



## خصوصیات سینتیکی نانوزیم جدید مقلد پراکسیدازی بر پایه کربن/گرافن و کاربرد آن در تشخیص گلوکاتایون در داروها

نیلوفر جهاندار شمایی<sup>۱</sup> | سیده شیرین شاهنگیان\*<sup>۱</sup> | سید سلمان سید افقهی<sup>۲</sup> | نوابه سالاری زاده<sup>۳</sup> | حجت اله زمانی آلمانی<sup>۱</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- مرکز علم و فناوری مواد پیشرفته و نانوفناوری، دانشکده و پژوهشکده ی فنی و مهندسی، دانشگاه جامع امام حسین ع، تهران، ایران

۳- دانشکده ی زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

**چکیده:** با توجه به اهمیت بهبودبخشی خصوصیات اکسید گرافن و کاربرد وسیع نانوزیمها در حوزه‌های متفاوت از جمله صنایع دارویی، این مطالعه با هدف سنتز نانوچندسازه اکسید گرافن احیاء/نانولوله‌ی کربنی چند دیواره، بررسی خصوصیت شبه پراکسیدازی آن و سنجش گلوکاتایون با روش رنگ‌سنجی ساده، سریع و کاربردی در کپسول‌های تجاری گلوکاتایون انجام شد. نانوچندسازه حاصل خاصیت مقلد پراکسیدازی مطلوبی از خود نشان داد و در مقایسه با آنزیم پراکسیداز طبیعی تمایل بیشتری به  $H_2O_2$  داشت. همچون بسیاری از آنزیم‌های طبیعی، رفتار سینتیکی نانوزیم از معادله مکائلیس-متن تبعیت کرد و فعالیت کاتالیستی آن وابسته به pH، دما و غلظت کاتالیست بود. با توجه به توانایی گلوکاتایون در حذف گونه‌های فعال اکسیژن و به دنبال آن مهار فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزیم، یک حسگر رنگ سنج برای سنجش گلوکاتایون طراحی شد که گستره‌ی خطی تشخیص آن ۶۲/۵ تا ۶۲۵ میکرومولار و حد تشخیص ۰/۱۵ میلی مولار بود. از این روش رنگ سنجی برای سنجش گلوکاتایون در کپسول‌های تجاری نیز با موفقیت استفاده شد.

**واژگان کلیدی:** نانوزیم، فعالیت مقلد پراکسیدازی، سنجش کالریمتریک، کپسول گلوکاتایون.

\*shahangian@guilan.ac.ir

های طبیعی به نمایش می‌گذارند [۱]. نانوزیم‌ها به واسطه ویژگی‌های منحصربفرد از جمله پایداری بالا، تولید آسان و کم هزینه و همچنین، حفظ فعالیت در بازه‌های زمانی طولانی به عنوان جایگزین مناسبی برای آنزیم‌های طبیعی شناخته شده‌اند [۲]. آنزیم‌های مصنوعی با توجه به توانایی شان در پیشبرد واکنش‌های متنوع شبه کاتالازی، سوپراکسید دیسموتازی، اکسیدازی، پراکسیدازی، در تشخیص و درمان هدفمند سرطان، تشخیص داروها، شناسایی زیستی، ایمونواسی و حتی سم شناسی محیطی بسیار پرکاربرد خواهند بود [۳، ۴]. تاکنون مطالعات بسیاری بر نانوذرات مقلد آنزیمی به ویژه مقلدهای پراکسیدازی

### ۱- مقدمه

با وجود کاربردهای متنوع آنزیم‌های طبیعی در صنایع دارویی، غذایی، کشاورزی، شیمیایی و نیز به عنوان بیوحسگر، برخی محدودیت‌های ذاتی آنزیم‌ها مثل پایداری عملکردی پایین، حساسیت نسبت به شرایط محیطی، مشکلات بازیابی آنزیم‌ها و هزینه بالای آماده سازی و تخلیص، کاربرد آن‌ها را محدود کرده است. به‌تازگی تلاقی علوم نانوفناوری و زیستی منجر به طراحی نانوذرات دارای فعالیت کاتالیستی شبه آنزیمی تحت عنوان نانوزیم‌ها شده است که ویژگی‌های عملکردی متنوعی از آنزیم

مثل نانوذرات فلزی (نانوذرات پلاتین [۲]، نانوذرات طلا [۳])، نانو ساختارهای اکسید فلزی [۴، ۵]، هالیدهای فلزی [۶] و نانوذرات بر پایه کربن [۷، ۸] انجام شده است و به عنوان کاتالیست‌های مقلد زیستی کارآمد در آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۹]. در بین نانوذرات بر پایه کربن، گرافن و مشتقات محلول در آب آن مثل اکسید گرافن [۱۰] و اکسید گرافن احیا شده [۱۱] به دلیل سطح وسیع، رسانش گرمایی و الکتریکی بالا، کشش مکانیکی زیاد، ویژگی‌های انتقال بار ویژه و کم هزینه بودن ساخت، به عنوان نانوذرات عملکردی با کارایی بالا و فعالیت کاتالیستی مشابه یا حتی بهتر از آنزیم‌های طبیعی (خصوصاً پراکسیدازها)، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اکسید گرافن ساختاری ورقه ای است که از اکسایش گرافیت به دست می‌آید. در مقایسه با گرافیت خالص، ورقه‌های اکسید گرافن به شدت اکسیژنه و دارای گروه‌های عملکردی هیدروکسیل و اپوکسید روی صفحه‌های پایه هستند. به علاوه گروه‌های کربوکسیل و کربونیل نیز در حاشیه‌ی ورقه‌ها قرار دارند. وجود این گروه‌های عاملی بر فعالیت شبه آنزیمی اکسید گرافن در مقایسه با گرافن تاثیرگذار است [۱۲-۱۶]. نانوتیوب‌های کربنی نیز، به عنوان مقلدهای کارآمد پراکسیدازی، از کاندید‌های مناسب برای کاربرد به‌عنوان نانوزایم به شمار می‌آیند [۱۷]. Song و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که فعالیت GO-COOH شبه پراکسیدازی ذاتی دارد و فعالیت آن مشابه HRP، به شدت به وسیله پارامترهای فیزیولوژیکی تغییر می‌کند. آنالیزهای سینتیکی نشان داد این واکنش کاتالیستی از مکانیسم پینگ پنگ پیروی می‌کند و GO-COOH فعالیت کاتالیستی برتری نسبت به HRP طبیعی نشان می‌دهد [۱۸]. گروهی از محققان، در سال ۲۰۱۲ نشان دادند نانوچندسازه مغناطیسی GO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با فعالیت شبه پراکسیدازی امکان سنجش گلوکز را با روش رنگ سنجی فراهم می‌کند. آنالیزهای سینتیکی نشان داد فعالیت کاتالیتیک این نانو ساختار نیز از سینتیک پینگ پنگ پیروی می‌کند [۱۹]. یکی از مهمترین کاربردهای نانوزایم‌های پراکسیدازی، سنجش متابولیت‌های زیستی از جمله اوره، گلوکز و گلوکاتایون است [۲۰]. تری پپتید گلوکاتایون (GSH) فراوان ترین بیومولکول تیوله‌ی شناخته شده در سلول است که نقش مهمی در حفظ هموستازی ردوکس ایفا و

به عنوان یک آنتی اکسیدانت عمل می‌کند، گروه تیول سیستمین پروتئین‌ها را در حالت احیا نگه می‌دارد و به این ترتیب نقش مهمی در حفظ عملکرد پروتئین و رشد سلول دارد. گلوکاتایون در سمیت زدایی ترکیبات متنوع الکتروفیل و پراکسید‌ها نقش کلیدی دارد، زیرا یک پیش ماده یا کوفاکتور برای برخی آنزیم‌های محافظتی مثل گلوکاتایون پراکسیداز است و از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد که به DNA و RNA آسیب می‌رسانند، سلول‌ها را از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند و به حفظ عملکرد ایمنی کمک می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند عدم تعادل سطوح گلوکاتایون با بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، پیری، مشکلات قلبی و بیماری‌های عصبی مرتبط است. بنابراین گلوکاتایون در حفظ سلامت موجودات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و تشخیص آن ارزش زیادی در علوم تغذیه و داروسازی دارد. با وجود اینکه استراتژی‌های زیادی برای تعیین کمی گلوکاتایون به کار گرفته شده است، محدودیت‌های بسیاری از روش‌های تشخیصی همچون مقرون به صرفه نبودن روش از لحاظ هزینه و زمان و نیازمندی به ابزارهای پیچیده و گران قیمت منجر به توسعه‌ی روش‌های جدید و آسانی شد که امکان سنجش ساده، حساس و اختصاصی گلوکاتایون را امکان پذیر می‌سازند. با توسعه‌ی روزافزون فناوری نانو، فرصت‌ها و امکاناتی جهت طراحی نسل‌های جدیدی از ابزارهای سنجشی ارائه شد. طی دهه‌ی اخیر سنجش هدفمند مولکول‌ها با استفاده از حسگرهای رنگ سنج توجه پژوهشگران بسیاری را جلب کرده است [۱۱، ۱۲، ۲۱-۲۳]. در این پژوهش، با توجه به کاربرد Graphene oxide احیاء شده در زمینه‌های متفاوت پزشکی، محیط زیست و صنایع غذایی و امکان ترکیب آن با سایر نانوذرات برای ارتقای فعالیت کاتالیتیک و حساسیت آن [۱۳]، هم چنین ویژگی‌های نانولوله‌های کربنی چند دیواره از جمله واکنش-پذیری شیمیایی، استحکام، مقاومت، جلوگیری از Restacking ورقه‌های گرافن و افزایش سرعت انتقال الکترون [۲۴]، در صد سنتز نانوذره‌ای جدید بر پایه‌ی اکسید گرافن و نانولوله‌های کربنی چند دیواره با خاصیت شبه پراکسیدازی برآمدیم. ضمن مطالعه‌ی خاصیت مقلد آنزیمی نانوذره‌ی GO/PPD/Multi-walled carbon nanotube از آن به‌عنوان حسگر جدیدی برای ارائه‌ی یک روش رنگ‌سنجی ساده، حساس و انتخابی

جهت تشخیص و سنجش گلوکوتائون بر اساس خاصیت آنتی اکسیدانی آن بهره بردیم.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد و تجهیزات

دستگاه‌های طیف‌سنجی UV-Visible از شرکت Pharmacia Biotech مدل Ultrospec 3000، ترازوی دیجیتالی چهار رقمی، pH متر، بن‌ماری Memmert و میکروسکوپ الکترونی روبشی [۲۵] مورد استفاده قرار گرفتند. کپسول تجاری Snow caps از کشور ژاپن تهیه شد.

اکسید گرافن و نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده از شرکت نوترینو، اسیدهای هیدروکلریک از شرکت MP Biomedicals تهیه شدند. پارافینیل دی‌آمین (PPD) به عنوان عامل کاهنده، آمونیاک و سدیم نیتريت، سدیم استات (NaAc)، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ( $KH_2O_4$ )، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ( $K_2HPO_4$ )، ۳-۵-۳-تترا متیل بنزیدین به عنوان پیش مادهی رنگ زا (TMB)، NaCl، لاکتوز و گلوکز، آمینواسیدهای فنیل آلانین، گلیسین، لوسین، تریپتوفان، آرژنین، سیستئین و کاتیون‌های  $Zn^{2+}$ ،  $Ca^{2+}$ ،  $K^+$  از شرکت مرک خریداری شدند.

### ۲-۲- روش کار

برای سنتز اکسید گرافن احیاء و عامل دار شده از روش بهینه شده در مطالعه Kotral و همکارانش، با اندکی تغییرات استفاده شد [۲۶]. بدین ترتیب که، ۸۰ mg گرافن اکسید با دستگاه اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه در آب پخش شد. سپس به تعلقه حاصل ۸۰۰ mg PPD و ۴۸۰  $\mu l$  محلول آمونیاک افزوده شد. محلول بدست آمده به مدت ۶ ساعت در دمای  $95^\circ C$  بازروانی شد. در نهایت، برای شفاف‌سازی محلول حاصل چندین بار فیلتراسیون با آب و اتانول به وسیله ی گریزانه انجام شد. ماده بدست آمده (GO/PPD) که عاری از ناخالصی است به مدت ۱۲ ساعت در دمای  $60^\circ C$  خشک شد.

برای ایجاد پیوند C-C بین اکسید گرافن و نانولوله های چند دیواره، نمک دیازونیوم اکسید گرافن احیاء و عامل‌دار شده تولید شد. به این صورت که محلول ۴۰٪ (حجمی-حجمی) HCl در بازه‌ی دمایی  $5-0^\circ C$  به شکل قطره‌ای به مخلوط GO/PPD ( $0.07$  گرم) و سدیم نیتريت ( $1/26$  گرم) حین هم زدن افزوده شد.

$0.07$  گرم از نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده با عامل‌های کربوکسیلیک تحت امواج اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه در آب دیسپرس و به مخلوط بالا افزوده شد. این مخلوط در دمای  $75^\circ C$  در یک فضای نیتروژنی حین هم زدن به مدت ۴ ساعت بازروانی شد. محلول حاصل (هیبرید GO/MWCNT) چندبار با آب و اتانول گریزانه و پس از آن در دمای  $60^\circ C$  به مدت ۱۲ ساعت خشک شد.

برای ارزیابی فعالیت کاتالیستی شبه پراکسیدازی نانوذرات بر پایه ی گرافن یعنی اکسید گرافن (GO)، گرافن احیاء شده با پارافینیل دی‌آمین (GO/PPD) و اکسید گرافن احیاء شده/نانولوله ی کربنی چند دیواره (GO/PPD/MWCNT) آزمایش اکسایش کاتالیتیکی پیش مادهی رنگ‌زای TMB در حضور  $H_2O_2$  انجام شد [۲۷].  $135 \mu l$   $H_2O_2$  ۸۰ میلی مولار (رقیق شده در بافر NaAc ۱۰۰ میلی مولار (pH ۳)) با  $135 \mu l$  TMB ۵ میلی مولار (حل شده در DMSO) مخلوط و  $30 \mu l$  از هر یک از نانوذرات مذکور با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر افزوده و پس از انجام واکنش به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، طیف جذبی نمونه ها با تغییر رنگ در ۶۵۲ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نمونه شاهد شامل دو پیش‌ماده و فاقد نانوذره بود.

به منظور بهینه سازی شرایط واکنش تاثیر فاکتورهای همچون زمان، غلظت نانوذره، pH و دما بر فعالیت شبه پراکسیدازی GO/PPD/MWCNT بررسی شد.

برای تعیین زمان مناسب واکنش، فعالیت نانوزایم طبق روش ذکر شده در بالا در فواصل زمانی ۵-۱ دقیقه بعد از آغاز واکنش سنجیده شد. مدت زمانی که پیشرفت واکنش در آن به‌صورت خطی است به‌عنوان زمان بهینه فعالیت نانوزایم در نظر گرفته شد.

غلظت بهینه‌ی نانوذره، با تغییر غلظت GO/PPD/MWCNT ( $0.0125$ ،  $0.025$ ،  $0.05$ ،  $0.1$ ،  $0.2$  میلی گرم بر میلی لیتر) در حجم

واکنش تعیین شد. سنجش واکنش آنزیمی طبق روش بالا انجام و طیف‌های جذبی در طول موج ۶۵۲ نانومتر مقایسه شد.

برای مطالعه اثر pH بر فعالیت شبه آنزیمی نانوذره، محلول‌های بافری سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار با مقادیر pH متفاوت (۵/۶-۲) تهیه شدند و فعالیت در pH های متفاوت و طبق روش استاندارد سنجش اندازه‌گیری و تغییرات جذب در ۶۵۲ نانومتر ثبت شد. سنجش‌ها در هر pH سه بار تکرار شد. حداکثر فعالیت مشاهده شده در pH های سنجش شده ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و فعالیت نسبی سایر سنجش‌ها در مقایسه با این مقدار محاسبه و گزارش شد.

برای تعیین دمای بهینه واکنش نیز پیش‌ماده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای مورد نظر (۸۰-۲۰ درجه سانتیگراد) انکوبه شدند. سپس فعالیت شبه آنزیمی با افزودن نانوزایم به پیش‌ماده در همان دما اندازه‌گیری شد. هر سنجش در هر دما سه بار تکرار شد. حداکثر فعالیت مشاهده شده در دماهای سنجش شده ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و فعالیت نسبی سایر سنجش‌ها در مقایسه با این مقدار محاسبه و گزارش شد.

آزمایش‌های سینتیک steady-state طی بازه‌ی زمانی ۳ دقیقه با بررسی تغییرات جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر با استفاده از طیف‌سنجی UV-Visible تحت شرایط ایتیمم (دمای ۳۵°C، pH ۳) انجام شد. بمنظور محاسبه پارامترهای سینتیکی  $K_m$  و  $V_{max}$ ، فعالیت شبه پراکسیدازی در حضور غلظت‌های متفاوت یک پیش‌ماده و غلظت ثابت پیش‌ماده‌ی دیگر ارزیابی شد. بدین ترتیب که ۳۰  $\mu\text{l}$  نانوذره‌ی GO/PPD/MWCNT (با غلظت نهایی نیم میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان کاتالیست و ۱۳۵  $\mu\text{l}$  غلظت‌های متفاوت  $\text{H}_2\text{O}_2$  (۲۵-۱۵۶ میلی مولار) یا TMB (۷-۲۵ میلی مولار) برای انجام واکنش شبه آنزیمی استفاده شد. منحنی سرعت اولیه برعلیه غلظت‌های متفاوت پیش‌ماده با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه‌ی ۶ رسم شد و ثابت میکائیلیس ( $K_m$ ) و سرعت ماکزیمم ( $V_{max}$ ) محاسبه شدند.

به‌منظور انجام روش رنگ سنجی تشخیص گلوکاتایون، ۳۰  $\mu\text{l}$  محلول نیم میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات GO/PPD/MW CNT را به ۱۳۵  $\mu\text{l}$  از  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۵ میلی مولار (در بافر NaAc

۱۰۰ میلی مولار (۳ pH)) و ۱۳۵  $\mu\text{l}$  TMB ۳ میلی مولار (حل شده در DMSO) افزوده شد. سپس، مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵°C در بن ماری انکوبه شد. در ادامه ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از غلظت‌های متفاوت گلوکاتایون (۲۵۰۰-۰ میکرومولار) به واکنش افزوده و دوباره برای ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵°C انکوبه شد. طیف جذبی در دمای اتاق ثبت و مقدار اکسایش TMB در ۶۵۲ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش‌ها نمونه‌ی حاوی پیش‌ماده‌ها و گلوکاتایون در عدم حضور نانوذره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

روش افزودن استاندارد (method The standard additions) برای تعیین گلوکاتایون در نمونه‌های کاربردی مورد استفاده قرار گرفت. یک محلول از نمونه‌ی داروهای تجاری هموزنایز شده تهیه شد. ۱۰ میلی گرم پودر کپسول وزن و در ۱۰۰ میلی لیتر بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار (۳ pH) حل شد و با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد. نمونه‌های Spike با گلوکاتایون با افزوده کردن مقادیر متفاوت گلوکاتایون به نمونه‌های کپسول رقیق شده، تهیه و مخلوط شدند.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تعیین خصوصیات نانوذرات بر پایه‌ی گرافن

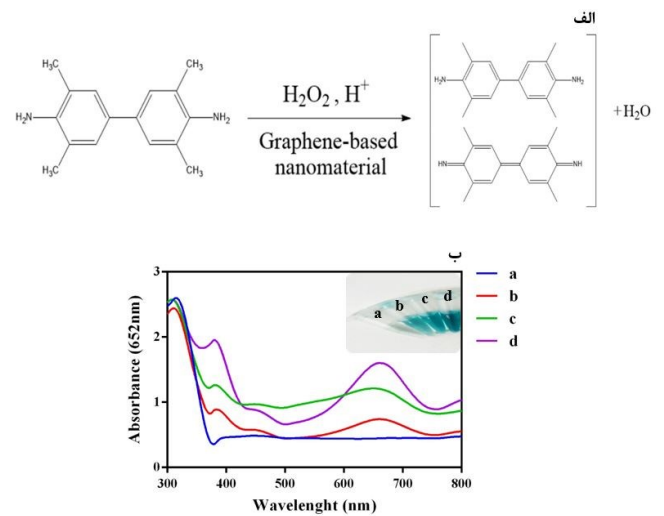
ساختار و ریخت‌شناسی نانوساختارهای گرافنی با استفاده از آنالیزهای FT-IR و SEM مورد بررسی قرار گرفت. بررسی طیف‌سنجی FT-IR برای گرافن اکسید نوارهایی را در اعداد موجی ۳۴۳۰، ۱۷۱۷، ۱۶۲۸، ۱۲۲۴ و  $1047\text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهد که به ترتیب متناظر با پیوندهای  $\text{C}=\text{O}$ ،  $\text{C}=\text{C}$ ،  $\text{C}-\text{O}$  و  $\text{C}-\text{OH}$  در حلقه‌های آروماتیکی، هستند. هرچند انتظار می‌رود پس از احیا شدن و اصلاح گرافن اکسید، شدت نوارهایی که مربوط به گروه‌های اکسیژنی است، کاهش یابد. در اثر احیا شدن گرافن اکسید، نوارهای جدیدی در اعداد موجی ۳۴۶۰، ۳۳۴۰، ۱۵۳۸، ۱۱۷۸ و  $733\text{ cm}^{-1}$  به وجود می‌آید که به ترتیب نشان‌دهنده پیوندهای  $\text{C}-\text{NH}_2$ ،  $\text{N}-\text{H}$ ،  $\text{C}-\text{N}$  و جابجایی ارتعاشی  $\text{N}-\text{H}$  است. CNT یک نوار ضعیف در  $1070\text{ cm}^{-1}$  و یک نوار قوی در  $3430\text{ cm}^{-1}$  به خاطر کشش  $\text{C}-\text{O}$  و جابجایی ارتعاشی  $\text{O}-\text{H}$  نشان می‌دهد. پس از پیوند





واکنش) به دست آمد. با توجه به تاثیر نامطلوب غلظت های بالاتر بر شفافیت محیط سنجش فعالیت و ایجاد اختلال در طیف جذبی، از این غلظت ها صرف نظر شد. همچنین بررسی تغییرات جذب در گستره‌ی دمایی ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد (با فاصله دمایی ۵ درجه سانتیگراد) (شکل ۴-ج) نشان داد این نانوذره رفتاری مشابه با برخی نانوجندسازه های بر پایه ی گرافن (Cu- Ag/rGO و Nitrogen-doped graphene quantum dots) [۲۹, ۳۱] دارد و دمای بهینه فعالیت آن ۳۵ °C به دست آمد. بنابراین برای اکسایش کاتالیستی TMB با نانوذره‌ی GO/PPD/MWCNT، غلظت مناسب کاتالیست نیم میلی گرم بر میلی لیتر در حجم واکنش، pH بهینه ۳ و دمای بهینه، ۳۵ درجه سانتیگراد است. نانوذره‌ی GO/PPD/MWCNT در دامنه pH ۲ تا ۶ و گستره‌ی وسیع دمایی ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد فعالیت کاتالیستی نشان داد، در حالیکه پراکسیداز طبیعی (HRP)، در pH های پایین تر از ۳ و دماهای بالای ۵۰ درجه سانتیگراد، غیرفعال شده و فعالیت کاتالیستی خود را تا حد زیادی از دست می دهد [۳۲]. بنابراین، پایداری کاتالیستی نانوذره‌ی GO/PPD/MWCNT در بازه ی وسیع دما و pH، باعث برتری آن بر آنزیم پراکسیداز طبیعی و بکارگیری آن در زمینه‌های متفاوت کاربردی می شود.

چنددیواره عامل دار شده با عامل های کربوکسیلیک به این ساختار احیا شده، افزون بر افزایش انتقال الکترون، جایگاه های فعال بیشتر و در نتیجه واکنش پذیری و فعالیت شیمیایی بالاتری برای GO/PPD/MWCNT در مقایسه با دو نانوذره‌ی دیگر فراهم می کند [۲۴]. بنابراین در این مطالعه از بین نانوذرات مورد بررسی، اکسید گرافن احیاء شده/نانولوله‌ی کربن چند دیواره به عنوان مقلد آنزیمی کارآمد برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

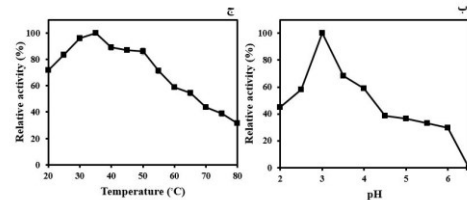
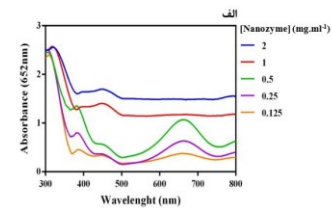


شکل ۳: الف) مکانیزم واکنش GO/PPD/MWCNT کاتالیست کننده‌ی اکسایش TMB در حضور  $H_2O_2$ . ب) طیف جذبی UV-Visible از سیستم های واکنشی متفاوت: (a:  $H_2O_2+TMB$ ) (b:  $GO+H_2O_2+TMB$ ) (c:  $GO/PPD+H_2O_2+TMB$ ) (d:  $GO/PPD+H_2O_2+TMB$ ) که به مدت سه دقیقه در بافر سدیم استات انکوبه شدند.

### ۳-۳- بهینه سازی شرایط واکنش

فعالیت نانوزایم های شبه پراکسیدازی، همانند آنزیم پراکسیداز طبیعی وابسته به فاکتورهایی مثل pH، دما و غلظت کاتالیست است [۲۹]. مطابق شکل ۴-الف، بررسی تغییرات جذب در pH های متفاوت نشان داد نانوزایم مورد مطالعه فعالیت کاتالیستی وابسته به pH دارد، بنابراین، برای بهینه سازی شرایط واکنش، وابستگی به pH در محلول های بافری با pH های متفاوت از ۲ تا ۵/۶ بررسی شد. همانند بسیاری از نانوزایم های گزارش شده [۳۰, ۳۱]، pH بهینه فعالیت GO/PPD/MWCNT، به دست آمد. همانطور که پیش بینی می شد، نتایج شکل ۴-ب نشان داد فعالیت نانوذره متاثر از غلظت آن است و مناسب ترین غلظت برای انجام تست های بعدی، نیم میلی گرم بر میلی لیتر (در حجم

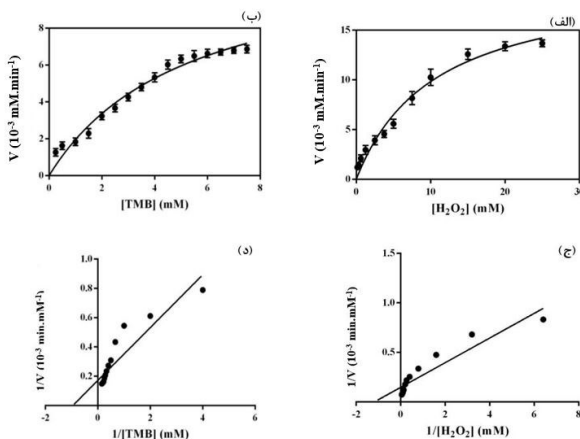
$H_2O_2$  باشد که نیاز به غلظت به نسبت بالا از TMB را برای آزمایشات توجیه می‌کند [۳۴]. با توجه به مطالعات پیشین، استنباط شد که انتقال الکترون از گرافن به  $H_2O_2$  اتفاق می‌افتد، همچنین، مولکول TMB با گروه‌های کربوکسیلیک بر سطوح GO/PPD/MWCNT، که به عنوان جایگاه‌های اتصال پیش ماده عمل می‌کنند، میانکنش هیدروفوبیک و  $\pi-\pi$  برقرار کرده و جفت الکترون گروه‌های آمینو را به GO/PPD/MWCNT می‌دهد. افزایش چگالی و تحرک الکترون در نانوذره ی گرافنی باعث می‌شود انتقال الکترون از نانوزایم به  $H_2O_2$  تسریع شده و در نتیجه کاهش  $H_2O_2$  به  $H_2O$  تحت شرایط pH اسیدی اتفاق می‌افتد و سرعت واکنش اکسایش TMB به وسیله  $H_2O_2$  افزایش می‌یابد [۱۸].  $V_{max}$  نانوذره ی GO/PPD/MWCNT نسبت به پیش ماده‌های  $H_2O_2$  و TMB به ترتیب  $10^{-8} \times 1/1$  مولار بر ثانیه و  $10^{-8} \times 9/9$  مولار بر ثانیه به دست آمد.



شکل ۴: وابستگی تغییرات جذبی ناشی از فعالیت شبه پراکسیدازی نانوذرات GO/PPD/MWCNT به: الف) غلظت نانوذره، ب) مقدار pH و ج) دما. آزمایشات مربوط به pH و دما با استفاده از یک میلی گرم بر میلی لیتر GO/PPD/MWCNT، ۱۳۵ میکرولیتر از  $H_2O_2$  ۸۰ میلی مولار و TMB ۵ میلی مولار انجام شد.

### ۳-۴ پارامترهای سینتیکی فعالیت کاتالیستی GO/PPD/MWCNT

در شرایط بهینه فعالیت، با تغییر غلظت یک پیش ماده و ثابت نگه داشتن غلظت پیش ماده‌ی دیگر، رفتار سینتیکی نانوزایم نسبت به هر دو پیش ماده‌ی  $H_2O_2$  و TMB بررسی و مشخص شد نانوذره از سینتیک میکائلیس-متن پیروی می‌کند. منحنی‌های میکائیلیس-متن مطابق شکل‌های ۵-الف و ۵-ب به دست آمدند و پارامترهای سینتیکی steady-state، ثابت میکائیلیس-متن ( $K_m$ ) و ماکزیمم سرعت واکنش ( $V_m$ ) از نمودارهای لاین ویور-برک (شکل‌های ۵-ج و ۵-د) محاسبه و در جدول ۱ ارائه شد. جالب اینکه همانند آنزیم طبیعی، فعالیت کاتالیستیک GO/PPD/MWCNT نیز در غلظت‌های بالای  $H_2O_2$  مهار می‌شود.  $K_m$  شاخص بررسی تمایل آنزیم به پیش ماده‌ست و هرچه مقدار آن کوچکتر باشد، تمایل آنزیم به پیش ماده بیشتر است [۳۳]. مقدار  $K_m$  نانوذره‌ی GO/PPD/MWCNT با  $H_2O_2$  به عنوان پیش ماده،  $0/96$  میلی مولار به دست آمد که خیلی پایین تر از مقدار گزارش شده برای آنزیم HRP طبیعی ( $3/7$  میلی مولار) و برخی نانوزایم‌ها بود (جدول ۱). با این وجود، مقدار  $K_m$  برای پیش ماده‌ی TMB از HRP بالاتر بود که نشان دهنده‌ی تمایل کمتر برای اتصال به پیش ماده‌ی TMB است. تمایل کمتر به TMB ممکن است ناشی از وجود و در دسترس بودن جایگاه‌های فعال بیشتر برای



شکل ۵: آنالیزهای سینتیکی steady-state واکنش کاتالیز شده به وسیله GO/PPD/MWCNT. سرعت واکنش (V) به وسیله یک میلی گرم بر میلی لیتر GO/PPD/MWCNT و با استفاده از بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۳) در دمای اتاق محاسبه شد. الف) غلظت TMB ۵ میلی مولار و غلظت  $H_2O_2$  متنوع بود. ب) غلظت  $H_2O_2$  ۸۰ میلی مولار و غلظت TMB متنوع بود. ج و د) نمودارهای Double reciprocal با یک غلظت ثابت از یک پیش ماده (TMB یا  $H_2O_2$ ) و غلظت‌های متنوع از پیش ماده‌ی دیگر.

جدول ۱: مقایسه ی پارامتر سینتیکی  $K_m$  مقلدهای آنزیمی متنوع.

Catalyst	Substrate	$K_m$ [mM]	Ref.
GO/PPD/MWCNT	TMB	1.1	This work
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.96	
HRP	TMB	0.434	[۲۵]
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.7	
GO-Au NCs	TMB	0.16	[۲۶]
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	142.39	
Pt NPs/GO	TMB	0.18	[۲۷]
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	221.4	
PtPd NAs/GNs	TMB	0.33	[۲۸]
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.67	

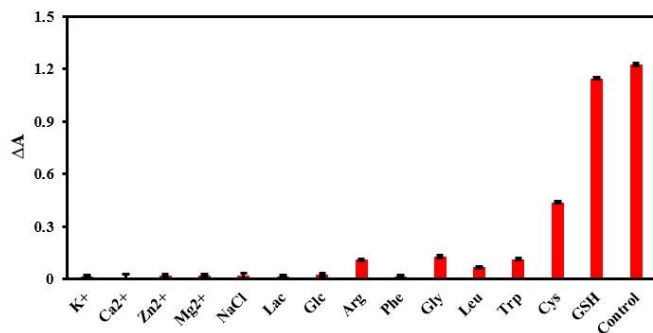
### ۳-۵- سنجش گلوپتایون با استفاده از سیستم GO/PPD/MWCNT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB

در سال ۲۰۱۸ Chen و همکارانش، با طراحی یک حسگر رنگ سنجی بر پایه نانوجندسازه های Sulfide های GO/montmorillonite/Ni، توانستند مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و GSH را به ترتیب با گستره تشخیص ۹/۷۳ و ۰/۵۰۴۳ میکرومولار اندازه گیری کنند [۳۵]. همچنین Li و Yang، گرافن کوانتوم دات های (GQDs) را سنتز کردند که فعالیت شبه پراکسیدازی ذاتی آن ها جهت شناسایی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، گلوکز و گلوپتایون به ترتیب با حد تشخیص ۱۰ نانومولار، ۰/۵ میکرومولار و ۰/۵ میکرومولار به کار گرفته شد. فعالیت کاتالیستی نسبتا بالای GQDs در مقایسه با GO به سرعت انتشار بالا و توانایی آن ها در ترکیب موثر مولکول های زیستی نسبت داده شد [۳۶]. در پژوهش حاضر، نیز بر اساس توانایی گلوپتایون در حذف رادیکال های آزاد تولید شده طی اکسایش TMB، اثر مهاری گلوپتایون بر اکسایش TMB و همچنین، رقابت این مولکول با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [۲۳]، روش سنجش گلوپتایون با استفاده از سیستم رنگ سنجی GO/PPD/MWCNT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB ارائه شد. همانطور که در شکل ۶-الف نشان داده شده است، با افزایش غلظت گلوپتایون، جذب در ۶۵۲ نانومتر به تدریج کاهش می یابد، به طوری که در غلظت ۶۲۵ میکرومولار گلوپتایون سیستم واکنش تقریبا بی رنگ می شود که به آسانی با چشم غیرمسلح نیز قابل تشخیص است. طبق آنالیز زتا پتانسیل و مطالعات پیشین، مجموع بارهای سطحی نانوذره منفی است و پیشنهاد می شود گروه های کربوکسیل به عنوان یک پذیرنده عمل می کنند. مولکول های H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بر سطح GO/PPD/MWCNT جذب می شوند و پیوند O-O در H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> شکسته می شود. در واقع گروه های کربوکسیل به عنوان منبع پروتون سازی عمل کرده و طی پروتونه شدن، دو رادیکال

هیدروکسیل تولید می شود [۱۴]. رادیکال های •OH به شدت اکسیداتیو هستند و می توانند به آسانی TMB بی رنگ را به فرم اکسید شده ی آبی رنگ تبدیل کرده که در نتیجه ی این واکنش پیک جذبی قوی در ۶۵۲ نانومتر به دست می آید. گلوپتایون با دارا بودن گروه های عملکردی متنوع از جمله کربنیل، آمین و تیول، خاصیت نوکلئوفیلی دارد و به سرعت با رادیکال های آزاد وارد واکنش می شود و به عنوان یک عامل احیاکننده ی قوی هم می تواند رادیکال های •OH حاصل از تجزیه ی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را برای اکسایش TMB از بین ببرد و هم می تواند فرم اکسید TMB را به حالت اولیه برگرداند [۹، ۲۱، ۳۰، ۳۷-۳۹]. دامنه ی تشخیصی گلوپتایون ۶۲/۵ تا ۶۲۵ میکرومولار و حد تشخیص (LOD) ۰/۱۵ میلی مولار به دست آمد (شکل ۶-ج). این نتایج نشان داد، مهار فعالیت کاتالیستی نانوذره ی GO/PPD/MWCNT که وابسته به غلظت گلوپتایون است، استراتژی مناسبی برای بررسی گلوپتایون در نمونه های زیستی است. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، اگرچه در مقایسه با سایر روش هایی که برای شناسایی گلوپتایون به کار گرفته شده اند از جمله روش های کروماتوگرافی، فلورسنس، الکتروشیمی، طیف سنجی و همچنین، روش های رنگ سنجی مشابه [۲۱]، روش رنگ سنجی ارائه شده گستره ی شناسایی بالاتری دارد، اما طبق مطالعات انجام شده با اعمال یکسری اصلاحات از جمله افزودن ترکیبات آلی مثل کوئینون [۴۰]، متالوپروتئین ها [۴۱] یا نانوذرات فلزی [۴۲] به ساختار گرافنی مورد مطالعه می توان فعالیت کاتالیستی آن را افزایش داد و با توجه به زمان انجام آزمایش و سهولت آماده سازی مواد، هزینه کم و حساسیت، روش ارائه شده می تواند به عنوان یک سیستم شناسایی مناسب با سایر روش ها قابل رقابت باشد.



کند، اما با توجه به قدرت آنتی اکسیدانی بسیار بیشتر GSH نسبت به سیستئین و نیز غلظت دو برابری سیستئین نسبت به گلوتاتیون در این آزمون، تاثیر آن در بررسی گلوتاتیون قابل چشم پوشی است. در گزارش های مشابه نیز از اثر تداخلی سیستئین با این روش شناسایی صرفنظر کرده اند [۳۹]. بنابراین سیستم شناسایی ارائه شده حساسیت بالایی برای تشخیص گلوتاتیون دارد و روش کاندیدای ارزان، ساده و مناسبی برای آنالیز گلوتاتیون در صنایع غذایی، داروسازی و غیره است.



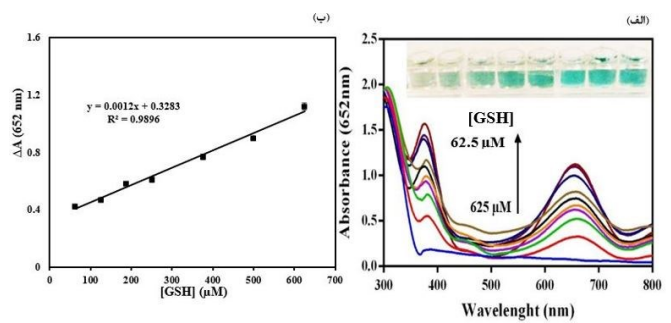
شکل ۷: اختصاصیت روش ارائه شده برای سنجش گلوتاتیون در برابر چندین ماده ی مداخله گر.

### ۷-۳- کاربرد در کنترل کیفیت نمونه ی کپسول گلوتاتیون

امکان استفاده از این سیستم سنجش، به عنوان روشی برای کنترل کیفیت گلوتاتیون در داروها، بررسی شد. براساس جدول ۳ بازایی گلوتاتیون از نمونه ها در گستره ی ۹۹/۳-۹۹/۶ درصد با مقادیر انحراف معیار نسبی ۱/۳۱-۱/۷۷ درصد بود، که نشان داد این سیستم شناسایی جهت کنترل کیفیت گلوتاتیون در آماده سازی داروها قابل اعتماد و دقیق است. نتایج به دست آمده با نتایج سایر مطالعات مشابه قابل مقایسه است [۳۹، ۱۱].

جدول ۳: سنجش گلوتاتیون در نمونه های کپسول تجاری (۳ رقت).

Sample	GSH detected (μM)	GSH found after spike (μM)	Recovery (%)	RSD(%)
1	75.0	124.6	99.6	1.77
2	150.0	198.6	99.3	1.75
3	230.0	278.3	99.3	1.31



شکل ۶: الف) تغییرات طیف UV-Visible محلول های

شکل ۶: الف) تغییرات طیف UV-Visible محلول های GO/PPD/MWCNT+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+TMB در غلظت های متفاوت از گلوتاتیون. ب) نمودار کالیبراسیون خطی شناسایی گلوتاتیون. آزمایشات در بافر سدیم استات ۱۰۰ میلی مولار (PH=۳) و دمای ۳۵ درجه ی سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. غلظت TMB، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و GO/PPD/MWCNT به ترتیب ۳ میلی مولار، ۵ میلی مولار و یک میلی گرم بر میلی لیتر بود.

جدول ۲: مقایسه ی گستره ی خطی و حد تشخیص GSH با استفاده از روش های سنجشی متفاوت.

Sensing system	Methods	Linear range (μM)	Detection limit (μM)	Ref.
MoS <sub>2</sub> /polyaniline	Fluorescence	60-700	25	[۲۲]
erythrocyte-like Cu <sub>1.8</sub> S	Colorimetry	500-10000	60	[۲۳]
MPA-Mn-ZnS QDs-KMnO <sub>4</sub>	Phosphorimetry	0.30-280	0.097	[۲۴]
Mesoporous carbon	Electrochemistry	0-5000	0.09	[۲۸]
CBT-Cys (SEI)	UV spectra	0-87	1.0	[۲۹]
GO-PPD/MW CNT	Colorimetry	62.5-625	150	This work

### ۶-۳- اختصاصیت سیستم شناسایی نسبت به گلوتاتیون

برای بررسی اختصاصیت این سیستم شناسایی نسبت به گلوتاتیون، اثر چندین ماده ی احتمالی مداخله گر از اجزای معمول در آماده سازی دارویی از جمله NaCl، لاکتوز و گلوکز، تحت شرایط بهینه ی آزمایشگاهی بررسی شد. روش سنجش گلوتاتیون بر برخی از آمینواسیدها، مثل فنیل آلانین، گلیسین، لوسین، تریپتوفان، آرژنین، سیستئین و کاتیون هایی مثل K<sup>+</sup>، Ca<sup>2+</sup>، Zn<sup>2+</sup>، Mg<sup>2+</sup>، به عنوان مداخله گر و جهت کنترل اختصاصیت سنجش گلوتاتیون مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، تغییرات شدت جذب با غلظت های دو برابر ترکیبات مداخله گر نشان داد سایر ترکیبات (به جز سیستئین) تاثیر بسیار ناچیزی بر واکنش کاتالیستی اکسایش TMB دارند و از بین آمینواسیدها تنها سیستئین منجر به تغییر رنگ و کاهش جذب در سیستم واکنش می شود. اگرچه ممکن است حضور سیستئین، به واسطه ی داشتن گروه تیول و ویژگی های شیمیایی مشابه گلوتاتیون در شناسایی GSH تداخل ایجاد

## ۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، نانوذره‌ی جدید GO/PPD/MWCNT به روش شیمیایی سنتز شد که در مقایسه با اجزای سازنده اش و برخی از سایر نانوذرات بر پایه گرافن فعالیت شبه پراکسیدازی ذاتی مطلوب تری نشان داد. مطالعه‌ی مکانیسم فعالیت کاتالیستی GO/PPD/MWCNT گویای فعالیت شبه پراکسیدازی آن مطابق سینتیک میکائلیس-منتن بود و نانوساختارهای GO/PPD/MWCNT تمایل بالاتری برای  $H_2O_2$  در مقایسه با HRP نشان دادند. بر اساس این ویژگی‌ها، از نانوساختارهای GO/PPD/MWCNT به عنوان یک مقلد پراکسیداز جدید برای شناسایی گلوکاتایون استفاده شد. با تکیه بر توانایی گلوکاتایون در حذف گونه‌های فعال اکسیژن و مهار فعالیت شبه پراکسیدازی نانوزایم در سیستم TMB- $H_2O_2$ -GO/PPD/MWCNT، یک روش رنگ سنجی ساده، حساس و انتخابی، طراحی و با موفقیت در راستای سنجش گلوکاتایون در کپسول‌های تجاری استفاده شد.

## مراجع

- [6] G.L. Wang, X.F. Xu, L. Qiu, Y.-M. Dong, Z.-J. Li, and C. Zhang, "Dual responsive enzyme mimicking activity of AgX (X= Cl, Br, I) nanoparticles and its application for cancer cell detection," *ACS applied materials & interfaces*, 6, 6434-6442, 2014.
- [7] H. Sun, A. Zhao, N. Gao, K. Li, J. Ren, and X. Qu, "Deciphering a nanocarbon-based artificial peroxidase: chemical identification of the catalytically active and substrate-binding sites on graphene quantum dots," *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 7176-7180, 2015.
- [8] R. Li *et al.*, "A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C60-carboxyfullerenes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 47, pp. 502-507, 2013.
- [9] H.H. Xu *et al.*, "Colorimetric glutathione assay based on the peroxidase-like activity of a nanocomposite consisting of platinum nanoparticles and graphene oxide," *Microchimica Acta*, 184, 3945-3951, 2017.
- [10] R. T. Zon, C. Nichols, and L.H. Einhorn, "Management strategies and outcomes of germ cell tumor patients with very high human chorionic gonadotropin levels," *Journal of clinical oncology*, 16, 1294-1297, 1998.
- [11] N. Zhang, W. Ma, D. Han, L. Wang, and T. Wu, "The fluorescence detection of glutathione by  $\cdot OH$  radicals' elimination with catalyst of  $MoS_2/rGO$  under full spectrum visible light irradiation," *Talanta*, 144, 551-558, 2015.
- [12] V. Georgakilas *et al.*, "Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications," *Chemical reviews*, 116, 5464-5519, 2016.
- [13] C.I. Justino, A.R. Gomes, A. C. Freitas, A. C. Duarte, and T.A. Rocha-Santos, "Graphene based sensors and biosensors," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 53-66, 2017.
- [14] G. Luque, M. Rojas, G. Rivas, and E. Leiva, "The origin of the catalysis of hydrogen peroxide reduction by functionalized graphene surfaces: A density
- [1] Y. Lin, J. Ren, and X. Qu, "Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes," *Accounts of chemical research*, 47, 1097-1105, 2014.
- [2] K. Cai *et al.*, "Aqueous synthesis of porous platinum nanotubes at room temperature and their intrinsic peroxidase-like activity," *Chemical Communications*, 49, 6024-6026, 2013.
- [3] Y. J. Long, Y. F. Li, Y. Liu, J. J. Zheng, J. Tang, and C. Z. Huang, "Visual observation of the mercury-stimulated peroxidase mimetic activity of gold nanoparticles," *Chemical Communications*, 47, 11939-11941, 2011.
- [4] A.L. Hu *et al.*, "Fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glucose and l-lactate detection," *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 374-378, 2014.
- [5] H. Peng *et al.*, "Fabrication and multifunctional properties of ultrasmall water-soluble tungsten oxide quantum dots," *Chemical Communications*, 52, 9534-9537, 2016.

- nanozymes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 199, 463-469, 2014.
- [24] J. Qian, X. Yang, Z. Yang, G. Zhu, H. Mao, and K. Wang, "Multiwalled carbon nanotube@ reduced graphene oxide nanoribbon heterostructure: synthesis, intrinsic peroxidase-like catalytic activity, and its application in colorimetric biosensing," *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 1624-1632, 2015.
- [25] C. J. Murray *et al.*, "Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition," *The Lancet*, 386, 2145-2191, 2015.
- [26] M. Kotal and A. K. Bhowmick, "Multifunctional hybrid materials based on carbon nanotube chemically bonded to reduced graphene oxide," *The Journal of Physical Chemistry C*, 117, 25865-25875, 2013.
- [27] Q. Chen, C. Liang, X. Zhang, and Y. Huang, "High oxidase-mimic activity of Fe nanoparticles embedded in an N-rich porous carbon and their application for sensing of dopamine," *Talanta*, 182, 476-483, 2018.
- [28] A. Hussein, S. Sarkar, D. Oh, K. Lee, and B. Kim, "Epoxy/p - phenylenediamine functionalized graphene oxide composites and evaluation of their fracture toughness and tensile properties," *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 13-21, 2016.
- [29] G. Darabdhara, B. Sharma, M.R. Das, R. Boukherroub, and S. Szunerits, "Cu-Ag bimetallic nanoparticles on reduced graphene oxide nanosheets as peroxidase mimic for glucose and ascorbic acid detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 238, pp. 842-851, 2017.
- [30] W. Yang, J. Hao, Z. Zhang, and B. Zhang, "PB@ Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as both oxidase and peroxidase mimics and their application for colorimetric detection of glutathione," *New Journal of Chemistry*, 39, 8802-8806, 2015.
- [31] L. Liu, B. Du, C. Shang, J. Wang, and E. Wang, "Construction of surface charge-functional theory study," *Electrochimica Acta*, 56, 523-530, 2010.
- [15] J. Sun, C. Li, Y. Qi, S. Guo, and X. Liang, "Optimizing colorimetric assay based on V2O5 nanozymes for sensitive detection of H2O2 and glucose," *Sensors*, vol. 16, no. 4, p. 584, 2016.
- [16] S. Stankovich *et al.*, "Graphene-based composite materials," *nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282-286, 2006.
- [17] Y. Song, X. Wang, C. Zhao, K. Qu, J. Ren, and X. Qu, "Label - free colorimetric detection of single nucleotide polymorphism by using single - walled carbon nanotube intrinsic peroxidase-like activity," *Chemistry–A European Journal*, 16, 3617-3621, 2010.
- [18] Y. Song, K. Qu, C. Zhao, J. Ren, and X. Qu, "Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection," *Advanced Materials*, 22, 2206-2210, 2010.
- [19] Y.-l. Dong *et al.*, "Graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposites with peroxidase-like activity for colorimetric detection of glucose," *Nanoscale*, 4, 3969-3976, 2012.
- [20] H. Wei and E. Wang, "Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes," *Chemical Society Reviews*, vol. 42, no. 14, pp. 6060-6093, 2013.
- [21] J. Feng, P. Huang, S. Shi, K.Y. Deng, and F.-Y. Wu, "Colorimetric detection of glutathione in cells based on peroxidase-like activity of gold nanoclusters: a promising powerful tool for identifying cancer cells," *Analytica chimica acta*, 967, 64-69, 2017.
- [22] J.F. Li, P.C. Huang, and F.Y. Wu, "Specific pH effect for selective colorimetric assay of glutathione using anti-aggregation of label-free gold nanoparticles," *RSC Advances*, 7, 13426-13432, 2017.
- [23] M. Shamsipur, A. Safavi, and Z. Mohammadpour, "Indirect colorimetric detection of glutathione based on its radical restoration ability using carbon nanodots as

- erythrocyte-like Cu 1.8 S nanoparticles in the colorimetric determination of glutathione," *Analytical Methods*, vol. 9, no. 5, pp. 841-846, 2017.
- [40] G. Liu *et al.*, "Quinone-mediated microbial synthesis of reduced graphene oxide with peroxidase-like activity," *Bioresource technology*, 149, 503-508, 2013.
- [41] Y. Guo, J. Li, and S. Dong, "Hemin functionalized graphene nanosheets-based dual biosensor platforms for hydrogen peroxide and glucose," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160, 295-300, 2011.
- [42] S. Bi, T. Zhao, X. Jia, and P. He, "Magnetic graphene oxide-supported hemin as peroxidase probe for sensitive detection of thiols in extracts of cancer cells," *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 110-116, 2014.
- controlled reduced graphene oxide-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Pt nanohybrid for peroxidase mimic with enhanced catalytic activity," *Analytica chimica acta*, 1014, 77-84, 2018.
- [32] S. Cai *et al.*, "Pt 74 Ag 26 nanoparticle-decorated ultrathin MoS<sub>2</sub> nanosheets as novel peroxidase mimics for highly selective colorimetric detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose," *Nanoscale*, 8, 3685-3693, 2016.
- [33] Y.W. Bao, X.W. Hua, H.H. Ran, J. Zeng, and F.G. Wu, "Metal-doped carbon nanoparticles with intrinsic peroxidase-like activity for colorimetric detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose," *Journal of Materials Chemistry B*, 7, 296-304, 2019.
- [34] M. Chen *et al.*, "FePt nanoparticles-decorated graphene oxide nanosheets as enhanced peroxidase mimics for sensitive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>," *Materials Science and Engineering: C*, 90, 610-620, 2018.
- [35] M. Chen *et al.*, "Novel synthesis of NiS/MMT/GO nanocomposites with enhanced peroxidase-like activity for sensitive colorimetric detection of glutathione in solution," *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 1, 612-623, 2018.
- [36] A.X. Zheng, Z.X. Cong, J.-R. Wang, J. Li, H.-H. Yang, and G.-N. Chen, "Highly-efficient peroxidase-like catalytic activity of graphene dots for biosensing," *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 519-524, 2013.
- [37] M. Chi, S. Chen, M. Zhong, C. Wang, and X. Lu, "Self-templated fabrication of FeMnO<sub>3</sub> nanoparticle-filled polypyrrole nanotubes for peroxidase mimicking with a synergistic effect and their sensitive colorimetric detection of glutathione," *Chemical communications*, 54, 5827-5830, 2018.
- [38] Q. Zhong, Y. Chen, A. Su, and Y. Wang, "Synthesis of catalytically active carbon quantum dots and its application for colorimetric detection of glutathione," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 273, 1098-1102, 2018.
- [39] H. Zou, T. Yang, J. Lan, and C. Huang, "Use of the peroxidase mimetic activity of



# Kinetic properties of a novel graphene/carbon-based peroxidase mimic nanozyme and its application for detection of glutathione in drugs

Jahandar Shamami, N.<sup>1</sup> | Shahangiyan, S.SH<sup>\*1</sup> | S.Afghahi, S.S.<sup>2</sup> | Salarizadeh, N.<sup>3</sup> | Zamani, H.<sup>1</sup>

1-Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

2-Department of Engineering, Faculty of Materials Science and Engineering, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3-School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

**Abstract:** Due to the importance of the improvement of graphene oxide characteristics and wide applications of nanozymes in various fields such as pharmaceutical industry, here, a reduced graphene oxide/multi-walled carbon nanotube nanocomposite was synthesized and after evaluating its peroxidase-like activity, a simple, fast, and practical colorimetric method was developed to detect glutathione in commercial capsules. The nanocomposite exhibited good peroxidase mimic activity, as its affinity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was higher when compared with natural peroxidase enzyme. The nanozyme followed Michaelis-Menten kinetics and its catalytic activity was dependent on pH, temperature, and concentration of the catalyst. Due to the ability of glutathione to remove reactive oxygen species and consequently inhibition of peroxidase-like activity, a colorimetric sensor was designed for detection of glutathione with a linear range of 62.5 to 625 μM and detection limit of 0.15 mM. The colorimetric method was successfully used to measure glutathione in commercial capsule.

**Keywords:** Nanozyme, Peroxidase-mimic activity, Colorimetric detection, Glutathione capsule.