

OSMOMETRIE

OSMOMETRIE

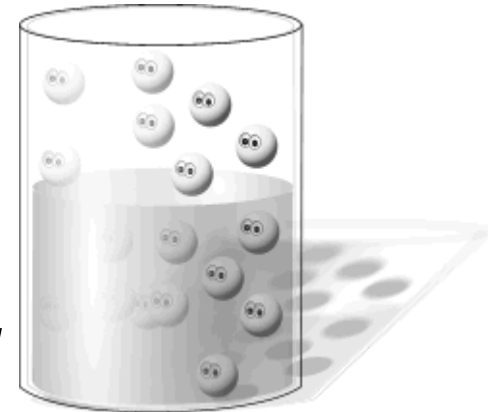
Princip

- analytická metoda k měření **koncentrace částic v roztoku**.
- využívá změn, které způsobí částice rozpuštěné v rozpouštědle tzv. **koligativních vlastností roztoku**.

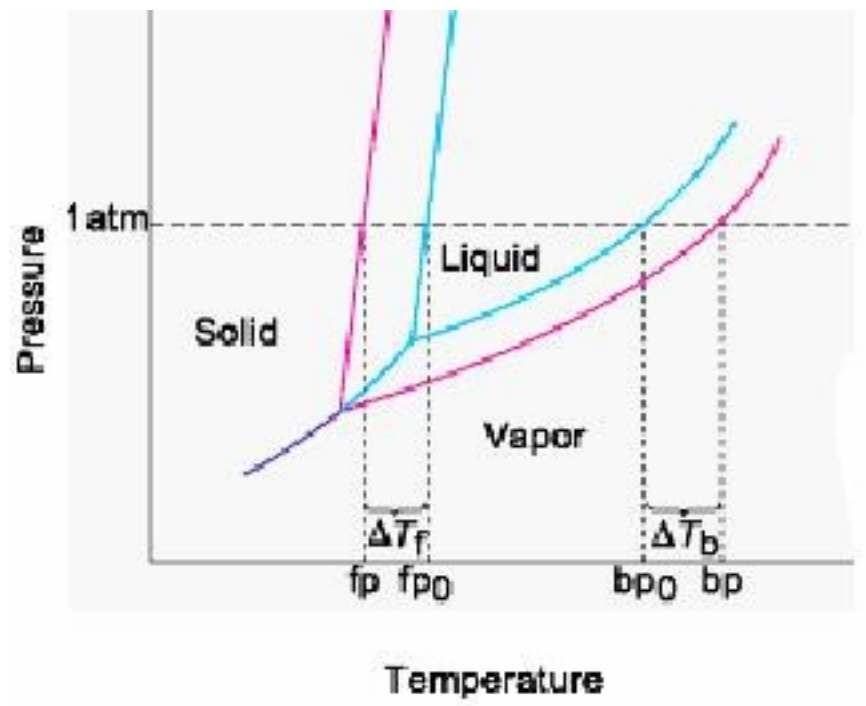
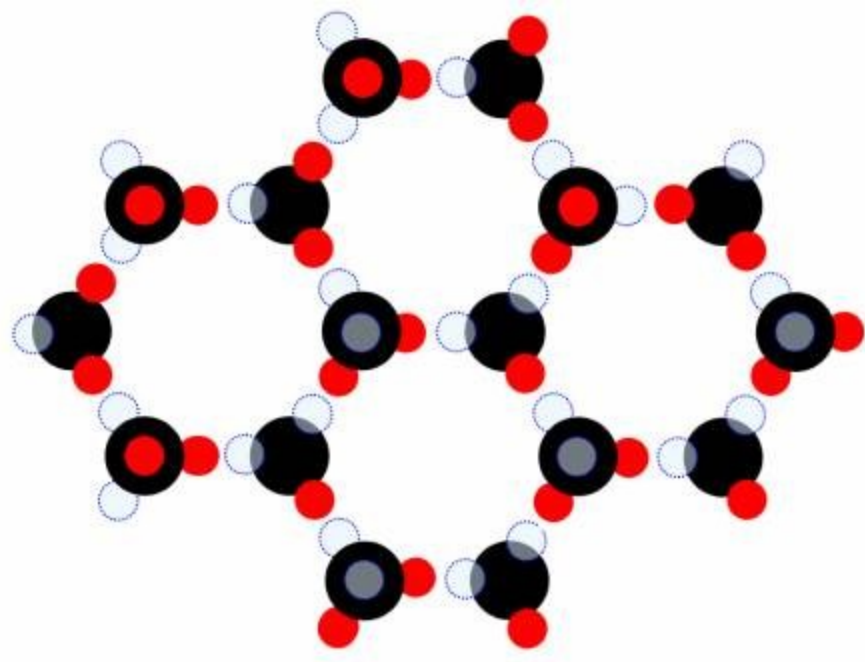
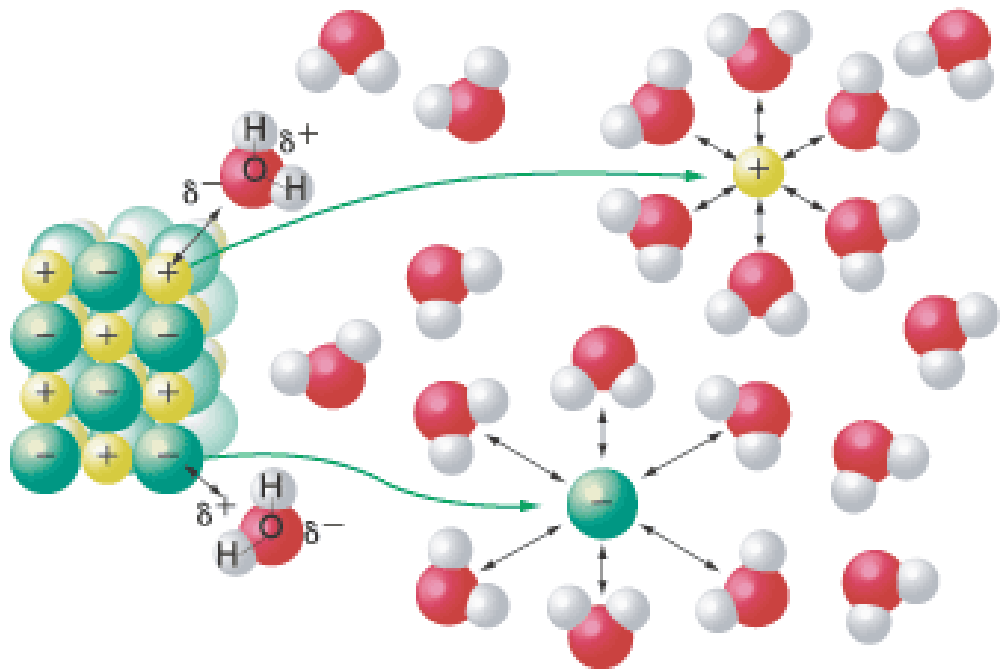
OSMOMETRIE-princip

Rozpuštění látky v rozpouštědle vede ke:

- snížení tenze vodních par
- zvýšení teploty varu (ebulioskopický efekt)
- snížení teploty tuhnutí (kryoskopický efekt)
- vzniku osmózy - zvýšení *osmotického tlaku*



Všechny tyto vlastnosti jsou závislé pouze na počtu rozpuštěných částic a nikoliv na rozpuštěné látce jako takové.

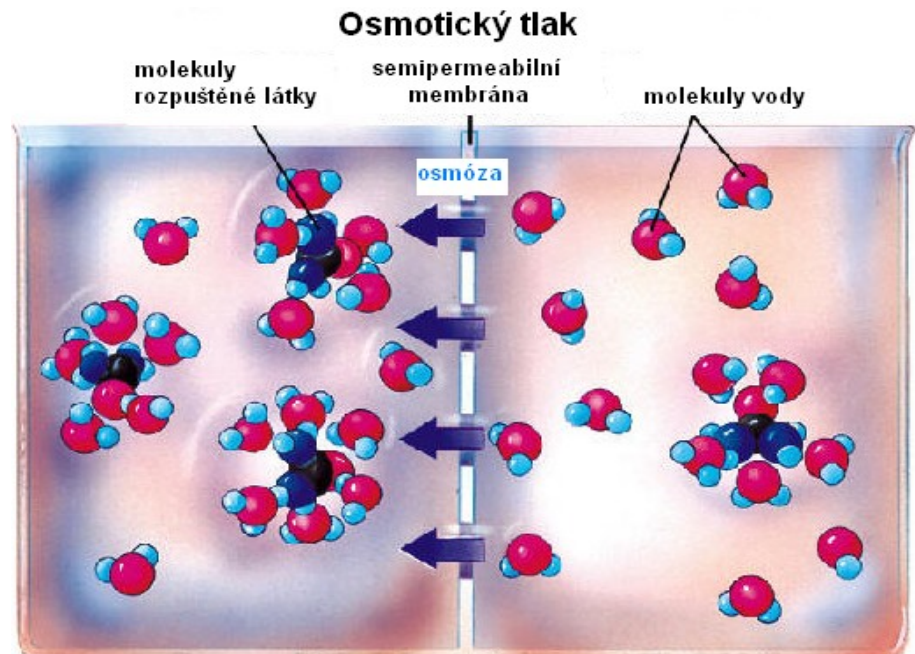


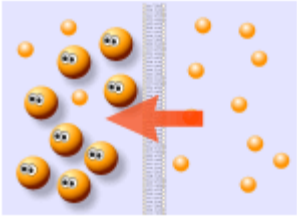
Osmotický tlak (π)

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**

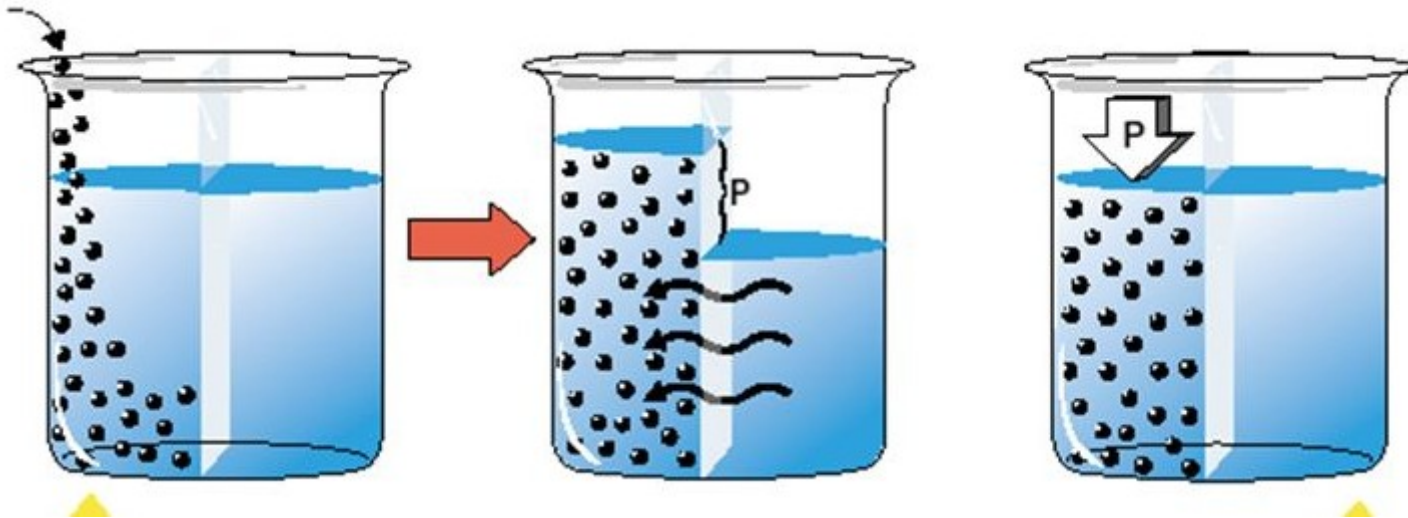
prostoru s vyšší koncentrací rozpuštěných částic.





Osmotický tlak (π)

- Tento pohyb molekul vody se nazývá ***osmóza***.
- Tlak, který je třeba vyvinout k zabránění pohybu vody přes membránu, se nazývá ***osmotický tlak***



Osmotický tlak (π)

- Osmotický tlak vzniká důsledkem působení celkového počtu osmoticky aktivních 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.

Osmotický tlak (π)

- **Osmoticky aktivní** jsou pouze částice, které jsou **rozpuštěné** v roztoku a které **nemůžou volně přecházet přes membránu**.
- Pokud látka disociuje, je každá její disociovaná část osmoticky aktivní částicí. Nedisociovaná látka představuje jen jednu osmoticky aktivní částici.

Osmotický tlak

- lze vyjádřit vztahem pro ideální roztok (van't Hoffova rovnice:

$$\pi = i \times c \times R \times T$$

Kde:

- π = osmotický tlak (Pa = J m⁻³)
- i = disociační číslo, počet částic, na které rozpuštěná látka disociuje = počet osmoticky účinných částic – např. $i = 1$ pro neelektrolyty,
- c = molární koncentrace (mol L⁻¹)
- R = molární plynová konstanta (8,31441 J mol⁻¹ K⁻¹)
- T = termodynamická teplota (K)

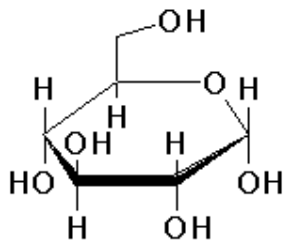
Osmolární koncentrace

Osmometrie je technika k měření **koncentrace** rozpuštěných částic v roztoku, tzv. ***osmolární koncentrace***:

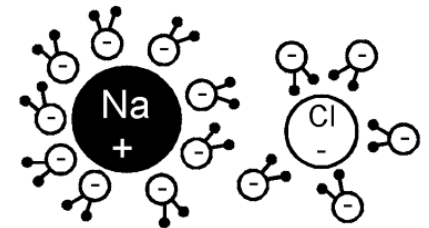
- **Osmolarita** ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{osmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- **Osmolalita** ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ nebo $\text{osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Osmolalita

- **Osmolalita je stejná jako molalita ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) u neelektrolytů nebo vyšší u elektrolytů, tj. látek disociujících, než molalita téhož roztoku.**
- Např. 1M roztok glukózy a 1M roztok NaCl mají stejnou molalitu, tj. 1 mol/kg. Molekula glukózy nedisociuje, proto je osmolalita tohoto roztoku rovna 1 osmol/kg. Roztok NaCl disociuje tak, že z jedné molekuly NaCl vzniknou dva ionty (Na^+ , Cl^-), z nichž oba jsou osmoticky aktivní, proto osmolalita tohoto roztoku je 2 osmol/kg.



Glukóza



Osmolalita

- ***Osmol* = mol osmoticky aktivních látek.**
Osmolalita vyjádřená v mmol/kg rozpouštědla je z termodynamického hlediska přesnější, protože koncentrace roztoku vztažená na váhu rozpouštědla není závislá na teplotě.
- U silně naředěných vodních roztoků se hodnota **osmolarity** a **osmolality** téměř neliší, protože 1 l vody se přibližně rovná 1 kg vody a množství rozpuštěných látek je možné zanedbat.

Měření osmotického tlaku

- V laboratoři se používá **nepřímé měření osmotického tlaku**.
- Vychází se z měření těch vlastností roztoku - **koligativní vlastnosti**, které se mění v závislosti na změně osmolality.
- Přístroje pro měření osmolality se nazývají **osmometry**.
- Nejvíce používaná metoda k měření osmolární koncentrace je metoda založena na měření snížení bodu tuhnutí - **kryoskopie**.

Kryoskopie

Osmometry založené na kryoskopickém principu využívají snížení teploty tuhnutí roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku.

- **1mol roztok glukózy rozpuštěný v 1kg vody má bod tuhnutí snížen o $-1,858\text{ }^{\circ}\text{C}$.**

Kryoskopie

Kryoskopický osmometr musí být vybaven velmi citlivým teploměrem, protože snížení teploty tuhnutí je velmi malé.

- **1 mmol látky rozpuštěný v 1 kg vody, sníží bod tuhnutí o - 0,001858 °C.**

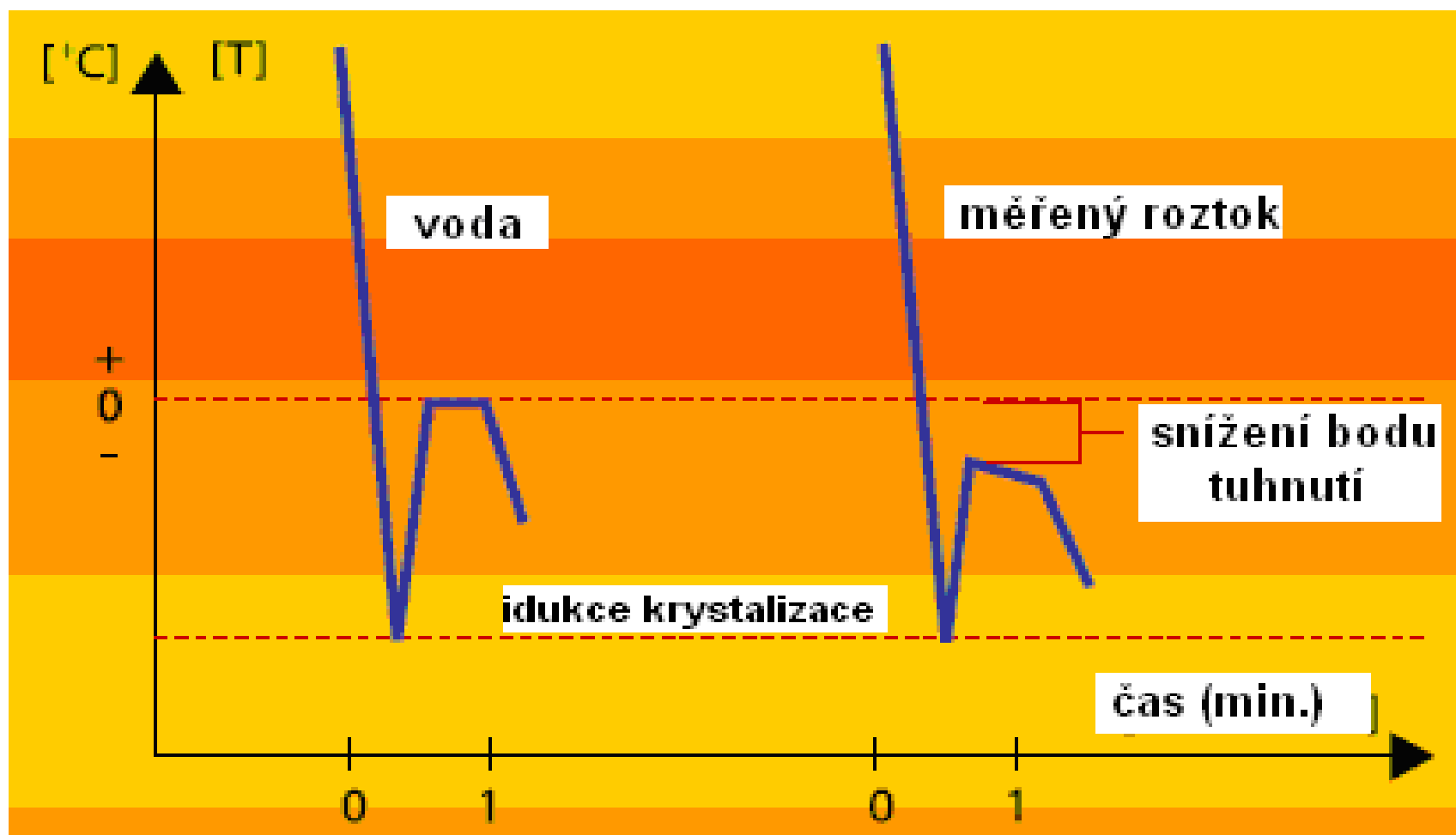
Průběh kryoskopického měření

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

<https://youtu.be/9N-Y2CyYhM>

<https://youtu.be/2SzUrjfvWPU?t=47>

Kryoskopická teplotní křivka



Kryoskopie

Jednotlivé přístroje se liší způsobem, jakým vyvolávají začátek krystalizace podchlazeného měřeného vzorku:

- krátkodobá vibrace kovového drátku
- poklep kladívka na stěnu měřicí nádoby
- účinek ultrazvukových vln.

Ebulioskopie

- sleduje snížení tenze vodních par nad roztokem, zvýšení bodu varu = **ebulioskopický efekt** - v závislosti na koncentraci osmoticky aktivních částic v roztoku.
- Jeden mol jakýkoliv částic rozpuštěných v jednom kg vody způsobí **zvýšení teploty varu (ebulioskopický efekt) o + 0,52 °C** a **snížení tenze vodních par rozpouštědla nad roztokem o -39,9 Pa (-0,3 mmHg)**.

Ebulioskopie

- Osmoticky aktivní částice v roztoku snižují 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.
- Strmost poklesu rosného bodu je $0,303\text{ °C}$ na osmol/kg , tento pokles je velmi nízký a vyžaduje vyšší rozlišení při měření teploty ($0,0003\text{ °C}$) stejně jako měření zvýšení teploty varu (ebulioskopie- zvýšení bodu varu bodu varu o $+0,52\text{ °C}$ na 1 osmol/kg).
- Při měření interferuje přítomnost alkoholu a jiných těkavých látek.

Stanovení osmolality v biologickém materiálu

- Nejčastěji používaná metoda v biologických tekutinách (plazmě, séru, moči) je založena na měření snížení bodu tuhnutí - **kryoskopie**.
- **Lidská plazma vykazuje snížení bodu tuhnutí v rozmezí $0,54 \pm 0,014$ °C (0,512 – 0,568 °C).**
- Pokud 1 mol osmoticky aktivních částic sníží teplotu tuhnutí o $-1,858$ °C, pak snížení o $-0,54$ °C představuje hodnotu osmolality $0,54/1,858 = 0,2906$ mol/kg = **290,6 mmol/kg**.
- Stejného výpočtu používají osmometry založené na ebulioskopickém principu.

Osmolalita séra (plazmy)

- Osmolalita charakterizuje **osmotickou kapacitu tekutiny, schopnost působit osmotickým tlakem na semipermeabilní membránu.**
- **Osmolalita plazmy** se za fyziologických podmínek pohybuje v rozmezí 285 ± 10 mmol/kg a je velmi přísně regulována pomocí osmoreceptorů v mezimozku, které regulují sekreci adiuretinu (ADH), jež ovlivňuje zpětnou resorpci vody v distálním tubulu ledvin.
- Systémy řídící příjem a výdej vody **zajišťují** nejen konstantní objem celkové tělesné vody, ale i **konstantní osmolalitu.**

Osmolalita séra (plazmy)

- nemáme-li k dispozici osmometr, lze k odhadu osmolality použít výpočet.
- **Nejvíce rozšířená je rovnice:**

Osmolalita séra (vypočítaná) = 2Na^+ + urea + glukóza

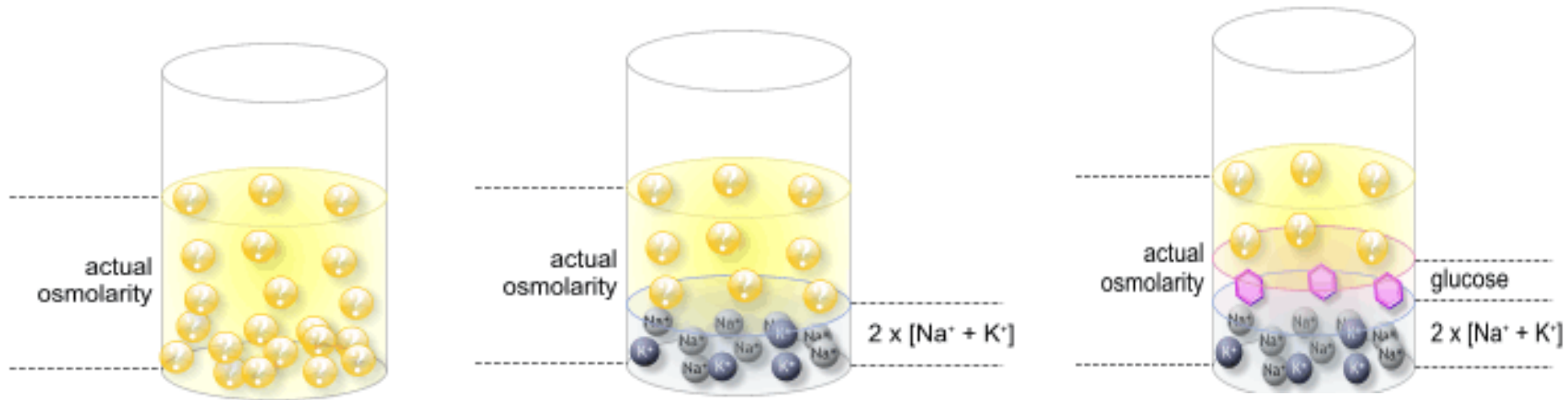
Osmolalita séra (plazmy)

- **Na⁺, urea, glukóza** jsou plazmatické koncentrace v mmol/l.
- Ve vzorci se počítá s hlavním extracelulárním kationtem (Na⁺), koeficient 2 započítává i odpovídající anionty.
- Urea a glukóza jsou jediné z běžně měřených složek plazmy, které mohou zvláště za patologických stavů dosáhnout koncentrace významně ovlivňující osmolalitu.

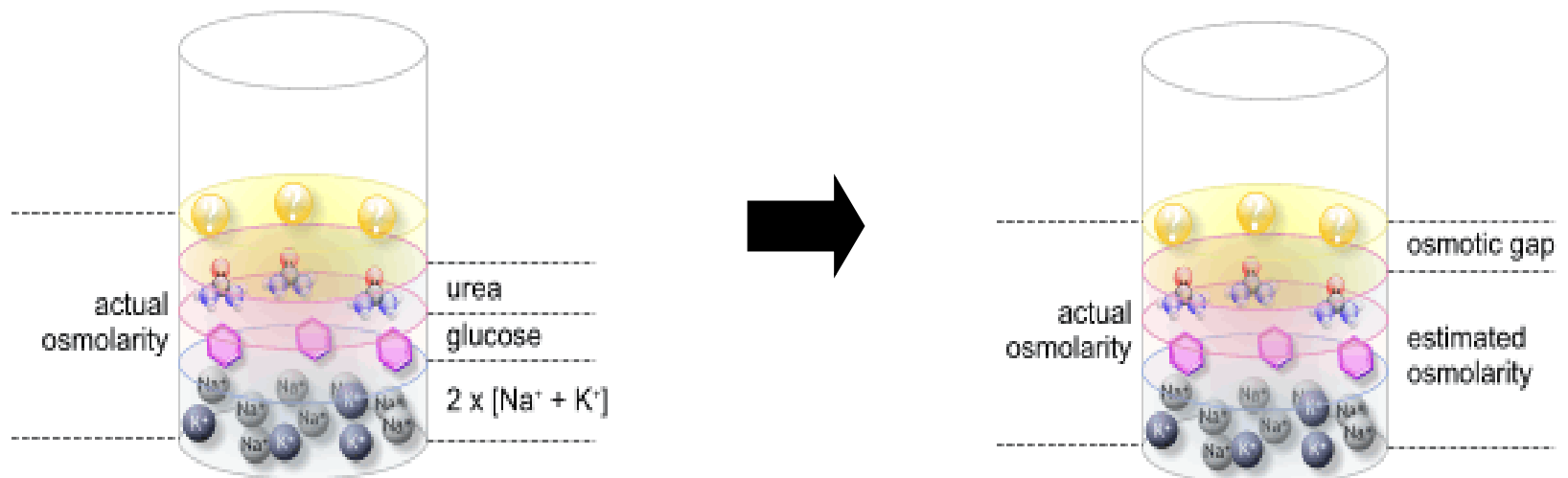


Osmolální okno (osmolal gap)

- Je rozdíl mezi měřenou a vypočítanou osmolalitou.
- Odhadovaná osmolalita podle uvedené rovnice odpovídá osmolalitě měřené, pokud se v plazmě nesvyskytují patologické látky zvyšující osmolalitu
- Obě hodnoty se běžně shodují, resp. liší pouze v intervalu do 5, maximálně 10 mmol/kg vody.
- Porovnání výpočtu s měřením je užitečné tam, kde je podezření na přítomnost látek o malé molekule, s nimiž výpočet nepočítá. Např. 1 g etanolu (tedy 1 promile alkoholu) v plazmě zvýší naměřenou osmolalitu o cca 23 mmol/kg vody.



Osmotic gap = actual osmolarity - calculated serum osmolarity



Patologická látka	Potenciální letální koncentrace (mg/l)	Osmolální okno (mmol/ kg vody)
etanol	3500	81
etyléter	1800	70
izopropanol	3400	60
metanol	800	27
ethylenglykol	210	3,4

Osmolální okno (osmolal gap)

- Dalším stavem, kdy neodpovídá vypočtená osmolalita měřené osmolalitě, je extrémně vysoká plazmatická koncentrace bílkovin nebo lipidů.
- V těchto případech se mění podíl vody v plazmě a výpočet, který počítá s koncentrací látek na 1 l plazmy, nemůže odpovídat změřené hodnotě, která se vztahuje na 1 kg vody.

Osmolalita moče

- Osmolalita moče se pohybuje u dospělého člověka v rozmezí 250 – 1200 mmol/kg při maximálním koncentračním úsilí zdravých ledvin.
- Na osmolalitě moče mají hlavní podíl kationty – Na^+ , K^+ , NH_4^+ a urea.
- Koncentrační schopnost ledvin je menší u kojenců
- Postupné snižování osmolality je fyziologické i vlivem stárnutí.

Diagnostický význam stanovení osmolality

Osmolalita séra (plazmy)

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 v organismu,
- podíl glukózy roste u dekompenzovaného diabetika nebo při intoleranci glukózy u kriticky nemocných.
- Podíl bílkovin, tzv. koloidně osmotický tlak, je významný pro udržení cirkulujících tekutin v cévním řečišti.

Při patologicky zvýšených hodnotách osmolality hovoříme o hyperosmolalitě a naopak při snížených hodnotách osmolality jde o stav, který se nazývá hypoosmolalita.

Hyperosmolalita (> 300 mOsm)

- **Příčina:** ztráta prosté vody, akutní katabolizmus, diabetické kóma, popáleniny, často selhání ledvin, těžké sepse, akutní intoxikace látkami o malé molekule (ethylenglykol) nebo tonutí ve slané vodě.
- **Klinické projevy:** 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.
- Při léčbě je nutné sledovat rychlost změny osmolality – je-li pokles osmolality větší než 2-4 mmol/l za hodinu, hrozí nasávání vody do CNS a rozvoj edému mozku.

Hypoosmolalita (< 270 mOsm)

- **Příčina:** metabolická odpověď na trauma, nadbytek celkové vody, chronický katabolizmus, tonutí ve sladké vodě, nepřiměřená sekrece ADH.
- **Klinické projevy:** slabost, nevolnost, apatie a opět bolesti hlavy. Vzniká difúzní edém mozku, bílkovina v mozkomíšním moku je snížena pod 0,1 g/l.

Osmolalita moče

- Stanovení osmolality moče má diagnostický význam u onemocnění ledvin.
- Podle hodnoty osmolality moče se posuzuje koncentrační schopnost ledvin.
- Porucha koncentrační schopnosti ledvin patří k prvním známkám onemocnění ledvin.

Technická řešení výrobců - nejvíce používané kryoskopické osmometry

- Osmometr Arkray OM 6050 a OM 6060 výrobce ARKRAY Inc. (Japonsko)
- Osmometr Fiske 210 (výrobce: Advanced Instrument, USA)

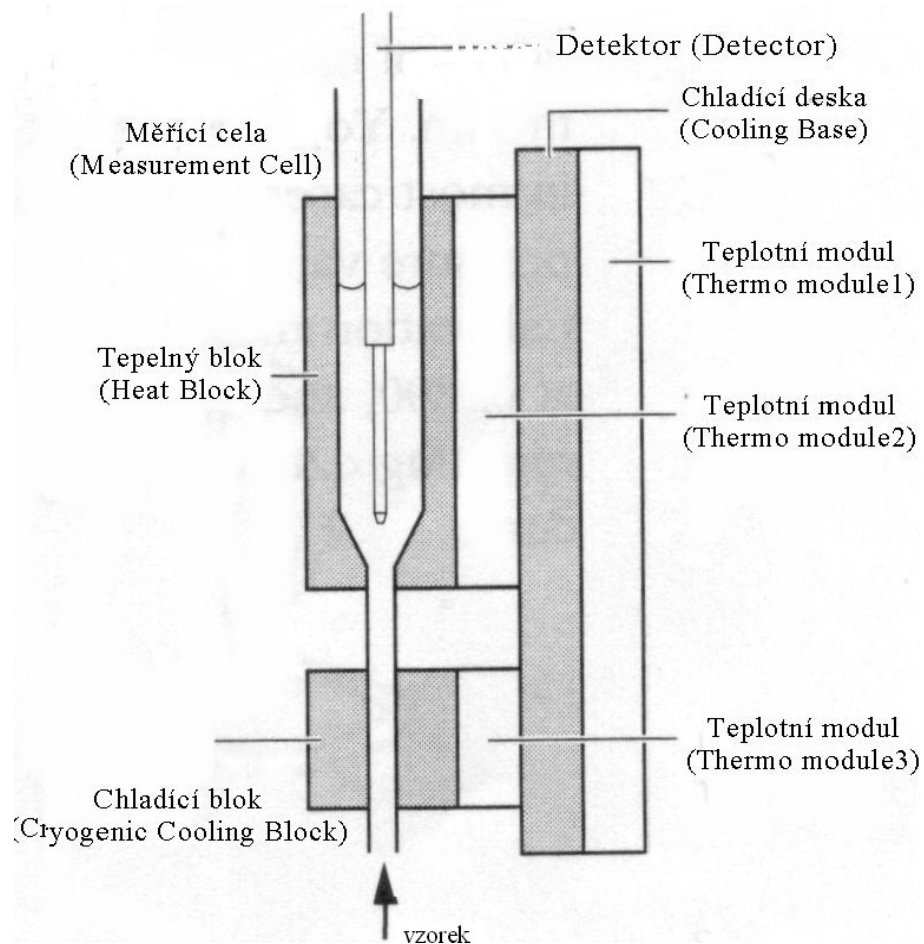


Osmometr Arkray

- Tento přístroj je plně automatizovaný, je vybaven podavačem vzorků, má integrovanou termotiskárnu a čtečku čárového kódu. Potřebný objem vzorků pro měření je 200 μ l, čas měření je 2 - 3 minuty. Rozsah měření je 0-2500 mOsm/kg, přesnost měření udává výrobce <1% (CV).

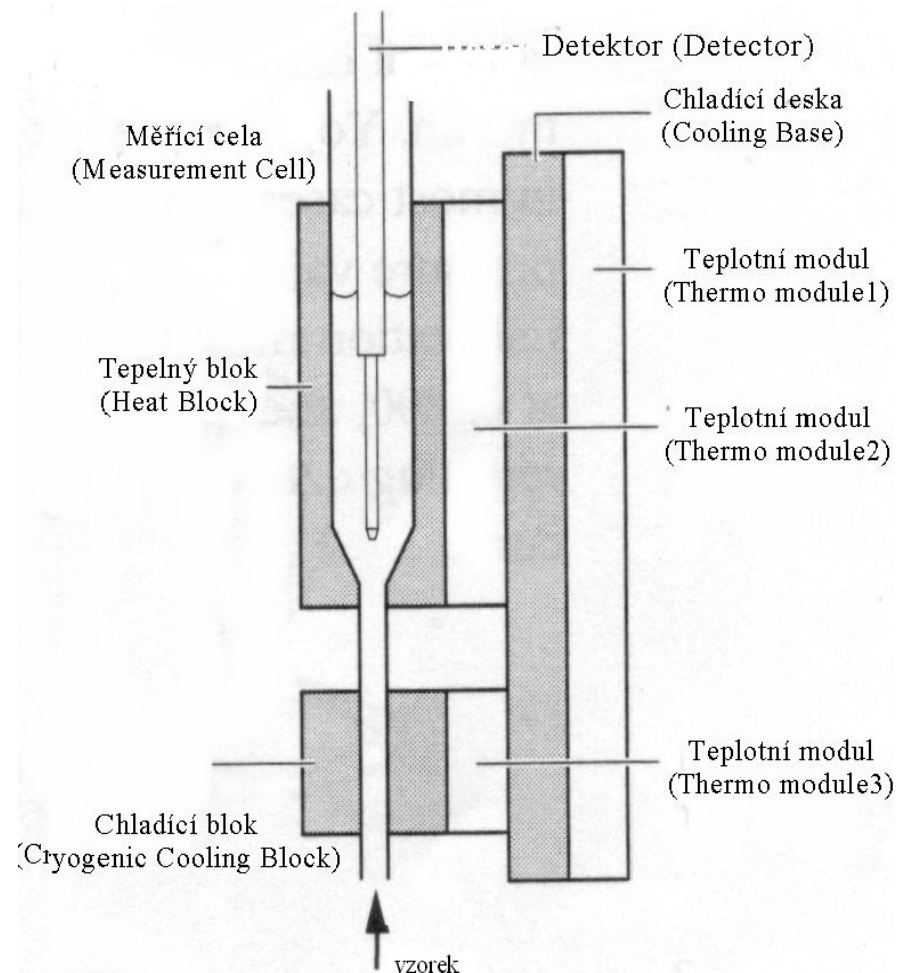
Osmometr Arkray

- **Průběh měření:**
- Tryska natáhne vzorek a pošle ho do měřicí cely.
- Thermo-module 2 je aktivován a postupně ochlazuje teplotní modul (Thermo module 1 a 3). To způsobuje superchlazení: vzorek v měřicí cele je ještě kapalný v bodě tuhnutí (tání).
- Thermo modul 3 je aktivován k chlazení chladícího bloku (Cryogenic Cooling Blocku), dokud teplota nepoklesne pod teplotu tuhnutí.
- Indukce krystalizace se provádí účinkem ultrazvukových vln. Vzorek v bloku tuhne (zmrzne).



Osmometr Arkray

- Prove se měření teploty - pokles bodu tuhnutí roztoku (vzorku) proti bodu tuhnutí rozpouštědla (vody), který je je přímo úměrný osmolalitě.
- Na Thermo-moduly 1 a 3 je aplikován opačný proud k zahřátí tepelného bloku (Heat Blocku) a chladícího bloku (Cryogenic Cooling Blocku).
- Vzorek roztaje do svého původního kapalného stavu. Tryska přenese vzorek z měřicí cely do odpadní nádobky



Osmometr Fiske

- Jedná se o jednovzorkový přístroj vhodný pro malé laboratoře. Potřebný objem vzorků pro měření je 20 μl , čas měření je 90 vteřin. Rozsah měření je 0-2000 mOsm/kg, přesnost měření udává výrobce <1% (CV).

Osmometr Fiske

Průběh měření:

- Vzorek je dávkován speciální pipetou, která dávkuje a umísťuje vzorek do měřicí komůrky a zároveň aktivuje spouštěcí spínač chladící komůrky.
- Teplota v chladící komůrce je udržována pomocí modulu s termoelektrickými články.
- Pro indukci krystalizace používá poklep kladívka na chladící komůrku.
- Dynamické změny teploty vzorku se automaticky měří pomocí termistoru a hodnoty se zobrazují na displeji.



Vapro®



Ebulioskopický osmometr

*Všechny výhody osmometrie
tlaku nasycených par jsou nyní
zhmotněny v podobě
jednoduchého a inteligentního
systému přímo pro Vás!*

 **BioVendor**
LM®

 **ELITechGroup**
BIOMEDICAL
SYSTEMS

Děkuji za pozornost