Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 23, No. 3, Autumn 2023, Pages: 292-308

Original article

A Novel Design of a Non-Enzymatic Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide Based on MWCNT/Co₃O₄/Hemoglobin Structures

Saboorifar M¹, Shamsazar A², Asadi A²*, Shourian M¹*

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

* Corresponding author. Tel: +9804531505193, Fax: +9804531514701, E-mail: asady@uma.ac.ir,

shourian@guilan.ac.ir

Article info

Article history: Received: Sep 26, 2023 Accepted: Nov 28, 2023

Keywords: Biosensor Nanocomposite Hemoglobin Hydrogen Peroxide

ABSTRACT

Background: Determining the concentration of hydrogen peroxide in liquids and biological samples is very important because of its effects on human health. This study aimed to design a new electrochemical biosensor based on hemoglobin to detect hydrogen peroxide in serum samples.

Methods: In this study, a basic science, a biosensor based on modifying the glassy carbon electrode surface with a nanocomposite consisting of cobalt oxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotube functionalized with a carboxyl group (MWCNT/Co₃O₄) and hemoglobin stabilized on this nanocomposite was made as a biological recognition element.

Results: In optimal conditions, the biosensor was used to measure different concentrations of hydrogen peroxide. The designed biosensor showed a wide linear response range from 10 μ M to 500 μ M, a detection limit of 0.512 μ M, and high reproducibility and stability.

Conclusion: In this innovative research work, MWCNTs/Co₃O₄ nanocomposite was used to make a diagnostic biosensor. The presented biosensor showed an acceptable performance in the measurement of hydrogen peroxide in serum samples and laboratory solutions.

How to cite this article: Saboorifar M, Shamsazar A, Asadi A, Shourian M. A Novel Design of a Non-Enzymatic Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide Based on MWCNT/Co3O4/Hemoglobin Structures. J Ardabil Univ Med Sci. 2023;23(3): 292-308

Extended Abstract

In this innovative research work, $MWCNTs/Co_3O_4$ nanocomposite was used to make a diagnostic biosensor. The presented biosensor showed an acceptable performance in the measurement of hydrogen peroxide in serum samples and laboratory solutions.

Background: Free radicals and reactive oxygen species (ROS) are naturally produced throughout many metabolic processes in the human body. Certain types of these products regulate physiological processes as signaling molecules. Hydrogen peroxide, as a ROS, can have detrimental impacts on human health when present in high concentrations. Accurately measuring the concentration of hydrogen peroxide in liquids and biological samples is crucial due to its impact on human well-being. Several techniques have been documented for quantifying hydrogen peroxide levels in body fluids. The electrochemical biosensor technique has garnered significant attention in recent years user-friendly nature. owing to its affordability, exceptional sensitivity, rapidity, selectivity, and the elimination of the requirement for an expert user to quantify the quantity of H2O2. The biosensor is created by modifying the surface of the glassy carbon electrode with the MWCNT/Co3O4 nanocomposite. The electrochemical reactions can be enhanced by immobilizing metal nanoparticles and metal oxide on carbon nanotubes to create a hybrid catalyst. This research adopts a combination of multiwalled carbon nanotubes and cobalt oxide nanoparticles to develop a biosensor so that the electron transport between hemoglobin and the electrode surface is facilitated.

Methods: Initially, cobalt oxide nanoparticles were fabricated using the co-precipitation technique. Subsequently, a MWCNT/ Co_3O_4 nanocomposite was synthesized using a straightforward technique. Next, the fabricated nanocomposite was immobilized onto the surface of the glassy carbon electrode. Following that, a covalent bond was formed between the amino group of hemoglobin and the carboxyl group linked to multi-walled carbon nanotubes. This resulted in the fixation of hemoglobin onto the surface of the glassy carbon electrode modified with MWCNT/Co₃O₄.

Results: The crystal structure of the MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite was identified using XRD analysis. The patterns with MWCNT and associated $C_{0_3}O_4$ nanoparticles were distinctly observed. An FTIR spectrum in the range of 400-4000 cm⁻¹ was conducted on the MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite to assess its functional groups. The peaks related to the presence of Co^{2+} and CO^{3+} in the CO-O stretching vibration in cobalt oxide nanoparticles and the peak related to the asymmetric or symmetric C-H stretching vibrations in the CH₂ and CH₃ groups in MWCNT, the peak related to the C=C stretching vibration in the main skeleton of the structure of carbon nanotubes and bonds related to the O-H stretching vibration were observed. The FTIR spectrum results were verified by the organization of MWCNTs with Co₃O₄ nanoparticles. The structural morphology of the MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite was examined using FESEM and HRTEM electron microscope. The photos showed a regular pattern of cobalt oxide nanoparticles on MWCNT. The process of modifying the examined electrode was using cyclic voltammetry in the potential range of -0.2 to +0.8 at a speed of 50 mV/s in an electrochemical cell. The cell contained a 0.1 M phosphate buffer solution with a pH=7. No discernible redox peak was seen on the unmodified glassy carbon electrode. The electrode enhanced by incorporating MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite resulted in an augmented active surface area, thus facilitated electron transfer, leading to an observed increase in the current peak. The current peak was reduced by immobilizing hemoglobin on the surface of the modified electrode using a synthetic nanocomposite. This was achieved by filling the active surface of the electrode with hemoglobin, hence decreasing electron exchange. The electrode surface demonstrated effective immobilization nanocomposite of and

hemoglobin, as confirmed by cyclic voltammetry. To optimize the conditions and reach the best response for measuring hydrogen peroxide, the effects of pH, incubation time of MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite with glassy carbon electrode, and the drying time of hemoglobin on the surface modified electrode with MWCNT/Co₃O₄ in the biosensor response were studied. For this purpose, the current response measurement for 100 µM hydrogen peroxide was evaluated in the range of different pH from 5 to 8.5. The results indicate that the biosensor achieved optimal performance at a pH=7. This pH level offers the optimal circumstances for the electron transfer process of the biosensor. In time intervals from 0.5 to 4.5 hours, the highest current response for measuring a constant amount of hydrogen peroxide by the DPV method was obtained when the MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite was incubated with the electrode surface for 2 hours. To form a successful interaction between hemoglobin and glassy carbon electrode modified with MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite, incubation time at room temperature is an important criterion for optimization. The most secure connection, which led to the most significant current response, was attained after a drying period of 180 minutes (equivalent to 3 hours) at ambient temperature. The biosensor was utilized under optimal circumstances to measure various quantities of H₂O₂ using the differential pulse voltammetry technique. A direct correlation exists between the concentration of H₂O₂ ranging from 10 µM to 500 µM and the corresponding current. The calibration curve regression equation may be expressed as y=0.2426x-1.111, with a correlation coefficient of $R^2=0.995$. The biosensor's detection limit for hydrogen peroxide was 0.512 µM. The constructed biosensor exhibits exceptional stability and excellent selectivity in detecting hydrogen peroxide. The relative standard deviation for the readings collected from five electrodes is

1.2%. Upon evaluating the stability of the measured current at the end of the fourth week, it was observed that there was a 3.2% decrease. This decrease signifies that constructing the biosensor using this method possesses satisfactory stability. The selectivity of the biosensor was assessed by sequentially injecting 100 µM concentrations of interfering substances such as ascorbic acid, dopamine, uric acid, and glucose into a 0.1 M phosphate buffer solution (pH=7) containing 100 µM per liter of hydrogen peroxide. The findings of this experiment clearly indicated that the achieved standard deviation for the current responses was 3.5%, demonstrating that the interfering compounds had no discernible impact on the current response. The comparison of the newly developed electrochemical biosensor, utilizing a glassy carbon electrode modified with MWCNT/Co₃O₄ nanocomposite, with superior previous studies reveals a performance in detecting hydrogen peroxide. This improved response can be attributed to synergistic effect of Co₃O₄ the and MWCNTs, two nanomaterials used in the modification process. Collectively, the substance can form an extensive conductive network, which, due to its exceptional chemical stability and other physical characteristics, results in an enhanced electrochemical reaction. The investigation of actual serum samples demonstrated that the biosensor developed in this study is suitable for practical applications in routine analysis of hydrogen peroxide in real-life scenarios. **Conclusions:** The research involved

measuring the quantity of hydrogen peroxide by utilizing the electrochemical characteristics of a glassy carbon electrode modified with MWCNT-Co₃O₄/Hb. The presence of hydrogen peroxide was identified through the activity of hemoglobin pseudoperoxidase and the reduction of H_2O_2 . LOD and the wide linear range of the biosensor verified the good performance of the biosensor in measuring low concentrations of H_2O_2 .

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و سوم، شماره سوم، پاییز ۱٤۰۲

مقاله اصيل

طراحی زیست حسگر جدید غیرآنزیمی بر پایه ساختار متشکل از نانولولههای کربنی چند دیواره/ نانوذرات اکسید کبالت/ هموگلوبین جہت تشخیص هیدروژن پراکسید

معصومه صبوری فر'، علی شمس آذر'، اسداله اسدی'*، مصطفی شوریان'*

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، *ر*شت، ایران ۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق ا*ر*دبیلی، ا*ر*دبیل، ایران *نویسنده مسئول. تلفن: ۰٤۵۳۱۵۰۵۱۹۳ فاکس: ۰٤۵۳۱۵۱٤۲۰۱ بیست الکترونیک: shourian@guilan.ac.ir , asady@uma.ac.ir

چکیدہ

زمینه و هدف: تعیین غلظت پراکسید هیدروژن در مایعات و نمونههای زیستی به علت تاثیرات آن بر سـلامت انسـان اهمیـت زیادی دا*ر*د. هدف از این مطالعه طراحی یک زیست حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر همو گلوبین برای تشـخیص هیـدروژن پراکسید در نمونه سرم میباشد.

روش کار: در این مطالعه که از نوع بنیادی علوم پایه است، زیست حسگر بر اساس اصلاح سطح الکترود کـربن شیشـهای بـا یـک نانو کامپوزیــت متشـکل از نــانوذرات اکسـید کبالــت و نانولولــه کربنــی چنــد دیــواره عامــل دا*ر*شــده بــا گــروه کربوکسـیل (MWCNT/Co₃O4) و همو گلوبین تثبیت شده بر روی این نانوکامپوزیت به عنوان عنصر شناسانگر زیستی ساخته شد.

یافتهها: در شرایط بهینه از زیست حسگر برای انداره گیری غلظتهای مختلف پراکسید هیدروژن استفاده شـد. زیسـت حسـگر طراحی شده محدوده پاسخ خطی وسیعی از ۱۰ میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار و حدتشخیص ۵۱۲/۰ میکرومولا*ر ر*ا نشان داد و تکراریذیری و پایدا*ر*ی بالایی داشت.

نتیجه گیری: در ایـن کـار تحقیقـی بـه صـورت نو آورانـه از نانو کامپوزیـت MWCNTs/Co₃O₄ بـرای سـاخت زیسـت حسـگر الکتروشیمیایی استفاده شد. زیست حسگر ا*ر*ائه شده در اندازه گیری مقادیر هیدروژن پراکسید در نمونههای سرم و محلولهای آزمایشگاهی عملکرد قابل قبولی نشان داد.

واژههای کلیدی: زیست حسگر، نانو کامپوزیت، همو گلوبین، هید*رو*ژن پراکسید

دریافت: ۱٤۰۲/۷/٤ یذیرش: ۱٤٠٢/٩/٧

مقدمه

گونههای فعال اکسیژن^۱ (ROS) مولکولهای درون سلولی هستند که مـیتواننـد سـنتز پـروتئین، آسـیب

DNA و آپوپتوز (مرگ برنامهریزی شده) سلولی را تنظیم کنند و همچنین در رویـدادهای فیزیولـوژیکی مثل پیامرسانی سلولی^۲ و فعالیتهای ایمنـی شـرکت

¹ Reactive Oxygen Species (ROS)

² Cell Signaling

کنند [۱،۲]. پراکسید هیدرژن یکی از گونـههـای فعـال اکسیژن است کے غلظےت بالای آن مے تواند اثرات نامطلوبی بر سلامتی انسان داشته باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که غلظت پراکسید هیدروژن با ابـتلا به بیماریهای قلبی- عروقی، سارطان و آلزایمار مرتبط است [۳،٤]. تعیین غلظت پراکسید هیـدروژن در مایعات و نمونههای زیستی به علت تاثیرات آن بـر سلامت انسان اهمیت زیادی دارد. غلظت هیـدروژن پراکسید در شرایط فیزیولوژیکی طبیعـی کـم بـوده و مقادیر نرمال آن در پلاسما تا ۵ میکرومولار است، اما تحت تاثیر برخی شـرایط پاتولوژیـک و غیـر نرمـال میتواند تا میزان ۱ میلیمولار نیز افزایش یابد [۵،۶]. عدم تعادل در سطح هیـدروژن پراکسـید نسـبت بـه آنتیاکسیدانهای خنثی کننـده آن اثـرات مضـری در بدن دارد که منجر به آسیبهایی به ماکروملکولهای حیاتی مثل اسیدهای نو کلئیک، پروتئینها و بیما*ر*یهای مرتبط با اسـترس اکسـيداتيو مـىشـود [۲]. بنـابراين انـدازهگیـری سـطح پراکسـید هیـدرژن در سـرم در د*ر*ک نقش آن به عنوان یک نشانگر زیستی^۱ بالقوه د*ر* مانیتورینگ و ردیابی سلامت و بیماری اهمیت دارد. روشهای مختلفی برای سنجش هیـدروژن پراکسـید در مایعات بـدن، ماننـد روشهـای طیـف سـنجی [٨]، کمولومینس___انس [۹]، فل___ورومتری [۱۰،۱۱]، کروماتو گرافی [۱۲] و تیتریمتری [۱۳] گـزارش شـده است. هرچند تمامی این روشها به دلیل مزایای قابل توجه آنها، از جمله نویز کم پس زمینه، حساسیت بالا روشهای معمول در آزمایشگاهها می باشند ولی از معایب این روشها گران بودن، نیازمندی به تجهیزات پرهزینه، طـرحهـای آنـالیزی پیچیـده، در دسـترس نبودن و نیاز به اپراتور آموزش دیده مـیباشـد [۱٤]. تکنیک مبتنی بر زیستحسـگرهای^۲ الکتروشـیمیایی بـه دلیل سہولت کار با آنھا، ھزینے کے، حساسیت بالا، سرعت و گزینش پذیری مناسب و عدم نیاز به کاربر

متخصص برای تعیین میـزان هیـدروژن پراکسـید در سالهای اخیر بسیار مورد توجه بوده است [۱۵،۱۶]. پروتئینهای حـاوی گـروههـای هِـم^۳ کـه د*ر* طراحـی زیست حسگرهای الکتروشیمیایی به کار مـی(ونـد، بـا داشتن مرکز الکتـرون فعـال هِـم دارای فعالیـت شـبه پراکسیدازی برای احیای هیـدروژن پراکسـید هسـتند [۱۷]. در این میان، پروتئین همو گلوبین به دلیل ساختار شناخته شده آن، در دسترس بودن تجـاری بـا هزینه کم و پایداری نسبی بـرای طراحـی ایـن نـوع از حسگرهای زیستی هیدروژن پراکسید مناسبتر است [۱۷،۱۸] . با این حال به علت درشت بودن ساختار سـه بعدی همو گلوبین و دفن شدن مرکز الکتروفعال آن در یاکت پروتئینی، مرکز ردوکس از سطح الکتـرود دور است [۱۹]. همچنین زمانی کـه همو گلـوبین روی سطح الکترود جذب می شود، اغلب دناتو (ه شده و فعالیت الکتروشیمیایی و زیست فعالی خود را از دست میدهد و یا این که جہت گیـری مناسـبی بـرای انتقـال الکترون ندارد، بنابراین ایجاد یک مسیر کوتاه برای انتقال الکترون بین سطح الکترود و مرکز ردوکس همو گلوبین ضروری است. محققان روشهای مختلفی را برای برقراری ارتباط انتقال الکترون بین پـروتئین و الکترود به کار گرفتهاند. یکی از این راههـا اسـتفاده از نانو ساختارها برای تسـہیل انتقـال الکتـرون مـیباشـد [۲۰]. در سال ۲۰۱۳ ویرایان مانی و همکاران از یک زیســتحسـگر الکتروشـیمیایی حـاوی نانو کامیوزیــت اکسید گرافن احیا شدہ، نانولولہ کربنی چنـد دیـوا*ر*ہ^² (MWCNT) و پلاتيــــن بــه همــراه ميو گلوبيــــن (rGO- MWCNT-Pt/Mb) برای تشخیص هیدروژن پراکسید استفادہ کردند که حد تشخیص این حسـگر ۶ ییکومولار بود [۲۱]. در مطالعهای دیگر در سال ۲۰۱۷ ناروال و همکاران از یک زیست حسـگر طراحـی شـده براساس همو گلوبین تثبیت شده بر روی الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا برای تشخیص هیـدروژن

¹ Biomarker

² Biosensor

³ Heme

⁴ Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs)

پراکسید استفاده کردند که نتایج مطلوبی در محدوده رنج خطی ۱ تا ۱۲۰۰ میکرومولار بدست آمد [۲۲]. در سال ۲۰۲۰ الوی و همکارانش زیست حسگر هیدروژن پراکسید را با همو گلوبین و الکترود کربن اصلاح شده با نانوذرات طلا طراحی کردند که به علت روش منحصر بهفرد و رسانایی و سطح موثر بالای نانوذرات طلا افزایش قابل توجهی در کارایی

تشخیصی هیدروژن پراکسید نشان داده شد [۲۳]. هر نانو مادهای ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی خـاص خود را دارد که طراحی و تهیه حسـگرهای زیسـتی بـر اساس یک نانومادہ تنہا *ر*ا سخت می کند. بنابراین یک نانو کامپوزیت متشکل از چندین نانو ماده میتواند اثر تجمیعــی مزایــای چنــد نانومــاده را بــا هــم داشــته و حساسیت زیست حسگر را افزایش دهـد و عملکـرد بهتری از خود نشان دهد [۲٤]. نانو ساختارهای مبتنی بر اکسید فلز به افزایش حساسیت و پایدا*ر*ی حسـگرها کمک مے کنے در میان خانوادہ اکسےدہای فلےزات واسطه، نانو ساختا $(\operatorname{Co}_3\operatorname{O}_4)^{-1}$ واسطه، نانو ساختا $(\operatorname{Co}_3\operatorname{O}_4)^{-1}$ فعالیت الكترو كاتاليستى خاصى براى تشخيص تر كيبات مختلـف از خود نشان میدهند [۲۵،۲۶]. اکسید کبالت دارای ویژگیهای خاصی مانند مساحت سطح بالا و خواص کاتالیزوری منحصر بهفرد میباشد. به همین علت به طور گسترده در کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژی پزشکی مورد استفادہ قرار می گیرد [۲۷،۲۸]. با این حال حسگرهای مبتنی بر نانوذرات اکسید کبالت اغلب رسانایی الکترونیکی ضعیف دارند و در محلولهای آبی روی یکدیگر جمع میشوند کـه سـطح ویـژه آنهـا را کاهش میدهد و عملکرد الکتروشیمیایی آنها را تا حدی ضعیف می کنـد [۲۹]. نـانومواد کـربندار ماننـد گـرافن و نانولولـههـای کربنـی در ترکیـب بـا ایـن نانوذرات اکسید فلـزی بـرای توسـعه زیسـت حسـگر مورد استفاده قرار می گیرند تا این موانـع را برطـرف کننــد و در نتیجــه مــیتواننــد انتقـال الکتـرون بـین

همو گلـوبین و سـطح الکتـرود را تسـهیل کننـد [۳۰]. نانولولـههـای کربنـی بـا خـواص فیزیکـی و سـاختاری منحصر به فرد به افـزایش حساسـیت حسـگر، تسـریع زمان پاسخدهی، پایداری بیشتر مواد اصلاح گـر سـطح الکتـرود و کـاهش پتانسـیل واکـنش ردوکـس کمـک میکنند [۳۳–۳۱].

در این کار، یک زیست حسگر الکتروشیمیایی جدیـد مبتنـی بـر هموگلـوبین بـرای تشـخیص هیـدروژن پراکسید طراحی شد که در آن به صورت نوآورانه و برای اولین بـار از نانوکامپوزیـت MWCNTs/Co₃O₄ به عنوان اصـلاح گـر سـطح الکتـرود کـربن شیشـهای^۲ (GCE) استفاده شد. نتایج بدست آمده در محـدوده تشخیص خطی ۱۰ تا ۵۰۰ میکرومـولار و حدتشـخیص بسیار پایین ۱۲۵/۰ میکرومولار در انـدازه گیـریهـای انجام شده برای نمونههای زیستی نشـان داد کـه ایـن روش طراحی شده میتواند بسیار مورد اعتماد باشد.

روش کار معرفھا

کلریــدکبالت هگــزا هیــدرات (CoCL₂.6H₂O)، هیدروژن پراکسید و هیدروکسید سدیم (NaOH) از شرکت مرک خریداری شد. نانو لولههای کربنی چنـد دیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل از شـرکت سیگما US nano خریداری شد. از بـافر فسـفات ۱/۰ مـولار بـا آلدریچ خریداری شد. از بـافر فسـفات ۱/۰ مـولار بـا pH=7 برای اندازه گیریهای الکتروشیمی استفاده شد. آب دیونیزه شده برای تمام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. همه معرفها بدون خالص سازی بیشـتر مورد استفاده قرار گرفتند.

دستگاهها

اندازه گیریهای الکتروشیمیایی بـا اسـتفاده از دسـتگاه پتانسیواستات گالوانواستات با مارک Autolab سـاخت کشور هلند انجام شد. از یک سیستم سه الکتـرودی در طول آزمایش استفاده شد. از الکترود کربن شیشـهای

¹ Cobalt Oxide (Co₃O₄)

² Glassy Carbon Electrode (GCE)

اصلاح شده به عنوان الکترود کار، الکترود نقره - نقره کلراید (Ag/AgCl) به عنوان الکترود مرجع و الکترود پلاتین به عنوان الکترود شمارش گر استفاده شد. تمام آزمایشات الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شد. ویژگیهای نانودرات، نانولولههای کربنی و نانوکامپوزیت تهیه شده بررسی شد. آنالیز پراش پرتو ایکس¹ (XRD) با دستگاه مدل Tomy راش فوریه مادون قرماز (XRD) با دستگاه کمپانی فوریه مادون قرماز (FTIR) با دستگاه کمپانی فوریه مادون قرماز (FTIR) با دستگاه کمپانی کربنی و نانوکامپوزیت با تحلیل تصاویر به دست گرفت. بررسی مورفولوژیکی نانوذرات، نانولولههای کربنی و نانوکامپوزیت با تحلیل تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی FESEM با دستگاه مدل TESCAN MIRA3 و TESCAN با دستگاه

سنتز نانوذرات Co₃O₄

نانوذرات $\operatorname{Co}_3\operatorname{O}_4$ به روش همرسوبی سنتز شدند. ۲ گرم نمک کلرید کبالت هگزاهیدرات در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت به کمک همزن مغناطیسی در آب مقطر حل شد. در حین همزدن محلول ۳ NaOH مولار به صورت قطره قطره به ظرف اضافه شـد تـا موجب تشکیل *ر*سـوب گـردد. محلـول بـه مـدت ۲٤ ساعت روی همزن مغناطیسی باقی ماند تا تشکیل رسوب نانوذرات تکمیل گردد. همزدن باعث شـد کـه نانوذرات به صورت همشکل و یکنواخت تشکیل شوند. Co_3O_4 پس از تشکیل رسوب مخلوط حاوی نانوذرہ دارای یک سـری ناخالصـی بـود. بـرای جداسـازی نانوذرات بدون ناخالصیها، مخلوط چندین بار بـا دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و با آب مقطـر شسـت و شـو داده شد تا نانوذرات Co_3O_4 در ته ظرف جمع آوری و ناخالصییها جدا شوند. نانوذرات Co₃O₄ بدست آمده به مدت ۲٤ ساعت د*ر* آون با دمای 60 °C نگهدا*ر*ی شد.

تهیه نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ سنتز نانو کامیوزیت MWCNT/Co₃O₄ با یک روش بسیار ساده و به دور از هر گونه پیچیدگی انجام شـد. در این روش ۵۰۰ میلی گرم MWCNTs با ۲۰۰ میلی گرم Co₃O₄ با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر آب مقطـر روی اسـتیرر بـا دور بـالا در دمـای ٤٠ درجـه سانتی گراد ترکیب شد تا نانوذرات Co_3O_4 به خوبی جذب MWCNTs شوند. مقادیر نانو ذرات O_3O_4 به طوری انتخاب گردید که بعد از تشکیل نانو کامیوزیت همچنان گروههای عاملی کربوکسیل کافی ب*ـر ر*وی MWCNTs برای واکنش با گروههای آمین همو گلـوبین در سـطح الکتـرود بـا جهـت گیـریهـای مناسب در دسترس باشند. بعد از ۲٤ ساعت نانو کامپوزیت به کمک پمپ خلا جدا شـد و بـه مـدت ۱۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجـه سـانتی گـراد قـرار گرفت تا خشک شود.

اصلاح الكترود با استفاده از نانو كامپوزيت

پس از تهیه نانو کامپوزیت ٤٠٠ میلی گرم از آن در 4 میلی لیتر آب مقطر و 4 میلی لیتر اتانول با نسبت ۱:۱ مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اولتر اسونیک دیسپرس گردید. در ادامه پس از صیقل دادن سطح الکترود کربن شیشه ای با پودر آلومینا و یک دستمال تمیز، با سمپلر محلول نانو کامپوزیت قطره قطره روی سطح الکترود ریخته شد تا جایی که سطح الکترود کاملا پوشانیده گردد. برای خشک سطح الکترود کربن شیشه ای اصلاح شده با نانو کامپوزیت به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا آب و الکل خشک شده و تماس قوی بین سطح الکترود و نانو کامپوزیت با جذب سطحی و پیوند واندروالسی بین الکترود و نانولوله های کربنی ایجاد شود.

تثبیت هموگلوبین بـرروی الکتـرود کـربن شیشـهای اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/C0₃O₄

۱۰ میکرولیتـر محلـول ۶ میلـیگـرم بـر میلـیلیتـر هموگلوبین روی سطح الکتـرود اصـلاح شـده بـا نـانو

دوره بیست و سوم، شماره سوم، پاییز ۱٤۰۲

¹ X-Ray Diffraction (XRD)

² Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)

کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ ریخته شد و به مـدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. با توجه به اینکه نانولوله کربنی چند دیـواره دارای گـروه کربوکسیل فعال شده در ساختار نانوکامپوزیت به کار برده شـده بود، اتصال کوالانسی بین گروه آمینی هموگلـوبین با گروه کربوکسیل متصل به نانولولههای کربنی چنـد دیواره برقرار شـد. تثبیـت محکـمتـر هموگلـوبین در سطح الکترود با به دام افتادن فیزیکی این پـروتئین در شبکه چند لایـه نانوکامپوزیـت در سـطح الکتـرود نیـز اتفاق افتاد.

يافتهها

آنالیز XRD و FTIR نمونه نانوکامپوزیت

ساختار کریستالی نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ ماختار کریستالی نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ توسط آنالیز که در



شكل ۱. الگوی XRD از MWCNT و نانوكامپوزیت (NC) MWCNT/Co₃O₄ (NC)

طیف FTIR از نانو کامپوزیت $MWCNT/Co_3O_4$ در محـدوده cm^{-1} 000 و cm^{-1} 4000 بـرای ارزیابی گروههای عاملی نانو کامپوزیت ساخته شده در شکل ۲ نشان داده شده است. دو پیک متمایز تیز در cm^{-1} نشان داده شده است. دو پیک متمایز تیز در cm^{-1} cm^{-2} cm^{-2} و cm^{-1} مشاهده میشود که بیانگر حضور cm^{-2} و cm^{-1} که در cm^{-2} است. که در Co^{2+} آن cm^{-2} با مختصات چهاروجهی و cm^{-1} با مختصات

هشت وجهی مرتبط است [۲۵،۳۵]. باندهیای هشت وجهی مرتبط است [۲۵،۳۵]. باندهیات ۲۹۲۱ cm⁻¹ ۲۹۲۱ cm⁻¹ کششی نامتقارن یا متقارن C-H در گروه CH_2 و MWCNT نامی ۱۹۳۵ می نامی داده میشود. پیک در ۱۶٤۱ cm⁻¹ در کربنی نسبت داد. اسکلت اصلی ساختار نانولوله های کربنی نسبت داد. باند C-T نسبت داده

میشود. نتایج طیف FTIR آرایش MWCNTs با نانوذرات Co₃O4را تایید کرد.

مورفولوژی ساختار نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ توسط مورفولوژی نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ توسط میکروسکوپ FESEM مورد بررسی قرار گرفت. در شکل 3a وجود نانوذرات Co₃O₄ رایش یافته بر روی سـطح MWCNT قابل مشـاهده است. تصـویر میکروسکوپ الکترونی با وضـوح بالا (HRTEM) از نانولولـه کربنـی چنـد دیـواره در شـکل 3b و نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ در شکل 3c نشان داده شده است. با توجه به شکل نانوذرات 3c₃O₄ به طور یکنواخت روی MWCNT پراکنده شـدهانـد کـه منجر به انتقال صحیح الکترون میشود.



شکل ۲. طیف سنجی FTIR از نانوذرات Co₃O4 و نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O4(طیف آبی: مربوط به نانوکامپوزیت و طیف قرمز: مربوط به اکسید کبالت)



HRTEM شكل ۳. (a) تصوير FESEM از نانوكامپوزيت MWCNT/C0₃O₄ تصوير (b) مسوير (c) تصوير (c) ت

رفتار الکتروشیمیایی مرحله به مرحله اصلاح الکترود مراحل اصلاح الکترود با روش ولتامتری چرخهای (CV) مورد بررسی قرار گرفت. سلول الکتروشیمیایی حاوی بافر فسفات 1/1 مولار با pH=7 بود. در این مرحله اندازه گیریهای CV با سرعت اسکن ۵۰ میلیولت بر ثانیه و در محدوده پتانسیل 1/1 - تامشاهده می شود هنگامی که الکترود کربن شیشهایبرهنه در محلول غوط ور شد هیچ پیک ردوکسآشکاری برای آن مشاهده نشد.

با اصلاح الکترود با نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ پیک جریان به طور قابل توجبی افزایش یافت که به علت افزایش سطح الکتروفعال و تسہیل انتقال الکترون بود. با تثبیت همو گلوبین بر روی سطح الکترود اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ کاهش پیک جریان در ولتامو گرام مشاهده شد که به علت اشعال سطح فعال الکترود توسط همو گلوبین و کاهش تبادل الکترون بین الکترود و الکترولیت میباشد.



شکل ٤ ولتاموگرام چرخهای به ترتیب برای: (a) الکترود کربن شیشهای اصلاح نشده، (b) الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت MWCNT/C0₃O₄ (c) الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با GCE/MWCNT-C0₃O₄/Hb در بافر فسفات (/-مولار

بهینه سازی شرایط آزمایش

برای دستیابی به اندازه گیریها و تجزیه و تحلیل دقیق مقادیر هیدروژن پراکسید فاکتورهای مهم از جمله pH بافر فسفات، زمان انکوباسیون نانو کامپوزیت سلما یا الکترود کربن شیشهای و مـدت MWCNT/Co₃O₄ زمان خشک شدن همو گلوبین روی سطح الکترود اصلاح شده در دمای اتاق که روی عملکرد زیست حسگر تاثیر مستقیم می گذا*ر*ند، بهینه سا*ز*ی شدند. اثر pH برای بهینه سازی پاسخ الکترو کاتالیستی الکترود اص_لاح شـدہ نسـبت بـه اکسیداسـیون $\mathrm{H}_2\mathrm{O}_2$ مـو $ar{u}$ د بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از انـدازهگیـریهـای انجام شده با روش ولتـامتری پـالس تفاضـلی (DPV) برای مقدا*ر* ۱۰۰ میکرومولا*ر* H₂O₂ با حسگر تہیہ شدہ در مقادیر مختلف pH بافر فسفات از δ تا λ/δ در شکل ۵۵ نشان داده شده است. بالاترین پیک جریان در pH=7 مشاهده گردیـد. بـه ایـن ترتیـب در ادامـه بررسیهای الکتروشیمیایی از بافر فسفات ۱/۰ مولار با pH=7 استفاده شد.

برای تثبیت مطمئن نانو کامپوزیت ساخته شده بر روی الکترود کربن شیشهای، مدت زمان انکوباسیون آن با سطح الکترود پا*ز*امتر بسیا*ز* مہمی است که بر عملکرد زیست حسگر نیز تاثیر می گذارد. این مدت زمان بررسی و بهینه سازی شد. بـرای ایـن کـار پاسـخهـای جریان بدست آمده برای انـدازه گیـری مقـدار ثـابتی هیدروژن پراکسید در مدت زمـان لازم بـرای تثبیـت نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ بر روی الکترود کربن شیشهای در فواصل زمانی ۵/۰ تا ٤/۵ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل 5b مدت زمان دو ساعت به عنوان زمان بهینه بدست آمد. در ادامه به منظور بهینهسازی مدت زمان برهمکنش همو گلوبین با الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/Co $_{3}O_{4}$ پاسخ جریان در زمانهای ۱ تا ۵ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین پاسخ جریان در سـه سـاعت انکوباسـیون در دمای اتاق بدست آمد (شکل ۲۵).



شکل ۵. (a) بهینهسازی اثر pH بافر فسفات برروی پاسخ جریان زیست حسگر برای اندازه گیری ۱۰۰ میکرومول هیدروژن پراکسید، (b) بهینهسازی زمان انکوبه شدن نانوکامپوزیت با الکترود کربن شیشهای و (c) تاثیر زمان انکوباسیون هموگلوبین با الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت

H_2O_2 تشخيص

در شرایط بهینه از زیست حسگر برای اندازه گیری غلظتهای مختلف H₂O₂ با روش ولتامتری پالس تفاضلی استفاده شد. با توجه به شکل 6a رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت H₂O₂ و افزایش جریان الکتریکی وجود دارد. طبق منحنی کالیبراسیون در شکل 6b یک رابطه خطبی بین غلظت H₂O₂

میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار و جریان وجود دارد. معادله رگریسون برای منحنی کالیبراسیون برابر با R²=0.995 و ضریب همبستگی y=0.2426x-1.111 بود. حد تشخیص زیست حسگر برای هیدروژن پراکسید ۰/۵۱۲ میکرومولار بدست آمد.



شکل ۶. (a) سیگنالهای جریان DPV زیست حسگر به غلظتهای مختلف هیدروزن پراکسید از a تا i به ترتیب: ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۲۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار. (b) منحنی کالیبراسیون زیست حسگر در غلظتهای مختلف هیدروژن پراکسید.

تکرارپذیری، پایداری و گزینش پذیری زیست حسگر برای ارزیابی تکراریذیری زیست حسگر استفاده شـده در این کار پنج الکترود با شرایط مشابه تہیے شـده و مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام اندازه گیریها محلول H_2O_2 با غلظت ۱۰۰ میکرومولار آماده شد. انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای نتایج بدست آمده از اندازه گیریها توسط پنج الکترود ۱/۲ درصـد است که نشان مـیدهـد حسگرزیسـتی طراحـی شـده دارای قابلیت تکرار پذیری مناسبی است (شکل 7a). برای بر رسی پایداری الکترود اصلاح شده و چگونگی یاسخ زیست حسگر با گذشت زمان، عملکرد زیست حسگر در محدودههای زمانی مختلف برای تشخیص ۱۰۰ میکرومولار هیـدروژن پراکسـید مـورد بررسـی قرار گرفت. بدین ترتیب الکترود به مدت یک مـاه در دمای ٤ د*ر*جه سانتی گراد نگهدا*ر*ی شد. پیک جریان در ابتدای هفته اول، ابتدای هفته دوم، ابتدای هفته سوم، ابتدای هفته چهارم و در آخر در انتہای هفته چہارم برای اندازه گیری هیـدروژن پراکسـید اسـتفاده شـد.

جریان اندازه گیری شـده در انتهـای هفتـه چهـارم بـه میـزان ۲/۲ درصـد کـاهش یافـت کـه نشـان دهنـده پایدا*ر*ی مناسب زیست حسگر تهیه شده به ایـن روش است (شکل 7b).

برای ارزیابی گزینش پذیری حسگر نسبت به هیدروژن پراکسید از گونه های احتمالی تداخل گر موجود در نمونه واقعی سرم استفاده شد. محلول های جداگانه به ترتیب شامل ۱۰۰ میکرومولار دوپامین، اسید اسیکوروبیک، گلو کز و اسیداوریک بعالاوه ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید و همچنین نمونه ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید و همچنین نمونه ۲۰۵ میکرومولار هیدروژن پراکسید مید تنهایی توسط زیست حسگر اندازه گیری شدند (شکل ۲۵). RSD پاسخها برای همه نمونه ها ۲۵ درصد بدست آمد که نشان دهنده انتخاب پذیری قابل قبول زیست حسگر نشان دهنده دارای گزینش پذیری بالایی نسبت به طراحی شده دارای گزینش پذیری بالایی نسبت به



شکل ۲. (a) بررسی تکرارپذیری، (b) اندازه گیری پایداری و (c) بررسی عوامل تداخلی تاثیر گذار بر زیستحسگر

ىحث

تجزيه و تحليل عملكرد زيستحسگر

ایـن زیسـت حسـگر بـا اصـلاح سـطح الکتـرود کـربن شیشهای با نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ طراحی شده است. نانو کامپوزیت تثبیت شده منجر به افزایش نسبت سطح بـه حجـم و تسـهیل انتقـال الکتـرون بـین الکتـرود و مرکـز ردوکـس هموگلـوبین مـیگـردد. استفاده از نانولولـههـای کربنـی در زیسـت حسـگرها دارای یک هدف دوگانه است که هم به عنوان پشتیبان و بستری مناسب برای تثبیت مولکولهای زیستی عمل میکنند و هـم هـدایت الکتریکی لازم را بـرای انتقـال سیگنالهای الکتروشیمیایی فراهم میکنند. نسبت سطح میدهد که به تقویـت سـیگنال کمـک مـیکنـد [۲۶]. هموگلوبین با تبدیل (II) جه (III) با عـث کاهیـده شدن هیـدروژن پراکسـید مـیگـردد. پاسـخ زیسـت

حسگر بر اساس فراینـد اکسـایش-کـاهش زیـر اسـت [۳۷]:

 $[Hb Fe(III)]+e^{-} \leftrightarrow [Hb Fe(II)]$ $2[Hb Fe(II)] + H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2[Hb Fe(III)] +$ $2H_2O$ مقایسه نتایج بدست آمده از اندازه گیری هیدروژن پراکسید توسط زیست حسگر تہیہ شـدہ در ایـن کـار تحقیقی با نتایج زیست حسگرهای مشابهای که کار شده بود در جدول ۱ گزارش شده است. همانطور که از این مقایسه قابل استخراج است زیست حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر الکترود کربن شیشـهای اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ برای تشخیص هیدروژن پراکسید پاسخ بہتری از خود نشان داد که میتواند بـه ترکیـب Co₃O₄ و MWCNTهـا نسبت داده شود که ایـن دو نـانو مـاده در کنـار هـم میتوانند شبکهی رسانای بزرگی را ارائه دهند کـه بـا پایدا*ر*ی بالای شیمیایی خود و سایر ویژ گیهای فیزیکی خود افزایش پاسخ الکتروشیمیایی *ر*ا منجر میشود.

			· · ·
الكترود	محدودہ خطی (µM)	حدتشخيص (µM)	منبع
Hb/AgNF/ITO	200 - 3400	0.12	[٣٢]
Co ₃ O ₄ -rGO	15-675	2.4	[٣٨]
SiO ₂ /Hb-AuNPs/ACNTs	40 - 4000	22	[٣٩]
N-rGO	100 - 10000	26	[٤٠]
NF-Hb-Cys-AuNPs-SPCE	10 - 450	0.6	[44]
Cyt c/TPP-HA[TFSI]/MWCNT/GCE	20 - 892	6.2	[[13]
CoO-CoS/NF	2-954	0.89	[23]
Hb/NIBA-IL/MWCNT/GCE	10 - 6300	3.2	[٤٣]
GC/Hb/SnO ₂ /CHIT	5 - 1500	1	[33]
MWCNT-Co ₃ O ₄ /Hb	10 - 500	0.512	مطالعه حاضر

جدول ۱. عملکرد الکترود اصلاح شده با MWCNT-Co₃O4/Hb برای تشخیص هیدروژن پراکسید در مقایسه با حسگرهای قبلی

آناليز نمونه واقعى سرم

قابلیت کاربرد عملی زیست حسگر تہیہ شدہ با استفادہ از روش افزودن استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نمونہ ہای واقعی سرم از آزمایشگاہ دکتر حدیثی در اردبیل با غلظت ہای مختلف بدون هیچگونہ دستکاری تہیہ شدہ بود و آزمایش ها بر اساس غلظت های نمونہ واقعی در دسترس طراحی

شد. نتایج برای افزایش استاندارد به مقدار اولیه ۵۰ میکرومولار نمونهی اولیه هیدروژن پراکسید مطابق جدول ۲ بدست آمد و انحراف استاندارد نسبی (RSD) بین ۱/۰۲ درصد تا ۱/۳۲درصد و مقادیر بازیابی^۱ برای تعیین نمونه در محدوده ٪۱۰۰ تا ۱۰۲٪

¹ Recovery

بود. از این رو، این نتایج نشان داد که زیست حسگر ساخته شده در این تحقیق میتواند عملاً برای تجزیه و تحلیل معمول هیدروژن پراکسید در کاربردهای واقعی مورد استفاده قرار گیرد. برای بررسی دقت اندازه گیری روش حاضر، مقایسه اندازه گیری مقادیر

هیدروژن پراکسید توسط زیست حسگر ارائه شده با روش آزمایشگاهی طیف سنجی نوری انجـام شـد کـه اختلاف نتـایج بدســـت آمـده بســـیار نزدیـک بـود (جدول ۳).

رنمونههای واقعی سرم	شخیص H ₂ O ₂ د	جدول ۲. ت
---------------------	--------------------------------------	-----------

نمونه	مقدار اضافه شده	غلظت اندازه گیری شده	میانگین	RSD%	Recovery%
(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(n=5)	(n=5)
	25	74.2, 76.58, 76.83, 75.19, 75.16	75.59	1.29	102.3
50	50	101, 101.8, 99.3, 100.74, 99.13	100.39	1.02	100.78
	100	154.68, 150.52, 150.02, 150.07, 148.84	150.82	1.32	100.8

نمونه	اندازه گیری با <i>ر</i> وش زیست حسگر ا <i>ر</i> ائه شده	اندازه گیری با روش طیف سنجی
	(μM)	(µM)
1	30.92	30.69
2	43.81	43.14
3	38.1	37.96

نتيجهگيرى

در این کار تحقیقی سنجش میزان هیدروژن پراکسـید براساس خاصيت الكتروشيميايي الكترود كربن شيشهاي اصلاح شده با MWCNT-Co₃O₄/Hb انجام شد. از نانولوله کربنی عامـلدار شـده بـا گـروه کربوکسـیل برای تثبیت همو گلوبین بر سطح الکترود اصلاح شده با نانو كاميوزيت MWCNT/Co₃O₄ استفاده شد. اتصال کوالانسے بین گروہ آمینی ہمو گلوبین با گروہ کربو کسیل متصل به نانولولههای کربنی چند دیـواره برقرار شد. تشخیص هیـدروژن پراکسـید بـا فعالیـت شبه پراکسیدازی همو گلوبین و کاهش H₂O₂ صورت گرفت. همو گلوبین اکسایش یافته از نظر شیمیایی می تواند دوباره احیا بشود. در شرایط بهینه از زیست حسگر برای اندازه گیری غلظت های مختلف H₂O₂ استفاده شد. زیست حسگر طراحی شده محدوده پاسخ خطی از ۱۰ تـا ۵۰۰ میکرومـولار و حدتشـخیص ۵۱۲/۰ میکرومولار را برای هیدروژن پراکسید نشان داد. زیست حسـگر جدیـد معرفـی شـده در ایـن کـار

تکرارپذیری و پایداری بالایی داشت و با توجه به اینکه بــــه صـــورت نو آورانـــه از نانو کامپوزیـــت MWCNTs/Co₃O₄ به عنوان اصلاح گر سطح الکترود استفاده شده بود عملکرد مناسبی را برای اندازه گیری هیـدروژن پراکسـید در نمونـههـای سـرم واقعـی و محلول آزمایشگاهی نشان داد. پیشـنهاد مـیشـود در کارهای آتی ممکن است تشـخیص مقـادیر هیـدروژن پراکسید از طریق طراحی یک فنـاوری زیسـت حسـگر جایگزین بدست آید. این رویکرد مسـتلزم اسـتفاده از مواد و کامپوزیتهای متنوع است.

تشكر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایاننامهی مقطع کارشناسی ارشـد رشته بیوشیمی است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خـود را از دانشـگاه گـیلان و دانشـگاه محقـق اردبیلـی بهدلیل حمایت مالی و فـراهم آوردن تجهیـزات اعـلام میدارند.

References -

1- Bai Z, Li G, Liang J, Su J, Zhang Y, Chen H, et al. Non-enzymatic electrochemical biosensor based on Pt NPs/RGO-CS-Fc nano-hybrids for the detection of hydrogen peroxide in living cells. J Biosens Bioelectron. 2016; 82:185-194.

2- Deng Z, Tao J, Zhang W, Mu H, Wu H, Wang Y, et al. Effect of protein adsorption on electrospun hemoglobin/gelatin-MWCNTs microbelts modified electrode: Toward electrochemical measurement of hydrogen peroxide. Mater Chem Physics. 2021; 257:123827.

3- Bhunia S, Dolai S, Sun H, Jelinek R. "On/off/on" hydrogen-peroxide sensor with hemoglobin-functionalized carbon dots. Sens Actuators B Chem . 2018; 270:223-230.

4- Ma B, Kong Ch, Hu X, , Liu K ,Huang Q,Lv J, et al. A sensitive electrochemical nonenzymatic biosensor for the detection of H2O2 released from living cells based on ultrathin concave Ag nanosheets. J Biosens Bioelectron. 2018; 106: 29-36.

5- Baghayeri M, Veisi H. Fabrication of a facile electrochemical biosensor for hydrogen peroxide using efficient catalysis of hemoglobin on the porous Pd@ Fe3O4-MWCNT nanocomposite. J Biosens Bioelectron. 2015; 74:190-198.

6- Gaikwad R, Thangaraj P, Sen A. Direct and rapid measurement of hydrogen peroxide in human blood using a microfluidic device. Sci Rep . 2021; 11(1): 2960.

7- Ye Y, Ji J, Pi F, Yang H, Liu J, zhang Y, et al. A novel electrochemical biosensor for antioxidant evaluation of phloretin based on cell-alginate/L-cysteine/gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode. J Biosens Bioelectron. 2018; 119: 119-125.

8-Saleh Ahammad A. Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. J Biosens Bioelectron S. 2013:9(2).

9- Tahirović A, Copra A, Omanovic-miklicanin E, Kalcher K . A chemiluminescence sensor for the determination of hydrogen peroxide. Talanta. 2007; 72(4): 1378-1385.

10- Su L, Cai Y, Wang L, Dong W, Mao G, Li Y, et al. Hemin@ carbon dot hybrid nanozymes with peroxidase mimicking properties for dual (colorimetric and fluorometric) sensing of hydrogen peroxide, glucose and xanthine. Mikrochim Acta. 2020; 187: 1-11.

11- Mazhabi RM, Ge L, Jiang H, Wang X. A facile photoelectrochemical sensor for high sensitive ROS and AA detection based on graphitic carbon nitride nanosheets. J Biosens Bioelectro. 2018; 107: 54-61.

12- Tantawi O, Baalbaki A, Asmar R.E, Ghauch A . A rapid and economical method for the quantification of hydrogen peroxide (H2O2) using a modified HPLC apparatus. Sci Total Environ. 2019; 654: 107-117.

13- McCurdy Jr W, Bell H. Titrimetric determination of hydrogen peroxide in alkaline solution. Talanta. 1966; 13(7): 925-928.

14- Shamsazar A, Soheili-Moghaddam M, Asadi A. A novel electrochemical immunosensor based on MWCNT/CuO nanocomposite for effectively detection of carcinoembryonic antigen (CEA). Microchem J. 2023; 196: 109643.

15- Li C, Wu R, Zou J, Zhang T, Zhang S, Zhang Z, et al. MNPs@ anionic MOFs/ERGO with the size selectivity for the electrochemical determination of H2O2 released from living cells. J Biosens Bioelectron. 2018; 116: 81-88.

16- Liu M, Liu R, Chen W. Graphene wrapped Cu2O nanocubes: non-enzymatic electrochemical sensors for the detection of glucose and hydrogen peroxide with enhanced stability. J Biosens Bioelectron. 2013; 45: 206-212.

17- Altinkaynak C, Turk M, Ekremoglu M, Özdemir N. Peroxidase-like activity of hemoglobin-based hybrid materials against different substrates and their enhanced application for H2O2 detection. Bull Chem Soc Ethiop. 2021; 35(3):537-55.

18- Elancheziyan M, Senthilkumar S. Covalent immobilization and enhanced electrical wiring of hemoglobin using gold nanoparticles encapsulated PAMAM dendrimer for electrochemical sensing of hydrogen peroxide. Appl Surf Sci. 2019; 495: 143540.

19- Xie H, Luo G, Niu Y, Weng W, zhao Y, Ling Z, et al. Synthesis and utilization of Co3O4 doped carbon nanofiber for fabrication of hemoglobin-based electrochemical sensor. Mater Sci Eng C. 2020; 107: 110209.

20- Zhang M, Zhang J, Wang J, Xu J, Hayat T, Alharbi NS. Direct electrochemistry of cytochrome c immobilized on one dimensional Au nanoparticles functionalized magnetic N-doped carbon nanotubes and its application for the detection of H2O2. Sens Actuators B Chem. 2019; 282: 85-95.

21- Mani V, Dinesh B, Chen Sh.M, Saraswathi R. Direct electrochemistry of myoglobin at reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes-platinum nanoparticles nanocomposite and biosensing towards hydrogen peroxide and nitrite. J Biosens Bioelectron. 2014; 53: 420-427.

22-Narwal V, Yadav N, Thakur M, Pundir Ch.S. An amperometric H2O2 biosensor based on hemoglobin nanoparticles immobilized on to a gold electrode. Biosci Rep. 2017; 37(4): BSR20170194.

23- Elewi AS, Al-Shammaree SAW, Sammarraie AKMA. Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin-modified gold nanoparticles–screen printed carbon electrode. Sens Bio-Sens Res. 2020; 28: 100340.

24- Si Y, Park JW, Jung S, HwanG G-S, Goh E, Lee HJ. Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/graphene complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions. J Biosens Bioelectron. 2018; 121: 265-271.

25- Hajializadeh A. Electrochemical sensor based on MWCNTs/Co3O4/SPGE for simultaneous detection of Sudan I and Bisphenol A. J Electrochem Sci Eng. 2022; 12(1): 185-197.

26- Chattopadhyay S, Chakraborty SP, Laha D, Baral R, Roy S. Surface-modified cobalt oxide nanoparticles: new opportunities for anti-cancer drug development. Cancer nanotechnol. 2012; 3(1): 13-23.

27- Sabir FK, Bekele ET, Gonfa BA, Edossa GD, Adino AT. Synthesis of cobalt oxide nanoparticles through chemical and biological pathways for antibacterial activity. J Nanostructures. 2021; 11(3): 577-587.

28- Papis E, Rossi F, Raspanti M, Donne ID, Colombo G, Milzani A, et al. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. Toxicol lett. 2009; 189(3): 253-259.

29- Dai H, Chen Y, Niu X, Pan C, Chen H, Chen X. High-performance electrochemical biosensor for nonenzymatic H2O2 sensing based on Au@ C-Co3O4 heterostructures. J Biosens Bioelectron. 2018; 118: 36-43.

30- Sheikholeslam M, Nanda P, Sanati A, Pritzker M, Chen P. Direct electrochemistry of hemoglobin/peptide-carbon nanotube modified electrode for hydrogen peroxide biosensing. Mater Lett. 2023; 335: 133799.

31- Alim S, Vejayan J, Yusoff MM, Kafi AKM. Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review. Biosens Bioelectron. 2018; 121: 125-136.

32- Jiang H, Lee EC. Highly selective, reusable electrochemical impedimetric DNA sensors based on carbon nanotube/polymer composite electrode without surface modification. Biosens Bioelectron. 2018; 118: 16-22.

33- Shamsazar A, Asadi A, Seifzadeh D, Mahdavi M. A novel and highly sensitive sandwich-type immunosensor for prostate-specific antigen detection based on MWCNTs-Fe₃O₄ nanocomposite. Sens Actuators B Chem. 2021; 346: 130459.

34- Lakshmi A, Gracelin DL, Vigneshwari M, Karpagavinayagam P, Veeraputhiran V, Vedhi C.

Microwave Synthesis and Characterization of Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNT) and Metal Oxide Doped MWCNT. J Nanosci Nanotechnol. 2015; 1(1):19-22.

35- Mkhondo N, Magadzu T. Surface properties of metal oxides and their role on electrochemical hydrogen storage of carbon nanotubes. Dig J Nanomater Bios. 2018; 13(4) 921-929.

36- Gergeroglu H,Yildirim S, Ebeoglugil MF. Nano-carbons in biosensor applications: an overview of carbon nanotubes (CNTs) and fullerenes (C 60). SN Appl Sci. 2020; 2:1-22.

37- Yagati AK, Ngoc Le HT, Cho S. Bioelectrocatalysis of hemoglobin on electrodeposited Ag nanoflowers toward H2O2 detection. Nanomaterials. 2020; 10(9):1628.

38- Kong L, Ren Zh, Zheng N, Du Sh, Wu J, Tang J, et al. Interconnected 1D Co 3 O 4 nanowires on reduced graphene oxide for enzymeless H 2 O 2 detection. Nano Res. 2015; 8:469-480.

39- Yang J, Xu Y, He P, Fang Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on aligned carbon nanotubes based electrodes modified with Au nanoparticles and SiO2 gel. Electroanalysis. 2013; 25(10):2345-2353.

40- Gaidukevic J, Aukstakojyte R, Kozlowski M, Barkauskas J, Pauliukaite R. A simple preparation of N-doped reduced graphene oxide as an electrode material for the detection of hydrogen peroxide and glucose. Electrochim Acta. 2023; 446:142113.

41- Murphy M, Theyagarajan K, Prabusankar G, Senthilkumar S, Thenmozhi K. Electrochemical biosensor for the detection of hydrogen peroxide using cytochrome c covalently immobilized on carboxyl functionalized ionic liquid/multiwalled carbon nanotube hybrid. Appl Surf Sci . 2019; 492:718-725.

42- Mai L, Bui Q, Bach L, Nhac-Vu H. A novel nanohybrid of cobalt oxide-sulfide nanosheets deposited three-dimensional foam as efficient sensor for hydrogen peroxide detection. J Electroanal Chem. 2020; 857: 113757.

43- Murphy M, Theyagarajan K, Thenmozhi K, Senthilkumar S. Direct electrochemistry of covalently immobilized hemoglobin on a naphthylimidazolium butyric acid ionic liquid/MWCNT matrix. Colloids Surf B. 2021; 199: 111540.

44- Kafi A, Alim S, Jose R, Yusoff M. Hemoglobin Immobilization on Multiporous Nanofibers of SnO2 and Chitosan Composite for Hydrogen Peroxide Sensing. J Nanosci Nanotechnol. 2019; 19(4): 2027-2033.