ISSN: 2821-157X | htpps://www.jasd.khadu.ir

Journal of Aerospace Defense
Volume 3, Issue 2
Summer
P.P. 119-148

Research Paper;

Design and development of a simple colorimetric biosensor based on a new commercially available dye for the determination of the amino acids arginine and glutathione with potential for defense applications

Hossein Tavallali 1 Aghdas Papari Moghaddam 2 Abolfath Parhami 3 Mohammad Ali Karimi 4

Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran ۱

۲Ph.D. Student, Payame Noor University, Tehran, Iran.

۳Assistant Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.

4 Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran

Article Information

Accepted:
2024/05/15
Recceived:
2024/10/10

Keywords:

Colorimetric Biochemosensor, Neutral red, Arginine, Glutathione

Corresponding Author :

Abstract

In this research, the design and development of Neutral Red (NHR), a commercial dye that is available with high purity, is reported as a colorimetric biosensor for the sequential identification of two amino acids, arginine (Arg) and glutathione (GSH). This method was used without the need for complex and expensive equipment and without using enzymatic methods to determine these two amino acids.

With the gradual increase of arginine, the absorption spectrum of the receiver decreased at 529 nm and increased at 454 nm, and the color of the solution changed from red to yellow. Further, by adding glutathione to the neutral red-arginine (NRH-Arg) complex, an increase in absorption at 529 nm and a decrease in absorption at 454 nm were observed, and the color of the solution changed from yellow to red.

In this study, the linear range for arginine and glutathione is 1.20-91.61 µmol/L and 243.11-605.49 µmol/L, respectively, and their correlation coefficient is 0.9945-0.9942, respectively. Also, the detection limit of the method is 0.61 and 25.32 µmol/L and, the relative deviation for arginine at two concentrations of 10.0 and 50.0 µmol/L, was 1.17% and 98% respectively, and for glutathione at two concentrations of 370.0 and 564.0 µmol/L it was 1.20% and 1.08 respectively. Finally, this method successfully identified and measured arginine in the blood serum samples of military barracks soldiers.

Aelaei, Mohammad; Sharafi, Ahmad and Zhaleh, Daniyal and Adavi, Hayat Allah.(2024). Design and development of a simple colorimetric biosensor based on a new commercially available dye for the determination of the amino acids arginine and glutathione with potential for defense applications. *Journal of Aerospace Defense*, Vol3(Issue2), Page 64-96

ISSN: 2821-157X | htpps://www.jasd.khadu.ir

فصلنامه علمی دفاع هوافضایی

دورهٔ ۳، شمارهٔ ۲

تابستان

صص ۱۴۸-۱۱۹

مقاله پژوهشی؛

طراحی و توسعه بیوحسگرشیمیایی رنگ سنجی ساده بر پایه رنگ تجاری دردسترس جدید برای تعیین آمینو اسیدهای آرژنین و گلوتاتیون با قابلیت کاربردهای دفاعی

حسین توللی[۱] اقدس پاپری مقدم[۲] ابوالفتح پرهامی[۳] محمدعلی کریمی[۴]

۱ استاد تمام، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲ دانشجوی دکتری، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳ استادیار، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۴-استاد تمام، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت:
۱۴۰۳/۰۲/۲۶
تاریخ پذیرش:
۱۴۰۳/۰۷/۱۹

کلیدواژه‌ها:
بیوحسگر شیمیایی رنگ سنجی، نوترال رد، آرژنین، گلوتاتیون

نویسنده مسئول:

ایمیل:

چکیده

در این پژوهش طراحی و توسعه نوترال رد (NHR) یک رنگ تجاری که با خلوص بالا در دسترس است، به عنوان یک بیوحسگرشیمیایی رنگ سنجی به منظور شناسایی پی در پی دو آمینواسید آرژنین (Arg)و گلوتاتیون (GSH)گزارش می شود. این روش بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت و بدون استفاده از روش های آنزیمی برای تعیین این دو آمینو اسید استفاده شد. با افزایش تدریجی آرژنین طیف جذبی گیرنده در ۵۲۹ نانومتر کاهش و در ۴۵۴ نانومتر افزایش یافت و تغییر رنگ محلول از قرمز به زرد دیده شد. در ادامه با افزایش گلوتاتیون به کمپلکس نوترال رد –آرژنین (NRH-Arg) افزایش جذب در ۵۲۹ نانومتر و کاهش جذب در ۴۵۴ نانومتر مشاهده شد و تغییر رنگ محلول از زرد به قرمز دیده شد. در این پژوهش محدوده خطی برای آرژنین و گلوتاتیون به ترتیب ۶۱/۹۱ –۱/۲۰ میکرومولار و ۶۰۵/۴۹–۲۴۳/۱۱ میکرومولار و ضریب همبستگی آنها به ترتیب ۰/۹۹۴۵ ۰/۹۹۴۲ می‌باشد. همچنین حد تشخیص روش ۰/۶۱ و ۲۵/۳۲ میکرومولار و انحراف نسبی برای آرژنین در دو غلظت ۱۰/۰ و ۵۰/۰ میکرومول بر لیتر به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۱۷ درصد و برای گلوتاتیون در دو غلظت ۳۷۰/۰ و ۵۶۴/۰ میکرومول بر لیتر به ترتیب ۱/۲۰ و ۱/۰۸ درصد بدست آمد. در نهایت این روش شناسایی و اندازه گیری آرژنین در نمونه های سرم خون سربازان پادگان نظامی را با موفقیت انجام داد.

استناد: (۱۴۰۳). طراحی و توسعه بیوحسگرشیمیایی رنگ سنجی ساده بر پایه رنگ تجاری دردسترس جدید برای تعیین آمینو اسیدهای آرژنین و گلوتاتیون و کاربردهای آن برای اندازه‌گیری در سرم خون سربازان پادگان نظامی .*دفاع هوافضایی*، دوره۳ (شماره۲)، ۱۱۹-۱۴۸.

۱– مقدمه

حدود ۵۰۰ اسیدآمینه (AA) در طبیعت وجود دارد، اما تنها ۲۰ اسید آمینه پروتئوژن[1] هستند، یعنی بلوک‌های سازنده پپتیدها/پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند[۱] به استثنای گلیسین[2]، این اسیدهای آمینه به دلیل وجود اتم آلفا کربن آنها در مرکز استریو چهار وجهی[3] مولکول‌های کایرال هستند. بنابراین، AAها می‌توانند به دو شکل استریوایزومری وجود داشته باشند: اشکال L و D. اگر گروه α-NH_2 به سمت چپ پیش بینی شود، اسید آمینه دارای پیکربندی L مطلق است و اگر گروه α-NH_2 به سمت راست برآمده شود، اسید آمینه دارای پیکربندی D است [۲]. بیشترین اهمیت تغذیه ای AA به عنوان ایزومرهای L وجود دارد. پروتئین‌های طبیعی منحصرا از LAA ساخته شده‌اند. بدن نمی‌تواند از ویتامین‌ها یا مواد معدنی به تنهایی استفاده کند. آنزیم‌ها، هورمون‌ها، بافت‌های بدن، حتی استخوان‌ها از AA با ترکیب ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل می‌شوند [۳]. ویتامین‌ها و مواد معدنی نمی‌توانند این عملکرد را بدون AAهای آزاد برای ایجاد اتصالات مورد نیاز انجام دهند. بنابراین AAها برای ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری هستند تا نقش خود را به درستی انجام دهند [۴]. AAهای آزاد نیز برای حفظ انتقال دهنده‌های عصبی مورد نیاز هستند، زیرا اینها برای تنظیم اسمزی سلول‌ها بسیار مهم هستند و به عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵]. تشخیص AAهای آزاد در اختلالات مغزی مختلف نیز بسیار مهم است. در واقع بدن انسان ۲۰ برابر بیشتر از ویتامین‌ها و حدود ۴ برابر بیشتر از مواد معدنی AA دارد.

یکی از این آنالیت‌های ضروری که شناسایی آن بسیار حائز اهمیت است اسید آمینه آرژنین است. تعیین مقدار این اسید آمینه در سیستم‌های بیولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار است. از سوی دیگر، آمینواسیدها اجزای اساسی پروتئین‌های ماکرومولکولی بیولوژیکی بوده و در پروسه‌های حیاتی نقش حساسی ایفا می‌کنند [۶]. آرژنین یک آمینواسید نیمه ضروری یا ضروری مشروط می‌باشد که نقش مهمی در سیستم‌های زنده‌ی گوناگون نظیر احیا سلولی، عملکردهای ایمنی و بازیابی پروتئین" دارد [۷]. شناسایی اسید آمینه آرژنین از این نظر حائز اهمیت است که این آمینواسید، جزء تشکیل دهنده‌ی پیش ماده‌ی مستقیم نیتریک اکساید (NO)، اوره ،آگماتین[4] و اورنیتین[5] می‌باشد [۸].

---

[1] -Proteogenic
[2] -Glycine
[3] -Tetrahedral stereo
[4] -Agmatine
[5] -Ornithine

گلوتاتیون[۱] یک ترکیب پروتئینی کوچک است که از سه اسید آمینه سیستئین[۲]، اسید گلوتامیک[۳] و گلیسین[۴] ساخته شده است. به دلیل استفاده از سه آمینو اسید در ساختار این پروتئین به آن تری پپتید هم می‌گویند [۹]. در این پروتئین، بین گروه آمینی اسید آمینه سیستئین که به‌طور معمول به اسید آمینه گلیسین متصل است با گروه کربوکسیل زنجیره اسید گلوتامیک یک پیوند پپتیدی غیرمعمول وجود دارد [۱۰]. این ماده به‌طور طبیعی در کبد انسان بر اثر ترکیب این سه اسید آمینه به وجود می‌آید. گلوتاتیون یک آنتی‌اکسیدان قوی است و باعث محافظت اجزای مهم سلولی در برابر واکنش با گروه‌های عاملی اکسیژن دار مانند رادیکال های آزاد و پراکسیدها می‌شود. ترکیبات سمی دارای رادیکال آزاد، معمولاً با گلوتاتیون ترکیب شده و از بدن خارج می‌شوند [۱۱]. باکتری ها، ویروس ها، تشعشعات، مسمومیت با فلزات سنگین، برخی داروها و حتی افزایش سن همگی می توانند باعث اکسیداسیون و متعاقباً تجمع رادیکال های آزاد در بدن شوند [۱۲]. گلوتاتیون نقش‌هایی را در سیستم عصبی ایفا می کند، از جمله حذف کننده رادیکال های آزاد، تعدیل کننده ردوکس فعالیت گیرنده یونوتروپیک و انتقال دهنده عصبی. گلوتاتیون در احیا (GSH) و اکسید شده (GSSG) وجود دارد. در سلول ها و بافت ها شکل می گیرد و غلظت گلوتاتیون از ۰/۵ تا ۱۰/۰ میلی مولار در سلول های حیوانی متغیر است. شکل کاهش یافته آن در سلول های سالم وجود دارد [۱۳]. یک شاخص حیاتی برای سلامت سلول نسبت GSH/GSSG است. برای انسان سالم، غلظت گلوتاتیون معمولاً از ۰/۶۸ تا ۲/۵۲ میلی مولار در خون و از ۲/۲۲ تا ۱۱/۳۶ میکرومولار در پلاسما متغیر است [۱۴].

انواع روش ها از جمله روش‌های رنگ سنجی آنزیمی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۵] (HPLC)، کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی[۶] (GCMS)، تشخیص فلوریمتری برای تعیین آمینواسیدها در دسترس هستند [۱۵]. برخی از روش‌های کروماتوگرافی زمانی که در معرض واکنش نین هیدرین قرار می‌گیرند بسیار اساسی و زمان بر هستند. AAها از نظر اسپکتروفتومتری قابل تشخیص نیستند، در حالی که جداسازی کایرال با روش‌های ساده کروماتوگرافی امکان پذیر نیست. روش‌های پیشرفته کروماتوگرافی حساس هستند اما وضوح

---

[1] - Glutathione
[2] - Cysteine
[3] - Glutamic acid
[4] - Glycine
[5] - High Performance Liquid Chromatography
[6] -Gas Chromatography-Mass Spectrometry

پایینی دارند. علاوه بر این، به دلیل مراحل متعدد مورد نیاز برای پاکسازی نمونه و مشتق‌سازی، اینها برای نمونه‌های با حجم کم بسیار دست و پا گیر هستند [۱۵].

پژوهشگران به دنبال روش‌هایی هستند که زمان پاسخ‌دهی کوتاه‌تر و آسانتر، در دسترس‌تر و مقرون به صرفه‌تر باشند. یکی از این روش‌ها حسگرهای شیمیایی است [۱۶]. بیشتر روش هایی که تا کنون برای شناسایی و اندازه گیری کاتیون ها، آنیون ها و آمینو اسیدها به کار گرفته شده اند، روش هایی با کاربرد دشوار و زمانبر بوده و با چشم غیرمسلح قابل مشاهده و تشخیص نمی باشند. از میان این روش ها، حسگرهای شیمیایی به دلیل سهولت کاربرد، گزینش پذیری و حساسیت بالا، زمان پاسخ دهی کوتاه، عدم نیاز به مراحل پیچیده‌ی آماده‌سازی نمونه و همچنین عدم نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و از همه مهم‌تر، قابلیت تشخیص با چشم غیر مسلح از برتری ویژه ای برخوردار می باشند [۱۷]. در این تحقیق، با استفاده از رنگ ها و لیگاندهایی که به راحتی قابل دسترسی می باشند، حسگرهای گزینش پذیری برای تشخیص و اندازه گیری کاتیون ها، آنیون ها و آمینو اسیدها پیشنهاد می گردد. این گیرنده ها با ایجاد برهمکنش با آنالیت، باعث ایجاد تغییراتی در گروه کروموفور شده و در نتیجه ی آن، تغییراتی در سیگنال خروجی ایجاد می شود، که این تغییرات (در زمان ایجاد تغییر در گروه کروموفور) با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده می باشند.

نوترال رد[1] یا قرمز تولوئیلن با فرمول شیمیایی $C_{15}H_{17}N_4$ یک ترکیب شیمیایی است که در حالت جامد پودر سبزرنگی است که در آب و الکل حل شده به رنگ قرمز تبدیل می‌شود [۱۸]. نوترال رد یک معرف اسید وباز است که در محدوده پی اچ ۸-۶ از آن استفاده می‌شود [۱۹]. از نوترال رد به عنوان یک رنگینه در مقاصد زیست شناختی استفاده می‌شود. واکنش این ماده در محیط‌های با pHهای مختلف به این صورت است که در محیط‌های کمتر از ۶/۸ به رنگ قرمز در آمده و در مقادیر بیش از ۸ به رنگ زرد ظاهر می‌شود و این واکنش‌ها و تغییر رنگ‌ها برگشت پذیر می‌باشد [۲۰]. نوترال رد، یک رنگ کاتیونی است که به طور گسترده به عنوان حسگر شیمیایی در کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار می گیرد [۲۱]. ویژگی‌های منحصر به فرد آن، آن را به یک ترکیب شیمیایی موثر و مفید برای تشخیص آنیون‌ها در محلول تبدیل می‌کند. هنگامی که نوترال رد با گونه-های آنیونی برهمکنش می‌کند، کمپلکس‌های جفت یونی را تشکیل می‌دهد که منجر به تغییر در خواص نوری، جذب یا طیف فلورسانس می‌شود [۲۲]. خواص نوری و طیف‌سنجی

[1] - Neutral red

نوترال رد به توسعه حسگرهای شیمیایی حساس و انتخابی جدید برای پایش آلودگی محیطی و تعیین کمیت آنیون‌های مضر در آب و خاک کمک می‌کند [۲۳].

در این تحقیق از روش بسیار ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و با تکرار پذیری خوب برای شناسایی آرژنین و گلوتاتیون استفاده‌شده‌است. حسگرهای شیمیایی رنگزا که تاکنون طراحی شده‌اند بیشتر سنتزی بوده و سنتز آنها دشوار است اما نوترال رد یک شناساگر رنگی حساس به فلز، با خلوص بالا و در دسترس است. این تحقیق پژوهشی است بر گسترش حسگرهای رنگزا که با کمک دید چشمی قابل شناسایی و ارزیابی می‌باشند و می توان اطلاعات کیفی را بسیار سریع دریافت نمود و اندازه‌گیری کمی را انجام داد. محدوده خطی برای آرژنین و گلوتاتیون به ترتیب ۶۱/۹۱ –۱/۲۰ میکرومولار و ۱۱۵/۴۹– ۲۴۳/۶۰۵ میکرومولار و ضریب همبستگی آنها به ترتیب ۰/۹۹۴۵ ۰/۹۹۴۲ می‌باشد. همچنین حد تشخیص روش ۰/۶۱ و ۲۵/۳۲ میکرومولار و انحراف نسبی برای آرژنین در دو غلظت ۱۰/۰ و ۵۰/۰ میکرومول برلیتر به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۱۷ درصد و برای گلوتاتیون در دو غلظت ۳۷۰/۰ و ۵۶۴/۰ میکرو مول بر لیتر به ترتیب ۱/۲۰ و ۱/۰۸ درصد بدست آمد. در نهایت از این روش شناسایی و اندازه گیری آرژنین در نمونه های سرم خون سربازان پادگان نظامی شیراز صورت گرفت.

۱–۱ پیشینه تحقیق

۱–۱–۱– تکنیک های تجزیه ای به منظور شناسایی آرژنین :

- در سال ۲۰۱۸ سولداتکینا[1] و همکارانش یک بیوحسگر هدایت سنجی جدید مبتنی بر اوره آز و آرژیناز متحرک برای تعیین آرژنین در داروسازی ارائه کردند. بیوحسگر توسعه یافته برای اندازه گیری غلظت آرژنین در برخی داروها استفاده شده است [۲۴].
- در سال ۲۰۱۹ خوش سرور و همکارانش یک حسگر شیمیایی رنگ سنجی و فلورسنت جدید مبتنی بر تیازول برای تشخیص آرژنین را طراحی و توسعه دادند. در میان اسیدهای آمینه مختلف، تنها اسید آمینه آرژنین یک تغییر رنگ بصری و یک تغییر باتوکرومیک در طیف UV-Vis در چند ثانیه به دلیل تبدیل بار بین گروه آزو حسگر و گروه گوانیدینو آرژنین نشان داد. حسگر دارای محدوده تشخیص

[1] - Soldatkina

خطی گسترده، محدودیت تشخیص کم، گزینش پذیری بالا و زمان پاسخ سریع برای تشخیص آرژنین در شرایط آزمایشی است [۲۵].

- در سال ۲۰۲۰ پان[1] و همکارانش یک حسگر شیمیایی جدید از نوع بیس H_3L را سنتز و ارائه دادند. در این پژوهش مشخص شد که مولکول حسگر می تواند به طور انتخابی Cu^{2+} را تشخیص دهد و $L\text{-}Cu^{2+}$ آن به تشخیص آنیون S^{2-}، آرژنین و لیزین زمانی که در حلال اتانول حل می شود بسیار حساس است. این شناسایی با استفاده از تغییرات رنگ و تغییرات در طیف جذبی حسگر است. حسگر H_3L را می توان برای شناسایی آرژنین و لیزین با گزینش پذیری و حساسیت بالا در محدوده pH فیزیولوژیکی قابل قبول بکار برد [۲۶].
- در سال ۲۰۲۱ می[2] و همکارانش یک کاوشگر فلورسنت را برای تشخیص حساس دوپامین[3]، لیزین و آرژنین توسعه دادند. این حسگر فلورسانس با دو پیک انتشار در ۴۹۵ و ۵۷۵ نانومتر تحت یک طول موج تک تحریکی ۳۹۵ نانومتر ارائه می‌شود. فلورسانس این حسگر توسط دوپامین خاموش می‌شود و تنها به طور موثر توسط لیزین و آرژنین بازیابی می‌شود. مکانیسم این شناسایی از طریق اتصال کووالانسی نقاط کربن فلورسنت سبز مایل به زرد با نقاط کوانتومی فلورسنت نارنجی–قرمز است [۲۷].
- در سال ۲۰۲۲ یو[4] و همکارانش یک کاوشگر فلورسنت مبتنی بر ۱،۱–بی–۲نفتول[5] سنتز شده است و به طور شیمیایی به آرژنین پاسخ می دهد تا در عرض یک دقیقه افزایش فلورسانس قوی ایجاد کند. کاوشگر می تواند غلظت آرژنین را در یک گستره بزرگ از ۱۰ میکرومولار تا ۵ میلی مولار گزارش کند. تابش اشعه ماوراء بنفش یک روش کیفی برای تشخیص آنالیت فراهم می کند [۲۸].
- در سال ۲۰۲۳ تواللی و همکارانش کمپلکس فلزی مخلوط لیگاندها (دایتیزون کاتیون کبالت(II) و آلیزارین رد) را به عنوان یک گیرنده رنگ سنجی به منظور شناسایی اسید آمینه آرژنین ارائه دادند. این گیرنده بر اساس مخلوط لیگاندها طراحی شده است و گزینش پذیری و حساسیت بسیار بالایی دارند. [۲۹].

---

[1] -Pan
[2] -Mi
[3]- Dopamine
[4] -Yu
[5] -1,1 bi-2-naphthol

- در سال ۲۰۲۴ سارکار[1] و همکارانش شناسایی مولکولی ال-آرژنین بر روی ال-لیزین توسط روش نورتابی Zn^{II} عاملدار شده با α-هیدروکسی اسید[2] از محیط آبی و سایر سیالات زیستی را ارائه دادند. در این پژوهش MOF به عنوان یک داربست عاملی منحصر به فرد برای نظارت فوق حساس ال-آرژنین بر ال-لیزین و سایر اسیدهای آمینه از محیط آبی خالص نشان می‌دهد. [۳۰].

۱-۱-۲- برخی از تکنیک های تجزیه ای به منظور شناسایی گلوتاتیون:

- در سال ۲۰۱۸ چن[3] و همکارانش یک حسگر فلورسانی و رنگ سنجی مبتنی بر رودامین برای تشخیص گلوتاتیون ایجاد کردند. [۳۱].
- در سال ۲۰۱۹ وو[4] و همکارانش یک حسگر بصری برای سنجش گلوتاتیون با هیدروژل فلورسنت پاسخگو به محرک طراحی کردند. توافق رضایت‌بخش بین نتایج حسگر و HPLC برای سنجش قرص نشان‌دهنده توانایی حسگرهای نوع دماسنج برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های واقعی است. این یافته‌ها سودمندی هیدروژل هوشمند پاسخ‌دهنده به محرک و مناسب بودن طراحی حسگر بصری به سبک دماسنج را برای سنجش‌های کمی ثابت کرد [۳۲].
- در سال ۲۰۲۰ جنگی و همکارانش یک روش رنگ سنجی انتخابی و حساس چند نانوآنزیمی جدید برای تشخیص گلوتاتیون با استفاده از پلیمر ایندامین[5] ارائه دادند [۳۳].
- در سال ۲۰۲۱ جلیلی و همکارانش چارچوب فلزی آلی محصور شده با نقطه کربن دو رنگ را برای تشخیص نسبت سنجی گلوتاتیون با روش فلورسانی و رنگ سنجی ارائه دادند. [۳۴].
- در سال ۲۰۲۲ هونگ و همکارانش از نانوذرات طلای محافظت‌شده تک‌لایه که دارای به‌عنوان نانوگیرنده‌های خود سازمان‌یافته استفاده کردند. نسبت GSH/GSSG (گلوتاتیون دی سولفید) را می توان از طریق پاسخ فلورسانس به صورت کمی تجزیه و تحلیل کرد [۳۵].

---

[1] - Sarkar
[2] -α-Hydroxy
[3] -Chen
[4] -Wu
[5] - Indamine

- در سال ۲۰۲۲ توللی و همکارانش طراحی جدید لیگاندهای متعدد برای حسگر شیمیایی رنگ سنجی فوق حساس گلوتاتیون در نمونه پلاسما را ارائه دادند. این پژوهش با استفاده از یک مخلوط دوتایی ساده از گیرنده‌های فلزی ارزان قیمت و تجاری با نام‌های بروموپیروگالول رد (BPR) و زایلنول نارنجی (XO) توسعه داده شده است. این روش بر اساس کمپلکس افزایشی BPR و XO با یون سریم برای شناسایی گلوتاتیون نسبت به سایر اسیدهای آمینه رقابتی موجود به‌ویژه گونه‌های تیول در محیط‌های آبی است [۳۶].
- در سال ۲۰۲۳ کومار و همکارانش یک روش ساده و آسان را برای سنتز نانوذرات نقره (NPs نقره) گزارش کردند و پتانسیل آن را برای تشخیص گلوتاتیون و دوپامین از طریق سنجش رنگ‌سنجی نشان دادند. آزمایش‌های UV-Vis و تداخل نانوذرات نقره حساسیت و گزینش‌پذیری عالی را در برابر GSH حتی پس از افزودن ۴۰ میکرومولار بیومولکول‌های مختلف تداخلی نشان دادند [۳۷].
- در سال ۲۰۲۴ لی و همکارانش نانوذرات دو فلزی $PdPt_3$ با فعالیت های شبه پراکسیداز و اکسیداز برای تشخیص رنگ سنجی حساس گلوتاتیون در شیر و آب میوه را ارائه دادند. محدوده خطی روش تشخیص پیشنهادی برای گلوتاتیون ۰/۰– ۴۰۰/۰ میکرومولار و حد تشخیص ۲/۵ میکرومولار بود. روش تشخیص با موفقیت در تشخیص گلوتاتیون در نمونه های غذایی با محدوده بازیابی بین ۹۲/۲۰٪ و ۱۰۷/۲۷٪ استفاده شده است، که چشم انداز خوبی را برای تشخیص گلوتاتیون در کاربردهای عملی نشان داد [۳۸].

.

۱–۲ هدف از پژوهش

استفاده از حسگرهای شیمیایی (شامل حسگرهای رنگ‌سنجی) انجام شده و مورد بررسی قرار گرفته است. بیشتر روش هایی که تا کنون برای شناسایی و اندازه گیری کاتیون ها، آنیون ها و آمینو اسیدها به کار گرفته شده اند، روش هایی با کاربرد دشوار و زمانبر بوده و با چشم غیرمسلح قابل مشاهده و تشخیص نمی باشند. از میان این روش ها، حسگرهای شیمیایی به دلیل سهولت کاربرد، گزینش پذیری و حساسیت بالا، زمان پاسخ دهی کوتاه، عدم نیاز به مراحل پیچیده‌ی آماده‌سازی نمونه و همچنین عدم نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و از همه مهم‌تر، قابلیت تشخیص با چشم غیر مسلح از برتری ویژه ای برخوردار می باشند [۱۷]. در این تحقیق، با استفاده از رنگ ها و لیگاندهایی که به راحتی قابل دسترسی می باشند، حسگرهای گزینش پذیری برای تشخیص و اندازه گیری کاتیون ها، آنیون ها و آمینو اسیدها پیشنهاد می گردد. این گیرنده ها با ایجاد برهمکنش با آنالیت، باعث ایجاد

تغییراتی در گروه کروموفور شده و در نتیجه ی آن، تغییراتی در سیگنال خروجی ایجاد می شود، که این تغییرات (در زمان ایجاد تغییر در گروه کروموفور) با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده می باشند [۳۹]. حسگر طراحی شده در این تحقیق برای یون سولفید دارای گزینش پذیری بالا بوده و آنیون سولفید را در حضور آنیون های دیگر شناسایی می کند. در طراحی این حسگرها، افزایش لیگاندهای کمکی مانند اریتروسین، گزینش پذیری را تا حد بسیار زیادی افزایش می دهد. در این پژوهش سعی داریم با استفاده از یک حسگر شیمیایی رنگ سنجی گزینش پذیر، آسان، با دقت بالا و نتایج رضایت بخش اقدام به شناسایی آلاینده های محیطی کنیم.

۲ روش پژوهش

۲–۱ مواد شیمیایی مورد نیاز

در این تحقیق جهت آماده‌سازی محلول‌های نمونه و استاندارد از آب یون زدایی شده و واکنشگرهای با درجه خلوص تجزیه ای بالا استفاده شده‌است که نیاز به خالص‌سازی بیشتر نداشتند. تمامی مواد و استانداردهای مورد استفاده در این کار پژوهشی توسط شرکت مرک تهیه شدند. نوترال رد از شرکت مرک تهیه شد و به منظور حسگر شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. آمینواسیدهای میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، گلوتاتیون، آلانین، آرژنین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، هیستدین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین از مواد شیمیایی ساخت کارخانه مرک آلمان تهیه شدند و در مرحله کمپلکس سازی با نوترال رد، مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از بافرهای استیک اسید/سدیم هیدروکساید جهت تثبیتpH در محدوده ۴/۰–۳/۰، از بافر ام ای اس/ سدیم هیدروکساید برای pH در محدوده ۶/۰–۵/۰، از بافر هپس/سدیم هیدروکساید برای pH درمحدوده ۱۰/۰–۷/۰ و از بافر کبس برای تثبیت pH در محدوده ۱۱/۴–۱۰/۰ به منظوز مطالعه و بررسی تاثیر وابستگی pH استفاده شد.

۲–۲– دستگاه ها و وسایل مورد نیاز

- دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش – مرئی ساخت شرکت پرکین المر مدل لامبدا ۱۴
- ترازوی دیجیتالی چهار رقمی آدام **La**۲۲۰ با دقت ۰/۰۰۰۱± گرم
- سرنگ ۵۰ میکرولیتری هامیلتون با خطای۰/۵± میکرولیتر

- ظروف شیشه ای شامل : بشر ۲۵ ،۵۰، ۱۵ میلی لیتری؛ پیپت ۲ ،۵ و۱۰ میلی لیتری؛ بالن حجمی ۱۰ ،۲۵ میلی لیتری
- اسپاتول، لوله مویین
- سل کوارتزی مکعبی یک سانتیمتری و سل های پلاستیکی
- دستگاه pH متر جن وی ۳۵۱۰
-

۲-۳ تهیه محلول استاندارد مورد استفاده در طیف بینی UV-Vis

۲-۳-۱ محلول نوترال رد با غلظت $۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار

به منظور تهیه محلول $۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار از نوترال رد، ابتدا محلول $۵/۰\times۱۰^{-۳}$ مولار از ترکیب نوترال رد تهیه گردید. به این صورت که ۰/۰۱۴۴گرم از نمونه جامد نوترال رد را توزین کرده و در یک بالن ژوژه ۱۰میلی لیتری با آب یون زدایی شده به حجم رسانده شد. سپس با رقیق سازی غلظت مورد نظر تهیه شد.

۲-۳-۲ محلول آمینواسیدهای مختلف با غلظت $۱/۰\times۱۰^{-۲}$ مولار

آمینواسیدهای میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، گلوتاتیون، آلانین، آرژنین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، هیستدین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین که به ترتیب ۰/۰۱۴۹، ۰/۰۱۶۵، ۰/۰۱۱۵، ۰/۰۱۰۵، ۰/۰۱۱۹، ۰/۰۲۰۴، ۰/۰۱۸۱، ۰/۰۳۵۷، ۰/۰۰۸۹، ۰/۰۱۷۴، ۰/۰۱۳۲، ۰/۰۱۳۳، ۰/۰۱۲۱، ۰/۰۱۴۷، ۰/۰۱۴۶، ۰/۰۰۷۵، ۰/۰۱۵۵، ۰/۰۱۳۱، ۰/۰۱۳۱، ۰/۰۱۴۶ گرم از هر ماده به بالون ژوژه ۱۰ میلی لیتری با آب یون زدایی حل نموده و به حجم رسانده شده تا غلظت $۱/۰\times۱۰^{-۲}$ مولار از این آمینواسیدها تهیه شود. سپس با رقیق‌سازی، محلولهای با غلظت $۱/۰\times۱۰^{-۳}$ مولار از آنها تهیه گردید.

۲-۳-۳- روش استاندارد تعیین گلوتاتیون

برای تائید صحت روش از کیت سنجش گلوتاتیون احیا(GSH) شرکت آرسام فرا زیست استفاده شد. اساس سنجش تیول موجود در گلوتاتیون با معرف اِلمان یعنی دی‌تیو بیس نیتروبنزوئیک اسید (DNTB) واکنش می‌دهد و تولید نیتروتیوبنزوات (TNB) می‌کند که رنگ آن زرد می‌باشد و در طول موج ۴۱۲ نانومتر قابل کمّی سازی است. شدت رنگ نسبت مستقیم با تیول‌های احیایی در نمونه دارد. برای سنجش نمونه بعد از رقیق سازی نمونه های سرم (۴ بار) مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم را در یک لوله آزمایش ریخته و با

بافر رقیق کننده به حجم ۴۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سولفوسالیسیلیک اسید به آن اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در روی یخ انکوبه شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰در دقیقه، کل محلول رویی را به میکروتیوب جدید منتقل و مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر واکنش به هر یک اضافه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DTNB رابه آن اضافه شد. در نهایت جذب نمونه ها را در طول موج۴۱۲ نانومتر قرائت گردید. برای آنالیز داده ها ازنمودار مربوط به استاندارد گلوتاتیون استفاده شد [۴۰، ۴۱].

۲-۴ روش کار

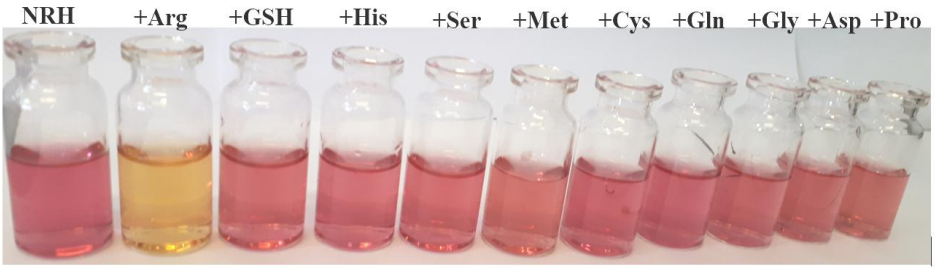
تمام آزمایشات در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد. محلول استوک نوترال رد (NRH) در یک محیط آبی آماده شد. محلول استاندارد کاری نوترال رد به صورت تازه توسط رقت‌های متوالی از محلول استوک ساخته شد. ابتدا ۲/۵ میلی لیتر محلول$^{-۵}$۱۰×۴/۰ مولار از نوترال رد در یک سل کوارتز با طول مسیر برابر ۱ سانتی‌متر ریخته شد و سپس محلول استاندارد کاری آمینواسید آرژنین ($^{-۳}$۱۰×۱/۰ مولار) با استفاده از میکرو سرنگ به تدریج به محلول نوترال رد در این سلول اضافه شد .در طی این فرآیند، طیف‌های جذبی ثبت شد. پس از اشباع محلول و زمانی که تغییرات جذب ناچیز شد افزایش آمینواسید گلوتاتیون صورت گرفت. تغییر رنگ محلول نوترال رد با افزایش آنالیت آرژنین از قرمز به زرد مشاهده شد. سپس محلول کاری گلوتاتیون با غلظت $^{-۲}$۱۰×۱/۰ مولار به تدریج به کمپلکس ایجاد شده در مرحله قبل (NRH-Arg) اضافه شد. در طی این فرآیند، طیف‌های جذبی ثبت شد. تغییر رنگ محلول (NRH-Arg-GSH) را از زرد به قرمز پس از افزودن آمینواسید گلوتاتیون ($^{-۴}$۱۰×۸/۲۶– $^{-۷}$۱۰×۱/۰ مولار) مشاهده شد. در نتیجه، نوترال رد به عنوان حسگر شیمیایی برای برای تشخیص آمینواسیدهای آرژنین و گلوتاتیون در یک محیط آبی استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ مطالعات طیف بینی UV-Vis کارایی حسگر شیمیایی نوترال رد برای استفاده به عنوان گیرنده آمینواسیدی و شناسایی آرژنین

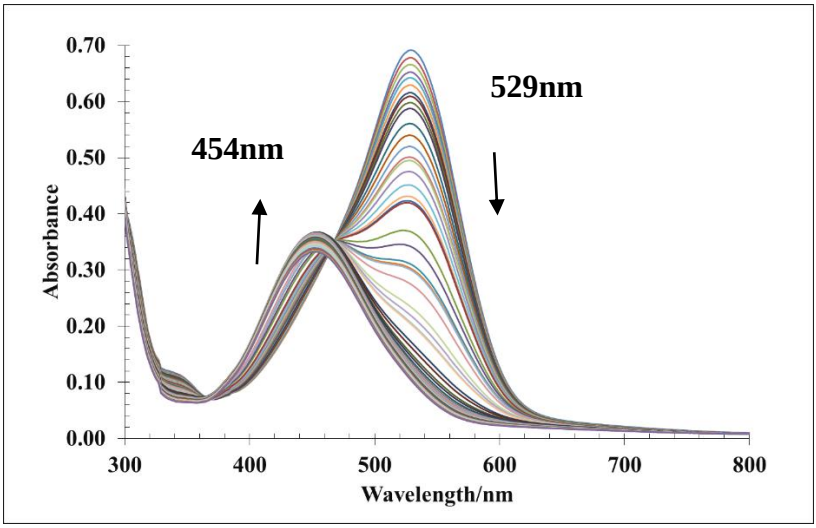
براساس آزمایشات انجام شده ، مقدار $^{-۵}$۱۰×۴/۰ مولار بعنوان مناسب ترین غلظت از نوترال رد در حلال آبی، بدست‌آمد. در این غلظت بهینه مقدار جذب حسگر درλ_{max}=529 معادل ۰/۶۹ مشاهده شد. در ابتدا با استفاده از تست چشمی بهترین آنالیت برای NRH مشخص شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است تنها در حضور

آرژنین تغییر رنگ گیرنده از قرمز به زرد مشاهده شد. در نتیجه نمودار تیتراسیون گیرنده در حضور آرژنین مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱ تغییرات رنگ نوترال رد با غلظت بهینه ($۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار) با افزودن آمینواسید آرژنین ($۱/۰\times۱۰^{-۳}$ مولار) و اسیدهای آمینه دیگر(گلوتاتیون، هیستدین، سرین، میتونین، سیستئین، گلوتامین، گلیسین، آسپارژین، پرولین)

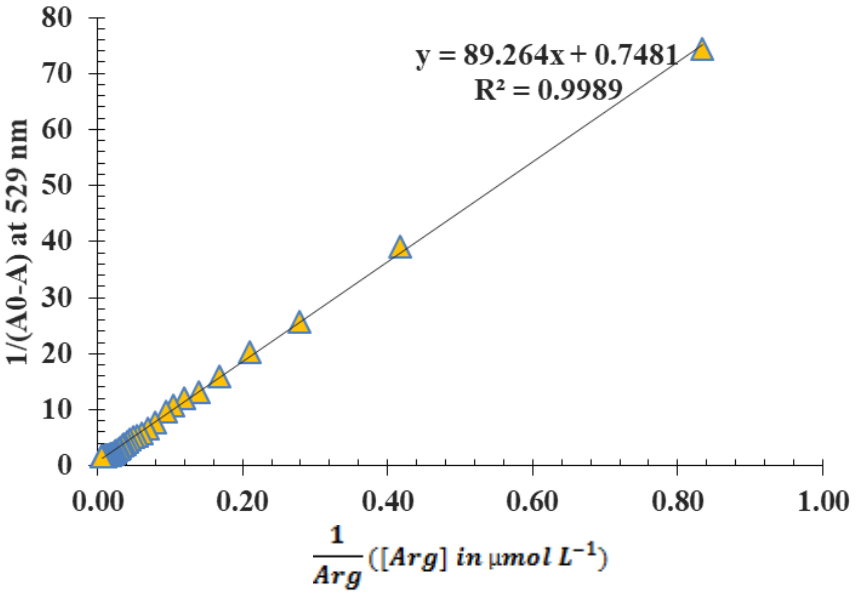
با تیتراسیون متوالی آرژنین به ۲/۵ میلی لیتر از محلول $۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار از نوترال رد به وسیله سرنگ ۵۰/۰ میکرولیتری هامیلتون، تغییراتی در پیک جذبی گیرنده ایجاد شد. در نهایت با افزایش تدریجی از آرژنین (۱۷۰/۵۴–۱/۲۰ میکرومولار)، پیک جذبی نوترال رد در طول موج ۵۲۹ نانومتر کاهش یافته و همزمان یک جابجایی آبی به ۴۵۴ نانومتر و ظهور یک پیک جدید دیده شد. علاوه بر این دو نقطه ایزوبستیک واضح در ۴۶۵ و ۳۶۹ نانومتر قابل مشاهده است. این نقطه ایزوبستیک تاییدی بر تشکیل کمپلکس میان حسگر و آرژنین است. در نهایت با اتمام عمل تیتراسیون تغییر رنگ حسگر از قرمز به زرد دیده شد (شکل ۱). شکل ۲ تغییرات در پیک جذبی نوترال رد که نشان از تشکیل کمپلکس میان گیرنده و آرژنین است نمایش داده شده است.



شکل ۲ تغییرات جذب ۲/۵ میلی لیتر نوترال رد با غلظت $۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار با اضافه کردن ۵۱۴/۰ میکرولیتراز آرژنین با غلظت $۱/۰\times۱۰^{-۳}$ مولار(۱۷۰/۵۴ میکرومولار)

۳-۲ تعیین نسبت استوکیومتری نوترال رد: آرژنین

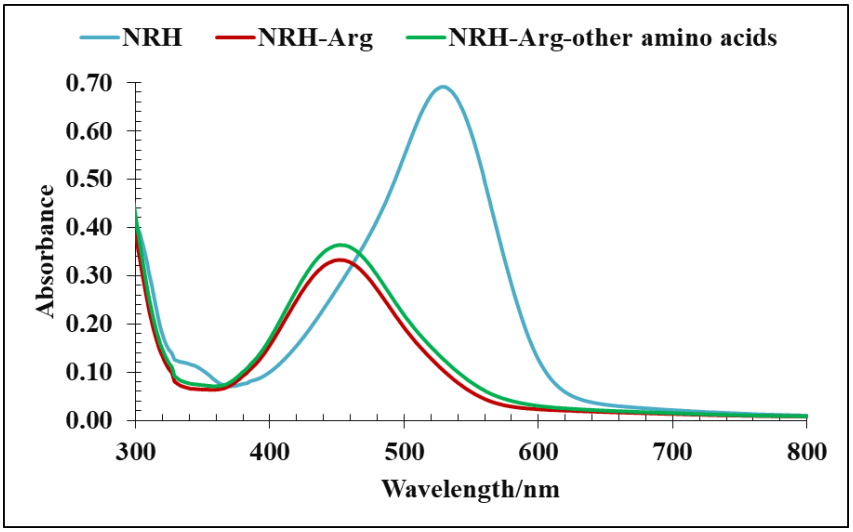
به منظور بررسی نسبت استوکیومتری نوترال رد و آرژنین از روش بنسی-هیلدبرند [۴۲] استفاده شد. شکل ۳ یک رابطه خطی بین ۱/[Arg] و ۱/(A_0-A) را نشان می‌دهد که A_0 جذب اولیه نوترال رد در طول موج ۵۲۹ نانومتر قبل از افزایش آرژنین، A جذب محلول در ول موج ۵۲۹ نانومتر بعد از افزایش آرژنین است. با رسم نمودار مشخص می‌شود نوترال رد و آرژنین با نسبت استوکیومتری ۱:۱ به شکل [NRH-Arg] پیوند برقرار می‌کنند. از تقسیم عرض از مبدا بر شیب، مقدار K_{ass} بدست آمد که برابر $۸/۳۸\times۱۰^{۳}$ لیتر بر مول شد.



شکل ۳ رسم نمودار ۱/(A_0-A) برحسب ۱/[Arg]؛ نوترال رد و آرژنین با نسبت استوکیومتری ۱:۱

۳-۳ بررسی اثر مزاحمت و گزینش پذیری حسگر شیمیایی بر اندازه گیری آرژنین

جهت بررسی اثر مزاحمت آمینواسیدها بر روی اندازه گیری آرژنین توسط نوترال رد در حلال آب یون زدایی شده، همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می شود، با افزایش ۵۱۴/۰ میکرولیتر از آرژنین (۱۷۰/۵۴ میکرومولار) پیک جذبی گیرنده در طول موج ۵۲۹ نانومتر کاهش می یابد و همزمان پیک جدیدی در ۴۵۴ نانومتر تشکیل شد. سپس با افزایش ۲۰۰/۰ میکرومولار از آمینواسیدهای میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، گلوتاتیون، آلانین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، هیستدین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین تغییرات زیادی در طیف مشاهده نشده است، در نتیجه می توان گفت که نوترال رد به طور گزینشی به آرژنین پاسخ می دهد.



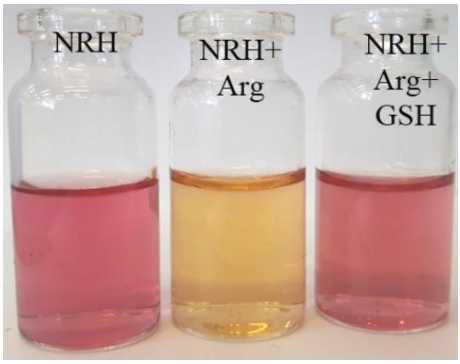
شکل ٤ نمودار بررسی اثر مزاحمت آمینواسیدها (میتونین، فنیل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، گلوتاتیون، آلانین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، هیستدین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین) بر روی اندازه گیری آرژنین توسط نوترال رد در حلال آب یون زدایی شده

۳–۴ معرفی یک حسگرشیمیایی رنگی بر مبنای NRH-Arg جهت شناسایی گلوتاتیون

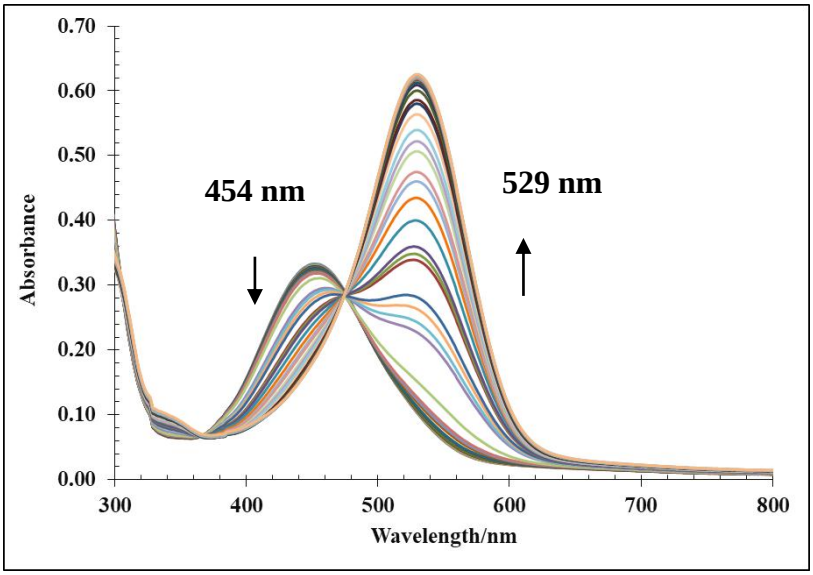
پس از مشاهده تغییرات رنگ و طیف جذبی UV-Vis و اطمینان از تشکیل کمپلکس NRH و آرژنین در مرحله بعد با استفاده از این کمپلکس اقدام به شناسایی آمینواسیدهای دیگر شد. در ابتدا تست چشمی آمینواسیدهای میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، گلوتاتیون، آلانین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، هیستدین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین با کمپلکس NRH-Arg انجام شد. نتیجه حاصل از این آزمایش معرفی یک حسگر شیمیایی برای آمینواسید گلوتاتیون بود که با تغییر رنگ واضحی از زرد به قرمز، در اثر افزایش گلوتاتیون به سل اسپکتروفوتومتر UV-Vis این هدف محقق گردید.

۳–۵ استفاده از حسگر شیمیایی NRH-Argبه منظور شناسایی آمینواسید گلوتاتیون

تیتراسیون کمپلکس نوترال رد–آرژنین با آمینواسید گلوتاتیون باعث ایجاد تغییراتی در پیک جذبی NRH-Arg شد. با افزایش گلوتاتیون به سل اسپکتروفوتومتری محتوی ۲/۵ میلی لیتر نوترال رد به همراه ۵۱۴/۰ میکرولیتر(۱۷۰/۵۴ میکرومولار) آرژنین، جذب در ۵۲۹ نانومتر افزایش می یابد و در ۴۵۴ نانومتر کاهش یافت. همچنین یک نقطه ی ایزوبستیک واضح در ۴۷۴ نانومتر ایجاد می‌شود که نشان دهنده تشکیل کمپلکس حسگر و گلوتاتیون است. در نهایت با افزایش ۲۷۱/۰ میکرولیتر(۸۲۵/۹۷ میکرومولار) از گلوتاتیون تغییر رنگ کمپلکس از زرد به قرمز مشاهده شد. تغییرات رنگ در شکل ۵ نمایش داده‌شده-است. علاوه بر آن نمودار تیتراسیون مربوط به این حسگر و گلوتاتیون در شکل ۶ نشان داده‌شده‌است.



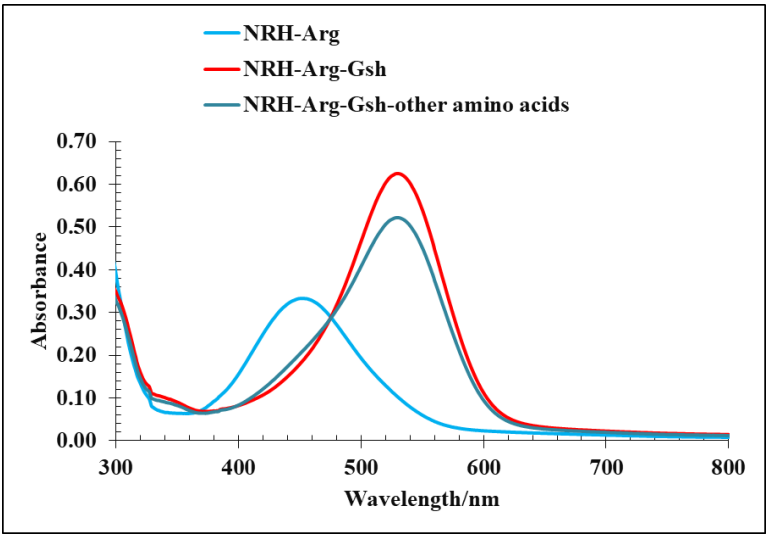
شکل ۵ مقایسه تغییرات رنگ حسگر شیمیایی NRH با افزایش ۵۱۴/۰ میکرولیتر (۱۷۰/۵۴ میکرومولار) از آرژنین و ۲۷۱/۰ میکرولیتر(۸۲۵/۹۷ میکرومولار) گلوتاتیون



شکل ٦ نمودار تیتراسیون حسگر شیمیایی NRH-Arg با افزایش تدریجی گلوتاتیون با غلظت $^{-۲}$۱۰×۱/۰ مولار

۳-۶ بررسی اثر مزاحمت آمینواسیدها بر اندازه‌گیری گلوتاتیون

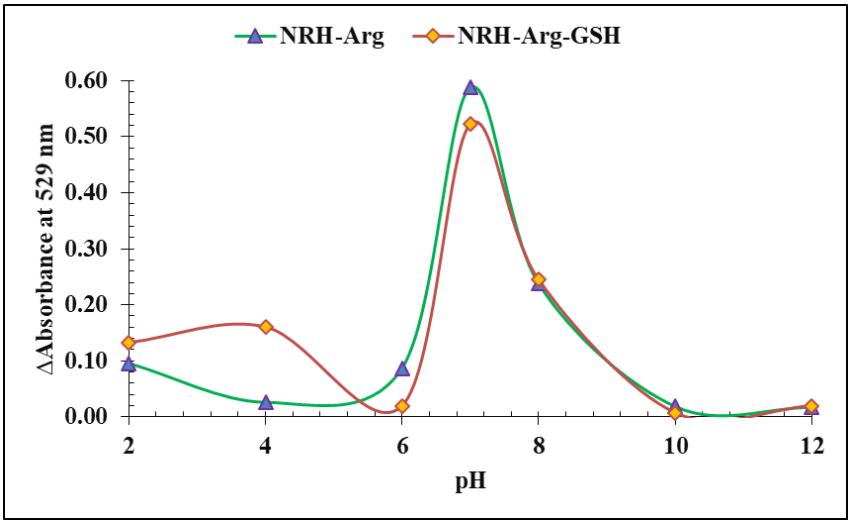
جهت بررسی اثر مزاحمت آمینواسیدها بر روی اندازه‌گیری گلوتاتیون توسط کمپلکس NRH-Arg همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود با افزایش ۸۲۵/۹۷ میکرومولار از گلوتاتیون پیک جذبی لیگاند در طول موج ۴۵۴ نانومتر کاهش می‌یابد و در ۵۲۹ نانومتر افزایش یافت. سپس با افزایش ۸۰۰/۰ میکرومولار از آمینواسیدهای میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، آلانین، آرژنین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین تغییرات قابل توجهی در طیف محلول کمپلکس مشاهده نشد. در نتیجه می توان گفت این حسگر نسبت به گلوتاتیون در حضور سایر آمینواسیدها گزینش‌پذیری بالایی دارد.



شکل ۷ نمودار حسگر شیمیایی NRH-Arg با افزایش گلوتاتیون و گلوتاتیون به همراه آمینواسیدهای دیگر(میتونین، فنل آنالین، پرولین، سرین، تریونین، تریپتوفان، تیروزین، آلانین، آرژنین، آسپارژین، آسپارتات، سیستئین، گلوتامات، گلوتامین، گلیسین، ایزولئوسین، لئوسین، لایزین)

۳-۷ بهینه‌سازی pH

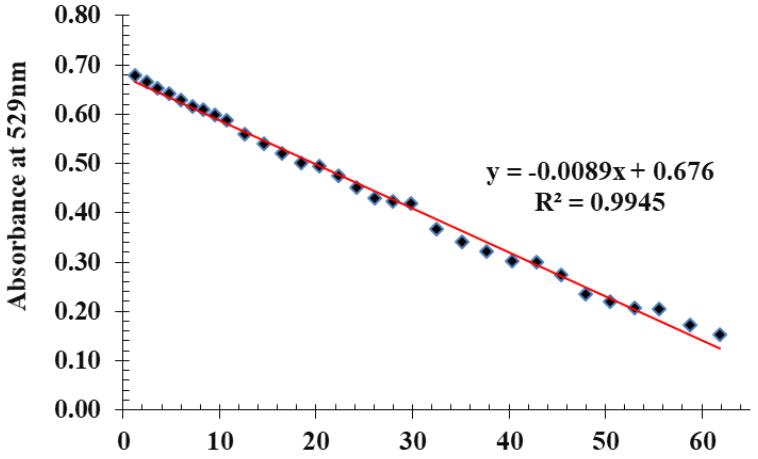
جهت بررسی اثرpH بر روی اندازه‌گیری آرژنین و گلوتاتیون ابتدا محلول استاندارد نوترال رد با غلظت$^{-۵}$۱۰×۴/۰ مولار در pH های مختلف تهیه شد و سپس از هرکدام از محلول‌ها با pH خاص در دستگاه فرابنفش–مرئی طیف‌گیری شد. در ادامه به هر محلول به میزان ۵۱۴/۰ میکرولیتر آرژنین با غلظت$^{-۳}$۱۰×۱/۰ مولار اضافه شد و طیف‌های آن گرفته شد. سپس ۲۷۱/۰ میکرولیتر از گلوتاتیون با غلظت $^{-۲}$۱۰×۱/۰ مولار به کمپلکس تشکیل-شده در هریک از pH ها افزوده شده و مجددا طیف گرفته‌شد. مطابق نتایج بدست آمده، این حسگر در pH = ۷/۰ بیشترین مقدار جذب را نشان می دهد. نمودار تغییرات جذب بر حسب pH برای آرژنین و گلوتاتیون درطول موج ۵۲۹ نانومتر در شکل ۸ آورده‌شده است.



شکل ۸ نمودار تغییرات جذب برحسب **pH** برای آرژنین و گلوتاتیون؛

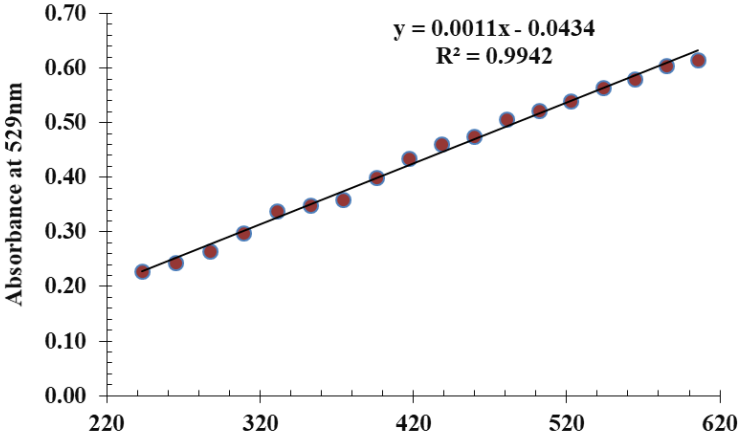
۳-۸ محدوده خطی جذب برای آرژنین و گلوتاتیون

با رسم منحنی کالیبراسیون، محدوده‌ای از غلظت که آرژنین دارای یک جذب خطی است مورد بررسی قرارگرفت. محدوده‌ی خطی جذب برای آرژنین در ۵۲۹ نانومتر و نمودار کالیبراسیون محدوده خطی آن در شکل ۹ آورده‌شده‌است. محدوده‌ی خطی برای آرژنین از ۱/۲۰ تا ۶۱/۹۱ میکرومولار با ضریب همبستگی(R^2) ۰/۹۹۴۵ محاسبه شد.



شکل ۹ نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی آرژنین در ۵۲۹ نانومتر؛ ۱/۲۰ تا ۶۱/۹۱ میکرومولار با ضریب همبستگی($\mathbf{R^2}$) ۰/۹۹۴۵

در ادامه محدوده‌ای از غلظت که گلوتاتیون دارای یک محدوده خطی است مورد بررسی قرارگرفت که نتایج در نمودار کالیبراسیون محدوده خطی مربوط به گلوتاتیون در شکل ۱۰ رسم شده‌است. منحنی کالیبراسیون برای تعیین کمی گلوتاتیون در محدوده خطی ۱۱۵/۴۹– ۲۴۳/۶۰۵ میکرومولار با ضریب هم بستگی($\mathbf{R^2}$) ۰/۹۹۴۲ خطی می‌باشد.



شکل ۱۰ نمودار کالیبراسیون محدوده خطی گلوتاتیون در ۵۲۹ نانومتر؛ محدوده خطی ۱۱/۴۹–۲۴۳/۶۰۵ میکرومولار با ضریب هم بستگی($\mathbf{R^2}$) ۰/۹۹۴۲

۳–۹ ارقام شایستگی

۳–۹–۱ حد تشخیص روش پیشنهادی

برای محاسبه حد تشخیص روش رنگ سنجی جذب محلول های شاهد که شامل ۲/۵ میلی لیتر نوترال رد با غلظت $۴/۰\times۱۰^{-۵}$ مولار به همراه ۵۱۴/۰ میکرولیتر آرژنین با غلظت $۱/۰\times۱۰^{-۳}$ مولار در طول موج ۵۲۹ نانومتر برای آرژنین و گلوتاتیون اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه حد تشخیص از رابطه(۳ S_b/m) استفاده شد کهS_b انحراف استاندارد محلول شاهد و m شیب منحنی کالیبراسیون می‌باشد. لذا حد تشخیص برای آرژنین و گلوتاتیون به ترتیب ۰/۶۱و ۲۵/۳۲ میکرومولار بدست‌آمد.

۳–۹–۲ تکرار پذیری روش‌ها

برای تعیین تکرار پذیری و دقت روش، جذب محلول‌هایی از آرژنین و گلوتاتیون تحت شرایط بهینه ۷ بار اندازه‌گیری شد و غلظت آن‌ها محاسبه گردید. با توجه به نتایج بدست‌آمده انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای آرژنین در دو غلظت ۱۰/۰ و ۵۰/۰ میکرومولار به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۱۷ درصد بدست آمد. علاوه بر این برای گلوتاتیون در دو غلظت ۳۷۰/۰ و ۵۶۴/۰ میکرومولار به ترتیب ۱/۲۰ و ۱/۰۸ درصد بدست آمد.

۳-۱۰ اندازه‌گیری آرژنین در نمونه‌های حقیقی

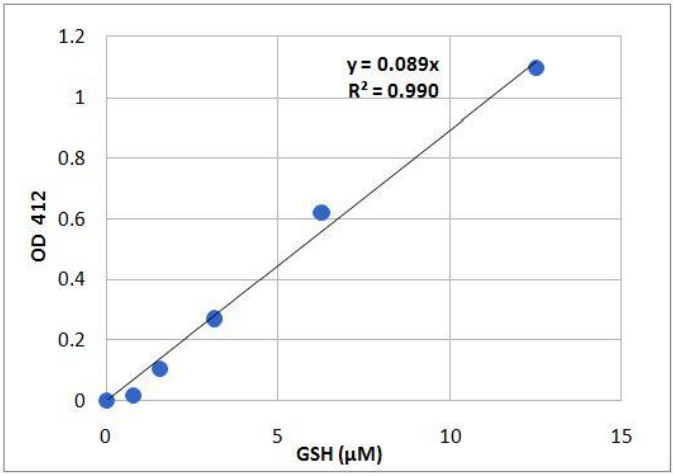
به منظور ارزیابی و کاربرد روش پیشنهادی مقادیر آرژنین در نمونه‌های سرم خون سربازان پادگان نظامی شیراز با این روش اندازه‌گیری شد.

۳-۱۰-۱ آماده‌سازی و اندازه‌گیری آرژنین در نمونه‌های سرم خون سربازان پادگان نظامی شیراز

به منظور اندازه‌گیری آرژنین در نمونه‌های حقیقی، سرم خون سربازان پادگان نظامی شیراز تهیه شد و ۰/۵ میلی لیتر از نمونه مورد نظر با کسر مناسبی از محلول ذخیره استاندارد آرژنین مخلوط شد و توسط روش پیشنهادی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج آزمایش در جدول ۱ ارائه شده‌است.

برای تائید صحت روش از کیت سنجش گلوتاتیون احیا(GSH) شرکت آرسام فرا زیست استفاده شد. اساس سنجش تیول موجود در گلوتاتیون با معرف اِلمان یعنی دی‌تیو بیس نیتروبنزوئیک اسید (DNTB) واکنش می‌دهد و تولید نیتروتیوبنزوات (TNB) می‌کند که رنگ آن زرد می‌باشد و در طول موج ۴۱۲ نانومتر قابل کمّی سازی است. برایآنالیز داده - ها از شکل ۱۱ که مربوط به استاندارد گلوتاتیون با روش کیت سنجش گلوتاتیون احیا است، استفاده شد. به کمک معادله خط برازش می توان غلظت گلوتاتیون را بدست آورد. برای سه نمونه سرم مقدار گلوتاتیون برای نمونه سرم ۱ ، ۲۲/۱±۰/۲ نمونه سرم ۲، ۲۲/۶±۰/۳ نمونه سرم ۳، ۲۱/۵±۰/۵ با ۵ اندازه گیری بدست آمد. بررسی با آزمون تی-تست[1] [۴۳] با حد اطمینان ۹۵ درصد کمتر از ۱/۷۵ بدست آمد که کمتر از مقدار بحرانی است (مقدار بحرانی تی ۲/۳۱ است) که صحت کار تائید می شود.

[1] *t*-test



شکل ۱۱ نمودار کالیبراسیون گلوتاتیون در ۴۱۲ نانومتر با روش کیت سنجش گلوتاتیون احیا

طبق نتایج بدست آمده این روش برای شناسایی آرژنین در هر نمونه‌ای مناسب می‌باشد.

جدول ۱- اندازه گیری آمینو اسید آرژنین در نمونه های سرم خون سربازان.

نمونه	آرژنین ($\mu mol\ L^{-1}$)		درصد بازیابی
	مقدار اضافه شده	مقداراندازه گیری شده[۱]	
نمونه سرم ۱	۰/۰۰	۲۲/۰۴±۰/۱۵	-
	۱۰/۰۰	۳۲/۴۰±۰/۱۶	۱۰۳/۶
	۲۰/۰۰	۴۱/۹۲±۰/۱۸	۹۹/۴
	۴۰/۰۰	۶۲/۷۱±۰/۳۵	۱۰۱/۷
نمونه سرم ۲	۰/۰۰	۲۲/۵۰±۰/۱۲	-
	۱۰/۰۰	۳۲/۷۱±۰/۱۹	۱۰۲/۱
	۲۰/۰۰	۴۱/۵۳±۰/۲۳	۹۵/۱
	۴۰/۰۰	۶۲/۸۹±۰/۱۷	۱۰۱/۰
نمونه سرم ۳	۰/۰۰	۲۱/۸۰±۰/۲۱	-
	۱۰/۰۰	۳۱/۵۹±۰/۱۳	۹۷/۹
	۲۰/۰۰	۴۱/۵۸±۰/۲۷	۹۸/۹
	۴۰/۰۰	۶۲/۲۱±۰/۱۹	۱۰۱/۰

[۱] میانگین ± انحراف استاندارد(۵ بار تکرار)

۴ بحث و نتیجه‌گیری

در دهه های اخیر توسعه گیرنده های شیمیایی به منظور شناسایی آنالیت های محیطی توجه زیادی رابه خود جلب کرده است. در این تحقیق از روش بسیار ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و با تکرار پذیری خوب برای شناسایی آرژنین و گلوتاتیون استفاده‌شده‌است. حسگرهای شیمیایی رنگزا که تاکنون طراحی شده‌اند بیشتر سنتزی بوده و سنتز آنها دشوار است اما نوترال رد یک شناساگر رنگی حساس به فلز، با خلوص بالا و در دسترس است. این تحقیق پژوهشی است بر گسترش حسگرهای رنگزا که با کمک دید چشمی قابل شناسایی و ارزیابی می‌باشند و می توان اطلاعات کیفی را بسیار سریع دریافت نمود و اندازه‌گیری کمی را انجام داد. محدوده خطی برای آرژنین و گلوتاتیون به ترتیب ۲۰/۹۱-۱/۶۱ میکرومولار و ۶۰۵/۴۹-۲۴۳/۱۱ میکرومولار و ضریب همبستگی آنها به ترتیب ۰/۹۹۴۵ ۰/۹۹۴۲ می‌باشد. همچنین حد تشخیص روش ۰/۶۱ و ۲۵/۳۲ میکرومولار و انحراف نسبی برای آرژنین در دو غلظت ۱۰/۰ و ۵۰/۰ میکرومول بر لیتر به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۱۷ درصد و برای گلوتاتیون در دو غلظت ۳۷۰/۰ و ۵۶۴/۰ میکرومول بر لیتر به ترتیب ۱/۲۰ و ۱/۰۸ درصد بدست آمد. در نهایت مشخص شد که این روش قادر به شناسایی آرژنین در نمونه های سرم خون سربازان است. همچنین حد تشخیص این روش کمتر در مقایسه با روش های قبلی است [۴۹-۴۴]. که نتایج در جدول۲ ارائه شده است. نکته مهم دیگر انجام این روش در محیط آبی بدون استفاده از حلال های شیمیایی که آلاینده محیط زیست هستند، است.

جدول ۲- مقایسه برخی ویژگی های مهم روش پیشنهادی با برخی تحقیقات قبلی برای اندازه گیری آمینواسید آرژنین

روش	حدتشخیص میکرومول بر لیتر	زمان پاسخگویی (ثانیه)	مرجع
فلورسانی	۱/۰	۱۰	[۴۴]
پتانسیومتری	۵۰/۰	۶۰۰	[۴۵]
مادون قرمز	۵۰/۰	۶۰	[۴۶]
پتانسیومتری	۱۰/۰	۲۴۰	[۴۷]
رنگ سنجی	۱/۰۶	کمتر از ۶۰ ثانیه	[۴۸-۵۰]
رنگ سنجی	۰/۶۱	کمتر از ۶۰ ثانیه	تحقیق حاضر

۵. قدردانی

با تشکر از دانشگاه پیام نور نور مرکز شیراز، که امکانات آزمایشـگاهی را فـراهم نمـوده و در انجام این پروژه نهایت همکاری را داشته‌اند.

فهرست منابع

[1] A.M. Pettiwala, P.K. Singh, Optical sensors for detection of amino acids. *Current medicinal chemistry*; Vol. 25(19), pp. 2272-9, 2018.

[2] A.M. Pettiwala, P.K. Singh, Recent developments in designing optical sensors for detection of basic amino acids, 2018.

[3] H. Imanzadeh, Y. Sefid-Sefidehkhan, H. Afshary, A. Afruz, M. Amiri, Nanomaterial-based electrochemical sensors for detection of amino acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 230, No. 115390, 2023.

[4] M. Yang, M. Zhang, M. Jia, Optical sensor arrays for the detection and discrimination of natural products, Natural Product Reports, Vol. 40(3), pp. 628-45, 2023.

[5] MB Behyar, M Hasanzadeh, F Seidi, N.Shadjou, Sensing of amino acids: Critical role of nanomaterials for the efficient biomedical analysis, *Microchemical Journal*, Vol. 188, No. 108452, 2023.

[6] N. Stasyuk, G. Gayda, W. Nogala, M. Holdynski, O. Demkiv, L. Fayura, et al. Ammonium nanochelators in conjunction with arginine-specific enzymes in amperometric biosensors for arginine assay, *Microchimica Acta*, Vol. 191(1), No. 47, 2024.

[7] H. Zhou, X. Huang, S. Zheng, H. Guo, F. Yang, An effect fluorescence sensor for arginine based on bis-cyanodistyrene Schiff-base, *Journal of Molecular Structure*, Vol. 1305, No. 137798, 2024.

[8] D. Singh, I. Annan, S. Tyagi, V. Meena, S. Singh, R. Gupta, A coumarin-anthracene-based chemodosimeter for the selective detection of arginine, *Journal of Chemical Sciences*, Vol. 135(4), No. 98, 2023.

[9] Y.H. Seo, T. Kim, C.K.P. Truong, H.S. No, J.I. Hong, I.S. Shin, Electrochemiluminescent “turn-on” chemosensor based on the selective recognition binding kinetics with glutathione, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 357, No. 131408, 2022.

[10] Y. Sasaki, X. Lyu, R. Kubota, S.y. Takizawa, T. Minami, Easy-to-prepare mini-chemosensor array for simultaneous detection of cysteine and glutathione derivatives, *ACS Applied Bio Materials*, Vol. 4(3), pp. 2113-9, 2020.

[11] Y. Xu, X. Niu, H. Zhang, L. Xu, S. Zhao, H. Chen, et al. Switch-on fluorescence sensing of glutathione in food samples based on a graphitic carbon nitride quantum dot (g-CNQD)–Hg^{2+} chemosensor, *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 63(6), pp. 1747-55, 2015.

[12] Y. Huang, J. Zhou, H. Feng, J. Zheng, H.M. Ma, W. Liu, et al. A dual-channel fluorescent chemosensor for discriminative detection of glutathione based on functionalized carbon quantum dots, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 86, pp. 748-55, 2016.

[13] L. Wang, Y.Q. Fan, X.W. Guan, W.J. Qu, Q. Lin, H. Yao, et al. A novel naphthalimide–glutathione chemosensor for fluorescent detection of Fe^{3+} and Hg^{2+} in aqueous medium and its application,*Tetrahedron*, Vol. 74(29), pp. 4005-12, 2018.

[14] H. Shu, X. Wu, B. Zhou, Y. Han, M. Jin, J. Zhu, et al. Synthesis and evaluation of a novel fluorescent chemosensor for glutathione based on a rhodamine B and N-[4-(carbonyl) phenyl] maleimide conjugate and its application in living cell imaging, *Dyes and Pigments*, Vol. 136, pp. 535-42, 2017.

[15] J. Kaur, N.K. Rangra, P.A. Chawla, A comprehensive review on recent trends in amino acids detection through analytical techniques, *Separation Science Plus*, Vol. 6(11), No. 2300040, 2023.

[16] P. Gale, L. Twyman, C. Handlin, J. Sessler, A colourimetric calix [4] pyrrole–4-nitrophenolate based anion sensor, *Chemical Communications*, Vol. (18), pp. 1851-2, 1999.

[17] Y.W. Liu, C.H. Chen, A.T. Wu, A turn-on and reversible fluorescence sensor for Al3+ ion, Analyst, Vol. 137(22), pp. 5201-3, 2012.

[18] A Kittilukkana, J Sanit, C. Pilapong, Reproposing Neutral Red as a Colorimetric Probe for Quantitative Assessment of Lysosomal Clearance in Neuroblastoma Cell Line, *ChemistrySelect*, Vol. 9(1), No. e202303856, 2024.

[19] M. Moradi, A. Afkhami, A. Ghoorchian, T. Madrakian, Poly (neutral red), poly (crystal violet), and poly (congo red) films as color filters for producing new color states in polyaniline electrochromic system, *Synthetic Metals*, Vol. 303, No. 117561, 2024.

[20] Y. Aghasoltan, S.M. Alavi, M.R. Sazegar, Synthesis Nanocomposites Copper and Titanium Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles as Potentials for Cancer Treatment by the Formation of Reactive Oxygen Species Via Photodegradation of Neutral Red, Available at SSRN 4821817.

[21] M. Iram, C. Guo, Y. Guan, A. Ishfaq, H. Liu, Adsorption and magnetic removal of neutral red dye from aqueous solution using Fe3O4 hollow nanospheres, *Journal of hazardous materials*, Vol. 181(1-3), pp. 1039-50, 2010.

[22] F. Kastury, A. Juhasz, S. Beckmann, M. Manefield, Ecotoxicity of neutral red (dye) and its environmental applications, *Ecotoxicology and environmental safety*, Vol. 122, pp. 186-92, 2015.

[23] G Repetto, A Del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, Vol. 3(7), pp. 1125-31, 2008.

[24] O. Soldatkina, O. Soldatkin, T. Velychko, V. Prilipko, M. Kuibida, S. Dzyadevych, Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceutics, *Bioelectrochemistry*, Vol. 124, pp. 40-6. 2018.

[25] A. Mohammadi, S. Khoshsoroor, B. Khalili, Rapid, sensitive and selective detection of arginine using a simple azo-based colorimetric and fluorescent chemosensor, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 384, No. 112035, 2019.

[26] Y.Q. Pan, X. Xu, Y. Zhang, Y. Zhang, W.K. Dong, A highly sensitive and selective bis (salamo)-type fluorescent chemosensor for identification of Cu^{2+} and the continuous recognition of S^{2-}, Arginine and Lysine, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 229, No. 117927, 2020.

[27] M. Jouyandeh, S.S.M. Khadem, S. Habibzadeh, A. Esmaeili, O. Abida, V. Vatanpour, et al. Quantum dots for photocatalysis: synthesis and environmental applications, *Green Chemistry*, Vol. 23(14), pp. 4931-54, 2021.

[28] X. Yu, B. Zhang, P. Liao, J. Huang, C. Fan, H. Hu, et al. A chemoselective fluorescent probe for arginine in aqueous phase. *Dyes and Pigments.* Vol. 203, No. 110339, 2022.

[29] Tavallali H, Parhami A, Karimi M-A, Askari J. Design and Developed Novel and Ultrasensitive Chemosensor for Sequential Determination of Arginine and Glutathione Amino Acids, *Iranian Journal of Analytical Chemistry,* Vol. 10(2), pp. 1-15, 2023.

[30] S. Sarkar, S. Bej, D. Kundu, P. Ghorai, N. Chanda, P. Banerjee, Molecular sieving of L-arginine over L-lysine by α-Hydroxy acid functionalized ZnII-luminescent framework from aqueous medium and other biofluids: Experimental and DFT corroboration with logic gate construction, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 446, No. 115152, 2024.

[31] L. Chen, J.S. Park, D. Wu, C.H. Kim, J. Yoon, A colorimetric and fluorescent probe for rapid detection of glutathione and its application to tissue specific bio-imaging in living cells and zebrafish, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 262, pp. 306-12, 2018.

[32] R. Wu, H. Ge, C. Liu, S. Zhang, L. Hao, Q. Zhang, et al. A novel thermometer-type hydrogel senor for glutathione detection, *Talanta*, Vol. 196, pp. 191-6, 2019.

[33] S.R.H. Jangi, M. Akhond, G. Absalan, A novel selective and sensitive multinanozyme colorimetric method for glutathione detection by using an indamine polymer, *Analytica Chimica Acta,* Vol. 1127, pp. 1-8, 2020.

[34] Q. Zheng, F. Ding, X. Hu, J. Feng, J. Shen, X. He, ESIPT-based fluorescent probe for bioimaging and identification of group IIIA ions in live cells and zebrafish, *Bioorganic Chemistry,* Vol. 109, No. 104746, 2021.

[35] F. Guo, H. Yang, L. Hong, X. Sun, J. Han, R. Guo, Self-organized nanoreceptors-based fluorescent probe for quantitative detection of denatured glutathione, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 652, No. 129914, 2022.

[36] H. Tavallali, G. Deilamy-Rad, A. Parhami, R. Zebarjadi, A. Najafi-Nejad, N. Mosallanejad, A novel design of multiple ligands for ultrasensitive colorimetric chemosensor of glutathione in plasma sample, *Analytical Biochemistry*, Vol. 637, No. 114475, 2022.

[37] A. Kumar, S. Ramamoorthy, A. Sundaramurthy, Synthesis of Ag nanoparticles for selective dual detection of glutathione and dopamine using N, N-dimethyl-p-phenylenediamine mediated colorimetric probe, *Chemosphere*, Vol. 342, No. 140124, 2023.

[38] S. Li, Z. Ma, Y. Cui, S. Jiao, R. Li, H. Xiao, et al. Daptomycin templated bimetallic $PdPt_3$ nanoparticles with peroxidase-like and oxidase-like activities for sensitive colorimetric detection of glutathione in milk and fruit juice, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 70, No. 134739, 2024.

[39] Z. Zhang, H. Wang, Z. Chen, X. Wang, J. Choo, L.Chen, Plasmonic colorimetric sensors based on etching and growth of noble metal nanoparticles: Strategies and applications, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 114, pp. 52-65, 2018.

[40] C. Gaucher, A. Boudier, J. Bonetti, I. Clarot, P. Leroy, M. Parent, Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies, *Antioxidants*, Vol. 7(5), p. 62, 2018.

[41] A .Pakfetrat Z. Dalirsani, S.I. Hashemy, A. Ghazi, L.V. Mostaan, K. Anvari, A.M. Pour, Evaluation of serum levels of oxidized and reduced glutathione and total antioxidant capacity in patients with head and neck squamous cell carcinoma, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, Vol. 14(2), pp. 428-31, 2018.

[42] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 71(8), pp. 2703-7, 1949.

[43] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5th ed., Pearson Education Limited, Prentice Hall, New York, 2005.

[44] S.D.S. Parveen, A. Affrose, K. Pitchumani, Plumbagin as colorimetric and ratiometric sensor for arginine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 221, pp. 521-7, 2015.

[45] M. Sheliakina, V. Arkhypova, O. Soldatkin, O. Saiapina, B. Akata, S. Dzyadevych, Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*, Vol. 121, pp. 18-23, 2014.

[46] Y.K. Wei, J. Yang, Evanescent wave infrared chemical sensor possessing a sulfonated sensing phase for the selective detection of arginine in biological fluids, *Talanta*, Vol. 71(5), 2007.

[47] Hosseini Moradi, S. A., & Amirzadeh, M. (2024). Removal of Acidic Dye by Electrochemical Method Using Polymeric Nanofiber Containing Reduced Graphene Oxide Nanoparticles and Catalyst. Journal of Color Science and Technology, 17(4), 287-301.

[48]Ghobadi, N., Hosseini Moradi, S. A., & Amirzade, M. (2022). SYNTHESIS AND STRUCTURAL, MAGNETIC, AND ELECTROMAGNETIC CHARACTERIZATION OF COBALT FERRITE/REDUCED GRAPHENE OXIDE COMPOSITE. Advanced Materials in Engineering, 40(4).

[49] R. Koncki, I. Wałcerz, F. Ruckruh, S. Głab, Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination, *Analytica chimica acta*, Vol. 333(3), pp. 215-22, 1996.

[50] H. Tavallali, G. Deilamy-Rad, and N. Mosallanejad, Reactive blue 4 as a Single colorimetric chemosensor for sequential determination of multiple analytes with different optical responses in aqueous media: Cu^{2+}-cysteine using a metal ion displacement and Cu^{2+}-arginine through the host-guest interaction, *Applied biochemistry and biotechnology*, Vol. 187, pp. 913-37, 2019.