

## Development of a pH Nano-sensor based on Electrochemical Impedance Spectroscopy in Order to Use in Rumen Monitoring System

EARAJ BAGVAND<sup>1</sup>, MAHMOUD OMID<sup>1\*</sup>, TAHER ALIZADEH<sup>2</sup>, HOSSEIN MOUSAZADEH<sup>1</sup>

1. Mechanics of Biosystem Engineering minor in Agriculture Machinery Design, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran.

2. Professor, Department of Electrochemistry, Faculty of Chemistry, University of Tehran, Iran.

(Received: Jan. 11, 2020- Revised: Feb. 4, 2020- Accepted: March. 7, 2020)

### ABSTRACT

It is necessary to use methods to monitor the pH of the rumen and maintain it between 5.5 and 7. In this research, a pH Nano-sensor based on EIS technique was developed and assessed in order to be used in wireless monitoring system of rumen pH. Single-Wall Carbon Nanotubes were functionalized with carboxylic groups (COOH), also with Amin groups (NHRNH<sub>2</sub>). Then interdigitated chrome-gold electrodes were coated by a drop of the solution obtained from dispersing with a known ratio of COOH-SWNT and Amin-SWNT in PECH/THF solution. Finally, the developed electrode was used as working electrode in EIS experiments over the laboratorial and real (rumen liquid) samples in the form of buffer solutions, adjusted at various pH values. Each experiment was done by applying AC voltages of 20 mV with frequencies ranging from 0.1Hz to 1MHz. Results showed that the developed electrode was pH sensitive and for real samples, impedance modulus,  $|Z|$ , linearly increased with pH (Freq.=0.4kHz,  $R^2 = 0.99$ ).

**Keywords:** Acidosis, Rumen pH, pH Nano-sensor, Single-Wall Carbon Nanotube, Impedance Spectroscopy.

## ساخت و ارزیابی یک نانوحسگر pH مبتنی بر روش طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی به منظور استفاده در سامانه پایش شکمبه گاو

ایرج بگوند<sup>۱</sup>، محمود امید<sup>۱\*</sup>، طاهر علیزاده<sup>۲</sup>، حسین موسی‌زاده<sup>۱</sup>

۱. گروه مهندسی مکانیک ماشینهای کشاورزی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. گروه الکتروشمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۱ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۱/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۲/۱۷

### چکیده

بکارگیری روش‌هایی برای پایش pH شکمبه و حفظ آن بین ۵/۵ تا ۷ ضروریست. هدف از این پژوهش، ساخت یک نانوحسگر pH مبتنی بر روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی، EIS، به‌منظور استفاده در سامانه پایش pH شکمبه گاو می‌باشد. نانولوله‌های تک‌دیواره (SWNT) با گروه‌های کربوکسیل (COOH) و نیز، با گروه‌های آمین (NHRNH<sub>2</sub>) عامل‌دار شدند. الکترودهانه‌ای با یک قطره از محلول حاصل از پخش یک نسبت معین از COOH-SWNT و NHRNH<sub>2</sub> در محلول PECH در THF، پوشش داده شده و الکتروده حاصل به عنوان الکتروده کاری در آزمایشات EIS بر روی نمونه‌های آزمایشگاهی و نمونه واقعی (مایع شکمبه‌ای)، که به صورت محلول‌های بافر تنظیم شده در pH های مختلف درآمده بودند، استفاده شد. در نهایت هر آزمایش با اعمال پتانسیل متناوب 20mV (0.1Hz-1MHz) انجام پذیرفت. الکتروده ساخته شده به pH حساس بوده و با افزایش pH، مقدار امپدانس، به‌صورت خطی، برای نمونه‌های واقعی، افزایش  $R^2 = 0.99$  (Freq.= 0.4Hz) یافت.

**واژه‌های کلیدی:** اسیدوز شکمبه‌ای، pH شکمبه‌ای، نانوحسگر pH، نانولوله‌های تک‌دیواره، طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی.

### مقدمه

امروزه، به منظور پایش تغییرات pH شکمبه، ابزاری معروف به بلوس داخل شکمبه‌ای<sup>۱</sup> توسعه یافته و به صورت تجاری توسط چندین شرکت عرضه شده است. این ابزار با قرار گرفتن درون شکمبه از طریق دهان، اطلاعات pH شکمبه را به صورت بی‌سیم به یک گیرنده خارجی ارسال می‌کند (Sato et al., 2012; Phillips et al., 2010). بلوس به همراه واحدگیرنده و واحد پردازشگر اطلاعات دریافتی، تشکیل یک سامانه پایش بی‌سیم pH شکمبه را می‌دهند. بلوس‌های مورد استفاده در کشور وارداتی و گران بوده و استفاده از آن‌ها برای دامداران مقرون به صرفه نمی‌باشد. جزء حسگری pH در بلوس‌های pH موجود، غالباً بر اساس فناوری قدیمی الکترودهای شیشه‌ای<sup>۲</sup> یا فناوری ترانزیستورهای اثرمیدان یون‌گزینه‌ای<sup>۳</sup> (ISFET) کار می‌کند که این فناوری‌ها دارای معایبی چون نیاز به ساختمان پیچیده، نیاز به الکتروده مرجع<sup>۴</sup> و طول عمر کوتاه می‌باشند (Gou et al.,

اسیدوز تحت حاد<sup>۱</sup> که در منابع به اختصار SARA خوانده می‌شود، به دوره‌هایی از کاهش ملایم pH شکمبه، از 5.5pH تا 5pH اطلاق می‌شود (Mottram et al., 2008; Krause et al., 2006). با وجود اینکه SARA درمقایسه با اسیدوز حاد، شدت کمتری دارد، اما چون دام مبتلا علائم ظاهری نداشته و تشخیص مبتلایی سخت‌تر است، بیشتر معمول بوده و به واسطه کاهش بازدهی خوراک و تولید شیر، کاهش ماده خشک (چربی و پروتئین) شیر، تحمیل هزینه‌های درمان، تغذیه اضافی، لنگش دام و لزوم تفکیک دام‌های مبتلا و دیگر مشکلات سلامتی دام، خسارت مالی بزرگتری را بر واحد دامپروری تحمیل میکند (Lin et al., 2009). بنابراین مسئله‌ی مقابله با SARA و به تبع پایش pH مایع شکمبه‌ای، همواره برای دامپروران، علی‌الخصوص مدیران گله‌های گاو شیری با تولید بالا مطرح بوده و می‌باشد (Penner et al., 2006).

\* نویسنده مسئول: Omid@ut.ac.ir

1. Sub-Acute Rumen Acidosis  
2. Intraruminal Bolus  
3. Glass Electrodes  
4. Ion-Selective Field Effect Transistors  
5. Reference Electrode

یا بازپخت دارند. چنانکه حسگر pH ساخته شده بر اساس نانولوله-های تک دیواره اکسیدشده (ox-SWNTs) و عامل دار شده با پلیمر هادی آمینوآنتراسن<sup>۴</sup> (PAA)، برای پایش pH اطراف زخم، یک پاسخ نرنستینی روی دامنه وسیعی از pH (۱۲-۲) داشته و حساسیت خود را برای بیش از ۱۲۰ روز حفظ می‌کند (Gou, et al. 2014). این حسگر بی‌سیم و بدون باتری و الکتروود مرجع، پتانسیل استفاده در کاربردهای بیوپزشکی را به عنوان یک حسگر قابل کاشت، نزدیک ایمپلنت های جراحی جهت تشخیص چرک-کردگی را داشت. از معایب ای حسگر پیچیدگی و گران تمام شدن آن (خصوصاً در داخل کشور) است که با برای استفاده در ساختمان بلوس های pH شکمبه ای مناسب به نظر نمی‌رسد.

روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی<sup>۵</sup> که به اختصار EIS یا امپدانس AC نامیده می‌شود، به عنوان روشی قدرتمند، در الکتروشیمی و علم مواد کاربرد فراوانی دارد. در این روش، که محیط الکتروشیمیایی با یک ولتاژ AC بسیار کوچک (که کمترین آشفتگی را در محیط ایجاد می‌کند) با فرکانس های مختلف، تحریک شده و مقادیر امپدانس حقیقی و موهومی به عنوان یک پاسخ الکتریکی با حساسیت و دقت بالا، از سیستم دریافت می‌شود، روشی بسیار مناسب برای ساخت حسگرهای الکتروشیمیایی کوچک، حساس و در عین حال دقیق می‌باشد. این روش توسط محققان برای ساخت حسگرهای pH بکار رفته است. Manjakka et al. (2016) مکانیزم حسگری pH حسگرهای غشای ضخیم RuO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> را با استفاده از طیف‌سنجی فوتوالکترون اشعه ایکس (XPS) و EIS بررسی کردند. مطالعات XPS حضور یون های Ru در حالت‌های مختلف اکسیداسیون و افزایش هیدروکسیل دهی سطح لایه ی حسگری را با افزایش pH آشکار کردند. آنالیزهای EIS اجرا شده در محدوده فرکانسی 10Hz-2MHz نشان داد که پارامترهای الکتریکی الکتروودهای حساس در محدوده فرکانسی پایین به طور واضح به pH بستگی دارد. انتقال بار و معاوضه یونی، که در سطح مشترک محلول-اکسید فلزی رخ می‌دهد، به عنوان فرایندهایی که مسبب مکانیزم حسگری حسگرهای pH غشاهای ضخیم RuO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> هستند، نشان داده شدند. Folkertsma, et. al. (2018) هم یک حسگر بدون الکتروود مرجع را، با قابلیت اندازه‌گیری هم pH و هم هدایت الکتریکی، ساخته شده از لایه‌ای از اکسید فلزی ایندیم-قلع و مبتنی بر EIS، ارائه کردند. بررسی آنها نشان داد که در فرکانس-های پایین، امپدانس الکتروود به ظرفیت دولایه ای آن بستگی دارد

(Liu et al., 2016; Song et al., 2012; 2014). استفاده از روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی<sup>۱</sup> (EIS)، به علت هزینه کم، سهولت کوچک‌سازی و کارکرد بدون برچسب<sup>۲</sup> (Halliwell et al., 2014)، در کنار استفاده از مواد نانوساختار، باتوجه به قابلیت هایی که کاربرد فناوری نانو در ساخت حسگرهای دقیق، کوچک، کم‌مصرف و ارزان دارد، نویدبخش غلبه بر مشکلات استفاده از الکتروود های شیشه‌ای و ISFET ها می‌باشد.

در زمینه حسگرهای اندازه‌گیری pH پژوهش‌های زیادی برای جایگزینی pH مترهای شیشه‌ای قدیمی با حسگرهای مبتنی بر ترانزیستورهای FET، مواد پلیمری و خصوصاً نانوساختارها و یا تلفیقی از آنها در جهت اهدافی همچون افزایش حساسیت، کاهش هرچه بیشتر اندازه، کاهش قیمت، افزایش پایداری و طول عمر صورت گرفته است و این پژوهش‌ها همچنان ادامه دارد. به عنوان مثال تقریباً تمام تحقیقات انجام شده برای توسعه حسگرهای pH، به جهت کاربردهای پزشکی و بیوپزشکی، متمرکز بر استفاده از نانوساختارها می‌باشد و دلیل آن قابلیت بی‌نظیر مواد نانو برای استفاده در ساخت نانوحسگرهای بسیار کوچک و با حساسیت بالا، که در زمینه های مذکور بسیار مهم‌اند، می‌باشد (Song et al., 2007). اگرچه این ویژگی‌ها در کنار توان مصرفی کم، قیمت ارزان و پایداری و استحکام مکانیکی بالا، محققان علوم مختلف را روزه-روز به سمت نانوحسگرها ترغیب می‌کند. مهمترین مزیت بکارگیری مواد نانوساختار در ساخت حسگرها، نسبت بالای سطح به حجم در آنهاست، که منجر به سرعت عکس‌العمل سریع و حساسیت زیاد می‌شود. همچنین استفاده از این مواد دارای مزایایی مثل سهولت کوچک‌سازی، توان مصرفی حداقل و قیمت ارزان به خاطر حجم کم شناساگرهای مورد نیاز می‌باشد. از نانولوله های کربنی<sup>۳</sup> در ساخت حسگرها، از جمله حسگرهای اندازه‌گیری pH به طور متعدد استفاده شده است (Jung et al., 2014). نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره (SWCNTs) به صورت عامل‌دار شده با گروه‌های کربوکسیل، دارای حساسیت به pH می‌باشند. گروه‌های کربوکسیل می‌توانند با یونهای H<sup>+</sup> و OH<sup>-</sup> واکنش داده و منفذها و الکترون‌ها در SWNT ها را تحت تأثیر قرار دهند، که این منجر به تغییرات مقاومت در SWNT ها می‌شود (Liu, et al. 2014; Gou, et al. 2016). و می‌توان یک حسگر pH شیمیزستوری، بدون نیاز به الکتروود مرجع، ساخت. هرچند این کار خود نیاز به فرایندهای پیشرفته و گرانی چون فوتولیتوگرافی

4. Aminoanthracene

5. Electrochemical Impedance Spectroscopy

1. Electrochemical Impedance Spectroscopy

2. Label-free operation

3. Carbon Nanotube

حسگر به تغییرات pH، از روش EIS استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

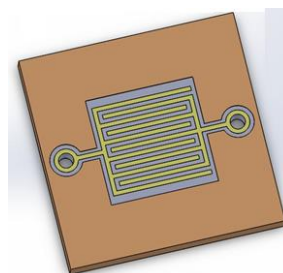
### مواد

نانولوله‌های کربنی تکدیواره (SWCNT)، به صورت بسته‌ای یک گرمی و پلیمرهای PECH (Polyepichlorhydrine) و پلیمر PVC (Polyvinyl chloride) از نمایندگی برند سیگما آلدریج<sup>۱</sup> (Munich, Germany) و سایر مواد عمدتاً از نمایندگی برند مرک<sup>۲</sup> (Darmstadt, Germany)، در تهران خریداری شدند. همچنین، تهیه الکتروده‌های<sup>۳</sup> (شکل ۱- الف) به واسطه سفارش ساخت به یک سازنده در تهران صورت گرفت. مقادیر pH با استفاده از یک pH متر (مدل ۷۸۰، شرکت Metrohm، سوئیس) مجهز به یک الکتروده شیشه‌ای ترکیبی اندازه‌گیری شدند.

و با pH، به علت اصلاح گروه‌های اکسید در سطح ITO تغییر می‌کند. همچنین در فرکانس‌های بالا، امپدانس توسط مقاومت سیستم تعیین می‌شود که با عکس هدایت الکتریکی محلول مطابق است. به علت عدم نیاز به الکتروده مرجع، کوچک‌سازی حسگر pH آسان است. از معایب استفاده از اکسیدهای فلزی در حسگرهای pH، قیمت بالای آن‌هاست (Alizadeh et al., 2015). مقاله حاضر به معرفی یک نانوحسگر pH مبتنی روش EIS به منظور استفاده در سامانه پایش بی‌سیم pH شکمبه می‌پردازد. در این پژوهش نانولوله‌های تکدیواره SWCNT به عنوان مواد نانوساختار در ساخت جزء حسگری انتخاب گردیدند و به‌منظور بهره‌برداری از خواص مطلوب و برجسته مکانیکی و الکتریکی آن‌ها، نانولوله‌ها، ابتدا با گروه‌های کربوکسیل (COOH) و سپس با گروه‌های آمین (NHRNH<sub>2</sub>) عامل‌دار شدند. در نهایت مخلوطی از این دو نوع در ساخت الکتروده کاری حسگر pH بکار رفته و برای بررسی پاسخ‌دهی



(ب)



(الف)

شکل ۱- الف) الکتروده شانه ای، ب) دستگاه اندازه‌گیری امپدانس

SWCNT در محلول ۹:۱ تیونیل کلراید<sup>۴</sup> و دی‌متیل‌فرمامید<sup>۵</sup> (DMF) در دمای ۴۵°C به مدت ۱۰ ساعت روی همزن قرار گرفت. پس از تکمیل واکنش، پودر جدا شده ۵ بار با 5ml تتراهیدروفوران<sup>۶</sup> (THF) شسته شده و تحت خلأ خشک گردید. برای آمین‌دار کردن نانولوله‌ها، پودر خشک شده، ۲۴ ساعت در 15ml محلول دی‌اتیل‌آمین<sup>۷</sup> روی همزن قرار گرفت و در آخر با اتانول شست و شو داده شد (Wang et al., 2005).

### آنالیز و تصویر برداری از نانومواد

به منظور بررسی ریزساختار و ترکیب فازی پودرهای نانولوله عامل‌دار شده، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز<sup>۸</sup> (FTIR)، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۹</sup> (TEM) و آنالیز پراش اشعه ایکس<sup>۱۰</sup> (XRD) به واسطه سفارش به یک آزمایشگاه تخصصی آنالیز مواد (بیم گستر تابان، تهران، ایران) صورت گرفت.

### روشهای شیمیایی

به منظور تهیه نانولوله‌های عامل‌دار شده با گروه‌های کربوکسیل (COOH-SWCNT)، 4mg از SWCNT در 50ml از محلول اسید سولفوریک در اسید نیتریک به نسبت ۱:۳ (۳ واحد اسید سولفوریک و ۱ واحد اسید نیتریک) و 50ml آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آلتراسونیک پخش گردید و سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای 100°C قرار گرفته و در پایان، تا pH خنثی با آب مقطر شسته شد. در نهایت پودر نانولوله‌های تکدیواره عامل‌دار شده با گروه‌های کربوکسیل (COOH-SWCNT) با استفاده از روش سانتریفوژ جمع‌آوری گردید (Ramanathan et al., 2005).

به منظور تهیه نانولوله‌های تکدیواره عامل‌دار شده با گروه‌های آمین (NHRNH<sub>2</sub>-SWCNT)، 4mg از پودر COOH-

6. Tetrahydrofuran  
7. Diethylamine  
8. Fourier Transform Infrared Spectroscopy  
9. Transmission Electronic Microscopy  
10. X-Ray Diffraction

1. Sigma AldrichTR  
2. MerckTR  
3. Interdigitated Electrode  
4. Thionyl Chloride  
5. Dimethylformamide

پایان، با سمپلر (micropipette)، 0.004ml از سوسپانسیون حاصل بر سطح الکتروده خشک قرار داده شد. بعد از تبخیر حلال و خشک شدن سطح الکتروده و ایجاد لایه‌ی نازکی از نانو مواد موردنظر بر سطح الکتروده، الکتروده پوشش داده شده، به عنوان الکتروده کاری، آماده انتقال به سلول الکتروشیمیایی گردید. در واقع، الکتروده کاری ساخته شده، از یک الکتروده شانه‌ای (کروم-طلا) که دو سر پایه (ترمینال) های آن به هم وصل شده و مساحتی برابر  $3.14\text{mm}^2$  از مرکز آن با مواد حساس به pH تهیه شده در مرحله قبل، پوشش داده شده بود، تشکیل می‌گردید. سایر سطوح و اتصالات روی این الکتروده به منظور جلوگیری از تماس با نمونه، با چسب حرارتی پوشانده شد.

#### اندازه گیری امپدانس

آزمایشات طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی با استفاده از یک دستگاه آنالیز الکتروشیمیایی (مدل VERTEX، برند IVEUM™، هلند، شکل ۱-ب)، که قابلیت اندازه گیری امپدانس هم داشت، با ترکیبی از سه الکتروده انجام شد. این آزمایشات با اعمال یک اختلاف پتانسیل الکتروکی AC برابر با 20mV در محدوده‌ی فرکانسی 0.1Hz-1MHz و اختلاف پتانسیل الکتروکی DC معادل 1V، با استفاده از یک سیستم سه الکتروده شامل الکتروده کمکی (گرافیت)، الکتروده مرجع کالومل (Ag/AgCl) و الکتروده کاری (الکتروده ساخته‌شده) صورت گرفت. تمام آزمایشات در دمای اتاق انجام شده و در هر آزمایش، pH نمونه محلول درون سلول، در مقدار معلومی تنظیم شده بود.

#### تهیه نمونه‌های آزمایش

برای آزمون و ارزیابی نانوحسگر ساخته شده، نمونه‌های آزمایشگاهی و نمونه‌های واقعی (نمونه‌هایی که از تنظیم pH مایع شکمبه‌ای بدست آمدند)، در pH های ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷ و ۷/۵ تنظیم شدند. برای تنظیم pH یک محلول، معمولاً از بافرهایی نظیر کربنات و فسفات می‌شود. نقش بافر خنثی نگه‌داشتن pH می‌باشد. از آنجا که بافر کربنات در pH 6.5 خاصیت بافوری داشته و pH آن در محدوده 5.5-7.5 در طول زمان ثابت نمی‌ماند، در این مرحله، برای تنظیم pH نمونه‌های آزمایشگاهی، از بافر فسفات (۰/۰۲ مولار) استفاده شد. در تهیه نمونه‌های واقعی با افزودن مقادیر مختلفی از محلول سود (NaOH) و اسید فسفریک ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) به مایع شکمبه‌ای، نمونه واقعی در pH های مختلف تنظیم شد.

#### ساخت الکتروده کاری<sup>۱</sup>

با تغییر مقدار نسبی COOH-SWCNT و NHRNH<sub>2</sub>-SWCNT بکار رفته در ساخت الکتروده (جدول ۱)، پنج نوع الکتروده کاری ساخته شده و مورد آزمون قرار گرفتند. برای ساخت هر الکتروده کاری، ابتدا سطح الکتروده شانه‌ای (کروم-طلا) به منظور پاک-سازی از هرگونه آلاینده با محلول THF شست‌وشو داده شد. سپس به منظور استفاده از نانولوله‌های عامل‌دار شده به عنوان جزء حسگری، 0.2mg از چسب پلیمری PECH در 1ml از حلال THF حل شده و مقادیر مورد نظر (جدول ۱) از پودرهای تهیه-شده‌ی CNT-COOH و CNT-NHRNH<sub>2</sub> به آن اضافه و محلول حاصل به مدت ۳ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. در

جدول ۱- پنج نوع الکتروده کاری ساخته شده، از نظر مقدار نسبی COOH-SWCNT و NHRNH<sub>2</sub>-SWCNT بکار رفته در ساخت آن‌ها

شماره الکتروده	مقدار COOH-SWCNT (mg)	مقدار COOH-NHRNH <sub>2</sub> (mg)	نسبت	بیشترین R-Square
۱	۱	۱	۰:۱	۰/۸۸۸
۲	۰/۲۵	۰/۵	۲:۱	۰/۹۰۲
۳	۰/۵	۰/۵	۱:۱	۰/۹۴۹
۴	۰	۱	۱:۰	۰/۸۵۴
۵	۰/۵	۰/۲۵	۱:۲	۰/۸۷۱

#### بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در اندازه گیری pH

آزمایش‌های صورت گرفته و در نتیجه بررسی روند و تکرارپذیری پاسخ‌ها، مشخص شد که بهترین پاسخ در نتیجه استفاده از پلیمر PECH حل شده در محلول THF، بدست می‌آید. سپس در گام-های بعدی، مقدار پلیمر PECH استفاده شده، از نظر جلوگیری از تخریب الکتروده پس از اعمال پتانسیل و همچنین اثر عایق

الف) بهینه‌سازی نوع و مقدار نسبی چسب پلیمری و حلال: در انجام آزمایشات، ابتدا از دو نوع چسب PECH و PVC استفاده شد که به ترتیب در حلال های THF و DMF حل گشته و در ساخت الکتروده کاری مورد استفاده و بررسی قرار گرفتند. طی

به منظور یافتن بهترین فرکانسی که در آن فرکانس بتوان بهترین رابطه را بین  $|Z|$  (یا  $\text{Log}_{10}|Z|$ ) و pH برقرار کرد، الگوریتمی در نرم‌افزار متلب طراحی و اجرا شد. طی این الگوریتم، به مقادیر  $|Z|$  و pH در هر فرکانس، منحنی‌هایی خطی (از درجه ۱) برازش داده شده و آن فرکانسی که در آن منحنی با کمترین SSE (مجموع مربع خطاها) و بیشترین ضریب تعیین  $R^2$ ، برازش داده شده بود، یافت گردید. این فرکانس، در تعیین ویژگی‌های سخت‌افزاری و نرم‌افزاری مدار الکترونیکی نهایی در بلوس بکار می‌رود. نکته ضروری این است که اگرچه برازش منحنی‌های با درجه بالاتر، ضریب تعیین بزرگتری بدست می‌دهند، اما بازه اطمینان<sup>۴</sup> ضرایب جملات درجه دو یا سه بدست آمده از این برازش‌ها، مقداری بزرگ است؛ درحالی‌که خود ضرایب مقداری بسیار کوچک (و بی تأثیر) هستند.

## نتایج و بحث

### نتایج آزمون‌های مشخصه‌یابی مواد

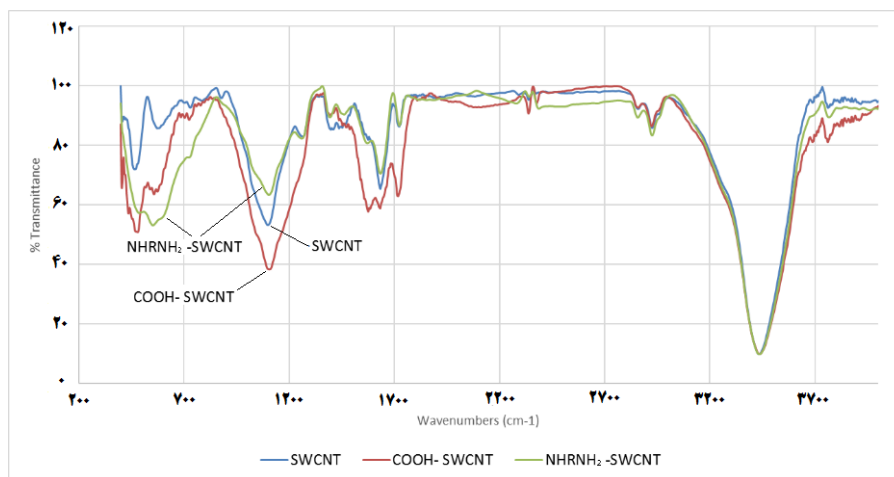
شکل (۲) نتایج آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) و شکل (۳) منحنی‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، بدست آمده از آزمون سه نانوساختار ۱- نانولوله‌های تکدیواره دست نخورده (SWCNT)، ۲- نانولوله‌های عامل‌دار شده با گروه‌های کربوکسیل (COOH-SWCNT) و ۳- نانولوله‌های عامل‌دار شده با گروه‌های آمین (NHRNH<sub>2</sub>-SWCNT) را نشان می‌دهد. همچنین، نتایج تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از دو نانولوله‌های عامل‌دار شده فوق در شکل (۴) نشان داده شده است.

سازی آن و نیز تأثیر بر پاسخ‌دهی الکتروود، اصلاح گردید. در نهایت مقدار بهینه چسب پلیمری PECH در 1ml از حلال THF، از بین چهار مقدار ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم، از نظر بیشترین همبستگی بین مقادیر pH و مدول امپدانس<sup>۱</sup>،  $|Z|$ ، به کمک طراحی و اجرای یک الگوریتم در نرم‌افزار متلب<sup>۲</sup> و تغذیه نتایج بدست آمده به این الگوریتم، بدست آمد.

ب) بهینه‌سازی مقدار نسبی COOH-SWCNT و NHRNH-SWCNT: به منظور بررسی تأثیر مقدار نسبی دو نوع نانولوله عامل‌دار شده در بهبود پاسخ‌دهی نانوحسگر، ۵ نوع الکتروود (جدول ۱) ساخته شده و آزمایشات EIS در pH‌های مختلف انجام گرفت. سپس به واسطه طراحی و اجرای الگوریتمی دیگر در نرم‌افزار متلب و تغذیه نتایج بدست آمده به این الگوریتم، الکتروودی که بیشترین همبستگی بین مقادیر pH و مقادیر  $|Z|$  را نتیجه داد، شناسایی گردید.

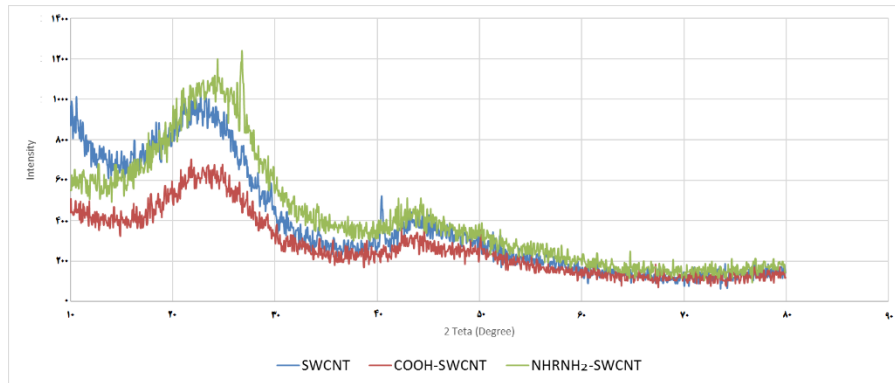
### ارزیابی نانوحسگر از طریق انجام آزمایشات طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی

بعد از انتخاب بهترین مقادیر برای پارامترهای تعیین‌کننده شرایط الکتروود و سیستم EIS، آزمایشات ارزیابی نانوحسگر به روش اندازه‌گیری امپدانس، هم روی نمونه‌های آزمایشگاهی (نمونه‌های بافر تهیه شده در آزمایشگاه)، و هم روی نمونه‌های واقعی (تهیه شده از مایع شکمبه‌ای)، هر کدام در سه تکرار انجام شد. در هر آزمایش، ابتدا الکتروودها با آب مقطر شستشو و در ظرف حاوی محلول نمونه قرار داده شدند. سپس پتانسیل AC در طیف فرکانسی 0.1Hz-1MHz، بر محیط اعمال و داده‌های مربوط به امپدانس حاصل از اعمال پتانسیل در رایانه به ثبت رسید. ارزیابی نانوحسگر براساس میانگین نتایج این سه تکرار انجام شد.



شکل ۲- نتایج آنالیز FTIR

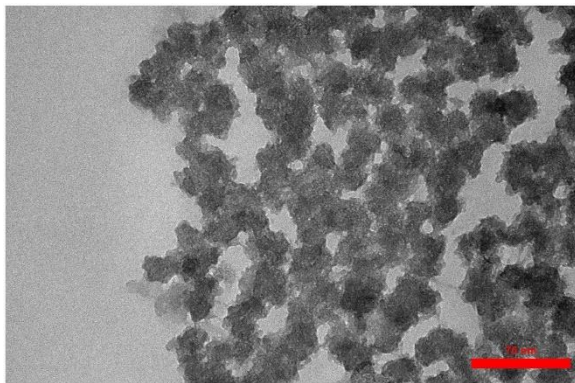




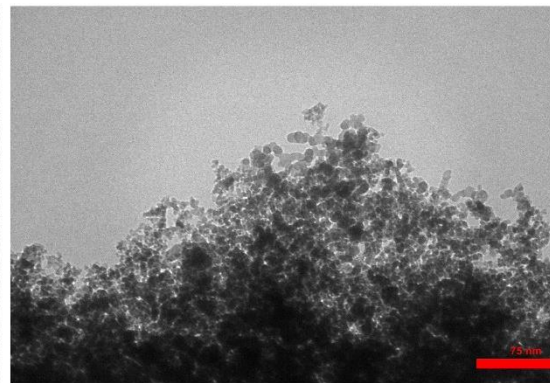
شکل ۳- نتایج آنالیز XRD

نانوحسگر ساخته شده دارای پاسخی خطی است. همچنین در نتیجه بررسی تأثیر مقدار نسبی پلیمر PECH، بیشترین همبستگی بین مقادیر pH و  $|Z|$ ، در نتیجه استفاده از الکترودی بدست آمد که در ساخت آن 0.15mg پلیمر PECH در 1ml از حلال THF استفاده شده بود. افزودن مقدار نسبی PECH بیشتر از این، اثرپذیری گروه‌های عاملی از یون‌های  $H^+$  را کاهش می‌دهد. کم کردن این مقدار نسبی، پایداری حسگر را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

نتایج بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در اندازه‌گیری pH همانطور که از ستون آخر (جدول ۱) قابل مشاهده است، بیشترین ضریب تعیین ( $R^2$ ) در رابطه خطی بین مقادیر pH و  $|Z|$ ، در نتیجه آزمون با الکتروود شماره ۳ بدست آمد؛ که در ساخت جزء حسگری این الکتروود، از دو نانولوله عامل‌دار شده (COOH-SWCNT و NHRNH<sub>2</sub>-SWCNT)، به نسبت مساوی، و هر کدام ۰/۵ میلی-گرم، استفاده شده بود. لازم به ذکر است که در نتیجه برازش منحنی‌های درجه دو بین مقادیر pH و  $|Z|$ ، ضریب جمله درجه دو مقداری بسیار کوچک بدست آمد. این مطلب نشان می‌دهد که



NHRNH<sub>2</sub>-SWNT

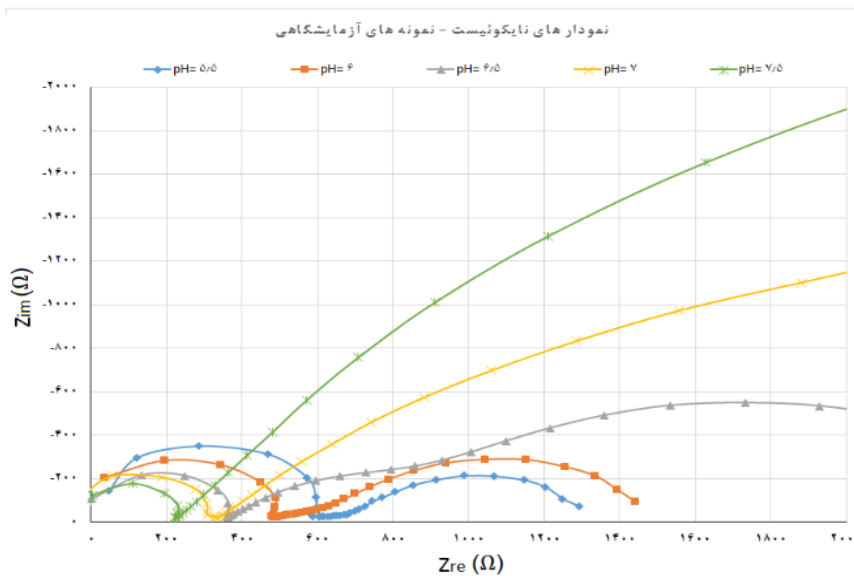


COOH-SWNT

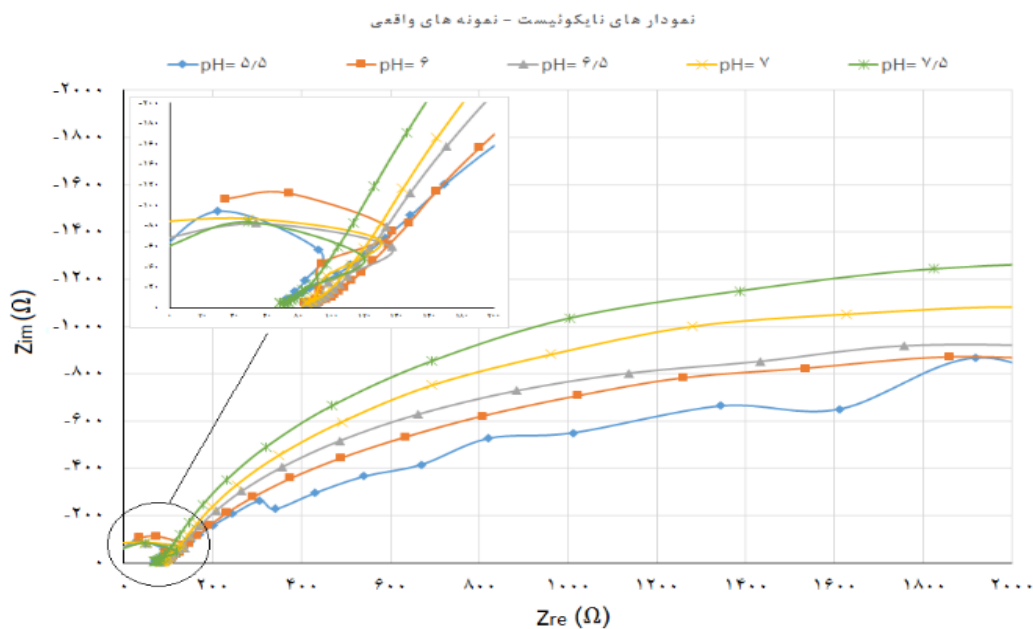
شکل ۴- تصاویر گرفته شده از نانولوله‌های عامل‌دار شده با دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری

استفاده شده به عنوان جزء حسگری، به مقدار pH حساس می‌باشد. همچنین همانطور که در شکل (۵) دیده می‌شود، با افزایش pH، قطر نیم دایره کوچکتر می‌شود؛ که بیانگر کم شدن مقاومت پلاریزاسیون است. شکل (۷) نیز نمودارهای  $I_p$  داده‌های دریافتی از آزمون با این نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

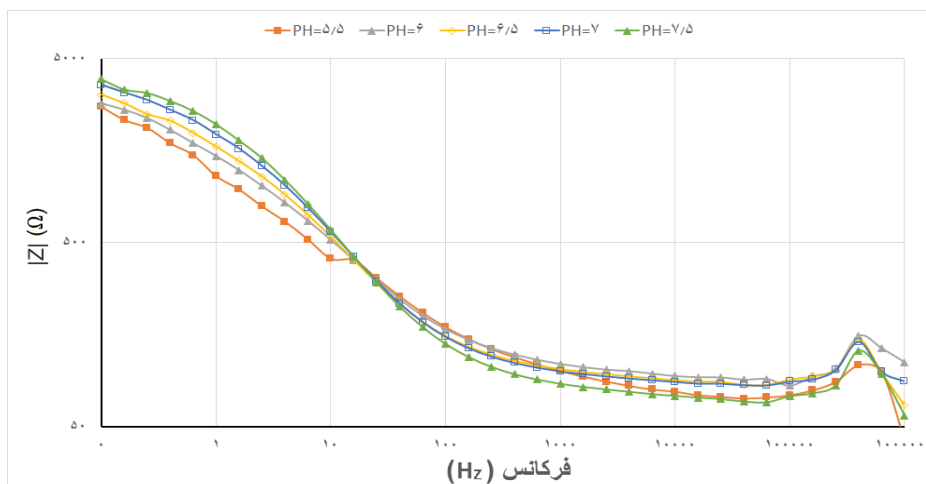
نتایج آزمایشات طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی با نمونه‌های آزمایشگاهی و نمونه‌های واقعی شکل‌های (۵) و (۶) نمودارهای نایکوئیست<sup>۱</sup> مربوط به نتایج اعمال پتانسیل AC (0.1Hz-1MHz) به ترتیب بر نمونه‌های آزمایشگاهی و نمونه‌های واقعی، تنظیم شده در pH های مختلف، را نشان می‌دهد. از این نمودارها به خوبی پیداست که نانومواد



شکل ۵ - نمودار نایکوئیست مقادیر امپدانس بدست آمده از آزمون نانوحسگر با نمونه های آزمایشگاهی



شکل ۶ - نمودار نایکوئیست مقادیر امپدانس بدست آمده از آزمون نانوحسگر با نمونه های واقعی



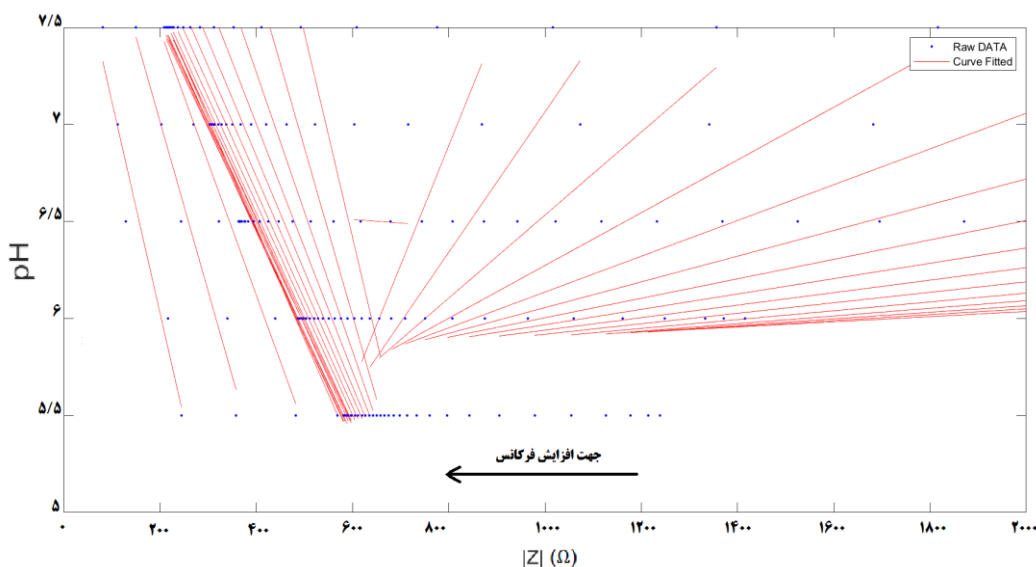
شکل ۷ - منحنی های بُد مربوط به مقادیر امپدانس بدست آمده از آزمون نانوحسگر با نمونه های واقعی



قابل توجه است.

نتایج اجرای الگویتم برازش منحنی‌های خطی، روی داده‌های حاصل از آزمایشات با نمونه‌های آزمایشگاهی، نشان داد که در یک بازه فرکانسی برابر 6310Hz-631Hz، یک رابطه خطی با ضریب تعیین بالایی ( $R^2 > 0.99$ ) بین مقادیر  $|Z|$  و pH، برقرار است و در این بازه، بیشترین همبستگی مربوط به فرکانس 1kHz می‌باشد. شکل (۸) کل خطوط برازش داده شده و شکل (۹) الف) خط برازش داده شده با بیشترین ضریب تعیین (Freq.=1kHz) را به همراه ضرایبش نشان می‌دهد. البته برای این نمونه‌ها، بین مقادیر pH و  $|Z|$ ، در فرکانس‌های پایین نیز همبستگی وجود دارد، اما مقدار آن کم بوده و کمترین مقدار آن R-Square=0.86 است.

نتایج حاصل از نمونه‌های واقعی (شکل ۶ و ۷) نشان می‌دهد که مقادیر pH با مقادیر  $|Z|$  بزرگتر (که مربوط به فرکانس‌های پایین هستند) همبستگی بهتری دارند و در مقادیر کم امپدانس (که از فرکانس‌های بالا حاصل شده‌اند)، همبستگی بین امپدانس و pH دیده نمی‌شود. زیرا همانطور که در بررسی منابع (Manjakkal et al., 2016; Folkertsma et al., 2018) اشاره شد، امپدانس در محدوده فرکانسی پایین به طور واضح به pH بستگی دارد و در فرکانس‌های بالا، امپدانس توسط مقاومت سیستم تعیین می‌شود که با عکس هدایت الکتریکی محلول مطابق است. از آنجا که محیط الکتروشیمیایی تهیه شده از نمونه‌های واقعی، یک محیط غیر همگن و نیز سرشار از مواد آلی است، نتایج مرتبط با هدایت الکتریکی این محیط (فرکانس‌های بالا) روند منظمی ندارند. اما همبستگی مربوط به فرکانس‌های پایین یک نکته



شکل ۸- خطوط برازش داده شده روی مقادیر  $|Z|$  و pH مربوط به آزمایشات EIS انجام شده با نمونه‌های آزمایشگاهی

در واقع (تمام یا قسمت بزرگی از آن) همان امپدانس واربرگ<sup>۱</sup> است. دلیل تفاوت با نمونه‌های آزمایشگاهی هم این است که چون محیط اندازه‌گیری در نمونه‌های واقعی مواد آلی بسیار بیشتری دارد و این مواد خاصیت دی الکتریکی بهتری نسبت به مواد معدنی دارند، بنابراین امپدانس حاصل از آزمون با نمونه‌های واقعی، در فرکانس‌های پایین بالاترست.

با توجه به مقایسه نتایج آزمایشات با نمونه‌های آزمایشگاهی و نمونه‌های واقعی، می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه نانومواد ساخته و استفاده شده، دارای حساسیت نویدبخشی به مقادیر pH محلول می‌باشد، فرکانس مطلوبی که در آن بیشترین همبستگی بین داده‌ها وجود داشته و بتوان با اعمال آن به سیستم و برداشت

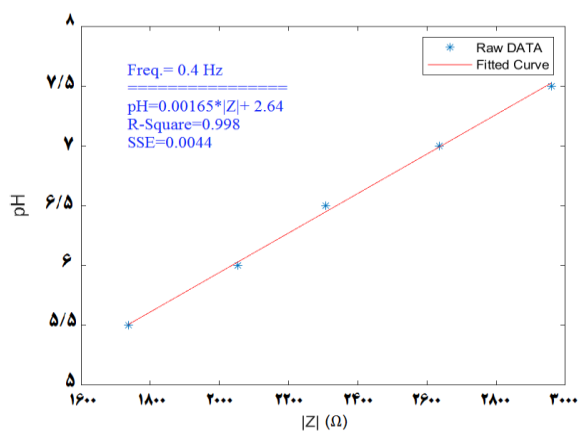
نتایج اجرای الگویتم برازش منحنی‌های خطی روی داده‌های حاصل از آزمایشات با نمونه‌های واقعی نشان داد که یک رابطه خطی با ضریب تعیین بالا ( $R^2 > 0.99$ ) در محدوده فرکانسی 0.4Hz-1.6Hz برقرار است و از این بین، بیشترین همبستگی مربوط به فرکانس 0.4Hz می‌باشد. شکل (۱۰) کل خطوط برازش داده شده و شکل (۹-ب) خط برازش داده شده با بیشترین ضریب تعیین را، به همراه ضرایبش نشان می‌دهد.

در شکل (۱۰) مشاهده می‌شود که امپدانس در فرکانس‌های بالا، بسیار کم و در فرکانس‌های پایین، بسیار بزرگتر از آن است. می‌توان نتیجه گرفت که در نمونه‌های واقعی، مقاومت تحت کنترل نفوذ مواد درون الکتروولیت به داخل الکتروود بوده و

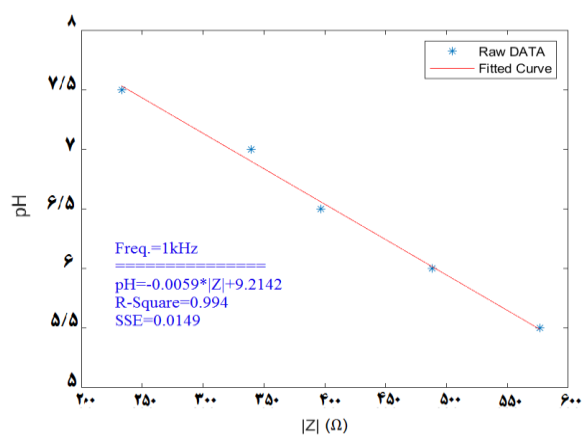
در مایع شکمبه‌ای را کم کند، ضروری به نظر می‌رسد. این پوشش‌ها ساختاری کاملاً شیمیایی دارند و در واقع به عنوان یک غشا عمل می‌کنند و افزودن آن‌ها طی فرایندهای شیمی-سنتزی صورت می‌گیرد.

در برازش منحنی درجه دو بین مقادیر  $|Z|$  و pH مربوط به نمونه‌های واقعی، همان فرکانس 0.4Hz را نقطه اوج همبستگی خطی بین داده‌ها نشان داد. همچنین، مقادیر بازه اطمینان مربوط به ضرایب خطوط برآورد شده نیز مؤید درست بودن مقادیر فرکانس‌های یافت شده بود.

مقادیر امپدانس، مقدار pH محلول را اندازه گرفت، وابستگی زیادی به ساختار محلول مورد آزمایش دارد. به نظر می‌رسد که در آزمایشات با نمونه‌های واقعی، مواد آلی درون محلول که در واقع مولکولهایی بزرگتر از یون‌های هیدرونیوم هستند، به داخل منافذ موجود در نانو ساختار الکتروود نفوذ کرده، ظرفیت خازنی آن و امپدانس واربروگ را تحت تأثیر قرار می‌دهند و این نفوذ در فرکانس‌های بالا منجر به عدم همبستگی بین مقادیر امپدانس و pH می‌شود. از طرفی برای پاسخ دهی هرچه سریعتر حسگر، بالاتر بودن فرکانس مطلوب‌تر است. بنابراین، ایجاد پوششی روی نانومواد تشکیل دهنده الکتروود، به نحوی که اثر مواد آلی موجود

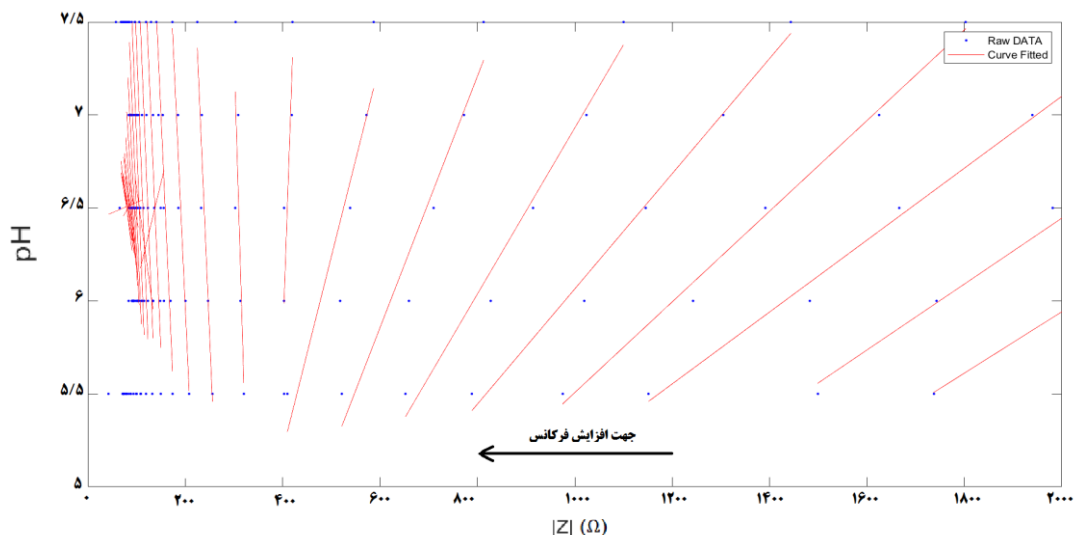


(ب)



(الف)

شکل ۹- بهترین رابطه خطی برآورد شده بین مقادیر  $|Z|$  و pH (فرکانس 1kHz)، مربوط به آزمایشات EIS، انجام شده با نمونه‌های آزمایشگاهی، (ب) انجام شده با نمونه‌های واقعی



شکل ۱۰- خطوط برازش داده شده روی مقادیر  $|Z|$  و pH مربوط به آزمایشات EIS انجام شده با نمونه‌های واقعی

الکتروشیمیایی (EIS)، به منظور پایش بی‌سیم pH شکمبه گاو بررسی شد. الکتروود ساخته شده پاسخی خطی به تغییرات pH نشان داد و این پاسخ، هنگام آزمایش با نمونه‌های واقعی، در فرکانس‌های پایین (0.4Hz-1.6Hz) اتفاق افتاد. در نتیجه،

## نتیجه گیری

ارائه روشی دقیق برای پایش pH شکمبه ای و حفظ آن بین ۵/۵ تا ۷ ضروری است. در این پژوهش، مراحل ساخت و ارزیابی یک نانوحسگر pH مبتنی بر روش طیفسنجی امپدانس

سایر مواد دارند) و کم‌هزینه (ارزان بودن مواد و روشها و سادگی نسبی ساخت‌افزایی روش EIS) است. به نظر می‌رسد ایجاد پوشش‌هایی بر روی الکتروود به منظور کاهش نفوذپذیری آن نسبت به مولکول‌های آلی (که غالباً بزرگتر از  $H^+$  هستند)، فرکانس پاسخ‌دهی مطلوب حسگر در محیط شکمبه را بالاتر برده و به تبع سرعت پاسخ‌دهی آن را بیشتر می‌کند.

استفاده از ترکیب نانولوله‌های تک‌دیواره اکسیدشده با گروه‌های کربوکسیل و نانولوله‌های عامل دارشده با گروه‌های آمین در ساخت یک نانوحسگر pH، در کنار استفاده از روش قدرتمند EIS، نویدبخش توسعه بلوس‌های حساس (به دلیل نسبت سطح به حجم بالای نانولوله‌ها و دقت زیاد روش EIS)، بادوام (نانولوله‌ها اساساً پایداری شیمیایی و استحکام مکانیکی بالاتری نسبت به

## REFERENCES

- Alizadeh, T., & Jamshidi, F. (2015). Synthesis of nanosized sulfate-modified  $\alpha$ - $Fe_2O_3$  and its use for the fabrication of all-solid-state carbon paste pH sensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 19 (4): 1053-1062.
- Folkertsma, L., Gehrenkemper, L., Eijkel, J., Gerritsen, K., & Odijk, M. (2018). Reference-Electrode Free pH Sensing Using Impedance Spectroscopy, In: *The Eurosensors 2018 Conference*. 9–12 September. Graz, Austria. 2(13): 63-72.
- Halliwel, J., Savage, A.C., Buckley, N. & Gwenin, D.G. (2014). Electrochemical impedance spectroscopy biosensor for detection of active botulinum neurotoxin. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2:12-15.
- Jung, D., Han, M.E., & Lee, G.S. (2014). pH-sensing characteristics of multi-walled carbon nanotube sheet, *Materials Letters*. 116 :57–60.
- Lin, X. (2009). Evaluation of Kahne rumen sensors in fistulated sheep and cattle under contrasting feeding conditions, M.Sc. Thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Liu, L., Shao, J., Li, X. (2016). High performance flexible pH sensor based on carboxyl-functionalized and DEP aligned SWNTs, *Applied Surface Science*. 386: 405–411.
- Krause, K.M. & Oetzel, G.R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3):215-236.
- Manjakkal, L., Synkiewicz, B., Zaraska, K., Cvejic, K., Kulawik, J. & Szwagierczak, D. (2016). Development and characterization of miniaturized LTCC pH sensors with RuO<sub>2</sub> based sensing electrodes. *Sensors and Actuators. B: Chemical*, 223: 641-649.
- Mottram, T., Lowe, J., McGowan, M. & Phillips, N. (2008). Technical note: a wireless telemetric method of monitoring clinical acidosis in dairy cows. *Computers and Electronics in Agriculture*. 64:45–48.
- Gou, P., Kraut, N.D., Feigel, L.M., Star, A. (2014). Carbon nanotube chemiresistor for wireless pH sensing, *Scientific Reports*. 4: Article number: 4468.
- Penner, G.B., Beauchemin, K.A., & Mutsvangwa, T. (2006). An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. *Journal of Dairy Science*. 89: 2132–2140.
- Phillips, N., Mottram, T., Poppi, D., Mayer, D., & McGowan, M.R. (2010). Continuous monitoring of ruminal pH using wireless telemetry, *Animal Production Science*. 50:72–77.
- Qin, Y., Kwon, H.J., Subrahmanyam, A., ... (2016). Inkjet-printed bifunctional carbon nanotubes for pH sensing. *Materials Letters*. 176: 68–70.
- Ramanathan, T., Fisher, F.T., Ruoff, R.S., & Brinson, L.C. (2005). Amino-functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems. *Chemistry of Materials*. 17(6):1290-1295.
- Sato, S., Mizuguchi, H., Ito, K., Ikuta, K., Kimura, A. & Okada, K. (2012). Technical note: Development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows, *Preventive Veterinary Medicine*. 103:274–279.
- Sato, S. (2016). REVIEW ARTICLE: Pathophysiological evaluation of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous ruminal pH monitoring. *Animal science journal*. 87:168–177.
- Takeda, S., Nakamura, M., Ishii, A., Subagyo, A., Hosoi, H., Sueoka, K., & Mukasa, K. (2007). A pH sensor based on electric properties of nanotubes on a glass substrate, *Nanoscale research letters*. 2:207–212.
- Wang, Y.B., Iqbal, Z., Malhotra, S.V. (2005). Functionalization of carbon nanotubes with amines and enzymes. *Chemical physics letters*. 405: 96–101.