

Osmometrie

Specializační vzdělávání

Katedra laboratorních metod LF MU

Mgr. Jana Gottwaldová

14.2.-18.2. 2011

Osmometrie

- Analytická metoda k měření koncentrace částic v roztoku; využívá změn, které působí částice rozpuštěné v rozpouštědle.
- Obor, který se zabývá měřením **osmotických vlastností látek**

Osmotické vlastnosti látek

Osmotický tlak: Je to tlak nízkomolekulárních látek a iontů v rozpouštědle.

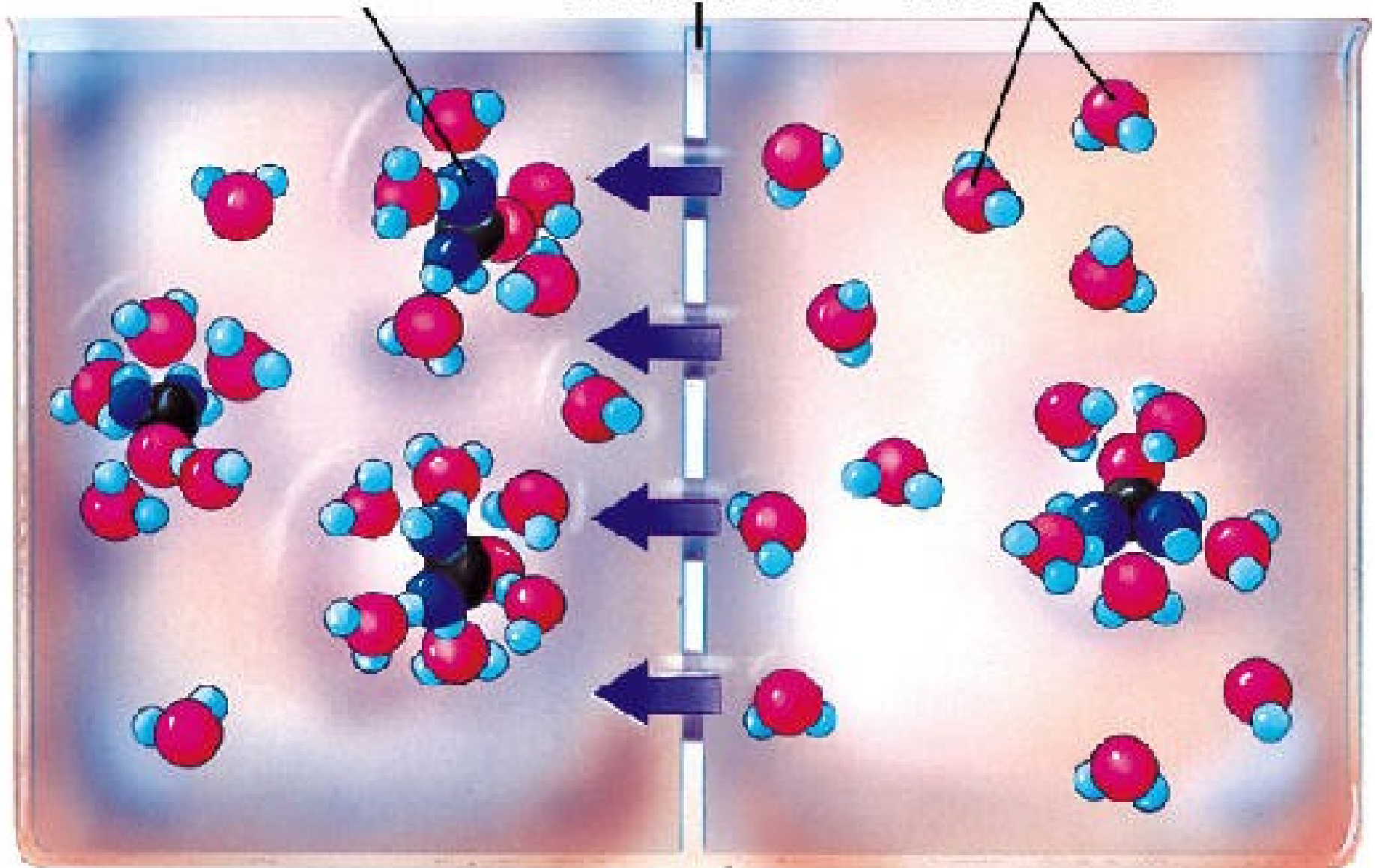
- Jestliže jsou dva vodné roztoky o různé koncentraci od sebe odděleny polopropustnou membránou, která je propustná pouze pro vodu (ne pro rozpuštěné částice), potom proniká voda z prostoru s nižší koncentrací rozpuštěných částic, do prostoru s vyšší koncentrací rozpuštěných částic.
- Tento pohyb molekul vody se nazývá **osmóza**. Tlak který je třeba vyvinout k zabránění pohybu vody přes membránu, se nazývá **osmotický tlak**.

Osmotic Pressure

Urea
molecule

Semipermeable
membrane

Water
molecules



Osmometrie

- **Osmotický tlak** vzniká důsledkem působení celkového počtu částic v roztoku bez ohledu na jejich velikost.
- Každá částice – molekula, atom nebo iont v roztoku se podílí na konečné hodnotě osmotického tlaku stejnou mírou.
- Osmometrie je tedy technika k měření koncentrace rozpuštěných částic v roztoku tzv. **osmolární koncentrace**.

Osmolární koncentrace

- **Osmolarita** – vyjadřuje se v **mmol/l** roztoku
 - Je to osmotická látková koncentrace, **tento pojem se běžně nepoužívá.**
- **Osmolalita** – vyjádřená v **mmol/kg** rozpouštědla
 - je přesnější z termodynamického hlediska, protože koncentrace roztoku vztažená na váhu rozpouštědla není závislá na teplotě.

Osmometrie

Částice rozpuštěné v roztoku působí:

- zvýšení osmotického tlaku
- snížení bodu tuhnutí (**kryoskopie**)
- zvýšení bodu varu
- zvýšení tenze vodních par (**ebulioskopie**)

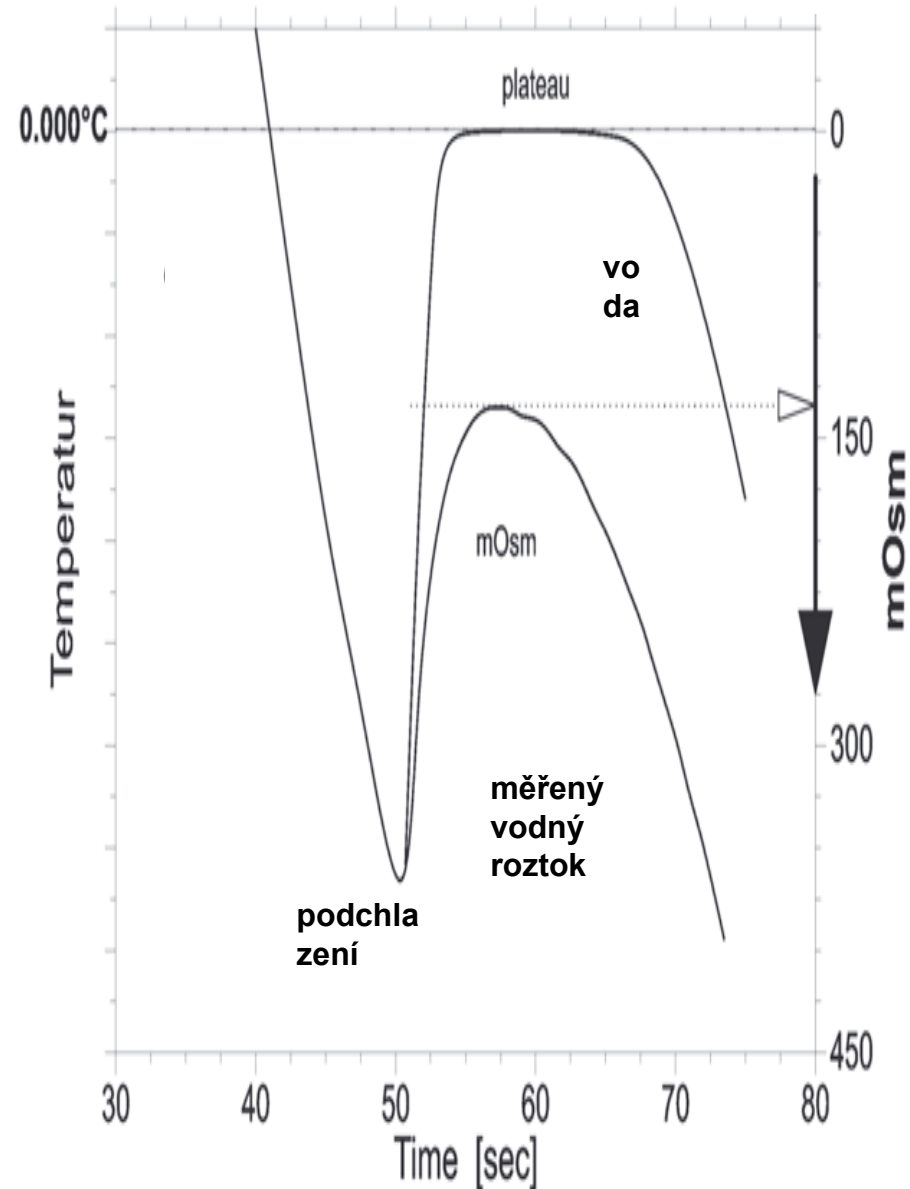
Všechny tyto změny jsou přímo závislé na celkovém počtu částic, které jsou rozpuštěny v 1 kg rozpouštědla, tzn. na osmolalitě roztoku.

Kryoskopie

- Nejčastěji používaná metoda k měření osmolární koncentrace v biologických tekutinách (plazmě, séru, moči), která je založena na měření snížení bodu tuhnutí.
 - Bod tuhnutí čisté vody je **0,000 °C**
 - 1molární roztok glukózy rozpuštěný v 1kg vody má bod tuhnutí snížen na **-1,858 °C**
 - **To znamená, že 1 osmomol látky rozpuštěný v 1 kg vody, sníží bod tuhnutí o 1,86 °C.**

Kryoskopická teplotní křivka

- Vzorek se nejprve termoelektricky ochladí několik stupňů pod bod tuhnutí
- Poté se mechanicky indukuje začátek krystalizace
- V tomto bodě se při krystalizaci uvolňuje skupenské teplo tuhnutí – dojde ke zvýšení teploty přesně na teplotu tuhnutí
- Teplota tuhnutí je stejná po dobu kdy se uvolňuje skupenské teplo tuhnutí rozpouštědla = „fáze platau“
- Teprve pak pokračuje ochlazování mrznoucího roztoku
- Pokles bodu tuhnutí roztoku (vzorku) proti bodu tuhnutí rozpouštědla (vody) je přímo úměrný **osmolalitě**



Osmometr

- Osmometr je založen na kryoskopickém měření, kdy se měří bod tuhnutí vodných roztoků.
- Jednotlivé přístroje se liší způsobem jakým vyvolávají začátek krystalizace podchlazeného měřeného vzorku
 - Krátkodobá vibrace kovového drátku – původní analogový přístroj
 - Poklep kladívka na stěnu měřicí nádoby – např. osmometr fy Advance
 - Účinkem ultrazvukových vln – např. osmometr fy Arkray

Analogový osmometr

- Do měřicí nádoby se zabroušeným hrdlem se pipetuje 200 μm vzorku
- Do nádoby se zanoří termistor ve skleněném obalu a tenký drátek, který složí jako míchadlo, nádoba se zasune do mrazicí komory
- V mrazicí komoře je vzorek rychle podchlazen pod bod mrazu, aby rychle zmrznul
- Krátkodobá vibrace drátku v nádobce způsobí okamžitou tvorbu krystalků ledu
- Při krystalizaci se uvolňuje skupenské teplo tuhnutí – teplota v nádobce se přechodně zvýší a to přesně na bod tuhnutí roztoku
- Toto teplotní „platau“ je zaznamenáno velice citlivým termistorem, který měří teplotu s přesností na $0,001^\circ\text{C}$

KNAUER

SEMI-MICRO OSMOMETER *VIBRATOR*



Milliosmol

400 800 1600



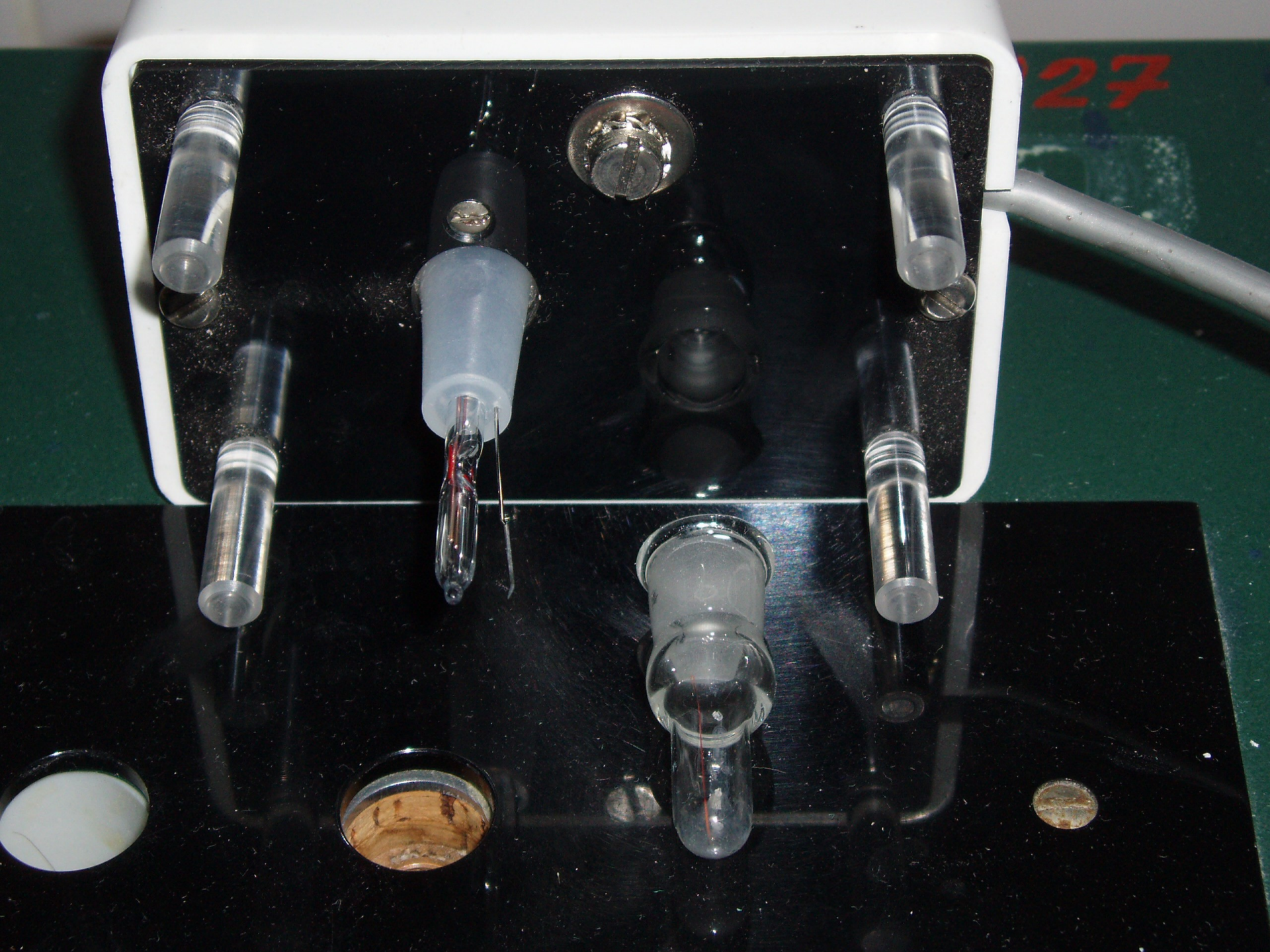
H₂O

400 m Osm



NE POUZÍVAT NEPŘEMÍSTOVAT

2.4.74



Osmometr-Advanced Instruments

- **Dávkovač** - speciální pipeta, která dávkuje a umísťuje vzorek do měřicí komůrky a zároveň aktivuje spouštěcí spínač
- **Chladicí komůrka** - teplota v ní je udržována pomocí modulu s termoelektrickými články; dynamické změny teploty vzorku se automaticky měří pomocí termistoru a hodnoty se zobrazují na displeji
- Pro indukci krystalizace používá **poklep kladívka** na chladicí komůrku
- Displej - zobrazuje výsledky testů, požadované informace a chybová hlášení;

Upozornění pro pohotovost

Pro získání přesnějších měření Advanced 3300 pro měření pomocí měřicího prvku
čísloka řada měření musí být rovno 1000000

Výsledek měření prvního vzorku po delší pauze nepoužít, měření opakovat

12-2-2006

© 2006 Advanced Instruments, Inc.

Test Chamber
101800



The Advanced™ Micro Osmometer

Model 3300

v.č. 97110731 B

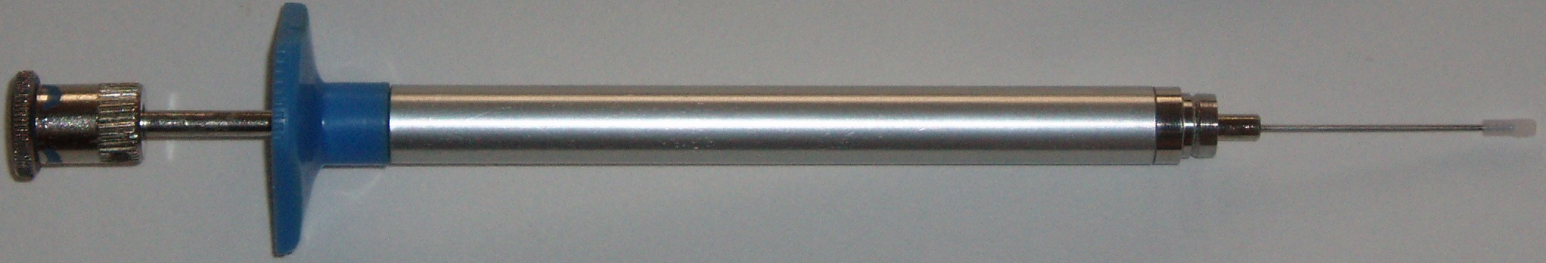
Chamber Cleaners



Syringe Tips



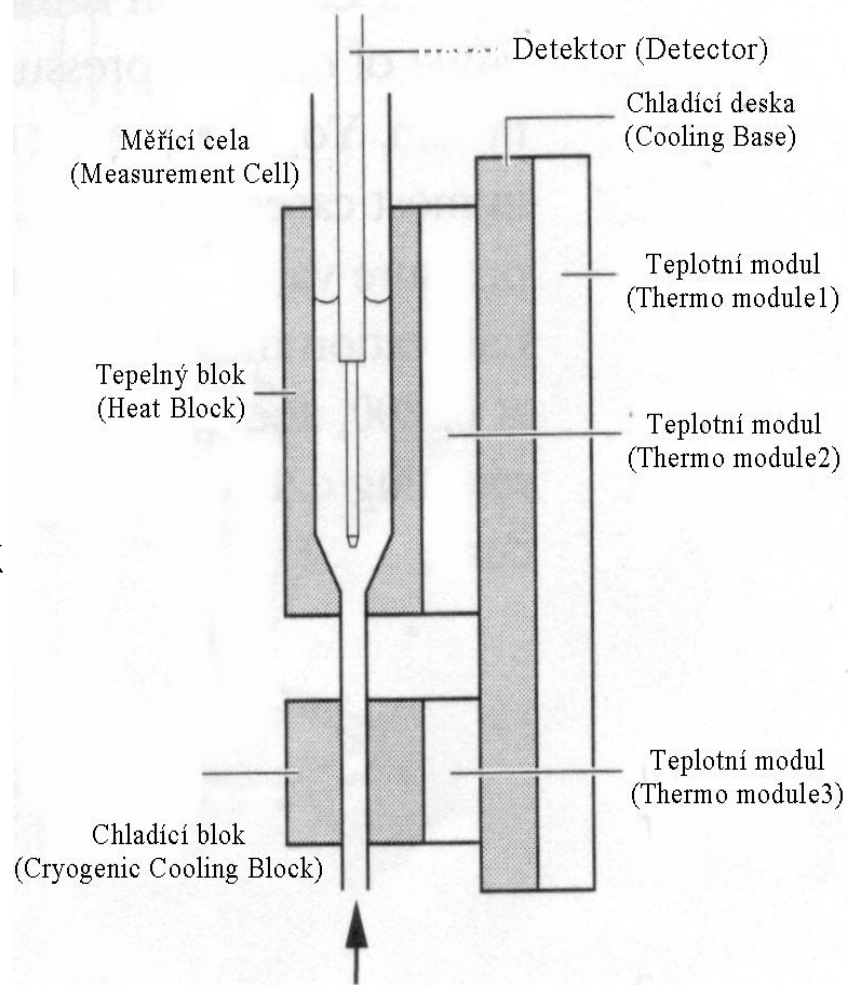
 **ADVANCED INSTRUMENTS, Inc.**
LAB PRODUCTS DIVISION
Two Technology Way / 781-320-9000
Norwood, Massachusetts 02062, USA





Osmometr – Arkray Osmo Station

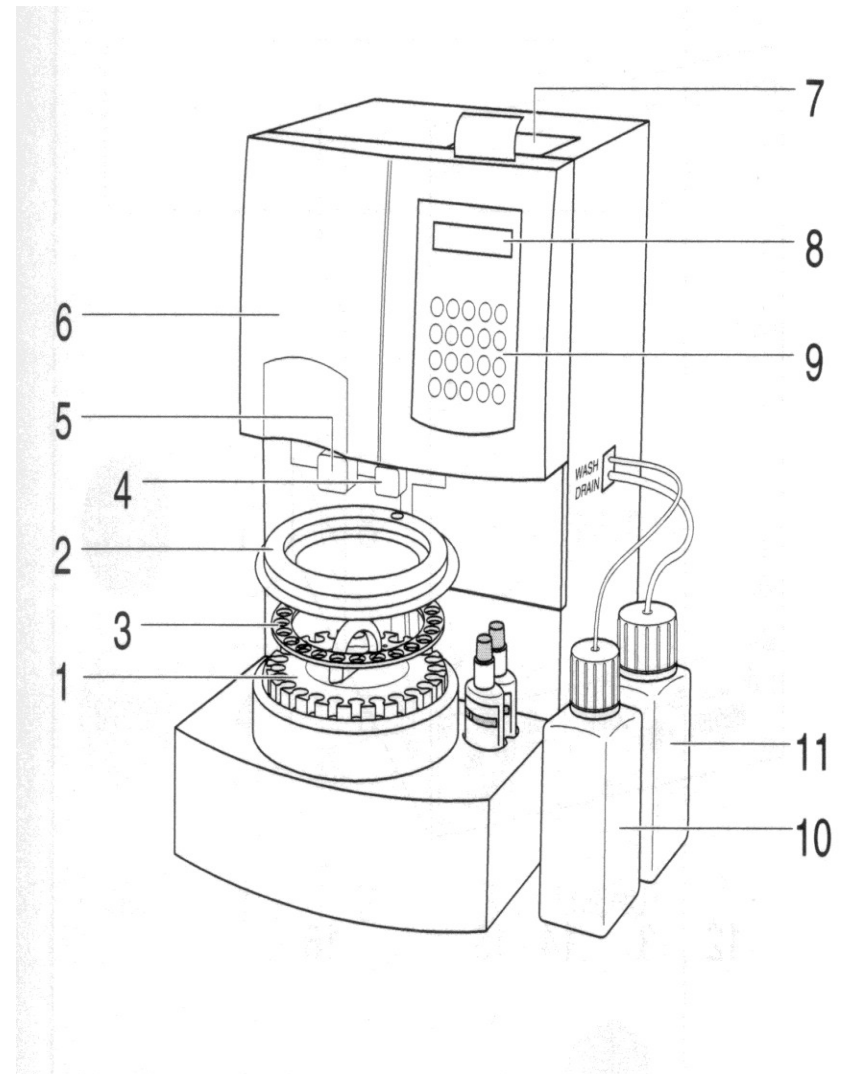
- Tryska natáhne vzorek a pošle ho do měřící cely.
- Thermo-module 2 je aktivován a postupně ochlazuje Heat Block. To způsobuje superchlazení: vzorek v měřící cele je ještě kapalný v bodě tuhnutí (tání).
- Thermo modul 3 je aktivován k chlazení Cryogenic Cooling Blocku, dokud teplota nepoklesne pod teplotu tuhnutí.
- Vzorek v bloku tuhne (zmrzne) a vzorek v měřící cele koaguluje (sráží se).
- Měření teploty krystalizace určuje snížení teploty v bodě tuhnutí.
- Opačný proud je aplikován na Thermo-moduly 1 a 3 k zahřátí Heat Blocku a Cryogenic Cooling Blocku. Vzorek roztaje do svého původního kapalného stavu. Tryska přeneseme vzorek z měřící cely do nádobky.



Obr. 1 Měřící cely

Osmometr – Arkray Osmo Station

- 1. Podavač
- 2. Kryt zabraňující odpařování vzorků A
- 3. Druhý protiodpařovací kryt B
- 4. Promývací cela
- 5. Statimová pozice
- 6. Přední kryt
- 7. Tiskárna
- 8. Displej
- 9. Operační panel
- 10. Láhev s promývacím roztokem
- 11. Odpadní nádoba





DATE: 2006-2-25
BATCH No.: 000
MEAS No.: AG42520W
ID: 2282
DATE: 2006-2-25
BATCH No.: 004-01

MERS 0001
READY

01-24
10:08

START 7 8 9 FEED
STOP 4 5 6 No.
CAL 1 2 3 MENU
STAT 0 - CE ENTER

ARKRAY

Termistory – detekce bodu tuhnutí

- Polovodičové odporové senzory
- Princip: závislost jejich odporu na teplotě
- Elektrony jsou pevně vázány k jádru (na rozdíl od kovů, kde dojde působením el. proudu k vytvoření tzv. elektronového plynu) dodáním energie – tzn. zvýšením teploty přeskochí elektrony do tzv. vodivostního pásu a začnou se účastnit vedení elektrického proudu. S rostoucí teplotou roste i koncentrace nosičů nábojů a el. odpor materiálu se snižuje

Osmometrie - Ebulioskopie

- **Analytická metoda k měření osmolality, málo používaná, horší reprodukovatelnost**
- **Princip: snížení tenze vodních par - využívá další z vlastností, kterou způsobí rozpuštěná látka v rozpouštědle**
 - Počet částic v roztoku snižuje proporcionálně tenzi vodních par, což vede ke snížení rosného bodu
 - Rosný bod je teplota, při které je vzduch maximálně nasycen vodními parami, pokud teplota klesne pod teplotu rosného bodu, nastává kondenzace vodních par

Stanovení osmolality v biologických tekutinách

- **Přímé** měření osmolality – nejčastěji kryoskopická metoda
- **Nepřímé** – použití různých vzorců zohledňující koncentrace hlavních analytů, jež se podílejí na osmotickém tlaku

Stanovení osmolality v biologických tekutinách

$$\text{Osm (mmol/kg)} = 2 [\text{Na}^+] + [\text{glc}] + \text{močovina}$$

Fyziologická hodnota séra: 285 ± 10
mmol/kg

Fyziologická hodnota moče: 600-1200
mmol//kg/d

Osmotické okno- osmolal gap

Je to rozdíl mezi naměřenou a vypočítanou osmolalitou.

Výpočet:

osmolalita mmol/kg H₂O = **2 [Na]** mmol/l +
[urea] mmol/l + **[glykémie]** mmol/l.

- Obě hodnoty se běžně shodují, resp. liší pouze v intervalu do 5, maximálně 10 mmol/kg H₂O.

Osmotické okno- osmolal gap

- Porovnání výpočtu s měřením je užitečné tam, kde je podezření na přítomnost látek o malé molekule, s nimiž výpočet nepočítá.
- Měření potom může být vyšší než výpočet třeba o 50 až 100 mmol/kg H₂O.
- Hovoříme potom o osmolální mezeře (osmolal gap). Např. 1 ‰ alkoholu v plazmě zvýší naměřenou osmolalitu o cca 23 mmol/kg H₂O.

Stanovení osmolality v biologických tekutinách

Tělesné tekutiny jsou krystaloidní a koloidní roztoky organických a anorganických látek.

- Tvoří jednak hlavní část buněčné fáze organismu - intracelulární tekutinu, jednak tzv. extracelulární tekutinu.
- Tyto fáze jsou odděleny buněčnými membránami. Obě složky extracelulární tekutiny, tj. složka intravazální a intersticiální, jsou odděleny kapilární stěnou.

Stanovení osmolality v biologických tekutinách

O osmolalitě séra (plazmy) rozhoduje především

Na⁺ a odpovídající anionty, dále urea, glukóza a v malé míře bílkoviny.

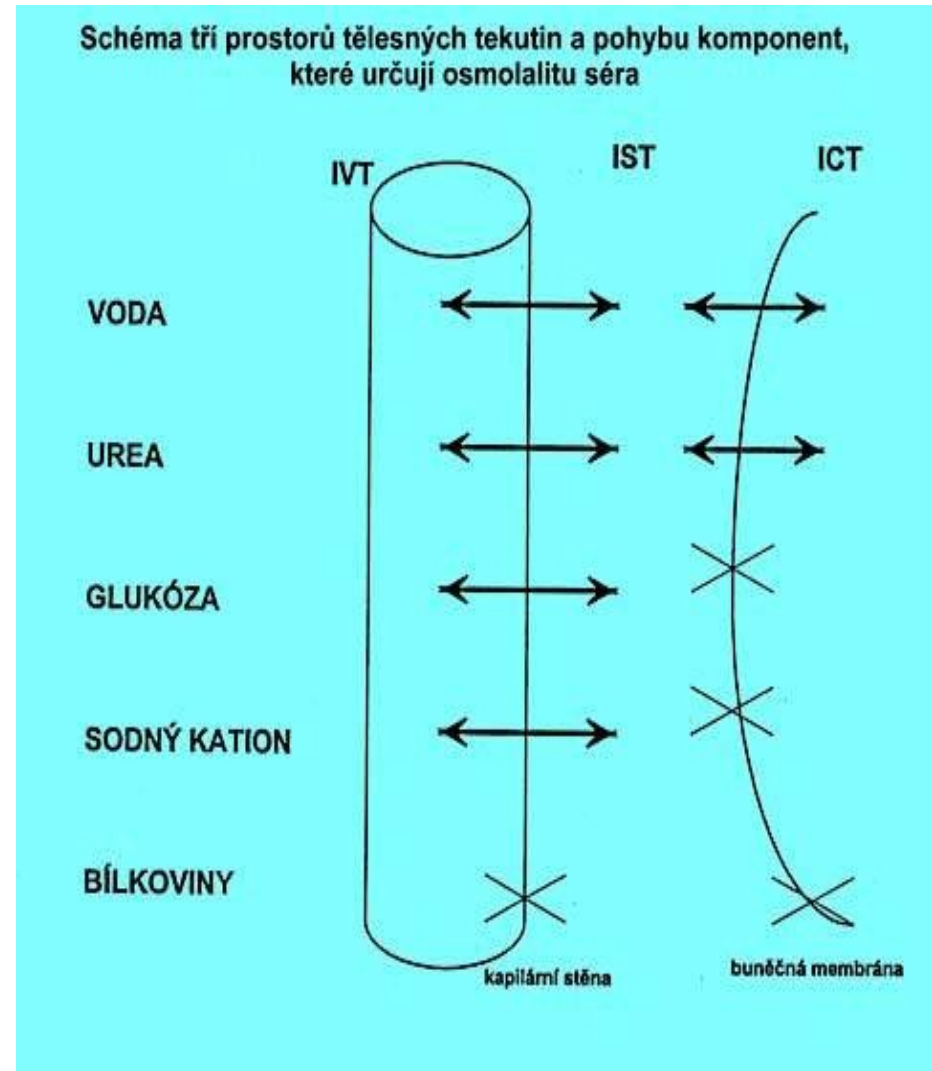
- Podíl urey se stává významnějším až s její retencí
- Podíl glykémie roste s dekompenzací diabetika nebo při intoleranci glukózy u kriticky nemocných
- Podíl bílkovin, tzv. koloidně osmotický tlak, je významný pro udržení cirkulujících tekutin v cévním řečišti

Schematické znázornění tří prostorů tělesných tekutin, oddělených membránami (kapilární stěna, buněčná membrána).

- IVT – intravazální tekutina – plasma
- IST intersticiální tekutina- zajišťuje výměnu látek mezi buňkou a zevním prostředím
- ICT-Intracelulární tekutina – uvnitř buněk

Hlavní podíl na osmolalitě:

Na⁺, K⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, glc, močovina



Význam stanovení osmolality

Hyperosmolalita (> 300 mOsm)

příčina hyperosmolality :

- může být ztráta prosté vody, akutní katabolismus, diabetické kóma, popáleniny, často selhání ledvin, těžké sepse, akutní intoxikace látkami o malé molekule (ethylenglykol) nebo tonutí ve slané vodě.
- Patobiochemicky je u většiny těchto stavů v popředí zvýšení efektivní osmolality v ECT a přesun vody z IC do EC prostoru.

Význam stanovení osmolality

Klinické projevy:

- Jde o stavy od mírných neuropsychických poruch spojených s nespecifickými motorickými symptomy až k deliriu a nakonec kómatu.
- Vývoj hyperosmolálního stavu provázejí zmatenost a halucinace, které jsou někdy u starších lidí mylně považovány za projevy sklerózy mozkových cév. Typická je žízeň a bolesti hlavy

Význam stanovení osmolality

Hypoosmolalita (< 270 mOsm)

- **Příčina:** jsou metabolická odpověď na trauma, nadbytek celkové vody, úhrada ztrát izotonické tekutiny vodou, chronický katabolismus, tonutí ve sladké vodě, nepřiměřená sekrece ADH.
- **Klinické projevy:** vývoj hypoosmolálních stavů je provázen slabostí, nevolností, apatií a opět bolestmi hlavy. Vzniká difuzní edém mozku, bílkovina v likvoru je nízká pod 0,1 g/l.