

MASTER

Metingen van gelijktijdig zuurstof- en kooldioxidetransport in hemoglobine-oplossingen

Heijnen, J.

Award date:
1983

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

8181491

METINGEN VAN GELIJKTIJDIG
ZUURSTOF- EN KOOLDIOXIDETRANSPORT
IN HEMOGLOBINE-OPLOSSINGEN

Verslag van het afstudeerwerk van J. Heijnen
Vakgroep Analyse van Fysische Meetmethoden
Afdeling Natuurkunde, Technische Hogeschool,
Eindhoven

Het afstudeerwerk werd verricht binnen de afdeling
Fysiologie van de Katholieke Universiteit Nijmegen

Afstudeerhoogleraar: Prof. Dr. J.A. Poulis
Coördinatie: Dr. ir. H.J. van Ouwerkerk
Begeleiding: Dr. P.M. Breepoel
ir. J.H.G.M. de Koning

Nijmegen, april 1981

INHOUD

BLZ.

SAMENVATTING	
1. INLEIDING	1
1.1. CO ₂ en water	1
1.2. CO ₂ -transport door water	1
1.3. CO ₂ -transport door eiwitoplossingen	2
1.4. O ₂ en hemoglobine	3
1.5. O ₂ -transport door hemoglobine-oplossingen	4
1.6. O ₂ - en CO ₂ -transportinteractie	6
2. THEORIE VAN DE MEETOPSTELLING	7
2.1. Inleiding	7
2.2. Transport door inerte lagen	8
2.3. Transport door niet-inerte lagen	11
2.4. Principe-beschrijving van de permeabiliteitsmetingen	13
3. MEETOPSTELLING	19
3.1. Inleiding	19
3.2. Diffusiecel	21
3.2.1. Vullen van de diffusie laag	22
3.2.2. Dikte van de diffusie laag	22
3.2.3. Bevochtiging van de gassen	26
3.3. O ₂ -detectie	27
3.4. CO ₂ -detectie	34
4. METINGEN EN RESULTATEN	38
4.1. Metingen aan kunststoflagen	38
4.1.1. Metingen aan Silastic	38
4.1.2. Metingen aan teflon	38
4.1.3. Metingen aan MEM 213	40
4.2. Metingen aan waterlagen	41
4.3. Metingen aan hemoglobine-oplossingen	43
4.4. CO ₂ -gevoeligheid O ₂ -electroden	48
4.5. Convectie-verschijnselen	49
5. CONCLUSIES	51
APPENDIX 1: Afleiding van formules 2.16 en 2.17	53
APPENDIX 2: Meting van gasstroom F ₂	55
REFERENTIES	58

SAMENVATTING

Gelijktijdig O_2 - en CO_2 -transport door laagjes hemoglobine-oplossing beïnvloeden elkaar. Elk van de diffusiefluxen afzonderlijk wekt een elektrische potentiaalgradiënt in de laag op. In de stationaire toestand zijn beide fluxen gerelateerd aan dezelfde potentiaalgradiënt.

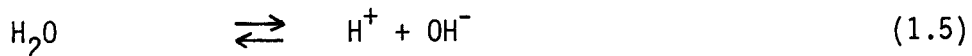
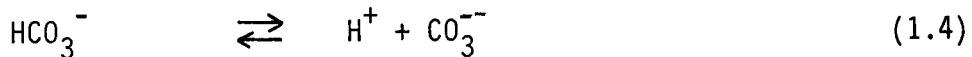
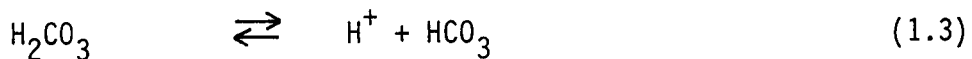
Er is een meetopstelling ontwikkeld om gelijktijdig O_2 - en CO_2 -transport door hemoglobine te meten. O_2 -detectie gebeurt polarografisch; de CO_2 -concentraties worden pH-statisch bepaald. Het is mogelijk gebleken O_2 - en CO_2 -permeabiliteiten van hemoglobine-oplossingen te meten. De spreiding in de resultaten voor verschillende laagjes is echter groot.

Er blijkt geen significante invloed te zijn van gelijkgericht CO_2 -transport op O_2 -transport, maar er is een duidelijke beïnvloeding gemeten wanneer CO_2 tegengesteld aan O_2 diffundeert (de zuurstofflux wordt met ongeveer 400 % verhoogd). Een O_2 -flux verhoogt, zowel in gelijke als tegengestelde richting, de CO_2 -flux met ongeveer 70 %.

1. INLEIDING

1.1. CO_2 en water

Wanneer kooldioxide (CO_2) oplost in water, stellen zich de volgende evenwichtsreacties in:



De concentraties van elk van de genoemde species zijn in de evenwichtssituatie aan elkaar gerelateerd d.m.v. de evenwichtsconstanten K_i ($i = 1, 2, 3, 4, W$).

1.2. CO_2 -transport door water

Het transport van CO_2 door een waterlaag is groter dan men verwacht op grond van de diffusiecoëfficiënt en de oplosbaarheid van dit gas. De oorzaak van deze zogenaamde facilitatie moet gezocht worden in de rol die de bicarbonaationen (HCO_3^-) bij het CO_2 -transport spelen. Een aangelegd CO_2 -concentratieverschil over de laag heeft volgens vgl. 1.1. t/m 1.5 tevens concentratiegradiënten, en dus fluxen, van de species HCO_3^- , CO_3^{--} , H_2CO_3 , H^+ en OH^- tot gevolg. Wanneer de niet-evenwichtseffecten in de laag verwaarloosbaar zijn (d.w.z. in aanwezigheid van het enzym carbo-anhydrase of bij laagdikten > 1 cm (ref. 19, 21) leveren bij fysiologische waarden van de pH (pH = 7.2-7.4) voornamelijk de HCO_3^- -ionen een aanzienlijke

bijdrage tot het totale CO_2 -transport. Volgens Enns (ref. 16) kan deze facilitatie tot een factor 10 oplopen, terwijl Suchdeo en Schultz (ref. 15) een verhoging van 15 à 50 keer gemeten hebben.

De diffusiecoëfficiënten van de geladen species zijn niet gelijk. Er treden derhalve ladingsverschuivingen op (over afstanden in de grootte-orde van molecuulafstanden) die een elektrische potentiaal genereren (ref. 17). De ontstane potentiaal heeft een invloed op de beweging van de HCO_3^- -ionen en zal de facilitatie van het CO_2 -transport veranderen.

1.3. CO_2 -transport door eiwitoplossingen

Wanneer naast CO_2 en de daaruit gevormde ionen tevens eiwitten in de oplossing aanwezig zijn, wordt de situatie ingewikkelder. Eiwitten kunnen H^+ -ionen uitwisselen met het milieu en daardoor een aanzienlijke gemiddelde lading bezitten, afhankelijk van de pH. Zij bufferen de protonen die bij vorming van HCO_3^- uit reacties 1.3 en 1.4 vrijkomen en worden daardoor positiever geladen. De pH-gradiënt die bij het CO_2 -transport optreedt heeft dus tevens een ladingsgradiënt van het eiwit in de laag tot gevolg. Omdat de mobiliteiten van de HCO_3^- -ionen en de H^+ -transporterende eiwitmoleculen verschillend zijn, zal ook nu een elektrische potentiaal ontstaan die de HCO_3^- -ionen afremt en zo de facilitatie van het CO_2 -transport verkleint (ref. 10). Het optreden van potentialen bij CO_2 -diffusie in proteïneoplossingen werd door experimenten van De Koning e.a. (ref. 9) bevestigd.

Het eiwit hemoglobine (Hb) dat in de rode bloedcellen van het menselijk en dierlijk lichaam voorkomt beïnvloedt het CO_2 -transport

op de hier beschreven manier. De rol van Hb als carrier van CO_2 is gering; carbaminaten spelen t.a.v. CO_2 -transport bij fysiologische pH-waarden een ondergeschikte rol t.o.v. de facilitatie d.m.v. bicarbonaationen (~12 % van het totale CO_2 -transport bij menselijk hemoglobine (Bauer ref. 18)).

1.4. O_2 en hemoglobine

Anders is de situatie wat betreft zuurstoftransport (O_2) door Hb-oplossingen. Hemoglobine kan via de evenwichtsreactie

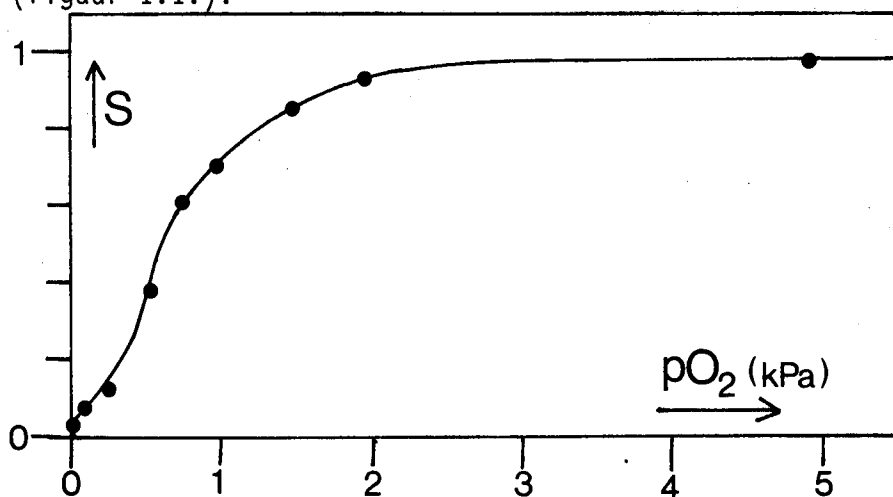


zuurstof reversibel binden. De ligging van dit evenwicht wordt uitgedrukt in de saturatiegraad S:

$$S = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{Hb}] + [\text{HbO}_2]} \quad (1.7)$$

[i]: concentratie species i (mol cm^{-3})

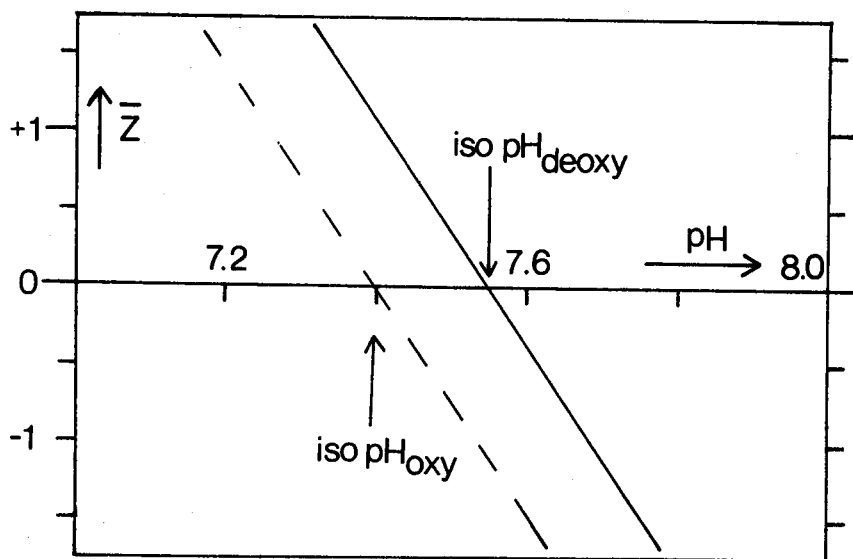
S is een functie van de heersende partiële zuurstofdruk, $p\text{O}_2$. Men geeft dit verband vaak weer in de zogenaamde zuurstofbindingscurve van het eiwit (figuur 1.1.).



Figuur 1.1. Voorbeeld van een zuurstofbindingscurve van zoutvrij runderhemoglobine. Hb = 2.43 mmol/l. T = 298 K.

Hb en HbO_2 zijn zwakke zuren. HbO_2 is sterker zuur dan Hb: opnemen van O_2 -moleculen bevordert het afstaan van protonen. Een hogere zuurstofdruk correspondeert dus met een lagere pH, bij gelijkblijvende gemiddelde lading van het proteïne.

Het HbO_2 -molecuul heeft bij gelijkblijvende pH een lagere lading dan het Hb-molecuul. Dit is te zien in de titratiecurven, waar de gemiddelde lading (\bar{z}) van een species als functie van de pH wordt weergegeven (figuur 1.2).



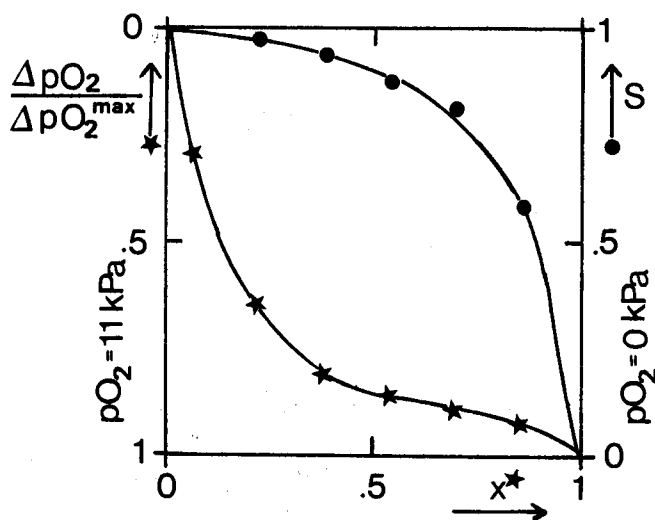
Figuur 1.2. Titratiecurven van oxy- (-----) en deoxyhemoglobine (———).

De iso-pH is de waarde van de pH waarbij de moleculen van betreffende species gemiddeld ongeladen zijn.

1.5. O_2 -transport door hemoglobine-oplossingen

O_2 kan onder invloed van een concentratieverschil zowel in opgeloste vorm als chemisch gebonden aan het hemoglobinemolecuul door een Hb-oplossing diffunderen. De verhouding van de HbO_2 -flux en de inerte O_2 -flux heet de facilitatie.

Een partiële zuurstofdrukgradiënt over een laag Hb-oplossing heeft een $[\text{HbO}_2]$ -gradiënt en daardoor ook een pH-gradiënt tot gevolg. We nemen thans, voor het gemak, aan dat er, afgezien van H^+ en OH^- , geen andere vrije ionen in de oplossing aanwezig zijn (zoutvrije Hb-oplossing). Figuur 1.3 toont zo'n laag waardoor een stationaire O_2 -flux J_{O_2} gaat. (De $[\text{O}_2]$ - en $[\text{HbO}_2]$ -profielen zijn te berekenen wanneer men bij een bekende $S(p\text{O}_2)$ op elke plaats in de laag de continuïteitsvergelijking m.b.t. O_2 toepast).



Figuur 1.3. Zuurstofdruk- en saturatieprofiel in een hemoglobinelag.
 $\Delta p\text{O}_2 = p\text{O}_2(x^*) - p\text{O}_2(0)$. $x^* = x/L$, x = positie in laag,
 L = laagdikte (naar ref. 11).

Aan de kant van de laag waar een hoge $p\text{O}_2$ heerst ($x^*=0$) verloopt de reactie



terwijl aan de lage zuurstofdrukkant ($x^*=1$) het O_2 weer vrijkomt:



Migratie van oxyhemoglobine in de richting van afnemende $p\text{O}_2$ en deoxyhemoglobine tegengesteld daaraan betekent verplaatsingen van (ongelijk) geladen species in de laag, waarvan de ladingen tijdens het transport

zullen veranderen t.g.v. het doorlopen van een pH-gradiënt.

Theoretische modellen die deze complexe diffusieprocessen beschrijven zijn gebaseerd op de Nernst-Planck vergelijking. Hoofd e.a. (ref. 11, 12) concluderen dat deze transporten gepaard gaan met potentiaalgradiënten in de laag, die op hun beurt, afhankelijk van zout- en proteïneconcentraties, de facilitatie van O_2 -diffusie veranderen.

1.6. O_2 - en CO_2 -transportinteractie

Uit het voorafgaande blijkt dat de rol van hemoglobine bij zuurstoftransport anders is dan bij kooldioxidetransport. Het optreden van elektrische diffusiepotentialen is echter in beide gevallen evident. Breepoel (ref. 11) heeft bij O_2 -diffusie door zoutvrije Hb-lagen (1.75 mm dik) potentiaalverschillen in de grootte-orde van 4 mV over de laag gemeten. Soortgelijke metingen bij CO_2 -diffusie door Hb-oplossingen (zoutvrij, dikte = 1 mm) tonen potentialen van ongeveer 30 mV (De Koning e.a., ref. 9).

Gelijktijdige stationaire O_2 - en CO_2 -diffusie induceren één elektrische potentiaalgradiënt in de laag. Onderlinge beïnvloeding van de twee transporten is waarschijnlijk, waarbij - gezien de grootte van de potentiaalverschillen - de invloed van CO_2 - op O_2 -transport groter zal zijn dan de invloed van O_2 - op CO_2 -transport.

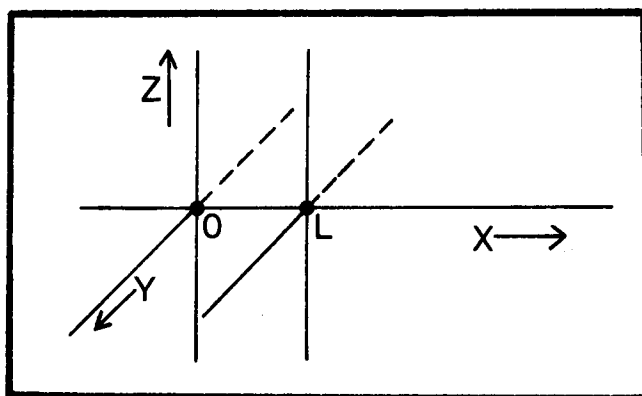
Zonder verder in te gaan op de theorie m.b.t. deze electrostatische interactie, die tot op heden is ontwikkeld, wordt in dit verslag de ontwikkeling van een experimentele methode beschreven, waarmee de genoemde interactie onder bepaalde condities bepaald kan worden.

2. THEORIE VAN DE MEETOPSTELLING

2.1. Inleiding

Bij de beschrijving van O_2 - en CO_2 -transport door verscheidene media zullen we steeds uitgaan van een eindimensionaal model. Dat wil zeggen dat het medium (kunststof, water, Hb-oplossing) in 3 dimensies als volgt is begrensd:

$$\begin{aligned} 0 &\leq x \leq L \\ -\infty &< y < +\infty \\ -\infty &< z < +\infty \end{aligned} \quad (2.1)$$



Figuur 2.1. Eindimensionaal diffusiemodel.

Het transport vindt plaats in de x-richting. Dit model komt in grote lijnen overeen met de configuratie van de transportexperimenten; hoewel de y en z-coördinaat dan vanzelfsprekend niet onbegrensd zijn, zijn de afmetingen in deze richtingen vele malen groter dan de laagdikte L. Voor $x > L$ en $x < 0$ bevinden de te transporteren stoffen zich in de gasfase. Deze bestaat uit mengsels van O_2 , CO_2 , N_2 en H_2O -damp. Elk van deze componenten representeert een partiële gasdruk p. We veronderstellen dat de ideale gaswet en de wet van Dalton gelden in de gehele gasfase, en nemen verder aan dat de temperatuur uniform en constant is. Dan geldt:

$$p_{CO_2} + p_{O_2} + p_{N_2} + p_{H_2O} = p_{bar} \quad (\text{Dalton}) \quad (2.2)$$

p_{bar} is de barometerdruk. In het vervolg zullen we echter met een andere grootte, p_{totaal} , werken:

$$p_{\text{CO}_2} + p_{\text{O}_2} + p_{\text{N}_2} = p_{\text{totaal}} = p_{\text{bar}} - p_{\text{H}_2\text{O}} \quad (2.3)$$

Omdat $p_{\text{H}_2\text{O}}$ (= de verzadigingsdampspanning van water bij de heersende temperatuur) overal dezelfde is, is p_{tot} in de gasfase uniform.

2.2. Transport door inerte lagen

We noemen een laag inert t.o.v. een getransporteerde stof wanneer die stof geen chemische reacties met species in die laag aangaat. Zo zijn kunststoffen als Teflon en Siliconenrubber inert voor O_2 , CO_2 en N_2 . Waterlagen zijn inert voor O_2 en N_2 , en Hb-oplossingen slechts voor N_2 .

Volgens de eerste diffusiewet van Fick zal een locale concentratiegradiënt van een bepaalde stof resulteren in een verplaatsing van die stof in de richting van kleiner wordende concentraties. Dit is een direct gevolg van de Brownse beweging van de moleculen van die stof. In formulevorm:

$$J_i = -D_i \frac{dC_i}{dx} \quad (2.4)$$

J_i : fluxdichtheid van stof i ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

D_i : diffusiecoëfficiënt van het medium voor stof i ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

C_i : $[i]$ = concentratie van stof i (mol cm^{-3})

Concentraties van stoffen zijn niet continu aan het grensvlak van twee media met verschillende transporteigenschappen. Partiële drukken zijn dit wel. De relatie tussen deze twee grootheden wordt gegeven door de wet van Henry:

$$C_i = \alpha_i \cdot p_i \quad (2.5)$$

p_i : partiële druk van stof i (kPa)

α_i : oplosbaarheid van gas i in het medium ($\text{mol cm}^{-3} \text{kPa}^{-1}$)

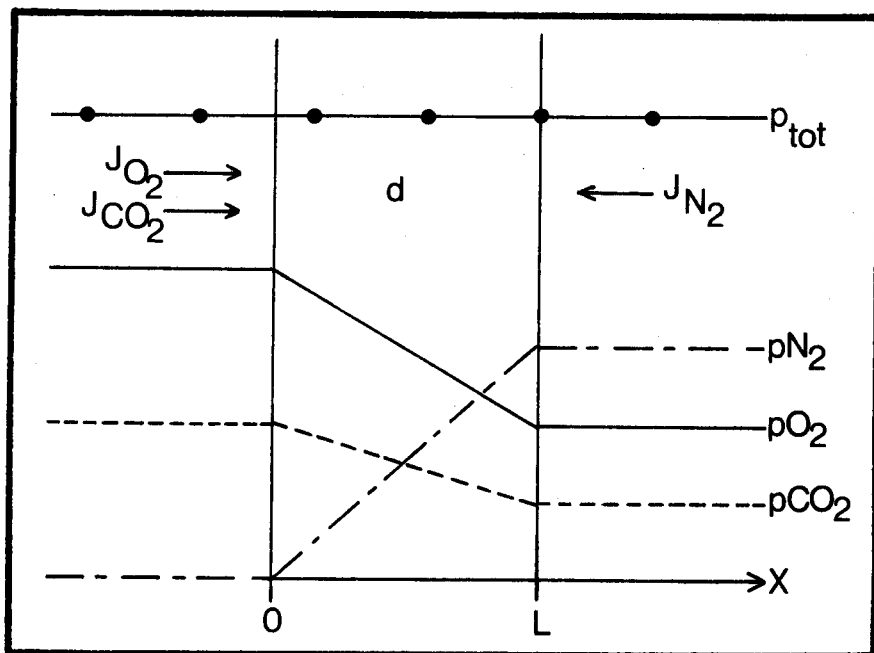
We werken in het vervolg niet met vgl. 2.4, maar met

$$J_i = -P_i \cdot \frac{dp_i}{dx} \quad (2.6)$$

P_i : permeabiliteit van het medium voor stof i ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$).

Uit vgl. 2.4 t/m 2.6 volgt

$$P_i = \alpha_i D_i \quad (2.7)$$



Figuur 2.2. Profielen van partiële N_2 -, O_2 - en CO_2 -drukken en van P_{totaal} .

Figuur 2.2. geeft de situatie waarin een inerte laag d omgeven is door de gasmengsels:

$$\begin{aligned} x < 0 : & \quad p_{\text{O}_2}(x=0), p_{\text{CO}_2}(x=0), p_{\text{N}_2}(x=0) \\ x > L : & \quad p_{\text{O}_2}(x=L), p_{\text{CO}_2}(x=L), p_{\text{N}_2}(x=L) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Langs de verticale as zijn de partiële drukken uitgezet, langs de horizontale de positie x . In de stationaire toestand, d.w.z. het geval waarin de beschouwde grootheden geen tijdsafhankelijkheid vertonen, zullen de drukprofielen van de verschillende componenten in de laag rechte lijnen

zijn. Dit volgt uit integratie van vgl. (2.6), aannemende dat P_i geen functie van x (dus homogeen) is. Sommatie leert dat

$$\sum_i P_i = P_{\text{totaal}} \quad (2.9)$$

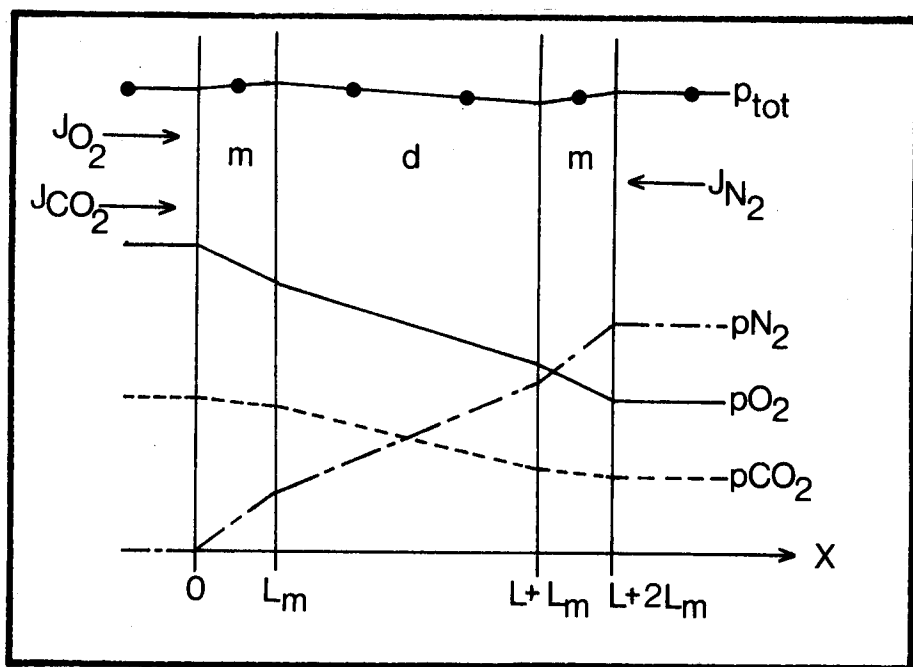
voor alle x .

De permeabiliteiten P_{O_2} , P_{CO_2} , P_{N_2} zijn i.h.a. niet aan elkaar gelijk. Er zal daarom een netto stoftransport in 'n bepaalde richting optreden, d.w.z.

$$\sum_i J_i \neq 0 \quad (2.10)$$

In de stationaire toestand betekent dat, dat er aan een kant van de laag voortdurend gas aangevoerd en aan de andere kant voortdurend afgevoerd wordt.

Vooruitlopend op de werkelijke geometrie van de laagjes beschouwen we het geval waarin de laag d (dikte L) omgeven is door twee lagen m (de ondersteunende membranen, dikte L_m). In figuur 2.3 is deze situatie geschetst.



Figuur 2.3. Partiële en totale drukprofielen in een inerte samenstelling.

Zowel m als d zijn inert voor de genoemde gassen. Omdat de transport-eigenschappen, met name de permeabiliteiten, van de laag d (P_i) en de membranen (P_m) verschillen, geldt vgl. (2.9) niet meer voor alle x. We leggen immers slechts de randvoorwaarden bij $x \leq 0$ en $x \geq L + 2 L_m$ op; de andere partiële drukken stellen zich zodanig in dat $J_i = \text{constant}$ voor alle x. Dit resulteert in een totaal druk binnen de laag die kan afwijken van de totaal druk in de gasfase.

In bovenstaand geval wordt de grootte van de diffusieflux J_i bepaald door zowel de diffusieweerstand van de laag als die van de membranen. Continuïteit van de flux J_i vereist dat

$$\frac{L + 2 L_m}{\bar{P}_i} = \frac{2 L_m}{P_{mi}} + \frac{L}{P_i} \quad (2.11)$$

P_i : permeabiliteit van laag d voor stof i

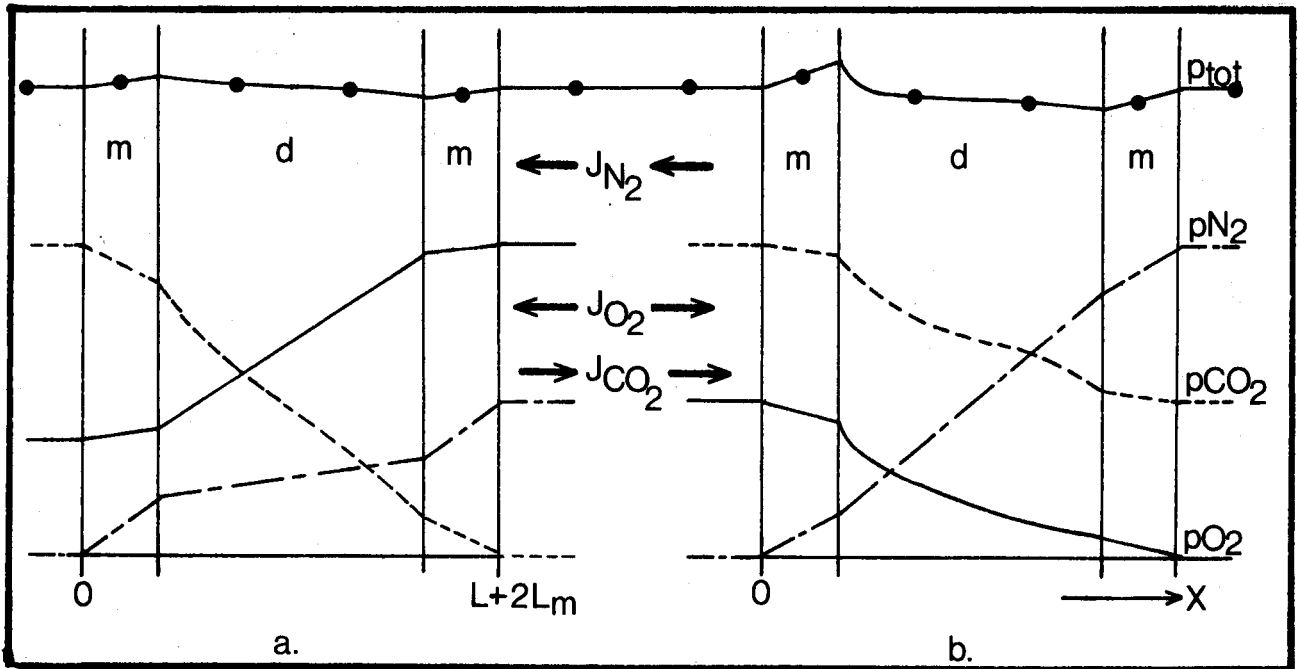
P_{mi} : permeabiliteit van membraan voor stof i

\bar{P}_i : gemiddelde permeabiliteit van de samengestelde laag.

Met behulp van vgl. (2.11) kan men P_i berekenen, wanneer men P_{mi} en \bar{P}_i (uit experimenten) kent.

2.3. Transport door niet-inerte lagen

Beschouwen we vervolgens een niet-inerte laag d, omgeven door 2 inerte, ondersteunende membranen. Figuren (2.4. a en 2.4. b) geven een beeld van enkele mogelijke steady-state configuraties. In fig. (2.4. a) is d een waterlaagje, waarin het O_2 -transport tegengesteld gericht is aan dat van CO_2 (counter-current transport). Fig. (2.4. b) toont co-current transport van O_2 en CO_2 door een laag hemoglobine-oplossing. Merk op dat de drukgradiëntprofielen in de (inerte) membranen rechte lijnen moeten zijn. Verder is de totaal druk binnen de laag i.h.a. niet uniform.



Figuur 2.4.a. Partiële en totale drukprofielen in een waterlaag.

Figuur 2.4.b. Partiële en totale drukprofielen in een hemoglobine laag.

Het is onjuist om te spreken van de permeabiliteit P_i van een laag voor stof i , wanneer deze laag niet-inert is. Vgl. (2.5) heeft slechts locale geldigheid en bovenstaande figuren tonen dit aan. Wanneer men echter toch een indruk wil hebben van het stoftransport J_i per eenheid van diffusieweglengte en per eenheid van drijvende kracht (= het partiële drukverschil), kan men een effectieve permeabiliteit definiëren:

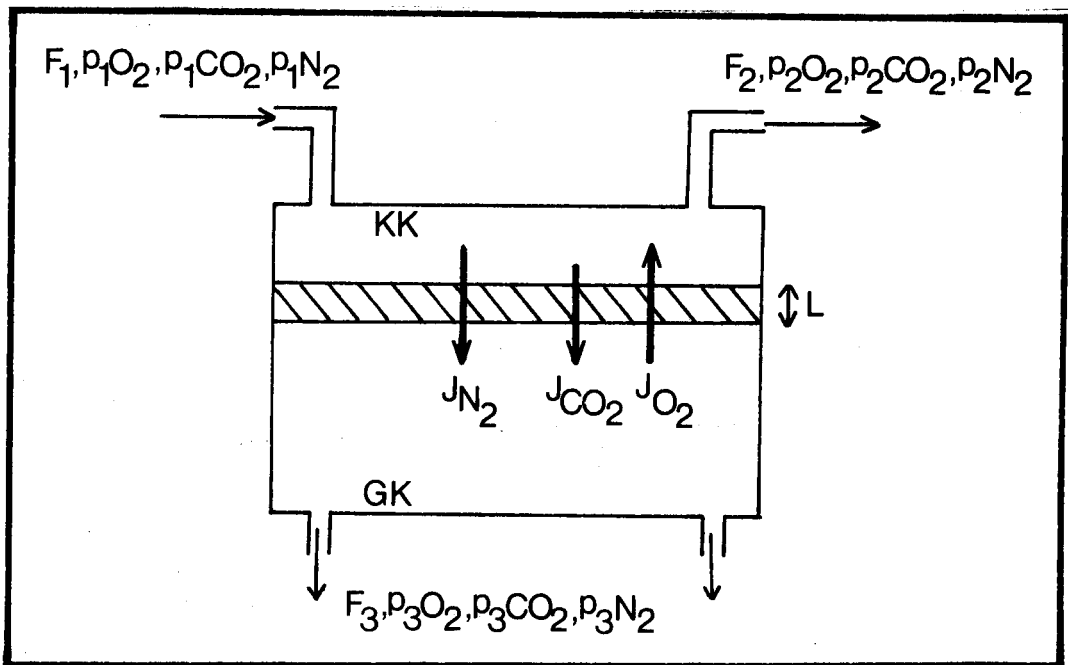
$$p_i^{eff} := \frac{J_i \cdot L}{p_i(x=L+L^m) - p_i(x=L^m)} \quad (2.13)$$

p_i^{eff} bevat naast informatie over het inerte transport ook effecten van facilitatie en elektrische diffusiepotentialen. De laatste twee zullen niet alleen bepaald worden door het drukverschil over de laag, maar tevens door de waarden van de randcondities. p_i^{eff} speelt verder dezelfde rol als P_i uit vgl. (2.11).

2.4. Principe-beschrijving van de permeabiliteitsmetingen

Men kan de permeabiliteit van een materiaal voor een gas bepalen door over een laagje van dat materiaal een partieel drukverschil aan te brengen en de daarbij behorende flux te meten. Met de vergelijkingen uit par. 2.3. kan men dan de (effectieve) permeabiliteit uitrekenen.

Wij gebruiken een meetopstelling waarin de fluxen van zuurstof en kool-dioxide als volgt bepaald worden.



Figuur 2.5. Principe-schema van de diffusieopstelling.

We gaan uit van de schets in figuur 2.5., waar een axiale doorsnede van een cilinder is getekend. De cilinder is aan boven- en onderkant gesloten en wordt door een laag van het te onderzoeken materiaal in 2 ruimten verdeeld, KK (= kleine kamer) en GK (= grote kamer). Beide kamers worden met gassen doorstroomd. Aangegeven zijn de gasstromen F_1 , F_2 en F_3 . De gasstroom F_1 ("meetstroom") heeft bij het binnenkomen van de KK een bekende samenstelling en grootte. Hetzelfde geldt voor de stroom F_3 , die de GK doorstroomt (de gasstromen bestaan steeds uit mengsels van N_2 ,

O_2 en CO_2 , al dan niet verzadigd met waterdamp). Tengevolge van de fluxen J_i zal de samenstelling van de meetstroom veranderen. Ook de grootte van F_2 zal anders zijn dan die van F_1 , omdat $\sum_i J_i \neq 0$ (zie par. 2.3.). De samenstelling van de gasmengsels in de kamers zullen we aangeven m.b.v. de partiële drukken van de componenten, de groottes door F_1 , F_2 en F_3 . De temperatuur van het gehele systeem wordt constant en uniform verondersteld. Toepassen van de ideale gaswet en de wet van materiebehoud in de KK geeft:

$$(J_{O_2} + J_{N_2} + J_{CO_2}) ART = p_{tot} (F_2 - F_1) \quad (2.14)$$

en voor elke component afzonderlijk:

$$J_i = \frac{1}{ART} \cdot (p_{2i} F_2 - p_{1i} F_1) \quad (2.15)$$

A: diffusieoppervlak van de laag (cm^2)

R: universele gasconstante (= constante van Regnault) = $8314.1 (cm^3 \text{ kPa mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$

T: absolute temperatuur (K).

R is een natuurconstante, A een systeemconstante, T, F_1 en p_{1i} worden in onze experimenten opgelegd. Meten van p_{2i} en F_2 geeft de resterende informatie om J_i te berekenen.

Onze meetopstelling bevat detectiesystemen voor p_2O_2 en p_2CO_2 . (p_2N_2 volgt uit p_{tot} en vgl. (2.9)). Het is in de praktijk echter nog niet mogelijk gebleken om F_2 te meten. Dit is een essentiële tekortkoming van de meetmethode. Door geschikte keuze van de condities zal dit geen overkomelijk probleem blijken te zijn. Immers, wanneer we de 3 vergelijkingen (2.15) combineren en herschrijven, volgt voor J_{O_2} en J_{CO_2} :

$$J_{O_2} = \frac{F_1}{ART} (p_2^{O_2} - p_1^{O_2}) - \frac{p_2^{O_2}}{p_2^{N_2}} \cdot \frac{F_1}{ART} \cdot (p_2^{N_2} - p_1^{N_2}) + \frac{p_2^{O_2}}{p_2^{N_2}} \cdot J_{N_2} \quad (2.16)$$

$$J_{CO_2} = \frac{F_1}{ART} (p_2^{CO_2} - p_1^{CO_2}) - \frac{p_2^{CO_2}}{p_2^{N_2}} \cdot \frac{F_1}{ART} (p_2^{N_2} - p_1^{N_2}) + \frac{p_2^{CO_2}}{p_2^{N_2}} \cdot J_{N_2} \quad (2.17)$$

(Voor een afleiding van vgl. 2.16 en 2.17 zie appendix 1) I.p.v. F_2 is nu J_{N_2} de onbekende in deze vergelijkingen. We kunnen deze echter berekenen, wanneer we een permeabiliteit P_{N_2} voor het inerte N_2 -gas uit de literatuur of uit andere experimenten overnemen. J_{N_2} volgt dan uit

$$J_{N_2} = P_{N_2} \frac{(p_3^{N_2} - p_2^{N_2})}{L} \quad (2.18)$$

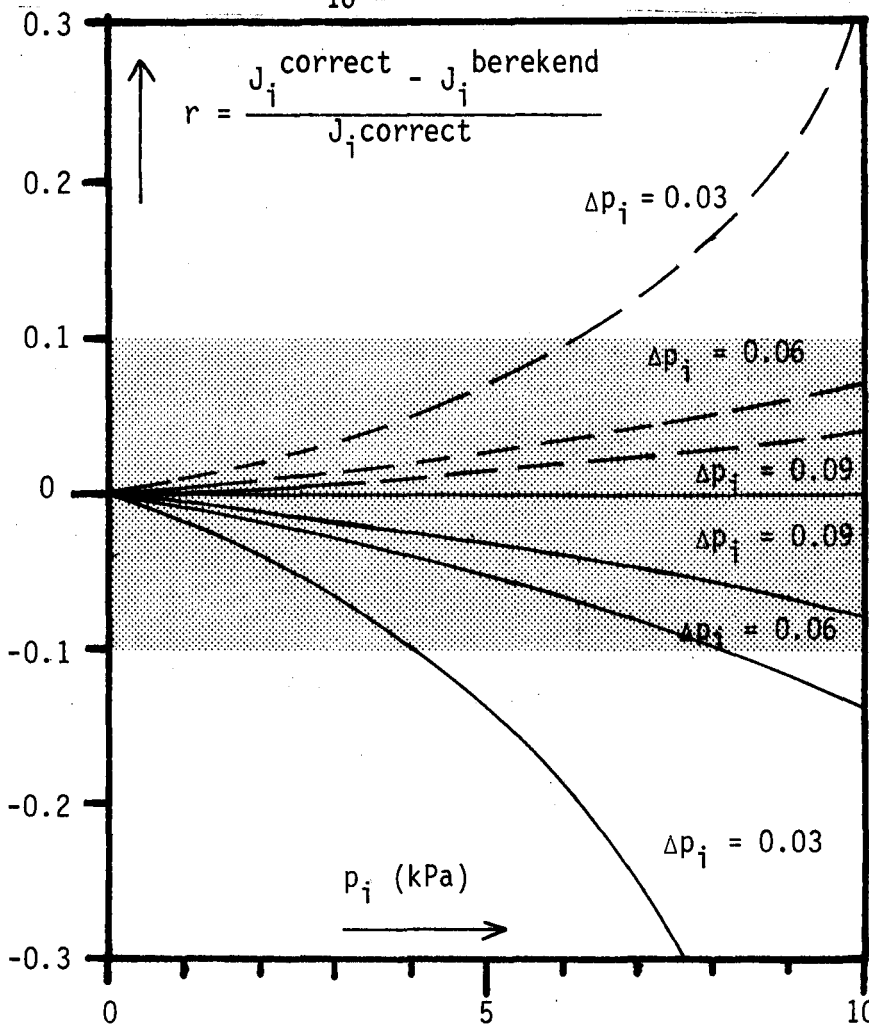
Vergelijking (2.16) toont dat het effect van een eventuele fout in de gekozen waarde van P_{N_2} op de berekende waarde van J_{O_2} groter is naarmate

$$a) \quad p_2^{O_2} - p_1^{O_2} - \frac{p_2^{O_2}}{p_2^{N_2}} \cdot (p_2^{N_2} - p_1^{N_2}) \quad (2.19)$$

kleiner, en

$$b) \quad \frac{p_2^{O_2}}{p_2^{N_2}} \quad (2.20)$$

groter is. Teneinde de invloed van een foute P_{N_2} klein te houden moeten we onze experimenten dus zodanig inrichten dat $p_2^{O_2}/p_2^{N_2}$ klein en het meetsignaal $p_2^{O_2} - p_1^{O_2}$ groot is. Het laatste heeft tevens het voordeel van een gunstige signaal-ruisverhouding. Aan de eerste voorwaarde wordt optimaal voldaan door voor de meetstroom F_1 puur N_2 -gas te nemen.



Figuur 2.6. Relatieve fout r in de berekening van J_i t.g.v. een fout in de gekozen waarde van P_{N_2} , als functie van p_i ($i = O_2, CO_2$).

- : gebruikte $P_{N_2} = 2 \times$ correcte P_{N_2}
- - - : gebruikte $P_{N_2} = 0.5 \times$ correcte P_{N_2}
- $\Delta p_i = p_{2i} - p_{1i}$ (kPa)
- ▨ = gebied waarvoor $r < 10\%$.

Figuur 2.6. geeft een kwantitatieve indruk van de invloed van de waarde van P_{N_2} op de berekende flux J_i . In de grafieken staat de waarde van de relatieve fout (r) in de berekende flux J_i uitgezet tegen p_{2i} , wanneer we voor P_{N_2} een 2 x grotere of een 2 x kleinere waarde dan de gebruikelijke kiezen. Als correcte waarde van P_{N_2} is in dit rekenvoorbeeld $5 \cdot 10^{-13}$ ($\text{mol cm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) genomen, terwijl de andere parameters uit vgl. (2.16) ontleend zijn aan reële experimentele condities. Tijdens onze experimenten was er slechts 1 situatie waarbij de meetstroom $F_1 \sim 10 \text{ kPa } O_2$ bevatte, nl. in het geval van countercurrent O_2 - CO_2 -transport. De respons $p_2 O_2 - p_1 O_2$

is dan in de grootte-orde van 0.05 kPa. Uit fig. 2.6. blijkt dat een extreme fout in de keuze van P_{N_2} dan toch slechts een fout van ~10 % in J_{O_2} betekent.

Een mogelijke experimentele oplossing voor het hierboven geschetste probleem wordt beschreven in appendix 2. De uitvoerbaarheid ervan is in dit afstudeerwerk niet nagegaan.

Wanneer m.b.v. vgl. (2.16) en (2.17) J_{O_2} en J_{CO_2} bekend zijn, volgen de permeabiliteiten P_{O_2} en P_{CO_2} uit vergelijkingen analoog aan (2.18):

$$P_{O_2} = \frac{J_{O_2} \cdot L}{(P_3O_2 - P_2O_2)} \quad (2.21)$$

$$P_{CO_2} = \frac{J_{CO_2} \cdot L}{(P_3CO_2 - P_2CO_2)} \quad (2.22)$$

Daarbij dient opgemerkt te worden dat ervan uit is gegaan dat de samenstelling van gasflow F_2 zoals die in de detectiesystemen wordt bepaald, dezelfde is als de randcondities aan de KK-kant van de diffusie laag. Deze aanname is gerechtvaardigd, omdat de diffusiesnelheid van de gediffundeerde gassen in de KK vele malen groter is dan die in de vloeistof laag. M.a.w., de gradiënt tussen vloeistof laag en detectiesysteem is verwaarloosbaar t.o.v. de diffusiegradiënt in de laag.

De gassamenstelling van gasflow F_3 verandert tijdens het doorstormen van GK nauwelijks, omdat de grootte van F_3 vele malen groter is (~30 x) dan de meetflow F_1 . We mogen daarom F_3 , p_3O_2 , p_3CO_2 en p_3N_2 constant veronderstellen.

Zoals eerder vermeld is het doel van dit onderzoek in eerste instantie om een mogelijke interactie tussen zuurstoftransport en kooldioxide-transport aan te tonen. We kunnen dit tot uitdrukking brengen in (2.21) door aan deze vergelijking een extra term

$$+ \mu_{O_2, CO_2} \cdot J_{CO_2} \quad (2.21.a)$$

toe te voegen. μ_{O_2, CO_2} is een fenomenologische interactiecoëfficiënt (dimensie cm.kPa^{-1}). $\mu_{O_2, CO_2} = 0$ betekent dat een CO_2 -flux geen invloed heeft op de permeabiliteit van de laag voor O_2 . Analoog kunnen we vgl. (2.22) uitbreiden met de term

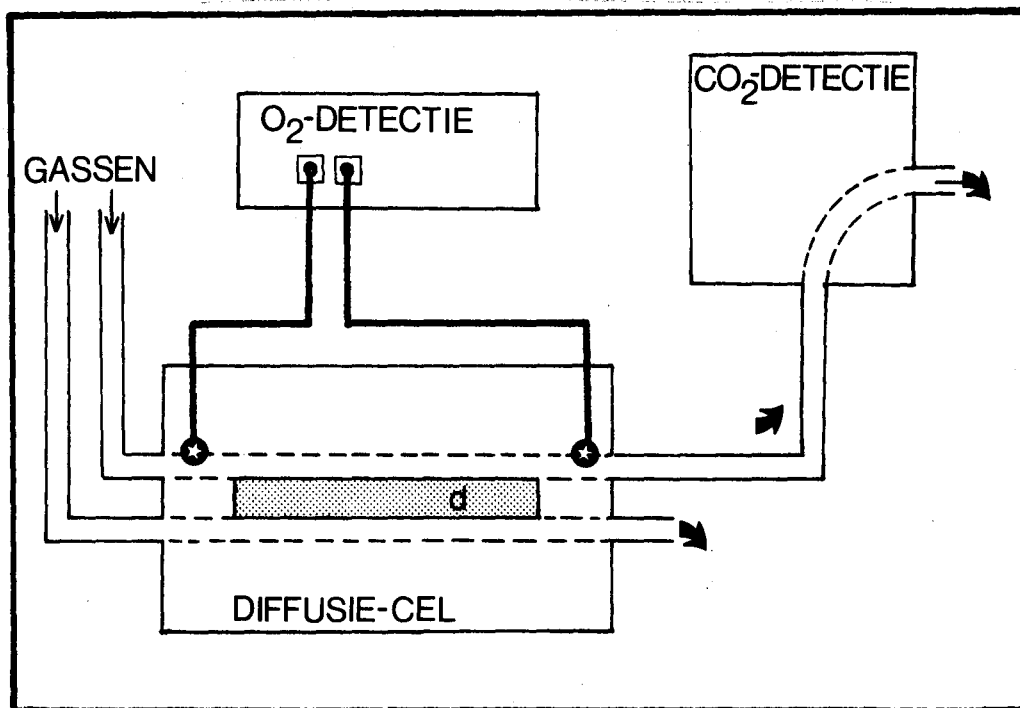
$$+ \mu_{CO_2, O_2} \cdot J_{O_2} \quad (2.22.a)$$

$\mu_{i,j}$ zal onder andere de electrostatische interactie-effecten bevatten. Een nauwgezette analyse van de parameters die de grootte van de coëfficiënt bepalen, vereist een diepgaand empirisch-theoretisch onderzoek naar de aard van genoemde transporten.

3. MEETOPSTELLING

3.1. Inleiding

Een blokschema van de gebruikte meetopstelling is gegeven in fig. 3.1.

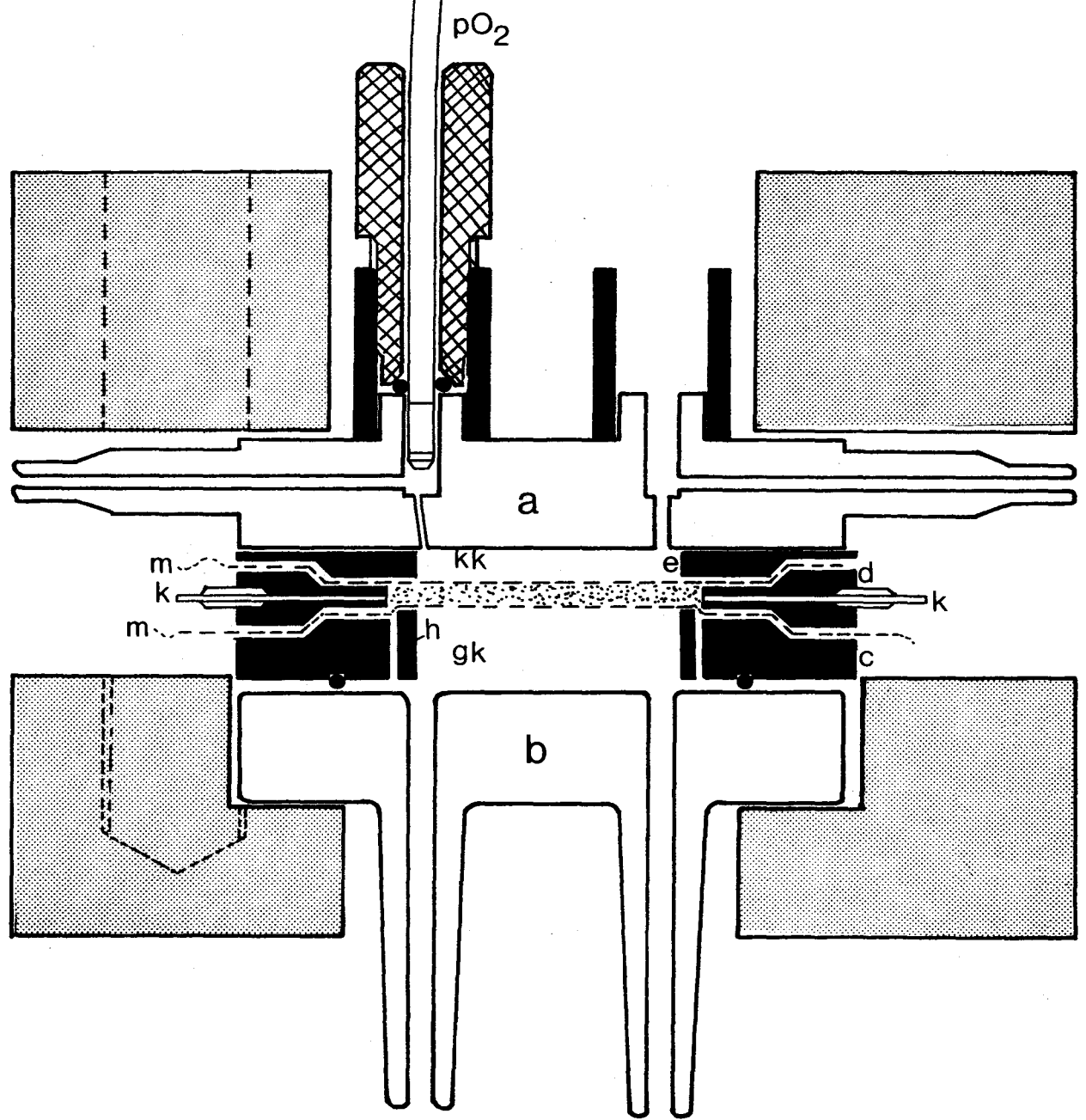


Figuur 3.1. Blokschema van de meetopstelling.

Gasmengsels stromen in de diffusiecel aan weerszijden van de te onderzoeken laag. Voor en na het passeren van de laag wordt in één gasstroom m.b.v. zuurstofelectroden de partiële O_2 -druk continu gemeten. Vervolgens wordt van monsters van dezelfde gasstroom in het CO_2 -detectiesysteem het kooldioxidegehalte bepaald. Diffusiecel, electroden en een deel van het CO_2 -systeem bevinden zich in een waterthermostaatbak met constante temperatuur ($T = 298 \text{ K}$).

In par. 3.2. gaan we nader in op constructie en gebruik van de diffusiecel, terwijl in par. 3.3. respectievelijk par. 3.4. de O_2 - en CO_2 -detectie beschreven worden.

sh81



- RVS
- a,b GLAS
- PERSPEX
- PVC
- DIFFUSIELAAG

1 cm

Figuur 3.2. Overzicht diffusiecel. Er is slechts één zuurstof-electrode getekend.

3.2. Diffusiecel

Figuur 3.2. toont een (axiale) doorsnede van de diffusiecel. Tussen twee glazen plaatjes a en b ($\varnothing = 45.5$ mm, dikte = 8.4 mm) bevindt zich een drietal roestvrijstalen ringen c, d en e. Ring e is op glasblok a gelijmd, ring c bevat een O-ring voor de afdichting tussen GK en de buitenlucht. Zowel tussen e en d als tussen d en c wordt een membraan onder lichte voorspanning ingeklemd. Deze twee membranen ondersteunen de te onderzoeken vloeistof, die via de kraantjes k in ring d ingespoten kan worden. Membranen + vloeistof vormen tezamen de diffusie laag. Het diffusieoppervlak is 3.14 cm^2 . De dikte van de laag kan gevarieerd worden tussen 0.48 mm en 1.22 mm door de ring h te vervangen door een ring met andere hoogte. Deze ring fixeert het membraan aan de GK-kant van de laag.

We hebben een aantal membranen op bruikbaarheid getest. Silastic (siliconen-rubber) membraan ($72 \mu\text{m}$ dik) is weliswaar goed doorlatend voor O_2 en CO_2 , maar minder geschikt vanwege de grote plastische vervormbaarheid (het zogenaamde "kruipen" van het membraan, waardoor een laag van ongelijke dikte ontstaat). Polysiloxane-Polycarbonaat (MEM 213-silastic) is een vergelijkbaar membraan, waaraan echter een "harder" is toegevoegd waardoor bovengenoemd euvel verdwijnt. Het is voor onze toepassing geschikt. De gebruikte versies waren $25 \mu\text{m}$ resp. $30 \mu\text{m}$ dik. Membranen + siliconenvet zorgen tevens voor afdichting tussen ringen c, d en e. De glasplaat b bevat 2 kanaaltjes ($\varnothing 2$ mm) waardoor de gasflow F_3 de GK in- en uitstroomt. Zo ook bevat a twee kanalen voor aan- en afvoer van de meetstroom F_1 , F_2 . Hier hebben beide kanalen echter een aftakking waarin plaats is voor een zuurstofelectrode ($p\text{O}_2$). Het instroomkanaaltje van meetflow F_1 heeft een zeer kleine doorsnede ($\varnothing = 0.3$ mm; het bevat verder nog een platinadraadje van $\varnothing = 0.15$ mm), teneinde terugdiffusie van gas uit de KK naar het aanvoer kanaal te verkleinen. De 5 ringen met de

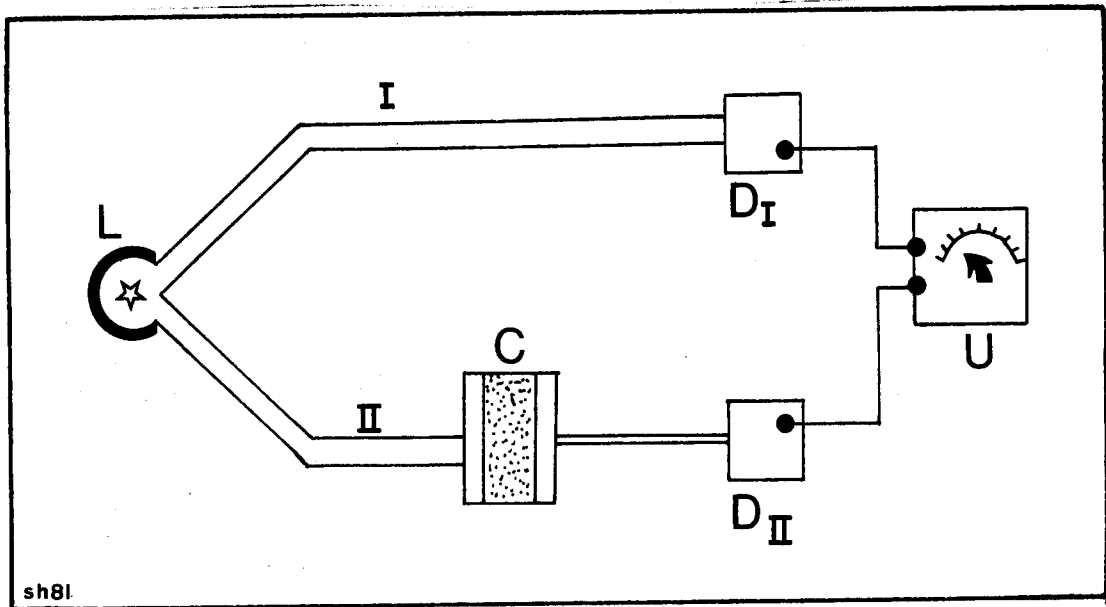
diffusielaag worden ingeklemd tussen twee perspex platen. Deze perspex mantel dient tevens voor de bevestiging in de thermostaatbak.

3.2.1. *Vullen van de diffusielaag*

Met behulp van een spuit wordt vloeistof door een van de kranen k ingespoten tussen de twee membranen. Lucht ontsnapt door de andere kraan, die vervolgens gesloten wordt als de laag geheel gevuld is. In horizontale stand laten we overtollige vloeistof door de vulkraan ontsnappen, waarna ook deze gesloten wordt. Dankzij de glasplaten a en b kunnen we tijdens het vullen controleren of er luchtbellen in de laag achterblijven c.q. of de laag constant van dikte is (niet hol of bol staat). Deze vulmethode geeft na enige oefening goede resultaten. Het blijkt belangrijk te zijn dat de membranen voor het vullen geheel droog zijn.

3.2.2. *Dikte van de diffusielaag*

Omdat de diffusiecel doorzichtig is kunnen we de dikte van hemoglobinelagen fotometrisch bepalen. Daartoe plaatsen we het diffusieblok in een "double beam"-spectrofotometer. Figuur 3.3. geeft de meetmethode schematisch weer.



Figuur 3.3. Schema van het fotometersysteem. L: lamp, I en II: lichtbundels, C: diffusiecel met hemoglobine laag, D_I en D_{II}: fotodiodes, U: electronica + uitlezing.

Lichtbundel I gaat van de lamp L direct naar een fotodiode (D_I). Het signaal van deze diode is een maat voor de intredende lichtintensiteit. De andere lichtbundel passeert respectievelijk glasplaat a, de diffusie-laag en glasplaat b, en wordt in elk van deze componenten in intensiteit verzwakt. Een maat voor deze verzwakking is de zogenaamde extinctie (A), die wordt gedefinieerd als:

$$A = -10 \log \frac{I_t}{I_0} \quad (3.1)$$

I₀: intredende lichtintensiteit

I_t: doorgelaten lichtintensiteit.

We scheiden de totale extinctie van de diffusiecel in een bijdrage A_{rest} van de glasplaatjes, membranen en oplosmiddel (water) en een bijdrage A_{Hb} van het opgeloste hemoglobine. Volgens de wet van Lambert-Beer geldt voor deze laatste

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon_\lambda \cdot [\text{Hb}] \cdot L} \quad (3.2)$$

ϵ_{λ} : millimolaire extinctiecoëfficiënt van het gebruikte Hb ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)

[Hb]: concentratie van het Hb ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)

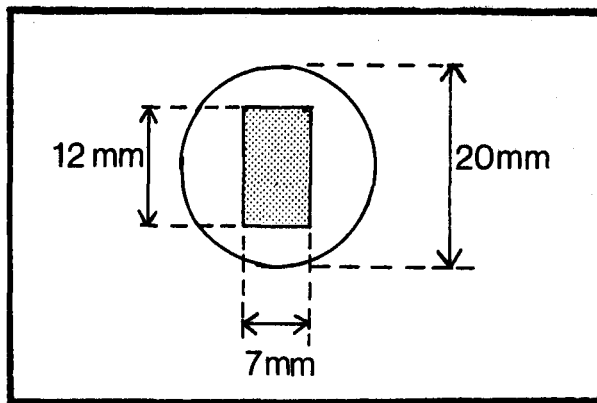
L: de doorlopen lichtweg in het Hb (cm)

zodat met vgl. (3.1) volgt

$$A_{\text{Hb}} = \epsilon_{\lambda} [\text{Hb}] L \quad (3.3)$$

A_{rest} meten we door de laag te vullen met gedestilleerd water. Omdat Hb een ander absorptiespectrum heeft dan HbO_2 , verzadigen we het hemoglobine eerst met koolmonoxide (CO). CO heeft een grotere affiniteit tot Hb dan O_2 (factor 100), waardoor alle hemoglobine wordt omgezet in HbCO. Het absorptiespectrum van HbCO is goed gedefinieerd (ref. 4). De factor $\epsilon_{\lambda} [\text{Hb}]$ wordt bepaald door de extinctie van een cuvet met vaste optische weglengte (1 mm), gevuld met dezelfde HbCO-oplossing, te meten. Het referentiekanaal bevat dan eenzelfde cuvet, gevuld met gedestilleerd water.

De diktemeting wordt steeds uitgevoerd na afloop van de diffusie-experimenten. Met behulp van deze meetmethode is het niet mogelijk eventuele dikteveranderingen tijdens de duur van de experimenten (enkele uren) te bepalen (bijv. t.g.v. het uitdrogen van de laag). Daarnaast dient nog opgemerkt te worden dat de methode wel voor hemoglobine-, maar niet voor waterlaagjes geschikt is en dat men de dikte van de laag semi-locaal bepaalt: de lichtbundel van de fotometer bestrijkt slechts een gedeelte van de laag (figuur 3.4.).



Figuur 3.4. Afmetingen van lichtbundel (▨) en hemoglobine laag.

Aan de hand van de beschreven methode werd de dikte van enkele laagjes hemoglobine-oplossing bepaald. Tabel 3.1. geeft de resultaten, waarbij L_1 de dikte van de laag is, zoals deze volgens de afmetingen van de ringen van de diffusiecel (fig. 3.2.) zou moeten zijn. L_2 is de gemeten dikte.

L_1 (in mm)	L_2 (in mm)
0.48	0.98
0.48	1.00
0.48	0.84
0.48	0.97
0.48	0.89 (gemiddeld 0.94 mm; S.D.=0.06 mm)
0.72	1.68 (gemiddeld 1.6 mm; S.D.=0.1 mm)
0.72	1.44

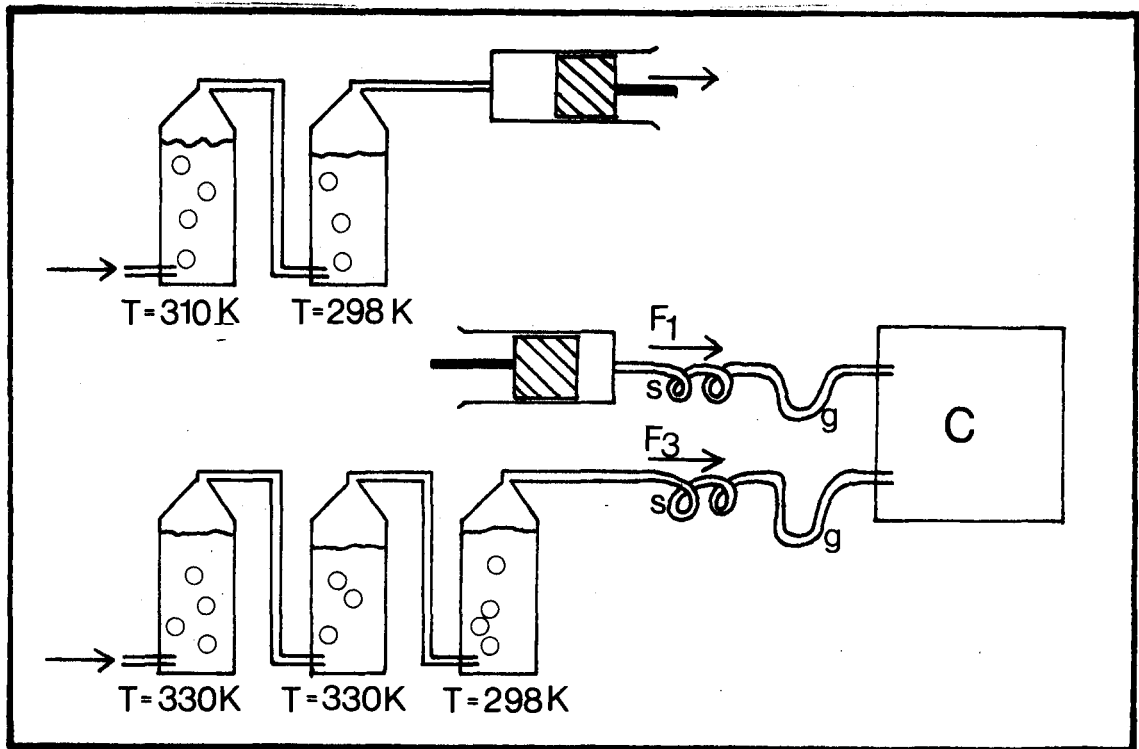
Tabel 3.1. L_1 : dikte van de laag volgens afmetingen diffusiecel
 L_2 : gemeten dikte.

Opvallend aan deze resultaten is dat de gemeten dikte ongeveer een factor 2 groter is dan de verwachte waarde op grond van de geometrie van de cel. Een voor de hand liggende verklaring voor dit verschil zou kunnen zijn dat de laag na het vullen bol staat. Dat is echter nooit waargenomen. Tot nu toe is dit verschil nog niet verklaard.

De lange insteltijd van de transportprocessen blijkt een nadeel van de geschetste laagconfiguratie. (Bij O_2 -diffusie door een hemoglobine-laag van ~ 0.5 mm wordt de stationaire toestand pas na ~ 2 uur bereikt.) Om dunnere lagen van beter gedefinieerde dikte te maken gebruiken we thans Milliporefilters ter ondersteuning van de hemoglobine-oplossing. Het filter ($\varnothing = 25$ mm, dikte variërend van $130-160 \mu\text{m}$ ($\pm 3 \mu\text{m}$), typen RA en SM) wordt met hemoglobine doordrenkt en vervolgens ingeklemd tussen de ringen e en d van de diffusiecel (zie figuur 3.1.). Ondanks bevochtiging van de gasstromen drogen deze lagen vrij snel uit (binnen 2 à 3 uur). Daarom wordt het filter omgeven door twee hydrofobe membranen (Teflon FEP, $6 \mu\text{m}$ dik; MEM 213, $30 \mu\text{m}$ dik) en brengen we in de GK een met water verzadigd cellulosefilter (Millipore pre-filter, type A P 25) als bevochtiger aan. De membranen verminderen de uitdroging, maar vormen een relatief hoge extra diffusieweerstand. De drukval over de membranen is aanzienlijk t.o.v. de totale drukgradiënten in de laag ($\sim 10\%$) (zie fig. 2.3.). Bij gebruik van Millipore filters moeten we corrigeren voor de extra weerstand die het filtermateriaal veroorzaakt (20-25 %): (ref. 5, 22) de diffunderende moleculen zullen immers een langere "kronkelweg" afleggen en het effectieve diffusie-oppervlak wordt kleiner.

3.2.3. Bevochtiging van de gassen

Het uitdrogen van de lagen vormde in eerste instantie een groot probleem. Bevochtiging van de gasstromen, zoals in figuur 3.5 is weergegeven, levert echter bevredigende resultaten. Gasstroom F_1 wordt ingesteld door in een infusor 3 glazen spuiten (elk 50 cm^3) parallel te schakelen ($0.75 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} < F_1 < 2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ met een onnauwkeurigheid $< 2\%$).

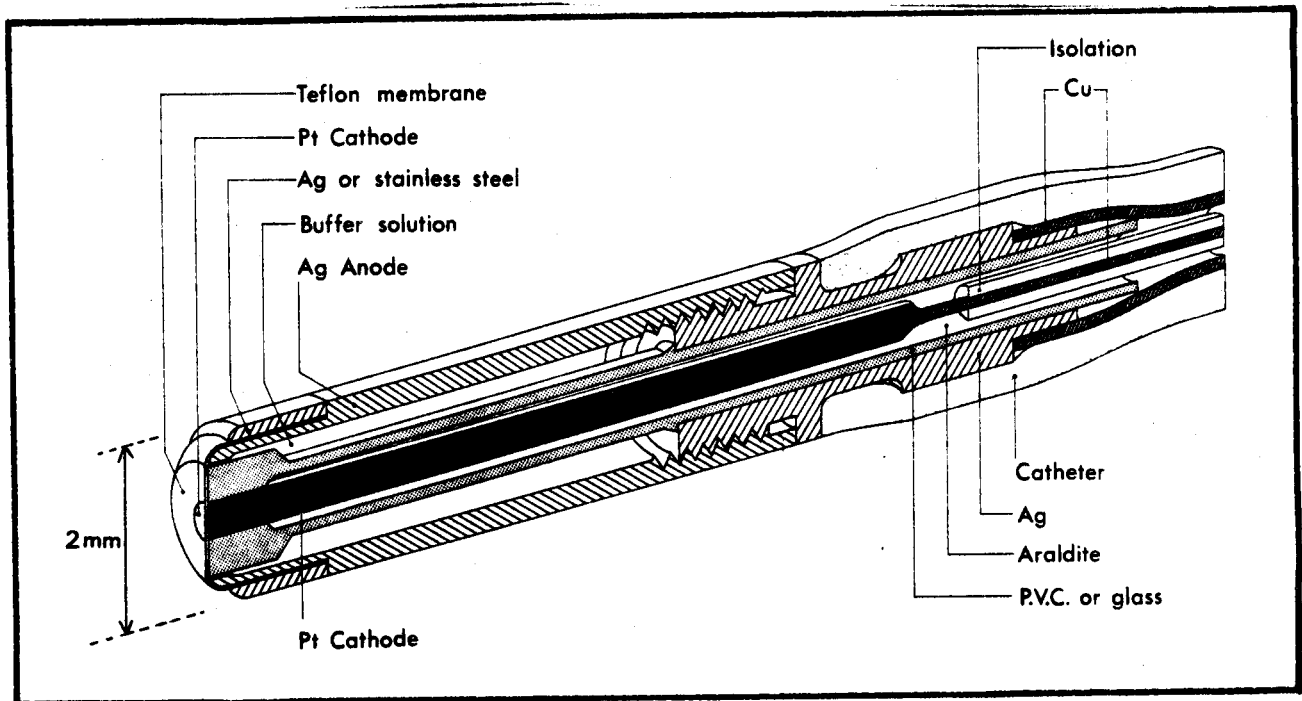


Figuur 3.5 Bevochtiging van de gasstromen F_1 en F_3 . C = diffusiecel, S = koperen buis, g = glascapillair met katoendraadjes.

Vanuit de spuitjes stroomt het gas door vitonslangen naar het diffusiesysteem, maar passeert eerst nog een koperen buisje en een glascapillair, waarin zich een nat katoendraadje bevindt. Tijdens de experimenten blijkt dit draadje niet uit te drogen. De stroom F_3 heeft vanwege z'n grootte ($\sim 40 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) een groter effect op het uitdrogen van de laag dan F_1 . De temperatuur van de eerste twee wasflessen is daarom op $\approx 333 \text{ K}$ gebracht.

3.3. O_2 -detectie

De zuurstofdetectie berust op het principe van de polarografie. De gebruikte membraanelectroden zijn van het Clark-type (ref. 6, 7, 8), en worden binnen de afdeling Fysiologie gemaakt. Figuur 3.6. geeft een doorsnede van 'n exemplaar dat geschikt is voor metingen in de gasfase.

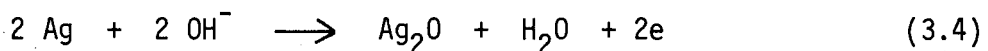


Figuur 3.6. Katheter-electrode voor het meten van p_{O_2} in gassen.

Een platina (Pt) kathode wordt afgedekt door een $6 \mu\text{m}$ dik teflonmembraan. Tussen Pt en membraan bevindt zich een electrolytoplossing, die voor het elektrische contact tussen de kathode en de (van zilver vervaardigde) anode zorgt. Over de elektroden wordt een spanningsverschil aangebracht (de zg. polarisatiespanning $V_{pO_2} = V_a - V_k \approx 0.75 \text{ Volt}$). Als gevolg hiervan verloopt bij de kathode een reductiereactie van zuurstof die globaal weergegeven kan worden met het schema:

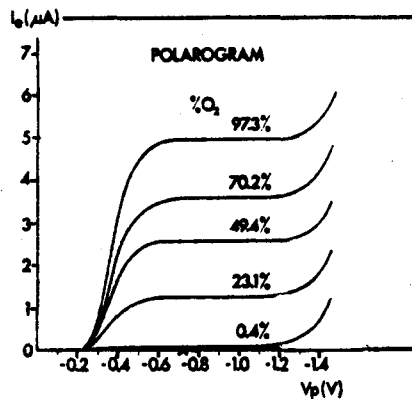


Aan de anode wordt zilver geoxideerd:



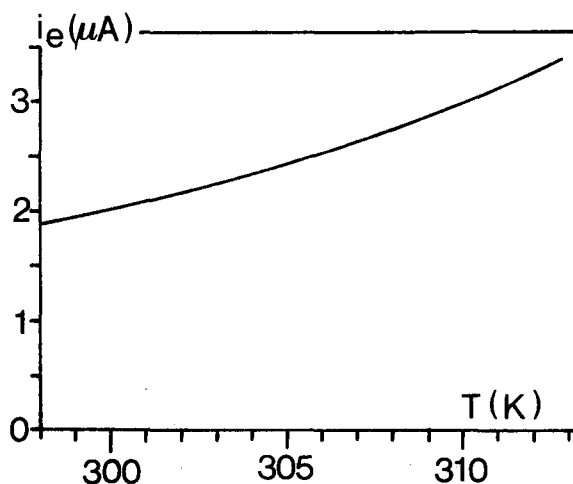
Aanwezigheid van zuurstof geeft dus aanleiding tot een electrodestroom i_e . Deze is afhankelijk van V_{pO_2} . Bij toenemende V_{pO_2} zal er per tijdseenheid meer O_2 gereduceerd worden. Boven een bepaalde waarde zal reactie 3.3 sneller verlopen dan er zuurstof (via diffusie door het membraan) aangevoerd wordt en blijft i_e verder constant. Omdat de diffusiesnelheid even-

redig is aan de partiële zuurstofdruk over het teflonmembraan zal de electrodestroom i_e een directe maat zijn voor pO_2 aan de buitenkant van het membraan (t.g.v. de snelle kathodereactie is de pO_2 aan de kathode nul) (ref. 7).



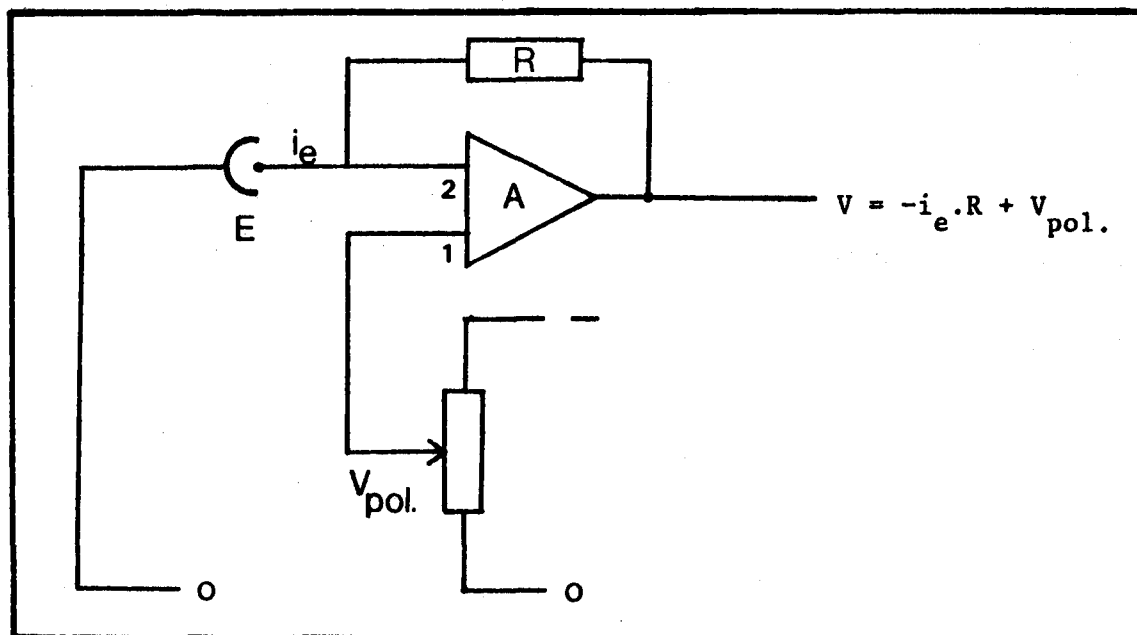
Figuur 3.7. Polarogram van een O_2 -electrode (naar ref. 6).

Figuur 3.7. geeft het verband tussen i_e en V_{pO_1} voor een aantal zuurstofspanningen. Tijdens onze experimenten bedraagt V_{pO_1} 750 mV. De responstijd van de electrode ligt in de orde van 0.5 s. (95 % van de eindwaarde). De electrodestroom is sterk temperatuurafhankelijk. Figuur 3.8. geeft i_e als functie van T (K) voor een pO_2 van 70 kPa.



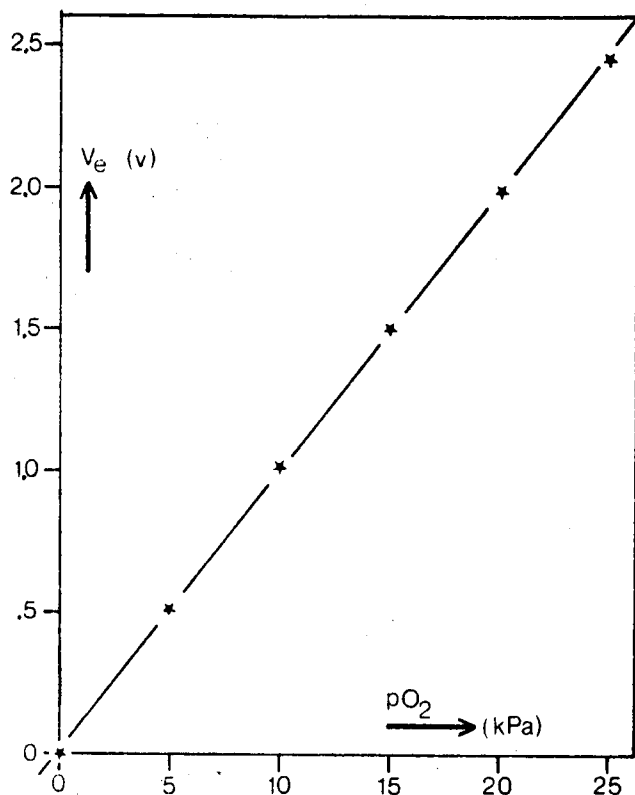
Figuur 3.8. Temperatuurafhankelijkheid van de zuurstofelectrode (naar ref. 6).

Rond $T = 298 \text{ K}$ blijkt di_e/dT overeen te komen met ongeveer $1.5 \text{ kPa} \cdot \text{K}^{-1}$. Het is dus van groot belang de temperatuur tijdens experimenten constant te houden. (De optredende temperatuurvariatiës tijdens onze experimenten zijn $< 0.002 \text{ K}$.) De electrodestroom i_e wordt in een pO_2 -versterker omgezet in een spanning. Het principe-schema van de pO_2 -versterker is in figuur 3.9. getekend.



Figuur 3.9. Principe-schema van de pO_2 -versterker.

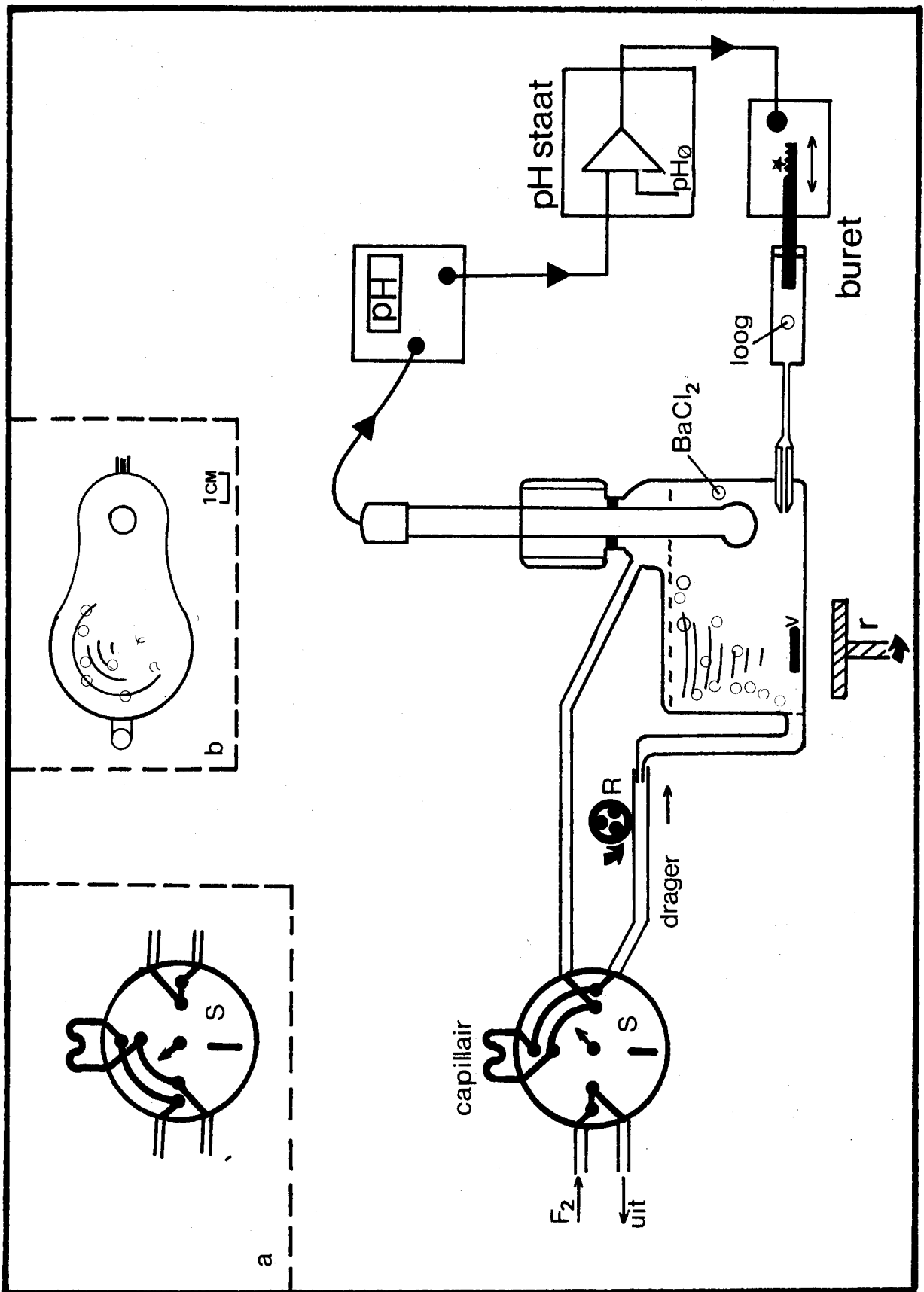
De polarisatiespanning ($-V_{pol}$) wordt als een offset-spanning aan de versterker, en daardoor aan de kathode, aangeboden. De operationele versterker A (Analog Devices, 42 K) heeft een uitgangsweerstand 0, zodat de uitgangsspanning $V_e = -i_e \cdot R$ is. Figuur 3.10 toont een ijklijn zoals die tijdens experimenten bepaald werd.



Figuur 3.10. Ijklijn pO_2 -electrode (d.d. 27-08-80) $V_{pol} = 750$ mV; lineaire regressie door 6 pntn.: 97.9 mV.kPa $^{-1}$; correlatie = 0.9998.

De ruis in het electrodesignaal V_e varieert per electrode, en is o.a. afhankelijk van het aantal dagen dat de electrode in gebruik is. Electrolyt-buffer en membraan worden nl. na ± 4 meetdagen vernieuwd. Onder optimale condities bedraagt de ruis 0.01 % van het electrodesignaal. Het meetsignaal tijdens de experimenten is echter een verschilspanning van twee electrodesignalen ($p_2O_2 - p_1O_2$), waardoor de signaal-ruisverhouding kleiner kan zijn dan de hier genoemde.

Volgens Beneken Kolmer en Kreuzer (ref. 8) zijn de O_2 -electroden niet gevoelig voor CO_2 .

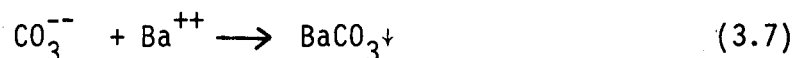
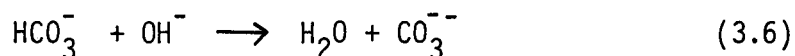


Figuur 3.10. Overzicht van de pH-staat opstelling voor CO₂-detectie. Schematische verticale doorsnede van het titratievat en blokschema van de overige componenten. Fig. 3.10a.: Horizontale doorsnede titratievat; fig. 3.10.b.: Samplekraan in vulstand.

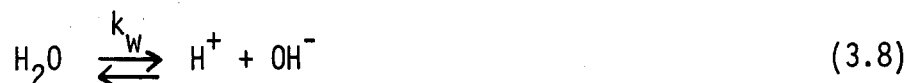
3.4. CO₂-detectie

De bepaling van het CO₂-gehalte van een gasmengsel gebeurt m.b.v. een pH-statische methode. Van de gasflow F₂, die de KK verlaat (zie fig. 3.1.) kan m.b.v. een kraan S een gasmonster (sample) van bepaalde grootte in een meetcircuit worden opgenomen (zie fig. 3.11). Het volume van het gebruikte monstercapillair bedraagt 1000 μl. Het meetcircuit bestaat uit een circulerend dragergas dat na de kraan S een titratievat doorstroomt. Een rollenpomp R zorgt voor het circuleren van het gas (~ 30 cm³.min⁻¹). Het (uit pyrexglas vervaardigde) titratievat bevat ongeveer 80 cm³ 0.05 molair BaCl₂-oplossing. De pH van deze oplossing is op een waarde van 8.5 gebracht en wordt m.b.v. een gecombineerde pH-electrode continu geregistreerd. Een door de magneetroerder r aangedreven magnetische vlo zorgt enerzijds voor menging van de vloeistof en anderzijds voor een vortex, waarin de gasbelletjes van de dragergasstroom gevangen worden. Zodoende wordt de contacttijd van het gas met de vloeistof aanzienlijk vergroot.

Bevat een monster van F₂ kooldioxide, dan verlopen in het titratievat de reacties:



De geschetste reacties (3.5) en (3.6) zijn in principe evenwichtsreacties, maar vanwege de geringe oplosbaarheid van BaCO₃ (oplosbaarheidsproduct $8.1 \times 10^{-9} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}$) zullen de evenwichten naar rechts verschoven zijn. Het basische milieu verhoogt de reactiesnelheden van (3.5) en (3.6). De OH⁻-ionen zijn afkomstig uit het waterevenwicht



Wanneer uit n moleculen CO_2 n moleculen BaCO_3 neerslaan, komen daarbij $2n$ protonen vrij. Deze verlagen de pH van de oplossing. pH-electrode, pH-meter en pH-staat vormen tesamen met de stappenmotorgestuurde buret een servoregeling die de verandering in zuurgraad compenseert door toevoeging van NaOH-oplossing (6 mmol.l^{-1}). De snelheid waarmee wordt getitreerd is evenredig met $\text{pH}-\text{pH}_0$ (proportionele regeling). Heeft de pH zijn startwaarde pH_0 herkreten, dan is de hoeveelheid toegevoegd loog een directe maat voor het CO_2 -gehalte in het gassample. Immers:

$$l \times t = 2 n_{\text{CO}_2} \quad (3.9)$$

l : aantal μl toegevoegd loog

t : concentratie (titer) van het loog (mol.l^{-1})

n_{CO_2} : aantal mol CO_2 in het gasmonster.

De ideale gaswet, toegepast op het monstervolume, geeft nu de partiële CO_2 -druk in F_2 :

$$p_2\text{CO}_2 \cdot V_s = n_{\text{CO}_2} \cdot RT \quad (3.10)$$

V_s : volume van het capillair (cm^3)

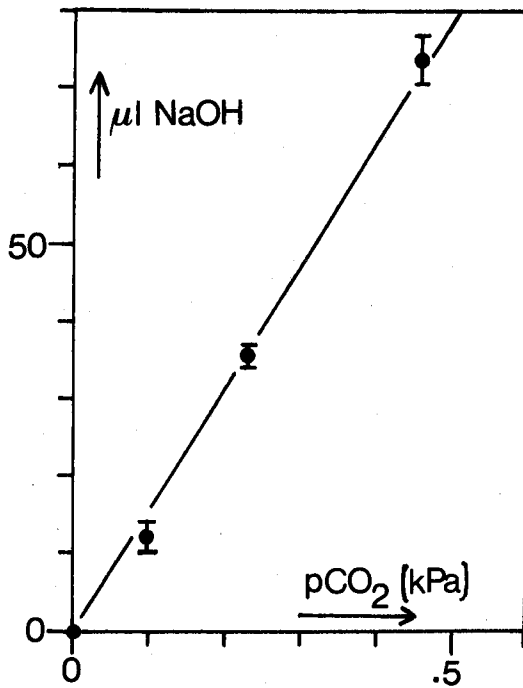
R : universele gasconstante

T : temperatuur van het systeem (298 K; samplecapillair en titratievat bevinden zich in de thermostaatbak).

Deze detectiemethode vereist een driftvrije pH-meting, d.w.z. dat het gehele systeem een constante pH-registratie geeft wanneer geen CO_2 in het dragergascircuit aanwezig is. Treedt er desondanks een pH-drift naar de basische kant op, dan zal dit lagere hoeveelheden NaOH, en daardoor lagere $p_2\text{CO}_2$ -waarden tot gevolg hebben. Een "zure" pH-drift daar entegen

resulteert in een continu toevoegen van NaOH, waardoor het eindpunt van de titratie moeilijk te bepalen is. In de praktijk blijkt de pH-staat opstelling steeds een pH-drift naar lagere pH-waarden te vertonen. Deze drift is niet regelmatig (driftcompensatie $dl/dt \neq \text{constant}$) en is groter naarmate de ingestelde pH_0 verder afwijkt van 8.5. Mogelijke oorzaken voor deze zuurdrift zijn nagegaan (CO_2 -inlek uit de buitenlucht, zure componenten in vitonslang of in het glas van het titratievat, instabiliteit van de pH-electrode), maar het euvel is tot op heden nog niet verholpen. Ter compensatie van deze systeemdrijf hebben we een tweede automatische buret in de opstelling aangebracht. Deze voegt met constante snelheid loog toe aan de inhoud van het titratievat. Wanneer de pH-drift gedurende de periode van 1 titratie constant blijft, is dit een bruikbare voorlopige oplossing van het probleem.

Ijkingen van het CO_2 -systeem bestaan uit het titreren van samples van bekende gasmengsels (geanalyseerd m.b.v. Scholander-methode). Theoretisch kunnen we de gevoeligheid van het systeem vergroten door de titer t van het NaOH te verkleinen. De toe te voegen hoeveelheid loog wordt dan groter. In de praktijk wordt dit echter beperkt doordat per buret maximaal 400 μl kan worden getitreerd, en door het feit dat verdunde loogoplossingen minder stabiel zijn. Gekozen is voor een loogsterkte waarbij de dosering van de meest voorkomende meetsamples ongeveer 100 x de minimale hoeveelheid (0.1 μl) bedraagt. Figuur 3.12 toont een ijking, waaruit voor de ijkingen rond $pCO_2 = 0.1$ kPa (=de grootte-orde van de partiële CO_2 -drukken tijdens de experimenten) een spreiding (S.D.) van $\approx 10\%$ volgt. Zoals te verwachten is uit vgl. (3.9) en (3.10) liggen de ijkpunten nagenoeg op een rechte. Tijdens de experimenten wordt dan ook volstaan met ijktitraties van monsters 1% CO_2 in N_2 , waarbij een spreiding $\leq 2\%$ in de toegevoegde hoeveelheden loog optreedt.



Figuur 3.12. Ijklijn van de CO₂-detectie (d.d. 6-02-1981). Monster-volume = 1000 μl, titer NaOH = $6.5 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

Het CO₂-detectiesysteem is niet zuurstofgevoelig, zoals men verwacht op grond van het inerte karakter van O₂ voor water.

4. METINGEN EN RESULTATEN

Om de beschreven meetopstelling te testen zijn er diffusiemetingen aan kunststof- en waterlagen verricht. Vervolgens hebben we hemoglobine-laagjes gemaakt, waarvan de permeabiliteit voor O_2 en CO_2 - zowel afzonderlijk als gelijktijdig - is gemeten. Alle in dit hoofdstuk vermelde experimenten zijn gedaan bij $25^{\circ} C$.

4.1. Metingen aan kunststoflagen

Het meten van de permeabiliteiten van siliconenrubber- en teflonmembranen had een tweeledig doel. Ten eerste kon de opstelling worden getest zonder het nadeel van lange equilibratietijden. Ten tweede hebben we deze permeabiliteiten nodig om voor de diffusieweerstand van de membranen bij vloeistoflagen te kunnen corrigeren.

4.1.1. Metingen aan Silastic

Een Silastic membraan (= siliconenrubber; handelsmerk Dow Corning Corporation) met een dikte van $80 \mu m$ wordt in de diffusiecel opgespannen. De gemeten zuurstofpermeabiliteit bedraagt $21.2 \times 10^{-13} (mol \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ kPa}^{-1})$ en stemt overeen met literatuurwaarden (zie tabel 4.1.).

4.1.2. Metingen aan teflon

Analoog aan de Silastic-metingen zijn permeabiliteiten van teflonmembranen (FEP) bepaald. De resultaten en enkele literatuurwaarden zijn in tabel 4.2. opgenomen. De experimenten 16.02 geven, zowel voor O_2 als

CO₂-transport, een beduidend grotere permeabiliteit dan de experimenten 19.03. Een oorzaak hiervan kan zijn dat de eerste gemeten zijn m.b.v. 1 membraan, terwijl bij de laatstgenoemde 3 membranen van 6 µm tegen elkaar werden gedrukt. Een beschadiging van het materiaal geeft in het eerste geval vanzelfsprekend grotere afwijkingen. De metingen

19.03. geven zowel voor P_{O₂} als P_{CO₂} waarden die een factor 2.5 groter zijn dan de waarde van Hwang e.a. (1974). Gebruik van verschillende teflonmembranen kan hiervan de oorzaak zijn. De Koning gebruikte identieke membranen en bepaalde een waarde van de permeabiliteit welke 25 % kleiner was dan de thans gevonden waarden.

	L	P _{O₂}	S.D.	n
experimenten (14.08)	80	21.2	0.2	3
Hwang e.a. (1974)	Silastic 500-1	19.0		
	Silastic RTV 501	18.7		
Robb (1968)	Dimehtylsiliconenrubber	20.8		
Ketteringham	Siliconenrubber	21.7		
Aiba e.a. (1968)	Siliconenrubber	3.8*		
		14.4*		

*afhankelijk van de meetmethode

Tabel 4.1. Zuurstofpermeabiliteit P_{O₂} (10⁻¹³ mol cm⁻¹ s⁻¹ kPa⁻¹) van Siliconenrubber. L = dikte membraan (10⁻⁴ cm), S.D. = standaarddeviatie; n = aantal metingen.

	L	P _{O₂}	S.D.	n	P _{CO₂}	S.D.	n
exp. 16.02	6	7.2	0.2	4			
"	6				5.7		
exp. 19.03	18	0.52	0.02	5			
"	18				0.98	0.04	2
Hwang e.a. (1974)		0.20			0.57		
De Koning (exp.maart 1980)	18	0.39	0.02	15			

Tabel 4.2. Zuurstof- en kooldioxide permeabiliteiten (10^{-13} mol cm⁻¹ s⁻¹ kPa) van teflonmembranen. L in 10⁴ cm.

4.1.3. Metingen aan MEM 213

MEM 213 is de naam van een polysiloxaan-polycarbonaatmembraan met een dikte van ongeveer 25 μm. Dit membraan bleek uiterst geschikt om water- en hemoglobinelagen tussen op te spannen. De gemeten permeabiliteit voor zuurstof komt overeen met de door de fabrikant opgegeven waarde en de metingen van Robb (1971) en Stroeve e.a. (1976). P_{CO₂} (uit 1 experiment) is ongeveer 15 % groter dan de waarde van Robb (1971). Zie tabel 4.3.

	P_{O_2}	S.D.	n	P_{CO_2}	S.D.	n
experimenten (membranen 25 μm en 30 μm)	5.2	0.7	30	36.3		
"						
Robb (1971) (45 gem.% siliconen)	6.03			31		
(55 gem.% siliconen)	6.53			33		
Stroeve e.a. (1976)	5.3					
General Electric Co. (fabrikant)	5.33					
Ketteringham	2.73			12.5		

Tabel 4.3. Permeabiliteiten van MEM 213 voor zuurstof en kooldioxide ($10^{-13} \text{ mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$).

4.2. Metingen aan waterlagen

Experimenten met waterlaagjes, ondersteund door twee membranen MEM 213, leveren permeabiliteiten van water voor O_2 die een grote spreiding vertonen (zie tabel 4.4.). Analoge metingen aan met H_2O doordrenkte Millipore-filters geven resultaten met minder spreiding. De dikte van deze Millipore-laagjes is beter gedefinieerd dan de eerdergenoemde waterlagen tussen membranen. Waarschijnlijk is daar de spreiding in de diffusieweg-lengte L de oorzaak van de grote variatie in de gemeten permeabiliteitswaarden. Bij de berekening van P_i uit J_i werd uitgegaan van de laagdikte die volgt uit de geometrie van de meetcel (fig. 3.2.) $L = 0.48 \text{ mm}$. Een nauwkeurige diktebepalingsmethode kan hier uitkomst bieden. In tabel 4.4. zijn tevens enkele literatuurwaarden voor P_{O_2} vermeld. De resultaten van Milliporelaag-experimenten zijn voor de diffusieweerstand van de filters gecorrigeerd.

	P_{O_2}	S.D.	n
exp. H ₂ O tussen 2 membranen	2	1	29
exp. H ₂ O in Millipore-filter	2.4	0.3	20
Kreuzer (1950)	2.34-3.75		
Hemmingsen (1965)	2.87		
Snell (1965)	2.75		
Colton (in Millipore) (1973)	1.57		
De Koning (1979)	2.71	0.09	4

Tabel 4.4. Zuurstofpermeabiliteiten van zuiver water (10^{-13} mol cm⁻¹ s⁻¹ kPa⁻¹).

CO₂-diffusie door zuiver water is alleen gemeten in Millipore-laagjes. Omdat bij dit transport facilitatie op kan treden worden in tabel 4.5. tevens de randvoorwaarden p_3CO_2 en p_2CO_2 vermeld. Literatuurwaarden van P_{CO_2} zijn vaak van weinig betekenis omdat deze randcondities (en daarmee informatie betreffende de facilitatie) ontbreken, ofwel onderling sterk uiteenlopen (Gros en Moll, 1971).

	p_3CO_2	p_2CO_2	P_{CO_2}	S.D.	n
exp. H ₂ O in Millipore-filter (150 μm)	0.8	0.1	28	3	3
"	4.0	0.6	23		
"	5.2	0.8	44		
Gros en Moll (1971) (Millipore, 150 μm)	87	13	54.4		

Tabel 4.5. CO₂-permeabiliteit van zuiver water (geen carbo-anhydrase).

Over het belang van de randdrukken m.b.t. de groote van de facilitatie is in par. 2.3. gesproken. De facilitatie van CO_2 -transport is tevens afhankelijk van de kinetiek voor de vergelijkingen 1.1. t/m 1.5. Wanneer door een waterlaag CO_2 -diffusie plaatsvindt, zal er voor elk van de genoemde vergelijkingen een gebied aan de rand van de laag zijn waar de betreffende reactie niet in evenwicht is. De grootte van dat randgebied hangt af van de verhouding van reactiesnelheid en diffusiesnelheid van de bij die reactie betrokken componenten. (Deze verhouding wordt vaak uitgedrukt in het dimensieloze Damköhler-getal $L \sqrt{k/D}$, waarin L = diffusieweglengte, k = reactiesnelheid en D = diffusie-constante). De invloed van deze niet-evenwichts-effecten op de facilitatie is gerelateerd aan de verhouding van het niet-evenwichtsgebied tot de totale laagdikte. Suchdeo e.a. (ref. 19) berekenen voor waterlagen met een dikte $L = 150 \mu\text{m}$ en in afwezigheid van het enzym carbo-anhydrase (dit enzym katalyseert de hydratatiereactie van CO_2) dat de hele laag in het niet-evenwichtsgebied valt. Hoofd (ref. 21) komt tot analoge conclusies. De facilitatie zal daarom in het genoemde geval kleiner zijn dan men verwacht op grond van maximale bicarbonaat-facilitatie. Indien men transporteigenschappen van diffusie-reactiesystemen wil bestuderen dient men dus laagdikte en kinetiekbepalende factoren expliciet in de beschouwing op te nemen.

4.3. *Metingen aan hemoglobine-oplossingen*

Hemoglobine-oplossingen worden bereid als beschreven door Breepoel (ref. 20). Vers runderbloed wordt, na toevoeging van heparine om stolling te voorkomen, gehemolyseerd en gedialyseerd tegen zuiver water. Vervolgens wordt het eiwit gedeïoniseerd door het gedurende ~1 uur langs een ionenwisselaar te leiden. De verkregen oplossing wordt bewaard bij

4° C, waardoor het methemoglobinegehalte gedurende enkele weken < 5 % blijft. De concentraties van de voor diffusie-experimenten gebruikte oplossingen liggen alle binnen 10 % van $2 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (13 gewichtsprocent).

Er zijn drie O_2 -diffusie-experimenten gedaan door Hb-oplossingen, ondersteund door twee MEM 213 membranen (zie tabel 4.6.). Vanwege eerder genoemde lange insteltijden van het diffusieproces en de spreiding in de waterlaagpermeabiliteiten (tabel 4.4.) is vervolgens gekozen voor met hemoglobine-oplossing doordrenkte Millipore-filters (dikte 150 μm , type S.M.), omgeven door teflon of MEM 213 membranen. Deze geven een P_{O_2} van $4.5 \times 10^{-13} \text{ (mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ kPa}^{-1})$. Niet-evenwichtseffecten zijn in het geval van O_2 -diffusie door hemoglobine klein, omdat de karakteristieke lengte van het niet-evenwichtsgebied in de orde van 0.1 μm is.

	P_{3O_2}	P_{2O_2}	P_{O_2}	S.D.	n
Oplossing tussen 2 membranen MEM 213	8.9	1.0	4.3	0.5	3
Millipore-filters	8.9	1.5	4.5	0.9	17

Tabel 4.6. Gemeten zuurstofpermeabiliteiten van zoutvrije hemoglobine-oplossing (in $10^{-13} \text{ mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)
[Hb] = 2 m M. Partiële drukken in kPa.

In tabel 4.7. zijn de CO_2 -permeabiliteiten van hemoglobine-oplossingen gegeven. Deze oplossingen bevatten carbo-anhydrase. Vergelijken we deze resultaten met de CO_2 -permeabiliteit van zuiver water (tabel 4.5.), dan kunnen we hieruit geen conclusies trekken m.b.t. de grootte van de faci-

litatie. Het in de oplossing aanwezige carbo-anhydrase zal een vergro-
tende invloed op de facilitatie hebben, het hemoglobine een verkleinen-
de (t.g.v. een verlaging van D_{CO_2} en t.g.v. elektrische effecten). Om
het effect van elektrische diffusiepotentialen te bestuderen dienen
 CO_2 -diffusie-experimenten door waterlagen gedaan te worden waarvan de
dikte groter is dan 1 cm (de niet-evenwichtseffecten op de facilitatie
zijn dan verwaarloosbaar, Suchdeo e.a., ref. 19). Toevoegen van carbo-
anhydrase zal weliswaar de reacties versnellen, maar omdat c.a. zelf
een eiwit is, zal het op vergelijkbare wijze als hemoglobine het CO_2 -
transport beïnvloeden.

	p_3CO_2	p_2CO_2	P_{CO_2}	S.D.	n
Millipore-filters	0.8	0.1	29.9	1.6	2
"	4.0	0.6	27.2		
Gros, Moll (1971) Millipore	87	13	29.6	0.2	49

Tabel 4.7. CO_2 -permeabiliteiten van zoutvrije hemoglobine-oplossingen.
[Hb] = 2 m M (P_{CO_2} in 10^{-13} mol cm^{-1} s $^{-1}$ kPa $^{-1}$, drukken
in kPa).

Gros en Moll hebben P_{CO_2} bepaald bij een groter partieel drukverschil
over de Millipore-filters. Zij hebben niet gecorrigeerd voor de weer-
stand van de filters, die ze afschatten tussen 10 en 30 %.

Hoofddoel van dit onderzoek was om onderlinge invloeden van gelijk-
tijdig zuurstof- en kooldioxidetransport in hemoglobine-oplossingen aan
te tonen. Daartoe onderscheiden we de situatie waarin de fluxen gelijk-

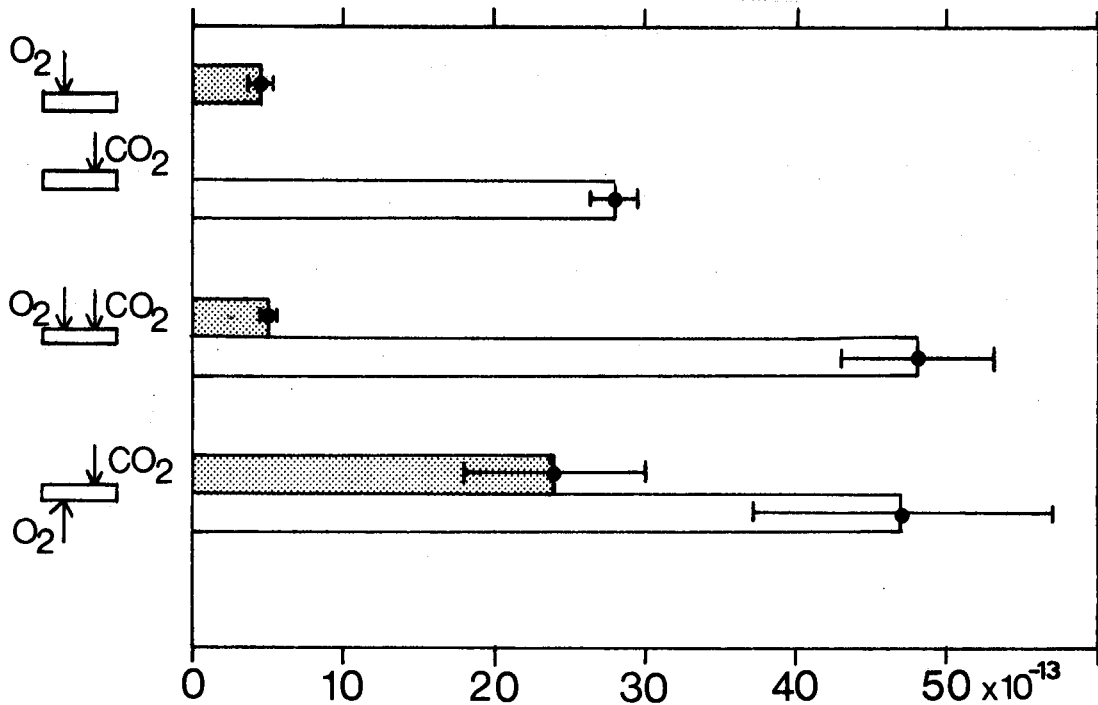
gericht zijn (co-current) en waarin ze tegengesteld gericht zijn (counter-current). In tabel 4.8 zijn de resultaten van diffusie-experimenten aan Hb-doordrenkte Millipore-filters weergegeven. De vijf metingen onder A zijn verricht aan twee hemoglobinelagen, zo ook de 3 metingen onder B. We vergelijken deze resultaten met de waarden van P_{O_2} en P_{CO_2} voor enkelvoudig zuurstof- en kooldioxidetransport uit de tabellen 4.6. en 4.7. (N.B.: de 17 metingen uit 4.6. bevatten tevens de lagen, waaraan ook het gecombineerde transport is gemeten. De enkelvoudige CO_2 -metingen uit 4.7. zijn aan identieke lagen verricht, waaraan echter geen O_2 -transport gemeten is).

Daaruit blijkt het volgende:

- Gelijktijdig, gelijkgericht CO_2 -transport heeft geen significante invloed op de grootte van het zuurstoftransport.
- Gelijktijdig, gelijkgericht O_2 -transport vergroot de CO_2 -permeabiliteit met een factor 1.7 in vergelijking met de situatie van enkelvoudig CO_2 -transport.
- Gelijktijdig, tegengesteld CO_2 -transport verhoogt het zuurstoftransport met een factor 5. Ondanks een grote spreiding (25 %) is deze invloed significant.
- Gelijktijdig, tegengesteld O_2 -transport heeft op de CO_2 -permeabiliteit dezelfde invloed als gelijkgerichte O_2 -diffusie (1.7 x vergroot).

	p_3O_2	p_2O_2	p_3CO_2	p_2CO_2	P_{O_2}	S.D.	P_{CO_2}	S.D.	μ_{O_2,CO_2}	S.D.	μ_{CO_2,O_2}	S.D.	n
A.	8.0	1.0	4.0	0.7	4.9	0.5	48	5	6.2×10^{-5}	0.9×10^{-5}	10×10^{-3}	1×10^{-3}	5
B.	1.0	8.5	5.0	0.8	24	6	47	10	2.2×10^{-3}	0.8×10^{-3}	2.6×10^{-3}	0.5×10^{-1}	3

Tabel 4.8. Permeabiliteiten van zoutvrije hemoglobine-oplossingen bij co-current (A) en counter-current (B) O_2 - CO_2 -transport. (in $10^{-13} \text{ mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$; drukken in kPa; μ in cm kPa^{-1}). Partiële drukken ter plaatse $x = L_m$ en $x = L + L_m$.



Figuur 4.1. Weergave van P_{O_2} (▨) en P_{CO_2} (□) van zoutvrije hemoglobine-oplossingen in Millipore-filters, bij enkelvoudig en gelijktijdig transport (in $\text{mol cm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{kPa}^{-1}$).

Figuur 4.1. geeft de permeabiliteiten uit tabellen 4.6 t/m 4.8 op een andere manier weer.

In tabel 4.8. zijn tevens de coëfficiënten μ_{O_2,CO_2} en μ_{CO_2,O_2} opgenomen. Deze coëfficiënten zijn gedefinieerd in vgl. 2.21.a. en 2.22.a. en zijn een maat voor de permeabiliteitsverandering per eenheid van de beïnvloedende flux. Er zijn tot nu toe te weinig experimenten verricht om de bruikbaarheid van μ als interactieparameter te verifiëren.

Omdat een interactie-theorie, waarin de elektrische potentialen en niet-evenwichtseffecten zijn betrokken, tot op heden niet gereed is, kunnen we de resultaten niet kwantitief interpreteren. Ulanowicz en Frazier (ref. 24) voorspellen m.b.v. een model dat gebaseerd is op interactie t.g.v. pH-verschillen (Bohr-Haldane-effect), maar waarin geen elektrische verschijnselen zijn verdisconteerd, een verandering van de O_2 flux

van maximaal 2 % voor lagen met $L = 100 \mu\text{m}$: een verhoging van counter-current CO_2 -transport en een verlaging met hetzelfde percentage voor co-current transport. Het is duidelijk dat de door ons gevonden resultaten niet met deze voorspellingen overeenkomen.

Resultaat d is opmerkelijk wanneer men interactie verwacht op grond van elektrische diffusiepotentialen. Deze zijn weliswaar bij O_2 -transport ongeveer een factor 8 kleiner dan bij CO_2 -transport (zie par. 1.6.), maar men verwacht dat "ompolen" van de O_2 -flux een andere facilitatie van het CO_2 -transport tot gevolg heeft.

4.4. CO_2 -gevoeligheid O_2 -electroden

Bij de berekening van de in dit hoofdstuk gepresenteerde permeabiliteiten voor zuurstof is uitgegaan van de bevindingen van Beneken Kolmer en Kreuzer (ref. 8) dat het signaal van de hier toegepaste O_2 -electroden niet beïnvloed wordt door CO_2 . Ter verificatie van deze aanname zijn experimenten gedaan, waarbij aan $\text{N}_2\text{-O}_2$ -gasmengsels met constante $p\text{O}_2$ een hoeveelheid CO_2 wordt toegevoegd. Daaruit blijkt het volgende: het electrodesignaal neemt direct na de toevoeging af (schijnbare $p\text{O}_2$ -verlaging), maar drift vervolgens weer, zij het zeer langzaam, in de richting van de oorspronkelijke waarde. Een exacte kwantitatieve invloed van CO_2 op de O_2 -detectie kunnen we daarom niet geven. Een afschatting leert dat van de gemeten vijfvoudige facilitatievergroting van het O_2 -transport t.g.v. countercurrent CO_2 -transport (par. 4.3. punt c), maximaal ongeveer 50 % toegeschreven kan worden aan deze CO_2 -gevoeligheid van de O_2 -electroden. Nader onderzoek naar dit effect is dus wenselijk.

4.5 . Convectie-verschijnselen

Een interessant verschijnsel treedt op bij O_2 -transport door laagjes hemoglobine - oplossing die tussen 2 membranen zijn opgespannen. Wanneer een zuurstofflux door een horizontaal opgestelde laag optreedt, worden licht- en donkerrode structuren zichtbaar die doen denken aan de (vrije) convectiepatronen die worden waargenomen wanneer een bakje olie aan de onderkant wordt verwarmd (ref. 23) (zie foto 4.1. en 4.2.). Zij het in dit laatste geval verschillen in dichtheid die o.i.v. de zwaartekracht gebieden van opstijgende en gebieden van dalende vloeistof veroorzaken, in het geval van O_2 -transport door een hemoglobine-oplossing ligt het voor de hand te denken aan geordend, tegengesteld gericht convectief HbO_2 - en Hb-transport (HbO_2 heeft een lichtere (rode) kleur dan Hb). De verschijnselen treden echter ook bij CO_2 -transport op. Vandaar dat plaatselijke hemoglobineconcentratieverschillen een meer waarschijnlijke verklaring voor de structuren zijn. Dat de zwaartekracht een rol speelt blijkt uit het feit dat de vorm en groote van de patronen anders zijn bij omgekeerde fluxrichting.

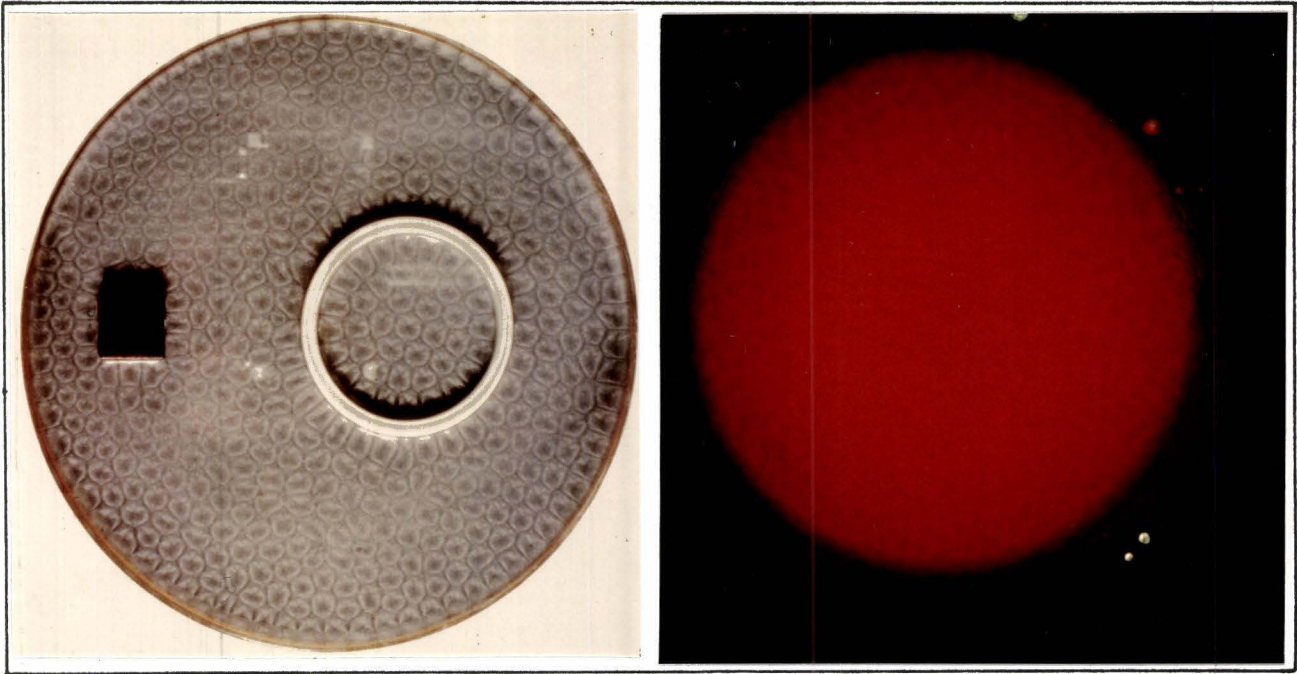


Foto 4.1. Convectiepatroon in een bakje olie dat aan de onderkant verwarmd wordt.

Foto 4.2. Waargenomen structuren tijdens gastransport door een hemoglobine laag.

Wanneer we hier inderdaad met convectief transport te maken hebben, zal dat in een essentieel andere interpretatie van onze experimenten resulteren, omdat het diffusie-reactie-model dan niet meer opgaat. Bovengenoemd verschijnsel is, zoals te verwachten, niet geconstateerd bij O_2 - CO_2 -transport door hemoglobine-oplossingen in Millipore-filters, zodat de resultaten van deze experimenten onaangetast blijven.

5. CONCLUSIES

Beschreven is een opstelling waarmee zowel enkelvoudig als gelijktijdig stationair zuurstof- en kooldioxidetransport gemeten is. De diffusiecel is geschikt voor het maken van vrije hemoglobine laagjes tussen twee membranen. Aan toepassing hiervan bleken echter enkele nadelen te kleven:

1. de insteltijd van het diffusieproces is lang (> 2 uur);
2. de spreiding in de (test)metingen aan waterlagen is groot;
3. tijdens diffusie door hemoglobine laagjes treden verschijnselen in de laag op (lichte en donkere structuren) die een gevolg van de vrije convectorie zijn.

Met water of hemoglobine verzadigde, en door twee membranen omgeven Millipore-filters vertonen bovengenoemde bezwaren niet, terwijl de laagdikte beter gedefinieerd is. De laagjes zijn echter zo dun, dat de reacties m.b.t. CO_2 tijdens het transport niet in evenwicht zijn.

De zuurstofdetectie m.b.v. elektroden voldoet goed (signaal-ruisverhouding 50:1), maar de CO_2 -analyse is voor verbetering vatbaar: naast een waargenomen en tot op heden niet verklaarbare drift in de pH-meting vertoont de methode een grote relatieve onnauwkeurigheid bij CO_2 -concentraties < 0.1 kPa. Dit kan bij toekomstige metingen aan dikkere lagen (kleinere respons) moeilijkheden opleveren. Tot bepaalde hoogte kan een groter monstervolume uitkomst bieden. Vergroten van het diffusie-oppervlak is een andere (zij het ingrijpende) verbetering van het systeem.

Dat in onze opstelling geen stroomsnelheden worden gemeten blijkt geen probleem wanneer de waarde voor de stikstofpermeabiliteit van de bestudeerde laag bekend is uit de literatuur of apart onderzoek.

Metingen van inerte diffusie (CO_2 - en O_2 -diffusie door Silastic en MEM 213 en O_2 -diffusie door water) geven permeabiliteiten die goed met de literatuurwaarden corresponderen. De gemeten permeabiliteit van teflon is groter dan die uit de literatuur.

Metingen aan laagjes hemoglobine-oplossing tonen aan dat er in een aantal situaties een duidelijke interactie is van O_2 - en CO_2 -transport, zoals weergegeven in figuur 4.2. Een kwantitatieve oorzakelijke beschrijving van deze onderlinge beïnvloeding, met name m.b.t. de rol van elektrische potentialen daarbij, kan pas gegeven worden aan de hand van een inzichtelijk theoretisch model dat nog in ontwikkeling is. Dit model beoogt diffusiefluxmetingen en elektrische potentiaalgradiëntmetingen onder gelijke condities met elkaar in verband te brengen.

APPENDIX 1. Afleiding van formules 2.16 en 2.17

We passen de wet van behoud van materie toe op elk der componenten O_2 , CO_2 en N_2 in de KK (zie figuur 2.5).

$$\frac{F_1}{ART} p_1 O_2 + J_{O_2} = \frac{F_2}{ART} p_2 O_2 \quad (A.1)$$

$$\frac{F_1}{ART} p_1 CO_2 + J_{CO_2} = \frac{F_2}{ART} p_2 CO_2 \quad (A.2)$$

$$\frac{F_1}{ART} p_1 N_2 + J_{N_2} = \frac{F_2}{ART} p_2 N_2 \quad (A.3)$$

Sommatie van A.1 t/m A.3 geeft:

$$\sum_i J_i = \frac{p}{ART} (F_2 - F_1) \quad (A.4)$$

$$\text{waarin } p = p_{O_2} + p_{CO_2} + p_{N_2} \quad (A.5)$$

We definiëren:

$$\Delta O_2 = p_2 O_2 - p_1 O_2 \quad (A.6)$$

$$\Delta CO_2 = p_2 CO_2 - p_1 CO_2 \quad (A.7)$$

$$\Delta N_2 = p_2 N_2 - p_1 N_2 \quad (A.8)$$

Combinatie van A.4 en A.2, gebruik makend van de afkortingen A.6 t/m A.8 geeft voor J_{CO_2} :

$$J_{CO_2} = \frac{\left(\frac{F_1}{ART} p \Delta CO_2 + p_2 CO_2 J_{O_2} + p_2 CO_2 J_{N_2} \right)}{(p - p_2 CO_2)} \quad (A.9)$$

Vul A.9 in A.4 in en elimineer uit deze laatste F_2 . Deze F_2 vullen we in in A.1, waaruit een uitdrukking volgt voor J_{O_2} :

$$J_{O_2} = \frac{F_1}{ART} \Delta O_2 + \frac{p_{2O_2}}{p} J_{O_2} + \frac{p_{2O_2}}{p} J_{N_2} + \frac{p_{2O_2}}{p} \frac{\left(\frac{F_1}{ART} p \Delta CO_2 \right)}{(p - p_{2CO_2})} +$$
$$+ \frac{p_{2O_2} p_{2CO_2} J_{O_2}}{p (p - p_{2CO_2})} + \frac{p_{2O_2} p_{2CO_2} J_{N_2}}{p (p - p_{2CO_2})} \quad (A.10)$$

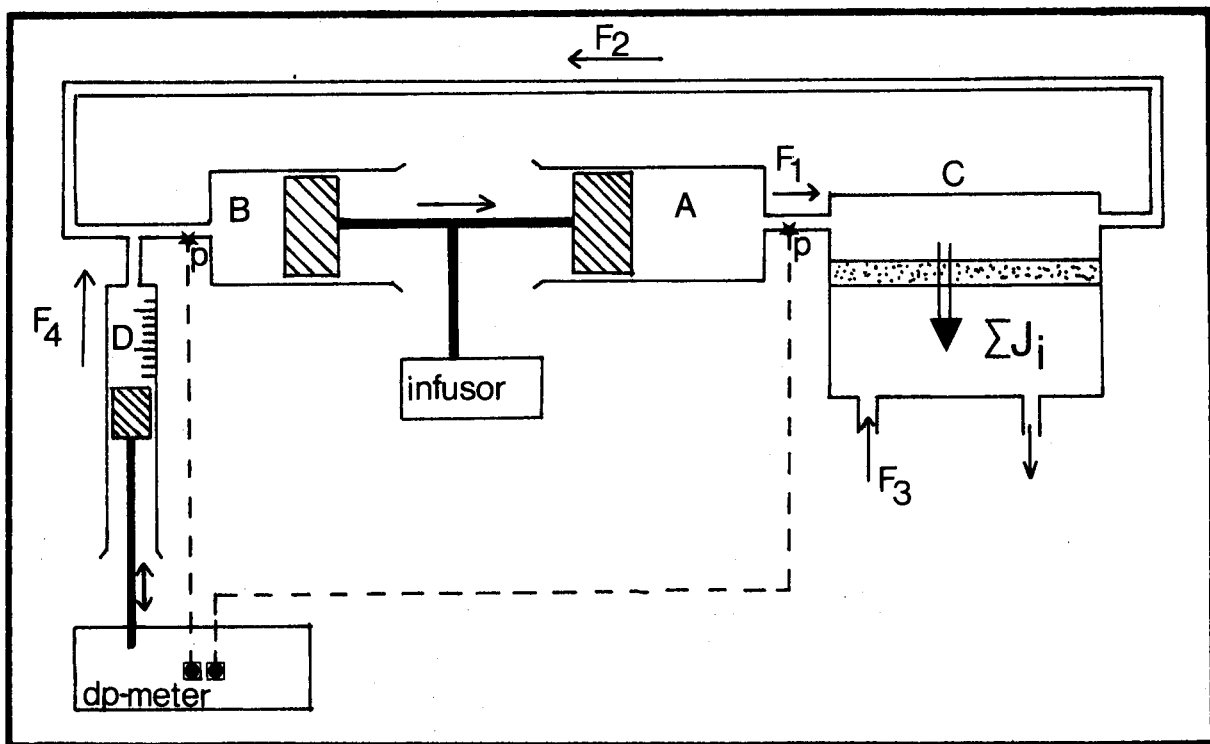
Na enig rangschikken volgt vergelijking

$$J_{O_2} = \frac{F_1}{ART} \Delta O_2 - \frac{p_{2O_2}}{p_{2N_2}} \frac{F_1}{ART} \Delta N_2 + \frac{p_{2O_2}}{p_{2N_2}} J_{N_2} \quad (A.11)$$

De afleiding van vergelijking (2.17) verloopt analoog.

APPENDIX 2. Meting van gasstroom F_2

In hoofdstuk twee hebben we gezien dat de gasstroom F_2 die de diffusiecel verlaat i.h.a. niet gelijk is aan F_1 , omdat $\sum J_i \neq 0$. Deze netto gasflux bedraagt tijdens de experimenten van dit onderzoek maximaal $5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, hetgeen bij een meetstroom van $0.025 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ een relatieve stroomverandering ($F_2 - F_1$) van 1.5 % betekent. Er zijn echter condities denkbaar waaronder deze relatieve veranderingen groter zijn ($> 10 \%$). Om niet afhankelijk te zijn van een (eventueel foute) literatuurwaarde van P_{N_2} moeten we in die gevallen de grootte van de uitgaande gasstroom meten. Dat kan bijvoorbeeld als volgt.



Figuur A.2.1. Schematische tekening van een uitbreiding van de meetopstelling ter bepaling van de meetstroom F_2

In figuur A.2.1. is de diffusiecel C schematisch getekend.

De meetstroom F_1 wordt door een spuit A in een infusor ingesteld.

We brengen een tweede, identieke spuit B zodanig aan dat de infusor beide zuigers gelijktijdig voortbeweegt. Dan geldt:

$$\frac{d V_A}{d t} = - \frac{d V_B}{d t} \quad (\text{A.2.1})$$

V_A, V_B : volume van de spuiten A en B ten tijde t.

De meetstroom F_2 die de KK verlaat wordt aangesloten op spuit B.

Wanneer $F_1 \neq F_2$ zal er een drukverschil

$$p_B - p_A = \Delta p (t) \quad (\text{A.2.2})$$

ontstaan. Men brengt in elke spuit een drukopnemer (p) aan, die verbonden is met een electronische schakeling (dp-meter). Het drukverschil wordt omgezet in een electricch potentiaalverschil, dat een automatische buret D stuurt. Het drukverschil kan zo op een constante waarde gehouden worden. De gasstroom F_4 correspondeert dan met de som van de diffusiefluxen volgens:

$$F_4 = \frac{ART}{p} \sum_i J_i \quad (\text{A.2.3})$$

A = diffusieoppervlak

R = universele gas-constante

T = temperatuur

p = totaal druk

Waaruit F_2 volgt:

$$F_2 = F_1 - F_4 \quad (\text{A.2.4})$$

De nauwkeurigheid van deze methode om de meetstroom F_2 te meten zal afhangen van de gevoeligheid van de drukopnemers, de nauwkeurigheid van de spuit en buret en van veranderingen in de temperatuur. Dat deze laatste zeer belangrijk is mag blijken uit het volgende voorbeeld. Een temperatuurfluctuatie van 0.1 K van een volle spuit A geeft in een meetstroom van $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (de gebruikelijke grootte-orde) een relatieve verandering van ongeveer 2 %, terwijl de meetstroomverandering t.g.v. de diffusiefluxen tijdens onze experimenten 1.5 ‰ bedroeg.

REFERENTIES

1. WRIGHT, C.I.: The diffusion of carbondioxide in tissues. *J.Gen. Physiol.* 17, 657-676 (1934).
2. LONGMUIR, I.S., R.E. FORSTER, C.Y. WOO: Diffusion of carbon-dioxide through thin layers of solution. *Nature* 209, 393-394 (1966).
3. WARD, W.J., W.L. ROBB: CO₂-O₂-separation; facilitated transport of carbon dioxide across a liquid film. *Science* 156, 1481-1484 (1967).
4. KIRSCHENBAUM, D.M.: Atlas of protein spectra in the ultraviolet and visible regions. IFI/Plenum, N.Y., 1974.
5. COLTON, C.K., P. STROEVE, J.G. ZAHKA: Mechanism of oxygen transport augmentation by hemoglobin. *J.Appl.Physiol.* 35, 307-309 (1973).
6. KIMMICH, H.P., F. KREUZER: Catheter pO₂-electrode with low flow dependency and fast response. *Progr.Resp.Res.* 3, 100-110, Karger, Basel-New York, 1969.
7. SCHULER, R., F. KREUZER: Rapid polarographic in vivo oxygen catheter electrodes. *Respir.Physiol.* 3, 90-110 (1967).
8. BENEKEN KOLMER, H.H., F. KREUZER: Continuous polarographic recording of oxygen pressure in respiratory air. *Respir.Physiol.* 4, 109-117 (1968).
9. De KONING, J., P. STROEVE, J.H. MELDON: Electrical potential during carbon dioxide transport in hemoglobin solutions. In: *Oxygen Transport to Tissue - III*. I.A. Silver, M. Erecińska (eds.), Plenum Press, New York, 1978.
10. MELDON, J.H., J. de KONING, P. STROEVE: Electrical potential induced by CO₂-gradients in protein solutions and their role in CO₂-transport. *Bioelectrochem.Bioenerg.* 5, 77-87 (1978).
11. BREEPOEL, P.M., J. de KONING, L.J.C. HOOFD: Facilitation of oxygen diffusion in hemoglobin solutions: measurement of electrical effects. In: *Advances in Physiological Sciences*, 25, Oxygen Transport to Tissue, 315-316, A.G.B. Kovach, E. Dora, M. Kessler, I.A. Silver (eds.), Pergamon Press, Budapest (1981).
12. HOOFD, L., P.M. BREEPOEL, J. de KONING: Facilitation of oxygen diffusion in hemoglobin solutions: new theoretical aspects. In: *Advances in Physiological Sciences*, 25, Oxygen Transport to Tissue, 321-322, A.G.B. Kovach, E. Dora, M. Kessler, I.A. Silver (eds.), Pergamon Press, Budapest (1981).

13. De KONING, J., L.J.C. HOOFD, P.M. BREEPOEL: Facilitation of oxygen diffusion in hemoglobin solutions: influence of various salt concentrations. In: *Advances in Physiological Sciences*, 25, Oxygen Transport to Tissue, 323-324, A.G.B. Kovach, E. Dora, M. Kessler, I.A. Silver (eds.), Pergamon Press, Budapest (1981).
14. MELDON, J.H., K.A. SMITH, C.K. COLTON: The effect of weak acids upon the transport of carbon dioxide in alkaline solutions. *Chem. Eng. Sci.* 32, 939-950, Pergamon Press, G. Brittain (1977).
15. SUCHDEO, S.R., J.S. SCHULTZ: The permeability of gases through reacting solutions: the carbon dioxide-bicarbonate membrane system. *Chem. Eng. Sci.* 29, 13-23, Pergamon Press, G. Brittain (1974).
16. ENNS, T.E.: Facilitation by carbonic anhydrase of carbon dioxide transport. *Science* 155, 44-47 (1967).
17. MELDON, J.H.: Theoretical aspects of facilitated CO₂-transport (1978), (unpublished).
18. BAUER, C.: The contribution of carbamate in human adult and foetal blood to the CO₂-exchange during the respiratory cycle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 28, 225 (1972).
19. SUCHDEO, S.R., J.S. SCHULTZ: Mass transfer of CO₂ across membranes: facilitation in the presence of bicarbonate ion and the enzyme carbonic anhydrase. *Biochim. Biophys. Acta* 352, 412-440 (1974).
20. BREEPOEL, P.M.: Proton binding studies on hemoglobins of cow and eel and the interaction with organic phosphates. Proefschrift, Nijmegen, 1978.
21. HOOFD, L.J.C., F. KREUZER: A new mathematical approach for solving carrier-facilitated steady-state diffusion problems. *J. Math. Biol.* 8, 1-13 (1979).
22. GROS, G., W. MOLL: The diffusion of carbon dioxide in erythrocytes and hemoglobin solutions. *Pflügers Arch.* 324, 249-266 (1971).
23. VELARDE, M.G., C. NORMAND: Convection. *Scientific American* 243/1, 78-94 (1980).
24. ULANOWICZ, R.E., G.C. FRAZIER: The transport of oxygen and carbon dioxide in hemoglobin systems. *Math. Biosci.* 7, 111-129 (1970).