

## МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АВТОПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДНОГО ДАТЧИКА

**М.В. Миняев, М.Б. Белякова, Н.В. Костюк, Д.В. Лещенко**

Тверской государственный медицинский университет, г. Тверь  
*Кафедра биохимии с курсом КЛД ФПДО*

Предложен метод количественной оценки автопотребления кислородного датчика, основанный на анализе динамики пассивного насыщения среды инкубации атмосферным кислородом в открытой измерительной ячейке. Для закрытого кислородного датчика с площадью катода  $5 \text{ мм}^2$  и толщиной полиэтиленовой мембраны  $50 \text{ мкм}$  скорость автопотребления в насыщенной атмосферным кислородом инкубационной среде, определенная данным методом, составила  $2,87 \cdot 10^{-11} \pm 0,15 \cdot 10^{-11}$  моль/с при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Ключевые слова:** электрод Кларка, кислородный датчик, автопотребление, погрешность измерения.

Несмотря на появление новых измерительных технологий [3; 6; 11; 17; 18] полярографический электрод Кларка [13] и его модификации [12; 16] до сих пор остаются наиболее распространенным типом кислородных датчиков. Его принцип действия основан на измерении тока, обусловленного восстановлением кислорода на поляризованном катоде полярографической ячейки [5]. Таким образом, сама полярографическая ячейка (электрод Кларка) является потребителем кислорода. На практике потребление кислорода датчиком (автопотребление) малозаметно, так как скорость его сравнительно невелика, а убыль кислорода обычно компенсируется диффузией из газовой фазы, с которой среда инкубации так или иначе контактирует в измерительных ячейках большинства конструкций. Тем не менее отсюда не следует, что точность измерения становится выше, если в системе одновременно протекают два трудноконтролируемых процесса, вносящих разнонаправленные вклады в величину погрешности. Кроме того, следует учитывать, что данная картина может кардинально измениться, например, при уменьшении объема среды, снижении скорости перемешивания [4; 10], увеличении вязкости среды [7] или ее полной изоляции от газовой фазы [9]. В подобных случаях погрешность, обусловленная автопотреблением, быстро достигает уровня, при котором корректная интерпретация результата измерения становится весьма затруднительной. Таким образом, количественная оценка автопотребления датчика может оказаться полезной не только для корректировки уже полученных результатов, но и на этапе

планирования эксперимента и подбора измерительного оборудования, соответствующего поставленным задачам.

На первый взгляд оценка автопотребления не составляет проблемы, так как предельный ток в полярографической ячейке является функцией скорости автопотребления [4]:

$$\text{или } i = v_a ZF, \quad (1)$$

где:  $i$  – значение предельного тока;  $m$  – масса кислорода, восстановленная на катоде за промежуток времени  $t$ ;  $v_a$  – скорость автопотребления;  $Z$  – количество электронов, присоединенных каждой молекулой кислорода;  $F$  – число Фарадея.

Однако на практике ток, протекающий через ячейку, обусловлен не только присутствием кислорода, но также электропроводностью электролита, к которому приложено напряжение поляризации, и присутствием примесей, восстанавливаемых одновременно с кислородом. Картина дополнительно осложняется неопределенностью механизма восстановления кислорода по двух- или четырехэлектронному пути [1; 8]. Их соотношение зависит от природы материала электродов, способа подготовки поверхности и степени загрязненности [5]. Именно по этим причинам для определения количества потребленного кислорода используется не расчетный метод, а калибровка датчика в средах с заведомо известным парциальным давлением кислорода [2].

Таким образом, разработка метода, позволяющего без привлечения дополнительного оборудования установить количественные закономерности автопотребления кислородного датчика, представляется актуальной.

### Экспериментальная часть

Предлагаемый метод базируется на допущении, что в заполненной инкубационной средой открытой измерительной ячейке, снабженной полярографическим кислородным датчиком, при отсутствии в среде иных потребителей кислорода одновременно протекают только два процесса: автопотребление датчика и компенсационная диффузия кислорода из атмосферы. При этом скорость автопотребления  $v_a = m_a/t$  пропорциональна парциальному давлению кислорода в среде [10]:

$$\frac{m_a}{t} = \frac{DSP_{O_2}}{\delta} \text{ или } v_a = \frac{DSP_{O_2}}{\delta}. \quad (2)$$

Скорость диффузии кислорода в среду  $v_d = m_d/t$  пропорциональна градиенту его парциального давления  $\Delta$  на границе раздела фаз между средой и атмосферой:

$$\frac{m_d}{t} = \frac{DS\Delta}{\delta} \text{ или } v_d = \frac{DS\Delta}{\delta}, \quad (3)$$

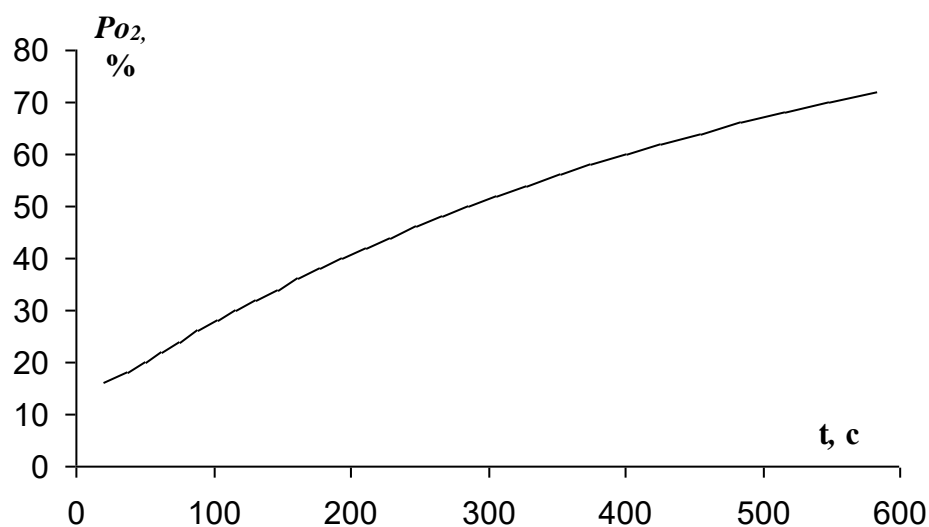
где  $v_a$  – скорость автопотребления;  $v_d$  – скорость диффузии;  $m_a$  – масса кислорода, восстановленного датчиком за единицу времени  $t$ ;  $m_d$  – масса кислорода, поступившего из атмосферы в среду за единицу времени  $t$ ;  $D$  – коэффициент диффузии;  $S$  – площадь диффузии;  $\delta$  – толщина диффузионного слоя;  $P_{O_2}$  – парциальное давление кислорода в среде;  $\Delta$  – градиент парциального давления кислорода между атмосферой и средой (здесь и далее  $P_{O_2}$  и  $\Delta$  выражаются в процентах от парциального давления кислорода в атмосфере при текущем атмосферном давлении  $P_{атм}$ , т.е.  $\Delta=100-P_{O_2}$ ).

Отсюда следует, что при неизменном атмосферном давлении  $P_{атм}$  существует некоторое равновесное значение парциального давления кислорода в среде  $P_{равн}$  (и соответственно градиента его парциального давления между атмосферой и средой  $\Delta_{равн}$ ), при котором скорости автопотребления кислорода и диффузии из атмосферы оказываются равны. Таким образом, при наличии автопотребления линейный график зависимости скорости насыщения среды атмосферным кислородом от градиента парциального давления кислорода между атмосферой и средой достигнет оси абсцисс не в нулевой точке, как это следует из уравнения 3, а в точке, соответствующей равновесному значению градиента  $\Delta_{равн}$ . Если зависимость экстраполировать до пересечения с осью ординат, то на ее отрицательном луче будет отсечен отрезок, длина которого согласно принятому допущению будет равна скорости автопотребления датчика в насыщенной атмосферным кислородом среде ( $v_{max}$ ), так как скорость диффузии кислорода из атмосферы при нулевом градиенте парциальных давлений равна нулю.

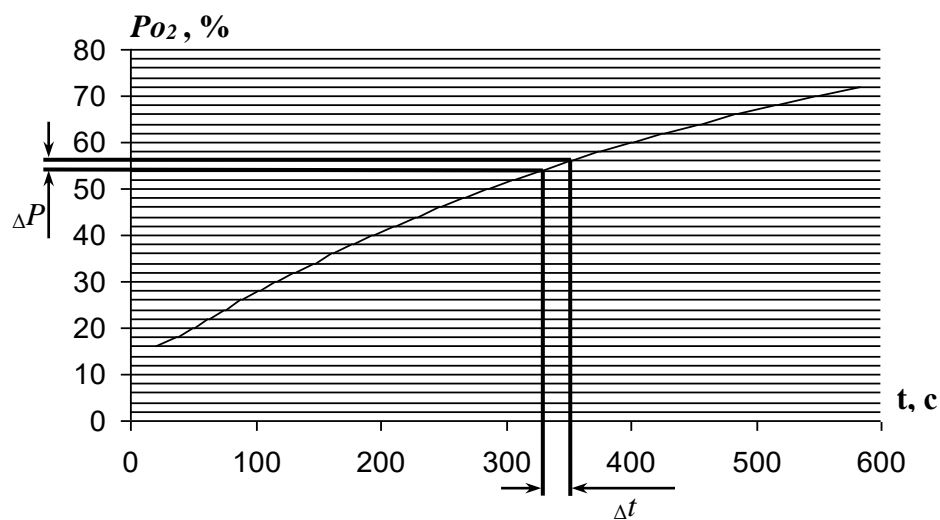
В работе использовался электрод Кларка [13] в модификации Манси [14] с серебряным катодом (5 мм<sup>2</sup>) и цинковым анодом (300 мм<sup>2</sup>), заполненный 400 мкл раствора KCl (60 г/л), снабженный полиэтиленовой мембраной (50 мкм). Датчик монтировался сбоку в термостатируемую при 37 °С измерительную ячейку [15] объемом 4 мл, снабженную магнитной мешалкой. Ячейка не имела крышки, поэтому площадь контакта среды с атмосферой составляла 180 мм<sup>2</sup> без учета кривизны мениска. Регистрация сигнала производилась с использованием измерительного усилителя постоянного тока и платы сбора данных L-154 (Lcard, Россия) на частоте 100 Гц.

В качестве среды выступал раствор KCl (60 г/л), идентичный электролиту кислородного датчика, насыщенный атмосферным кислородом при 37 °С. Перед началом работы измерительную ячейку, заполненную средой, прогревали до рабочей температуры (37 °С) и уравнивали с атмосферой в течение 3 ч [16]. Для восстановления

первоначальных параметров измерительной системы после каждого замера ячейку заполняли свежей средой и выдерживали не менее 30 мин. Для поглощения растворенного в среде кислорода использовался  $\sim 0,01$  М раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , добавление 100 мкл которого приводило к падению парциального давления кислорода в 3,5 мл среды до 10–20 % от первоначального уровня.



Р и с . 1. Регистрационная кривая насыщения среды инкубации атмосферным кислородом (на примере замера № 1)



Р и с . 2. Схема обработки регистрационной кривой

Эксперимент заключался в следующем. В измерительную ячейку помещали 3,5 мл среды и оставляли до стабилизации показаний

предварительно откалиброванного кислородного датчика (~10 мин), после чего приливали 100 мкл 0,01 М Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Как только парциальное давление кислорода в среде падало до минимума, включали регистратор и производили непрерывную запись сигнала, пока парциальное давление кислорода в среде не восстанавливалось до 70 % за счет диффузии из атмосферы. В результате получали регистрационную кривую пассивного насыщения среды атмосферным кислородом, пример которой представлен на рис. 1.

Регистрационную кривую разбивали на одинаковые участки  $\Delta P$ , соответствующие изменению парциального давления кислорода на 2 % (70–68 %; 68–66 % и т.д.), после чего для каждого из них рассчитывали среднюю скорость насыщения  $v_i$  по уравнению

$$v_{нас} = \frac{\Delta P}{\Delta t}, \quad (4)$$

как показано на рис. 2.

Типичная зависимость скорости насыщения среды от градиента парциального давления кислорода между атмосферой и средой представлена на рис. 3.

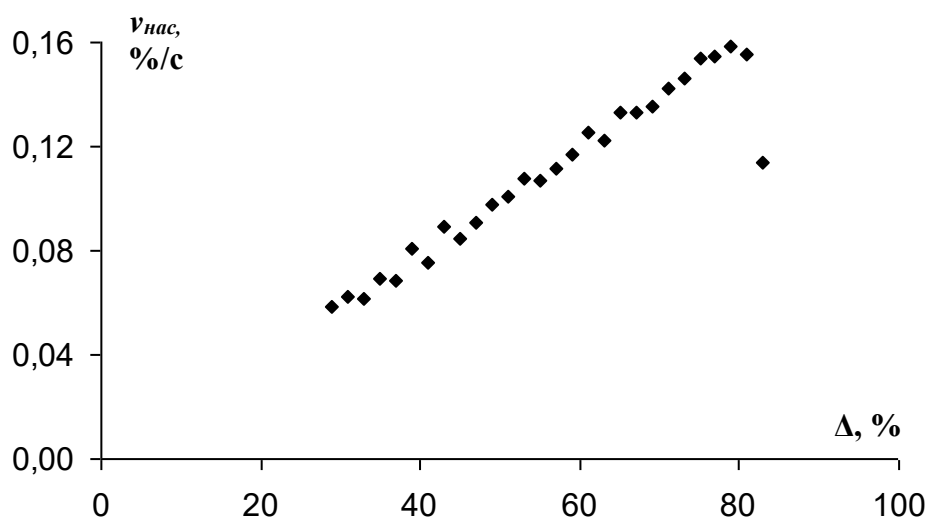


Рис. 3. Зависимость скорости насыщения инкубационной среды атмосферным кислородом от градиента парциального давления кислорода между атмосферой и средой (на примере замера № 1)

Как видно из рисунка, линейность зависимости грубо нарушалась при низких значениях парциального давления кислорода, что объясняется остаточным поглощением кислорода сульфитом натрия

после прохождения регистрационной кривой через точку минимума. По этой причине для дальнейшей обработки использовался только линейный участок зависимости, соответствующий изменению парциального давления кислорода от 25 до 70 %.

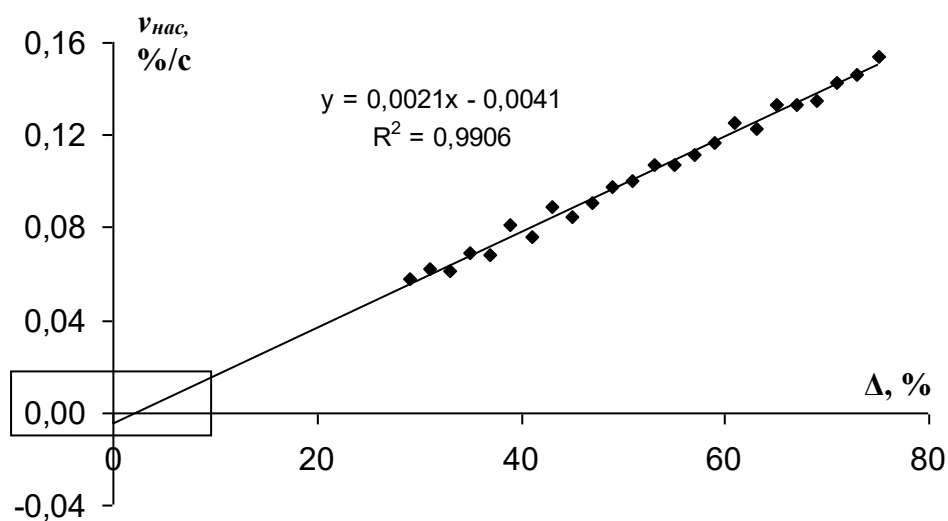


Рис. 4. Результат аппроксимации данных линейного участка зависимости скорости насыщения среды от градиента парциального давления кислорода (на примере замера №1). Область, выделенная прямоугольником, увеличена на рис. 5.

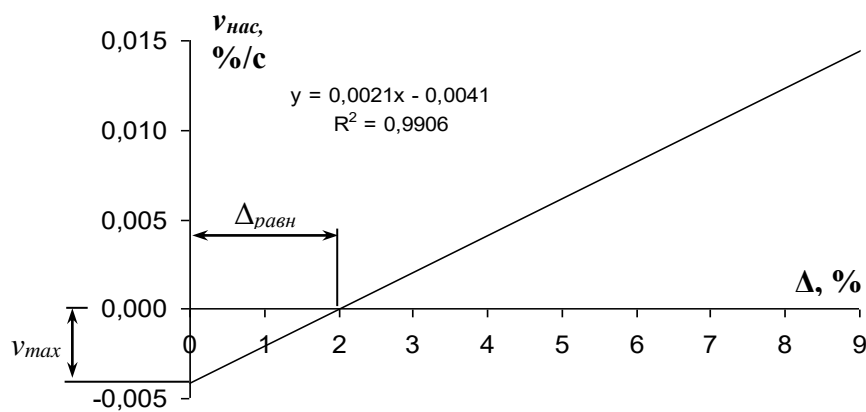


Рис. 5. Схема определения скорости автопотребления и равновесного значения парциального давления кислорода (на примере замера № 1)

Данные участка подвергались линейной аппроксимации, после чего полученное уравнение использовалось для определения длины

отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат, которую рассматривали как скорость автопотребления кислородного датчика при 100 %-м насыщении среды атмосферным кислородом (рис. 4).

Учитывая линейность характеристики электрода Кларка (уравнение 1), а также то, что при отсутствии кислорода в среде скорость автопотребления  $v_a$  равна нулю, зависимость автопотребления от парциального давления кислорода в среде восстанавливали как прямую, соединяющую начало координат с точкой, характеризующей автопотребление в насыщенной кислородом среде, как показано на рис. 6.

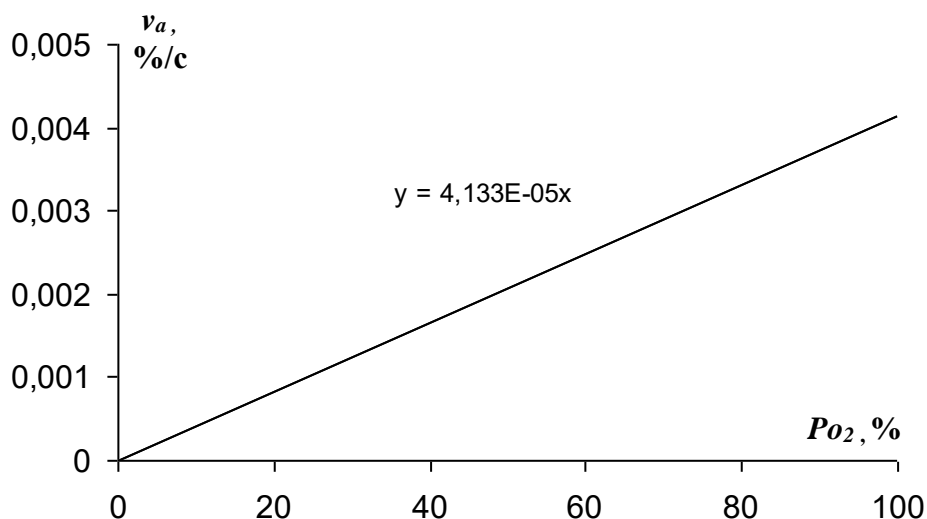


Рис. 6. Зависимость скорости автопотребления кислородного датчика от парциального давления кислорода в среде инкубации (на примере замера № 1)

### Результаты и обсуждение

Были проведены 7 серий однотипных замеров динамики пассивного насыщения инкубационной среды атмосферным кислородом, описанных в предыдущем разделе. Каждая серия соответствовала рабочему дню и включала 4 замера с 30-минутными восстановительными промежутками между ними. Серии 4 и 6 не были завершены по техническим причинам, таким образом, всего провели 25 замеров. Для каждого замера, как представлено в предыдущем разделе, определяли равновесное парциальное давление кислорода в среде  $P_{равн}$  и скорость автопотребления датчика  $v_{max}$  при парциальном давлении кислорода в среде, равном 100 % по условной шкале регистратора. Результаты представлены в таблице.

## Результаты измерения скорости автопотребления закрытого кислородного датчика

№ серии	$P_{\text{атм}}$ (мм рт.ст.)	$V_{\text{max}}$		$P_{\text{равн}}$ (%)
		(%/с)	(моль/с)	
		0,0041	$2,19 \cdot 10^{-11}$	97,99
		0,0050	$2,63 \cdot 10^{-11}$	97,64
		0,0061	$3,25 \cdot 10^{-11}$	97,11
		0,0035	$1,84 \cdot 10^{-11}$	98,30
		0,0042	$2,25 \cdot 10^{-11}$	97,97
		0,0048	$2,57 \cdot 10^{-11}$	97,56
		0,0052	$2,78 \cdot 10^{-11}$	97,41
		0,0030	$1,61 \cdot 10^{-11}$	98,51
		0,0052	$2,79 \cdot 10^{-11}$	97,42
		0,0036	$1,92 \cdot 10^{-11}$	98,20
		0,0046	$2,47 \cdot 10^{-11}$	97,66
		0,0054	$2,87 \cdot 10^{-11}$	97,33
		0,0059	$3,12 \cdot 10^{-11}$	97,12
		0,0067	$3,57 \cdot 10^{-11}$	96,65
		0,0050	$2,64 \cdot 10^{-11}$	97,58
		0,0064	$3,38 \cdot 10^{-11}$	96,81
		0,0053	$2,78 \cdot 10^{-11}$	97,36
		0,0086	$4,53 \cdot 10^{-11}$	95,80
		0,0041	$2,17 \cdot 10^{-11}$	97,99
		0,0052	$2,74 \cdot 10^{-11}$	97,43
		0,0079	$4,21 \cdot 10^{-11}$	96,17
		0,0080	$4,27 \cdot 10^{-11}$	96,22
		0,0054	$2,87 \cdot 10^{-11}$	97,33
		0,0058	$3,08 \cdot 10^{-11}$	97,11
		0,0062	$3,33 \cdot 10^{-11}$	96,93
$\bar{X}$	-	0,0054	$2,87 \cdot 10^{-11}$	97,34
$\pm m$	-	0,0003	$0,15 \cdot 10^{-11}$	0,69

Как видно из таблицы, равновесное парциальное давление кислорода в среде, при котором автопотребление датчика полностью компенсируется диффузией кислорода из атмосферы, для открытой измерительной ячейки составило  $97,34 \pm 0,69$  %. По этой причине даже в полностью открытой измерительной ячейке автопотребление не позволяет достичь 100 %-го насыщения среды кислородом, что негативно сказывается на точности как калибровки кислородного датчика, так и оценки исходного содержания кислорода в среде инкубации. Максимальная скорость автопотребления (при 100 %-м насыщении среды кислородом) составила  $(2,87 \pm 0,15) \cdot 10^{-11}$  моль/с, что соответствует 19 % в час от исходного содержания кислорода в насыщенной среде инкубации. Отсюда следует, что в закрытых измерительных ячейках, где диффузия кислорода из атмосферы в среду



затруднена, вклад автопотребления в величину погрешности измерения может оказаться весьма заметным. Точность предлагаемого метода ( $\pm 5\%$  от измеренной величины) вполне достаточна для решения утилитарных задач, таких, как выбор оборудования, планирование эксперимента или вычисление поправки к результату измерения. Тем не менее она может быть существенно повышена путем ограничения площади контакта инкубационной среды с атмосферным воздухом.

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработан метод количественной оценки автопотребления закрытого кислородного датчика, не требующий привлечения дополнительного измерительного оборудования.
2. При площади катода  $5 \text{ мм}^2$ , толщине полиэтиленовой мембраны  $50 \text{ мкм}$ , исходном объеме среды  $3,5 \text{ мл}$  и площади поверхности раздела фаз атмосфера/среда  $180 \text{ мм}^2$  скорость автопотребления датчика в насыщенной атмосферным кислородом инкубационной среде составила  $2,87 \cdot 10^{-11} \text{ моль/с}$  при  $37^\circ\text{C}$ .
3. Длительность замера в рассмотренных условиях не превышает  $10 \text{ мин}$  без учета времени подготовки измерительной системы.

#### Список литературы

1. Делахей П. Двойной электрический слой и кинетика электродных процессов. М.: Мир, 1976. 315 с.
2. Делимарский Ю.К., Городынский А.В. Электродные процессы и методы исследования в полярографии. Киев: Изд-во АН УССР, 1960. 192 с.
3. Захаров А.И., Гришаева Т.И. // Журн. аналит. хим. 1996. Т. 51, № 8. С. 818.
4. Зеленский М.И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. Л.: Наука, 1986. 140 с.
5. Коваленко Е.А., Березовский В.А., Эпштейн И.М. Полярографическое определение кислорода в организме. М.: Медицина, 1975. 232 с.
6. Летута С.Н., Бондаренко В.А., Кеделе Г.А. // Датчики и системы. 2001. № 9. С. 27.
7. Миняев М.В., Степанова Т.А. // Вестник ТвГУ. Серия: Биология и экология. 2008. № 10. С. 77–81.
8. Никулин В.Н. // Журнал физ. хим. 1961. Т. 35, № 1. С. 84–89.
9. Роскошный В.Г. // Приборы и системы управления. 1983. № 10. С. 25–26.
10. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / ред. Г.М. Франк. М.: Наука, 1973. 220 с.
11. Bassnett S., McNulty R. // J. Exp. Biol. 2003. V. 206, № 12. P. 4353.
12. Beste D.J.V., Peters J., Hooper T., Avignone-Rossa C., Bushell M.E., McFadden J. // J. Bacteriol. 2005. V. 187, № 3. P. 1677–1684.
13. Clark Jr L. C., Wolf R., Granger D., Taylor Z. // J. Appl. Physiology. 1953. V. 6, № 3. P. 189–193.
14. Mancy K.H., Okun D.A., Reilley C.N. // J. Electroanal. Chem. 1962. V. 4, № 2. P. 65–92.

15. Miniaev M.V., Belyakova M.B., Kostiuk N.V., Leshchenko D.V. // Int. J. Electrochemistry. 2011. doi:10.4061/2011/376750.
16. Miniaev M. V., Belyakova M. B., Kostiuk N. V., Leshchenko D. V., Fedotova T. A. // J. Anal Meth. Chem. 2013. doi: 10.1155/2013/249752.
17. McNulty R., Wang H., Mathias R.T., Ortwerth B.J., Truscott R.W., Bassnett S. // J. Physiol. 2004. V. 559, № 9. P. 883–898.
18. Vanderkooi J.M. Erecinska M., Silver I.A. // J. Physiol. Cell. Physiol. 1991. V. 260, № 6. P. 1131.

## **METHOD OF QUANTITATIVE ESTIMATION FOR AUTO-CONSUMPTION OF OXYGEN SENSOR**

**M.V. Miniaev, M.B. Belyakova, N.V. Kostiuk, D.V. Leshchenko**

Tver State Medical University, Tver  
*Department of Biochemistry with the course of CLD PGEF*

A method for quantifying of auto-consumption by oxygen sensor, based on the analysis of the dynamics of passive saturation of the incubation medium with atmospheric oxygen in an open measurement cell, is suggested. For a closed oxygen sensor, with an area of the cathode 5 mm<sup>2</sup>, and polyethylene membrane of thickness 50 microns, rate of auto-consumption for the incubation medium saturated with atmospheric oxygen, determined by this method, amounted to  $2,87 \cdot 10^{-11} \pm 0,15 \cdot 10^{-11}$  mol/sec at 37 °C.

**Keywords:** *Clark electrode, oxygen sensor, auto-consumption, measurement error.*

*Об авторах:*

МИННЯЕВ Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, специалист, Тверской государственной медицинский университет (ТГМУ), e-mail: mmb\_77@mail.ru

БЕЛЯКОВА Майя Борисовна – кандидат биологических наук, старший преподаватель, ТГМУ, e-mail: MayaBe@yandex.ru

КОСТЮК Наталья Валериевна – кандидат биологических наук, доцент, ТГМУ, e-mail: p001637@mail.ru

ЛЕЩЕНКО Джулианна Викторовна – кандидат биологических наук, доцент, ТГМУ, e-mail: Dvleshchenko@mail.ru