

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.

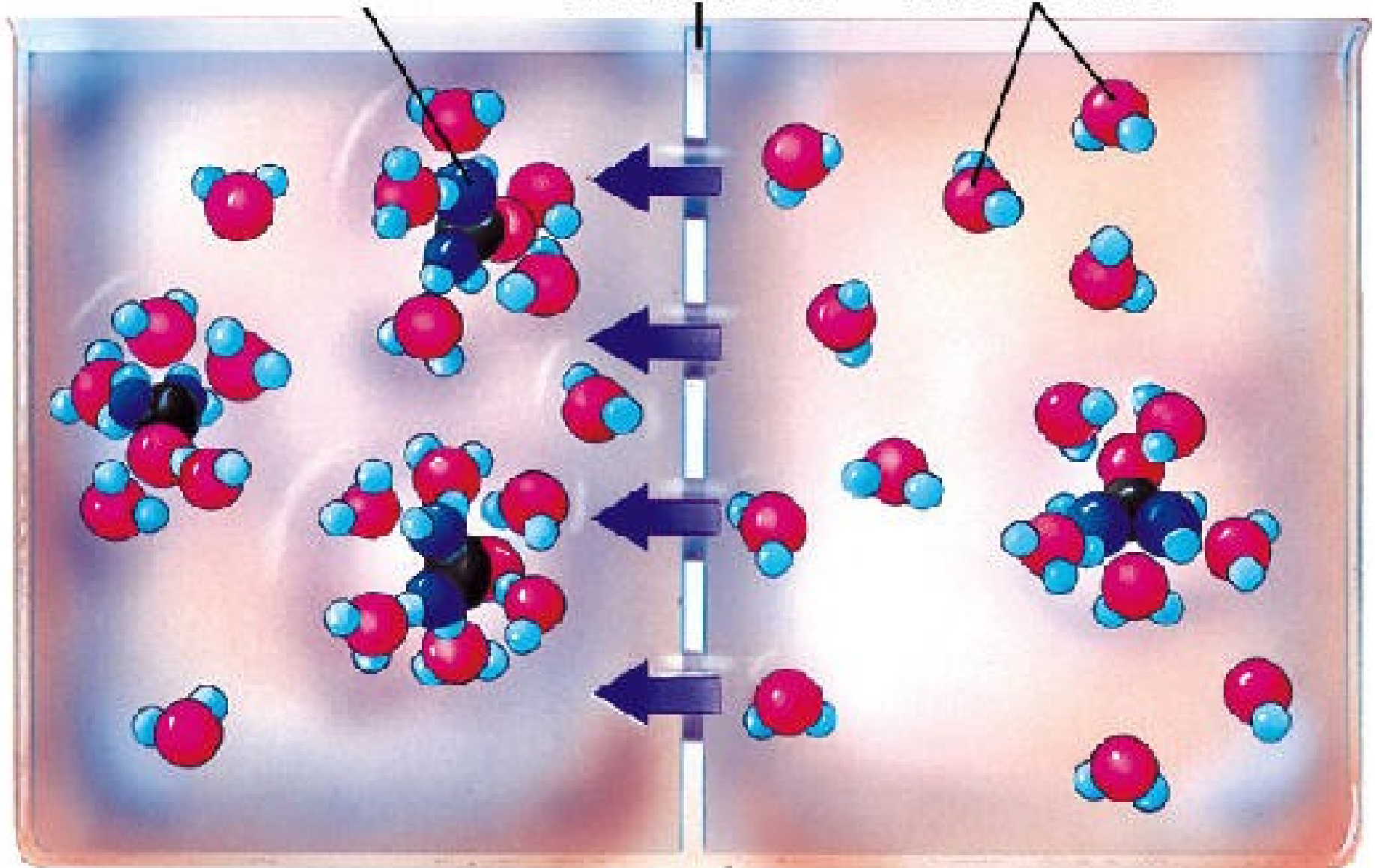
- Jestliže jsou dva vodné roztoky o různé koncentraci od sebe odděleny polopropustnou membránou, která je propustná pouze pro vodu (ne pro rozpuštěné částice), potom proniká voda z prostoru s nižší koncentrací rozpuštěných částic, do prostoru s vyšší koncentrací rozpuštěných částic.
- Tento pohyb molekul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

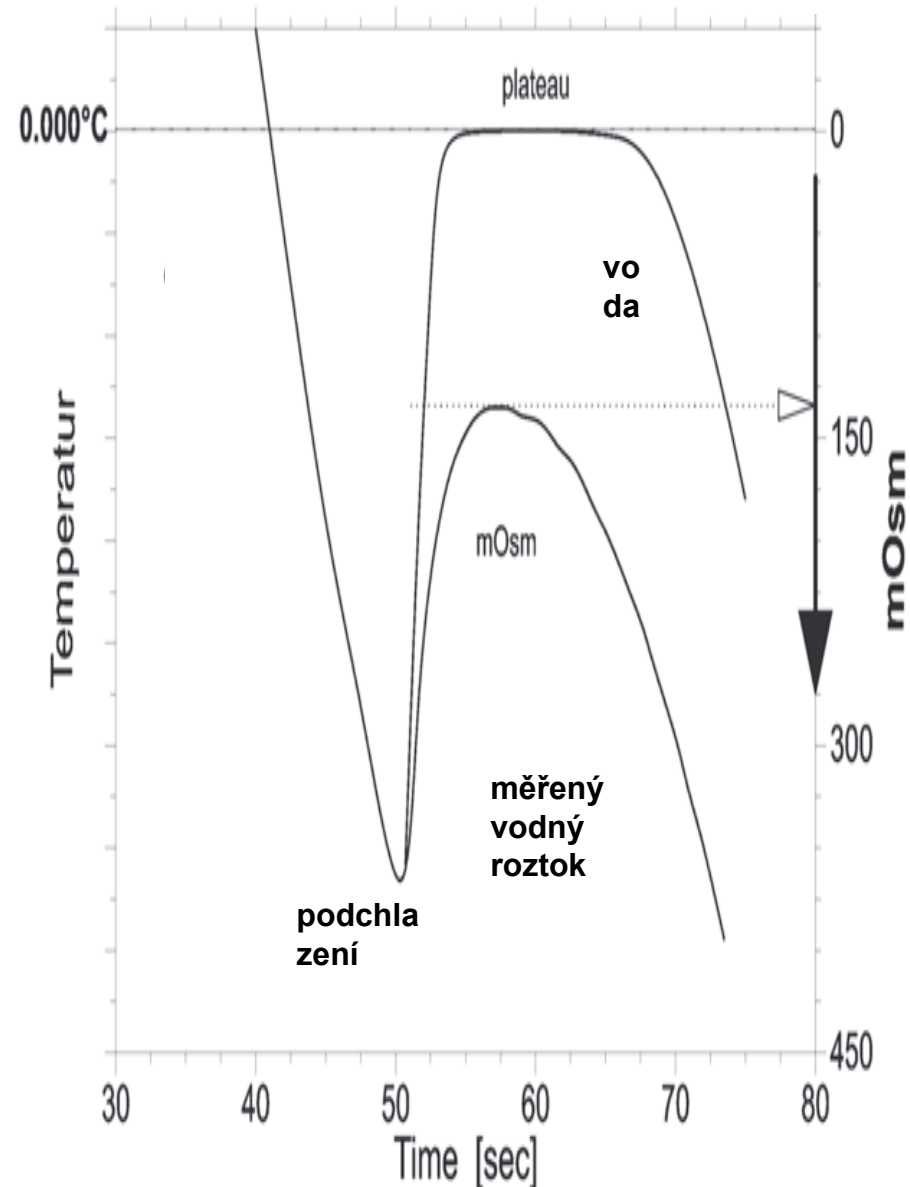
Všechny tyto změny jsou přímo závislé na celkovém počtu částic, které jsou rozpuštěny v 1 kg rozpouštědla, tzn. na osmolalitě roztoku.

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 μl 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



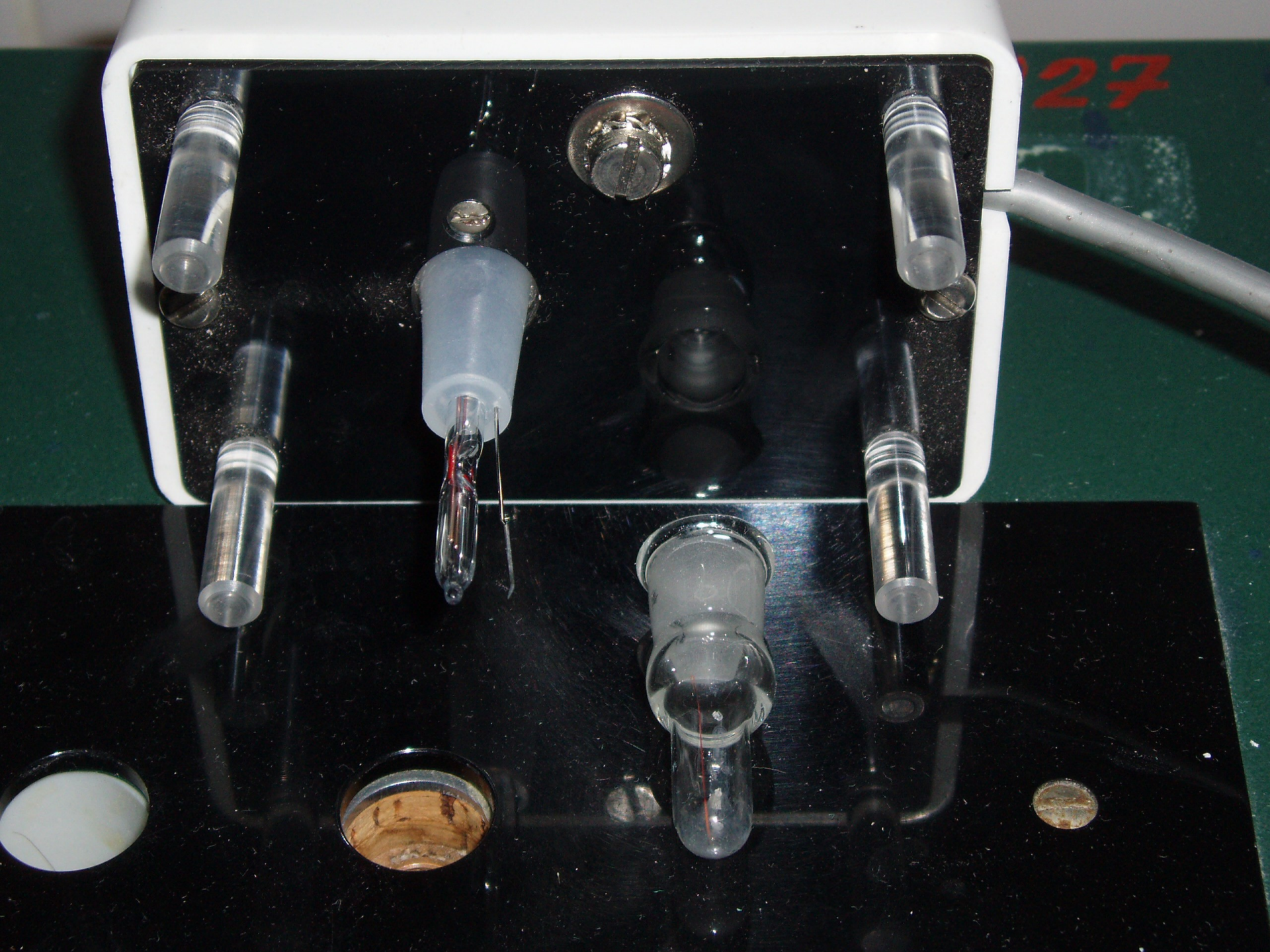
H₂O

400 m Osm



НЕ ПРОВОДИТЬ
ПУССИНО НЕПРЕМИСТОВАТ

2.11.74



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 přesnosti pro Advanced 3300 při měření použijte vždy první měření
výsledek měření prvního vzorku po delší pauze nepoužijte, měření opakujte

12-2-2006

Test Chamber
0.0100



The Advanced™ Micro Osmometer

Model 3300

v.č. 97110731 B

Chamber Cleaners

Syringe Tips

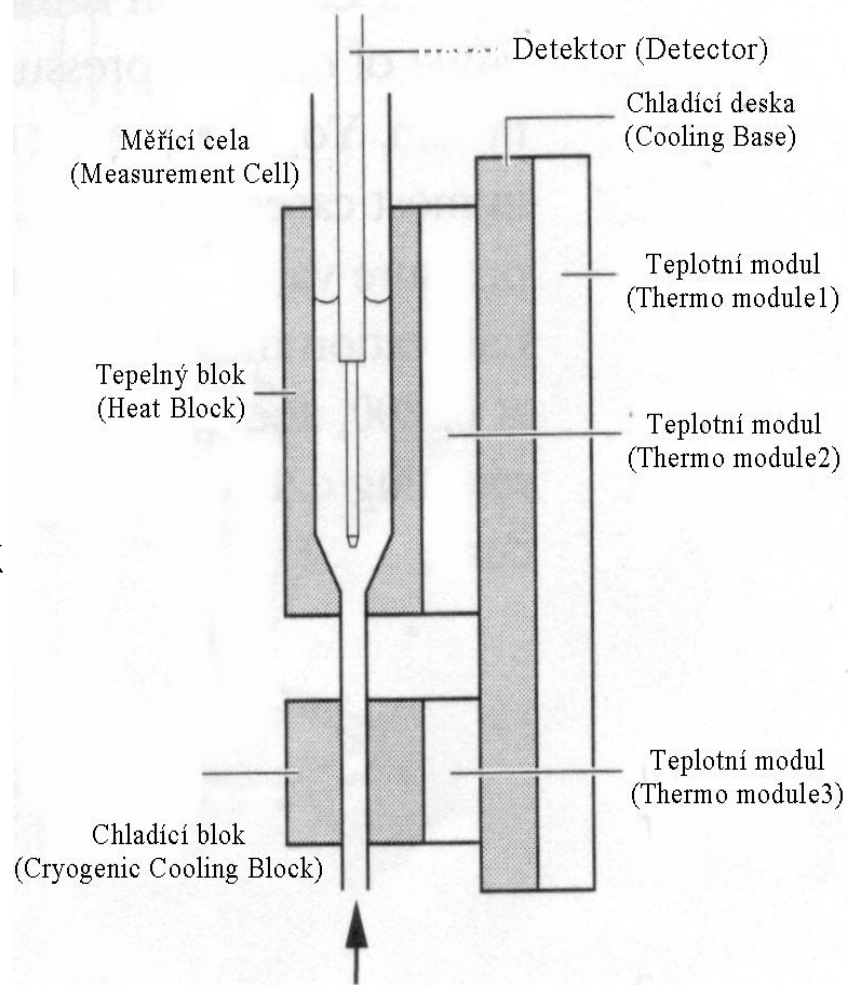
 **ADVANCED
INSTRUMENTS, Inc.**
LAB PRODUCTS DIVISION
Two Technology Way / 781-320-9000
Norwood, Massachusetts 02062, USA





Osmometr – Arkray Osmo Station

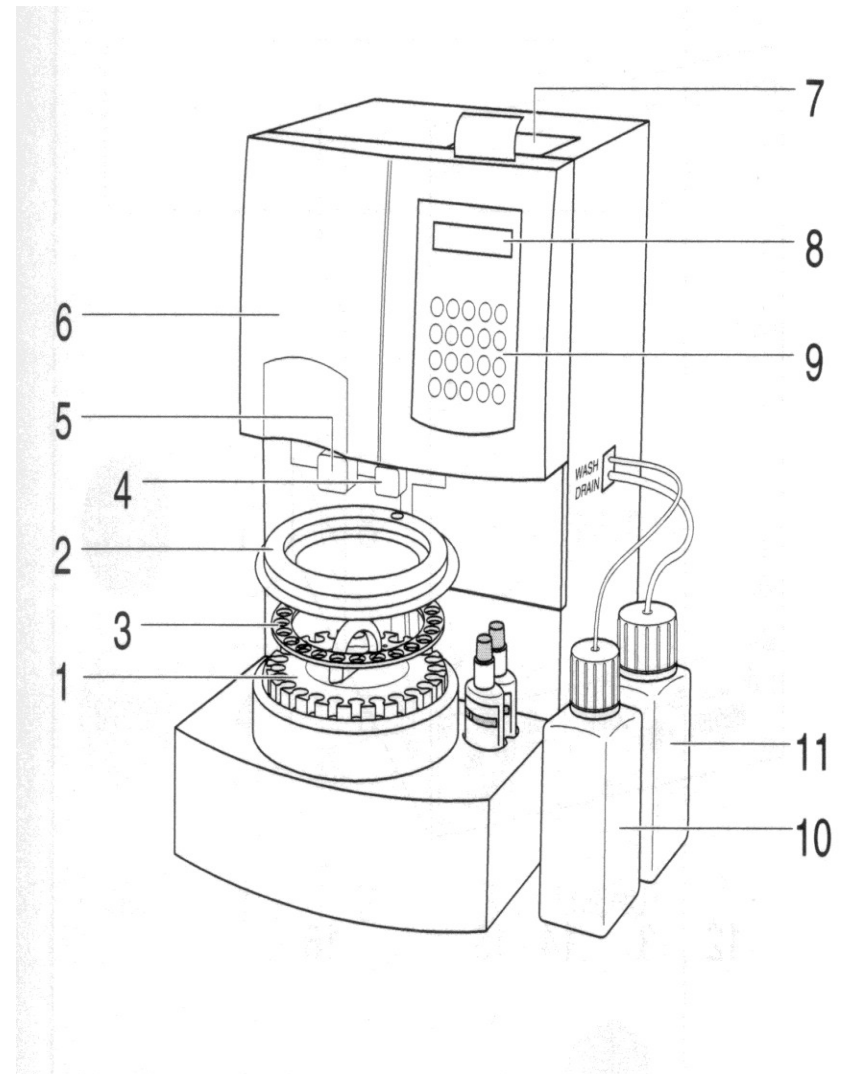
- Tryska natáhne vzorek a pošle ho do měřící cely.
- Thermo-module 2 je aktivován a postupně ochlazuje Heat Block. To způsobuje superchlazení: vzorek v měřící cele je ještě kapalný v bodě tuhnutí (tání).
- Thermo modul 3 je aktivován k chlazení Cryogenic Cooling Blocku, dokud teplota nepoklesne pod teplotu 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 cela

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





OSMO STATION
OM-6050
Date: 01-24
Time: 10:08
Batch No: 0001
ID: AG42520W
Date: 2006-01-24
Batch No: 004-01

MERS 0001 01-24
READY 10:08

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

24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

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.

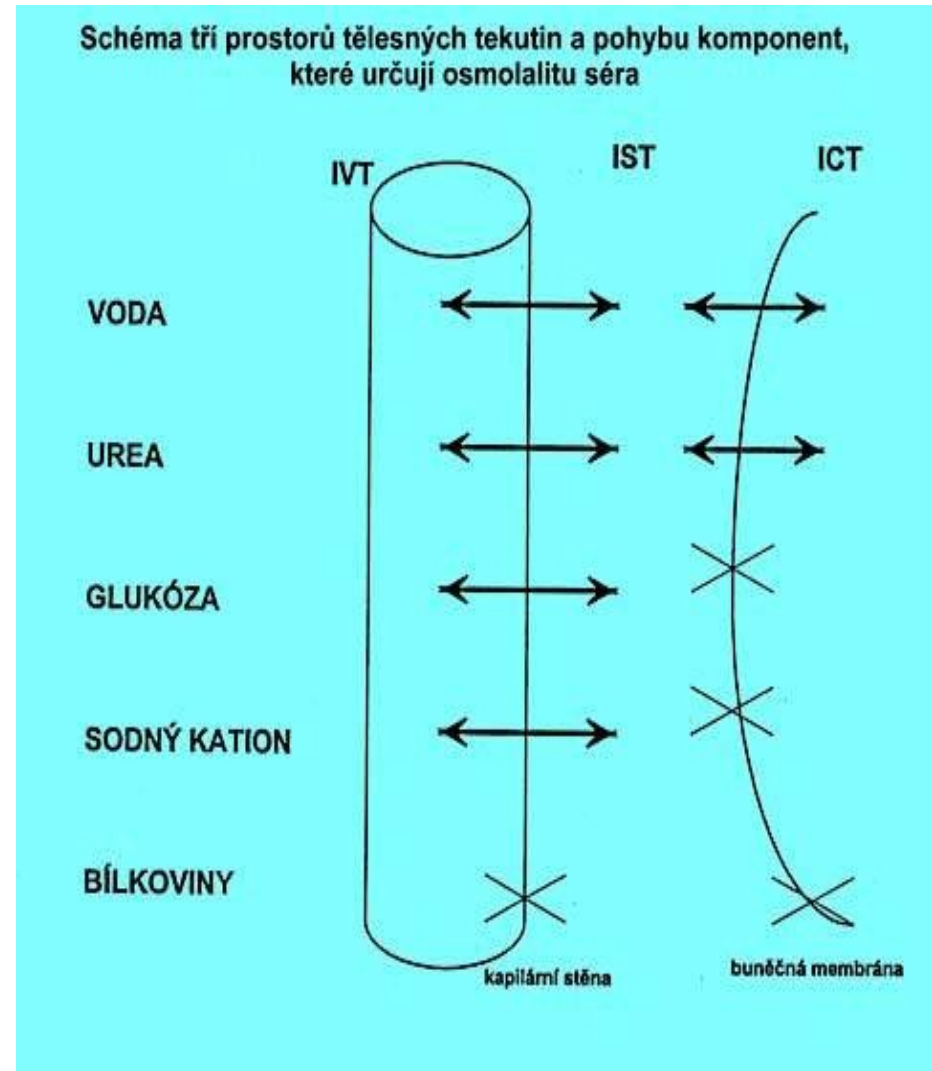
- Podíl urey se stává významnějším až s její retencí
- Podíl glykémie roste s dekompenzací diabetika nebo při intoleranci glukózy u kriticky nemocných
- Podíl bílkovin, tzv. koloidně osmotický tlak, je významný pro udržení cirkulujících tekutin v cévním řečišti

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.