

Электрохимические датчики оксида азота(I) в водных растворах

Константинов Виктор Витальевич

Физический факультет. Практикум по электричеству и магнетизму. 3 семестр.

Группа №18306, 2019.

Научный руководитель:

Научный сотрудник ЛОДБС НГУ, к.х.н. Дранова Т.Ю.

Аннотация

Целью работы является исследование и реализация электрохимического метода обнаружения NO в жидких средах.

В ходе работы произведен обзор различных литературных источников, на основе которого выполнено сравнение различных методов детектирования NO в медицине, биологии и химии. Детально рассмотрен принцип работы кулонометрического (амперометрического) электрода типа Кларка. Экспериментально была проведена настройка и калибровка датчика (ISO-NOP), оценка влияния примесей, часто встречающихся в живых средах и внешних электрических полей.

Ключевые слова: оксид азота(I), амперометрический датчик, электрод типа Кларка.

Работа выполнена в лаборатории оптики и динамики биологических систем ФФ НГУ.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет

Кафедра общей физики

Константинов Виктор Витальевич

КУРСОВАЯ РАБОТА

Электрохимические датчики оксида азота(I) в водных растворах
Практикум по электричеству и магнетизму, 2 курс, группа №18306

Научный руководитель:

к.х.н., научный сотрудник ЛОДБС
НГУ

Дранова Т.Ю.

оценка научного руководителя

«__»_____2019 г.

Преподаватель практикума:

Рева В.Б.

Оценка преподавателя практикума:

«__»_____2019 г.

Куратор практикума:

к. т. н. Астрелин В.Т.

Оценка за курсовую работу

«__»_____2019 г

Аннотация

Целью работы является исследование и реализация электрохимического метода обнаружения NO в жидких средах.

В ходе работы произведен обзор различных литературных источников, на основе которого выполнено сравнение различных методов детектирования NO в медицине, биологии и химии. Детально рассмотрен принцип работы кулонометрического (амперометрического) электрода типа Кларка. Экспериментально была проведена настройка и калибровка датчика (ISO-NOP), оценка влияния примесей, часто встречающихся в живых средах и внешних электрических полей.

Ключевые слова: оксид азота(I), амперометрический датчик, электрод типа Кларка.

Работа выполнена в лаборатории оптики и динамики биологических систем ФФ НГУ.

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор	5
1.1. Основные понятия электрохимии.....	5
1.2. Электрохимические датчики. Типы, устройство и принцип работы.....	6
1.3. Электрод типа Кларка	7
Глава 2. Экспериментальная часть.....	9
2.1 Настройка датчика.....	9
2.2 Исследование реакции датчика на примеси.....	11
2.3. Исследование реакции датчика на внешние электрические поля	13
2.4. Исследование скорости распада источника NO	16
Заключение	19
Список использованной литературы.....	20

Введение

Оксид азота (NO) это гидрофобный свободный радикал, обладающий коротким временем жизни, зависящим от присутствия окислителей, и выделяющийся в биологических системах. Например, он синтезируется в ферментативной реакции окисления L-аргинина, фермент – NO синтеза, в результате получается NO и L-цитрулин. NO играет множество различных ролей в физиологии и фармакологии. Начиная с 1987 года было обнаружено участие NO в огромном множестве биологических процессов, таких как передача нервных импульсов, регуляция кровяного давления, реакция иммунной системы, как посредник в противовоспалительной и противомикробной активности. Исследование концентрации NO так же позволяет обнаружить такие заболевания: сахарный диабет, болезнь Паркинсона и Альцгеймера. Важная биологическая роль оксида азота привела к разработке аналитических методов, дающих высокую чувствительность и селективность.

Измерение NO довольно проблематично, так как время жизни молекулы составляет примерно 5 секунд (водных растворах, насыщенных кислородом [2]), но в тоже время требуется высокая точность его временной концентрации. В настоящее время существует несколько методов измерения NO, однако большая их часть дает низкую чувствительность, требует дорогого оборудования и не дает возможности непрерывного измерения. Электрохимическое (амперометрическое) обнаружение NO является доступным и удобным способом измерения оксида азота в реальном времени с крайне малым влиянием от других веществ, имеющих сходное строение.

Цель работы: исследование концентрации оксида азота в водных средах при помощи электрохимического датчика.

Задачи:

- 1) Настройка установки и получение калибровочной кривой.
- 2) Моделирование процесса образования NO.
- 3) Изучение погрешностей, вносимых окружением и веществами, близкими по структуре к NO.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Основные понятия электрохимии

Все электрохимические методы основаны на реакциях на электродах или процессах между электродами, протекающими в электрохимической ячейке (в кулонометрии называют электролитической).

Электрод – токопроводящее тело, на поверхности которого возникает электродный потенциал. Причиной возникновения потенциала может быть либо электрохимическая реакция, либо изменение концентрации потенциалобразующих ионов в околоэлектродном пространстве.

Электрохимическая ячейка – система, состоящая как минимум из двух электродов, погруженных в раствор электролита (исследуемый раствор).

Количественные расчеты в кулонометрии базируются на законах Фарадея, которые устанавливают зависимость между массой вещества, выделившегося при электролизе, и количеством электричества, прошедшего через электролитическую ячейку.

Первый закон Фарадея: количество электропревращенного (восстановленного или окисленного в процессе электролиза) вещества прямо пропорционально количеству прошедшего электричества.

Второй закон Фарадея: массы различных веществ, выделенных или растворенных при прохождении одного и того же количества электричества, пропорциональны их электрохимическим эквивалентам. (Электрохимический эквивалент характеризует массу электропревращенного вещества при прохождении через раствор 1 Кл электричества)

Если измерено количество электричества, то, объединив два закона Фарадея, можно определить массу анализируемого вещества. Все электрохимические датчики основаны на использовании этих двух законов. В этой работе расчеты выполняются аппаратной частью установки.

Различают два основных вида кулонометрических определений: прямую кулонометрию (обычно выполняется в потенциалостатическом режиме, при

котором фиксируется ток протекающий через электроды с постоянными потенциалами) и кулонометрическое титрование - метод количественного/массового анализа, который часто используется в аналитической химии, основанный на измерении объема раствора реактива точно известной концентрации, расходуемого для реакции с определяемым веществом (в амперостатическом режиме – фиксируется изменение разности потенциалов при неизменяемом токе). В методах прямой кулонометрии анализируемое вещество непосредственно подвергается электрохимическому превращению. В кулонометрическом титровании определяемое вещество реагирует с титрантом, который получается в кулонометрической ячейке при электролизе специально подобранного раствора, такой титрант называется электрогенерированным кулонометрическим титрантом.

Определение количества электричества в потенциостатической кулонометрии осложняется изменением силы тока с понижением концентрации электроактивного вещества в процессе электролиза.

1.2. Электрохимические датчики. Типы, устройство и принцип работы.

Для измерения концентрации NO разработано и адаптировано огромное разнообразие конструкций. Их точное устройство варьируется в широких пределах, однако их все объединяет наличие твердой поверхности, способной к окислению или восстановлению NO при определенном напряжении и фильтра помех, в роли которого зачастую выступает NO проникаемая мембрана.

Можно выделить три основных группы электродов (см. Рис. 1): 1) типа Кларка, 2) твердый проникаемый, 3) твердый каталитический.

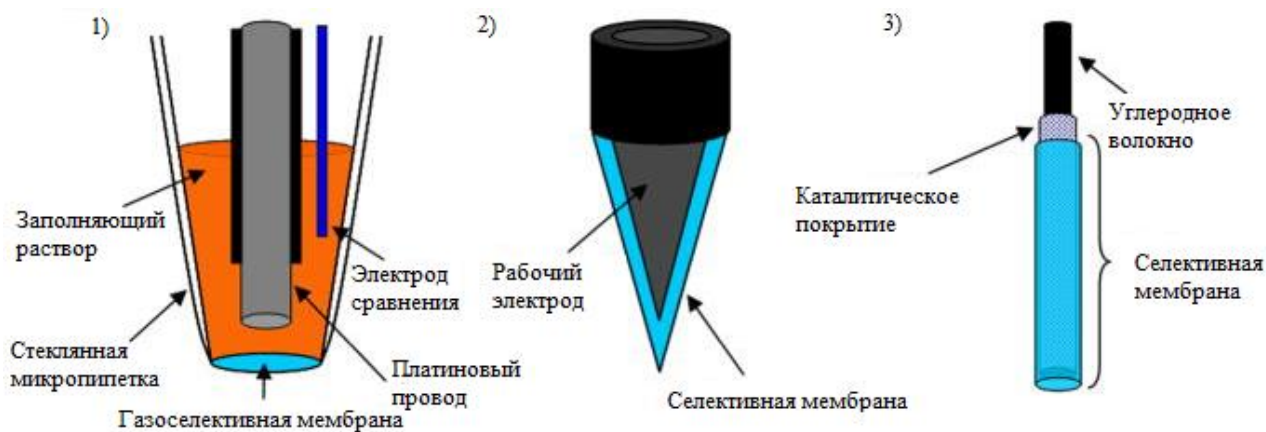


Рис. 1. Виды электродов

Первые датчики типа Кларка состояли из рабочего и контрольного проводов, помещенного в стеклянную пипетку, заполненную электролитом. Легкие газы, наподобие O_2 и N_2 , легко проходят через мембрану, и окисляются/восстанавливаются (в зависимости от напряжения) на платиновом электроде.

Твердые проницаемые электроды лишены электролита. Его изготавливают путем покрытия благородного металла селективной к интересующему веществу и гидрофобной мембраной. Наслоение различных мембран позволяет настраивать селективность датчика.

Каталитические электроды по конструкции схожи с проницаемыми, однако содержат медиатор, способный катализировать окисление и восстановление NO , что позволяет снизить величину необходимого электрохимического потенциала.

1.3. Электрод типа Кларка

В нашей работе мы применяли электрод типа Кларка (ISO-NOP). В современных версиях этого прибора стеклянная пипетка была заменена на оболочку Фарадея из нержавеющей стали, внутри которой близко к поверхности мембраны располагаются платиновый рабочий электрод и хлорсеребряный ($Ag/AgCl$) электрод сравнения. Такая прочная, по сравнению с оригиналом, конструкция позволила применить его во многих исследовательских приложениях.

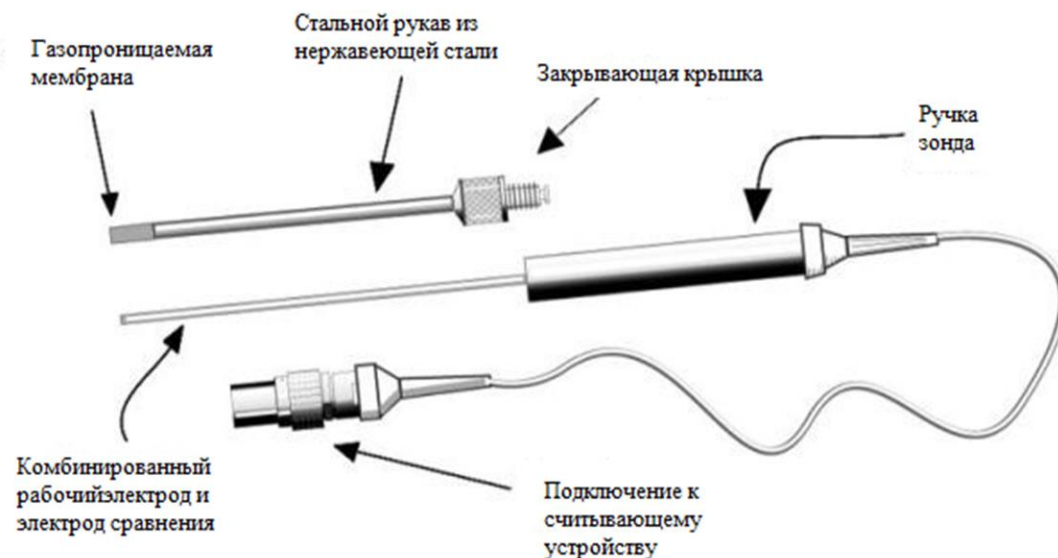
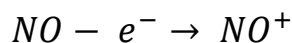


Рис. 2. Электрод типа Кларка

Работу датчика можно описать следующим образом:

- 1) Подготовленный датчик погружается в исследуемую среду.
- 2) NO проникает через проницаемую мембрану, попадая в электролит.
- 3) К рабочему электроду прикладывается потенциал ~ 865 мВ, под воздействием которого NO окисляется:



- 4) Т.к. NO является относительно сильной кислотой, он реагирует с OH превращается в нитрит:



- 5) Количество выделившихся электронов, образующих ток между электродами, пропорционально количеству NO, таким образом датчик измеряет количество NO в растворе.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Настройка датчика

Настройка датчика начинается с установления разности потенциалов при включении прибора и его «поляризации», процесса поворота диполей, присутствующих в заполняющем датчик растворе, во время которого базовый ток приходит к минимальным значениям. Этот процесс занимает больше 12 часов.

Калибровка датчика выполняется при помощи химической генерации заранее известного количества NO, в данной работе с помощью известного химического донора NO – DAE NONOate, который при растворении в водных растворах образует NO. Приготовление стокового раствора происходит непосредственно перед экспериментом, путем разведения сухого порошка в PBS (натрий-фосфатный буфер, используемый в биологических исследованиях).

Мы помещаем датчик в пробирку с известным объемом раствора PBS с $pH=7,4$, запускаем магнитную мешалку, расположенную внутри пробирки, на фиксированной частоте (5,5 оборот/сек), что обеспечит нам более однородное распределение NO в растворе.

После этого мы ждем стабилизации тока датчика (2-5 минут).

Добавляем в пробирку аликвоту донора NO (точно измеренный объем раствора с известной концентрацией донора). Инструкция предлагает использовать другие известные доноры NO, такие как KNO_2 или $NaNO_2$ в растворе H_2SO_4 с долгим временем разложения.

Тогда после добавления аликвоты ток начинал расти экспоненциально, достигая «плато» - состояния, в котором количество генерируемого NO совпадает с количеством исчезающего. Методика калибровки датчика предлагает добавление следующей аликвоты донора NO, и измерение нового уровня плато, однако, это корректно лишь для достаточно длительного процесса работы донора NO. В этом случае при добавления новых количеств NO

получаются ступеньки, соответствующие току при различных концентрациях NO в растворе (Рис.3).

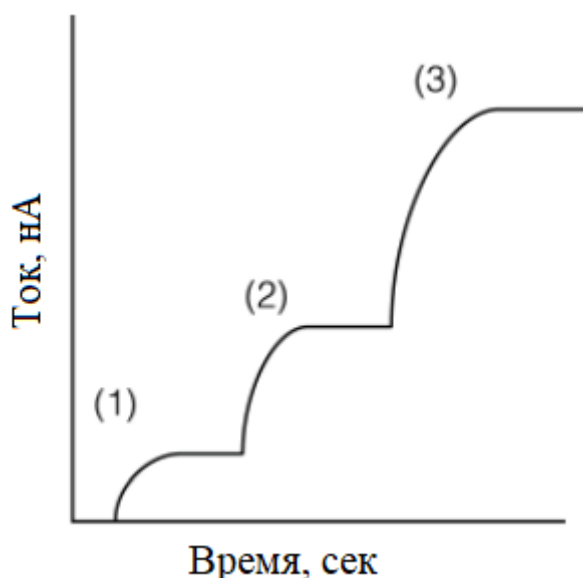


Рис. 3 Калибровочная кривая

Однако, взятый нами раствор (Diethylamine NONOate) реагирует намного быстрее, выделяя NO, за короткий промежуток времени. Этап спада уровня тока начинался вскоре после достижения максимального значения. Т.е. мы не сможем построить калибровочную кривую, постоянным добавлением к раствору новых объемов.

Мы добавляли первый объем аликвоты, когда значение тока достигало максимума, записывали значение и рассчитывали его разность с уровнем базового тока. Затем мы промывали датчик водой, заменяли раствор на чистый и повторяли процедуру при другом количестве аликвоты.

Все полученные значения записываем в таблицу (Таблица 1.):

Таблица 1 Измерение концентрации NO

V, мл	Val, мл	Vsum, мл	Abase, нА	Amax, нА	deltaA, нА	Cno, нМ
6,000	0,002	6,002	4,400	5,072	0,672	4,049
6,000	0,005	6,005	4,500	5,328	0,828	10,117
6,000	0,007	6,007	4,500	5,497	0,997	14,158
6,000	0,010	6,010	4,700	6,720	2,020	20,216
6,000	0,015	6,015	4,610	5,840	1,230	30,299

По экспериментальным данным была построена калибровочная кривая (Рис. 4):

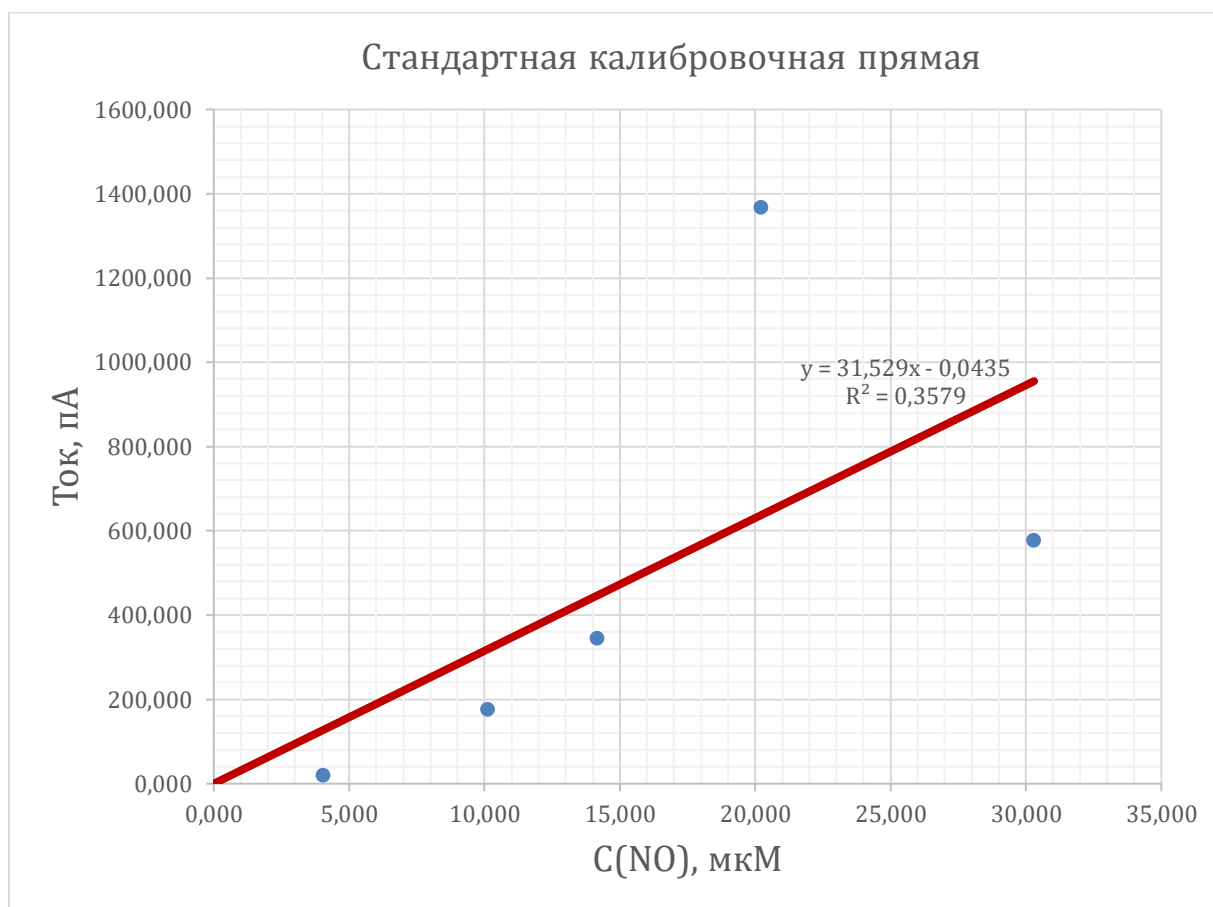


Рис. 4 Стандартная калибровочная прямая

Наклон этой кривой указывает на чувствительность датчика, составляющую $31,529 \frac{\text{пА} \cdot \text{л}}{\text{мкМоль}}$. Т.к. чувствительность датчика установлена он готов к использованию.

2.2 Исследование реакции датчика на примеси

Из различных примеров электрохимических датчиков NO, предназначенных для биологических применений, многие из них оказывались достаточно селективными к определяемому веществу. Степень, в которой конкретное вещество влияет на измерение NO, зависит от типа датчика, приложенного потенциала, характеристик проницаемой мембраны (то есть поверхностного заряда, пористости, гидрофобности и толщины) и предполагаемого биологического местоположения. Например, помехи от газообразного

кислорода имеют значение только в том случае, если NO измеряется посредством электро-восстановления, поскольку потенциал восстановления для NO и кислорода аналогично отрицателен. Наиболее часто встречаются в биологической среде такие мешающие виды как нитрит, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, дофамин и другие. Нитрит вызывает особую озабоченность, т.к. обладает сходным потенциалом, размером и высокой концентрацией в живых средах. Кроме того, нитрит является стабильным побочным продуктом самоокисления NO, что приводит к прямой зависимости между этими веществами. Окись углерода (CO) в равной степени проблематична из-за ее сходства с NO по размеру, гидрофобности, окислительному потенциалу и физиологическим функциям. Недавние исследования показали, что NO и CO регулируют друг друга посредством различных физиологических процессов [1]. В результате, Попытки исключить CO с использованием селективной для NO мембраны часто оказываются неудачными.

Мы проверили селективность нашего датчика на примере нитрита - NaNO_2 и H_2O_2 (перекись водорода). Показания датчика при добавлении этих веществ не давали сигнала, превышающего фоновый шум (Рис. 5).

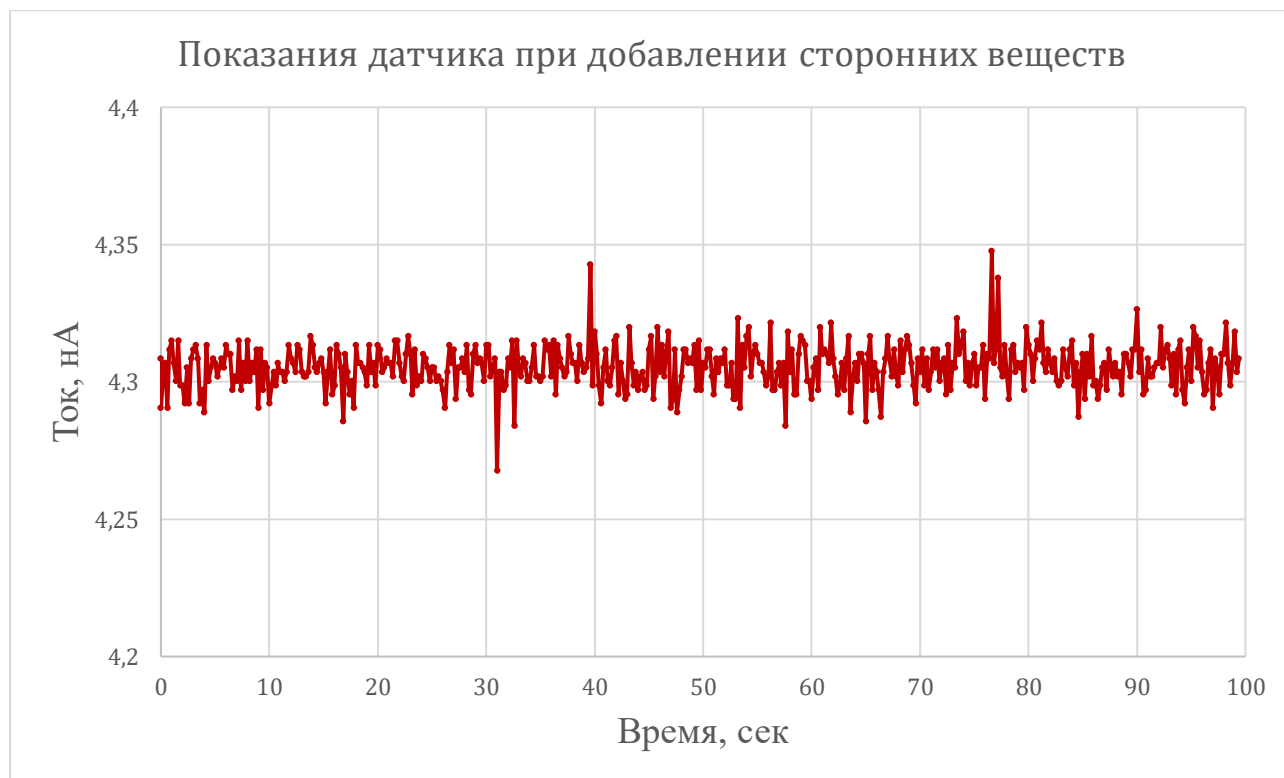


Рис. 5 Реакция датчика на посторонние вещества

2.3. Исследование реакции датчика на внешние электрические поля

В ходе работы замечена реакция датчика на внешние источники электростатического поля. Мы рассмотрели их влияние на полученные ранее измерения и тем самым смогли избавиться от некоторых «выбивающихся точек».

Рассмотрим некоторые из источников помех, оказавших наиболее сильное влияние.

1. Мы провели эксперимент для оценки влияния самого оборудования, его перемещения на поверхности стола во время хода эксперимента, в частности, стеклянных пробирок с реагентами:



Рис. 6 Реакция датчика на пробирки и бумагу

В результате выявлено, что погрешности (Рис. 6), связанные с перемещением предметов на поверхности стола может приводить к скачкам величины тока, достигающих от 16 до 30 процентов от разности между базовым и током плато.

Был поставлен эксперимент по исследованию влияния движения людей, находящихся на небольшом расстоянии от места проведения эксперимента, что, как выяснилось, тоже является сильным источником помех (Рис. 7):



Рис. 7 Реакция датчика на проходящего человека

На графике волнообразные пики, направленные вверх соответствуют удалению человека в шерстяном свитере (моделируемого заряженным шаром) на небольшое расстояние в 1 метр, а нижние – на 4 м. Это может привести к отклонениям значений на величину от 12 до 25 процентов.

2. Так же исследованы более резкие перемещения человека (заряженного шара), чему в полной мере соответствовали прыжки на высоту до 25 см (Рис. 8):

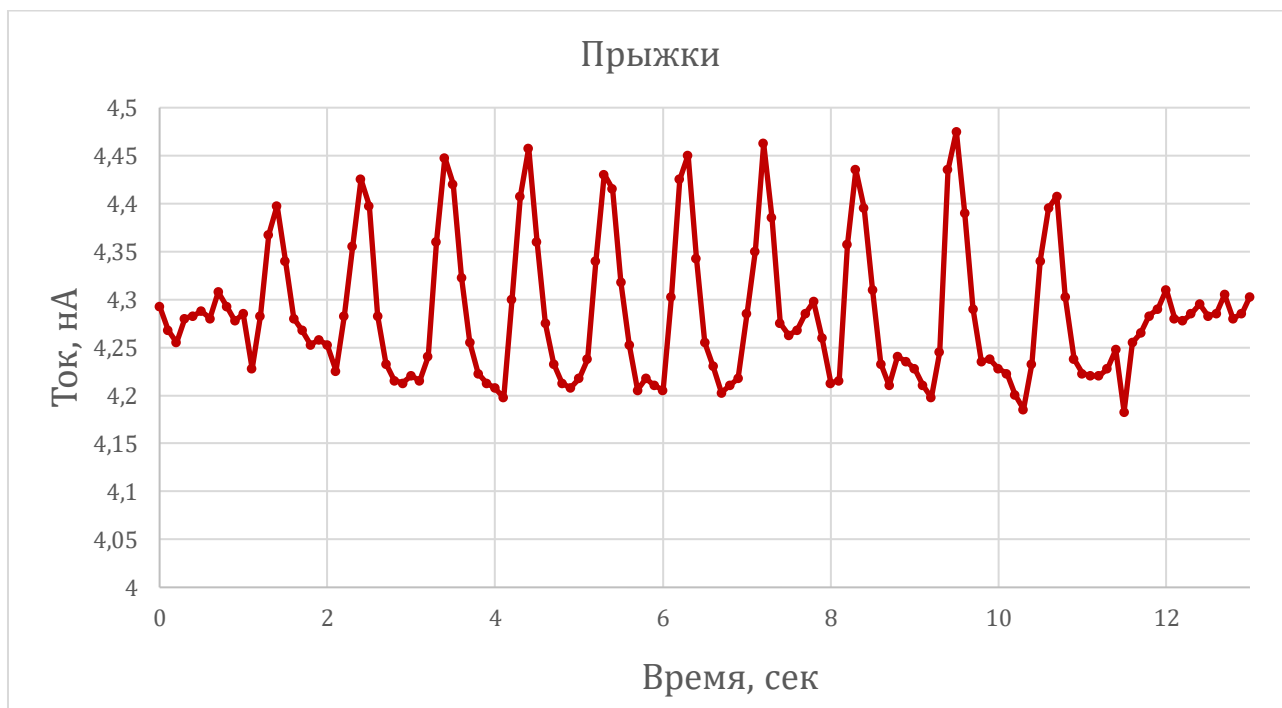


Рис. 8 Реакция датчика на прыжки человека

В данном случае отклонение может составлять от 13 до 25 процентов.

Интерес представляет тот факт, что сама оболочка датчика должна представлять из себя «клетку Фарадея», однако она не позволяет полностью избавиться от внешних полей. В дальнейшем для проведения экспериментов была использована металлическая пластина полукруглой формы, поставленная перед датчиком и погасившая значительную долю электростатических помех.

В процессе измерений была замечена одна особенность: первое измеряемое нами значение в серии экспериментов часто оказывается очевидно завышенным. Можно предположить, что в результате измерения мембрана частично «засоряется», поэтому дальнейшие измерения проходят с заниженным током, а также свое влияние может оказывать чрезвычайно быстрый распад донора NO. Данный факт требует дальнейшего исследования.

В калибровочной кривой первое измерение также оказалось значительно выше ожидаемого (Рис.4), исключив данную точку, калибровочная кривая принимает вид (Рис. 9):

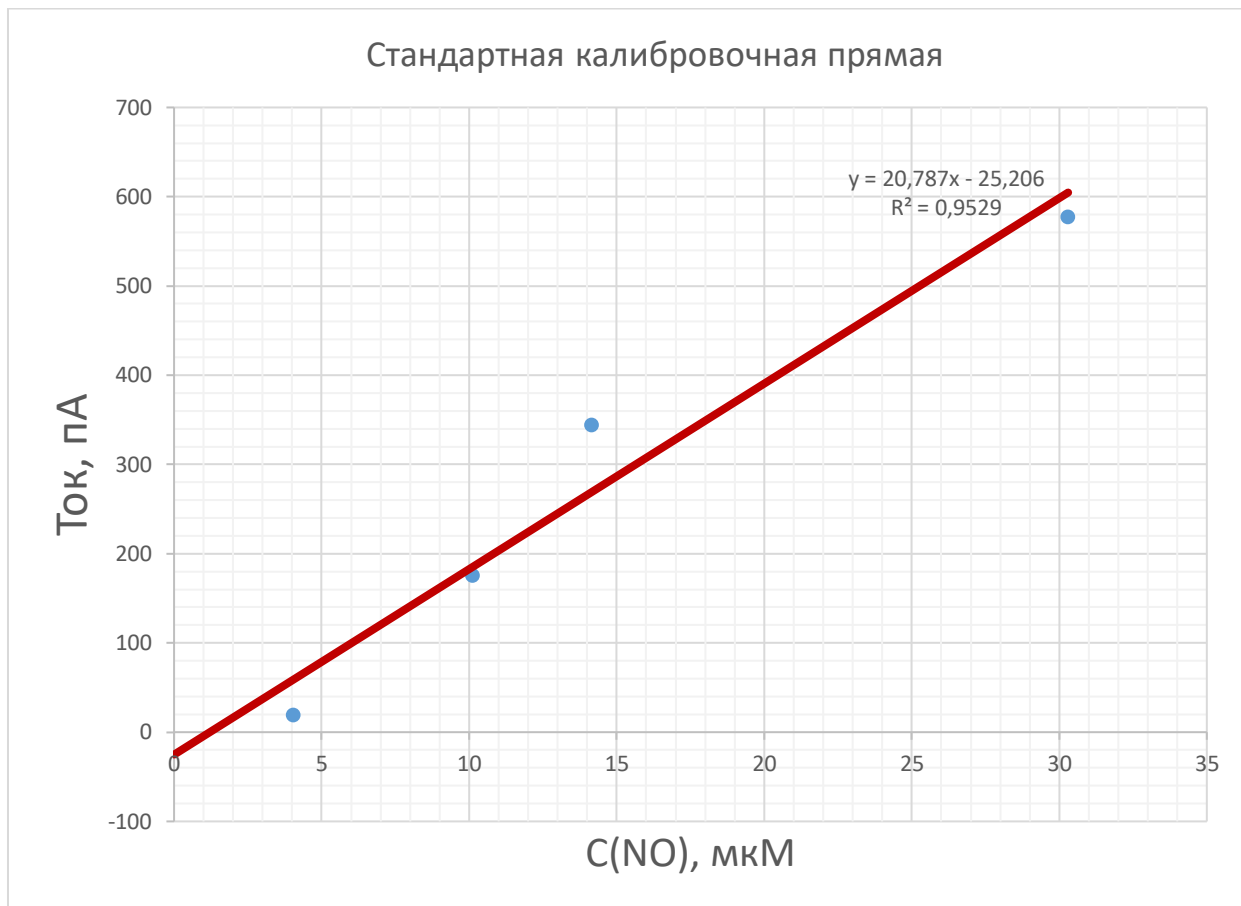


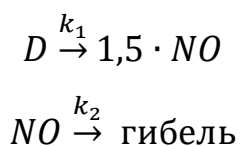
Рис. 9 Стандартная калибровочная прямая с выброшенной точкой

Чувствительность датчика таким образом составила – 20,787 (пА·л)/мкМоль.

2.4. Исследование скорости распада источника NO

Ранее мы упоминали о том, что взятый нами источник NO (Diethylamine NONOate) генерирует NO за короткий промежуток времени, но не может поддерживать это достаточно долго, а в следствие короткой продолжительности жизни NO (около 5 сек), концентрация так же быстро падает. В рамках простой модели выведем зависимость предполагаемого количества NO от времени в процессе распада донора NO.

Модель включает в себя процесс образования NO и процесс гибели NO в растворе (окисление растворенным в среде кислородом):



Где $D(t)$ – количество донора NO, $NO(t)$ – количество NO, x – стехиометрический коэффициент (количество образующихся молекул NO на одну молекулу донора), а k_1 и k_2 – коэффициенты скорости реакции:

$$D'(t) = -k_1 D(t)$$

$$NO'(t) = xk_1 NO(t) - k_2 NO(t)$$

Решая систему дифференциальных уравнений первого, мы получаем (Рис. 10):

$$D(t) = D_0 e^{-k_1 t}$$

$$NO(t) = \frac{D_0 x k_1 e^{-k_1 t} - k_2 t (e^{k_2 t} - e^{k_1 t})}{k_2 - k_1}$$

Зависимость концентрации донора NO и концентрации NO от времени имеет характерный вид:

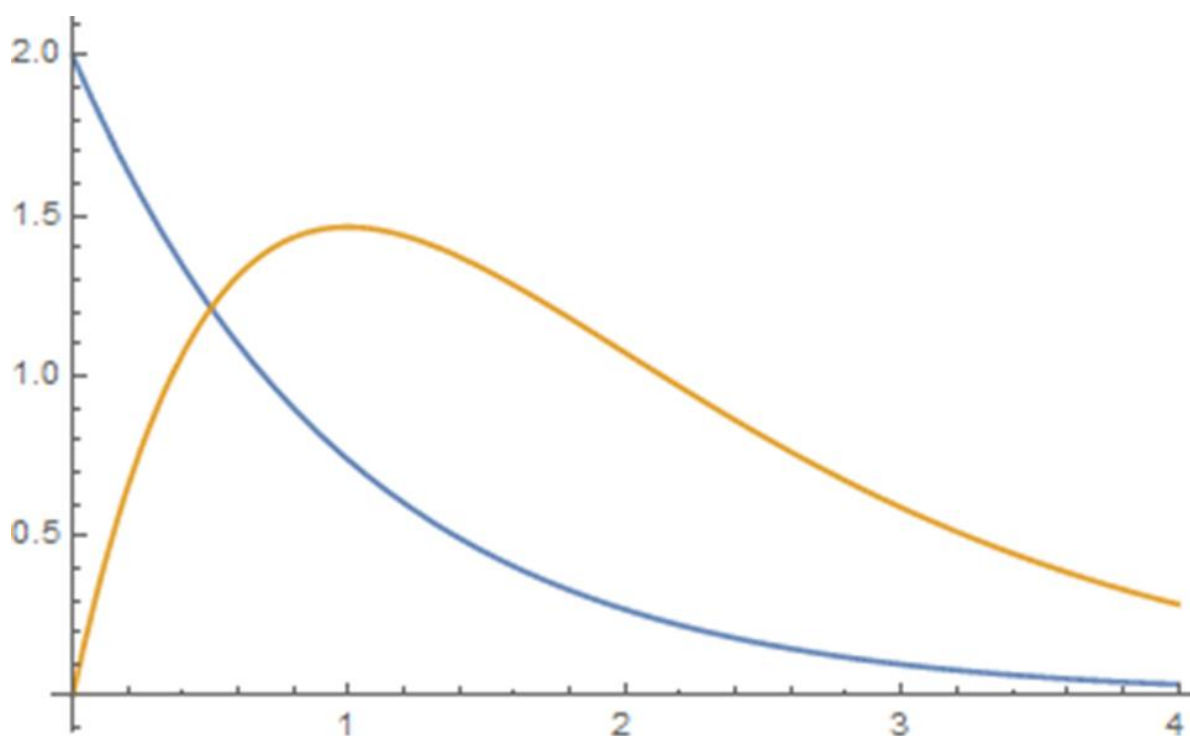


Рис. 10 Зависимости D и NO от времени

Методом наименьших квадратов в программе Origin найдены константы k_1 и k_2 , наилучшим образом описывающие экспериментальные данные (Рис. 11). За основу возьмем график, полученный при добавлении 5 мкл аликвоты с концентрацией $8,1 \frac{\text{мМ}}{\text{л}}$ в 6 мл PBS (50%), стехиометрический коэффициент $x = 1,5$.

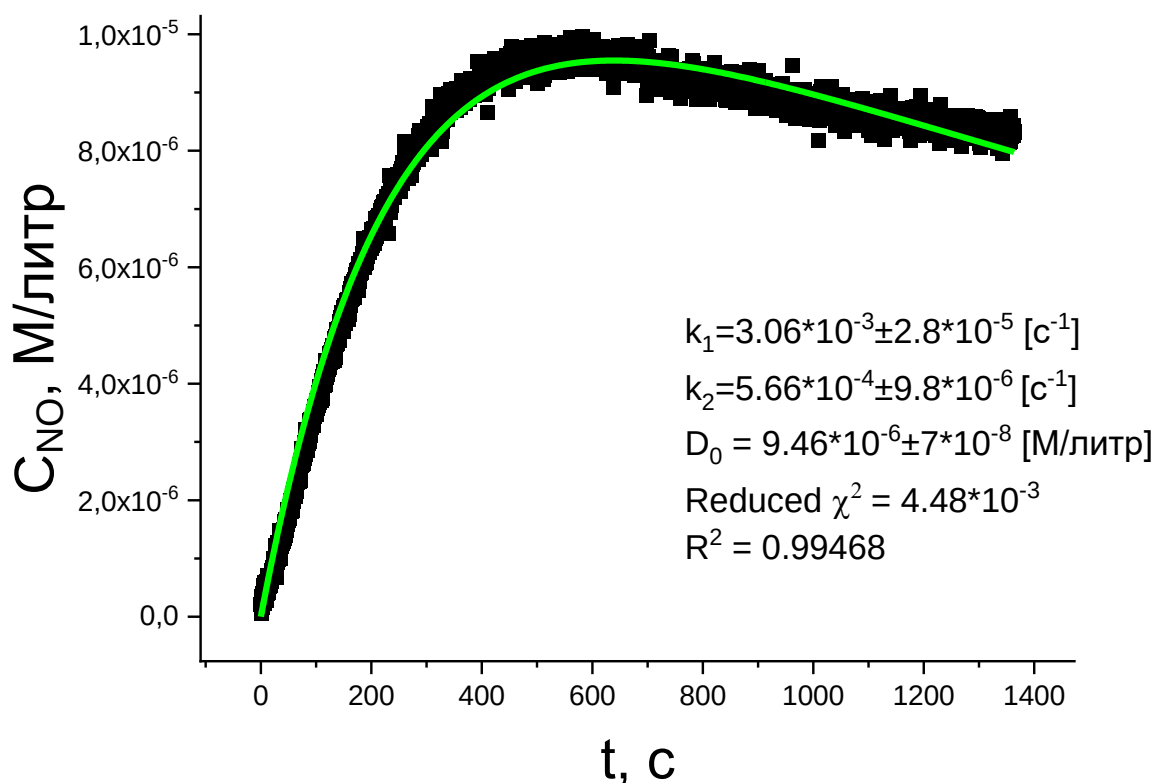


Рис. 11 Экспериментальная зависимость концентрации NO во времени (Черные точки). $D_0 = 6.7$ мкл, $V_{\text{аликвоты}} = 5$ мкл.. Модельная кривая образования NO (зеленая).

Таким образом, мы получаем $k_1 = 3,06 * 10^{-3} \pm 3 * 10^{-5} \frac{1}{c}$, $k_2 = 5,66 * 10^{-4} \pm 1 * 10^{-5} \frac{1}{c}$.

Для k_1 согласно литературным данным время полураспада 16 мин при комнатной температуре (22 °C) и pH=7,4, что совпадает с полученной нами величиной с точностью до порядка.

Коэффициент k_2 , напротив, получился значительно меньше ожидаемого $k_{2-\text{лит}} = 0,124 \pm 1 * 10^{-3} \frac{1}{c}$ [2]. Это связано в первую очередь с малой сложностью, взятой нами модели распада и потребностью во введения дополнительных параметров. Действительно, в модели не учитывались многие другие реакции, в которые вступает NO, что привело к неоднозначности фитирования.

Заключение

Целью данной курсовой работы являлось исследование и реализация метода электрохимического измерения NO в жидких средах.

В ходе выполнения данной курсовой работы были получены следующие результаты:

- 1) Произведен обзор различных литературных источников, на основе которого проведено сравнения различных методов и датчиков для измерения NO.
- 2) Экспериментально проведена настройка и калибровка датчика (ISO-NOP)
- 3) Проведена базовая оценка возможных источников погрешностей, совершающих большой вклад в измеряемые данные.
- 4) Выяснено, что использование экранирования от внешних помех в виде клетки Фарадея позволяет повысить точность результатов.

Как выяснилось, наши измерения соответствуют ожидаемым результатам, но имеют некоторые отличия, как следствие простоты описывающих процесс моделей.

Список использованной литературы

1. B. J. Privett, Jae Ho Shin, M. H. Schoenfisch. Tutorial Review: Electrochemical Nitric Oxide Sensors for Physiological Measurements // Chem Soc Rev – 2010. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569000/> (дата обращения 14.12.2019).
2. M. Feelisch, J.S. Stamler. Methods in Nitric Oxide Research. // John Wiley & Sons Ltd – 1996.
3. M.J. Serpe, Xueji Zhang. Chapter 21 The Principles, Development and Application of Microelectrodes for the In Vivo Determination of Nitric Oxide // CRC Press/Taylor & Francis – 2007. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2566/> (дата обращения 14.12.2019).
4. Zishuo Cheng, A.P. Landry, Yiming Wang, Huang Ding. Binding of Nitric Oxide in CDGSH-type [2Fe-2S] Clusters of the Human Mitochondrial Protein Miner2 // J Biol Chem – 2017. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5336151/> (дата обращения 14.12.2019).
5. Дмитриевич И.Н., Пругло Г.Ф., Фёдорова О.В, Комиссаренков А.А. Физико-химические методы анализа. Ч.I. Электрохимические методы анализа: учебное пособие для студентов очной формы обучения // СПб ГТУРП. – СПб – 2014.