

تشخیص رنگ سنجی دوپامین با استفاده از دستگاه‌های تحلیلی مبتنی بر کاغذ میکروسیالی

فاطمه قربانی، مصطفی رحیم‌نژاد*

مرکز پژوهش‌های سوخت‌های زیستی و انرژی‌های تجدیدپذیر، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

عباس رامیار

گروه مکانیک، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

مهدی ازوجی

گروه الکترونیک، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

چکیده: در این کار پژوهشی، یک روش تشخیص رنگ‌سنجی ساده و ارزان برای دوپامین با استفاده از فناوری برش لیزر بر روی دستگاه‌های تحلیلی مبتنی بر کاغذ میکروسیالی، گزارش شد. همچنین تأثیر عامل‌های گوناگون از جمله زمان واکنش بین دوپامین و فریک کلرید، حجم نمونه مصرفی، زمان خشک شدن، pH محلول فنانترولین و نسبت حجمی فریک کلرید / دوپامین مورد بررسی قرار گرفت و بهینه‌سازی شد که مقدار بهینه برای هر کدام از پارامترها به ترتیب، ۴ دقیقه، ۱/۴، ۲/۸ و ۴/۲ μl ، ۱۲ دقیقه، ۷/۴ و ۲:۱ به دست آمد. از تجزیه و تحلیل‌های بعدی با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ، حد تشخیص و حد کمی برای دوپامین ۰/۰۱۷۱ و ۰/۰۵۱۷ میکرومول و انحراف استاندارد نسبی از ۰/۱۲٪ تا ۰/۱۷٪ برای $n = 5$ به دست آمد که دقت خوب این روش را نشان می‌دهد. همچنین در این مطالعه، پتانسیل روش پیشنهادی به عنوان یک روش ارزان قیمت و سریع رنگ‌سنجی برای تعیین دوپامین در نمونه‌های حقیقی از جمله سرم خون انسان نشان داده شد.

واژگان کلیدی: رنگ‌سنجی، دوپامین، برش لیزر، مبتنی بر کاغذ، میکروسیالی، تلفن هوشمند

KEYWORDS: colorimetric detection, dopamine, laser cut, paper-based, microfluidic

مقدمه

شناخت انسان دارد [۲،۱]. همچنین در سلول‌های ایمنی حضور دارد و می‌تواند توسط نفوسیت‌ها سنتز و آزاد شود. دوپامین در غلظت nM تا $10 nM$ ($1 nM$ تا $1 \mu M$) در مایع خارج سلولی سامانه عصبی مرکزی وجود دارد. مهم‌تر از همه این که، تغییرها در غلظت دوپامین

دوپامین (DA) یکی از ساده‌ترین مولکول‌های خانواده کتکول‌آمین^۲ است. دوپامین یک انتقال‌دهنده عصبی حیاتی است که اثرهای مهمی در سامانه عصبی و بسیاری از اندام‌های محیطی ایجاد می‌کند و عملکردهای گوناگونی در حرکت، حافظه، رفتار، خواب و

* عهده‌دار مکاتبات

+Email: rahimnejad@nit.ac.ir

(۱) Dopamine

(۲) Catecholamine

مقیاس‌پذیری و سهولت استفاده را بهبود بخشند [۱۶، ۱۷]. استفاده از کاغذ به‌عنوان یک بستر تحلیلی مدرن به دهه‌های ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ میلادی بازمی‌گردد، که در آن دوره از کاغذ برای کروماتوگرافی^{۱۷} و الکتروفورز^{۱۸} استفاده می‌شد [۱۶]. اولین سنجش زیستی مبتنی بر کاغذ، در سال ۱۹۵۷ میلادی برای شناسایی گلوکز در ادرار معرفی شد. در اواسط دهه ۱۹۶۰ میلادی، این روش به یک فراورده تجاری تبدیل شد و در کمک به تشخیص و مدیریت دیابت محبوبیت زیادی پیدا کرد [۱۸]. دستگاه‌های تحلیلی مبتنی بر کاغذ میکروسیالی (μPAD) اولین بار توسط گروه وایتساید^{۱۹} معرفی شدند که به دلیل سادگی، کم‌هزینه بودن، مصرف کم معرف و نمونه مصرفی، قابلیت حمل و قابلیت دسترسی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۹، ۲۰]. پتانسیل تبدیل کاغذ به تراشه‌های هوشمند میکروسیالی، به تعدادی از کاربردهای سیالی، شامل تشخیص بالینی^{۲۰}، زیست‌شناسی سلولی^{۲۱}، نظارت بر محیط‌زیست^{۲۲} برای غربالگری دارو و تجزیه و تحلیل ایمنی مواد غذایی تبدیل شده‌است. علاوه بر این، آن‌ها به حداقل استفاده از دستگاه‌های پشتیبانی نیاز دارند و به هیچ منبع قدرت بیرونی نیاز ندارند زیرا حرکت سیال با عمل مویرگی کنترل می‌شود [۲۰-۲۲]. μPADها کلاس نوینی از دستگاه‌های تشخیصی مراقبت از نقطه (POC) هستند که ارزان بوده و دارای کارکرد آسان می‌باشند و به طور خاص برای استفاده در کشورهای در حال توسعه و منابع محدود طراحی شده‌اند [۲۳]. چندین روش تشخیصی از جمله اسپکتروفتومتری [۲۴]، رنگ‌سنجی [۲۵]، فلورسنس^{۲۳} [۲۶]، الکتروشیمیایی [۲۷]، لومینسانس الکتروشیمیایی^{۲۴} [۲۸] و لومینسانس شیمیایی [۲۹] به کمک دستگاه‌های مبتنی بر کاغذ انجام شده است. در بین این فناوری‌های تشخیصی، تشخیص رنگ‌سنجی بیش‌ترین کاربرد را دارد زیرا اجرای آن بسیار آسان است و به دستگاه‌های ساده‌ای نیاز دارد. در این روش، محصول‌های رنگی را می‌توان به صورت بصری مشاهده نمود [۲۵].

در شرایط خاص به شدت با اختلال‌های جدی فیزیولوژیکی و روانشناختی، از جمله اختلال بیش‌فعالی کمبود توجه (ADHD)^۱، پارکینسون^۲، آلزایمر^۳ و اسکیزوفرنی^۴ ارتباط دارد [۳، ۴]. بنابراین، تشخیص کمی انتخابی DA برای تشخیص بیماری ضروری است. از این رو، تلاش‌های زیادی برای ایجاد روشی دقیق و حساس برای تشخیص و تعیین سطح DA در نمونه‌های زیستی انجام شده است. به‌طور کلی، تا به امروز غلظت دوپامین توسط پژوهشگران پزشکی با استفاده از کروماتوگرافی معمولی^۵، الکتروفورز مویرگی^۶، آنزیم‌سنجی^۷، فلورومتري^۸، رنگ‌سنجی^۹، اسپکتروفتومتری^{۱۰}، شیمی وارون^{۱۱} و روش‌های الکتروشیمیایی^{۱۲} اندازه‌گیری شده است [۱۱-۵]. روش‌های سنتی بالا دارای برتری‌ها و معایبی هستند. به عنوان نمونه، در حالی که الکتروفورز مویرگی روش تحلیلی حساسی است، نیاز به ابزار دقیق و تخصص برای عملیات دارد که در محیط‌های منابع-محدود عملی نیست [۱۲]. اسپکتروفتومتری به راحتی عمل می‌کند ولی مصرف نمونه آن بالاست [۱۳]. روش الکتروشیمیایی در شناسایی دوپامین حساس است، اما معمولاً نیاز به اصلاح پیچیده الکتروود دارد [۱۳]. رنگ‌سنجی به دستگاه پیچیده نیاز ندارد اما دارای حساسیت تشخیص کم است [۱۴، ۱۵]. از این رو، توسعه روش‌های کارآمد و مناسب برای اندازه‌گیری دوپامین ضروری است.

از مواد گوناگونی برای ساخت دستگاه‌ها و سامانه‌های میکروسیالی مانند سیلیکون^{۱۳}، شیشه، کوارتز^{۱۴}، سرامیک^{۱۵}، استفاده می‌شود. فلزها و پلیمرها نیز بسته به کاربرد، به‌عنوان بستر و ساختار در ساخت میکرو مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین این مواد، پلیمرها یا پلاستیک‌ها به دلیل ویژگی‌های عالی برای سیالات بیوشیمیایی و تولید کم هزینه، در دوره معاصر به یکی از مواد دلخواه برای کاربردهای آزمایشگاه روی تراشه تبدیل شدند. روندهای اخیر در تشخیص نقطه-مراقبت^{۱۶} (POC) میکروسیال‌ها، به سمت مواد یکبار مصرف ارزان قیمت مانند کاغذ و نخ حرکت کرده‌اند تا

(۱) attention deficit hyperactivity disorder

(۳) Alzheimer's

(۵) Conventional chromatography

(۷) Enzyme assay

(۹) Colorimetry

(۱۱) Chemiluminescence

(۱۳) Silicon

(۱۵) Ceramics

(۱۷) Chromatography

(۱۹) Whiteside

(۲۱) Cell Biology

(۲۳) fluorescence

(۲) Parkinson's

(۴) Schizophrenia

(۶) Capillary electrophoresis

(۸) Fluorometry

(۱۰) Spectrophotometry

(۱۲) Electrochemistry

(۱۴) Quartz

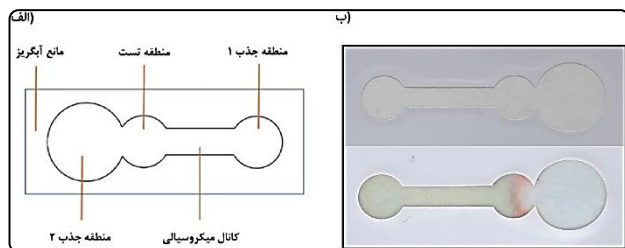
(۱۶) Point-of-care diagnostics

(۱۸) Electrophoresis

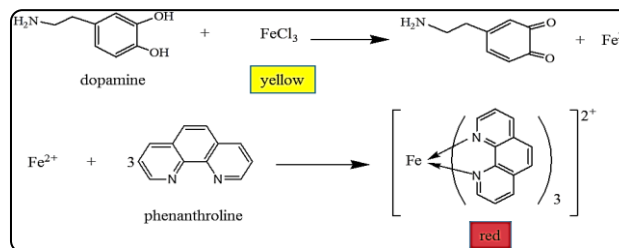
(۲۰) clinical diagnosis

(۲۲) Environmental monitoring

(۲۴) electrochemiluminescence



شکل ۲ - الف) شمایی طراحی شده برای تشخیص دوپامین،
ب) تصویر گرفته شده از μPAD پیش و پس از انجام آزمایش



شکل ۱ - شمایی واکنش سنجش دوپامین [۱۴]

(بابل، ایران) تهیه شدند. محلول دوپامین با حل کردن مقدار مشخصی از پودر دوپامین هیدروکلرید در آب مقطر به دست آمد. از سوی دیگر، محلول فریک کلرید، با مقدار مشخصی از آب مقطر تهیه شد. از محلول‌های مونوپتاسیم فسفات (۱ M) و دی‌پتاسیم فسفات (۱ M) برای ساخت محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pHهای گوناگون استفاده شد، که برای آماده‌سازی این محلول‌ها، مواد در آب مقطر حل شدند و به حجم رسیدند. محلول فنانترولین با افزودن مقدار مشخصی از بافر فسفات ۰/۱ M به دست آمد. کاغذ صافی واتمن درجه ۱ از شرکت آزمیران (تهران، ایران) خریداری شد. همه محلول‌های شیمیایی در مرکز رشد دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل تهیه شد.

دستگاه‌ها و روش‌ها

روش ساخت μPADها

الگوهای μPAD با استفاده از نرم افزار گِرِل^۱ مطابق شکل ۲ - ب طراحی شد. سپس، الگوی طراحی شده بر روی کاغذ صافی واتمن درجه ۱، با استفاده از دستگاه برش لیزر مدل پروفشنال^۲ در یک مرکز طراحی و برش لیزر واقع در قائمشهر برش شد. قطر منطقه جذب ۱، منطقه‌ها آزمایش و جذب ۲ به ترتیب ۸، ۸ و ۱۲ mm، و طول و عرض کانال میکروسیالی به ترتیب ۱۴ و ۴ mm بود. برای ایجاد مانع آب‌گریز مناسب از مواد گوناگونی استفاده شد که نتیجه‌های دلخواهی به همراه نداشتند. سرانجام به‌عنوان ایده نهایی، از برچسب برای ایجاد ناحیه‌های آب‌گریز استفاده شد. به این صورت که برچسب‌ها توسط دستگاه برش لیزر مطابق شکل ۲ برش داده شدند. سپس برای مونتاژ μPAD، برچسب را جدا کرده و کاغذ از

در مطالعه حاضر، اندازه‌گیری رنگ‌سنجی ساده دوپامین در دستگاه‌های تحلیلی مبتنی بر کاغذ میکروسیالی ساده و کم‌هزینه با استفاده از برچسب به‌عنوان سد آب‌گریز توسعه داده شد. واکنش تشخیصی بر اساس واکنش ردوکس دوپامین-آهن (III) کلرید بود که مطابق روش چنیه لیو^۱ و همکاران انجام شد [۱۴]. مطابق این واکنش‌های متوالی، قسمت‌های ارتو هیدروکسیل موجود در حلقه بنزنی، اکسایش ترکیب را تسریع می‌کنند. بنابراین یون فریک، دوپامین را اکسید نموده و به یون فروز کاهش می‌یابد. در مرحله بعد، یون فروز با فنانترولین وارد واکنش شده و کمپلکس قرمز رنگ آهن (II) تریس (۱۰۱-فنانترولین) تشکیل می‌شود (شکل ۱). سپس از منطقه‌های رنگی با گوشی هوشمند در یک جعبه نور با شدت نور یکسان، عکس گرفته شد و تغییرهای شدت رنگ توسط نرم‌افزار فتوشاپ مورد بررسی قرار گرفت. چنیه لو و همکاران [۱۴]، در مطالعه‌ای همانند، از روش چاپ موم برای تعیین رنگ سنجی دوپامین بر روی μPADها استفاده کردند. همچنین، مانانا^۲ و همکاران [۳۰]، در پژوهشی اندازه‌گیری رنگ سنجی ساده دوپامین در فرمولاسیون دارویی بر روی دستگاه‌های مبتنی بر کاغذ ساده و کم هزینه، که با استفاده از فناوری چاپ موم به شکل صفحه well-based ساخته شده‌اند توسعه دادند.

بخش تجربی

مواد

پودر خالص دوپامین هیدروکلرید (سیگما-آلدریج، ایالات متحده) با خلوص بیش از ۹۸٪ از شرکت سفیر آزما (تهران، ایران) خریداری شد. آهن (III) کلرید ۶ آبه (فریک کلرید)^۳، فنانترولین^۴، مونوپتاسیم فسفات^۵، دی‌پتاسیم فسفات^۶ (مرک^۷، آلمان) از آریا پوشش تک

(۱) Chunye Liu

(۳) Iron (III) chloride.6H₂O

(۵) KH₂PO₄

(۷) Merck

(۹) Professional

(۲) Manmana

(۴) Phenantroline

(۶) K₂HPO₄

(۸) Corel

- نازک و سبک است، در طیف گسترده‌ای از ضخامت‌ها موجود است، و شرایط نگهداری و حمل و نقل آن آسان است.
- با نمونه‌های زیستی سازگاری دارد.
- کاغذ را می‌توان به راحتی چاپ، روکش، اصلاح کرد و برش داد.
- کاغذ سلولزی ارزان و در دسترس است.

بسیاری از μ PADها را می‌توان سریع و با هزینه کم روی یک برگه کاغذ چاپ کرد. با این وجود، در تکنولوژی μ PADها، معمولاً مشکل‌های وجود دارد. به عنوان نمونه، معرف‌های رنگی تمایل دارند در اطراف لبه منطقه‌های آزمایش متمرکز شوند، در نتیجه، تعیین مقدار کمی نمونه را دشوار می‌سازند. در صورتی که، در μ PADهایی که در این مطالعه مفصل توضیح داده شد، فنانتروالین و کوکتیل دارای دوپامین و فریک کلرید، در دو منطقه جذب متفاوت قرار گرفتند و با عمل مویرگی به منطقه تشخیص منتقل شدند، در نتیجه از مشکل‌های معمول مرتبط با تراشه‌های کاغذی تک لایه جلوگیری به عمل آمد.

تأثیر عامل‌های گوناگون بر تشخیص دوپامین

عامل‌های گوناگونی می‌توانند بر شدت رنگ ایجاد شده در μ PAD، و در نتیجه تشخیص بهتر دوپامین نقش داشته باشند از جمله: زمان واکنش دوپامین/فریک کلرید، حجم نمونه مصرفی، زمان خشک شدن، pH محلول فنانتروالین و نسبت حجمی فریک کلرید / دوپامین. در بخش‌های بعدی به بررسی جامع‌تر و کامل‌تر هر کدام از پارامترها خواهیم پرداخت.

زمان واکنش بین دوپامین و فریک کلرید

زمان واکنش بین فریک کلرید و دوپامین، شدت رنگ را مطابق شکل ۳ تحت تأثیر قرار داد. به منظور اطمینان از کامل بودن واکنش و همچنین اطمینان از تولید بیش‌ترین شدت رنگ، زمان واکنش دوپامین/فریک کلرید بهینه شد. کوکتیل فریک کلرید و دوپامین در زمان‌های گوناگون در یک میکروتیوب واکنش داد و سپس توسط میکروپیپت در μ PADها ریخته شد. زمان واکنش از ۱۰-۱ دقیقه با فاصله زمانی ۱ دقیقه متغیر بود و pH محلول فنانتروالین نیز روی ۵/۰ ثابت شد. با استفاده از نرم افزار فتوشاپ میانگین شدت رنگ قرمز ایجاد شده در دستگاه به‌دست آمد. برای محاسبه میانگین شدت رنگ قرمز، ۵ نقطه از منطقه تشخیص در درون کانال RGB محاسبه و میانگین آن به‌دست آمد.

در شکل ۳ می‌بینیم که شدت رنگ با افزایش زمان واکنش افزایش یافته و در ۴ دقیقه به اوج می‌رسد و پس از آن شاهد کاهش

پیش برش داده شده را در لایه میانی قرار داده و کاملاً ثابت نمودیم (شکل ۲ - ب). از آن جایی که مواد چسبنده موجود در برچسب‌ها از جنس موم می‌باشد، پس از مونتاژ دستگاه، آن را به مدت ۳ دقیقه درون آن در دمای 100°C قرار دادیم تا موم کاملاً در درون کاغذ نفوذ کرده و موانع آب‌گریز ایجاد شود.

تعیین دوپامین در دستگاه‌های مبتنی بر کاغذ

پس از ساخت μ PADها، مقدار $4/2 \mu\text{l}$ محلول دوپامین (۰/۱٪) به همراه $8/4 \mu\text{l}$ محلول فریک کلرید (۱٪) در درون یک میکروتیوب به مدت ۶ دقیقه باهم واکنش دادند، سپس کوکتیل ($12/6 \mu\text{l}$) دارای فریک کلرید و دوپامین توسط میکروپیپت در منطقه جذب ۱ و $12/6 \mu\text{l}$ فنانتروالین (۰/۲٪) در منطقه جذب ۲ ریخته شدند. در اینجا، نسبت حجم فریک کلرید به دوپامین ۱:۲ بود. تشکیل کمپلکس در منطقه آزمایش پس از جریان یافتن محلول‌ها به این منطقه به روش عمل جذب مویرگی صورت می‌گیرد که باعث تشکیل کاتیون رنگی قرمز می‌شود. پس از گذشت زمان خشک شدن ۱۰ دقیقه، عکس‌هایی از منطقه‌های رنگی با استفاده از دوربین تلفن‌های هوشمند در یک جعبه نور گرفته شد. سپس تصویرها به نرم‌افزار فتوشاپ منتقل شد و میانگین شدت رنگ قرمز ایجاد شده در دستگاه به‌دست آمد. برای محاسبه میانگین شدت رنگ قرمز ۵ نقطه از منطقه تشخیص در درون کانال RGB محاسبه و میانگین آن محاسبه شد.

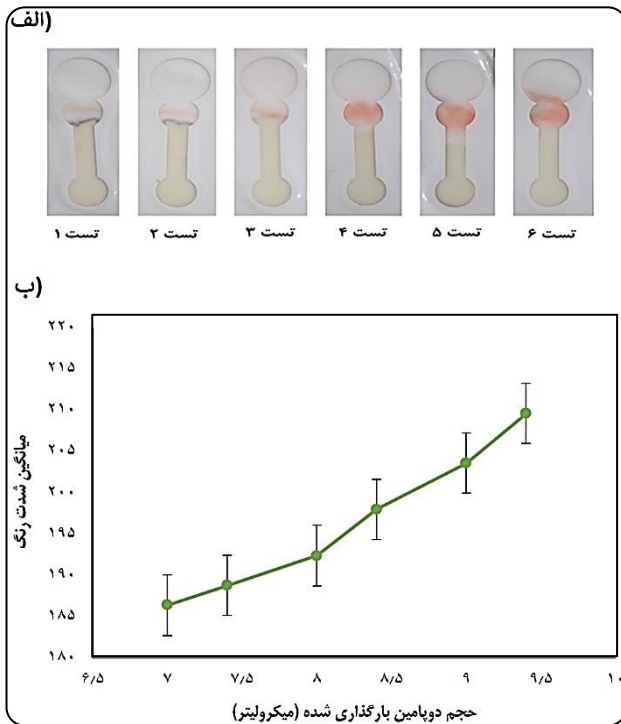
آماده‌سازی نمونه حقیقی

نمونه سرم خون داوطلب سالم از مرکز انتقال خون واقع در شهر بابل تهیه شد. برای تشخیص دوپامین در نمونه، مقدار $100 \mu\text{l}$ استون به نمونه سرم اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه مطابق روش گفته شده توسط چانه‌لو و همکاران [۱۴]، سانتریفیوژ شد تا هرگونه پروتئین باقی‌مانده و ماتریس رسوب‌دهنده را پاک کند. مایع رومانند به یک میکروتیوب 2 ml منتقل و با گاز N_2 خشک شد و آب یون‌زدایی شده اضافه شد تا نمونه سرم در آن حل شده و به‌دست آید. در نهایت غلظت دوپامین در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

مزیت الگوهای μ PAD

استفاده از کاغذ سلولزی به عنوان بستر برای ایجاد μ PAD شامل برتری‌های گوناگونی می‌شود [۳۲، ۳۱]:

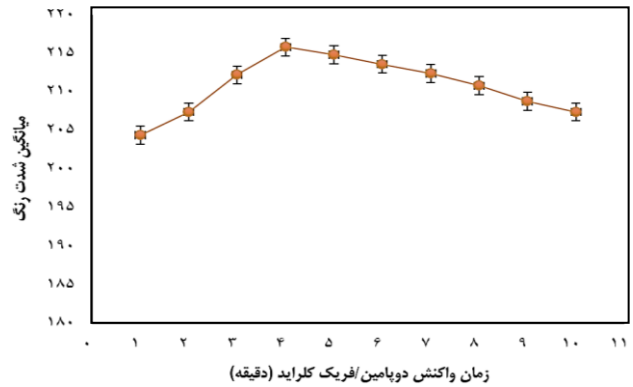


شکل ۴ - (الف) تصویرهای گرفته شده از μ PADها پس از انجام آزمایش. (ب) منحنی اثر حجم دوپامین بارگذاری شده بر میانگین شدت رنگ

این پارامتر، زمان واکنش کوکتیل، حجم نمونه، مقدار pH و نسبت فریک کلرید به دوپامین به ترتیب در ۴ دقیقه، $27 \mu\text{l}$ و 0.5 و $2:1$ ثابت شد. زمان خشک شدن بین ۱۶-۶ دقیقه متغیر بود. نتیجه‌های به دست آمده از نمودار (شکل ۵) نشان داد که، بیشترین نرخ شدت رنگ در زمان ۱۲ دقیقه به دست آمد، لذا این زمان به عنوان زمان بهینه در نظر گرفته شد. با توجه به نمودار، می‌بینیم که برای زمان خشک شدن طولانی‌تر از مقدار بهینه، سیگنال رنگ کاهش می‌یابد. یک دلیل احتمالی این است که کاغذها تا ۱۲ دقیقه اندکی خیس بودند و پس از ۱۲ دقیقه به طور کامل خشک شدند که این مسئله، کاهش شدت رنگ را توضیح می‌دهد.

PH محلول فنانتروлін

از آن جایی که محلول فنانتروлін توسط بافر فسفات تهیه می‌شود، لذا مقدار pH بر شکل‌گیری و پایداری کمپلکس فروز-فنانتروлін تأثیر می‌گذارد. برای انجام آزمایش نخست محلول‌های فنانتروлін با pHهای ۵، ۶، ۷، $7/4$ و ۸ تهیه شد. در ارزیابی اثر pH فنانتروлін بر رشد رنگ، زمان واکنش کوکتیل، حجم نمونه، زمان خشک شدن و نسبت فریک کلرید به دوپامین به ترتیب در ۴ دقیقه، $21 \mu\text{l}$ ، ۱۲ دقیقه و $2:1$ به دست آمد. همان‌گونه که در شکل ۶



شکل ۳ - نمودار تغییرهای زمان واکنش دوپامین/فریک کلرید بر حسب میانگین شدت رنگ ایجاد شده

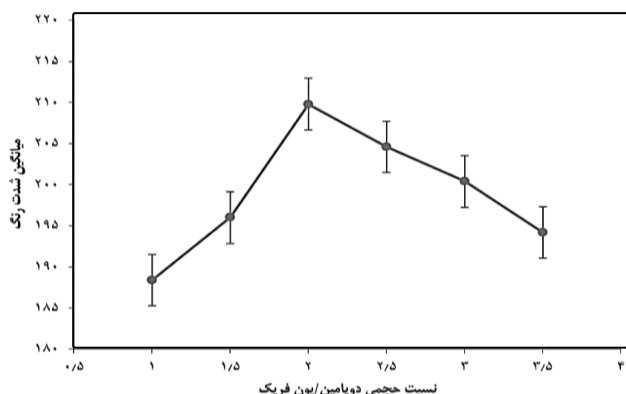
میزان نرخ رنگ هستیم. نکته دارای اهمیت این است که از یک طرف، اگر آزمایش خیلی کوتاه باشد، زمان واکنش برای ایجاد یک پاسخ بصری کافی نیست. از طرف دیگر، اگر زمان واکنش بیش از حد طولانی باشد، با توجه به این که یون فروز به آسانی در هوا اکسید شده و به یون فریک تبدیل می‌شود، از میزان رنگ ایجاد شده کاسته خواهد شد. با توجه به نتیجه‌های آزمایش‌ها، زمان واکنش دوپامین/فریک کلرید برای آزمایش‌های پیش رو در ۴ دقیقه ثابت شد.

حجم نمونه مصرفی

همان‌گونه که استفاده از حجم نمونه کم ممکن است برای کامل شدن رنگ کافی نباشد، افزودن بیش از حد محلول می‌تواند سبب انتشار معرف‌ها به خارج از منطقه‌های آزمایش شود. بنابراین، حجم نمونه‌ها بهینه شد. به منظور ارزیابی اثر مقدار حجم نمونه در توسعه رنگ، μ PADها با استفاده از دوپامین در بازه حجمی 7 تا $9/4 \mu\text{l}$ و زمان واکنش، زمان خشک شدن، مقدار pH و نسبت فریک کلرید به دوپامین به ترتیب در ۴ دقیقه، ۶ دقیقه، $5/0$ و $2:1$ مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین شدت رنگ در منطقه تشخیص با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل ۴ می‌بینیم که با افزایش حجم نمونه، شدت رنگ افزایش می‌یابد. اما در آزمایش شماره ۶ مقداری محلول از منطقه تشخیص به بیرون نشت کرد لذا افزایش بیش‌تر حجم باعث افزایش نشت می‌شود. بر اساس این نتیجه می‌توان تشخیص شماره ۵ را به‌عنوان حجم بهینه در نظر گرفت (دوپامین $9 \mu\text{l}$ ، فریک کلرید $18 \mu\text{l}$ و فنانتروлін $27 \mu\text{l}$).

زمان خشک شدن

عامل دیگری که می‌تواند بر افزایش شدت رنگ تأثیر بگذارد، زمان خشک شدن پس از پیت کردن محلول‌ها است. برای ارزیابی



شکل ۷ - منحنی اثر نسبت حجمی فریک کلرید/دوپامین بر میانگین شدت رنگ

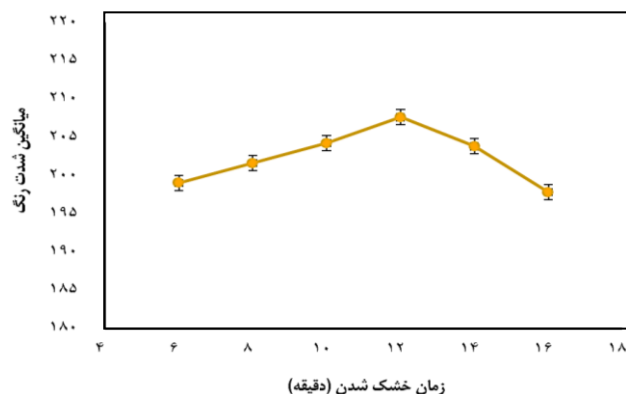
افزایش می‌یابد و با نسبت ۲:۱ به اوج می‌رسد و هنگامی که نسبت بالاتر از ۲:۱ می‌باشد، اندکی کاهش می‌یابد.

بهبودسازی اندازه‌های μPAD

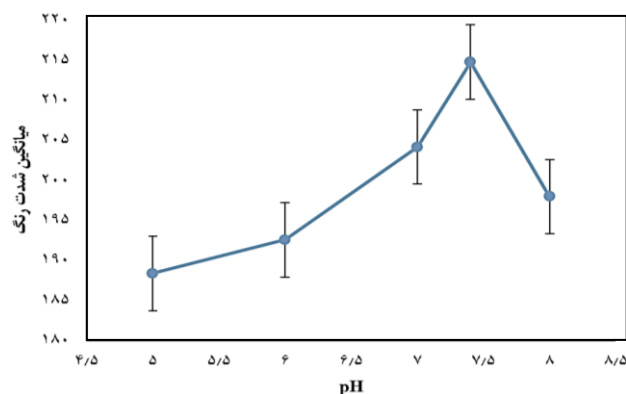
برای دستیابی به هندسه بهینه و همچنین اثبات برتری وجود کانال میکروسیالی در ساختار سامانه، ۴ هندسه گوناگون (۲ هندسه دارای کانال میکروسیالی و ۲ هندسه بدون کانال میکروسیالی) توسط نرم‌افزار کرل طراحی و توسط دستگاه برش لیزر برش داده شد. μPAD ها مطابق مرحله‌های گفته شده در بخش‌های پیشین آماده شدند. سپس به‌عنوان نمونه آزمایش اثر زمان واکنش دوپامین/فریک کلرید برای هر کدام از هندسه‌ها انجام شد و نتیجه‌ها به‌دست آمد. در هندسه‌های دارای کانال مشاهده شد که شدت رنگ با افزایش زمان واکنش افزایش یافته، در ۴ دقیقه به اوج رسید و پس از آن روند نزولی را طی کرد. برای هندسه‌های بدون کانال، روند تغییرهای شدت رنگ از قانون خاصی پیروی نکرد و دو برآمدگی در نمودار مشاهده شد. می‌توان علت این پدیده را عدم وجود کانال میکروسیالی عنوان کرد. چرا که وجود کانال سبب هدایت مناسب محلول در سامانه شده و از حرکات اضافی محلول‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. علاوه بر این، میزان شدت رنگ به‌دست آمده کمتر از هندسه‌های دارای کانال بود که همه این موارد برتری وجود کانال میکروسیالی را نشان می‌دهد.

بهبودسازی مجدد پارامترها برای هندسه منتخب

مطابق بخش‌های پیش، عامل‌های مؤثر بر شدت رنگ قرمز ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه‌ها نشان داد که کوچک‌سازی اندازه‌ها تأثیری بر روی pH محلول فنانترویلین، زمان



شکل ۵ - منحنی اثر زمان خشک شدن بر میانگین شدت رنگ



شکل ۶ - منحنی اثر pH بر میانگین شدت رنگ

نشان داده شده است، شدت رنگ از pH ۵/۰ تا ۷/۰ افزایش یافته، در ۷/۴ به اوج می‌رسد و در pH ۸ کاهش می‌یابد. در نتیجه، مقدار pH بهینه ۷/۴ است. نتیجه به‌دست آمده نتیجه دلخواهی برای ما می‌باشد، زیرا pH بهینه در بازه pH خون انسان قرار دارد و برای پژوهش‌های انسانی مناسب است.

نسبت حجمی فریک کلرید/دوپامین

نسبت حجمی فریک کلرید به دوپامین بر شدت رنگ به‌دست آمده تأثیر دارد. برای دستیابی به شدت رنگ مناسب، دوپامین باید به طور کامل اکسیده شود. برای ارزیابی این پارامتر بر توسعه رنگ، نسبت حجمی دوپامین به فریک کلرید از ۱/۰ تا ۳/۵ متغیر بود و پارامترهای دیگر با مقدار بهینه به دست آمده از پیش ثابت شدند. برای تأیید این نسبت، دوپامین (۱/۰٪) و حجم‌های گوناگون فریک کلرید (۱٪) در یک میکروتیوب مخلوط شد. کوکتیل به مدت ۴ دقیقه واکنش نشان داد و سپس در μPAD ها ریخته شد. حجم فنانترویلین (۲/۰٪) در $21 \mu\text{l}$ ثابت شد. نتیجه‌های شکل ۷ نشان داد که با افزایش نسبت حجمی دوپامین به فریک کلرید، شدت رنگ

$LOQ = \frac{10 \times S_0}{Slope}$ ، که در آن S_0 انحراف استاندارد است، 0.171 و $0.517 \mu M$ محاسبه شد. این در حالی است که، اکسورن و همکاران [۳۳] در روشی همانند، منحنی‌های کالیبراسیون بازه‌های خطی ۱ تا ۲، ۲۵ تا ۲۰ و 0.5 تا 10 mM را به ترتیب برای ساکارز، فروکتوز و گلوکز ارایه کردند که مقادیر LOD برای ساکارز 0.9 mM ، برای فروکتوز 0.8 mM و برای گلوکز 0.4 mM بود. علاوه بر این، مقدار LOD در سنجش رنگ سنجی دوپامین در مطالعه چانه‌لو و همکاران [۱۴]، در بازه 0.00527 تا $4/75$ میکرومولار، $0.37 \mu M$ به دست آمد.

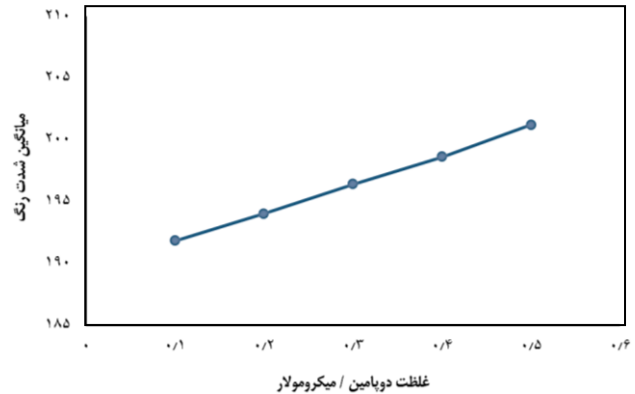
انتخاب و تکرارپذیری روش

μPAD توسعه یافته برای تعیین دوپامین در مایع‌های زیستی پیشنهاد داده شده است، بنابراین باید اثر تداخلی گونه‌های احتمالی موجود در مایع‌های زیستی (یون‌های گوناگون، ترکیب‌های زیستی و موادی که معمولاً در فرمولاسیون‌های دارویی وجود دارند) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گیرد. لذا با توجه به مطالعه‌های انجام شده بر روی مقاله‌هایی که از روش‌های گوناگون برای تعیین غلظت دوپامین در مایع‌های زیستی استفاده کردند، محلول یون‌های Mg^{2+} ، Cu^{2+} ، Zn^{2+} با غلظت ۱۰۰ برابر و مولکول‌های ساکاروز، گلوکز، دکستروز با غلظت ۵۰ برابر به‌عنوان نمونه تهیه شد و آزمایش تداخل یون‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

میزان انحراف برای یون‌ها و مولکول‌های ذکر شده به ترتیب -0.272 ، $+1.76$ ، -0.491 ، $+2.18$ ، $+2.75$ ، -3.02 به دست آمد. نتیجه‌های به دست آمده نشان داد که بیش‌ترین انحراف مثبت مربوط به گلوکز ($+2.75\%$) و کم‌ترین انحراف منفی مربوط به دکستروز (-3.02%) است. همه ترکیب‌ها دارای انحراف در دامنه -3% تا $+3\%$ بودند که نشان می‌دهد ۶ ماده مداخله کننده در تشخیص دوپامین در شرایط بهینه دخالت نمی‌کنند.

تعیین دوپامین در نمونه حقیقی

از سرم خون انسان برای نشان دادن کاربرد بالقوه روش پیشنهادی برای تعیین دوپامین استفاده شد. برای تایید اعتبار داده‌ها، یک محلول دوپامین با غلظت مشخص به نمونه حقیقی اضافه شد تا بازیابی را بررسی کند. آزمایش‌ها پس از افزودن غلظت‌های 0.2 ، 0.4 و $0.6 \mu M$ دوپامین در محلول نمونه انجام و برای هر کدام از غلظت‌ها ۵ بار تکرار شد. در پایان مقدار RSD و درصد بازیابی از معادله‌های موجود محاسبه شد و بازیابی رضایت‌بخشی از 101% به 102.5% برای دوپامین در نمونه سرم خون انسان به دست آمد.



شکل ۸ - منحنی کالیبراسیون رسم شده برای غلظت‌های گوناگون محلول دوپامین

واکنش دوپامین و فریک کلرید و نسبت حجمی فریک کلرید / دوپامین نداشت، اما بر روی سایر پارامترها تأثیرگذار بود. کاملاً روشن است که با کوچک‌سازی دستگاه میکروسیالی، حجم نمونه مصرفی کاهش می‌یابد. که این مسئله برای ما بسیار دارای اهمیت بود چرا که یکی از اهداف این پژوهش استفاده از کم‌ترین میزان محلول‌ها و واکنش‌گرها است. طی عمل کوچک‌سازی مقدار مصرف محلول‌ها تا بیش از ۶ برابر کاهش یافت. در مورد پارامتر اثر زمان خشک شدن نیز طی عمل کوچک‌سازی، مدت زمان خشک شدن کاهش یافته و در نتیجه بیش‌ترین نرخ میانگین شدت رنگ در زمان ۱۰ دقیقه اتفاق افتاد که زمان کم‌تری نسبت به اندازه‌های بزرگ‌تر (۱۲ دقیقه) بود. نکته دارای اهمیت دیگر این است که از لحاظ میانگین شدت رنگ نیز استفاده از اندازه‌های کوچک‌تر نتیجه‌های بهتری را به دنبال داشت. لذا می‌توان گفت فرایند مینیاتورسازی در کاهش زمان فرایند و همچنین افزایش نرخ رنگ نقش بسزایی دارد.

اعتبارسنجی روش

به منظور تشخیص غلظت دوپامین در نمونه‌ها، منحنی کالیبراسیون به دست آمد (شکل ۸). برای رسم منحنی کالیبراسیون، محلول‌های گوناگون دوپامین در بازه غلظت $0.5 - 0.1 \mu M$ تهیه شد. سپس مطابق آزمایش‌های پیشین مقدار مشخصی از محلول‌ها ($1/4 \mu l$) دوپامین، $2/8 \mu l$ فریک کلرید و $4/2 \mu l$ فنانترولین) توسط میکروپیپت بر روی دستگاه ریخته شد و میانگین شدت رنگ توسط نرم‌افزار فتوشاپ مورد بررسی قرار گرفت. متوسط شدت رنگ متناسب با غلظت دوپامین در بازه خطی بود. معادله منحنی $y = 23.4x + 189.38$ و ضریب همبستگی خطی $R^2 = 0.9992$ به دست آمد. مقدار LOD و LOQ روش توسعه یافته به ترتیب با استفاده از روابط $LOD = \frac{3 \times S_0}{Slope}$ و

و کوکتیل (دوپامین و فریک کلرید)، در دو منطقه جذب متفاوت قرار گرفتند و با عمل موبرگی و بدون هیچ گونه نیروی بیرونی به منطقه تشخیص منتقل شدند، در نتیجه از مشکل‌های معمول مرتبط با تراشه‌های کاغذی تک لایه به‌عنوان نمونه، تمایل تمرکز معرف‌های رنگی در اطراف لبه منطقه‌های آزمایش و در نتیجه کاهش دقت در تعیین کمی نمونه جلوگیری به عمل آمد.

جدول ۱ - تعیین دوپامین در نمونه‌های حقیقی (n=5)

نمونه رقیق شده	دوپامین اضافه شده (μM)	دوپامین پیدا شده (μM)	انحراف استاندارد نسبی (%)	بازیابی (%)
سرم خون انسان	۰/۲	۰/۲۰۲	۰/۱۶	۱۰۱
	۰/۴	۰/۴۰۹	۰/۱۵	۱۰۲/۲۵
	۰/۶	۰/۶۱۲	۰/۱۷	۱۰۲

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک روش رنگ‌سنجی ساده، ارزان، قابل اطمینان، قابل حمل و سازگار با محیط‌زیست برای تعیین غلظت دوپامین توسعه داده شد. همچنین، برای اولین بار از برچسب به عنوان مانع آب‌گریز استفاده شد. این ماده به دلیل در دسترس بودن، قیمت پایین، انعطاف‌پذیری، ایجاد وضوح بالا بین منطقه‌های آبدوست و آب‌گریز، آرایه دقت و بازتولید مناسب و قابلیت تولید انبوه، محدودیت‌های روش‌های پیشین را ندارد و می‌تواند گزینه مناسبی برای پژوهش‌های پیش رو باشد. تصویرها با استفاده از دوربین تلفن هوشمند در یک جعبه نور گرفته و سپس به نرم‌افزار فتوشاپ منتقل شد تا میانگین شدت رنگ قرمز در کانال RGB محاسبه شود. μPAD های پیشنهاد شده می‌توانند برای اندازه‌گیری دوپامین در پلاسما، سرم و یا نمونه‌های دیگر زیستی استفاده شوند. این روش، دقت، انتخاب‌پذیری و تکرارپذیری مناسبی را نشان می‌دهد و LOD و LOQ به دست آمده عدد دلخواهی را در مقایسه با پژوهش‌های همانند روی μPAD ها در شرایط بهینه نشان می‌دهد. علاوه بر این، تولید μPAD ها و سامانه‌های توسعه رنگ عملی و راحت است. به علاوه، این روش پتانسیل تشخیص بدون دستگاه‌ها را نشان می‌دهد زیرا واکنش شیمیایی روی کاغذ با چشم غیر مسلح قابل دیدن است. سکوی تحلیلی از مواد سلولزی ساخته شده است که هم ارزان است و هم با بسیاری از مواد شیمیایی سازگار بوده و به راحتی قابل استفاده و ذخیره‌سازی است. بنابراین، از این دستگاه‌ها می‌توان برای سایر واکنش‌های شیمیایی که شامل روش‌های تحلیلی است، استفاده کرد. در μPAD های پیشنهادی، فنانتروپین

قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل قدردانی نمایند. این پروژه تحت حمایت مالی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل با شماره گرنت (BNUT/370393/1400) بوده است.

فهرست نمادها

$^{\circ}\text{C}$	درجه سلسیوس
C	غلظت
M	مولار
μM	میکرو مولار
ml	میلی لیتر
nM	نانو مولار
mm	میلی متر
μl	میکرو لیتر
Zn	روی
Cu	مس
Ca	کلسیم
Mg	منیزیم

تاریخ دریافت: ۱۶/۰۵/۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳/۱۰/۱۴۰۰

مراجع

- [1] Hafezi-Mehrjardi A., Beheshti-Marnani A., Askari N., "Cu²⁺ Loaded" Zeolite A"/Nitrogen-Doped Graphene as a Novel Hybrid for Simultaneous Voltammetry Determination of Carbamazepine and Dopamine, *Materials Chemistry and Physics*, **225**: 137-144 (2019).

- [2] Rostami S., Mehdinia A., Jabbari A., [Intrinsic Peroxidase-Like Activity of Graphene Nanoribbons for Label-Free Colorimetric Detection of Dopamine](#), *Materials Science and Engineering: C*, **114**: 111034 (2020).
- [3] Pirino B.E., Spodnick M.B., Gargiulo A.T., Curtis G.R., Barson J.R., Karkhanis A.N., [Kappa-Opioid Receptor-Dependent Changes in Dopamine and Anxiety-Like or Approach-Avoidance Behavior Occur Differentially across the Nucleus Accumbens Shell Rostro-Caudal Axis](#), *Neuropharmacology*, **181**: 108341 (2020).
- [4] Wai J.M., Grassetto A., Slifstein M., Matuskey D., Nabulsi N., Ropchan J., Labaree D., Huang Y., Martinez D., [Binge Alcohol Use Is Not Associated with Alterations in Striatal Dopamine Receptor Binding or Dopamine Release](#), *Drug and alcohol dependence*, **205**: 107627 (2019).
- [5] Rasheed P.A., Lee J.-S., [Recent Advances in Optical Detection of Dopamine Using Nanomaterials](#), *Microchimica Acta*, **184(5)**: 1239-1266 (2017).
- [6] Qi S., Zhao B., Tang H., Jiang X., [Determination of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid by a Novel Electrochemical Sensor Based on Pristine Graphene](#), *Electrochimica Acta*, **161**: 395-402 (2015).
- [7] Jothi L., Neogi S., kumar Jaganathan S., Nageswaran G., [Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid by a Novel Electrochemical Sensor Based on N₂/Ar Rf Plasma Assisted Graphene Nanosheets/Graphene Nanoribbons](#), *Biosensors and Bioelectronics*, **105**: 236-242 (2018).
- [8] Zhao H., Zhu Y., Liao F., Gao A., Shao Y., Shao M., [Additive-Free Gold Nanoparticles Induced by Gamma Ray Irradiation for Voltammetric Detection of Dopamine](#), *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **18(7)**: 4495-4500 (2018).
- [9] Ye H., Wang H., Zhang B., Zhao F., Zeng B., [Tremella-Like ZnIn₂S₄/Graphene Composite Based Photoelectrochemical Sensor for Sensitive Detection of Dopamine](#), *Talanta*, **186**: 459-466 (2018).
- [10] Kong D., Zhuang Q., Han Y., Xu L., Wang Z., Jiang L., Su J., Lu C.-H., Chi Y., [Simultaneous Voltammetry Detection of Dopamine and Uric Acid in Human Serum and Urine with a Poly \(Procaterol Hydrochloride\) Modified Glassy Carbon Electrode](#), *Talanta*, **185**: 203-212 (2018).
- [11] Chen Q., Liang C., Zhang X., Huang Y., [High Oxidase-Mimic Activity of Fe Nanoparticles Embedded in an N-Rich Porous Carbon and Their Application for Sensing of Dopamine](#), *Talanta*, **182**: 476-483 (2018).
- [12] Šolínová V., Žáková L., Jiráček J., Kašička V., [Pressure Assisted Partial Filling Affinity Capillary Electrophoresis Employed for Determination of Binding Constants of Human Insulin Hexamer Complexes with Serotonin, Dopamine, Arginine, and Phenol](#), *Analytica chimica acta*, **1052**: 170-178 (2019).
- [13] Boumya W., Achak M., Bakasse M., El Mhammedi M., [Indirect Determination of Dopamine and Paracetamol by Electrochemical Impedance Spectroscopy Using Azo Coupling Reaction with Oxidized 2, 4-Dinitrophenylhydrazine \(Dnph\): Application in Commercial Tablets](#), *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **5(2)**: 218-223 (2020).

- [14] Liu C., Gomez F.A., Miao Y., Cui P., Lee W., [A Colorimetric Assay System for Dopamine Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices](#), *Talanta*, **194**: 171-176 (2019).
- [15] Wang J., Du R., Liu W., Yao L., Ding F., Zou P., Wang Y., Wang X., Zhao Q., Rao H., [Colorimetric and Fluorometric Dual-Signal Determination of Dopamine by the Use of Cu-Mn-O Microcrystals and C-Dots](#), *Sensors and Actuators B: Chemical*, **290**: 125-132 (2019).
- [16] Gong M.M., Sinton D., [Turning the Page: Advancing Paper-Based Microfluidics for Broad Diagnostic Application](#), *Chemical reviews*, **117(12)**: 8447-8480 (2017).
- [17] Alfihed S., Holzman J.F., Foulds I.G., [Developments in the Integration and Application of Terahertz Spectroscopy with Microfluidics](#), *Biosensors and Bioelectronics*, **165**: 112393 (2020).
- [18] LIANG S.-J., Ji-Kai M., Chen G., Dong-Dong Y., Jian-Guang Z., [Research and Application Progress of Paper-Based Microfluidic Sample Preconcentration](#), *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **47(12)**: 1878-1886 (2019).
- [19] Fu L.-M., Wang Y.-N., [Detection Methods and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices](#), *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **107**: 196-211 (2018).
- [20] Nuchtavorn N., Macka M., [A Novel Highly Flexible, Simple, Rapid and Low-Cost Fabrication Tool for Paper-Based Microfluidic Devices \(Mpsds\) Using Technical Drawing Pens and in-House Formulated Aqueous Inks](#), *Analytica chimica acta*, **919**: 70-77 (2016).
- [21] Lim W.Y., Thevarajah T.M., Goh B.T., Khor S.M., [Paper Microfluidic Device for Early Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction Via Quantitative Multiplex Cardiac Biomarker Detection](#), *Biosensors and Bioelectronics*, **128**: 176-185 (2019).
- [22] Tseng C.-C., Yang R.-J., Ju W.-J., Fu L.-M., [Microfluidic Paper-Based Platform for Whole Blood Creatinine Detection](#), *Chemical engineering journal*, **348**: 117-124 (2018).
- [23] Ruiz-Vega G., Arias-Alpizar K., de la Serna E., Borgheti-Cardoso L.N., Sulleiro E., Molina I., Fernández-Busquets X., Sánchez-Montalvá A., Del Campo F.J., Baldrich E., [Electrochemical Poc Device for Fast Malaria Quantitative Diagnosis in Whole Blood by using Magnetic Beads, Poly-Hrp and Microfluidic Paper Electrodes](#), *Biosensors and Bioelectronics*, **150**: 111925 (2020).
- [24] Chen Z., Zhang C., Zhou T., Ma H., [Gold Nanoparticle Based Colorimetric Probe for Dopamine Detection Based on the Interaction between Dopamine and Melamine](#), *Microchimica Acta*, **182(5-6)**: 1003-1008 (2015).
- [25] Nguyen Q.H., Kim M.I., [Nanomaterial-Mediated Paper-Based Biosensors for Colorimetric Pathogen Detection](#), *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **132**: 116038 (2020).
- [26] Hao G., Zhang Z., Ma X., Zhang R., Qin X., Sun H., Yang X., Rong J., [A Versatile Microfluidic Paper Chip Platform Based on Mips for Rapid Ratiometric Sensing of Dual Fluorescence Signals](#), *Microchemical Journal*, **157**: 105050 (2020).
- [27] Zhou Y., Kablan A., Engelberg D.L., [Metallographic Screening of Duplex Stainless Steel Weld Microstructure with a Bipolar Electrochemistry Technique](#), *Materials Characterization*, **169**: 110605 (2020).

- [28] Wang F., Fu C., Huang C., Li N., Wang Y., Ge S., Yu J., [Based Closed Au-Bipolar Electrode Electrochemiluminescence Sensing Platform for the Detection of Mirna-155](#), *Biosensors and Bioelectronics*, **150**: 111917 (2020).
- [29] Mesgari F., Beigi S.M., Fakhri N., Hosseini M., Aghazadeh M., Ganjali M.R., [Based Chemiluminescence and Colorimetric Detection of Cytochrome C by Cobalt Hydroxide Decorated Mesoporous Carbon](#), *Microchemical Journal*, **157**: 104991 (2020).
- [30] Manmana Y., Chutvirasakul B., Suntornsuk L., Nuchtavorn N., Cost Effective Paper-Based Colorimetric Devices for a Simple Assay of Dopamine in Pharmaceutical Formulations Using 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine-Silver Nitrate as a Chromogenic Reagent, *Pharm. Sci. Asia*, **46**: 270-277 (2019).
- [31] Ghosh R., Gopalakrishnan S., Savitha R., Renganathan T., Pushpavanam S., [Fabrication of Laser Printed Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Point-of-Care Applications](#), *AIChE*, (2019).
- [32] Zhong Z., Wu R., Wang Z., Tan H., [An Investigation of Paper Based Microfluidic Devices for Size Based Separation and Extraction Applications](#), *Journal of Chromatography B*, **1000**: 41-48 (2015).
- [33] Aksorn J., Teepoo S., Development of the Simultaneous Colorimetric Enzymatic Detection of Sucrose, Fructose and Glucose Using a Microfluidic Paper-Based Analytical Device, *Talanta*, **207**: 120302 (2020).