştir.



Şekil 2. Renk dönüşümünün radikal+antioksidan varlığında gerçekleşmesi, 1) askorbik asit 2) gümüş nitrat 3) askorbik asit+gümüş nitrat

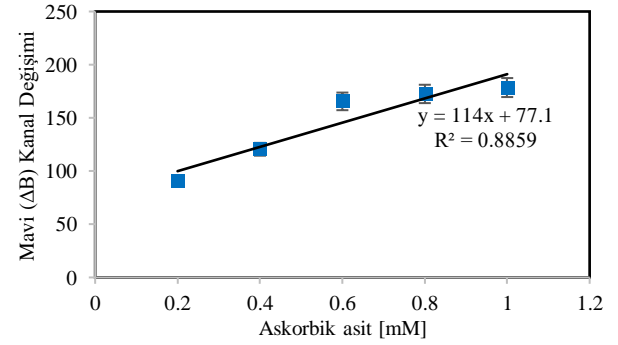
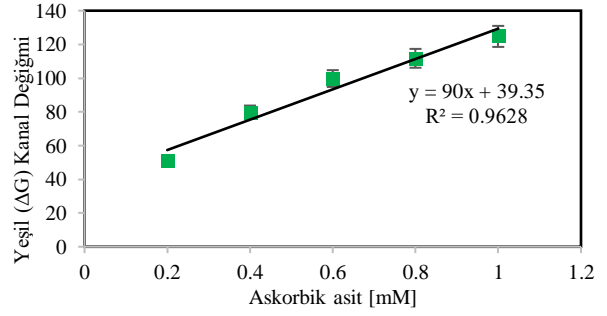
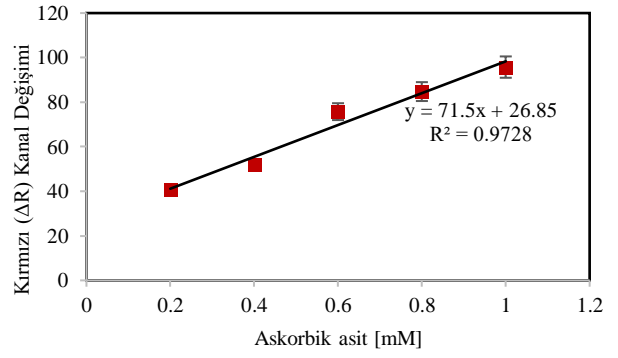
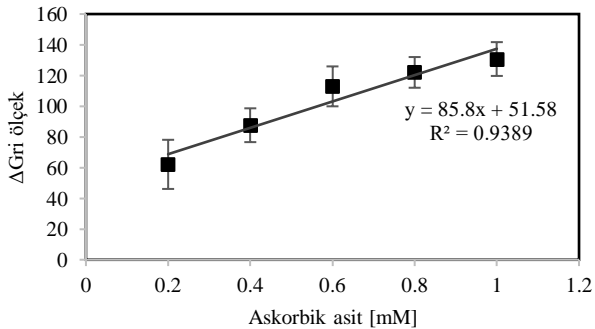
$AgNO_3$ çözeltisi saydam ve berraktır, sabit konsantrasyon olarak 10 mM belirlenmiştir. Çalışılan konsantrasyon aralığında elektron transferini gerçekleştirdiğinde askorbik asitten daha fazla sayıda Ag^+ iyonunun bulunması sınırlayıcı etkinin ortadan kalkması için gerekmektedir. $AgNO_3$ çözeltisinden, Whatman 1 filtre kağıdında hazırlanan 10 mm çapındaki 6 dairesel hücreye 20 µl damlatılmıştır. Kuruması beklendikten sonra ise 1 mM bromkresol yeşili aynı hacimde hücreler içerisine damlatılarak kuruması beklenmiştir. Bromkresol yeşili indikatörü bu yöntemde 50 mM MES tamponunda pH 6,5 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bromkresol yeşilinin bu yöntemde kullanılması hem renk dönüşümünün başlangıcı ile olan farkını görsel ve sayısal olarak daha iyi hesaplanmasına katkı sağlamak hem de tamponlama yaparak pH dönüşümlerinde seçici olarak görev almasını sağlamaktır. Radikal üzerinden indirgeme gerçekleşmediğinde ve ortamda pH dönüşümü olduğunda hatalı pozitif değerlerin görsel olarak kolayca tespit edilmesi sağlanmıştır.

Askorbik asidin 0,2-1,0 mM arası derişimleri hazırlanarak 20 µl kör hariç her bir hücreye damlatılmıştır. Kör olarak belirlenen hücreye saf su damlatılmıştır. Şekil 3.'de Whatman 1 filtre kağıdının askorbik asit damlatılmadan öncesindeki ve sonrasındaki görüntüsü verilmiştir. Antioksidan olarak kullanılan askorbik asidin Ag^+ radikalini indirgemesi sonucu gümüş nanoparçacıkların oluşmasıyla karakteristik sarı-gri renk dönüşümü gerçekleşmiştir. Şekil 3A'da Bromokresol yeşili damlatılarak hazırlanmış test hücrelerindeki RGB ve Gri ölçek değerleri başlangıç değeri olarak ölçülmüştür. Kör olarak ayrılan test hücresine Şekil 3B'de sadece saf su damlatılmıştır. Diğer test hücrelerine ise belirtilen konsantrasyonlarda model askorbik asit çözeltisi damlatılarak son oluşan renk değerleri ölçülerek kaydedilmiş ve ilk değerlerinden çıkarılmıştır. Bu sayede her test hücresi içerisindeki reaksiyona bağlı elde edilen renk dönüşümü değerleri dış faktörlerden oluşacak (zemin rengi, dış ortam ışık şiddeti, kamera uzaklığı vb.) hata paylarını minimize etmektedir.



Şekil 3. A) Askorbik asit damlatılmadan önce B) Askorbik asit damlatıldıktan sonra, renk değişimleri

Hidrofobik bariyerli hücrelerde 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen renk dönüşümleri 12 MP, f/1.8 diyafram özellikli sabit akıllı telefon kamerasıyla görüntülenmiştir. Görüntüler gün ışığında ilave bir ışık kaynağı kullanılmadan alınmıştır. Ölçümlerde ilave bir parça, aygıt ve eklenti kullanılmamasına özen gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisi hesaplamalarında kullanılacak görüntülerin günün aynı saatlerinde telefon kamerasının aynı açı ve uzaklıkta alınmasına özen gösterilmiştir. Bunu sağlamak için kağıt şeritlerin yanına ölçek olarak bir cetvel yerleştirilmiştir. Açık kaynak kodlu bir yazılım olan ImageJ programı kullanılarak elde edilen görüntülerin Gri ölçek (Grayscale) ve RGB (Kırmızı-Yeşil-Mavi) değerleri sayısal olarak işlenmiştir. Şekil 4'de askorbik asidin farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen sayısal değerlere ait kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir;

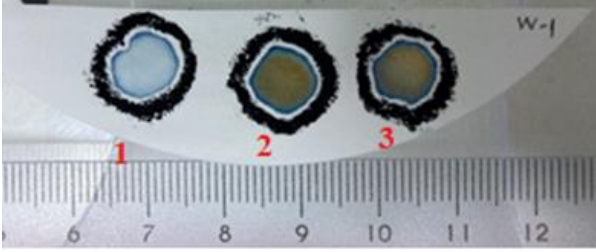


Şekil 4. Askorbik asit derişimlerine karşılık A) Gri ölçek B) Kırmızı (ΔR), C) Yeşil (ΔG), D) Mavi (ΔB) renk değerlerine ait kalibrasyon eğrileri

Gri ölçek, Kırmızı, Yeşil ve Mavi renk kodlarına karşılık gelen değerlere ait grafiklerin R² değerleri sırasıyla; 0,9389, 0,9728, 0,9628 ve 0,8859 olarak bulunmuştur. Renk kodları üzerinden elde edilen sonuçlara göre en iyi R² değeri Kırmızı renk kodundan elde edilmiştir.

Gerçek örnek denemeleri için taze sıkılmış portakal suyu hava ve ışık geçirmez kapalı kaptaki muhafaza edilerek kullanılmıştır. Karanlık ortamda portakal suyunun pulbu filtre kağıdından geçirelerek serum kısmından ayrılmıştır. Filtre kağıdının altında toplanan süzüntüden alınarak 1:10 oranında ultra saf suyla seyreltilerek denemelerde kullanılmıştır. Hidrofobik reaksiyon hücrelerinde renk dönüşümü sonrası örnek içerisinde askorbik asit miktarının analizi; elde edilen R*G*B* ve Gri ölçeklendirme

kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapılmıştır. Şekil 5.'de gerçek örnek olarak hazırlanan portakal suyunda askorbik asit tayini için kullanılan filtre kağıdı gösterilmiştir. İlk hücre kör deneme, ikinci hücre konsantrasyonu bilinen (1 mM) standart askorbik asit çözeltisi, son hücre ise gerçek örnekteki askorbik asit tayini için kullanılmıştır.



Şekil 5. Portakal suyunda yapılan antioksidan aktivitesi tayini; 1) Kör, 2) 1 mM askorbik asit 3) 1:10 seyreltilmiş portakal suyu

ImageJ programı kullanılarak yapılan renk analizleri sonucunda 1:10 seyreltilmiş portakal suyunda bulunan askorbik asit miktarları hesaplanmıştır. Renk kodları için elde edilen kalibrasyon eğrileri ve fonksiyonları kullanılarak Kırmızı için (ΔR) 0,394 mM, Yeşil için (ΔG) 0,403 mM, Mavi için (ΔB) 0,541 mM ve Gri ölçeklendirme kullanılarak yapılan hesaplamada 0,442 mM askorbik asit konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Referans bir ölçüm yöntemi olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC); model askorbik asit çözeltilerinin derişimlerinin belirlenmesinde ve gerçek örnek olarak kullanılan

portakal suyundaki askorbik asit derişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır. Portakal suyunun kağıt tabanlı geliştirilen analitik yöntemde örnek hazırlama işlemleri HPLC numunesi hazırlamak içinde kullanılmış ve yapılan ölçüm sonrası 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyunun askorbik asit derişimi 0,372 mM olarak bulunmuştur. Portakal suyunun örnek olarak hazırlanması sırasında kaybedilen askorbik asit miktarının belirlenmesi için bilinen konsantrasyondaki (1 mM) askorbik asit filtre işlemi öncesi portakal suyuna eklenmiş ve bu şekilde HPLC ölçümleri için numuneler hazırlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda askorbik asit eklenmiş portakal suyu örneğinde askorbik asidin derişimi 0,42 mM olarak bulunmuştur. Elde edilen bu verilere göre, portakal suyundaki askorbik asidin belirlenmesine yönelik yaptığımız örnek hazırlama prosedürümüzün geri kazanım (recovery) oranının % 50 olduğu görülmektedir. Çizelge 2.'de gün içi ve günler arası portakal suyuna eklenen askorbik asidin geri kazanım değerleri ve rölatif standart hataları (RSD) hesaplanmıştır. Portakal suyuna 1 mM eklenen askorbik asit filtre kağıdından süzöldükten sonra 1:10 oranında seyreltilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında test hücrelerine damlatılan portakal sularında eklenmiş olan askorbik asidin son derişimi 0,1 mM'dır.

Kağıt tabanlı renk dönüşümüne dayalı yöntemden elde edilen sonuçların, referans olarak belirlenen HPLC sonuçlarıyla karşılaştırılmasına Çizelge 3.'de yer verilmiştir.

Çizelge 2. Görüntü işleme sonucunda askorbik asit için elde edilen geri kazanım değerleri

Eklenen AA 0,1 [Mm]	Gün İçi	Hesaplanan Ort. AA [mM]	%RSD	Eklenen AA 0,1 [Mm]	Günler Arası	Hesaplanan Ort. AA [mM]	%RSD
R	1	0,048	6,88	R	1	0,048	4,73
	1	0,049			2	0,052	
	1	0,054			3	0,048	
G	1	0,052	2,59	G	1	0,056	3,07
	1	0,051			2	0,053	
	1	0,053			3	0,053	
B	1	0,043	3,89	B	1	0,040	10,10
	1	0,041			2	0,042	
	1	0,040			3	0,049	

Gri Ölçek	1	0,059	6,13	Gri Ölçek	1	0,053	6,59
	1	0,053			2	0,060	
	1	0,054			3	0,053	

%RSD= (Standart hata/ Ortalama konsantrasyon)*100; Gün içi ve Günler arası ölçümlerde RGB ve Gri ölçek analizlerinde

Çizelge 3. Görüntü işleme ve HPLC yöntemleri sonucunda askorbik asit için elde edilen analitik ve istatistik değerleri

	Gri Ölçek	(ΔR) Kırmızı	(ΔG) Yeşil	(ΔB) Mavi	HPLC
Determinasyon Katsayısı (R ²)	0,939	0,973	0,963	0,886	0,996
Tespit Limiti (LOD) [mM]	0,115	0,092	0,092	0,130	0,015
Tayin Limiti (LOQ) [mM]	0,349	0,280	0,278	0,395	0,046
Portakal Suyunda AA [mM] ±(Standart hata) N=4	0,442±0,043	0,394±0,033	0,403±0,019	0,541±0,011	0,372±0,007
t Testi α=0.05 (%95 Güven aralığında)	T _{tablo} = 1,943	T _{tablo} = 1,943	T _{tablo} = 1,943	T _{tablo} = 1,943	Referans metot olarak karşılaştırılmıştır
Serbestlik derecesi (df)= 6	T _{hesaplanan} =3,035	T _{hesaplanan} =3,112	T _{hesaplanan} =6,115	T _{hesaplanan} =4,463	
F testi α=0.05 (%95 Güven aralığında)	F _{Tablo} = 9,277	F _{Tablo} = 9,277	F _{Tablo} = 9,277	F _{Tablo} = 9,277	Referans metot olarak karşılaştırılmıştır
Serbestlik derecesi (df)= 3	F _{Hesap} =20,167	F _{Hesap} =20,997	F _{Hesap} =6,821*	F _{Hesap} =2,429*	

Kağıt tabanlı renk dönüşümüne dayalı yöntemden elde edilen sonuçları, referans olarak kullanılan HPLC sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; Tespit limit değerleri (LOD) Kırmızı için (ΔR) 0,092 mM, Yeşil için (ΔG) 0,092 mM, Mavi için (ΔB) 0,130 mM ve Gri ölçeklendirme için 0,115 mM olarak bulunmuştur. Tayin limit değerleri (LOQ) Kırmızı için (ΔR) 0,280 mM, Yeşil için (ΔG) 0,278 mM, Mavi için (ΔB) 0,395 mM ve Gri ölçeklendirme için 0,349 mM olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen analiz modelinin referans olarak alınan HPLC analiz sonuçlarıyla kıyaslanması için F ve t

testleri yapılmıştır. Çizelge 3'de F testi için n=4 örnekleme her bir renk değerinin (ΔR, ΔG, ΔB ve Gri ölçek) F değeri hesaplanmıştır. Tablo değeri F için 9,277 olarak bulunmuştur. Yapılan hesaplamalara göre ΔG ve ΔB için bulunan F değeri tablo değerinden küçük olduğu için HPLC metodu ile standart hataların karşılaştırılmasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. T testi HPLC metodu sonucu elde edilen portakal suyundaki askorbik asit konsantrasyonları ve geliştirilen kağıt tabanlı sistemde renk dönüşümü sonucu elde edilen ΔR, ΔG, ΔB ve Gri ölçek değerlerine ait portakal suyundaki askorbik asit konsantrasyonlarının ortalamalarında

istatistiksel olarak bir farkın olup olmadığını karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Yapılan istatistik analizi sonucu edilen ΔR , ΔG , ΔB ve Gri ölçek değerleri $T_{\text{hesaplanan}} > T_{\text{tablo}}$ olarak elde edildiğinden HPLC metoduyla karşılaştırıldıklarında portakal suyunda bulunan askorbik asidin konsantrasyonlarının tespitinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir.

4. Sonuç

Kağıt tabanlı analiz sistemimizi hızlı, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli hale getirebilmek için, laboratuvar ortamında kullanılması gereken veya sahada ölçüm için pahalı taşınabilir aletlere ihtiyaç duymadan yapılabilecek şekilde tasarlanmıştır. Sistemimizin bileşenleri; uygun bir filtre kağıdı, ölçümlerin yapılmasını sağlayacak hidrofobik bariyerli bir geometrik şekil-desen, önceden hazırlanıp kağıt üzerine damlatılmış reaktif çözeltilerdir. Bu yöntemin bir maliyet hesabı çıkarıldığında; kullanılan Whatman 1 filtre kağıdının 100 adeti 114 TL, vaks kalemleri 10-20 TL arasındadır. Test için kullanılacak tek bir hücrenin yapım maliyeti 10 kuruştan daha azdır. Ölçümü yapılmak istenen antioksidanın bulunduğu maddeden 1 damla sıvının reaksiyonun gerçekleşeceği hücreye damlatılmasıyla 1 dakikalık bir süre içerisinde test tamamlanmış olmaktadır. Bu testin yapılmasında her hangi bir uzmanlık veya tecrübeye ihtiyaç olmaması geliştirilen yöntemin geniş bir sahada uygulanabilmesine olanak sağlamaktadır. Gıdalarda askorbik asidin belirlenmesi amacıyla geliştirilen kağıt tabanlı analitik yöntemimizde, elde edilen renk dönüşümlerinin işlenmesi için bir kamera ve yazılım gerekmektedir.

Günümüzde akıllı telefonların yaygınlaşmasıyla kullanıcılarına yönelik sağlık, spor, beslenme, gıda alanlarında bir çok uygulama geliştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirdiğimiz yöntemin sahada sadece akıllı bir telefon uygulaması yardımıyla analizi yapılan maddenin içeriğinde bulunan hedef analitin tespitine yönelik modifiye etme imkanı vardır.

Teşekkür

Bu çalışma Ardahan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından BAP 2018-027 No'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

5. Kaynaklar

- Busa, L. S. A., S. Mohammadi, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani and M. Tokeshi 2016. Advances in Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Food and Water Analysis. *Micromachines* **7**(5), 86.
- Carr, A. C. and M. C. M. Vissers 2013. Synthetic or Food-Derived Vitamin C-Are They Equally Bioavailable? *Nutrients* **5**(11), 4284-4304.
- de Quirós, A. Rodríguez-Bernaldo, M Fernández-Arias, and J López-Hernández 2009. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food chemistry* **116**(2), 509-512.
- Dennison, D. B., T. G. Brawley and G. L. Hunter 1981. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid and combined ascorbic acid-dehydroascorbic acid in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**(5), 927-929.
- Güçlü, K., K. Sözen, E. Tütem, M. Özyürek and R. Apak 2005. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta* **65**(5), 1226-1232.
- Hawkins, K. R. and B. H. Weigl 2010. Microfluidic diagnostics for low-resource settings. *Microfluidics, bioMEMs, and medical microsystems VIII*, International Society for Optics and Photonics.
- Hu, J., S. Q. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. Lu and F. Xu 2014. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics* **54**, 585-597.
- Hua, M. Z., S. M. Li, S. Wang and X. N. Lu 2018. Detecting Chemical Hazards in Foods Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (PADs): The Real-World Application. *Micromachines* **9**(1).
- Jeeva, J. S., J. Sunitha, R. Ananthalakshmi, S. Rajkumari, M. Ramesh and R. Krishnan 2015. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* **7**(Suppl 2), S331-S333.
- Kapur, A., A. Hasković, A. Čopra-Janićijević, L. Klepo, A. Topčagić, I. Tahirović and E. Sofić 2012. Spectrophotometric analysis of total ascorbic acid content in various fruits and vegetables. *Bulletin of*

the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina **38**(4), 39-42.

Lykkesfeldt, J., S. Loft and H. E. Poulsen 1995. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection-are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Analytical biochemistry* **229**(2), 329-335.

Lykkesfeldt, J. and P. Tveden-Nyborg 2019. The Pharmacokinetics of Vitamin C. *Nutrients* **11**(10).

Mabey, D., R. W. Peeling, A. Ustianowski and M. D. Perkins 2004. Diagnostics for the developing world. *Nature Reviews Microbiology* **2**(3), 231-240.

Maritim, A. C., R. A. Sanders and J. B. Watkins, 3rd 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* **17**(1), 24-38.

Martinez, A. W., S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho 2010. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry* **82**(1), 3-10.

Pinchuk, I., H. Shoval, Y. Dotan and D. Lichtenberg 2012. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids* **165**(6), 638-647.

Pisoschi, A. M., A. Pop, A. I. Serban and C. Fafaneata 2014. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta* **121**, 443-460.

Ratnam, D. V., D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana and M. N. Kumar 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* **113**(3), 189-207.

Uğur, H., S. Eker, J. Çatak and M. Yaman 2020. Vitamin C ve Hastalıklar Üzerine Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* **19**(19), 746-756.

Washko, P. W., W. O. Hartzell and M. Levine 1989. Ascorbic acid analysis using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Analytical biochemistry* **181**(2), 276-282.

Washko, P. W., R. W. Welch, K. R. Dhariwal, Y. Wang and M. Levine 1992. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples. *Analytical biochemistry* **204**(1), 1-14.

Whitesides, G. M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**(7101), 368-373.