

ساخت حسگر الکتروشیمیایی اصلاح شده با نانو ذرات گرافن برای اندازه گیری وارفارین در نمونه های پلاسما

فروزان حسن پور*، معصومه طایی، محسن نکویی نیا، بیژن دادرس، سمیرا دیوان زاده

گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷ تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: وارفارین یک داروی ضد انعقاد است و مانع از لخته شدن خون در مواردی مانند آمبولی ریه و تشکیل لخته در وریدهای عمقی ساق پا که احتمال تشکیل ترومبوز بالاست، می گردد. وارفارین از مرز سلامتی اندکی برخوردار می باشد. بنابراین کنترل سطح غلظت درمانی در خون حائز اهمیت می باشد. حسگرهای الکتروشیمیایی به دلیل داشتن مزایایی از قبیل گزینش پذیری زیاد، حساسیت بالا و کم هزینه بودن ابزارهای قدرتمندی در زمینه ی تشخیص بیماری ها، بررسی و نظارت های پزشکی به شمار می روند. این مطالعه با هدف ساخت یک نوع حسگر الکتروشیمیایی براساس اصلاح سطح الکتروود کربن با نانوذرات گرافن برای تعیین کمی وارفارین در پلاسما صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه پلاسمای ۸ بیماری که وارفارین مصرف می کردند، مورد آنالیز قرار گرفت. پس از رسوب دهی پروتئین های پلاسما به کمک استونیتریل، نمونه سانتریفوژ شد و محلول شفاف بالایی به لوله آزمایش منتقل گردید. محلول حاصل با گاز نیتروژن تبخیر شد تا کاملاً خشک گردد. رسوب باقیمانده با آب مقطر رقیق شده و به سل الکتروشیمیایی منتقل گردید تا اکسایش وارفارین توسط حسگر ساخته شده مورد ارزیابی قرار گیرد. یافته ها: نتایج آزمایش نشان داد نانو حسگر ساخته شده جریان اکسایش وارفارین را به شدت کاتالیست می کند. همچنین یک ارتباط خطی (با روش حداقل مربعات) بین جریان اکسایش وارفارین و غلظت آن در پلاسما وجود داشت.

نتیجه گیری: این حسگر توانست به عنوان روشی ساده و کم هزینه وارفارین پلاسمای بیماران را با دقت و صحت خوبی اندازه گیری نماید.

واژه های کلیدی: وارفارین، حسگر الکتروشیمیایی، نانو ذرات گرافن.

مقدمه:

متابولیسم این دارو در بدن افراد وابسته است. این دارو از مرز سلامتی اندکی برخوردار می باشد. زیرا در مواردی که سطح دارو در خون پایین باشد احتمال لخته شدن خون وجود دارد. از سویی دیگر چنانچه سطح این دارو در خون بالا برود احتمال خونریزی وجود دارد. بنابراین نظارت بر سطح غلظت این دارو در بدن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. سطح خونی وارفارین با تستی به نام (Prothrombin Time= PT) کنترل می شود.

وارفارین یک داروی ضدانعقاد است که توانایی بدن را برای تشکیل لخته خون کاهش می دهد (۱). این دارو خون را رقیق نمی کند بلکه فرآیند لخته شدن خون را کند کرده و باعث سهولت گردش خون در بدن می شود. وارفارین از طریق مهار فعالیت ویتامین K، فاکتورهای انعقادی را که برای فعالیت خود نیاز به ویتامین K دارند مهار می کند (۲). مقدار داروی مورد نیاز در افراد مختلف بسیار متفاوت بوده و به شدت به

دارو ساخت. حسگر الکتروشیمیایی یک دریافتگر حسی با قابلیت حمل می باشد که از طریق واکنش اکسیداسیون آنالیت روی سطح آن علامت الکتریکی متناسب با غلظت آنالیت مورد نظر ایجاد می کند. این حسگر توسط گرافن یک نانو ماده آلی که کاربرد وسیعی در ساخت حسگرهای الکتروشیمیایی داراست، ساخته می شود (۷۸). گرافن از اتم های کربن در پیکربندی تشکیل شده است. این پیکربندی الکترونی موجب خواص فوق العاده گرافن از جمله رسانندگی الکتریکی بالای آن می شوند (۹). این حسگرها دارای کاربرد وسیعی در زمینه ی پزشکی بالینی از جمله اندازه گیری داروها و متابولیت آن ها دارند. تاکنون تعداد کمی حسگرهای الکتروشیمیایی برای اندازه گیری این دارو به کار گرفته اند. این حسگرها شامل الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات مغناطیسی آهن، نانو لوله ها، نانوذرات کادمیوم می باشند (۱۰-۱۲). در این مطالعه برای اولین بار از نانو ذرات گرافن به عنوان اصلاحگر و ساخت حسگر الکتروشیمیایی استفاده شده است.

روش بررسی:

محللول بافر فسفات از انحلال سدیم دی هیدروژن فسفات NaH_2PO_4 و سدیم مونو هیدروژن فسفات Na_2HPO_4 ، هر کدام به غلظت ۰/۰۵ مولار در یک بالن ژوژه صد میلی لیتری تهیه شد. وارفارین (آپوتکس، کانادا) و پودر گرافیت (سیگما، آمریکا) خریداری شد. تمام اندازه گیری ولتامتری با استفاده از یک سیستم الکتروشیمیایی (Herisau, Switzerland) مدل metrohm انجام گرفت. pH محلول با pH متر کورنینگ (مدل ۱۴۶) کنترل شد. جهت بررسی و مورفولوژی سطح و سایز ذرات بر روی سطح الکتروود، تصاویر توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی با مدل (FE-SEM) (Hitachi) انجام شد. سنتز گرافن اکسید از ماده ی اولیه گرافیت با استفاده از روش هامر انجام شد (۱۳). سپس حسگر الکتروشیمیایی از احیای الکتروشیمیایی گرافن اکسید با استفاده از اسکن های

شاخصه ی استاندارد دیگر برای تعیین سطح وارفارین در خون (International Normalized Ratio= INR) می باشد. مقدار INR معادل ۲-۳ نشانگر سطح درمانی وارفارین است. INR کمتر از ۱/۸ نشان دهنده ی انعقاد پذیری خون در افراد می باشد. بیمارانی که شاخصه INR بالاتر از سطح درمانی دارند مستعد خطر ابتلا به خونریزی می باشند، در حالی که بیمارانی با INR پایین تر از این سطح دچار کمبود وارفارین برای محافظت در برابر حوادث ترومبوآمبولیک هستند. مسمومیت وارفارین در اغلب موارد به دلیل افزایش دوز درمانی می باشد. با توجه به اینکه این دارو سریعاً جذب خون می گردد، در دوزهای بالا منجر به مسمومیت و آسیب در مورد افزایش دوز وارفارین (چه به صورت درمانی و چه به صورت مسمومیت) عوارض متعددی از جمله عوارض گوارشی گرفته تا اختلالات انعقادی را می تواند به دنبال داشته باشد (۳). پس تعیین غلظت وارفارین در پلاسما نشان دهنده ی وضعیت بیمار بوده و می تواند کمک به درمان آن باشد. عوارض جانبی شایع وارفارین شامل حالت تهوع، استفراغ، درد معده، نفخ و در برخی موارد خونریزی می باشد (۴-۶). ویتامین K که به ایجاد لخته در خون و جلوگیری از خونریزی کمک می کند، دارای نقش متضادی با وارفارین می باشد. در بیمارانی که وارفارین مصرف می کنند دریافت زیاد ویتامین K باعث کاهش اثر دارو می گردد. به همین دلیل بسیار مهم است که میزان این ویتامین در رژیم غذایی بیمار ثابت باقی بماند تا کنترل میزان دارو مشکل نباشد. اثر ضد انعقادی وارفارین طی ۲-۷ روز پس از شروع مصرف وارفارین خوراکی طبق مقدار تعیین شده توسط پزشک، مشاهده می شود. با شروع مصرف وارفارین فرد به طور مرتب و روزانه چک می شود و این عمل تا زمانی که INR دو بار پشت سر هم در محدوده درمانی مطلوب واقع شود، ادامه دارد. با توجه به اینکه وارفارین دارای یک گروه عاملی هیدروکسیل قابل اکسایش می باشد. در این تحقیق سعی بر آن است تا بتوان یک حسگر الکتروشیمیایی برای این

حاوی وارفارین اضافه می شود و جریان اکسایش مربوط به هر ظرف را آنالیز و در نهایت ارتفاع یا سطح زیر پیک نمونه ها را بر اساس حجم استاندارد اضافه شده رسم می کنند. در نهایت با استفاده از روابط موجود می توان غلظت وارفارین موجود در پلاسما را محاسبه کرد. استفاده از این روش سبب حفظ بافت و ماتریس نمونه ها می شود، در نتیجه با این روش احتمال مزاحمت بافت (Matrix Interference) نمونه از بین برده می شود. برای بررسی انتخابی بودن حسگر نسبت به وارفارین در برابر داروهایی که امکان مصرف همزمان با وارفارین را دارند و همچنین ترکیباتی مانند آمینواسیدها، اوریک اسید، آسکوربیک اسید که امکان ایجاد مزاحمت داشتند مورد بررسی قرار گرفتند. این داروها عبارت بودند از استامینافن، آسپیرین، ایبوپروفن، تتراسایکلین، اریترومايسين، آزیترومایسین، تنوفیلین، آموکسی سیلین، سایمتیدین، دگزامتازون، فولیک اسید، دیفن هیدرامین، متروئیدازول، دیازپام، آمپی سیلین و پنی سیلین. این داروها در سطح غلظت درمانی تهیه و به پلاسما اضافه شدند. برای محاسبه ی مزاحمت ها از رابطه ی (۱) استفاده شد:

$$\frac{A-B}{B} \times 11 < \pm 5 \% \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه برای ۱/۰ میکروگرم بر میلی لیتر وارفارین B میانگین جریان اندازه گیری شده بدون حضور مزاحم و A میانگین جریان اندازه گیری شده در حضور مزاحم می باشد. اگر حضور دارو باعث ایجاد ۵٪ تغییر در سیگنال جریان وارفارین می شد، به عنوان مزاحم به شمار می آمد. در غیر این صورت داروی مورد نظر در اندازه گیری وارفارین اختلالی ایجاد نمی کند (۱۷).

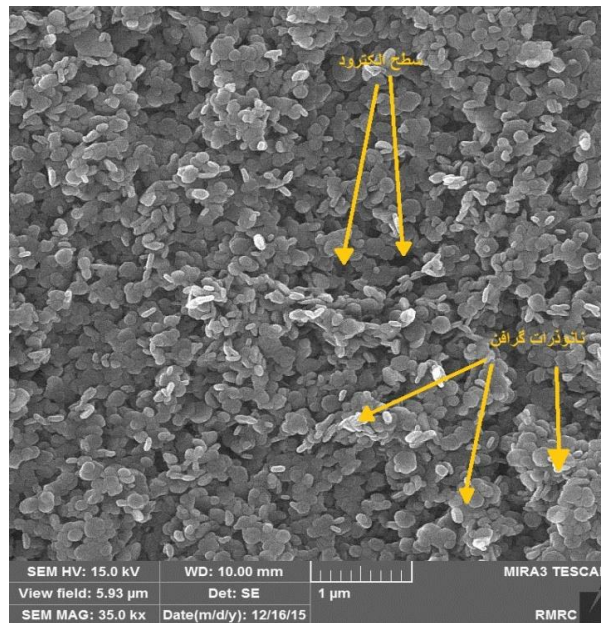
یافته ها:

تصویر شماره ۱ مورفولوژی بسیار یکنواخت و کروی نانوذرات گرافن تشکیل شده بر روی سطح الکتروود را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود میانگین ابعاد نانو ذرات در حدود ۱۰۰ نانومتر می باشد

ولتاژمتری چرخه ای در ولتاژ ۰/۵ تا ۱ ولت ساخته شد (۱۴). مورفولوژی سطح حسگر الکتروشیمیایی برای اثبات تشکیل نانو ذرات گرافن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. سپس حسگر الکتروشیمیایی ساخته شده از لحاظ گزینش پذیری، دقت، صحت و پایداری ارزیابی شد. برای تعیین گزینش پذیری حسگر نسبت به وارفارین در حضور ترکیباتی که در پلاسما احتمال اکسایش در همان پتانسیل دارند، حد تحمل گونه های مزاحم اندازه گیری شد. حد تحمل به عنوان حداکثر غلظت گونه ی مزاحم در نظر گرفته شد که باعث خطای نسبی بیش از ۵٪ ± بر روی سیگنال اکسیداسیون وارفارین داشته باشد (۱۵). این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت و نمونه ها از بیمارستان چمران اصفهان دریافت شد. در این پژوهش پلاسمای خون ۸ بیمار که داروی وارفارین مصرف می کردند. پس از ۴ ساعت از تزریق این دارو گرفته شد. نمونه ها پس از دریافت به دمای ۲۰°C- منتقل شدند. برای حذف مزاحمت ناشی از پروتئین های پلاسما به ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما ۲ میلی لیتر استونیتریل اضافه گردید و به شدت در لوله ی آزمایش به هم زده شد. پس از سانتریفوژ کردن محلول تشکیل شده ی شفاف در بالای لوله ی آزمایش که فاقد پروتئین بود به لوله ی دیگری منتقل شد و به آن گاز نیتروژن دمیده شد (۱۶). پس از بخار شدن استونیتریل ترکیب خشک در کف لوله آزمایش با ۵ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH= ۴ به حجم رسانده شد و به سل الکتروشیمیایی منتقل گردید. سپس اکسایش وارفارین با تکنیک ولتاژمتری اندازه گیری شد. در نهایت غلظت وارفارین با استفاده از روش افزایش استاندارد اندازه گیری شد. در این روش پلاسمای گرفته شده از بیمار به ۴ قسمت تقسیم بندی می شود. به ظرف اول که حاوی وارفارین واقعی موجود در پلاسما هست، هیچ گونه استاندارد اضافه نمی شود و مستقیماً مورد آنالیز قرار می گیرد. سپس به ۳ ظرف که حاوی مقدار یکسانی از نمونه است، حجم های مشخصی از استاندارد

نانوذرات گرافن سطح وسیعی از الکتروود را پوشانده اند،
سطح الکتروود برهنه به سختی قابل رویت می باشد.

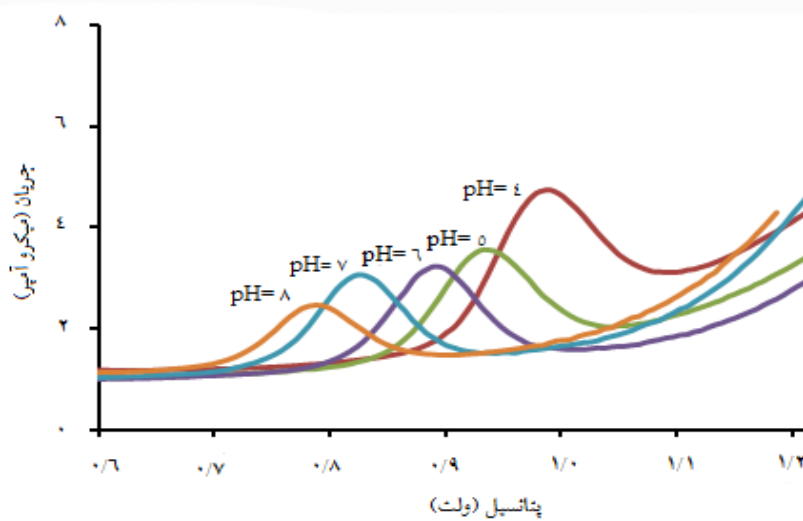
که موجب سهولت انتقال الکترون و افزایش جریان نسبت
به الکتروود کربن فاقد نانو ذره می گردد. با توجه به اینکه



تصویر شماره ۱: مورفولوژی نانو ذرات گرافن روی سطح حسگر وارفارین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی

اکسیداسیون وارفارین در محدوده $\text{pH} = 4-8$ بافر فسفات
مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در $\text{pH} = 4$ بیشترین
جریان اکسیداسیون صورت می پذیرد (تصویر شماره ۲).

از آنجا که وارفارین شامل گروه هیدروکسیل
حساس به pH است تغییر در pH می تواند بر روی رفتار
اکسیداسیون این دارو تأثیر گذارد. برای تعیین pH بهینه



تصویر شماره ۲: تأثیر pH بر روی پتانسیل و جریان اکسایش وارفارین

$$R^2 = \frac{(\sum XY - n\bar{X}\bar{Y})^2}{(\sum X^2 - n\bar{X}^2)(\sum Y^2 - n\bar{Y}^2)} \quad \text{رابطه (۲)}$$

در این رابطه X غلظت وارفارین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر، Y جریان اکسایش این دارو بر حسب میکرو آمپر و n تعداد اندازه گیری ها (n= ۸) می باشد. نتایج بررسی تداخل داروها نشان داد که تنها اسید آمینه ی سیستین باعث تغییر ۱۰٪ در سیگنال می شود و سایر داروها باعث تغییر کمتر از ۵٪ در سیگنال اکسایش وارفارین می شدند. نتایج آنالیز وارفارین در ۱۰ نمونه پلاسما در جدول شماره ۱ آمده است. برای اطمینان از صحت روش مورد نظر میزان بازیابی وارفارین در پلاسما با روش افزایش استاندارد مورد بررسی واقع شد. همان طور که در جدول مشاهده می شود، بازیابی روش در محدوده ی ۱۰۸٪-۹۵٪ قرار داشت.

ماندگاری حسگر با استفاده از ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از وارفارین اندازه گیری شد. هنگامی که حسگر در دمای یخچال نگهداری شود، در مدت ۳۰ روز جریان اکسایش وارفارین به مقدار ۹۵٪ اولیه اش کاهش می یابد. تکرار پذیری حسگر با ساخت ۵ حسگر مستقل با استفاده پروتکل مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. انحراف استاندارد حاصل از ۵ اندازه گیری در جریان اکسایش ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از وارفارین ۳/۶٪ محاسبه شد. با استفاده از روش حداقل مربعات در شرایط بهینه ارتباط بین جریان اکسایش وارفارین با غلظت این دارو در گستره ی ۵۰-۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر در پلاسما، ضریب همبستگی از رابطه ی (۲) $R^2=0/998$ به دست آمد.

جدول شماره ۱: اندازه گیری وارفارین در چند نمونه پلاسما توسط حسگر اصلاح شده با نانو ذرات گرافن

نمونه	دوز اضافه شده وارفارین ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	مقدار اندازه گیری شده وارفارین ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	درصد بازیابی
پلاسما ۱	۰	$1/0 \pm 0/02$	-
	۱۰	$10/7 \pm 0/3$	۹۷/۲٪
پلاسما ۲	۰	$5/2 \pm 0/05$	-
	۵	$9/7 \pm 0/2$	۹۵٪
پلاسما ۳	۰	$2/5 \pm 0/05$	-
	۱۰	$12/0 \pm 0/3$	۹۶٪
پلاسما ۴	۰	$6/0 \pm 0/05$	-
	۱۰	$16/3 \pm 0/4$	۱۰۱/۸٪
پلاسما ۵	۰	$3/2 \pm 0/02$	-
	۲۰	$22 \pm 0/4$	۹۴/۸٪
پلاسما ۶	۰	$2/7 \pm 0/03$	-
	۵	$7/1 \pm 0/09$	۹۲/۲٪
پلاسما ۷	۰	$1/5 \pm 0/01$	-
	۱۰	$12/2 \pm 0/3$	۱۰۶٪
پلاسما ۸	۰	$0/5 \pm 0/01$	-
	۵	$5/1 \pm 0/05$	۹۲/۷٪

بحث:

پایداری شیمیایی گرافن توسط محققان به اثبات رسیده است (۱۸). Zhou و Bongiorno اثر جذب سطحی گونه های حاوی هیدروکسیل بر روی گرافن را مورد بررسی قرار دادند و اثبات کردند که برهمکش این گونه ها با گرافن هیچ تغییری در ساختار سه بعدی آن ایجاد نمی کند (۱۹). نتایج ما همسو با یافته های محققان نشان داد که جریان وارفارین قبل و بعد از قرار گرفتن در محیط اسیدی/ بازی اختلاف ($\pm 2\%$) قابل ملاحظه ای ندارد. اولین اثری که نانو ذرات گرافن بر عملکرد حسگر دارند، افزایش سطح حسگر است. به موجب افزایش نسبت سطح حسگر انتقال الکترون از دارو به حسگر افزایش یافته و در نتیجه جریان اکسیداسیون وارفارین و حساسیت حسگر افزایش می یابد. در نتیجه این روش می تواند وارفارین را در مقادیر بسیار ناچیز اندازه گیری کند. برای اثبات افزایش سطح الکتروود اصلاح شده با گرافن نسبت به الکتروود برهنه آزمایش راندلس - سویک انجام شد (۲۰). در این آزمایش از محلول آهن (III) با غلظت ۱ میلی مولار به عنوان پروب استفاده شد. با استفاده از معادله ی (۲) و ترسیم جریان (I) بر حسب سرعت روبش پتانسیل (۷) سطح میکروسکوپی الکتروودها (A) محاسبه می شود.

$$I = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (2) \text{ معادله}$$

در این معادله D ثابت دیفیوژن آهن و C_0 غلظت آهن و n تعداد الکترون مبادله شده می باشد. آزمایش نشان داد نسبت سطح الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات گرافن نسبت به الکتروود برهنه ۲/۲ برابر می باشد. از آنجایی که جریان رابطه ی مستقیم با سطح الکتروود دارد، می توان گفت حساسیت اندازه گیری وارفارین در حسگر ۲/۲ برابر الکتروود برهنه می باشد. مقایسه جریان وارفارین روی دو الکتروود این فرضیه را تصدیق می کند. تاکنون ۳ روش الکتروشیمیایی با استفاده از الکتروودهای اصلاح شده برای اندازه گیری

وارفارین گزارش شده است. قلی وند و محمدی بهزاد از الکتروود اصلاح شده نانو ذرات کادمیوم- نانو لوله کربن به عنوان حسگر برای اندازه گیری وارفارین استفاده کردند (۱۲). جریان وارفارین بر روی حسگر نسبت به الکتروود برهنه حدود ۲ برابر افزایش نشان داد. همچنین در پژوهش دیگر قلی وند و همکاران نشان داد استفاده از اصلاحگر نانو ذرات مغناطیسی آهن باعث افزایش ۱/۷ برابر جریان روی الکتروود اصلاح شده نسبت به الکتروود برهنه می گردد (۱۰). طایی و عابدی از نانو لوله کربنی همراه با نانو ذرات مغناطیسی آهن/ روی/ کروم برای اندازه گیری وارفارین استفاده کردند (۱۱). نتایج آزمایش در این پژوهش نشان داد جریان وارفارین بر روی الکتروود اصلاح شده ۲/۴ برابر الکتروود برهنه می باشد. اگرچه نتایج پژوهش اخیر نشان می دهد اصلاحگر نانو لوله کربنی- نانو ذرات مغناطیسی آهن/ روی/ کروم نسبت به اصلاحگر نانو ذرات گرافن باعث حساسیت اندکی بیشتر می گردد، روش پیشنهادی این تحقیق دارای مزایایی از قبیل زمان آماده سازی کوتاه و قیمت مناسب تهیه اصلاحگر می باشد. وارفارین دارای گروه هیدروکسیل می باشد. با توجه به اینکه سطح گرافن دارای بار منفی می باشد و گروه هیدروکسیل وارفارین دارای $pK_a = 5$ است، در pH های کمتر از ۵ که وارفارین دارای بار مثبت می باشد، جاذبه ی الکتروستاتیک می تواند باعث افزایش غلظت وارفارین روی سطح الکتروود گردد. تصویر شماره ۲ نشان می دهد با تغییرات pH پتانسیل اکسایش وارفارین به سمت مقادیر کمتر می رود. این پدیده حاکی از حضور موثر پروتون در واکنش اکسایش این دارو می باشد. نتایج مشابهی در پژوهش های مذکور گزارش شده است (۱۲-۱۰). یکی دیگر از مزایای این روش انتخابی بودن آن است که غیر از سیستمین تقریباً داروی دیگری با سیگنال وارفارین تداخل ندارد. مقدار سیستمین در پلاسما در مقابل دوز درمانی وارفارین ناچیز است و

۰/۵ سی سی و زمان لازم برای تهیه نمونه حدود یک ساعت می باشد. با توجه به اینکه دوز درمانی وارفارین در گستره ی ۰/۵-۳/۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد، وارفارین پلازما ی دو بیمار دارای دوز بالاتر از حد درمانی می باشند.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از دانشگاه پیام نور به دلیل حمایت مالی در انجام کار پژوهشی قدردانی می گردد.

مزاحمتی ایجاد نمی کند. صحت این روش با تعیین میزان بازیابی (۱۰۶٪-۹۲/۲٪) وارفارین در پلازما با روش افزایش استاندارد به اثبات رسید.

نتیجه گیری:

نتایج آزمایش نشان داد، ساخت این حسگر می تواند روشی ساده، دقیق، کم هزینه با حساسیت بالا برای اندازه گیری وارفارین در پلازما را در اختیار پژوهشگران قرار دهد. در این روش حجم پلاسمای مورد استفاده برای اندازه گیری وارفارین ناچیز بوده

منابع:

1. Keeling D, Baglin T, Tait C, Watson H, Perry D, Baglin C, et al. Guidelines on oral anticoagulation with warfarin. 4th ed. Br J Haematol. 2011; 154(3): 311-24.
2. Booth SL, Al Rajabi A. Determinants of vitamin K status in humans. Vitam Horm. 2008; 78: 1-22.
3. El-Naby AGA, Hashem H, Ismail G. Evaluation of a designed warfarin educational program on patients' knowledge and incidence of side effects. Global J Pharm. 2014; 8(4): 592-600.
4. Lurie Y, Loebstein R, Kurnik D, Almog S, Halkin H. Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. Br J Clin Pharmacol. 2010; 70(2): 164-70.
5. Radaelli F, Dentali F, Repici A, Amato A, Paggi S, Rondonotti E, et al. Management of anticoagulation in patients with acute gastrointestinal bleeding. Dig Liver Dis. 2015; 47(8): 621-7.
6. Kessler CM, Urgent reversal of warfarin with prothrombin complex concentrate, J Thromb Haemost. 2006; 4: 963-6.
7. Qiu H, Bechtold T, Le L, Lee WY. Evaporative assembly of graphene oxide for electric double-layer capacitor electrode application. Powder Technol. 2015; 270: 192-6.
8. Arvand M, Ghodsi N. A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for the determination of trace amounts of l-dopa in mouse brain extract and pharmaceuticals. J Solid State Electr. 2013; 17(3): 775-84.
9. Goyal V, Balandin AA. Thermal properties of the hybrid graphene-metal nano-micro-composites: Applications in thermal interface materials. Appl Phys Lett. 2012; 100(7): 1-14.
10. Gholivand MB, Torkashvand M, Yavari E. Electrooxidation behavior of warfarin in Fe₃O₄ nanoparticles modified carbon paste electrode and its determination in real samples. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015; 48: 235-42.
11. Taei M, Abedi F. New modified multiwalled carbon nanotubes paste electrode for electrocatalytic oxidation and determination of warfarin in biological and pharmaceutical samples. Chinese J Catal. 2016; 37(3): 436-45.
12. Gholivand MB, Mohammadi-Behzad L. An electrochemical sensor for warfarin determination based on covalent immobilization of quantum dots onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes and chitosan composite film modified electrode. Mater Sci Eng C Mater Biol App. 2015; 57: 77-87.
13. Shahriary L, Athawale AA. Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. Int J Renew Energy Environ Eng. 2014; 2(01): 58-63.

14. Chen L, Tang Y, Wang K, Liu C, Luo S. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. *Electrochem Commun.* 2011; 13(2): 133-7.
15. Ensafi AA, Khayamian T, Hasanpour F. Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48(1): 140-4.
16. Kay R, Barton C, Ratcliffe L, Matharoo-Ball B, Brown P, Roberts J, et al. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008; 22(20): 3255-60.
17. Apetrei IM, Apetrei C. Biosensor based on tyrosinase immobilized on a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for detection of epinephrine. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 4391-8.
18. Alhwaige AA, Alhassan SM, Katsiotis MS, Ishida H, Qutubuddin S. Interactions, morphology and thermal stability of graphene-oxide reinforced polymer aerogels derived from star-like telechelic aldehyde-terminal benzoxazine resin. *RSC Advances.* 2015; 5(112): 92719-31.
19. Zhou S, Bongiorno A. Origin of the chemical and kinetic stability of graphene oxide. *Sci Rep.* 2013; 3: 2484.
20. Anson AC, *Electroanalytical chemistry.* USA: American Chemical Society, Washington, D. C; 1976.

Fabrication of modified electrochemical sensor using graphen nano particle for determination of warfarin in plasma samples

Hasanpour F*, Taei M, Nekoeinia M, Dadras B, Divanzadeh S
Chemistry Dept., Payame Noor University, PO BOX 19395-4697 Tehran, I.R. Iran.

Received: 29/Feb/2016 Accepted: 27/Jul/2016

Background and aims: Warfarin is anticoagulant drug and prevents thromboembolism in cases such as pulmonary embolism and blood clot in a leg vein which under high risk of thrombosis. The therapeutic window of warfarin is very narrow. Therefore, it is important to monitoring the level of warfarin in blood patient. Electrochemical sensors are powerful tools in the field of diseases diagnosis and medical care, due to advantages such as high selectivity, high sensitivity and low. The aim of this study was fabrication of an electrochemical sensor base on modification of carbon electrode using graphene nanoparticle for quantification of warfarin in plasma.

Methods: In this study, plasma sample of 8 patients who had consumed warfarin were analyzed. After precipitation of plasma proteins by acetonitrile, the sample was centrifuged and the supernatant was transferred to a test tube. The resulting solution was evaporated by stream of nitrogen gas to complete drying. The dry residue was diluted by distilled water and transferred into the voltammetric cell for evaluation of warfarin oxidation by sensor.

Results: The results show that fabricated nano sensor strongly catalyzes the oxidation current of warfarin. Furthermore there are linear relationship (least squares method) between oxidation current of warfarin and its concentration in plasma.

Conclusion: The sensor as a simple, low-cost and accurate procedure is able to measure warfarin in patients' plasma.

Keywords: Warfarin, Electrochemical sensor, Graphen nano particles.

Cite this article as: Hasanpour F, Taei M, Nekoeinia M, Dadras B, Divanzadeh S. Fabrication of modified electrochemical sensor using graphen nano particle for determination of warfarin in plasma samples. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(2): 32-40.

***Corresponding author:**

Chemistry Dept., Payame Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, I.R. Iran,
Tel: 00989131669634, E-mail: hasanpoura@yahoo.com