ORIGINAL ARTICLE

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

Mitra Ghodrati Shahtouri[1],
Hamed Fathi[2,3],
Davod Ilbeigi[4,5],
Mehdi Mogharabi-Manzari[6,7],
Ebrahim Fooladi[8]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۳۸ آبان سال ۱۴۰۳ (۲۶-۱۵)

طراحی و ساخت بیوسنسور آنزیمی لکاز بر پایه اکسید گرافن و پلی‌آنیلین به منظور اندازه گیری دفستاتین

میترا قدرتی شاهتوری[۱]
حامد فتحی[۲و۳]
داود ایل بیگی[۴و۵]
مهدی مقربی منظری[۶و۷]
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 آن ها اشاره نمود. لکاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های متعلق به خانواده اکسیدو رداکتاز هاست. خاصیت کاتالیزوری لکاز بیش تر مربوط به فعالیت آن نسبت به دی فنول‌های اورتو و پارا بوده و وابسته به نوع اورگانیسم تولیدکننده آن است. برخلاف بسیاری از آنزیم‌ها که فقط بر یک سوبستری کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند. این آنزیم اکسایش طیف وسیعی ازسوبستراها مانند دی فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، 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 دفستاتین بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بیوسنسور از طریق تثبیت آنزیم لکاز بر سطح الکترود تهیه شد. برای این‌منظور در ابتدا سطح الکترود کربن چاپی استفاده از نانوکامپوزیت گرافن اکساید/ پلی‌آنیلین اصلاح شد. سپس آنزیم لکازاز طریق اتصال‌دهنده‌های 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 پتاسیل اکسایش، pH، دما و غلظت بهینه شد. در پتانسیل ۰/۴۵ ولت نسبت به الکترود نقره/کلرید نقره میزان جریان هر نمونه توسط بیوسنسور، تعیین گردید. سپس نمودار کالیبراسیون آن رسم و ازطریق درونیابی سیگنال‌های آمپرومتریک منطبق بر منحنی‌های کالیبراسیون به‌دست آمده با محلول‌های دفستاتین، اندازه‌گیری‌ها تکمیل شد. بدون هیچ‌گونه آماده‌سازی، از نمونه‌های استاندارد دفستاتین به نمونه نسکافه رقیق شده با بافرفسفات (۰/۰۵ مولار، pH۶/۵) اضافه شد و میزان بازیابی تعیین گردید.

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

استنتاج: از آن‌جا که این پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالینگ 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 اندازه‌گیری دفستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. بیوسنسور تهیه شده شامل آنزیم لکاز و نانوذرات گرافن تثبیت شده توسط نانوکامپوزیت کیتوزان بر سطح الکترود بود و جهت اندازه‌گیری دفستاتین با دقت بالا به‌کار می‌رود. آنزیم لکاز تثبیت شده بر سطح الکترود قادر است مولکول دفستاتین را به‌صورت اختصاصی اکسید کند و موجب تولید پاسخ اختصاصی الکترود نسبت به این مولکول باشد.

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

مولف مسئول: مهدی مقربی منظری– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir
و ابراهیم فولادی– مشهد: موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی E-mail: e.fooladi@rifst.ac.ir

۱. دانشجوی دکترای ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد ایران
۲. کارشناس ارشد زیست شناسی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکترای 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 داروئی، 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

مقدمه

بیوسنسورها ابزارهای تحلیلی هستند که از عناصر بیولوژیکی برای تشخیص و اندازه‌گیری مواد مختلف استفاده می‌کنند(۱). این حسگرها به‌دلیل دقت بالا، پاسخ‌دهی سریع و قابلیت شناسایی انتخابی مواد، اهمیت زیادی در زمینه‌های مختلف مانند پزشکی، محیط زیست و صنایع غذایی دارند(۲). در پزشکی، بیوسنسورها می‌توانند درتشخیص زودهنگام بیماری‌ها، نظارت بر سلامت بیماران و مدیریت داروها نقش حیاتی ایفا کنند. در حوزه محیط زیست، این ابزارها قادر به تشخیص آلاینده‌ها و سموم در آب و هوا هستند که به حفظ محیط‌زیست کمک می‌کند(۳). هم‌چنین درصنایع غذایی، بیوسنسورها می‌توانند کیفیت و ایمنی محصولات را با شناسایی سریع آلودگی‌ها و مواد مضر تضمین کنند. بنابراین، توسعه و استفاده از بیوسنسورها می‌تواند 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 می‌روند. این حسگرها قادر به تشخیص سریع آلودگی‌ها و پاتوژن‌ها مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها هستند، که به تولیدکنندگان کمک می‌کند تا محصولات آلوده را قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده شناسایی و حذف کنند و از شیوع بیماری‌های غذایی جلوگیری کنند(۵). هم‌چنین، بیوسنسورها می‌توانند ترکیبات شیمیایی مرتبط با تازگی و کیفیت مواد غذایی را شناسایی کنند، که این امکان را برای تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان فراهم می‌آورد تا از مصرف مواد غذایی فاسد شده جلوگیری کنند. علاوه بر این، بیوسنسورها در کنترل فرآیندهای تولید و نگهداری مواد غذایی نقش دارند و می‌توانند شرایط محیطی مانند دما، رطوبت و pH را نظارت کنند تا شرایط ایده‌آل برای تولید محصولات با کیفیت بالا حفظ شود. این ابزارها هم‌چنین قادر به تشخیص مواد افزودنی غیر مجاز، سموم و آلاینده‌ها هستند، که به تضمین رعایت استانداردهای ایمنی و کیفیت کمک می‌کند(۶). به‌کارگیری بیوسنسورها در سیستم‌های ردیابی و برچسب‌گذاری محصولات غذایی نیز به شفافیت بیش‌تر در زنجیره تامین و ارائه اطلاعات دقیق به مصرف‌کنندگان درباره منشاء و کیفیت محصولات منجر می‌شود. به طور کلی، استفاده گسترده از بیوسنسورها در صنایع غذایی می‌تواند به کاهش هدررفت مواد غذایی، افزایش ایمنی و بهبود رضایت مصرف‌کنندگان منجر شود(۷). اصلاح سطح الکترود عملکرد حسگر را با بهبود حساسیت و گزینش‌پذیری افزایش می‌دهد که برای نانوحسگرهای مورد استفاده در کاربردهای مختلف مانند زیست پزشکی، ماشین‌آلات و کشاورزی بسیار مهم است. گرافن اکساید، شکل اکسید شده گرافن است که دارای چهار نوع گروه عملکردی شامل کربونیل، کربوکسیل، هیدروکسیل و اپوکسید می‌باشد. ترکیب مواد رسانا در شبکه گرافن اکساید منجر به اثرات هم‌افزایی می‌شود و توانایی گرافن اکساید برای اتصال گیرنده‌های زیستی را حفظ می‌کند که منجر به افزایش رسانایی آن می‌شود. نانوکامپوزیت‌های شامل اکسید گرافن به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود، نقش مهمی در بهبود عملکرد بیوسنسورها دارند. این ذرات با داشتن سطح بسیار بزرگ نسبت به حجم، قابلیت اتصال به مولکول‌های زیستی را افزایش می‌دهند و به این ترتیب حساسیت بیوسنسورها را بهبود می‌بخشند(۸). هم‌چنین، نانوذرات رسانا می‌توانند انتقال سیگنال‌ها را تسریع کنند و زمان پاسخ‌دهی سنسورها را کاهش دهند. علاوه بر این، خواص الکتریکی، آن به‌طور قابل توجهی باعث تقویت سیگنال‌های تولیدی در فرآیندهای تشخیصی می‌شوند(۹). از این‌رو، استفاده از نانوکامپوزیت اکسید گرافن و پلی‌آنیلین در ساختار بیوسنسورها به‌عنوان ابزاری نوآورانه برای ارتقاء دقت، سرعت و کارایی در تشخیص بیماری‌ها و ترکیبات شیمیایی ضروری است.

آنزیم لکاز به عنوان یکی از مهم‌ترین بیوکاتالیست‌ها در بیوسنسورها به دلیل توانایی آن در اکسیداسیون طیف

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

گسترده‌ای از ترکیبات فنلی و غیر فنلی 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(۱۶،۱۵). این ویژگی‌ها، لکاز را به یک جزء کلیدی در توسعه بیوسنسورهای زیست محیطی و پزشکی تبدیل کرده است.

نیتریت 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 نیتریت ممکن است با آمین‌ها و اسیدهای آمینه واکنش داده و N-nitrosamine تولید کند که سرطان‌زا، جهش‌زا و تراتوژن شناخته شده است. این ترکیبات از واکنش آمین‌های ثانویه با عوامل نیتروز کننده مانند نیترات‌ها یا نیتریت‌ها که معمولاً در تولید فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شوند، تشکیل می‌شوند. به‌همین دلیل، استفاده از این عوامل نیتروژن 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 نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها مورد توجه قرار گرفته است به‌طوری 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). دفستاتین یک نیتروزآمین 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). دفستاتین 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 ازدفستاتین به‌عنوان داروی مهارکننده مورد توجه قرار گرفته است. از این رو ارائه روشی دقیق و سریع برای اندازه‌گیری دفستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. این مطالعه با هدف طراحی وساخت بیوسنسور آنزیمی برای اندازه‌گیری دقیق و سریع دفستاتین، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، گرافن اکساید، آنیلین، ۱-(3-دی متیل آمینو پروپیل)-3-اتیل کربودی ایمید 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 برمیلی‌گرم ازشرکت سیگما آمریکا خریداری شد. یک پتانسیواستات/گالوانوستات مدل (Autolab,PGSTAT-302 N) ساخت کشور هلند و مجهز به یک سیستم سه الکترودی متشکل از الکترود کار، و الکترود نقره-کلرید نقره و سیم پلاتین به عنوان الکترودهای مرجع و کمکی، برای همه اندازه‌گیری‌ها مانند ولتامتری چرخه‌ای، کرونوآمپرومتری و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. طیف‌سنج مادون قرمز مدل Avatar 370 ساخت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

کشور امریکا برای ثبت طیف فروسرخ تبدیل فوریه استفاده شد. میکروگراف‌های سطوح الکترود 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.

سنتز نانوکامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین

ابتدا ۱۰ میلی‌گرم گرافن اکساید در ۱۰ میلی‌لیتر آب یون‌زدایی شده دیسپرس شد. سپس، محلول دیسپرس شده به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه همزده شد. با افزودن محلول آنیلین (۰/۲۵ میلی‌مولار در اسید کلریدریک ۰/۱ مولار) به محلول دیسپرس شده، نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین از طریق اکسایش آنیلین (الکتروپلیمریزاسیون) بر روی سطح الکترود قرار داده شد(۲۳).

تثبیت آنزیم بر روی سطح الکترود اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن اکساید/ پلی آنیلین

به منظور تثبیت آنزیم بر سطح الکترود اصلاح شده از اتصال دهنده‌های عرضی (NHS– EDC) استفاده شد. در ابتدا الکترود اصلاح شده، به ترتیب در محلول ((۰/۰۵ mol L^{-1}) EDC در PBS، pH 6.0) و ((۰/۰۱) NHS mol L^{-1} در PBS، pH 6.0) قرار داده شد. سپس، الکترود در محلول آنزیمی (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بیوسنسور تهیه شده در محلول بافر فسفات با pH=۷ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

شناسایی ساختار مروفولوژی و رفتار الکتروشیمیایی الکترود

شناسایی سطح بیوسنسور تهیه شده توسط FE-SEM، ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی انجام شد. در شناسایی‌های الکتروشیمیایی از محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (۱۰ میلی‌مولار) 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 اندازه‌گیری کرونوآمپرومتری(۰/۵-۰/۳ ولت) و دما (۵۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد) بهینه سازی شد. جریان آمپرومتری بعد از اعمال پتانسیل ۰/۴۵ ولت به مدت ۱۰ ثانیه تا رسیدن نمودار کرونوآمپروگرام به حالت ایستا (۳۰ ثانیه) در pH=۶، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد 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.

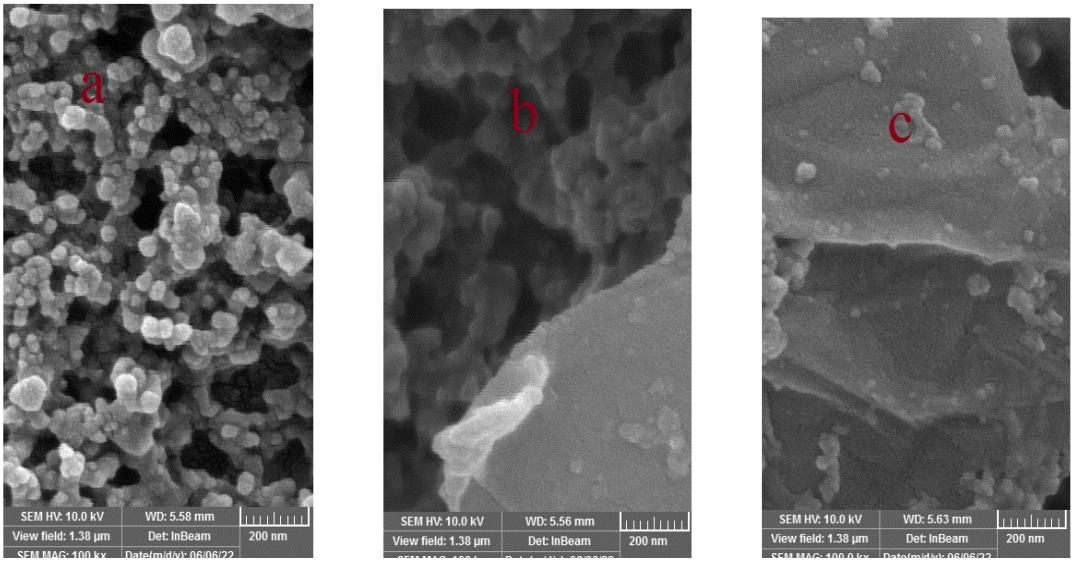
یافته‌ها

بررسی مشخصات سطحی الکترود اصلاح شده

تصاویر SEM مربوط به سطح الکترود اصلاح نشده و اصلاح شده با نانوکامپوزیت و آنزیم در تصویرشماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طورکه در تصویر شماره ۱ (b) مشاهده می‌شود، با تثبیت نانوکامپوزیت GO/PANI بر روی سطح الکترود مورفولوژی سطح الکترود تغییر کرده که دلیلی بر توانایی تشکیل یک لایه پلیمر توسط آنیلین است. با تثبیت آنزیم لکاز، به‌دلیل وجود پروتئین در سطح الکترود، ساختار همگن‌تری مشاهده شد (تصویر شماره ۱ (c)).

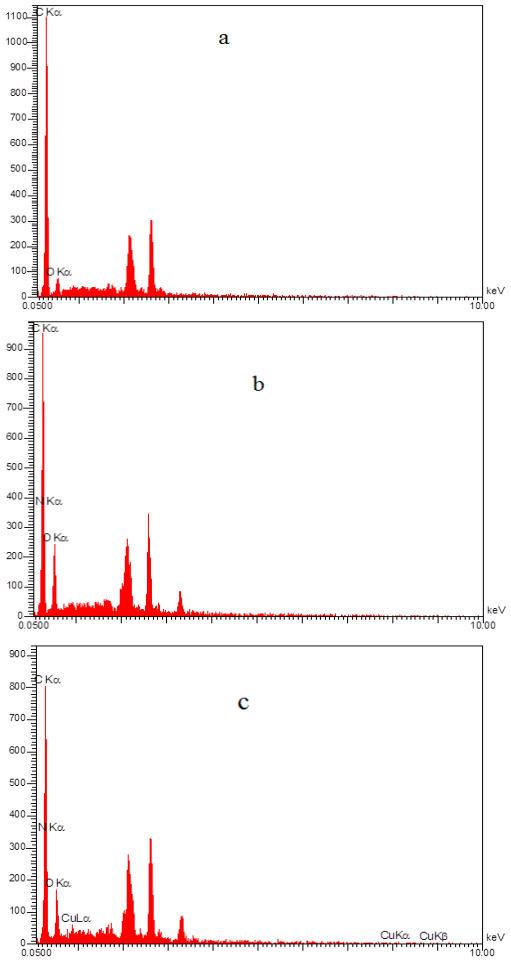
نمودار شماره ۱، طی‌های EDX مربوط به مراحل اصلاح الکترود و تهیه بیوسنسور را نشان می‌دهد. با اصلاح الکتروشیمیایی الکترود SPCE با نانوکامپوزیت GO/PANI پیک مربوط به نیتروژن در نمودار شماره ۱(b) مشاهده شد و با تثبیت آنزیم لکاز که حاوی کوفاکتور مس(Cu) است پیک مربوط بر Cu نشان‌دهنده تثبیت آنزیم بر روی سطح الکترود است (نمودار شماره۱(b)).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]



a b c

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



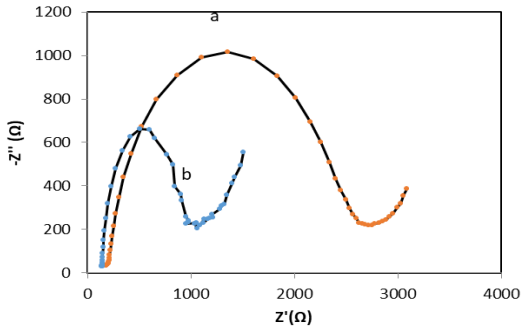
نمودار شماره ۱: طیف EDX مربوط به (a)SPCE، (b) SPCE/GO/PANI و (C) SPCE/GO/PANI/Laccase

رفتار الکتروشیمی الکترود اصلاح شده

از روش ولتامتری چرخه‌ای و طیف سنجی امپدانس جهت بررسی مشخصات سطح الکترود استفاده شد. در روش طیف سنجی امپدانس یک تغییر کوچک و سینوسی به پتانسیل در الکترود 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 الکترود 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 Rct (مقاومت انتقال بار) می‌توان نقش کامپوزیت و رفتار آن بعد از

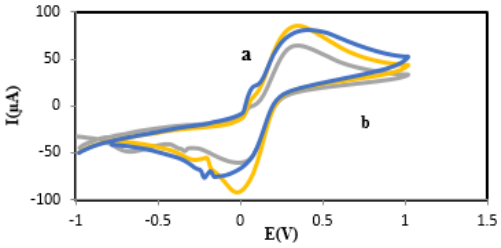
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

تثبیت بر روی سطح الکترود 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 Rct داشته باشد (نمودار شماره ۲).



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

نمودار شماره ۳، رفتار الکتروشیمیایی بیوسنسور نسبت به الکترود اصلاح نشده را نشان می‌دهد. با تثبیت گرافن اکساید بر روی سطح الکترود (b) میزان جریان کاتدی و آندی الکترود اصلاح شده نسبت به الکترود اصلاح نشده در محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ به مقدار ۲۰μA افزایش یافت، که نشان‌دهنده افزایش انتقال الکترون در نتیجه تثبیت نانوذرات گرافن اکساید است.

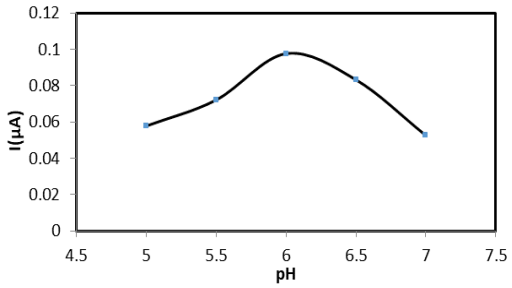


نمودار شماره ۳: ولتامتری چرخه‌ای SPCE(a)، SPCE/GO/PANI (b) و SPCE/GO/PANI/Laccase (C) در محلول $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (۱۰ میلی مولار) و KCl (۰/۱ مولار).

بهینه‌سازی پارامترهای موثر

تاثیر pH و دما

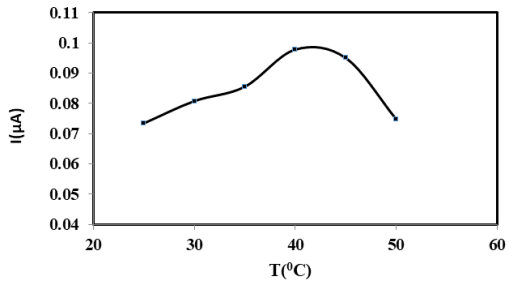
تاثیر pH بر پاسخ بیوسنسوردر محدوده ۷-۵ مورد بررسی قرار گرفت. با تنظیم pH با استفاده از بافر فسفات و غلظت ۲۰ نانومولار دفستاتین پاسخ جریان آمپرومتری تعیین شد؛ نتایج نشان می‌دهد که میزان جریان تا pH برابر ۶ یک افزایش در جریان مشاهده می‌شود و بعد از این pH یک کاهش در جریان مشاهده می‌شود که این کاهش مربوط به کاهش فعالیت آنزیم لکاز در pHهای قلیایی است (نمودار شماره ۴).



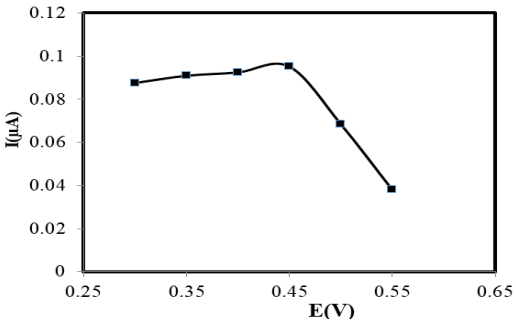
نمودار شماره ۴: pH بهینه مؤثر بر عملکرد بیوسنسور

یکی ازپارامترهای موثر درفعالیت 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 ۵۵-۲۵ 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 پتاسیل بهینه از اهمیت بالایی برخوردار است. این پتاسیل بهینه را می‌توان بر اساس ماکزیمم جریان ولتامتری چرخه‌ای آنالیت و یا اندازه‌گیری جریان در پتاسیل‌های نزدیک به پیک ماکزیمم تعیین نمود. در این پژوهش تغییرات جریان در محدوده پتانسیل‌های ۰/۵-۰/۳ ولت مورد بررسی قرار گرفت که پتانسیل ۰/۴۵ ولت بیش‌ترین جریان آمپرومتری مشاهده شد (نمودار شماره ۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]



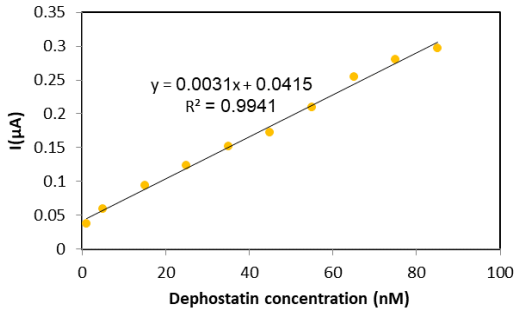
نمودار شماره ۵: دمای بهینه مؤثر بر عملکرد بیوسنسور



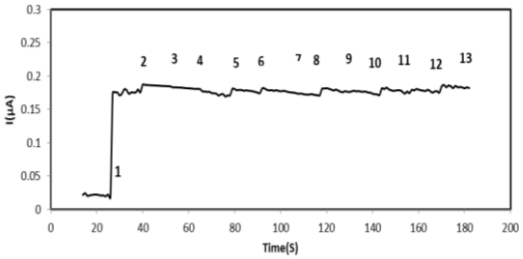
نمودار شماره ۶: تعیین پتانسیل بهینه اندازه‌گیری آمپرومتری بیوسنسور آنزیم لکاز

نمودار شماره ۷، نمودار کالیبراسیون تغییرات جریان نسبت به تغییرات غلظت دفستاتین را نشان می‌دهد. به منظور اندازه‌گیری دفستاتین، پس از شناسایی سطح الکترود، پارامترهای موثر در اندازه‌گیری دفستاتین توسط بیوسنسور آمپرومتری مورد بررسی قرار گرفت. در این بیوسنسور پتانسیل ۰/۴۵ ولت به‌عنوان پتانسیل ثابت اندازه‌گیری جریان، pH= ۶ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. در این شرایط بهینه میزان جریان در غلظت‌های مختلف دفستاتین اندازه‌گیری شد و براساس تغییرات غلظت میزان جریان تعیین شد و نمودار کالیبراسیون رسم شد. این تغییرات در محدوده ۹۰۰-۱۰ نانومولار خطی است. ضریب رگرسیون ۰/۹۹۴۱ و معادله خط Y= 0.0031+0.0415 تعیین شد. حد تشخیص بر اساس ۳ برابر انحراف استاندارد غلظت ۱۰ نانومولار ۰/۶ نانومولار به دست آمد.

بررسی اثر مزاحمت هر کدام از ترکیبات گزالات (۵µM)، پرولین (۵µM)، والین (۵µM)، گلیسرین (۵µM)، فروکتوز(۵µM)، کافئین (۵µM)، ساکاروز (۵µM)، گلوکوز (۵µM)، کلرید پتاسیم (۵µM)، آسکوربیک اسید (۱µM) و گالیک اسید (۱µM) را به‌صورت اندازه‌گیری جداگانه در حضور ۵۰nM از دفستاتین و در شرایط بهینه به سل الکتروشیمیایی اضافه شد. اندازه‌گیری‌های آمپرومتری برای گونه‌های مزاحم در نمودار شماره ۸ نشان می‌دهد که از بین این گونه‌ها آسکوربیک اسید به دلیل نزدیکی پتانسیل اکسایش و کاهش آن به ۰/۴۵ ولت و گالیک اسید به دلیل وجود گروه‌های فنولی و تاثیر آن بر روی آنزیم بیش‌ترین تاثیر را دارند.



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



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

کاربرد بیوسنسور آنزیمی لکاز در اندازه‌گیری آمپرومتری دفستاتین در نمونه‌های حقیقی

با توجه به این که N-nitrosamines توسط IARC و US EPA به عنوان مواد سرطان‌زا طبقه‌بندی می‌شوند، به راحتی در غذاهای مختلف یافت می‌شوند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

آن‌ها محصولات واکنش بین اکسید نیتروژن و آمین‌های ثانویه هستند، اما می‌توانند در طی تخمیر نیز تولید شوند. دفستاتین به عنوان یک نیتروزآمین فنولی می‌تواند از واکنش نیترات 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 دفستاتین و در شرایط بهینه در حضور بافر فسفات مقدار دفستاتین در نمونه‌های حقیقی و میزان بازیابی تعیین شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: اندازه‌گیری دفستاتین در نمونه نسکافه

نمونه	غلظت اضافه شده به نمونه های نسکافه (نانو مولار)	غلظت دفستاتین اندازه گیری 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

نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا به تشخیص و کنترل منابع آلودگی کمک می‌کند و به بهبود کیفیت محصولات وحفاظت ازسلامت عمومی منجر می‌شود(۲۵). با توجه به خطرات بالقوه‌ای که نیتروزآمین‌ها 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).

در مطالعه‌ای که اخیرا توسط Junior و همکاران انجام شد، روشی نوین برای اندازه‌گیری نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها حاصل شود. پژوهشگران ابتدا نمونه‌های آب را با استفاده از روش استخراج فاز جامد آماده‌سازی کردند تا نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها 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 نیتروزآمین‌ها با وزن ملکولی کم مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۸). یک سنجش مولکولی بر اساس دو پروب فلورسنت جهت شناسایی و تعیین کمیت نیتروزآمین‌ها، از جمله نیتروزآمین‌های مرتبط با سرطان توسط Minani وهمکاران مورد بررسی قرار گرفت(۱۸).

در مطالعه دیگری، یک بیوسنسور الکتروشیمیایی DNA مبتنی بر نقاط کربنی برای تشخیص حساس و انتخابی نیتروزآمین‌های 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 الکترود کربن شیشه‌ای رسوب کرد، سپس DNA به صورت الکترواستاتیکی روی سطح نقاط کربن تثبیت شد تا بیوسنسور ساخته

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

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 گزینش‌پذیری و حساسیت بالا تشخیص دهد. هم‌چنین، حد تشخیص به ترتیب $۹/۹ \times ۱۰^{-۹}$ مولار و $۹/۶ \times ۱۰^{-۹}$ مولار گزارش شد(۲۹).

در مطالعه حاضر، بیوسنسور آنزیمی لکاز برای اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری دفستاتین ممکن است به دلیل ساختار ویژه آنزیم لکاز و برهم‌کنش‌های مؤثر آن با دفستاتین باشد. لکاز به‌عنوان یک آنزیم اکسیداز، قابلیت اکسید کردن دفستاتین و تولید سیگنال الکتروشیمیایی قابل اندازه‌گیری را دارد. نوآوری اصلی این تحقیق، استفاده از لکاز به‌عنوان عنصر تشخیصی بیوسنسور است. این انتخاب نه‌تنها باعث افزایش حساسیت بیوسنسور شده است، بلکه زمان پاسخ‌دهی را نیز کاهش داده است. علاوه بر این، طراحی نانوساختار 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 تأثیرگذار باشند. هم‌چنین، تحقیقات بیش‌تری 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 اندازه‌گیری قابل حمل و کاربر پسند متمرکز شود.

اندازه‌گیری دفستاتین توسط روش‌های کروماتوگرافی انجام می‌شود که نیاز به دستگاه‌های گران قیمت داشته و وقت‌گیر 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 اندازه‌گیری 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/ پلی‌آنیلین بر سطح الکترود بوده و جهت اندازه‌گیری دفستاتین با دقت بالا به کار می‌رود. با تثبیت نانوکامپوزیت و آنزیم بر روی سطح الکترود میزان جریان کاتدی و آندی الکترود اصلاح شده نسبت به الکترود اصلاح نشده در $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ افزایش یافت. انتقال الکترون در سطح الکترود در نتیجه حضور نانوذرات گرافن اکساید در سطح الکترود به میزان ۲۰ میکروآمپر افزایش یافت. آنزیم لکاز تثبیت شده بر سطح الکترود قادر است مولکول دفستاتین را به صورت اختصاصی اکسید کند و موجب تولید پاسخ اختصاصی الکترود 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 سیگنالیک سلولی و بروز برخی بیماری‌ها موثر هستند، استفاده از دفستاتین به‌عنوان داروی مهارکننده مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو ارائه روشی دقیق و سریع برای اندازه‌گیری دفستاتین از اهمیت بالایی در صنایع دارویی برخوردار است. لذا استفاده از این بیوسنسور امکان اندازه‌گیری میزان نیتروزآمین 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

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 bio-sensing: 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]

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, Tiringer 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-02]