

<연구논문(학술)>

황원자를 함유한 아미노산 검출용 전하이동형 색소에 관한 연구

신인섭 · 권선영¹ · 마츠모토 신야 · 김성훈^{1,†}

요코하마 국립대학 환경정보연구원, ¹경북대학교 섬유시스템공학과

Charge Transfer Dye Probe for Thiol-containing Amino Acid

In Sub Shin, Seon Yeong Gwon¹, Shinya Matsumoto and Sung Hoon Kim^{1,†}

Graduate School of Environment and Information Sciences,
Yokohama National University, Yokohama, Japan

¹Department of Textile System Engineering, Kyungpook National University, Daegu, Korea

(Received: October 07, 2015 / Revised: November 09, 2015 / Accepted: November 26, 2015)

Abstract: Two new D- π -A dyes were synthesized by the condensation reaction between active methyl and aromatic aldehyde and its biothiols sensing properties in DMSO/water were investigated by UV-vis spectroscopy. Upon addition of Hg²⁺, the solution of D- π -A dyes showed color change and the absorption band shows a formation of a dye-Hg²⁺ coordination complex. These dyes exhibited high selectivity for Hg²⁺ as compared with other cations. The dye-Hg²⁺ could be recovered by adding glutathione(GSH). The absorption intensity of dye-Hg²⁺ increased only by the addition of glutathione(GSH). The competition experiments revealed that no obvious interference was observed by performing the titration with the mixture of glutathione(GSH) and other amino acids. The results indicated that these D- π -A dyes were highly selective for glutathione(GSH) detection.

Keywords: cysteine(Cys), glutathione(GSH), homocysteine(Hcy), biothiols sensing, D- π -A dyes

1. 서 론

최근 유기 기능성 색소재료가 광학 센서분야에 많이 사용되고 있다¹⁻³⁾. 온도센서, 중금속 이온센서, 혈당센서, 면역센서, 바이오센서, UV센서 등에 응용되고 있으며 센서용 자극 응답성 광기능성색소의 사용으로 감도의 향상, 즉 극미량의 화합물 등 정보의 정밀한 감지가 가능하게 되었다. 특히 바이오센서의 중요성이 커지고 있고 세포, 단백질 그리고 DNA와 같은 생물학적 시료들을 광학적인 관찰 영역에서 관찰하고, 그 생화학적, 병리학적 특성 등의 생화학적 반응을 측정하기 위하여 다양한 종류의 바이오센서들이 연구 되고 있다⁴⁻⁷⁾. 이런 바이오센서는 기하학적 형상에 따라 주변의 광원과 조합하여 저렴하고 편리하게 효율적으로 사용되고 있다. 아미노산 센서도 그 중 하나이다.

아미노산 중에서도 유일하게 티올기(-SH)를 가지는 아미노산을 biothiols이라고 한다. Biothiols은 인간 대사 작용에 중요한 역할을 하고 있고, 여러 가지 유해물질로부터 보호하며, 사람 몸의 일부분을 구성하고 있다. 이러한 biothiols이 부족한 경우 여러 가지 심각한 질병에 노출되기 때문에 biothiols의 농도를 감지할 수 있는 바이오센서에 관한 연구도 계속 되고 있다⁸⁻²⁰⁾. 전자 이동형 색소(Charge transfer dye, CT형 색소)는 주위 환경 변화에 아주 민감하게 반응하는 특징을 가지고 있어, 외부 자극을 인식하여 흡수, 발광의 변화를 유발시키는 기능성 색소, 즉 광학 센서용 재료로 사용되어지고 있다²¹⁾.

본 연구에서는 강한 전자 받개(acceptor)인 2-(3-cyano-4,5,5-trimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile (TCF), 2-(2-methyl-4H-chromen-4-ylidene)malononitrile 등이 도입된 D- π -A형 색소를 합성하고 이들 색소를 이용한 biothiols 센서의 특성에 관해 연구했다. 주요 biothiols(Cys, GSH, Hcy)의 구조는 Figure 1에 나타냈다.

[†]Corresponding author: Sung Hoon Kim(shokim@knu.ac.kr)
© 2015 The Korean Society of Dyers and Finishers.
All rights reserved. TCF 27-4/2015-12/261-269

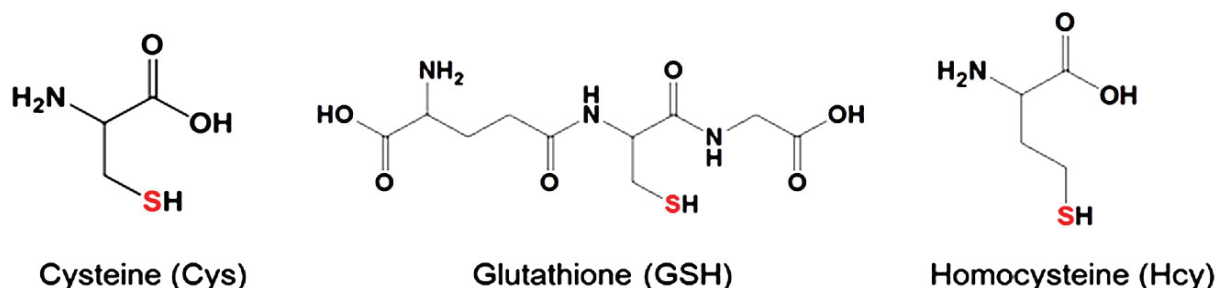


Figure 1. Structure of cysteine(Cys), glutathione(GSH) and homocysteine(Hcy).

2. 실험

2.1 시약

아미노산류인 L-cysteine, L-homocysteine, L-glutathione, amino acid(Ala, Met, Val, Pro, Leu, Thr, Gln, Asp, Nor, Ie, Trp, Phe, Glu, Gly, Cystine, Homocystine, His, Arg, Lys) 및 각종시약, 용매류는 Aldrich Chemical의 시약을 사용 하였다.

원소분석은 Carlo Erba Model 1106을 사용했으며, 녹는점은 Electrothermal IA900을 이용하여 측정 하였다.

Direct Mass는 direct probe EI방식을 사용한 Shimadzu QP-1000 spectrometer를 사용했으며 70eV 조건에서 측정하였다. ¹H NMR spectra는 DMSO-d₆, D₂O, CDCl₃용매에서 TMS를 기준물질로 한 Varin Inova 400MHz FT-NMR spectrometer를 사용하였고, UV-Vis 흡수 spectra는 Agilent 8453 spectrometer를 이용하여 측정하였다. 형광 spectra는 Shimadzu RF-5301PC Fluorescence spectrometer를 이용하여 측정하였다.

2.2 합성

2.2.1 4-(Bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino)benzaldehyde (3)의 합성

아세톤 200mL에 K₂CO₃(3.93g, 28.43mmol)를 첨가 하고 1시간 질소기류 하에서 온도를 120℃까지 승 온시켜 교반시킨다.

4-(Bis(2-chloroethyl)amino)benzaldehyde 1(2g, 8.125 mmol)를 첨가 후 10분 정도 교반 후, 2-mercaptoethanol 2(1.71mL, 24.38mmol)을 첨가하고 24시간동안 환류 하에서 교반하면서 반응을 진행 하였다. 냉각 후 자연필터 하고 용매를 제거하면 갈색의 점성 있는 액 체 3 2.4g(89.8%)을 얻는다²²⁾.

2.2.2 (E)-2-(2-(4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)-amino)styryl)-4H-chromen-4-ylidene)malononitrile (Dye 5)의 합성

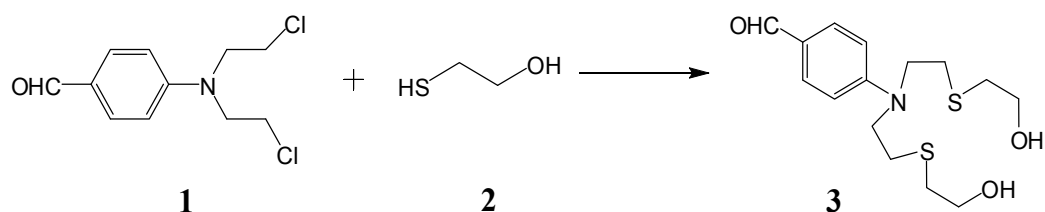
2-(2-Methyl-H-chromen-4-ylidene)malononitrile 4(0.47g, 2.25mmol)과 4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino) benzaldehyde 3(1.37g, 4.0mmol)를 acetonitrile 25mL에 첨가 후 piperidine 5방울을 첨가한 후 질 소기류 하에서 온도를 120℃까지 승온 시켜 교반 시킨다. 24시간동안 환류 하에서 교반 하면서 반 응을 진행 하였다. 냉각 후 용매를 제거하고 컬럼 으로 불순물을 제거·분리하여 적색의 dye 5 0.5g (수율: 42.5%)을 얻었다(용매: CH₂Cl₂/EtOH(10:1, v/v)).

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) : δ 2.65(t, J=6.7, 4H), 2.73(t, J=7.6, 4H), 4.87(s, 2H), 6.75(d, J=9.0, 2H), 6.90(s, 1H), 7.16(d, J=15.8, 1H), 7.57~7.63(m, J=7.0, 3H), 7.67(d, J=15.9, 1H), 7.78(d, J=8.4, 1H), 7.88(t, J=7.1, 1H), 8.71(d, J=9.6, 1H). EA : Anal. Calcd. for C₂₈H₂₉N₃O₃S₂ : C, 64.71; H, 5.62; N, 8.09; S, 12.31. Found : C, 64.80; H, 5.87; N, 7.88; S, 11.83%. M⁺ : 519.2.

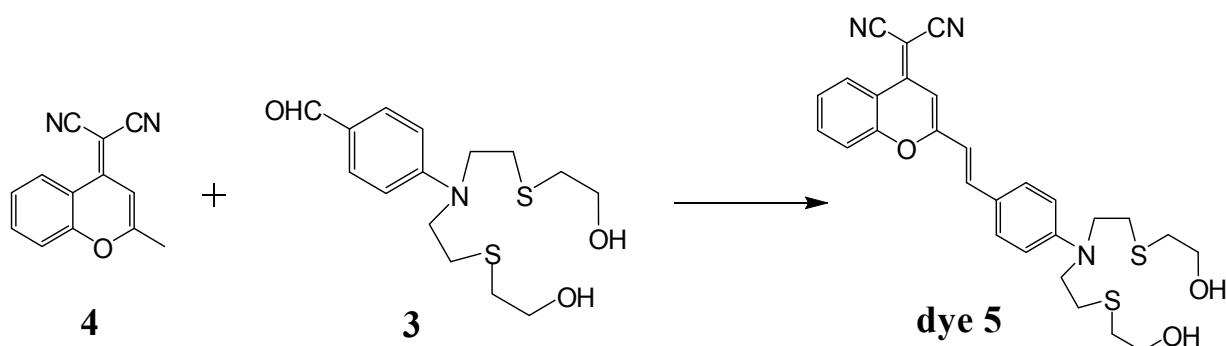
2.2.3 (E)-2-(4-(4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)-amino)styryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile (Dye 7)의 합성

2-(3-Cyano-4,5,5-trimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile 6(0.5g, 2.5mmol)과 4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino)benzaldehyde 3(0.83g, 2.5mmol)를 ethanol 25mL에 첨가 후 piperidine 5방울을 첨가 한 후 질소기류 하에서 온도를 120℃까지 승온 시켜 교반 시킨다. 24시간동안 환류 하에서 교반 하면서 반응을 진행하였다.

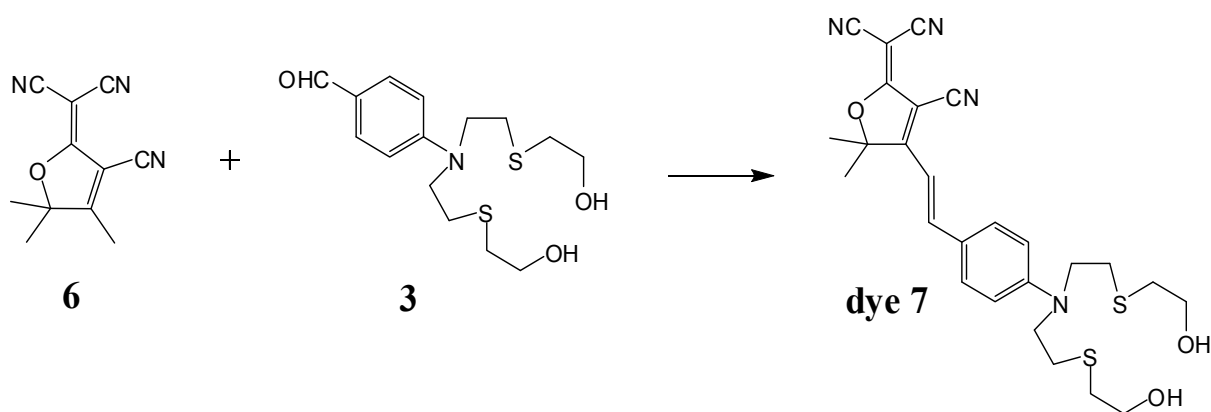
냉각 후 용매를 제거하고 컬럼으로 불순물을 제 거·분리하여 dye 7 0.45g (35.3%)을 얻는다(용매: CH₂Cl₂/EtOH(20:1, v/v)).



Scheme 1. Synthesis of 4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino)benzaldehyde (3)



Scheme 2. Synthesis of E-2-(2-(4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino)styryl)-4H-chromen-4-ylidene)malononitrile (Dye 5)



Scheme 3. Synthesis of (E)-2-(4-(4-(bis(2-(2-hydroxyethylthio)ethyl)amino)styryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile (Dye 7)

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ 1.66(s, 6H), 2.59(t, J=6.6, 5H), 2.69(t, J=7.36, 5H), 3.61(t, J=7.2, 6H), 4.89(t, J=5.44, 2H), 6.82~6.74(m, J=7.6, 3H), 7.69(d, J=8.92, 2H), 7.83(d, J=15.88, 1H). EA : Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: C, 61.15; H, 5.92; N, 10.97. Found : C, 60.68; H, 5.95; N, 10.33%. M^+ : 510.2.

3. 결과 및 고찰

3.1 Dye 5의 biothioliol 센싱

Dye 5는 전자 받개(acceptor) 4와 전자 주개(donor) 3을 사용하여 합성하였다.

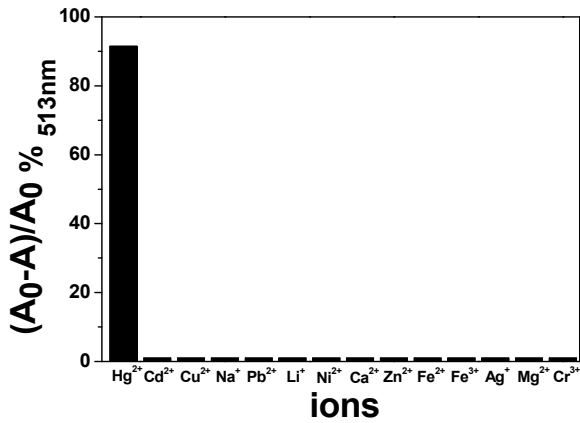


Figure 2. The absorbance response $(A_0-A)/A_0$ of dye 5 (20 μ M) towards metal ions ($\lambda=513$ nm).

Dye 5에 양이온들을 첨가한 결과, Hg^{2+} 이온에만 반응하여 UV-Vis 흡수 변화를 나타내고 다른 양이온들과는 흡수 변화를 나타내지 않아 dye 5는 Hg^{2+} 이온에 선택성을 가진다는 것을 알 수 있었다(Figure 2).

Dye 5에 Hg^{2+} 이온을 첨가한 후의 광학적 변화를 측정된 결과 흡수 스펙트럼이 513nm에서 규칙적으로 감소하고 415nm에서는 증가 한다는 것을 알 수 있었다(Figure 3).

Dye 5- Hg^{2+} 용액에 biothiol을 첨가 한 결과 UV-Vis 흡수 변화를 일으켰다.

Biothiol과의 광학적 변화를 측정 (Dye 5 용액 + Hg^{2+} 4당량 + Cys, Hcy, GSH을 측정) 한 결과, 흡수 스펙트럼이 513nm에서 Cys, Hcy, GSH는 각각 2, 2.5, 1.5당량까지 원상태의 dye 5의 흡광도까지 증가 하였다(Figure 4).

Dye 5와 Hg^{2+} 이온의 혼합물에 biothiol을 첨가하는 반응에서는 Benesi-Hildebrand method(식1)를 이용하여 상수 k 값을 계산하였으며 Cys, Hcy, GSH는 각각 $8.18 \times 10^2 M^{-1}$, $5.26 \times 10^2 M^{-1}$, $3.48 \times 10^3 M^{-1}$ 로 나타났다.

$$1/(A-A_0) = 1/k(A_{max}-A_0)[biothiol] + 1/(A_{max}-A_0) \dots (1)$$

where,

A : the absorbance of dye 5

A_0 : the absorbance obtained with biothiols

A_{max} : the absorbance obtained with excess amount of biothiols

따라서 반응속도는 $GSH > Cys > Hcy$ 순으로 나타낼 수 있고 dye 5와 GSH이 가장 반응성이 좋은 것

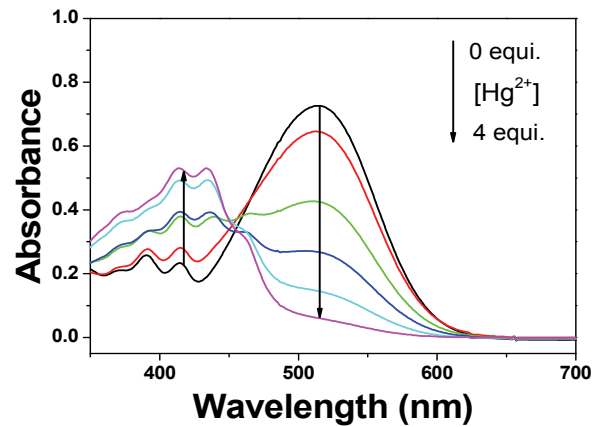


Figure 3. Absorption spectra change of dye 5 (20 μ M) upon addition of Hg^{2+} (0~4 equiv.) in acetonitrile /water (5:5, v/v).

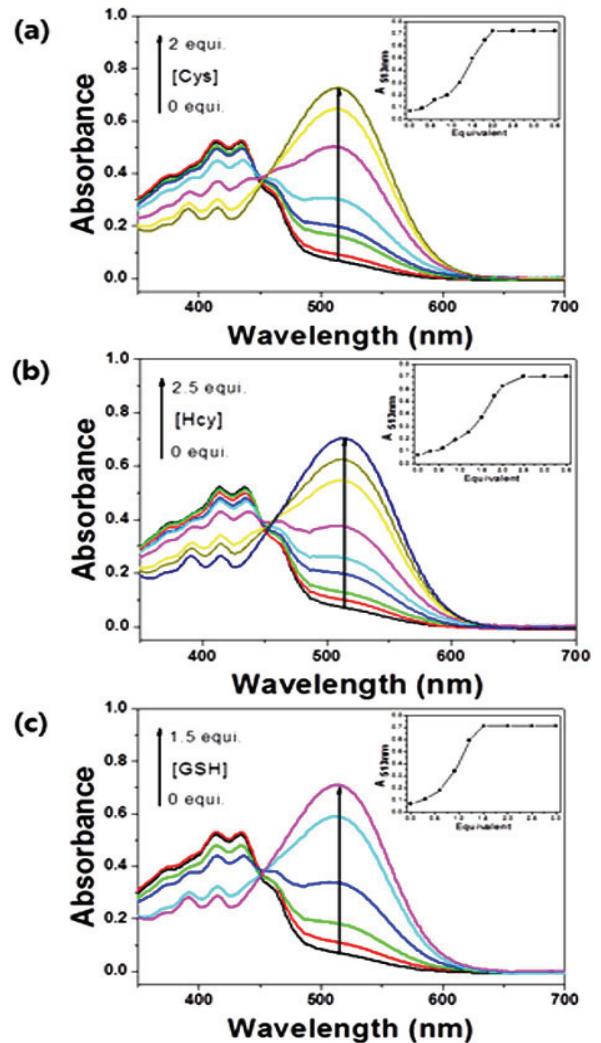


Figure 4. Changes of UV-Vis absorption for ensemble dye 5- Hg^{2+} (20 μ M dye 5 and 80 μ M Hg^{2+}) upon addition of (a) Cys, (b) Hcy, (c) GSH in acetonitrile/water (5:5, v/v).

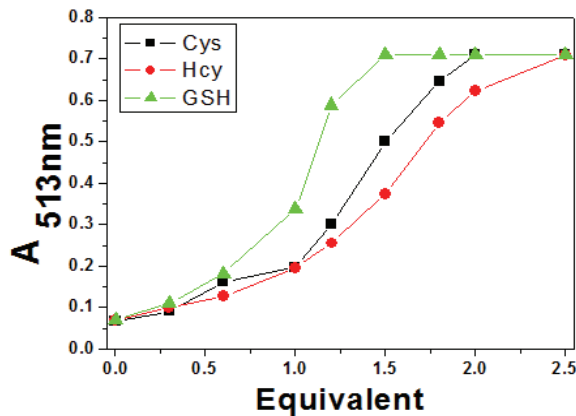


Figure 5. Equivalent dependant absorption intensity change of ensemble dye 5-Hg²⁺(20μM dye 5 and 80μM Hg²⁺) in the presence of Cys, Hcy, GSH at 513nm in a mixture of acetonitrile and water(5:5, v/v).

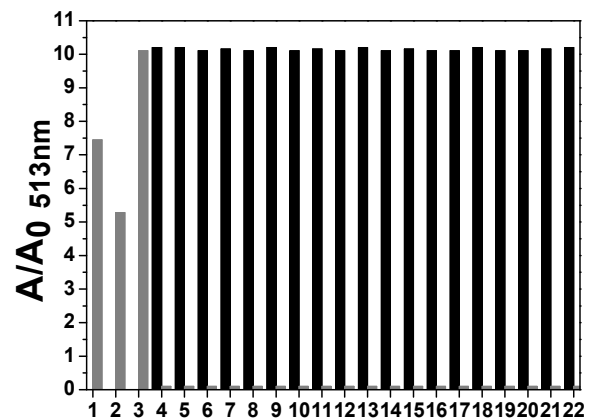


Figure 7. A/A₀ 513nm change profile of dye 5(20μM) to various amino acids(1.5 equiv.). Gray bars represent the addition of 1.5 equiv. of various amino acids to a 20μM solution of dye 5. Black bars represent the addition of 1.5 equiv. of GSH to the above solution, respectively. 1, Cys; 2, Hcy; 3, GSH; 4, Ala; 5, Met; 6, Val; 7, Pro; 8, Leu; 9, Thr; 10, Gln; 11, Asp; 12, Nor; 13, Ile; 14, Trp; 15, Phe; 16, Glu; 17, Gly; 18, Cystine; 19, Homocystine; 20, His; 21, Arg; 22, Lys.

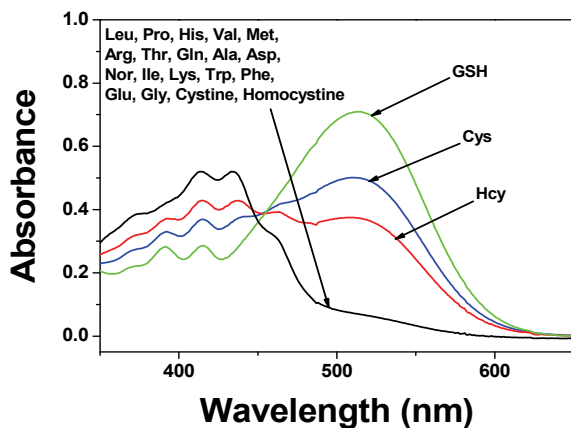


Figure 6. Absorption spectra of ensemble dye 5-Hg²⁺(20μM dye 5 and 80μM Hg²⁺) upon addition of 1.5 equiv. of various amino acids.

을 알 수 있다(Figure 5). Dye 5와 Hg²⁺이온의 혼합물과 GSH의 선택성을 위해 biothiol과 다양한 아미노산(Ala, Met, Val, Pro, Leu, Thr, Gln, Asp, Nor, Ile, Trp, Phe, Glu, Gly, Cystine, Homocystine, His, Arg, Lys)을 동일한 조건에서 측정 하였다. 그 결과 Cys, Hcy, GSH의 다른 아미노산들의 첨가는 biothiol의 센싱에 관여 하지 않음을 알 수 있었다(Figure 6).

Biothiol을 제외한 아미노산이 dye 5와 Hg²⁺이온의 혼합물에 직접적으로 반응이 일어나지 않지만 GSH이 첨가 된 상태에 영향을 미칠수 있기 때문에 dye 5와 Hg²⁺이온의 혼합물에 GSH를 첨가 하였을 때 biothiol의 다른 아미노산들이 영향을 미치는지 알아보기 위해 경쟁반응을 조사한 결과 무시해도 좋을 정도의 변화가 관찰 되었으므로 다른 아미노산들이 GSH 첨가 된 상태에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다(Figure 7).

Dye 5와 Hg²⁺이온의 혼합물이 GSH에 선택적으로 작용함에 따라 육안으로도 쉽게 확인 가능할 정도로 색상 변화가 뚜렷한 반면, 다른 아미노산들은 색상 변화를 일으키지 않았다(Figure 8).

Dye 5는 형광성을 가지고 있고 형광 센서로 이용할 수 있기 때문에 형광강도 변화를 관찰해 보았다. Dye 5에 Hg²⁺이온을 첨가함에 따라 dye 5의 형광강도가 감소했다(Figure 9).



Figure 8. Photos of ensemble dye 5-Hg²⁺ in the presence of amino acids.

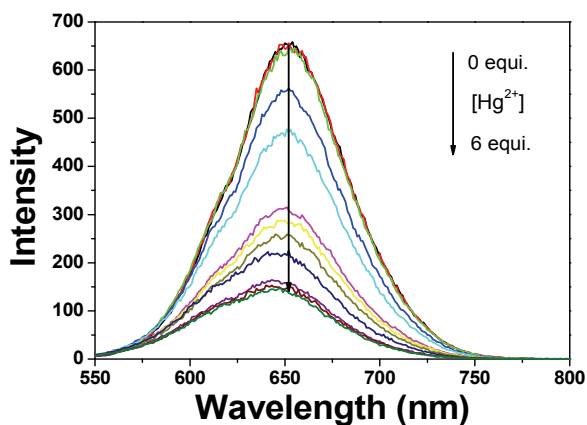


Figure 9. Fluorescent spectra change of dye 5 (20 μM) upon addition of Hg²⁺ (0~6 equiv.) in acetonitrile /water (5:5, v/v).

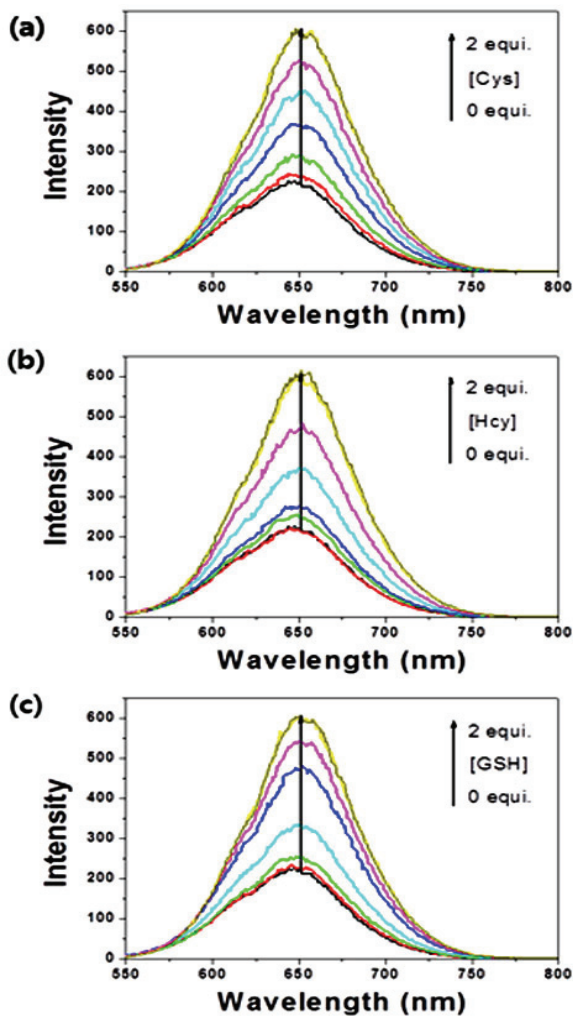


Figure 10. Changes of UV-Vis fluorescent intensity for ensemble dye 5-Hg²⁺ (20 μM dye 5 and 8 μM Hg²⁺) upon addition of (a) Cys, (b) Hcy, (c) GSH in acetonitrile /water (5:5, v/v).

Dye 5와 Hg²⁺이온의 혼합물에 biothiol을 첨가한 후 형광강도의 변화를 측정했다.

그 결과 Hg²⁺이온 때문에 감소하였던 dye 5의 형광강도가 biothiol을 첨가 후 원상태 dye 5의 형광강도까지 증가하였다(Figure 10).

3.2 Dye 7의 biothiol 센싱

Dye 7는 전자 받개 6과 전자 주개 3을 사용하여 합성하였다. Dye 7에 양이온들을 첨가한 결과 Hg²⁺이온에 가장 큰 UV-Vis 흡수 변화를, Ag⁺이온에는 작은 흡수 변화를 일으키고 다른 양이온들과는 흡광도 변화를 일으키지 않았다(Figure 11).

Dye 7과 Hg²⁺이온과의 광학적인 변화 반응으로부터 흡수 스펙트럼이 588nm에서 규칙적으로 감소하고 430nm에서 증가함을 알 수 있었다(Figure 12).

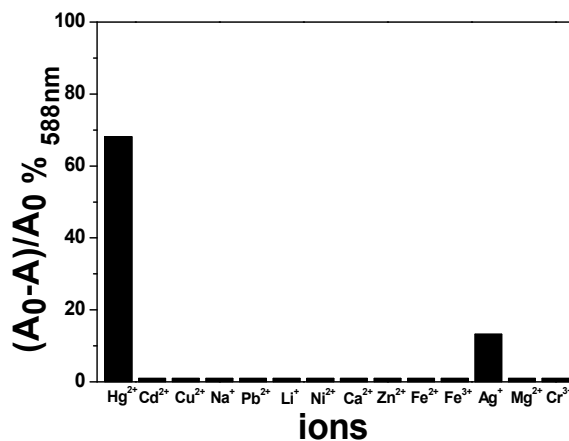


Figure 11. The absorbance response(A₀-A)/A₀ of dye 7 (20 μM) towards metal ions(λ=588 nm).

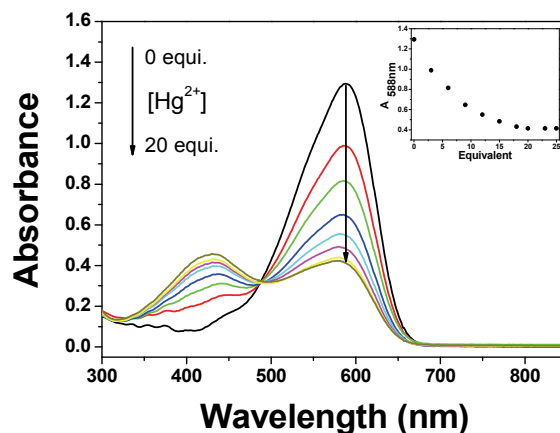


Figure 12. Absorption spectra change of dye 7(20 μM) upon addition of Hg²⁺ (0~20 equiv.) in DMSO/water (7:3, v/v).

Dye 7이 Hg^{2+} 이온에 선택적으로 작용함에 따라 육안으로도 쉽게 확인 가능할 정도로 Hg^{2+} 이온에 색상 변화가 뚜렷하게 나타나고 Ag^+ 이온에서는 작은 변화를 나타내는 반면, 다른 양이온들에서는 색상 변화가 나타나지 않았다(Figure 13).

Dye 7은 형광성을 가지고 있고 형광 센서로 이용할 수 있기 때문에 형광강도 변화를 관찰해 보았다. Dye 7에 Hg^{2+} 이온을 첨가함에 따라 dye 7의 형광강도가 감소했다(Figure 14).

Dye 7과 Hg^{2+} 이온의 혼합물에 biothiol을 첨가한 결과 UV-Vis 흡수파장에 변화가 나타났으며 biothiol과의 광학적 변화는 흡수 스펙트럼이 588nm에서 biothiol 15당량까지 원상태 dye 7의 흡광도까지 증가 하였다(Figure 15).

Dye 7와 Hg^{2+} 이온의 혼합물과 biothiol의 반응에서 Benesi-Hildebrand method(식1)를 이용하여 상수 k값 을 계산한 결과 Cys, Hcy, GSH은 각각 $1.07 \times 10^2 M^{-1}$, $6.5 \times 10^1 M^{-1}$, $1.47 \times 10^2 M^{-1}$ 로 나타났다.

따라서 반응속도는 $GSH > Cys > Hcy$ 순으로 나타낼 수 있고, dye 7과 GSH이 반응성이 가장 좋은 것을 알 수 있다(Figure 16).

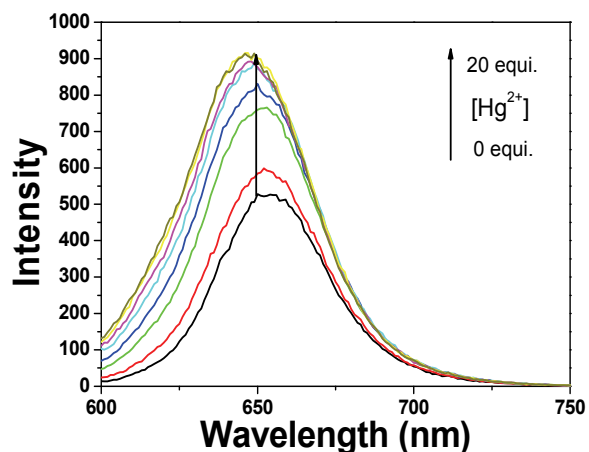


Figure 14. Fluorescent spectra change of dye 7(20 μ M) upon addition of Hg^{2+} in DMSO/water(7:3, v/v).

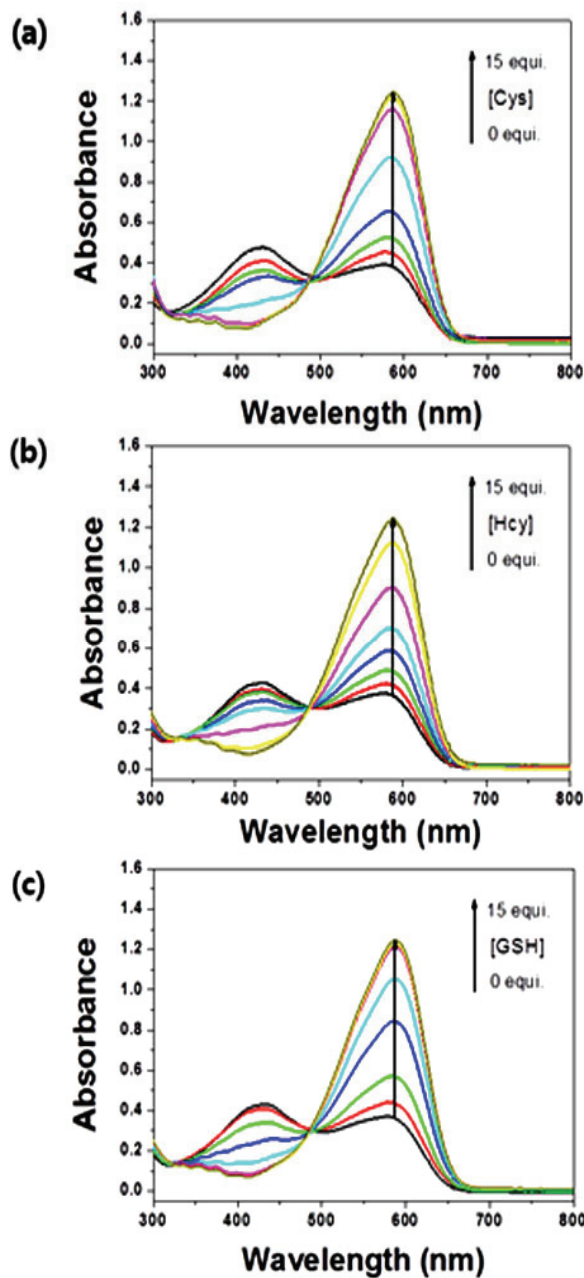


Figure 15. Changes of UV-Vis absorption for ensemble dye 7- Hg^{2+} (20 μ M dye 7 and 80 μ M Hg^{2+}) upon addition of (a) Cys, (b) Hcy, (c) GSH.



Figure 13. Photos of dye 7 in the presence of different metal ion.

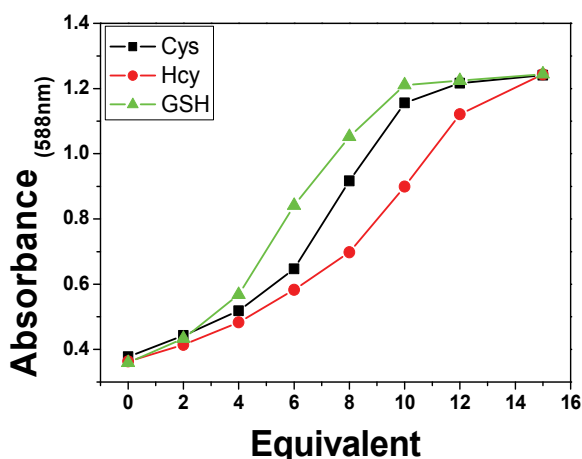


Figure 16. Equivalent dependant absorption intensity change of ensemble dye 7-Hg²⁺ (20 μM dye 7 and 80 μM Hg²⁺) in the presence of Cys, Hcy, GSH at 588nm in a mixture of DMSO and water(7:3, v/v).

4. 결 론

본 연구에서는 신규 D-π-A형색소를 합성한 후 biothiols(Cys, Hcy, GSH)의 센싱에 따른 흡수, 형광 스펙트라의 변화와 같은 광학적 성질들을 연구하였다. Dye 5와 7은 양이온과의 반응에서 Hg²⁺이온에 선택적으로 반응하고, Hg²⁺이온과 양상불인 biothiols과의 반응에서는 GSH에 선택성을 가진다. 또한 biothiols을 제외한 다른 아미노산에는 영향을 받지 않았다. 이들 색소는 흡수 스펙트럼뿐만 아니라 형광 스펙트럼에서 동일한 변화를 나타냈다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2014R1A2A2A01002985).

References

1. S. H. Lee, J. Kumar, and S. K. Tripathy, Thin Film Optical Sensors Employing Polyelectrolyte Assembly, *Langmuir*, **16**, 10482(2000).
2. Y. Lio, R. C. Mills, J. M. Boncella, and K. S. Schanze, Fluorescent Polyacetylene Thin Film Sensor for Nitroaromatics, *Langmuir*, **17**, 7452(2001).
3. T. A. Dickinson, J. White, J. S. Kauer, and D. R. Walt, A Chemical-detecting System Based on a Cross-reactive Optical Sensor Array, *Nature*, **382**, 697(1996).
4. J. S. Bae, S. Y. Gwon, and S. H. Kim, Anthraquinone-carbamodithiolate Assembly as Selective Chromogenic Chemosensor for Fe³⁺, *Textile Coloration and Finishing*, **25**(1), 13(2013).
5. Y. A. Son and S. H. Kim, Anthraquinone and Indole based Chemosensor for Fluoride Anions Detection, *Textile Coloration and Finishing*, **26**(1), 1(2014).
6. D. G. Myszk, Improving Biosensor Analysis, *J. Mol. Recognit.*, **12**, 279(1999).
7. J. Liu and Y. Lu, A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6642(2003).
8. J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, and J. Dichgans, Glutathione, Oxidative Stress and Neurodegeneration, *European J. of Biochemistry*, **267**, 4904(2000).
9. S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. B. D. Agostino, P. W. F. Wilson, and P. A. Wolf, Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease, *New Engl. J. Med.*, **346**, 476(2002).
10. R. O. Ball, G. C. Martin, and P. B. Pencharz, The In Vivo Sparing of Methionine by Cysteine in Sulfur Amino Acid Requirements in Animal Models and Adult Humans, *J. Nutr.*, **136**, 1682S(2006).
11. R. Hong, G. Han, J. M. Fernandez, B. J. Kim, N. S. Forbes, and V. M. Rotello, Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1078(2006).
12. S. Shahrokhian, Lead Phthalocyanine as a Selective Carrier for Preparation of a Cysteine-Selective Electrode, *Anal. Chem.*, **73**, 5972(2001).
13. H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygard, and S. E. Vollset, Homocysteine and Cardiovascular Disease, *Annual Review of Medicine*, **49**, 31(1998).
14. J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, and J. Dichgans, Glutathione, Oxidative Stress and Neurodegeneration, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4904(2000).
15. Z. A. Wood, E. Schroder, J. R. Harris, and L. B. Poole, Structure, Mechanism and Regulation of Pero-

- xiredoxins, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 32(2003).
16. I. S. Shin, S. Y. Gwon, and S. H. Kim, Chromogenic Sensing of Biological Thiols Using Squarylium Dye, *Dyes and Pigments*, **120**, 642(2014).
 17. L. E. Khairy, P. M. Ueland, H. Refsum, I. M. Graham, and S. E. Vollset, Plasma Total Cysteine as a Risk Factor for Vascular Disease, *Circulation*, **103**, 2544(2001).
 18. B. S. V. Asbeck, J. Hoidal, G. M. Vercellotti, B. A. Schwartz, C. F. Moldow, and H. S. Jacob, Protection against Lethal Hyperoxia by Tracheal Insufflation of Erythrocytes: Role of Red Cell Glutathione, *Science*, **227**, 756(1985).
 19. V. P. Wellner, M. E. Anderson, R. N. Puri, G. L. Jensen, and A. Meister, Radioprotection by Glutathione Ester: Transport of Glutathione Ester into Human Lymphoid Cells and Fibroblasts, *Proceedings of Natl. Acad. Sci., USA*, Vol.81, p.4732, 1984.
 20. L. H. Lash, T. M. Hagen, and D. P. Jones, Exogenous Glutathione Protects Intestinal Epithelial Cells from Oxidative Injury, *Proceedings of Natl. Acad. Sci., USA*, Vol.83, p.4641, 1986.
 21. Y. Suzuki and K. Yokoyama, Design and Synthesis of Intramolecular Charge Transfer-Based Fluorescent Reagents for the Highly-Sensitive Detection of Proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17799(2005).
 22. L. Yuanyuan, W. Fangfang, L. Yan, H. Song, and Z. Xianshung, Novel Mercury Sensor based on Water Soluble Styrylindolium Dye, *Dyes and Pigments*, **96**, 424(2013).