

Design and Fabrication of Laccase Enzyme Biosensor Based on Graphene Oxide and Polyaniline for the Measurement of Dephostatin

Mitra Ghodrati Shahtouri¹,
Hamed Fathi^{2,3},
Davod Ilbeigi^{4,5},
Mehdi Mogharabi-Manzari^{6,7},
Ebrahim Fooladi⁸

¹ PhD Candidate in Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

² MSc in Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Candidate in Plant Biology-Systematic, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Torbat Hedariyeh University of Medical Sciences, Torbat Hedariyeh, Iran

⁵ Health Sciences Research Center, Torbat Hedariyeh University of Medical Sciences, Torbat Hedariyeh, Iran

⁶ Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ Assistant Professor, Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

(Received July 13, 2024; Accepted October 23, 2024)

Abstract

Background and purpose: A biosensor is composed of two main components: a biological sensing element and a transducer, which together determine the concentration of the analyte by facilitating a biological reaction near the transducer to improve detection capabilities. Compared to traditional analyte measurement and biochemical control methods, biosensors offer advantages such as reusability, fast response times, and high specificity. Laccase is a critical enzyme within the oxidoreductase family, with catalytic properties particularly effective toward ortho- and para-diphenols, depending on the producing organism. Unlike many enzymes that act exclusively on a specific substrate, laccase catalyzes the oxidation of a broad range of substrates, including diphenols, polyphenols, diamines, methoxyphenols, aromatic amines, and ascorbate. Protein tyrosine phosphatases are a class of enzymes that remove phosphate groups from tyrosine residues in proteins. This project aimed to design and develop an enzyme-based biosensor using modified screen-printed carbon electrodes with high sensitivity and selectivity for accurate and rapid dephostatin measurement.

Materials and methods: The biosensor was fabricated by immobilizing laccase on the electrode surface. First, the surface of the screen-printed carbon electrode was modified with a graphene oxide/polyaniline nanocomposite, after which the laccase enzyme was immobilized on the modified surface using EDC/NHS linkers. Electrochemical characteristics of the electrodes were assessed using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Optimal parameters, including oxidation potential, pH, temperature, and concentration, were calibrated. At an oxidation potential of 0.45 V relative to the Ag/AgCl electrode, the current response for each sample was measured with the biosensor. Calibration curves were generated, and measurements were obtained by interpolating the amperometric signals from dephostatin solutions. Dephostatin standards were then introduced to the diluted Nescafe sample (phosphate buffer, 0.05 M, pH 6.5) without any pretreatment, and recovery rates were calculated.

Results: By immobilizing graphene oxide and laccase on the electrode surface, the modified electrode exhibited increased cathodic and anodic currents compared to the unmodified electrode in $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ solution. Due to the presence of graphene nanoparticles on the electrode surface, the electron transfer rate improved, as indicated by a 20 μA increase. The electrode response was linear across a concentration range of 10 to 900 nM, with a detection limit of 6 nM.

Conclusion: Since protein tyrosine phosphatases play essential roles in cell signaling pathways and disease development, the use of dephostatin as an inhibitor has gained interest. Therefore, an accurate and rapid method for dephostatin measurement is crucial in the pharmaceutical industry. The prepared biosensor, which incorporates laccase enzyme and graphene nanoparticles stabilized with a chitosan nanocomposite, allows for precise dephostatin measurement. The laccase enzyme immobilized on the electrode surface can specifically oxidize the dephostatin molecule, producing a unique electrode response for this molecule.

Keywords: biosensor, enzyme, laccase, dephostatin, graphene

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (238): 15-26 (Persian).

Corresponding Author: Mehdi Mogharabi-Manzari - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir) and **Ebrahim Fooladi**- Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran. (E-mail: e.fooladi@rifst.ac.ir)

طراحی و ساخت بیوسنسور آنزیمی لکاز بر پایه اکسید گرافن و پلی آنیلین به منظور اندازه گیری دفتستاتین

میترا قدرتی شاهتوری^۱

حامد فتحی^{۳و۲}

داود ایل بیگی^{۵و۴}

مهدی مقربی منطری^{۷و۶}

ابراهیم فولادی^۸

چکیده

سابقه و هدف: یک بیوسنسور از دو جزء شامل عنصر حسگر زیستی و مبدل به منظور تعیین غلظت آنالیت تشکیل شده است که با انجام یک واکنش زیستی در مجاورت مبدل امکان تشخیص آن افزایش می‌یابد. از مزایای بیوسنسورها نسبت به روش‌های متداول در اندازه‌گیری آنالیت و کنترل بیوشیمی می‌توان به قابلیت استفاده مجدد، انجام سریع واکنش و ویژه بودن آن‌ها اشاره نمود. لکاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های متعلق به خانواده اکسیدو ردکتازهاست. خاصیت کاتالیزوری لکاز بیش‌تر مربوط به فعالیت آن نسبت به دی فنول‌های اور تو و پارا بوده و وابسته به نوع اورگانیزم تولیدکننده آن است. برخلاف بسیاری از آنزیم‌ها که فقط بر یک سوبسترای کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند. این آنزیم اکسایش طیف وسیعی از سوبستراها مانند دی فنل‌ها، پلی فنل‌ها، دی آمین‌ها، متوکسی فنل‌ها، آمین‌های آروماتیک و آسکوربات را کاتالیز می‌کند. پروتئین تیروزین فسفاتاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که وظیفه حذف گروه فسفات از اسید آمینه تیروزین در پروتئین‌ها را به عهده دارد. هدف از این پروژه طراحی و ساخت بیوسنسور آنزیمی بر مبنای الکترودهای صفحه چاپی کربنی اصلاح شده با حساسیت و گزینش پذیری بالای برای اندازه‌گیری دقیق و سریع دفتستاتین بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بیوسنسور از طریق تثبیت آنزیم لکاز بر سطح الکتروده تهیه شد. برای این منظور در ابتدا سطح الکتروده کربن چاپی استفاده از نانوکامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین اصلاح شد. سپس آنزیم لکاز از طریق اتصال دهنده‌های EDC/NHS بر روی سطح آن تثبیت شد. رفتار الکتروشیمیایی الکترودها با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای (CV) و امپدانس (EIS) مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای بهینه مانند پتانسیل اکسایش، pH دما و غلظت بهینه شد. در پتانسیل ۰/۴۵ ولت نسبت به الکتروده نقره/کلرید نقره میزان جریان هر نمونه توسط بیوسنسور، تعیین گردید. سپس نمودار کالیبراسیون آن رسم و از طریق درونیایی سیگنال‌های آمپرومتری یک منطبق بر منحنی‌های کالیبراسیون به دست آمده با محلول‌های دفتستاتین، اندازه‌گیری‌ها تکمیل شد. بدون هیچ گونه آماده‌سازی، از نمونه‌های استاندارد دفتستاتین به نمونه نسکافه رقیق شده با بافر فسفات (۰/۰۵ مولار، pH ۶/۵) اضافه شد و میزان بازیابی تعیین گردید.

یافته‌ها: با تثبیت گرافن اکساید و آنزیم بر روی سطح الکتروده میزان جریان کاتدی و آندی الکتروده اصلاح شده نسبت به الکتروده اصلاح نشده در محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ افزایش یافت. افزایش سرعت انتقال الکترون در سطح الکتروده به میزان ۲۰ میکروآمپر مشاهده شد که در نتیجه حضور نانوذرات گرافن در سطح الکتروده بود. پاسخ الکتروده در محدوده ۱۰ تا ۹۰۰ نانومولار خطی گزارش شد. حد تشخیص الکتروده برابر ۶ نانومولار بود.

استنتاج: از آن‌جا که این پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و بروز برخی بیماری‌ها موثر هستند، استفاده از دفتستاتین به عنوان داروی مهارکننده مورد توجه قرار گرفته است. از این رو ارائه روشی دقیق و سریع برای اندازه‌گیری دفتستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. بیوسنسور تهیه شده شامل آنزیم لکاز و نانوذرات گرافن تثبیت شده توسط نانوکامپوزیت کیتوزان بر سطح الکتروده بود و جهت اندازه‌گیری دفتستاتین با دقت بالا به کار می‌رود. آنزیم لکاز تثبیت شده بر سطح الکتروده قادر است مولکول دفتستاتین را به صورت اختصاصی اکسید کند و موجب تولید پاسخ اختصاصی الکتروده نسبت به این مولکول باشد.

واژه های کلیدی: بیوسنسور، آنزیم، لکاز، دفتستاتین، گرافن

E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir

E-mail: e.fooladi@rifst.ac.ir

مؤلف مسئول: مهدی مقربی منطری - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، مرکز تحقیقات علوم دارویی

و ابراهیم فولادی - مشهد: موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی

۱. دانشجوی دکتری ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد ایران

۲. کارشناس ارشد زیست شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

۵. مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

۶. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. مرکز تحقیقات علوم تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۸. استادیار، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۵/۲۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۸/۲

مقدمه

بیوسنسورها ابزارهای تحلیلی هستند که از عناصر بیولوژیکی برای تشخیص و اندازه گیری مواد مختلف استفاده می کنند (۱). این حسگرها به دلیل دقت بالا، پاسخ دهی سریع و قابلیت شناسایی انتخابی مواد، اهمیت زیادی در زمینه های مختلف مانند پزشکی، محیط زیست و صنایع غذایی دارند (۲). در پزشکی، بیوسنسورها می توانند در تشخیص زودهنگام بیماری ها، نظارت بر سلامت بیماران و مدیریت داروها نقش حیاتی ایفا کنند. در حوزه محیط زیست، این ابزارها قادر به تشخیص آلاینده ها و سموم در آب و هوا هستند که به حفظ محیط زیست کمک می کند (۳). هم چنین در صنایع غذایی، بیوسنسورها می توانند کیفیت و ایمنی محصولات را با شناسایی سریع آلودگی ها و مواد مضر تضمین کنند. بنابراین، توسعه و استفاده از بیوسنسورها می تواند تأثیرات مثبتی در بهبود کیفیت زندگی و حفاظت از محیط زیست داشته باشد (۴).

بیوسنسورها در صنایع غذایی به عنوان ابزارهای حیاتی برای ارتقاء کیفیت، ایمنی و کارایی تولید مواد غذایی به کار می روند. این حسگرها قادر به تشخیص سریع آلودگی ها و پاتوژن ها مانند باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها هستند، که به تولیدکنندگان کمک می کند تا محصولات آلوده را قبل از رسیدن به دست مصرف کننده شناسایی و حذف کنند و از شیوع بیماری های غذایی جلوگیری کنند (۵). هم چنین، بیوسنسورها می توانند ترکیبات شیمیایی مرتبط با تازگی و کیفیت مواد غذایی را شناسایی کنند، که این امکان را برای تولیدکنندگان و مصرف کنندگان فراهم می آورد تا از مصرف مواد غذایی فاسد شده جلوگیری کنند. علاوه بر این، بیوسنسورها در کنترل فرآیندهای تولید و نگهداری مواد غذایی نقش دارند و می توانند شرایط محیطی مانند دما، رطوبت و pH را نظارت کنند تا شرایط ایده آل برای تولید محصولات با کیفیت بالا حفظ شود. این ابزارها هم چنین قادر به تشخیص مواد افزودنی غیر مجاز، سموم و آلاینده ها هستند، که به تضمین رعایت استانداردهای

ایمنی و کیفیت کمک می کند (۶). به کارگیری بیوسنسورها در سیستم های ردیابی و برچسب گذاری محصولات غذایی نیز به شفافیت بیش تر در زنجیره تامین و ارائه اطلاعات دقیق به مصرف کنندگان درباره منشاء و کیفیت محصولات منجر می شود. به طور کلی، استفاده گسترده از بیوسنسورها در صنایع غذایی می تواند به کاهش هدررفت مواد غذایی، افزایش ایمنی و بهبود رضایت مصرف کنندگان منجر شود (۷). اصلاح سطح الکتروود عملکرد حسگر را با بهبود حساسیت و گزینش پذیری افزایش می دهد که برای نانوحسگرهای مورد استفاده در کاربردهای مختلف مانند زیست پزشکی، ماشین آلات و کشاورزی بسیار مهم است. گرافن اکساید، شکل اکسید شده گرافن است که دارای چهار نوع گروه عملکردی شامل کربونیل، کربوکسیل، هیدروکسیل و اپوکسید می باشد. ترکیب مواد رسانا در شبکه گرافن اکساید منجر به اثرات هم افزایی می شود و توانایی گرافن اکساید برای اتصال گیرنده های زیستی را حفظ می کند که منجر به افزایش رسانایی آن می شود. نانوکامپوزیت های شامل اکسید گرافن به دلیل ویژگی های منحصر به فرد خود، نقش مهمی در بهبود عملکرد بیوسنسورها دارند. این ذرات با داشتن سطح بسیار بزرگ نسبت به حجم، قابلیت اتصال به مولکول های زیستی را افزایش می دهند و به این ترتیب حساسیت بیوسنسورها را بهبود می بخشد (۸). هم چنین، نانوذرات رسانا می توانند انتقال سیگنال ها را تسریع کنند و زمان پاسخ دهی سنسورها را کاهش دهند. علاوه بر این، خواص الکتریکی، آن به طور قابل توجهی باعث تقویت سیگنال های تولیدی در فرآیندهای تشخیصی می شوند (۹). از این رو، استفاده از نانوکامپوزیت اکسید گرافن و پلی آنیلین در ساختار بیوسنسورها به عنوان ابزاری نوآورانه برای ارتقاء دقت، سرعت و کارایی در تشخیص بیماری ها و ترکیبات شیمیایی ضروری است. آنزیم لکاز به عنوان یکی از مهم ترین بیوکاتالیست ها در بیوسنسورها به دلیل توانایی آن در اکسیداسیون طیف

گسترده‌ای از ترکیبات فنی و غیر فنی استفاده می‌شود. این آنزیم به‌طور طبیعی در قارچ‌ها، باکتری‌ها و بافت‌های گیاهی یافت می‌شود و با کاتالیز واکنش‌های اکسیداسیون-احیا، الکترون‌ها را به مولکول اکسیژن منتقل و آب تولید می‌کند (۱۴-۱۰). در بیوسنسورها، لکاز می‌تواند برای تشخیص و اندازه‌گیری مواد مختلف مانند فنل‌ها، آمین‌ها و حتی برخی آلاینده‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۱۵، ۱۶). این ویژگی‌ها، لکاز را به یک جزء کلیدی در توسعه بیوسنسورهای زیست محیطی و پزشکی تبدیل کرده است. نیتريت یکی از افزودنی‌های بسیار مهم در فرآیند تولید گوشت از نظر رنگ، بافت، اکسیداسیون لیپید مطلوب و به ویژه برای جلوگیری از تشکیل سم است. اما نگرانی‌های قابل توجهی وجود دارد زیرا نیتريت ممکن است با آمین‌ها و اسیدهای آمینه واکنش داده و N-nitrosamine تولید کند که سرطان‌زا، جهش‌زا و تراژون شناخته شده است. این ترکیبات از واکنش آمین‌های ثانویه با عوامل نیتروزکننده مانند نیترات‌ها یا نیتريت‌ها که معمولاً در تولید فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شوند، تشکیل می‌شوند. به همین دلیل، استفاده از این عوامل نیتروزکننده برای پخت گوشت در برخی کشورها به شدت کنترل می‌شود. اندازه‌گیری نیتروزامین‌ها در نمونه‌های غذایی با استفاده از روش‌های رنگ سنجی، GC-MS، HPLC و فلورسانس انجام شده است (۱۷). اگرچه این روش‌ها برای اندازه‌گیری هریک از نیتروزامین‌ها می‌تواند استفاده شوند ولی هزینه بالا، وقت‌گیر بودن و نیاز به اپراتور ماهر از محدودیت آن‌ها است. اخیراً استفاده از حسگرها به‌طور چشمگیری برای اندازه‌گیری نیتروزامین‌ها مورد توجه قرار گرفته است به طوری که استفاده از حسگرها بر پایه ماکرومولکول‌ها، نانولوله‌های کربنی، حسگرهای فلورسانس بر پایه کاغذ و حسگرهای الکتروشیمیایی بر پایه فاز متحرک آلی گزارش شده است (۲۰-۱۸). دستاتین یک نیتروزامین است که به‌عنوان یک مهارکننده پروتئاز در تحقیقات زیست‌شناسی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این

ماده با مهار فعالیت پروتئازها، آنزیم‌هایی که پروتئین‌ها را تجزیه می‌کنند، نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی و جلوگیری از تخریب پروتئین‌های حیاتی دارد (۲۱). دستاتین به‌خصوص در مطالعه مکانیسم‌های بیماری‌های مرتبط با پروتئازها، مانند برخی از انواع سرطان‌ها و بیماری‌های عفونی، مفید است. هم‌چنین، این ترکیب می‌تواند به عنوان یک ابزار تحقیقاتی برای بررسی نقش پروتئازها در مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی و فرآیندهای زیستی پیچیده مورد استفاده قرار گیرد، که می‌تواند به توسعه درمان‌های جدید و بهبود روش‌های درمانی موجود کمک کند (۲۲). از آن‌جاکه این پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و بروز برخی بیماری‌ها موثر هستند، استفاده از دستاتین به‌عنوان داروی مهارکننده مورد توجه قرار گرفته است. از این رو ارائه روشی دقیق و سریع برای اندازه‌گیری دستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. این مطالعه با هدف طراحی و ساخت بیوسنسور آنزیمی برای اندازه‌گیری دقیق و سریع دستاتین، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، گرافن اکساید، آنیلین، ۱-(3-دی‌متیل آمینو پروپیل)-3-اتیل کربودی‌ایمید هیدروکلراید (EDC)، ان-هیدروکسی سوکسینیمید (NHS)، اکسید گرافن، پتاسیم فرو سیانید و پتاسیم فری سیانید از شرکت مرک آلمان تهیه شد. آنزیم لکاز قارچی جدا شده از قارچ *ترامتس ورسیکالر* با فعالیت ۰/۵ واحد بر میلی‌گرم از شرکت سیگما آمریکا خریداری شد. یک پتانسیواستات/گالوانوستات مدل (Autolab, PGSTAT-302 N) ساخت کشور هلند و مجهز به یک سیستم سه الکترودی متشکل از الکتروود کار، و الکتروود نقره-کلرید نقره و سیم پلانین به عنوان الکتروودهای مرجع و کمکی، برای همه اندازه‌گیری‌ها مانند ولتامتری چرخه‌ای، کروماتوگرافی و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. طیف‌سنج مادون قرمز مدل Avatar 370 ساخت

$K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (۱۰ میلی مولار) در KCl با (۰/۱ مولار) استفاده شد.

بهینه سازی پارامترهای موثر در اندازه گیری دفستاتین پارامترهای مؤثر بر عملکرد بیوسنسور از قبیل pH (۵-۷)، پتانسیل اندازه گیری کروماترومتری (۰/۵-۰/۳ ولت) و دما (۵۵-۲۵ درجه سانتی گراد) بهینه سازی شد. جریان آمپرومتری بعد از اعمال پتانسیل ۰/۴۵ ولت به مدت ۱۰ ثانیه تا رسیدن نمودار کروماترومتری و گرم به حالت ایستا (۳۰ ثانیه) در pH=۶، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در غلظت‌های مختلف از دفستاتین تعیین و نمودار کالیبراسیون رسم شد. براساس نمودار کالیبراسیون و معادله خط، غلظت دفستاتین در نمونه حقیقی (نسکافه) اندازه گیری شد.

یافته‌ها

بررسی مشخصات سطحی الکتروود اصلاح شده

تصاویر SEM مربوط به سطح الکتروود اصلاح نشده و اصلاح شده با نانو کامپوزیت و آنزیم در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر شماره ۱ (b) مشاهده می‌شود، با تثبیت نانو کامپوزیت GO/PANI بر روی سطح الکتروود مورفولوژی سطح الکتروود تغییر کرده که دلیلی بر توانایی تشکیل یک لایه پلیمر توسط آنیلین است. با تثبیت آنزیم لکاز، به دلیل وجود پروتئین در سطح الکتروود، ساختار همگن تری مشاهده شد (تصویر شماره ۱ (c)).

نمودار شماره ۱، طی‌های EDX مربوط به مراحل اصلاح الکتروود و تهیه بیوسنسور را نشان می‌دهد. با اصلاح الکتروشیمیایی الکتروود SPCE با نانو کامپوزیت GO/PANI پیک مربوط به نیتروژن در نمودار شماره ۱ (b) مشاهده شد و با تثبیت آنزیم لکاز که حاوی کوفاکتور مس (Cu) است پیک مربوط بر Cu نشان دهنده تثبیت آنزیم بر روی سطح الکتروود است (نمودار شماره ۱ (b)).

کشور امریکا برای ثبت طیف فرسرخ تبدیل فوریه استفاده شد. میکروگراف‌های سطوح الکتروود توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM)، S-4160 هیتاچی، ژاپن تهیه شد. اصول اخلاقی در این مطالعه رعایت شده است و این طرح با کد IR.MAZUMS.REC.1400.077 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران تصویب شده است.

سنتر نانو کامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین

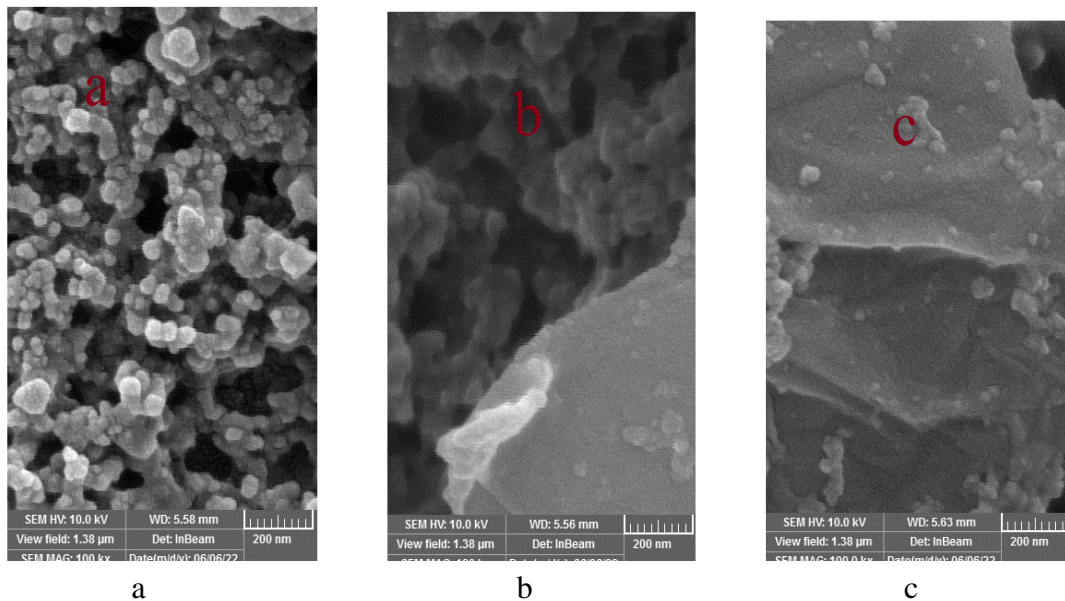
ابتدا ۱۰ میلی گرم گرافن اکساید در ۱۰ میلی لیتر آب یونزدایی شده دیسپرس شد. سپس، محلول دیسپرس شده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه همزده شد. با افزودن محلول آنیلین (۰/۲۵ میلی مولار در اسید کلریدریک ۰/۱ مولار) به محلول دیسپرس شده، نانو کامپوزیت پلی آنیلین از طریق اکسایش آنیلین (الکتروپلیمریزاسیون) بر روی سطح الکتروود قرار داده شد (۲۳).

تثبیت آنزیم بر روی سطح الکتروود اصلاح شده با نانو کامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین

به منظور تثبیت آنزیم بر سطح الکتروود اصلاح شده از اتصال دهنده‌های عرضی (NHS-EDC) استفاده شد. در ابتدا الکتروود اصلاح شده، به ترتیب در محلول ((0.05 mol L^{-1}) EDC در PBS، pH 6.0 و ((0.01 mol L^{-1}) NHS در PBS، pH 6.0 قرار داده شد. سپس، الکتروود در محلول آنزیمی (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بیوسنسور تهیه شده در محلول بافر فسفات با pH=۷ و دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

شناسایی ساختار مورفولوژی و رفتار الکتروشیمیایی الکتروود

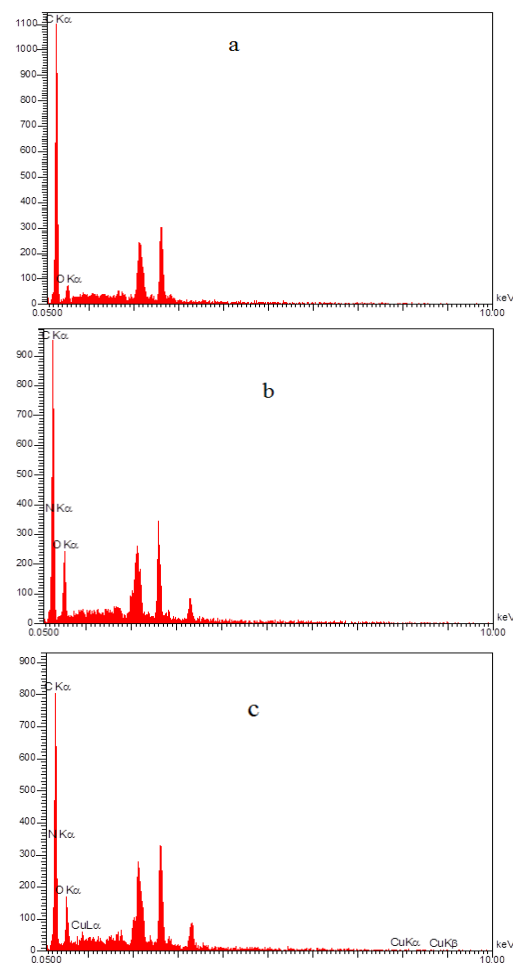
شناسایی سطح بیوسنسور تهیه شده توسط FE-SEM، ولتامتری چرخه‌ای و طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی انجام شد. در شناسایی‌های الکتروشیمیایی از محلول



تصویر شماره ۱: تصاویر SEM مراحل مختلف تهیه بیوسنسور (a) الکتروود اصلاح نشده (SPCE)، (b) الکتروود اصلاح شده با گرافن اکساید و پلی آنیلین (SPCE/GO/PANI)، (c) بیوسنسور لکاز (SPCE/GO/PANI/Laccase).

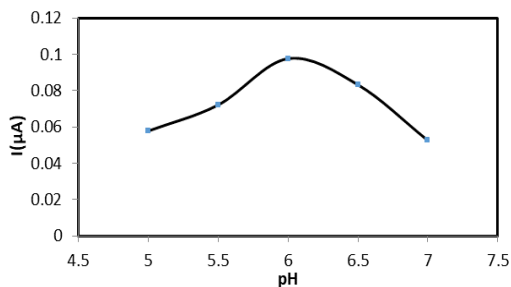
رفتار الکتروشیمی الکتروود اصلاح شده

از روش ولتامتری چرخه‌ای و طیف سنجی امپدانس جهت بررسی مشخصات سطح الکتروود استفاده شد. در روش طیف سنجی امپدانس یک تغییر کوچک و سینوسی به پتانسیل در الکتروود کار اعمال و جریان حاصل اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل می‌توانند به فرم منحنی‌های نایکوئیست باشند. منحنی نایکوئیست یکی از معمول‌ترین روش‌ها در تفسیر داده‌های EIS است که از یک نیم دایره و در ادامه آن خط راست تشکیل شده است و از طریق آن می‌توان اطلاعاتی در مورد انتقال بار سیستم به دست آورد. قسمت دایره‌ای مربوط به سرعت انتقال الکترون (R_{ct}) در سطح الکتروود کار بوده و در فرکانس‌های بالا مشاهده می‌شود. در صورتی که قسمت خطی در فرکانس‌های پایین مشاهده شده و بیانگر فرآیندهای کنترل شده با نفوذ (انتقال جرم) بوده و تحت عنوان خط واربرگ شناخته می‌شود. در این کار از منحنی‌های نایکوئیست برای تعیین اثر اصلاح سطح بر فرآیند انتقال الکترون و تعیین اثر متقابل نانو ذرات بر یکدیگر استفاده شد. براساس تغییرات میزان R_{ct} (مقاومت انتقال بار) می‌توان نقش کامپوزیت و رفتار آن بعد از



نمودار شماره ۱: طیف EDX مربوط به (a) SPCE، (b) SPCE/GO/PANI و (c) SPCE/GO/PANI/Laccase.

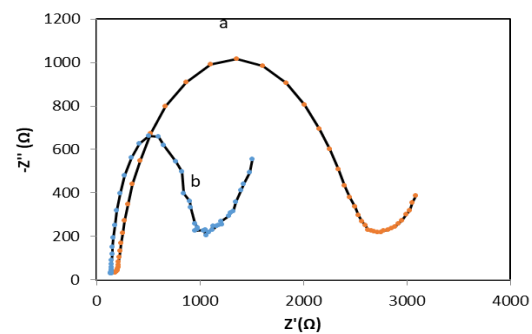
بررسی قرار گرفت. با تنظیم pH با استفاده از بافر فسفات و غلظت ۲۰ نانومولار دفستاتین پاسخ جریان آمپرومتری تعیین شد؛ نتایج نشان می‌دهد که میزان جریان تا pH برابر ۶ یک افزایش در جریان مشاهده می‌شود و بعد از این pH یک کاهش در جریان مشاهده می‌شود که این کاهش مربوط به کاهش فعالیت آنزیم لکاز در pHهای قلیایی است (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: pH بهینه مؤثر بر عملکرد بیوسنسور

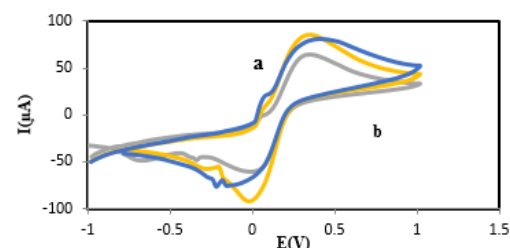
یکی از پارامترهای مؤثر در فعالیت آنزیم دما است که می‌تواند نقش مهمی در حساسیت بیوسنسورهای آنزیمی داشته باشد. برای این منظور تغییرات پاسخ بیوسنسور آنزیمی لکاز را در pH=۶ و غلظت ۲۰ نانومولار دفستاتین و در محدوده دمایی ۲۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت که تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد یک افزایش در جریان می‌شود که این مربوط به افزایش فعالیت آنزیم است و سپس کاهش جریان می‌تواند به تغییر ساختار آنزیم در نتیجه افزایش دما باشد (نمودار شماره ۵). در سنسورها و بیوسنسورهای آمپرومتری اندازه‌گیری جریان در پتانسیل بهینه از اهمیت بالایی برخوردار است. این پتانسیل بهینه را می‌توان بر اساس ماکزیمم جریان ولتامتری چرخه‌ای آنالیت و یا اندازه‌گیری جریان در پتانسیل‌های نزدیک به پیک ماکزیمم تعیین نمود. در این پژوهش تغییرات جریان در محدوده پتانسیل‌های ۰/۳-۰/۵ ولت مورد بررسی قرار گرفت که پتانسیل ۰/۴۵ ولت بیش‌ترین جریان آمپرومتری مشاهده شد (نمودار شماره ۶).

تثبیت بر روی سطح الکتروود را بررسی نمود. افزایش نانو ذرات موجب افزایش انتقال بار و کاهش مقاومت می‌شود. استفاده از گرافن اکساید علاوه بر ایجاد شرایط مناسب برای تثبیت آنزیم، می‌تواند نقش مهمی در افزایش انتقال بار و کاهش R_{ct} داشته باشد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: طیف امپدانس (a) SPCE و (b) SPCE/GO/PANI

نمودار شماره ۳، رفتار الکتروشیمیایی بیوسنسور نسبت به الکتروود اصلاح نشده را نشان می‌دهد. با تثبیت گرافن اکساید بر روی سطح الکتروود (b) میزان جریان کاتدی و آندی الکتروود اصلاح شده نسبت به الکتروود اصلاح نشده در محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ به مقدار $20 \mu A$ افزایش یافت، که نشان‌دهنده افزایش انتقال الکترون در نتیجه تثبیت نانوذرات گرافن اکساید است.



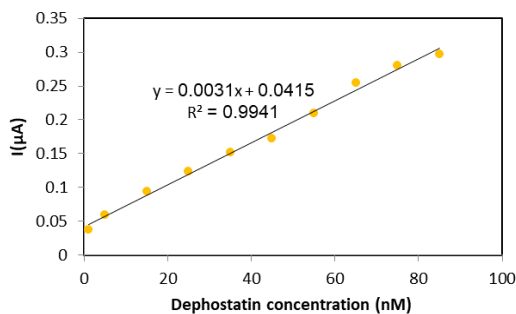
نمودار شماره ۳: ولتامتری چرخه‌ای (a) SPCE، (b) SPCE/GO/PANI و (c) SPCE/GO/PANI/Laccase در محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (۱۰ میلی‌مولار) و KCl (۰/۱ مولار).

بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر

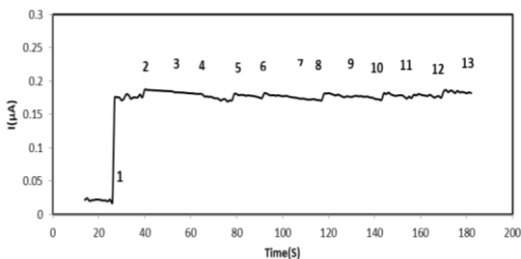
تأثیر pH و دما

تأثیر pH بر پاسخ بیوسنسور در محدوده ۵-۷ مورد

گلوکوز ($5\mu\text{M}$)، کلرید پتاسیم ($5\mu\text{M}$)، آسکوربیک اسید ($1\mu\text{M}$) و گالیک اسید ($1\mu\text{M}$) را به صورت اندازه گیری جداگانه در حضور 50 nM از دستاتین و در شرایط بهینه به سل الکتروشیمیایی اضافه شد. اندازه گیری های آمپرومتری برای گونه های مزاحم در نمودار شماره ۸، نشان می دهد که از بین این گونه ها آسکوربیک اسید به دلیل نزدیکی پتانسیل اکسایش و کاهش آن به $0/45$ ولت و گالیک اسید به دلیل وجود گروه های فنولی و تاثیر آن بر روی آنزیم بیش ترین تاثیر را دارند.



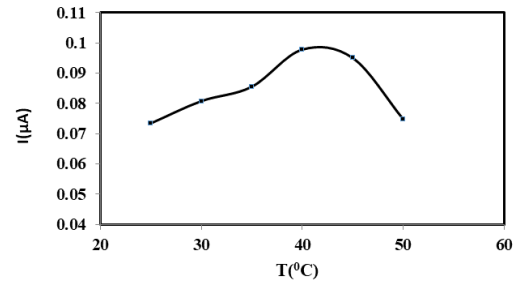
نمودار شماره ۷: نمودار کالیبراسیون تغییرات جریان نسبت به تغییرات غلظت دستاتین



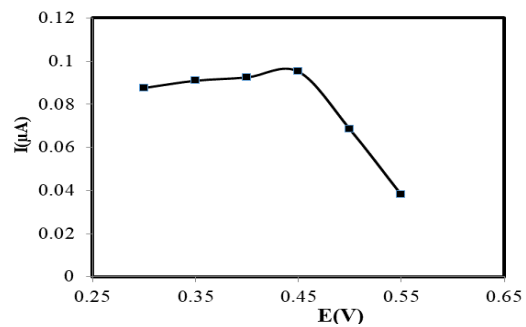
نمودار شماره ۸: بررسی اثر مزاحمت ها بر روی پاسخ آمپرومتری بیوسنسور در شرایط بهینه (۱ بافر، ۲ دستاتین، ۳ اگزالات + دستاتین، ۴ پرولین + دستاتین، ۵ والین + دستاتین، ۶ گلیسرین + دستاتین، ۷ فروکتوز + دستاتین، ۸ کافئین + دستاتین، ۹ ساکاروز + دستاتین، ۱۰ گلوکوز + دستاتین، ۱۱ کلرید پتاسیم + دستاتین، ۱۲ گالیک اسید + دستاتین، ۱۳ آسکوربیک اسید + دستاتین)

کاربرد بیوسنسور آنزیمی لکاز در اندازه گیری آمپرومتری دستاتین در نمونه های حقیقی

با توجه به این که N-nitrosamines توسط IARC و US EPA به عنوان مواد سرطان زا طبقه بندی می شوند، به راحتی در غذاهای مختلف یافت می شوند.



نمودار شماره ۵: دمای بهینه مؤثر بر عملکرد بیوسنسور



نمودار شماره ۶: تعیین پتانسیل بهینه اندازه گیری آمپرومتری بیوسنسور آنزیم لکاز

نمودار شماره ۷، نمودار کالیبراسیون تغییرات جریان نسبت به تغییرات غلظت دستاتین را نشان می دهد. به منظور اندازه گیری دستاتین، پس از شناسایی سطح الکترو، پارامترهای مؤثر در اندازه گیری دستاتین توسط بیوسنسور آمپرومتری مورد بررسی قرار گرفت. در این بیوسنسور پتانسیل $0/45$ ولت به عنوان پتانسیل ثابت اندازه گیری جریان، $\text{pH}=6$ و دمای 40 درجه سانتی گراد به دست آمد. در این شرایط بهینه میزان جریان در غلظت های مختلف دستاتین اندازه گیری شد و براساس تغییرات غلظت میزان جریان تعیین شد و نمودار کالیبراسیون رسم شد. این تغییرات در محدوده $10-900$ نانومولار خطی است. ضریب رگرسیون $0/9941$ و معادله خط $Y = 0.0031 + 0.0415X$ تعیین شد. حد تشخیص بر اساس 3 برابر انحراف استاندارد غلظت 10 نانومولار $0/6$ نانومولار به دست آمد.

بررسی اثر مزاحمت هر کدام از ترکیبات گزالات ($5\mu\text{M}$)، پرولین ($5\mu\text{M}$)، والین ($5\mu\text{M}$)، گلیسرین ($5\mu\text{M}$)، فروکتوز ($5\mu\text{M}$)، کافئین ($5\mu\text{M}$)، ساکاروز ($5\mu\text{M}$)،

در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Junior و همکاران انجام شد، روشی نوین برای اندازه‌گیری نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های دارویی توسعه یافت. در این تحقیق، از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با آشکارساز طیف‌سنجی جرمی استفاده شد تا دقت و حساسیت بالایی در تشخیص نیتروز آمین‌ها حاصل شود. پژوهشگران ابتدا نمونه‌های آب را با استفاده از روش استخراج فاز جامد آماده‌سازی کردند تا نیتروز آمین‌ها متمرکز شوند. سپس، آنالیز HPLC-MS به منظور شناسایی و اندازه‌گیری این ترکیبات انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که روش پیشنهادی قادر است نیتروز آمین‌ها را با دقت و حساسیت بالایی تا حد نانوگرم در لیتر تشخیص دهد. این یافته‌ها نشان‌دهنده قابلیت بالای روش پیشنهادی برای استفاده در پایش محیطی و تضمین ایمنی آب آشامیدنی است. پژوهشگران همچنین توصیه کردند که این روش می‌تواند در صنایع غذایی و داروسازی نیز برای تشخیص و کنترل نیتروز آمین‌ها به کار رود (۲۷). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Kalauz و همکاران در سال ۲۰۲۳، انجام شد روشی مبتنی بر تکنیک کروماتوگرافی گازی جفت شده با طیف سنج جرمی برای اندازه‌گیری گستره وسیعی از نیتروز آمین‌ها با وزن ملکولی کم مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۸). یک سنجش مولکولی بر اساس دو پروب فلورسنت جهت شناسایی و تعیین کمیت نیتروز آمین‌ها، از جمله نیتروز آمین‌های مرتبط با سرطان توسط Minani و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

در مطالعه دیگری، یک بیوسنسور الکتروشیمیایی DNA مبتنی بر نقاط کربنی برای تشخیص حساس و انتخابی نیتروز آمین‌های جهش‌زا مانند ان-نیتروزودی متیل آمین و ان-نیتروزودی اتانول آمین توسط Majumdar و همکاران ساخته شد. در این مطالعه ابتدا نقاط کربنی کیتوزان بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای رسوب کرد، سپس DNA به صورت الکترواستاتیکی روی سطح نقاط کربن تثبیت شد تا بیوسنسور ساخته

آن‌ها محصولات واکنش بین اکسید نیتروژن و آمین‌های ثانویه هستند، اما می‌توانند در طی تخمیر نیز تولید شوند. دستاتین به عنوان یک نیتروز آمین فنولی می‌تواند از واکنش نترات در حضور ترکیبات فنولی مانند کاتکول و هیدروکینون که در نمونه‌های مانند چای و قهوه یافت می‌شوند تشکیل شود. لذا در این مطالعه کارایی بیوسنسور آنزیمی در نمونه‌های نسکافه مورد بررسی قرار گرفت. در این اندازه‌گیری ۵ g از نمونه نسکافه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب جوش اضافه کرده سپس با افزودن مقادیر مشخصی از نمونه‌های استاندارد دستاتین و در شرایط بهینه در حضور بافر فسفات مقدار دستاتین در نمونه‌های حقیقی و میزان بازیابی تعیین شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: اندازه‌گیری دستاتین در نمونه نسکافه

نمونه	غلظت اضافه شده به نمونه های نسکافه (نانومولار)	غلظت دستاتین اندازه‌گیری شده بوسیله بیوسنسور در نمونه نسکافه (نانومولار)	درصد بازیابی
۱	۲۰/۰۰	۱۸/۵۶	۹۲/۸
۲	۵۰/۰۰	۵۲/۱۲	۱۰۴/۲
۳	۱۰۰/۰۰	۱۰۳/۰۰	۱۰۳

بحث

نیتروز آمین‌ها گروهی از ترکیبات شیمیایی هستند که به دلیل ویژگی‌های سرطان‌زایی و جهش‌زایی‌شان مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این ترکیبات در محیط‌های مختلف، از جمله مواد غذایی، آب آشامیدنی، محصولات تنباکو و برخی مواد دارویی وجود دارند و می‌توانند از طریق فرآیندهای مختلف شیمیایی و بیولوژیکی تولید شوند (۲۴). اندازه‌گیری دقیق و قابل اعتماد نیتروز آمین‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا به تشخیص و کنترل منابع آلودگی کمک می‌کند و به بهبود کیفیت محصولات و حفاظت از سلامت عمومی منجر می‌شود (۲۵). با توجه به خطرات بالقوه‌ای که نیتروز آمین‌ها برای انسان‌ها دارند، توسعه و استفاده از روش‌های حساس و اختصاصی برای پایش این ترکیبات، به‌ویژه در صنایع غذایی و داروسازی، یک ضرورت حیاتی است (۲۶).

شود. حداکثر جریان مطلق در حضور نمونه با تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی بررسی شد و روند افزایشی مشاهده شد. بنابراین، بیوسنسور طراحی شده قادر بود ان-نیتروزودی متیل آمین و ان-نیتروزودی اتانول آمین را با گزینش پذیری و حساسیت بالا تشخیص دهد. همچنین، حد تشخیص به ترتیب $10^{-9} \times 9/9$ مولار و $10^{-9} \times 9/6$ مولار گزارش شد (۲۹).

در مطالعه حاضر، بیوسنسور آنزیمی لکاز برای اندازه گیری دفستاتین با دقت و حساسیت بالا طراحی و ساخته شد. نتایج نشان داد که بیوسنسور تهیه شده قادر است دفستاتین را در غلظت‌های پایین شناسایی کند. توانایی بالای این بیوسنسور در اندازه گیری دفستاتین ممکن است به دلیل ساختار ویژه آنزیم لکاز و برهم کنش‌های مؤثر آن با دفستاتین باشد. لکاز به عنوان یک آنزیم اکسیداز، قابلیت اکسید کردن دفستاتین و تولید سیگنال الکتروشیمیایی قابل اندازه گیری را دارد. نوآوری اصلی این تحقیق، استفاده از لکاز به عنوان عنصر تشخیصی بیوسنسور است. این انتخاب نه تنها باعث افزایش حساسیت بیوسنسور شده است، بلکه زمان پاسخ‌دهی را نیز کاهش داده است. علاوه بر این، طراحی نانو ساختار بیوسنسور به بهبود ویژگی‌های تشخیصی آن کمک کرده است. یکی از محدودیت‌های این تحقیق، نیاز به شرایط محیطی کنترل شده برای عملکرد بهینه بیوسنسور است. تغییرات دما و pH ممکن است بر عملکرد بیوسنسور تأثیر گذار باشند. همچنین، تحقیقات پیش‌تری برای بررسی پایداری بلند مدت بیوسنسور مورد نیاز است. این بیوسنسور می‌تواند در صنایع داروسازی و پزشکی برای پایش دقیق دفستاتین استفاده شود. تحقیقات آینده می‌تواند بر بهبود پایداری بیوسنسور و توسعه سیستم‌های اندازه گیری قابل حمل و کاربر پسند متمرکز شود.

اندازه گیری دفستاتین توسط روش‌های کروماتوگرافی انجام می‌شود که نیاز به دستگاه‌های گران قیمت داشته و وقت گیر است. بنابراین، توسعه بیوسنسورهای مبتنی بر آنزیم، به دلیل توانایی آن‌ها در ارائه تشخیص سریع، حساسیت بالا و دقت قابل توجه، می‌تواند یک روش نوآورانه و کارآمد برای شناسایی و اندازه گیری دقیق دفستاتین در نمونه‌های حقیقی فراهم کند. با توجه به انجام آزمایشات و ارزیابی‌های صورت پذیرفته در این تحقیق نتایج ذیل به دست آمده که به این شرح ارائه می‌گردد. بیوسنسور تهیه شده شامل آنزیم لکاز و نانوکامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین بر سطح الکتروود بوده و جهت اندازه گیری دفستاتین با دقت بالا به کار می‌رود. با تثبیت نانوکامپوزیت و آنزیم بر روی سطح الکتروود میزان جریان کاتدی و آندی الکتروود اصلاح شده نسبت به الکتروود اصلاح نشده در $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ افزایش یافت. انتقال الکترون در سطح الکتروود در نتیجه حضور نانوذرات گرافن اکساید در سطح الکتروود به میزان ۲۰ میکروآمپر افزایش یافت. آنزیم لکاز تثبیت شده بر سطح الکتروود قادر است مولکول دفستاتین را به صورت اختصاصی اکسید کند و موجب تولید پاسخ اختصاصی الکتروود نسبت به این مولکول شود. پاسخ بیوسنسور در محدوده ۱۰ تا ۹۰۰ نانومولار خطی بود. حد تشخیص بیوسنسور برابر ۶ نانومولار گزارش شد. از آنجا که این پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالیکی سلولی و بروز برخی بیماری‌ها موثر هستند، استفاده از دفستاتین به عنوان داروی مهارکننده مورد توجه قرار گرفته است. از این رو ارائه روشی دقیق و سریع برای اندازه گیری دفستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. لذا استفاده از این بیوسنسور امکان اندازه گیری میزان نیتروز آمین دفستاتین در نمونه‌های غذایی و دارویی را در آزمایشگاه فراهم می‌کند.

References

1. Zhai W, Wei D, Cao M, Wang Z, Wang M.

Biosensors based on core-shell nanoparticles

- for detecting mycotoxins in food: a review. *Food Chem* 2023; 429: 136944.
2. Malik S, Singh J, Goyat R, Saharan Y, Chaudhry V, Umar A, et al. Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. *Heliyon* 2023; 9(9): e19929.
 3. Nikpour S, Salehipour M, Rezaei S, Mogharabi-Manzari M. Design and fabrication of magnetic cross-linked laccase aggregate using superparamagnetic metal-organic frameworks for phenol removal. *Biochem Eng J* 2024; 209: 109385.
 4. Khan IM, Niazi S, Akhtar W, Yue L, Pasha I, Khan MKI, et al. Surface functionalized AuNCs optical biosensor as an emerging food safety indicator: Fundamental mechanism to future prospects. *Coord Chem Rev* 2023; 474: 214842.
 5. Salehipour M, Rezaei S, Asadi Khalili HF, Motaharian A, Mogharabi- Manzari M. Nanoarchitectonics of Enzyme/Metal–Organic Framework Composites for Wastewater Treatment. *J Inorg Organomet Polym Mater* 2022; 32: 3321-3338.
 6. Xiao Y, Zhang T, Zhang H. Recent advances in the peptide-based biosensor designs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2023; 231: 113559.
 7. Mogharabi-Manzari M, Rezaei S, Salehipour M, Pakdin-Parizi Z, Motaharian A. Chapter 6-Photoelectrochemical enzymatic sensing, in: *Photoelectrochem Bioanal* Altaf M, Ashraf RS, Sohail M, (eds). Elsevier; 2023. p. 115-126.
 8. Lee J, Kim J, Kim S, Min DH. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 105: 275-287.
 9. Yildiz G, Bolton-Warberg M, Awaja F. Graphene and graphene oxide for biosensing: General properties and the effects of graphene ripples, *Acta Biomater* 2021; 131: 62–79.
 10. Mogharabi M, Faramarzi MA. Are algae the future source of enzymes? *Trends Pept. Protein Sci* 2016; 1(1): 1-6.
 11. Mogharabi-Manzari M, Heydari M, Sadeghian-Abadi S, Yousefi-Mokri M, Faramarzi MA. Enzymatic dimerization of phenylacetylene by laccase immobilized on magnetic nanoparticles via click chemistry, *Biocatal. Biotransformation* 2019; 37(6): 455-465.
 12. Yousefi-Mokri M, Sharafi A, Rezaei S, Sadeghian-Abadi S, Imanparast S, Mogharabi-Manzari M, et al. Enzymatic hydrolysis of inulin by an immobilized extremophilic inulinase from the halophile bacterium *Alkalibacillus filiformis*. *Carbohydr Res* 2019; 483: 107746. PMID: 31323478.
 13. Salehipour M, Rezaei S, Rezaei M, Yazdani M, Mogharabi M. Opportunities and Challenges in Biomedical Applications of Metal–Organic Frameworks. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 2021; 31(12): 4443-4462.
 14. Salehipour M, Nikpour S, Rezaei S, Mohammadi S, Rezaei M, Ilbeygi D, et al. Mogharabi-Manzari, Safety of metal–organic framework nanoparticles for biomedical applications: An in vitro toxicity assessment. *Inorganic Chemistry Communications* 2023; 152: 110655.
 15. Rezaei S, Yazdian-Robati R, Mogharabi-Manzari M, Salehipour M. Editorial: Medical and Pharmaceutical Applications of Nanomaterials: From Diagnosis to Treatment. *Front Nanotechnol* 2024; 6: 1386250.
 16. Salehipour M, Rezaei S, Haddad R, Mogharabi-Manzari M. Preparation of

- electrospun hybrid polyacrylonitrile nanofibers containing TiO₂/Fe₃O₄ and their capsaicinoids adsorption applications, *Vietnam J Chem* 2022; 60: 267-280.
17. Frassanito R, Benfenati E, Fanell R, Ciotti G. A simple method for determination of N-nitrosamine traces in trifluralin samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Toxicol Environ Chem* 1994;45 :199-204.
 18. Minami T, Esipenko NA, Zhang B, Kozelkova ME, Isaacs L, Nishiyabu R, Kubo Y, Anzenbacher P Jr. Supramolecular sensor for cancer-associated nitrosamines. *J Am Chem Soc* 2012;134(49):20021-20024 PMID:23194337.
 19. Romero V, Sant'Anna C, I.Lavilla, C. Bendicho. Fluorescent paper-based sensor integrated with headspace thin-film microextraction for the detection of acyclic N-nitrosamines following in situ photocatalytic decomposition, *Anal Chim Acta* 2023; 1239: 340729.
 20. Mentana A, Palermo C, Iammarino M, Chiaravalle E, Centonze D. Electroanalytical characterisation of nitrosamines in different mobile phases as supporting electrolytes. *Microchem J* 2021; 171(2): 106885.
 21. Inoguchi H, Furukawa T, Yoshinari T, Sakuda S. Inhibition of aflatoxin production by protein tyrosine phosphatase inhibitors, blasticidin A and dephostatin. *JSM Mycotoxins* 2019; 69: 71-79.
 22. Suzuki T, Hiroki A, Watanabe T, Yamashita T, Takei I, Umezawa K. Potentiation of insulin-related signal transduction by a novel protein-tyrosine phosphatase inhibitor, Et-3, 4-dephostatin, on cultured 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(29): 27511-27518 PMID: 11342532.
 23. Zhang Q, Li Y, Feng Y, Feng W. Electropolymerization of graphene oxide/polyaniline composite for high-performance supercapacitor, *Electrochimica Acta* 2013; 90: 95-100.
 24. Akkaraju H, Tatia R, Mane SS, Khade AB, Dengale SJ. A comprehensive review of sources of nitrosamine contamination of pharmaceutical substances and products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2023; 139: 105355.
 25. Gushgari AJ, Halden RU. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere* 2018; 210: 1124-1136. PMID: 30208538.
 26. Tuesuwan B, Vongsutilers V. Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: threat, impact, and control. *J Pharm Sci* 2021; 110: 3118-3128.
 27. Junior ACB, Rocha YA, Souza CG, Chaves AR. Development of a reliable method for determination of N-nitrosamines in medicines using disposable pipette extraction and HPLC-MS analysis. *Anal Methods* 2024; 16(21): 3318-3330. PMID: 38747210.
 28. Kalauz A, Tiringier KV, Horváth V, Kapui I. Simultaneous determination of low molecular weight nitrosamines in pharmaceutical products by fast gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2023; 1708: 464323. PMID: 37696123.
 29. Majumdar S, Thakur D, Chowdhury D. DNA carbon-nanodots based electrochemical biosensor for detection of mutagenic nitrosamines. *ACS Appl Bio Mater* 2020; 3(3): 1796-1803. PMID: 35021669.