

OSMOMETRIE

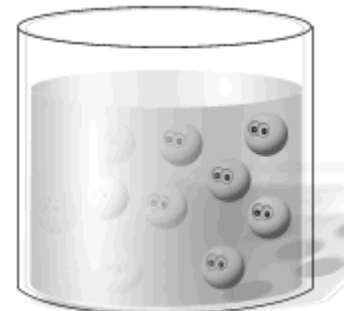
Jana Gottwaldová

FN Brno

OSMOMETRIE

Princip

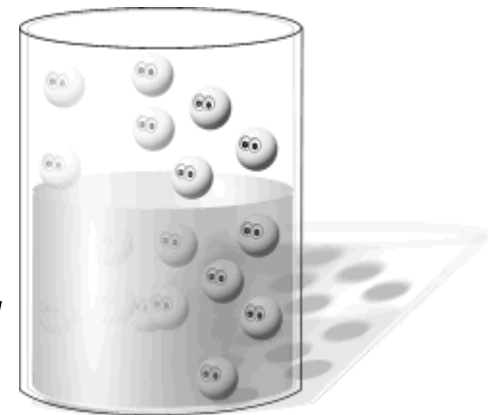
- analytická metoda k měření **koncentrace částic v roztoku**.
- využívá změn, které způsobí částice rozpuštěné v rozpouštědle tzv. **koligativních vlastností roztoku**.



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*

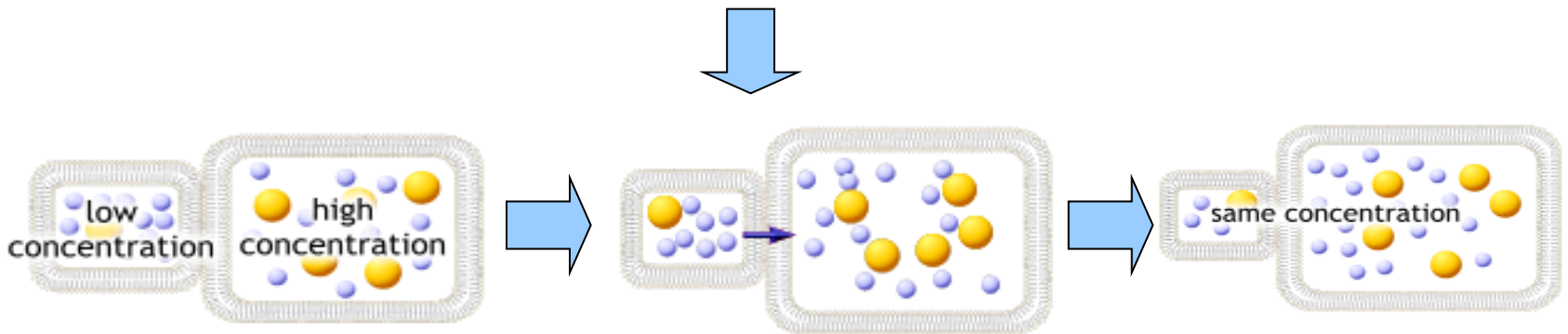


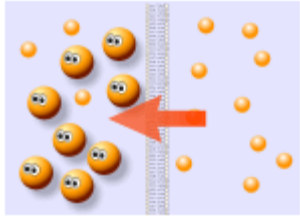
Všechny tyto vlastnosti jsou závislé pouze na počtu rozpuštěných částic a nikoliv na rozpuštěné látce jako takové.

Osmotický tlak (π)

Tlak nízkomolekulárních látek a iontů v rozpouštědle.

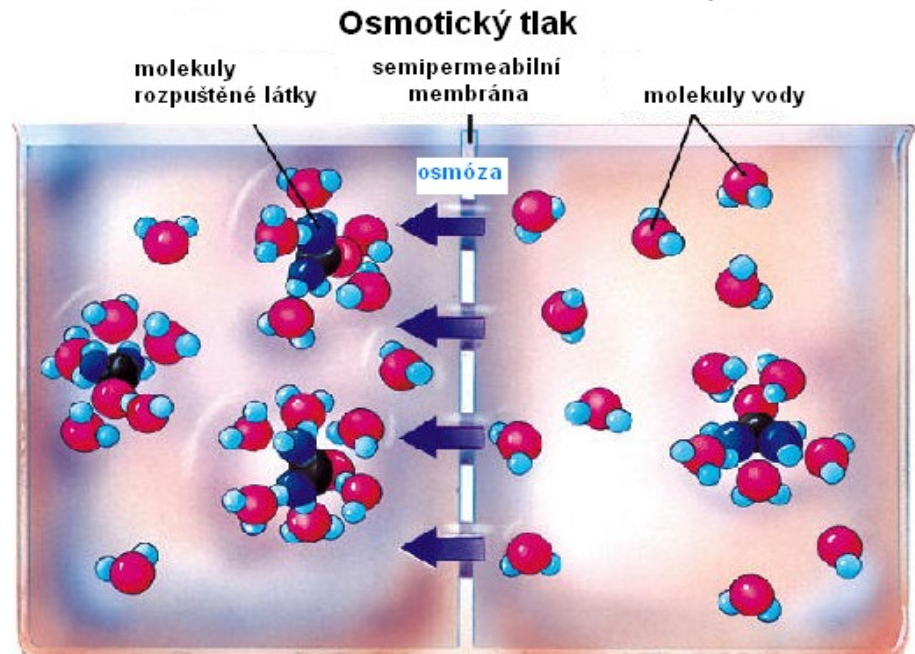
- ➔ Jestliže jsou dva vodné roztoky o různé koncentraci od sebe odděleny **polopropustnou membránou**, která je propustná pouze pro vodu (ne pro rozpuštěné částice),
- ➔ potom proniká **voda z prostoru s nižší koncentrací rozpuštěných částic, do prostoru s vyšší koncentrací rozpuštěných částic.**





Osmotický tlak (π)

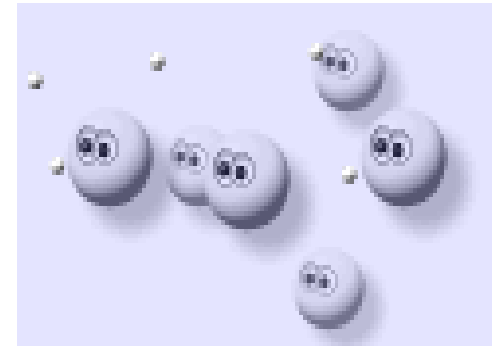
- Tento pohyb molekul vody se nazývá ***osmóza***.
- Tlak, který je třeba vyvinout k zabránění pohybu vody přes membránu, se nazývá ***osmotický tlak***



Osmotický tlak (π)

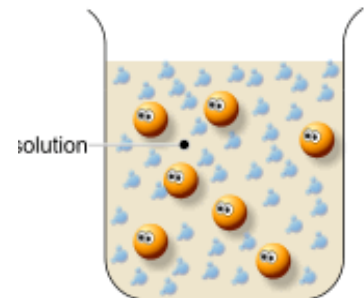


- Osmotický tlak vzniká důsledkem působení celkového počtu osmoticky aktivních částic v roztoku bez ohledu na jejich velikost.
- Každá částice – molekula, atom nebo iont v roztoku se podílí na konečné hodnotě osmotického tlaku stejnou mírou.



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 – např. $i = 1$ pro neelektrolyty,
 i = počet osmoticky účinných částic (pro silné elektrolyty)
- c = molární koncentrace (mol /L)
- 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 (mol/l, osmol/l)**
- **Osmolalita (mol/kg nebo osmol/kg)**

Osmolarita

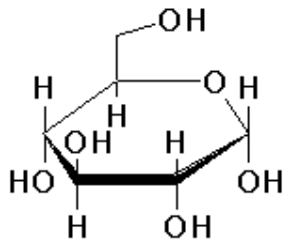
- Osmolarita (mol / l , osmol / l) – se vyjadřuje na objem (l) roztoku.
- Osmolarita je molarita (mol/l): je to látková koncentrace osmoticky aktivních látek.
- **Osmolarita je množství všech osmoticky aktivních látek v 1 l roztoku.**

Osmolalita

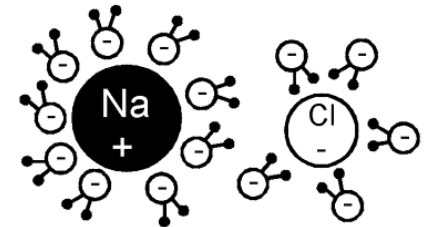
- *Osmolalita* (mol/kg nebo osmol/kg) – vyjádřená na kg rozpouštědla.
- **Je to koncentrace osmoticky aktivních látek v jednotce hmotnosti rozpouštědla.**
- Na rozdíl od osmolarity se jedná o množství látek v objemu rozpouštědla (tj. bez rozpuštěných látek).

Osmolalita

- **Osmolalita je stejná jako molalita (mol/kg) 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.

- **Bod tuhnutí čisté vody je $0,000\text{ }^{\circ}\text{C}$**
- **1M roztok glukózy rozpuštěný v 1kg vody má bod tuhnutí snížen o $-1,858\text{ }^{\circ}\text{C}$.**

Kryoskopie

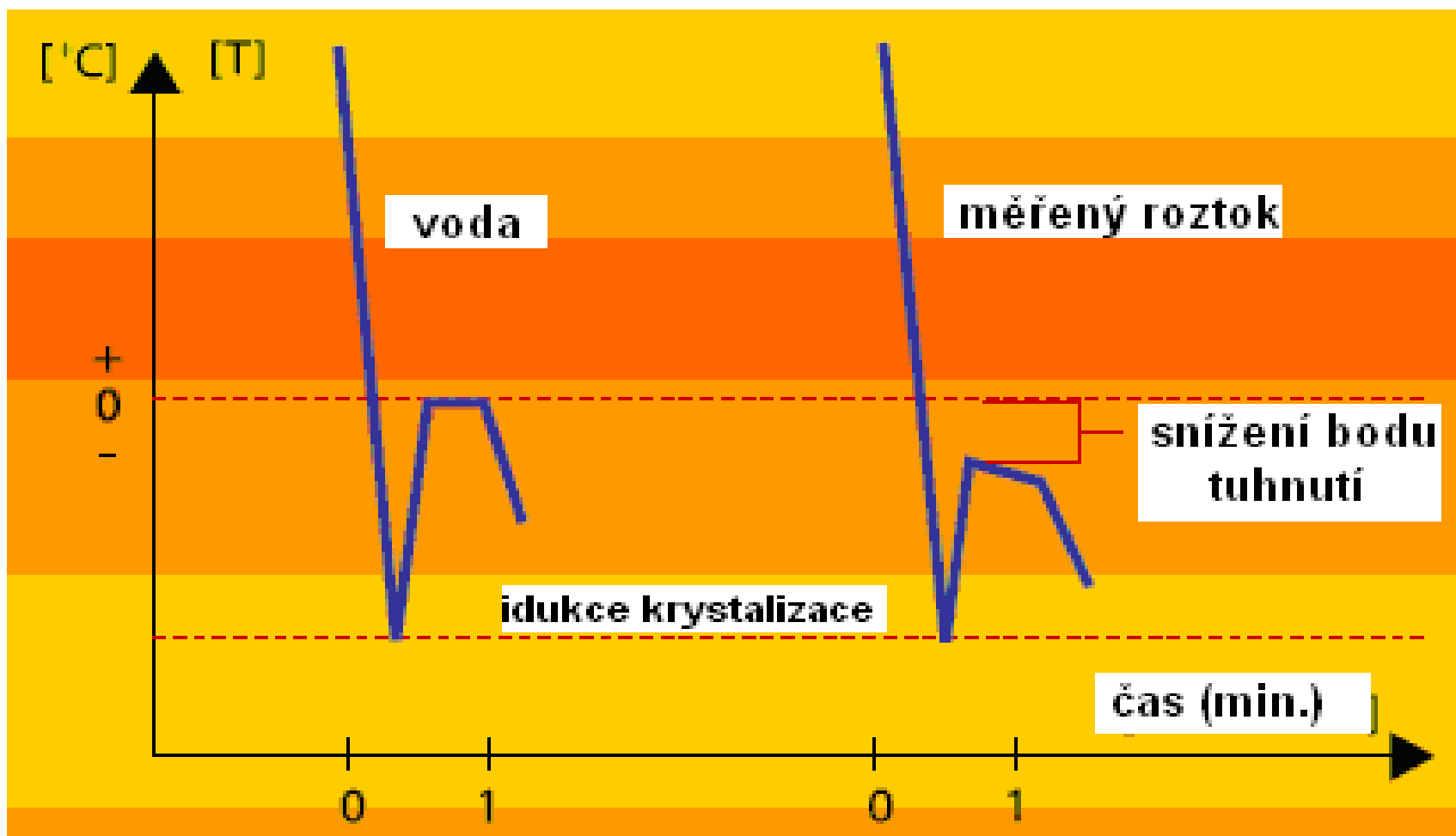
Kryoskopický osmometr musí být vybaven velmi citlivým teploměrem, protože snížení teploty tuhnutí je velmi malé.

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

Průběh kryoskopického měření

1. Vzorek se nejprve pomalu 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.

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 osmol 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 0,3 mmHg (39,9 Pa)**.

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.

Koloidní osmometr

- Jeden osmol jakýchkoliv částic rozpuštěných v jednom kg vody způsobí zvýšení osmotického tlaku o 17 000 mmHg (2266 kPa).
- V praxi není možné měřit osmolární koncentraci látek přímo měřením osmotického tlaku, tzn. tlaku vznikajícího na semipermeabilní membráně propustné pouze pro vodu, protože dostupná semipermeabilní membrána je vždy propustná pro malé ionty.
- tlak , který je vyvíjen na membránu, je vysoký (1 osmol způsobí zvýšení osmotického tlaku o 2266 kPa) a membrána by praskla.

Koloidní osmometr

- Pokud bychom chtěli měřit pouze **osmoticky aktivní molekuly proteinů**, můžeme měřit osmotický tlak pomocí koloidního osmometru, kde si zvolíme odpovídající membránu s cut off hodnotou 10 – 20 000 Da, která není propustná pro proteinové molekuly.
- Pro měření celkové osmolality nelze koloidní osmometr použít.

Koloidní osmometr

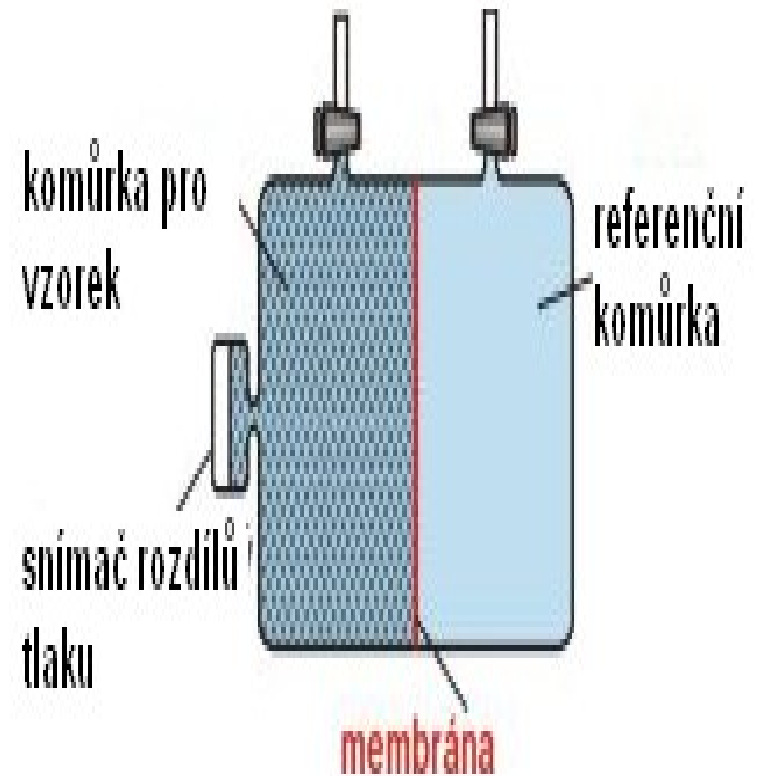
- Koloidní osmometr – onkometr se používá vzácně k měření tzv. onkotického tlaku – tlaku plazmatických bílkovin.
- K měření se používá polopropustná membrána, která odděluje tekutiny (referenční a měřenou), o různé koncentraci vysokomolekulárních látek. Principem měření onkotického tlaku je sledování rozdílu tlaku mezi referenční komůrkou a komůrkou s měřeným vzorkem. Rozdíl tlaků je měřen piezoelektricky.

Koloidní osmometr

Princip měření

onkotického tlaku:

sledování rozdílu tlaku mezi referenční komůrkou a komůrkou s měřeným vzorkem. Rozdíl tlaků je měřen piezoelektricky.



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 mmo/l**.
- Stejného výpočtu používají osmometry založené na kryoskopickém 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) = $2 \times \text{Na}^{++}$ + urea + glukóza

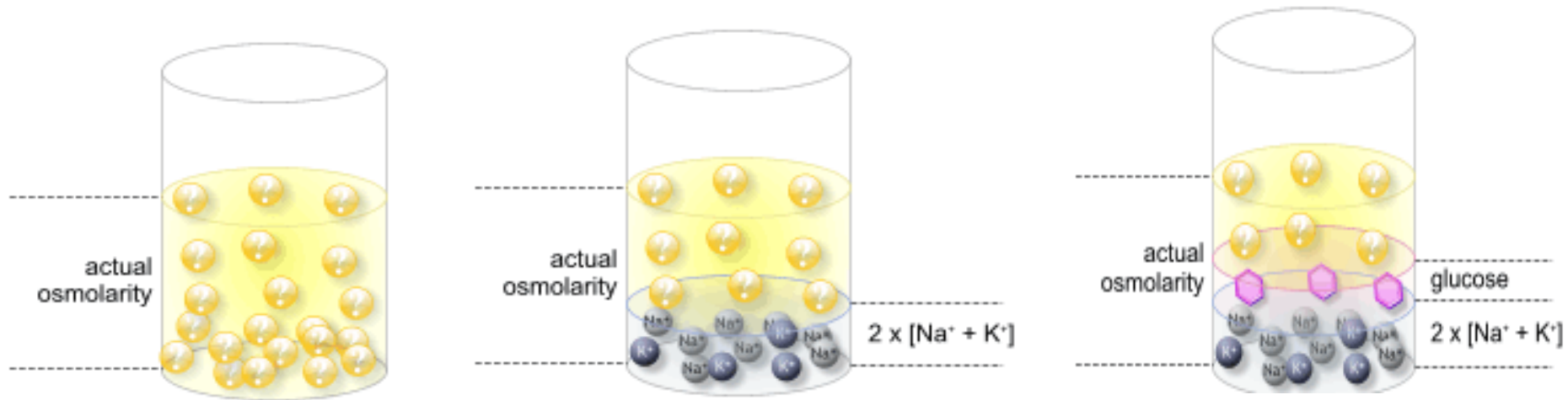
Osmolalita séra (plazmy)

- **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.

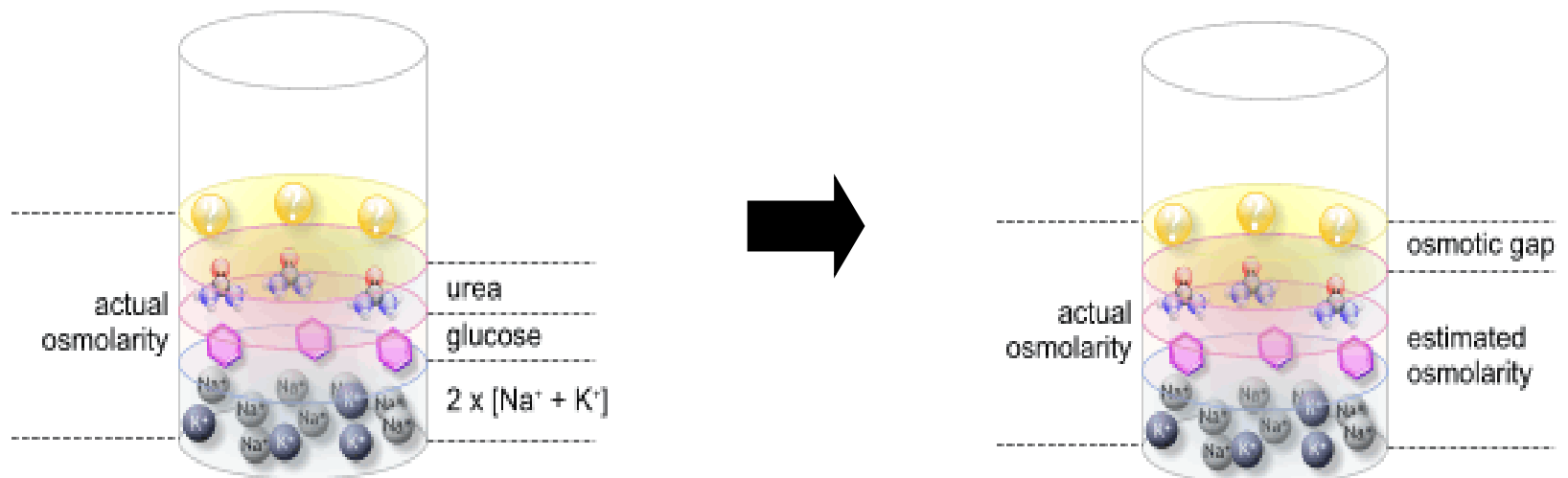


Osmolální okno (osmolal gap)

- 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 organizmu,
- 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)

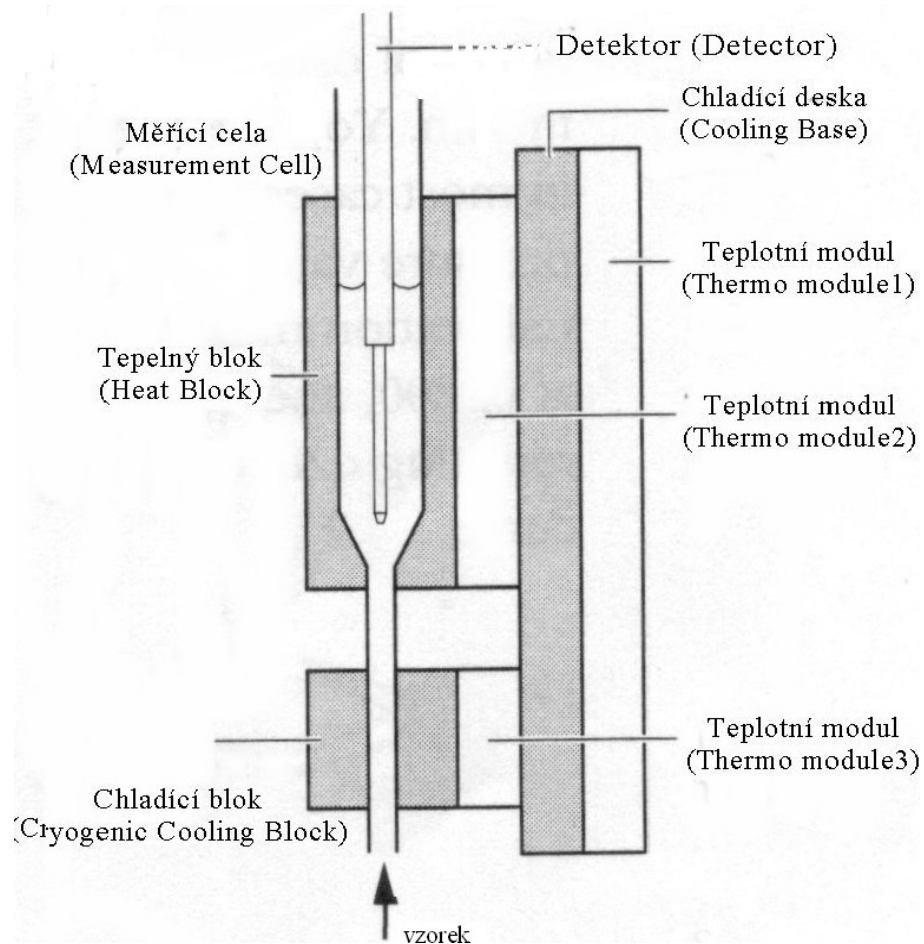


Osmometr Arkray

- 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).

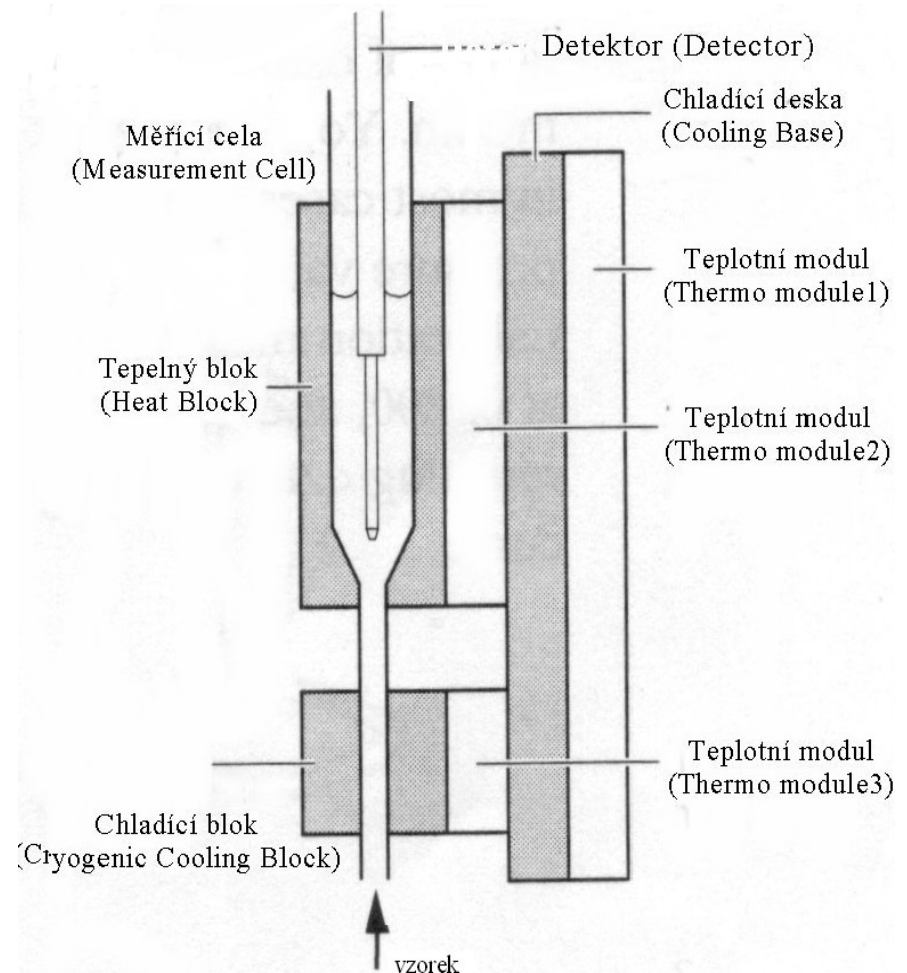
Osmometr Arkray

- **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 nádoby



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. D
- dynamické změny teploty vzorku se automaticky měří pomocí termistoru a hodnoty se zobrazují na displeji.

Děkuji za pozornost