

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 A^{2*}, Shourian M^{1*}

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 μM to 500 μM, a detection limit of 0.512 μM, 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/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.

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 owing to its user-friendly nature, 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 multi-walled 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/Co₃O₄ 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 associated with MWCNT and Co₃O₄ 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 Co²⁺ and Co³⁺ 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 electrode was examined 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 of nanocomposite 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 electrode surface modified 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 previous studies reveals a superior performance in detecting hydrogen peroxide. This improved response can be attributed to the synergistic effect of Co₃O₄ 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 pseudo-peroxidase and the reduction of H₂O₂. LOD and the wide linear range of the biosensor verified the good performance of the biosensor in measuring low concentrations of H₂O₂.

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

معصومه صبوری فر^۱، علی شمس آذر^۲، اسداله اسدی^{۲*}، مصطفی شوریان^{۱*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۹۳ فاکس: ۰۴۵۳۱۵۱۴۷۰۱ پست الکترونیک: asady@uma.ac.ir ، shourian@guilan.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تعیین غلظت پراکسید هیدروژن در مایعات و نمونه‌های زیستی به علت تأثیرات آن بر سلامت انسان اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه طراحی یک زیست حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر هموگلوبین برای تشخیص هیدروژن پراکسید در نمونه سرم می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه که از نوع بنیادی علوم پایه است، زیست حسگر بر اساس اصلاح سطح الکتروکود کربن شیشه‌ای با یک نانو کامپوزیت متشکل از نانوذرات اکسید کبالت و نانولوله کربنی چند دیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل (MWCNT/Co₃O₄) و هموگلوبین تثبیت شده بر روی این نانو کامپوزیت به عنوان عنصر شناسانگر زیستی ساخته شد.

یافته‌ها: در شرایط بهینه از زیست حسگر برای اندازه‌گیری غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن استفاده شد. زیست حسگر طراحی شده محدوده پاسخ خطی وسیعی از ۱۰ میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار و حد تشخیص ۰/۵۱۲ میکرومولار را نشان داد و تکرارپذیری و پایداری بالایی داشت.

نتیجه‌گیری: در این کار تحقیقی به صورت نوآورانه از نانو کامپوزیت MWCNTs/Co₃O₄ برای ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی استفاده شد. زیست حسگر ارائه شده در اندازه‌گیری مقادیر هیدروژن پراکسید در نمونه‌های سرم و محلول‌های آزمایشگاهی عملکرد قابل قبولی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: زیست حسگر، نانو کامپوزیت، هموگلوبین، هیدروژن پراکسید

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۷

مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS) مولکول‌های درون سلولی هستند که می‌توانند سنتز پروتئین، آسیب

DNA و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده) سلولی را تنظیم کنند و همچنین در رویدادهای فیزیولوژیکی مثل پیام‌رسانی سلولی^۲ و فعالیت‌های ایمنی شرکت

¹ Reactive Oxygen Species (ROS)

² Cell Signaling

کنند [۱۰،۲]. پراکسید هیدروژن یکی از گونه‌های فعال اکسیژن است که غلظت بالای آن می‌تواند اثرات نامطلوبی بر سلامتی انسان داشته باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که غلظت پراکسید هیدروژن با ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان و آلزایمر مرتبط است [۳،۴]. تعیین غلظت پراکسید هیدروژن در مایعات و نمونه‌های زیستی به علت تاثیرات آن بر سلامت انسان اهمیت زیادی دارد. غلظت هیدروژن پراکسید در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی کم بوده و مقادیر نرمال آن در پلاسما تا ۵ میکرومولار است، اما تحت تاثیر برخی شرایط پاتولوژیک و غیر نرمال می‌تواند تا میزان ۱ میلی‌مولار نیز افزایش یابد [۵،۶]. عدم تعادل در سطح هیدروژن پراکسید نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های خنثی کننده آن اثرات مضر در بدن دارد که منجر به آسیب‌هایی به ماکرومولکول‌های حیاتی مثل اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌شود [۷]. بنابراین اندازه‌گیری سطح پراکسید هیدروژن در سرم در درک نقش آن به عنوان یک نشانگر زیستی^۱ بالقوه در مانیتورینگ و ردیابی سلامت و بیماری اهمیت دارد. روش‌های مختلفی برای سنجش هیدروژن پراکسید در مایعات بدن، مانند روش‌های طیف سنجی [۸]، کمولومینسانس [۹]، فلورومتری [۱۰،۱۱]، کروماتوگرافی [۱۲] و تیترومتری [۱۳] گزارش شده است. هرچند تمامی این روش‌ها به دلیل مزایای قابل توجه آن‌ها، از جمله نویز کم پس زمینه، حساسیت بالا روش‌های معمول در آزمایشگاه‌ها می‌باشند ولی از معایب این روش‌ها گران بودن، نیازمندی به تجهیزات پرهزینه، طرح‌های آنالیزی پیچیده، در دسترس نبودن و نیاز به اپراتور آموزش دیده می‌باشد [۱۴]. تکنیک مبتنی بر زیست‌حسگرهای^۲ الکتروشیمیایی به دلیل سهولت کار با آن‌ها، هزینه کم، حساسیت بالا، سرعت و گزینش پذیری مناسب و عدم نیاز به کاربر

متخصص برای تعیین میزان هیدروژن پراکسید در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده است [۱۵،۱۶]. پروتئین‌های حاوی گروه‌های هم^۳ که در طراحی زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به کار می‌روند، با داشتن مرکز الکترون فعال هم دارای فعالیت شبه پراکسیدازی برای احیای هیدروژن پراکسید هستند [۱۷]. در این میان، پروتئین هموگلوبین به دلیل ساختار شناخته شده آن، در دسترس بودن تجاری با هزینه کم و پایداری نسبی برای طراحی این نوع از حسگرهای زیستی هیدروژن پراکسید مناسب‌تر است [۱۷،۱۸]. با این حال به علت درشت بودن ساختار سه بعدی هموگلوبین و دفن شدن مرکز الکتروفعال آن در پاکت پروتئینی، مرکز ردوکس از سطح الکتروود دور است [۱۹]. همچنین زمانی که هموگلوبین روی سطح الکتروود جذب می‌شود، اغلب دناتوره شده و فعالیت الکتروشیمیایی و زیست‌فعالی خود را از دست می‌دهد و یا این که جهت‌گیری مناسبی برای انتقال الکترون ندارد، بنابراین ایجاد یک مسیر کوتاه برای انتقال الکترون بین سطح الکتروود و مرکز ردوکس هموگلوبین ضروری است. محققان روش‌های مختلفی را برای برقراری ارتباط انتقال الکترون بین پروتئین و الکتروود به کار گرفته‌اند. یکی از این راه‌ها استفاده از نانو ساختارها برای تسهیل انتقال الکترون می‌باشد [۲۰]. در سال ۲۰۱۳ ویراپان مانی و همکاران از یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی حاوی نانو کامپوزیت اکسید گرافن احیا شده، نانولوله کربنی چند دیواره^۴ (MWCNT) و پلاتین به همراه میوگلوبین (rGO- MWCNT-Pt/Mb) برای تشخیص هیدروژن پراکسید استفاده کردند که حد تشخیص این حسگر ۶ پیکومولار بود [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۷ ناروال و همکاران از یک زیست‌حسگر طراحی شده براساس هموگلوبین تثبیت شده بر روی الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا برای تشخیص هیدروژن

³ Heme⁴ Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs)¹ Biomarker² Biosensor

هموگلوبین و سطح الکتروود را تسهیل کنند [۳۰]. نانولوله‌های کربنی با خواص فیزیکی و ساختاری منحصر به فرد به افزایش حساسیت حسگر، تسریع زمان پاسخ‌دهی، پایداری بیشتر مواد اصلاح‌گر سطح الکتروود و کاهش پتانسیل واکنش ردوکس کمک می‌کنند [۳۱-۳۳].

در این کار، یک زیست حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر هموگلوبین برای تشخیص هیدروژن پراکسید طراحی شد که در آن به صورت نوآوران و برای اولین بار از نانو کامپوزیت MWCNTs/Co₃O₄ به عنوان اصلاح‌گر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای^۲ (GCE) استفاده شد. نتایج بدست آمده در محدوده تشخیص خطی ۱۰ تا ۵۰۰ میکرومولار و حدتشخیص بسیار پایین ۰/۵۱۲ میکرومولار در اندازه‌گیری‌های انجام شده برای نمونه‌های زیستی نشان داد که این روش طراحی شده می‌تواند بسیار مورد اعتماد باشد.

روش کار

معرف‌ها

کلرید کبالت هگزا هیدرات (CoCl₂.6H₂O)، هیدروژن پراکسید و هیدروکسید سدیم (NaOH) از شرکت مرک خریداری شد. نانو لوله‌های کربنی چند دیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل از شرکت US nano خریداری شد. هموگلوبین از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. از بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 برای اندازه‌گیری‌های الکتروشیمی استفاده شد. آب دیونیزه شده برای تمام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. همه معرف‌ها بدون خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

دستگاه‌ها

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستات گالوانواستات با مارک Autolab ساخت کشور هلند انجام شد. از یک سیستم سه الکتروودی در طول آزمایش استفاده شد. از الکتروود کربن شیشه‌ای

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 هموگلوبین و الکتروود کربن اصلاح شده با نانوذرات طلا طراحی کردند که به علت روش منحصر به فرد 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 خاص خود را دارد که طراحی و تهیه حسگرهای زیستی بر اساس یک نانوماده تنها را سخت می‌کند. بنابراین یک نانو کامپوزیت متشکل از چندین نانو ماده می‌تواند اثر تجمعی مزایای چند نانوماده را با هم داشته و حساسیت زیست حسگر را افزایش دهد و عملکرد بهتری از خود نشان دهد [۲۴]. نانو ساختارهای مبتنی بر اکسید فلز به افزایش حساسیت و پایداری حسگرها کمک می‌کند. در میان خانواده اکسیدهای فلزات واسطه، نانو ساختارهای اکسید کبالت^۱ (Co₃O₄) فعالیت الکترو کاتالیستی خاصی برای تشخیص ترکیبات مختلف از خود نشان می‌دهند [۲۵،۲۶]. اکسید کبالت دارای ویژگی‌های خاصی مانند مساحت سطح بالا و خواص کاتالیزوری منحصر به فرد می‌باشد. به همین علت به طور گسترده در کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژی پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۷،۲۸]. با این حال حسگرهای مبتنی بر نانوذرات اکسید کبالت اغلب رسانایی الکترونیکی ضعیف دارند و در محلول‌های آبی روی یکدیگر جمع می‌شوند که سطح ویژه آن‌ها را کاهش می‌دهد و عملکرد الکتروشیمیایی آن‌ها را تا حدی ضعیف می‌کند [۲۹]. نانو مواد کربن‌دار مانند گرافن و نانولوله‌های کربنی در ترکیب با این نانوذرات اکسید فلزی برای توسعه زیست حسگر مورد استفاده قرار می‌گیرند تا این موانع را برطرف کنند و در نتیجه می‌توانند انتقال الکترون بین

¹ Cobalt Oxide (Co₃O₄)

² Glassy Carbon Electrode (GCE)

تهیه نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄

سنتز نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ با یک روش بسیار ساده و به دور از هر گونه پیچیدگی انجام شد. در این روش ۵۰۰ میلی‌گرم MWCNTs با ۲۰۰ میلی‌گرم Co₃O₄ با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی استیرر با دور بالا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ترکیب شد تا نانوذرات Co₃O₄ به خوبی جذب MWCNTs شوند. مقادیر نانوذرات Co₃O₄ به طوری انتخاب گردید که بعد از تشکیل نانوکامپوزیت همچنان گروه‌های عاملی کربوکسیل کافی بر روی MWCNTs برای واکنش با گروه‌های آمین هموگلوبین در سطح الکتروود با جهت‌گیری‌های مناسب در دسترس باشند. بعد از ۲۴ ساعت نانوکامپوزیت به کمک پمپ خلا جدا شد و به مدت ۱۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود.

اصلاح الکتروود با استفاده از نانوکامپوزیت

پس از تهیه نانوکامپوزیت ۴۰۰ میلی‌گرم از آن در ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۴ میلی‌لیتر اتانول با نسبت ۱:۱ مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اولتراسونیک دیسپرس گردید. در ادامه پس از صیقل دادن سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با پودر آلومینا و یک دستمال تمیز، با سمپلر محلول نانوکامپوزیت قطره قطره روی سطح الکتروود ریخته شد تا جایی که سطح الکتروود کاملاً پوشانیده گردد. برای خشک کردن، الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوکامپوزیت به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب و الکل خشک شده و تماس قوی بین سطح الکتروود و نانوکامپوزیت با جذب سطحی و پیوند واندروالسی بین الکتروود و نانولوله‌های کربنی ایجاد شود.

تثبیت هموگلوبین بر روی الکتروود کربن شیشه‌ای

اصلاح شده با نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄

۱۰ میکرولیتر محلول ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هموگلوبین روی سطح الکتروود اصلاح شده با نانوکامپوزیت

اصلاح شده به عنوان الکتروود کار، الکتروود نقره-نقره کلراید (Ag/AgCl) به عنوان الکتروود مرجع و الکتروود پلاتین به عنوان الکتروود شمارش گر استفاده شد. تمام آزمایشات الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شد. ویژگی‌های نانوذرات، نانولوله‌های کربنی و نانوکامپوزیت تهیه شده بررسی شد. آنالیز پراش پرتو ایکس^۱ (XRD) با دستگاه مدل Xpert pro panalytical انجام شد. آنالیز اسپکترومتری تبدیل فوریه مادون قرمز^۲ (FTIR) با دستگاه کمپانی TERMO مدل AVATAR در آزمایشگاه انجام گرفت. بررسی مورفولوژیکی نانوذرات، نانولوله‌های کربنی و نانوکامپوزیت با تحلیل تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی FESEM با دستگاه مدل Tescan Mira3 و TEM با دستگاه مدل Zeiss Libra انجام شد.

سنتز نانوذرات Co₃O₄

نانوذرات Co₃O₄ به روش هم‌رسوبی سنتز شدند. ۲ گرم نمک کلرید کبالت هگزا هیدرات در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت به کمک هم‌زن مغناطیسی در آب مقطر حل شد. در حین هم‌زدن محلول NaOH ۳ مولار به صورت قطره قطره به ظرف اضافه شد تا موجب تشکیل رسوب گردد. محلول به مدت ۲۴ ساعت روی هم‌زن مغناطیسی باقی ماند تا تشکیل رسوب نانوذرات تکمیل گردد. هم‌زدن باعث شد که نانوذرات به صورت هم‌شکل و یکنواخت تشکیل شوند. پس از تشکیل رسوب مخلوط حاوی نانوذره Co₃O₄ دارای یک سری ناخالصی بود. برای جداسازی نانوذرات بدون ناخالصی‌ها، مخلوط چندین بار با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و با آب مقطر شست و شو داده شد تا نانوذرات Co₃O₄ در ته ظرف جمع‌آوری و ناخالصی‌ها جدا شوند. نانوذرات Co₃O₄ بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای 60 °C نگهداری شد.

¹ X-Ray Diffraction (XRD)

² Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)

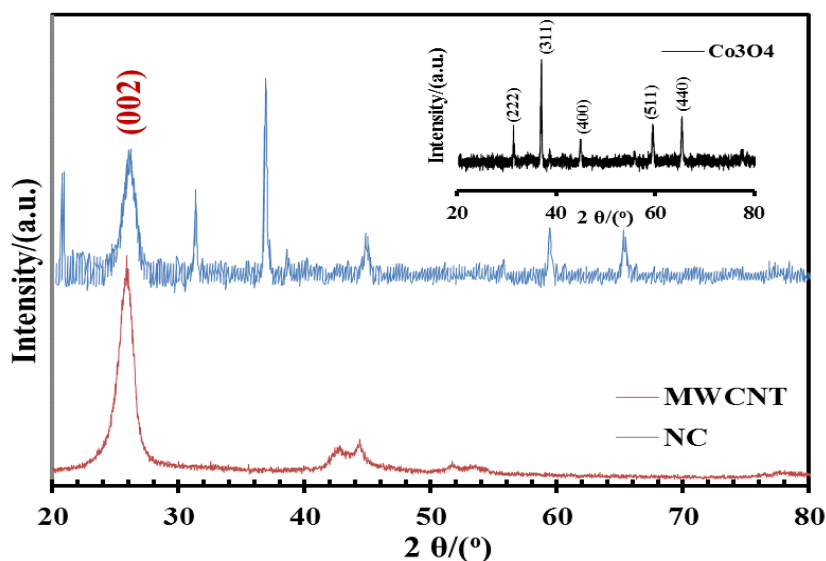
شکل ۱ مشاهده می‌شود الگوهای مربوط به MWCNT دارای دو پیک مشخص در 2θ در زوایای $25/9^\circ$ و $43/1^\circ$ است که به ترتیب به الگوی صفحات ۰۰۲ و ۱۰۰ ساختار گرافیتی MWCNT تعلق دارد [۳۴]. پیک در پراش 2θ در زوایای $3/31^\circ$ ، $9/36^\circ$ ، $6/38^\circ$ ، $9/44^\circ$ ، $4/59^\circ$ و $3/65^\circ$ برای نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ مشاهده شد که به ترتیب با صفحات ۲۲۰، ۳۱۱، ۲۲۲، ۴۰۰، ۵۱۱ و ۴۴۰ از نانوذرات Co₃O₄ مطابقت دارد [۲۵]. این پیک‌های شاخص متعلق به فاز مکعبی Co₃O₄ هستند. پیک‌ها دارای شدت مناسبی هستند که نشان دهنده بلورینگی قابل قبول نمونه‌ها است. هیچ ناخالصی پیدا نشد که نشان دهنده سهم قابل توجه نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ در نمونه تحت بررسی می‌باشد.

کامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ ریخته شد و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. با توجه به اینکه نانولوله کربنی چند دیواره دارای گروه کربوکسیل فعال شده در ساختار نانوکامپوزیت به کار برده شده بود، اتصال کوالانسی بین گروه آمینی هموگلوبین با گروه کربوکسیل متصل به نانولوله‌های کربنی چند دیواره برقرار شد. تثبیت محکم‌تر هموگلوبین در سطح الکتروود با به دام افتادن فیزیکی این پروتئین در شبکه چند لایه نانوکامپوزیت در سطح الکتروود نیز اتفاق افتاد.

یافته‌ها

آنالیز XRD و FTIR نمونه نانوکامپوزیت

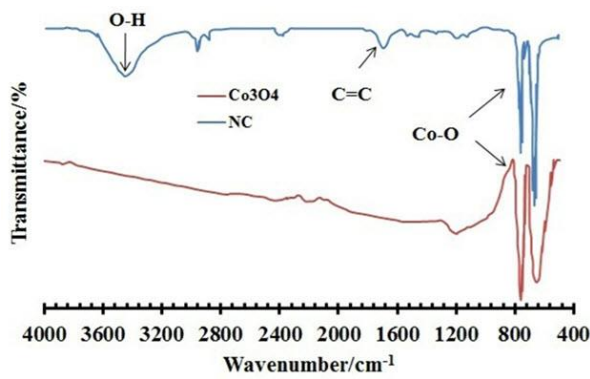
ساختار کریستالی نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ توسط آنالیز XRD شناسایی شد. همان طور که در



شکل ۱. الگوی XRD از MWCNT و نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ (NC)

هشت وجهی مرتبط است [۲۵،۳۵]. باندهای 2921 cm^{-1} تا 2854 cm^{-1} در طیف به ارتعاشات کششی نامتقارن یا متقارن C-H در گروه CH₂ و CH₃ در MWCNT نسبت داده می‌شود. پیک در 1641 cm^{-1} را می‌توان به ارتعاش کششی C=C در اسکلت اصلی ساختار نانولوله‌های کربنی نسبت داد. باند 3442 cm^{-1} به ارتعاش کششی O-H نسبت داده

طیف FTIR از نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ محدوده 400 cm^{-1} و 4000 cm^{-1} برای ارزیابی گروه‌های عاملی نانوکامپوزیت ساخته شده در شکل ۲ نشان داده شده است. دو پیک متمایز تیز در 660 cm^{-1} و 562 cm^{-1} مشاهده می‌شود که بیانگر حضور Co^{2+} و Co^{3+} در ارتعاش کششی CO-O است، که در آن Co^{2+} با مختصات چهاروجهی و Co^{3+} با مختصات

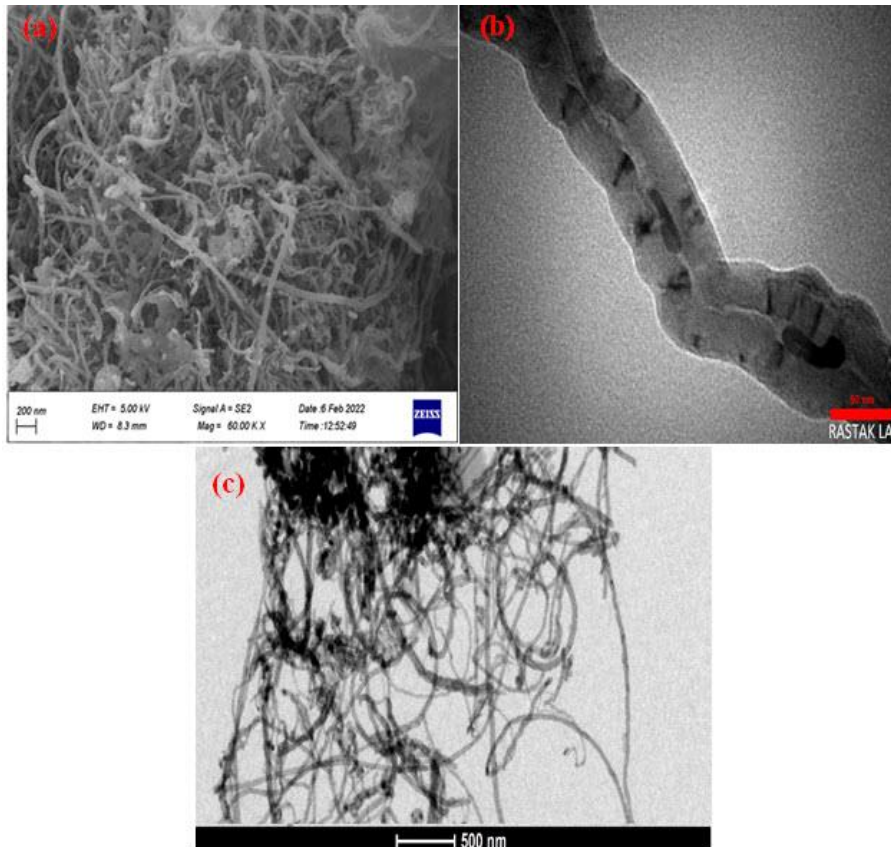


شکل ۲. طیف سنجی FTIR از نانوذرات Co_3O_4 و نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$ (طیف آبی: مربوط به نانوکامپوزیت و طیف قرمز: مربوط به اکسید کبالت)

می‌شود. نتایج طیف FTIR آرایش MWCNTs با نانوذرات Co_3O_4 را تایید کرد.

مورفولوژی ساختار نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$

مورفولوژی نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$ توسط میکروسکوپ FESEM مورد بررسی قرار گرفت. در شکل 3a وجود نانوذرات Co_3O_4 آرایش یافته بر روی سطح MWCNT قابل مشاهده است. تصویر میکروسکوپ الکترونی با وضوح بالا (HRTEM) از نانولوله کربنی چند دیواره در شکل 3b و نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$ در شکل 3c نشان داده شده است. با توجه به شکل نانوذرات Co_3O_4 به طور یکنواخت روی MWCNT پراکنده شده‌اند که منجر به انتقال صحیح الکترون می‌شود.



شکل ۳. (a) تصویر FESEM از نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$. (b) تصویر HRTEM از نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT) و (c) تصویر HRTEM از نانوکامپوزیت $\text{MWCNT}/\text{Co}_3\text{O}_4$

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 MWCNT/C₃O₄ با الکترود کربن شیشه‌ای و مدت زمان خشک شدن هموگلوبین روی سطح الکترود اصلاح شده در دمای اتاق که روی عملکرد زیست حسگر تاثیر مستقیم می‌گذارند، بهینه سازی شدند.

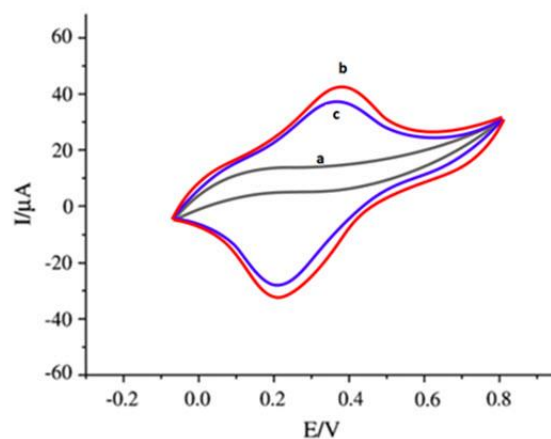
اثر pH برای بهینه سازی پاسخ الکتروکاتالیستی الکترود اصلاح شده نسبت به اکسیداسیون H₂O₂ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه گیری‌های انجام شده با روش ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) برای مقدار ۱۰۰ میکرومولار H₂O₂ با حسگر تهیه شده در مقادیر مختلف pH بافر فسفات از ۵ تا ۸/۵ در شکل ۵a نشان داده شده است. بالاترین پیک جریان در pH=7 مشاهده گردید. به این ترتیب در ادامه بررسی‌های الکتروشیمیایی از بافر فسفات ۰/۱ 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 پارامتر بسیار مهمی است که بر عملکرد زیست حسگر نیز تاثیر می‌گذارد. این مدت زمان بررسی و بهینه سازی شد. برای این کار پاسخ‌های جریان بدست آمده برای اندازه گیری مقدار ثابتی هیدروژن پراکسید در مدت زمان لازم برای تثبیت نانو کامپوزیت MWCNT/C₃O₄ بر روی الکترود کربن شیشه‌ای در فواصل زمانی ۰/۵ تا ۴/۵ 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 هموگلوبین با الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/C₃O₄ پاسخ جریان در زمان‌های ۱ تا ۵ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین پاسخ جریان در سه ساعت انکوباسیون در دمای اتاق بدست آمد (شکل 5c).

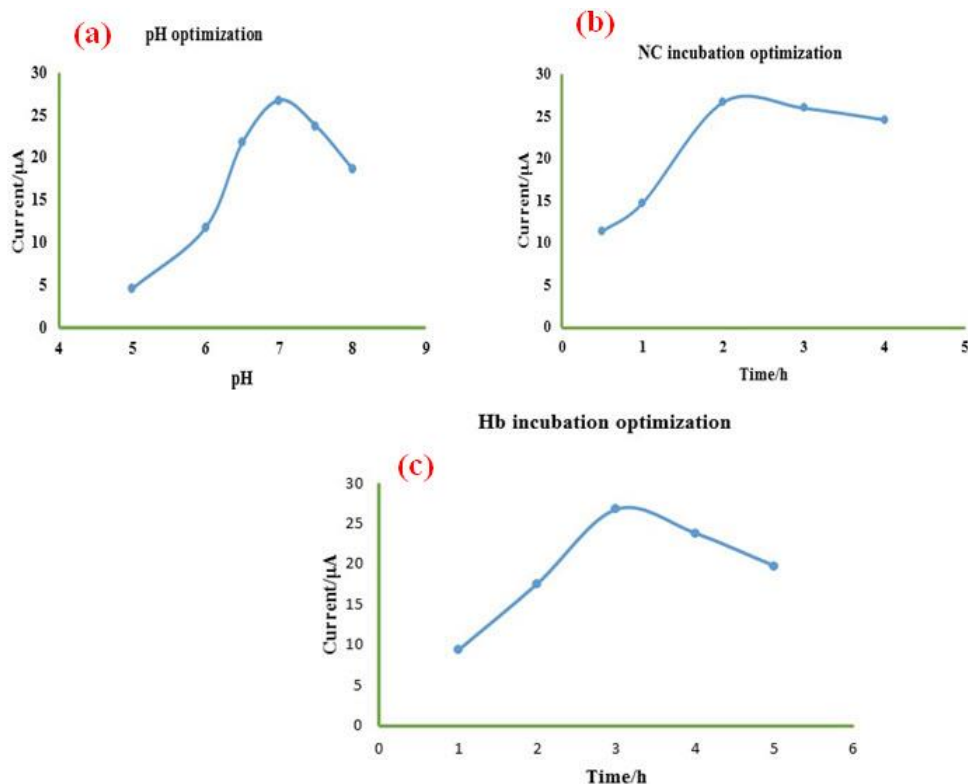
رفتار الکتروشیمیایی مرحله به مرحله اصلاح الکترود

مراحل اصلاح الکترود با روش ولتامتری چرخه‌ای (CV) مورد بررسی قرار گرفت. سلول الکتروشیمیایی حاوی بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 بود. در این مرحله اندازه گیری‌های CV با سرعت اسکن ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه و در محدوده پتانسیل ۰/۲- تا ۰/۸+ ولت انجام شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود هنگامی که الکترود کربن شیشه‌ای برهنه در محلول غوطه‌ور شد هیچ پیک ردوکس آشکاری برای آن مشاهده نشد.

با اصلاح الکترود با نانو کامپوزیت MWCNT/C₃O₄ پیک جریان به طور قابل توجهی افزایش یافت که به علت افزایش سطح الکتروفعال و تسهیل انتقال الکترون بود. با تثبیت هموگلوبین بر روی سطح الکترود اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/C₃O₄ کاهش پیک جریان در ولتاموگرام مشاهده شد که به علت اشغال سطح فعال الکترود توسط هموگلوبین و کاهش تبادل الکترون بین الکترود و الکترولیت می‌باشد.



شکل ۴. ولتاموگرام چرخه‌ای به ترتیب برای: (a) الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح نشده، (b) الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/C₃O₄ و (c) الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با GCE/MWCNT-C₃O₄/Hb در بافر فسفات ۰/۱ مولار

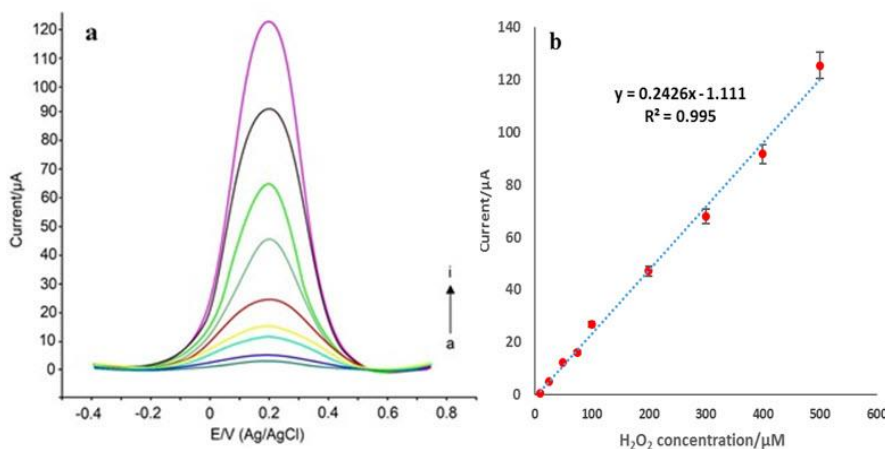


شکل ۵. (a) بهینه‌سازی اثر pH با فر فسفات بر روی پاسخ جریان زیست حسگر برای اندازه‌گیری ۱۰۰ میکرومول هیدروژن پراکسید، (b) بهینه‌سازی زمان انکوبه شدن نانوکامپوزیت با الکتروود کربن شیشه‌ای و (c) تاثیر زمان انکوباسیون هموگلوبین با الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوکامپوزیت

تشخیص H₂O₂

میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار و جریان وجود دارد. معادله رگرسیون برای منحنی کالیبراسیون برابر با $y=0.2426x-1.111$ و ضریب همبستگی $R^2=0.995$ بود. حد تشخیص زیست حسگر برای هیدروژن پراکسید ۰/۵۱۲ میکرومولار بدست آمد.

در شرایط بهینه از زیست‌حسگر برای اندازه‌گیری 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 خطی بین غلظت H₂O₂ از ۱۰



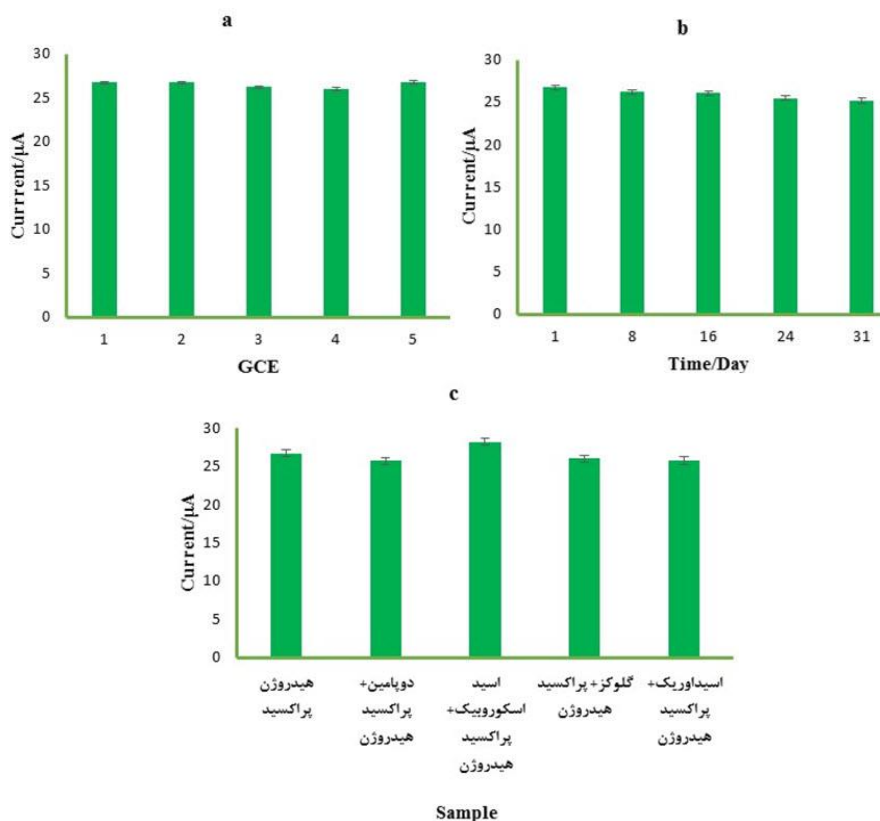
شکل ۶. (a) سیگنال‌های جریان DPV زیست حسگر به غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید از a تا i به ترتیب: ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار. (b) منحنی کالیبراسیون زیست حسگر در غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید.

تکرارپذیری، پایداری و گزینش پذیری زیست حسگر

برای ارزیابی تکرارپذیری زیست حسگر استفاده شده در این کار پنج الکتروود با شرایط مشابه تهیه شده 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 الکتروود ۱/۲ درصد است که نشان می‌دهد حسگر زیستی طراحی شده دارای قابلیت تکرار پذیری مناسبی است (شکل 7a). برای بررسی پایداری الکتروود اصلاح شده و چگونگی پاسخ زیست حسگر با گذشت زمان، عملکرد زیست حسگر در محدوده‌های زمانی مختلف برای تشخیص ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب الکتروود به مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پیک جریان در ابتدای هفته اول، ابتدای هفته دوم، ابتدای هفته سوم، ابتدای هفته چهارم و در آخر در انتهای هفته چهارم برای اندازه گیری هیدروژن پراکسید استفاده شد.

جریان اندازه گیری شده در انتهای هفته چهارم به میزان ۳/۲ درصد کاهش یافت که نشان دهنده پایداری مناسب زیست حسگر تهیه شده به این روش است (شکل 7b).

برای ارزیابی گزینش پذیری حسگر نسبت به هیدروژن پراکسید از گونه‌های احتمالی تداخل گر موجود در نمونه واقعی سرم استفاده شد. محلول‌های جداگانه به ترتیب شامل ۱۰۰ میکرومولار دوپامین، اسید اسکورویک، گلوکز و اسیداوریک به علاوه ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید و همچنین نمونه ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید به تنهایی توسط زیست حسگر اندازه گیری شدند (شکل 7c). RSD پاسخ‌ها برای همه نمونه‌ها ۳/۵ درصد بدست آمد که نشان دهنده انتخاب پذیری قابل قبول زیست حسگر است. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که زیست حسگر طراحی شده دارای گزینش پذیری بالایی نسبت به H_2O_2 می‌باشد.



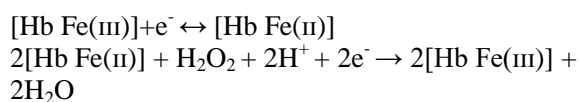
شکل ۷. (a) بررسی تکرارپذیری، (b) اندازه گیری پایداری و (c) بررسی عوامل تداخلی تاثیر گذار بر زیست حسگر

بحث

تجزیه و تحلیل عملکرد زیست حسگر

این زیست حسگر با اصلاح سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ طراحی شده است. نانوکامپوزیت تثبیت شده منجر به افزایش نسبت سطح به حجم و تسهیل انتقال الکترون بین الکتروود و مرکز ردوکس هموگلوبین می‌گردد. استفاده از نانولوله‌های کربنی در زیست حسگرها دارای یک هدف دوگانه است که هم به عنوان پشتیبان و بستری مناسب برای تثبیت مولکول‌های زیستی عمل می‌کنند و هم هدایت الکتریکی لازم را برای انتقال سیگنال‌های الکتروشیمیایی فراهم می‌کنند. نسبت سطح به حجم بالای نانولوله‌های کربنی اجازه بارگذاری بیومولکول‌های بیشتری در واحد سطح هندسی را می‌دهد که به تقویت سیگنال کمک می‌کند [۳۶]. هموگلوبین با تبدیل Fe(II) به Fe(III) باعث کاهش شدن هیدروژن پراکسید می‌گردد. پاسخ زیست

حسگر بر اساس فرایند اکسایش-کاهش زیر است [۳۷]:



مقایسه نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید توسط زیست حسگر تهیه شده در این کار تحقیقی با نتایج زیست حسگرهای مشابهی که کار شده بود در جدول ۱ گزارش شده است. همان‌طور که از این مقایسه قابل استخراج است زیست حسگر الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوکامپوزیت MWCNT/Co₃O₄ برای تشخیص هیدروژن پراکسید پاسخ بهتری از خود نشان داد که می‌تواند به ترکیب Co₃O₄ و MWCNT‌ها نسبت داده شود که این دو نانوماده در کنار هم می‌توانند شبکه‌ی رسانی بزرگی را ارائه دهند که با پایداری بالای شیمیایی خود و سایر ویژگی‌های فیزیکی خود افزایش پاسخ الکتروشیمیایی را منجر می‌شود.

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

منبع	حد تشخیص (μM)	محدوده خطی (μM)	الکتروود
[۳۷]	0.12	200 - 3400	Hb/AgNF/ITO
[۳۸]	2.4	15-675	Co ₃ O ₄ -rGO
[۳۹]	22	40 - 4000	SiO ₂ /Hb-AuNPs/ACNTs
[۴۰]	26	100 - 10000	N-rGO
[۲۳]	0.6	10 - 450	NF-Hb-Cys-AuNPs-SPCE
[۴۱]	6.2	20 - 892	Cyt c/TPP-HA[TFSI]/MWCNT/GCE
[۴۲]	0.89	2-954	CoO-CoS/NF
[۴۳]	3.2	10 - 6300	Hb/NIBA-IL/MWCNT/GCE
[۴۴]	1	5 - 1500	GC/Hb/SnO ₂ /CHIT
مطالعه حاضر	0.512	10 - 500	MWCNT-Co ₃ O ₄ /Hb

آنالیز نمونه واقعی سرم

قابلیت کاربرد عملی زیست حسگر تهیه شده با استفاده از روش افزودن استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های واقعی سرم از آزمایشگاه دکتر حدیثی در اردبیل با غلظت‌های مختلف بدون هیچگونه دستکاری تهیه شده بود و آزمایش‌ها بر اساس غلظت‌های نمونه 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 ۱/۳۲ درصد و مقادیر بازیابی^۱ برای تعیین نمونه در محدوده ۱۰۰٪ تا ۱۰۲٪

¹ Recovery

هیدروژن پراکسید توسط زیست حسگر ارائه شده با روش آزمایشگاهی طیف سنجی نوری انجام شد که اختلاف نتایج بدست آمده بسیار نزدیک بود (جدول ۳).

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

جدول ۲. تشخیص H_2O_2 در نمونه‌های واقعی سرم

نمونه	مقدار اضافه شده (μM)	غلظت اندازه گیری شده (μM)	میانگین (μM)	RSD% (n=5)	Recovery% (n=5)
50	25	74.2, 76.58, 76.83, 75.19, 75.16	75.59	1.29	102.3
	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

جدول ۳. تشخیص H_2O_2 به دو روش طیف سنجی و حسگر زیستی MWCNT- Co_3O_4/Hb

نمونه	اندازه گیری با روش زیست حسگر ارائه شده (μM)	اندازه گیری با روش طیف سنجی (μM)
1	30.92	30.69
2	43.81	43.14
3	38.1	37.96

نتیجه گیری

تکرارپذیری و پایداری بالایی داشت و با توجه به اینکه به صورت نوآورانه از نانوکامپوزیت MWCNTs/ Co_3O_4 به عنوان اصلاح گر سطح الکتروود استفاده شده بود عملکرد مناسبی را برای اندازه گیری هیدروژن پراکسید در نمونه‌های سرم واقعی و محلول آزمایشگاهی نشان داد. پیشنهاد می‌شود در کارهای آتی ممکن است تشخیص مقادیر هیدروژن پراکسید از طریق طراحی یک فناوری زیست حسگر جایگزین بدست آید. این رویکرد مستلزم استفاده از مواد و کامپوزیت‌های متنوع است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه گیلان و دانشگاه محقق اردبیلی به دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن تجهیزات اعلام می‌دارند.

در این کار تحقیقی سنجش میزان هیدروژن پراکسید براساس خاصیت الکتروشیمیایی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با MWCNT- Co_3O_4/Hb انجام شد. از نانولوله کربنی عامل دار شده با گروه کربوکسیل برای تثبیت هموگلوبین بر سطح الکتروود اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNT/ Co_3O_4 استفاده شد. اتصال کوالانسی بین گروه آمینی هموگلوبین با گروه کربوکسیل متصل به نانولوله‌های کربنی چند دیواره برقرار شد. تشخیص هیدروژن پراکسید با فعالیت شبه پراکسیدازی هموگلوبین و کاهش H_2O_2 صورت گرفت. هموگلوبین اکسایش یافته از نظر شیمیایی می‌تواند دوباره احیا بشود. در شرایط بهینه از زیست حسگر برای اندازه گیری غلظت‌های مختلف H_2O_2 استفاده شد. زیست حسگر طراحی شده محدوده پاسخ خطی از ۱۰ تا ۵۰۰ میکرومولار و حد تشخیص ۰/۵۱۲ میکرومولار را برای هیدروژن پراکسید نشان داد. زیست حسگر جدید معرفی شده در این کار

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- Elanchezian 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, Vejjayan 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 Co₃O₄ nanowires on reduced graphene oxide for enzymeless H₂O₂ 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.