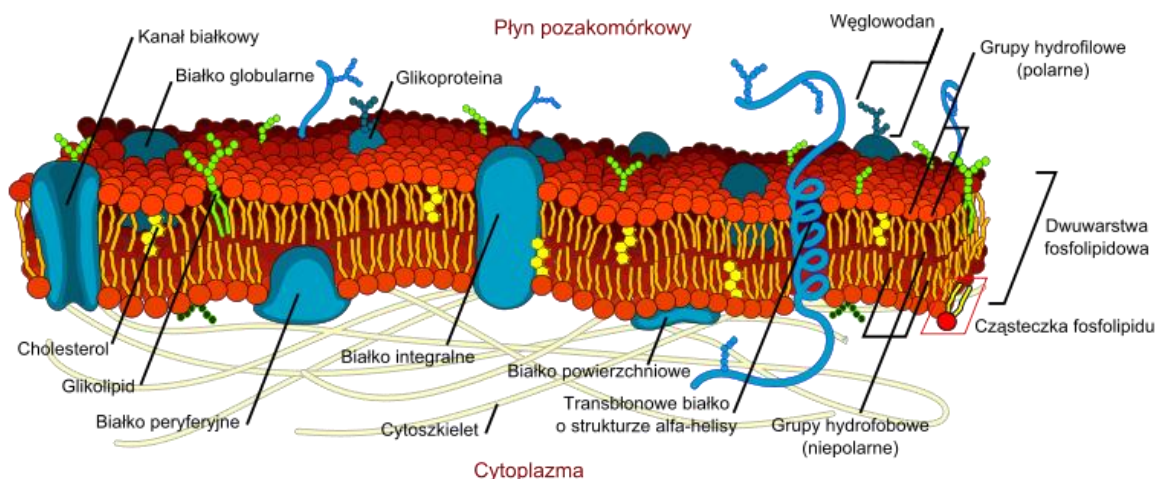


## Ćwiczenie 33 b. Oznaczanie oporności osmotycznej krwinek czerwonych.

### Błony biologiczne

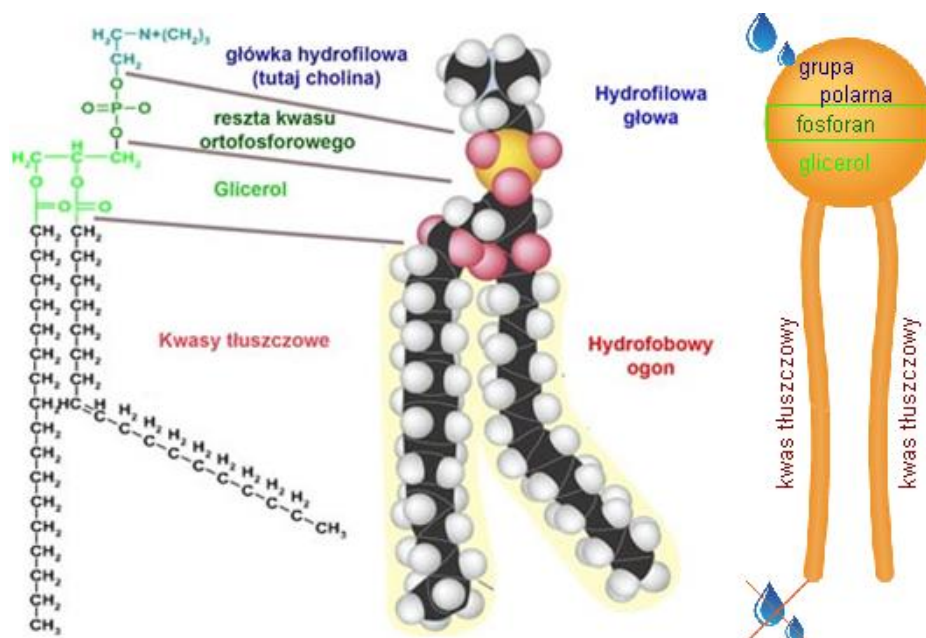
Każda komórka otoczona jest błoną komórkową, która zapewnia integralność komórki przez zachowanie charakterystycznego dla niej składu chemicznego, często różniącego się od otaczającego ją środowiska. Jednocześnie zapewnia ona wymianę materii i informacji pomiędzy komórką, a jej otoczeniem. Badania składu chemicznego błon komórkowych wykazały, że jej głównymi składnikami są białka (w zależności od pełni funkcji przez błonę stanowią one ok. 20-70 %) i związki lipidowe. Wiele z nich ma kowalencyjnie przyłączone węglowodany, tworząc tym samym glikoproteiny i glikolipidy. W latach 70-tych XX wieku zaproponowano tzw. *mozaikowy model budowy błon biologicznych*, według którego lipidy tworzą podwójną warstwę, w której zanurzone są białka (ryc. 1). Część białek „przebija” błonę i ich końce wystają po obu stronach dwuwarstwy lipidowej (białka integralne, transbłonowe; kanały białkowe), część natomiast jest luźniej związana z powierzchnią błony (białka powierzchniowe/peryferyjne, globularne). Białka te odpowiedzialne są za specjalistyczne funkcje pełnione przez dany typ komórek.



Ryc. 1. Mozaikowy model budowy błony

Główną przyczyną tworzenia struktur dwuwarstwowych przez cząsteczki lipidów tworzące błony jest ich amfipatyczny charakter i oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy poszczególnymi lipidami oraz pomiędzy wodą i lipidami. Spośród związków lipidowych tworzących zrab błony komórkowej, najbardziej liczne są **fosfolipidy**. Pod względem chemicznym fosfolipidy są pochodnymi kwasu fosfatydylowego, którego rdzeniem jest cząsteczka glicerolu zestyfikowana dwoma długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi i kwasem fosforowym. Reszty kwasów tłuszczowych mają charakter *hydrofobowy* (są niepolarne), a drugi region w którym obecna jest grupa fosforanowa z przyłączoną do niej częścią polarną ma charakter *hydrofilowy* (ryc. 2). W środowisku

wodnym strukturą energetycznie korzystną dla fosfolipidów jest taka forma, w której części hydrofobowe nie mają kontaktu z wodą. Dlatego też w błonie plazmatycznej hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych skierowane są do środka, a hydrofilowe „głowy” pozostają w kontakcie z środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym komórki, w których woda jest jednym z integralnych składników chemicznych (zobacz ryc. 1).



Ryc. 2. Schemat amfifilowej (amfipatycznej) budowy cząsteczki fosfolipidu.

Amfipatyczny charakter fosfolipidów sprawia, że w środowisku wodnym samoistnie tworzą one dwuwarstwy fosfolipidowe, gdzie niepolarne reszty kwasów tłuszczowych skierowane są do jej środka, a polarne głowy na zewnątrz. Widać to doskonale na przykładzie liposomów (pęcherzyków fosfolipidowych), które powstają w wyniku hydratacji (uwodnienia) suchego filmu fosfolipidowego (cienkiej warstewki lipidu przylegającego do ścianki kolby, z której odparowano niepolarny rozpuszczalnik). **Liposomy** mają na ogół postać kulistych pęcherzyków (o wielkości od kilku nanometrów do kilku mikrometrów; 0,01-10  $\mu\text{m}$ ) wypełnionych roztworem wodnym i otoczonych dwuwarstwą lipidową o strukturze analogicznej do tej występującej w błonach biologicznych. Podobieństwo właściwości liposomów do właściwości błon biologicznych powoduje, że stały się one modelowym obiektem badań właściwości błon biologicznych

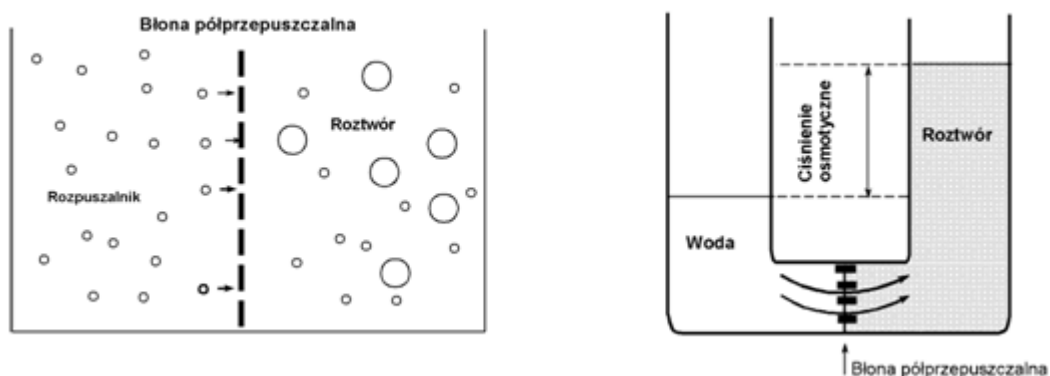
Oddziaływania, które występują pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi kwasów tłuszczowych fosfolipidów mają charakter sił van der Waalsa i prowadzą do równoległego ustawienia się tych łańcuchów względem siebie. Dodatkowe wiązania wodorowe oraz siły jonowe pojawiające się pomiędzy naładowanymi fragmentami cząsteczek lipidów pozwalają wytworzyć dość silne oddziaływania krótkozasięgowe. Upakowanie lipidów zależne jest od ilości atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym kwasu tłuszczowego i stopnia nasycenia. Obecność wiązania podwójnego w łańcuchu węglowodorowym powoduje jego zakrzywienie, co sprawia, że trudniej dopasować do siebie sąsiadujące

cząsteczki, a tym samym sprzyja to rozluźnieniu struktury i wpływa na wzrost płynności błony, czy jej grubość. Również wielkość grupy polarnej w hydrofobowej głowie będzie wpływać na stopień upakowania lipidów w dwuwarstwie tworzącej błonę fosfolipidową.

Polarny charakter cząsteczek wody sprawia, że grupują się one wokół jonów i innych cząstek polarnych, co sprzyja tworzeniu się wiązań wodorowych, a tym samym stabilizuje strukturę dwuwarstwy lipidowej. Utworzona w ten sposób powierzchnia pełni funkcję bariery przepuszczalności, natomiast obecność w niej cząsteczek białka umożliwia pełnienie innych funkcji błony (np.: transportowe, receptorowe) i nadają różnym błonom ich indywidualne właściwości. Błona pełni zatem rolę selektywnej membrany, która oddziela środowisko wewnętrzne komórki, od otaczającego ją środowiska zewnętrznego, które często różnią się składem i zawartością poszczególnych składników.

### Ciśnienie osmotyczne

Jeżeli dwa roztwory o różnych stężeniach oddzielimy od siebie błoną półprzepuszczalną to pewne rozpuszczone substancje i/lub cząstki rozpuszczalnika będą wykazywały zdolność do spontanicznego przepływu. Cząsteczki substancji rozpuszczonej (np. jony soli) są zwykle większe od cząsteczek wody, a dodatkowo często są one otoczone płaszczem zbudowanym z cząsteczek rozpuszczalnika (np. zhydratyzowane jony) i jako większe nie mogą swobodnie przechodzić przez pory w błonie. Natomiast mniejsze cząstki wody (lub innego rozpuszczalnika) będą mogły swobodnie przechodzić przez wspomniane pory w błonie (Ryc. 3), powodując przenikanie rozpuszczalnika do roztworu i wzrost poziomu (ilości) cieczy w roztworze zawierającym substancje rozpuszczone (następuje ich rozcieńczenie, w celu zmniejszenia gradientu stężeń). Taka dyfuzja wody (lub innego rozpuszczalnika) wynikająca z różnicy stężeń po obu stronach błony półprzepuszczalnej określana jest mianem *osmozy*.



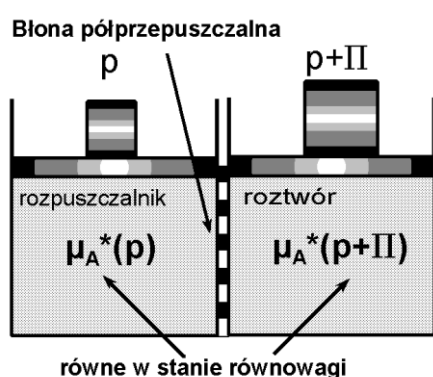
Ryc. 3. Schemat działania błony półprzepuszczalnej – zjawisko osmozy.

Przenikanie wody do roztworu spowoduje podnoszenie się słupa cieczy w roztworze na taką wysokość, aż zostanie zrównoważone ciśnienie hydrostatyczne bo obu stronach błony (Ryc. 3). Wielkość ciśnienia hydrostatycznego w stanie równowagi jest miarą

**ciśnienia osmotycznego ( $\pi$ ).** Ciśnienie to jest tym większe, im większa jest różnica stężeń po obu stronach błony:  $\pi = (c_1 - c_2) R T$

Jeśli po jednej stronie błony będzie znajdował się czysty rozpuszczalnik (gdzie stężenie substancji rozpuszczonej  $C_2 = 0$ ), wzór ten możemy uprościć do zapisu:  $\pi = C R T$ , określanego jako równanie Morse'a. Na jego podstawie możemy stwierdzić, że ciśnienie osmotyczne roztworu, jest tym większe im więcej cząstek substancji rozpuszczonej znajduje się w określonej ilości roztworu. Należy jednak pamiętać, że równanie to dość dobrze opisuje ciśnienie osmotyczne tylko w bardzo rozcieńczonych roztworach.

Zjawisko osmozy jest wywołane tendencją do wyrównania potencjału chemicznego cząsteczek rozpuszczalnika ( $\mu_{\text{rozp}}$ ) w roztworach po obu stronach przegrody. Aby zatem zrównoważyć obecność substancji rozpuszczonej, należy podzielać na roztwór ciśnieniem



**Geneza ciśnienia osmotycznego.** Potencjał chemiczny rozpuszczalnika A po obu stronach przegrody jest jednakowy jedynie wówczas, gdy na roztwór podziela się dodatkowym ciśnieniem  $\Pi$ .

$\Pi$  i przywrócić w ten sposób równość potencjału chemicznego rozpuszczalnika ( $\mu_{\text{rozp}}$ ) po obu stronach przegrody (Ryc. 4). Działanie odpowiednio dużym ciśnieniem zewnętrznym,

którego wartość odpowiadałaby wartości ciśnienia osmotycznego ( $\Pi$ ) mogłoby zatem powstrzymać przepływ rozpuszczalnika/wody do roztworu o większym stężeniu. Dlatego też ciśnienie osmotyczne często określa się liczbowo jako równe ciśnieniu gazowemu, które powstałoby, gdyby

substancja rozpuszczona mogła zostać zamieniona na gaz i zamknięta w objętości równej objętości roztworu w tej samej temperaturze. Tak więc np. 1 molowy roztwór mocznika powinien wywierać, w temperaturze 273 K, ciśnienie osmotyczne równe 22,4 atm ( $22,4 \times 1013$  hPa), tj. takie jakie w tej temperaturze wywiera 1 mol gazu (jako gaz zajmuje  $22,4 \text{ dcm}^3$ ) zamknięty w objętości  $1 \text{ dcm}^3$ . Aby przeliczyć ciśnienie osmotyczne, na inne jednostki ciśnienia, np.: paskale ( $\text{Pa} = \text{N/m}^2$ ) to stężenie roztworu ( $c$ ) powinno być określone w molach na  $\text{m}^3$ , natomiast ilość substancji rozpuszczonej ( $m$ ) jako liczbę moli substancji rozpuszczonej w 1000 kg rozpuszczalnika. Dla roztworów rzeczywistych ciśnienie osmotyczne opisuje zależność

$$\Pi = - \frac{RT}{V_{\text{mA}}} \ln a_A$$

gdzie:  $V_{\text{mA}}$  jest molową objętością czystego rozpuszczalnika, zaś  $a_A$  aktywnością substancji rozpuszczonej.

Przy wyrażaniu jednostek ciśnienia osmotycznego bardzo często korzysta się z jednostki Osmomol (Osm), zwłaszcza wtedy kiedy ilość substancji rozpuszczonej wyrażane jest jako stężenie molowe. Jeśli jednostką wyrażającą stężenie cząsteczek rozpuszczonych jest **mol**, to w przypadku ciśnienia osmotycznego, możemy posłużyć tą

wspomnianą jednostką. I tak roztwór substancji, która nie dysocjuje na jony o stężeniu  $1 \text{ mol/dm}^3$  będzie wywierał ciśnienie osmotyczne równe  $1 \text{ Osm/kg}$ , co odpowiada ciśnieniu  $22,4 \text{ atm/kg}$  czy  $1013 \text{ hPa/kg}$ . W przypadku substancji, które będą dysocjowały na jony musimy uwzględnić, że każdy jon z osobna będzie wywierał działanie na błonę. Dlatego  $1 \text{ mol}$  roztworu  $\text{NaCl}$  (jony  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ) wywiera ciśnienie  $2 \times 22,4 \text{ atm}$  ( $2 \text{ Osm}$ ), zaś  $1 \text{ mol}$   $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $2\text{Cl}^-$ ) –  $3 \times 22,4 \text{ atm}$  ( $3 \text{ Osm}$ ).

W przypadku roztworów występujących w organizmach żywych najczęściej ciśnienie osmotyczne wyrażane jest w  $\text{mOsm}$  ( $1/1000 \text{ osmola}$ ) i przykładowo ciśnienie osmotyczne wszystkich płynów ustrojowych człowieka wynosi  $300 \text{ mOsm/kg}$ . Roztwory o takim samym ciśnieniu osmotycznym określane są jako *izotoniczne/izoosmotyczne*. Najbardziej znanym roztworem izotonicznym jest  $0,9 \%$  roztwór  $\text{NaCl}$  określany mianem soli fizjologicznej, i możemy sprawdzić wyliczając jego ciśnienie osmotyczne:

$$\Pi = C R T \qquad 0,9 \% \text{ oznacza, że mamy } 0,9 \text{ g w } 100 \text{ ml (g) wody}$$

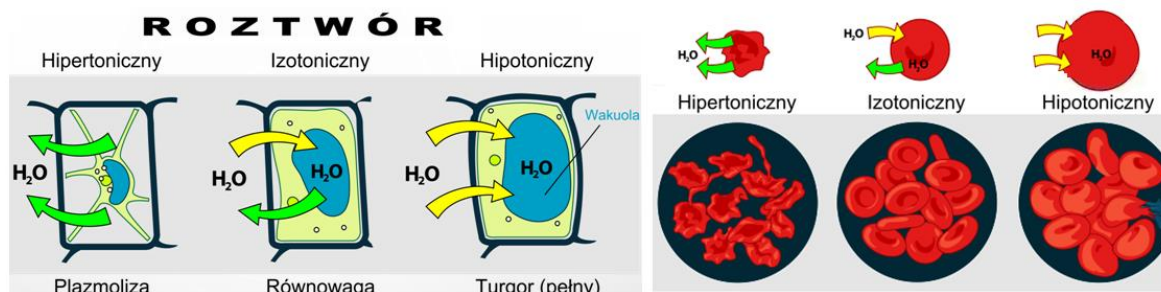
Wiedząc, że masa molowa ( $\text{NaCl}$ ) wynosi  $58,5 \text{ g/mol}$ , i że w  $1 \text{ litrze}$  ( $1 \text{ kg}$ ) roztworu znajduje się  $9 \text{ g}$  tej soli, można wyliczyć stężenie molowe, które wynosi:

$$C = m/VM = 9\text{g}/(1 \text{ dm}^3 \times 58,5\text{g/mol}) = 0,15 \text{ mol/dm}^3.$$

Musimy pamiętać, że w roztworze wodnym zamiast cząsteczek  $\text{NaCl}$  występują jony  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , co powoduje że zarówno jon sodowy wywiera ciśnienie równe  $0,15 \text{ Osm}$ , jak i jon chlorkowy działa z taką samą siłą na błonę - roztwór ten wywiera zatem ciśnienie równe  $0,3 \text{ Osm/kg}$  ( $2 \times 0,15 \text{ mol}$ ), czyli  $300 \text{ mOsm}$ .

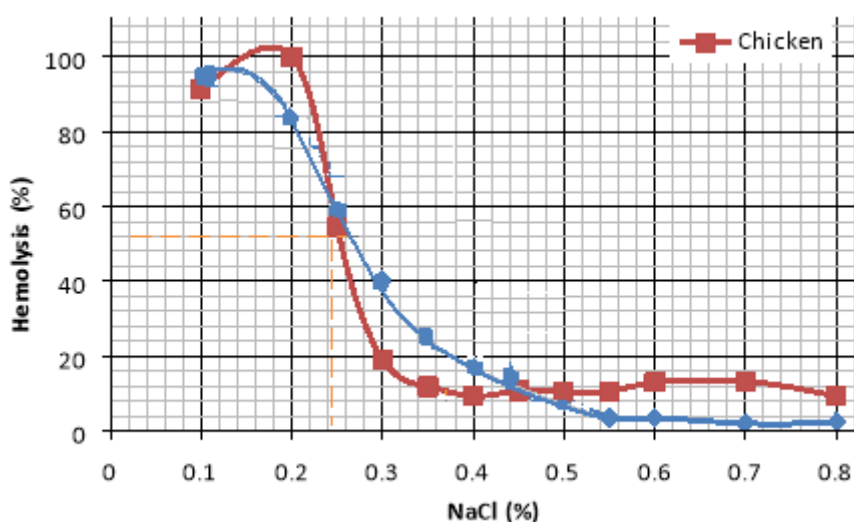
### Oporność osmotyczna komórek

Jeżeli komórkę roślinną lub zwierzęcą zanurzy się w roztworze o większym stężeniu (hipertonicznym), a tym samym o większym ciśnieniu osmotycznym niż płyn komórkowy, wówczas woda przenika z komórki do roztworu i komórka kurczy się lub zachodzi plazmoliza. Zanurzając komórkę w wodzie destylowanej lub w roztworze o mniejszym ciśnieniu osmotycznym (hipotonicznym) niż panujące w jej wnętrzu obserwuje się przenikanie wody do komórki, a tym samym pęcznienie komórki prowadzące nawet do rozerwania ciągłości błony komórkowej (Ryc. 5).



Ryc. 5. Biologiczne konsekwencje istnienia ciśnienia osmotycznego - przenikanie płynów przez błony komórkowe na przykładzie komórki roślinnej i erytrocytów. Jeżeli dwa roztwory posiadają to samo ciśnienie osmotyczne, mówimy wówczas że są one względem siebie **izotoniczne**. Roztwór który posiada wyższe ciśnienie osmotyczne od porównawczego, nazywa się **hipertonicznym**, a o niższym ciśnieniu osmotycznym od porównawczego **hipotonicznym**.

Eryocyty, podobnie jak i inne komórki zwierzęce, otacza wybiórczo półprzepuszczalna błona, co czyni je swoistego rodzaju osmometrami. Osmolarność<sup>1</sup> ich wnętrza uwarunkowana jest obecnością białek, niskocząsteczkowych związków organicznych i jonów nieorganicznych. Poprzez aktywną wymianę jonów pomiędzy wnętrzem, a środowiskiem zewnętrznym mogą kontrolować swoją osmolarność. W warunkach fizjologicznych, kiedy stężenie jonów pozostaje w równowadze izotonicznej z osoczem, eryocyty utrzymują postać dwuwklęsłego dysku. Umieszczenie tych komórek w środowisku hipotonicznym prowadzi do napływu wody do ich wnętrza, co prowadzi do ich pęcznienia i zmiany kształtu. Zarówno kształt komórki, jak i budowa błony pozwalają na maksymalne zwiększenie objętości o 70%. Gdy krwinka przyjmuje kształt kuli - błona staje się mało rozciągliwa, i dalszy napływ wody powoduje przerwanie jej ciągłości (liza komórkowa) przez co z wnętrza komórki wydostaje się hemoglobina i proces taki określany jest mianem **hemolizy**.



Ryc. 6. Krzywa hemolizy wykonana na krwi kurczaka i żaby

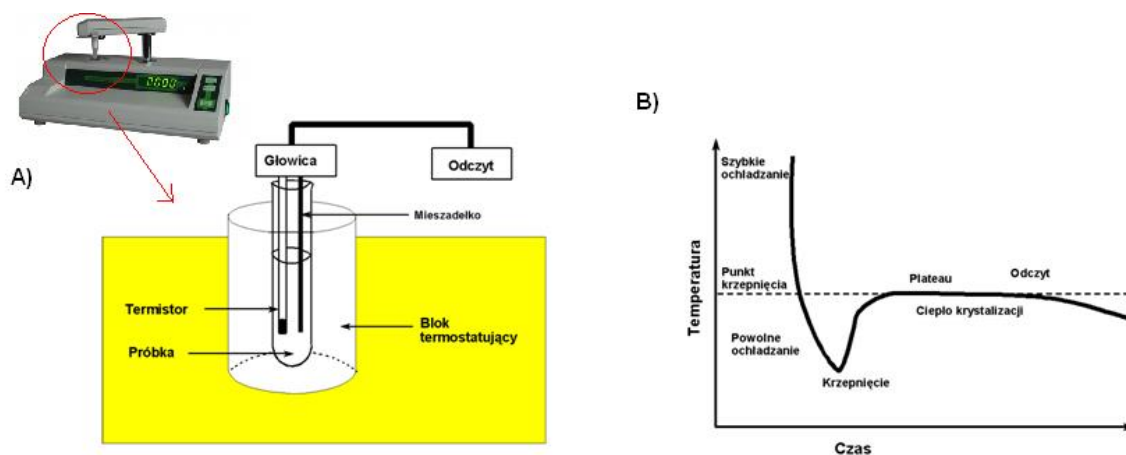
**Oporność osmotyczna** (ang. *osmotic fragility*) **erytrocytów** jest uznawana za wskaźnik wrażliwości krwinek czerwonych na działanie czynników mogących powodować ich rozpad (hemolizę). Wpływa na nią wiele czynników, wśród których można wymienić: skład i integralność błony plazmatycznej, stosunek powierzchni do objętości komórki, czynniki zewnętrzne (temperatura, ultradźwięki, rozpuszczalniki, leki) czy czas ich życia. Podstawą testu oceniającego oporność osmotyczną jest ocena odporności erytrocytów na hemolizę w zależności od stężenia NaCl (roztwory hipotoniczne: 0,1 ÷ 0,8 %). Prawidłowo

<sup>1</sup> **Osmolarność**, molarność – liczba moli substancji osmotycznie czynnych w **1 litrze** roztworu. Można też spotkać się z pojęciem *osmomolalności*, która odnosi się do 1 kg rozpuszczalnika. Z względu na fakt że gęstość wody w przybliżeniu równa jest 1kg/dm<sup>3</sup> czasami określenie to traktowane jest jako tożsame (pamiętać musimy jednak, że gęstość wody zmienia się wraz z temperaturą, np.: 4°C – 0,999 kg/dm<sup>3</sup>; 25°C – 0,997 kg/dm<sup>3</sup>; 35°C – 0,994 kg/dm<sup>3</sup>)

wykształcone krwinki czerwone człowieka ulegają hemolizie w wodnych roztworach NaCl o stężeniu w granicach 0,48 (oporność minimalna) do 0,30 % (oporność maksymalna). Bardzo często oporność osmotyczna oceniana jest na podstawie przesunięcia krzywej hemolizy, na wykresie zależności absorbancji (wynikającej z uwalniania hemoglobiny) od stężenia NaCl, gdzie określa się stężenie NaCl wywołujące 50% hemolizę (ryc. 6).

### Zasada działania osmometru

Pomiar ciśnienia osmotycznego odbywa się w przyrządach zwanych osmometrami. Schemat budowy i zasadę działania osmometru w prosty sposób przedstawiono na ryc. 7. Zwykle są to zautomatyzowane cyfrowe przyrządy, które umożliwiają szybkie i dokładne oznaczenie ciśnienia osmotycznego metodą pomiaru obniżenia temperatury krzepnięcia. Temperatura mierzona jest przy pomocy termistora, którym jest półprzewodnik metaliczny. Chłodzenie próbki (zamrażanie) prowadzi się przy pomocy układu Peltiera umieszczonego w bloku termostatującym. Na skutek obniżenia temperatury dochodzi do krzepnięcia (zamarzania) roztworu. Aparat porównuje temperaturę zamarzania mierzonego roztworu względem temperatury krzepnięcia czystego rozpuszczalnika (wody).



Ryc. 7. Osmometr: A) schemat budowy; B) rejestrowane zmiany temperatury przez osmometr w trakcie pomiaru – krzywa krzepnięcia.

Na ryc. 7B przedstawiono zmiany temperatury badanego roztworu w trakcie pomiaru osmometrem. Po umieszczeniu w osmometrze próbka ulega szybkiemu ochłodzeniu do temperatury ok.  $-7^{\circ}\text{C}$  tj. do temperatury w której powinna krzepnąć. Jednak w trakcie szybkiego ochładzania, mimo osiągnięcia i przekroczenia punktu krzepnięcia może nie dochodzić do przemiany fazowej (ciecz - ciało stałe). Dzieje się tak dlatego, że w układzie brakuje inicjatorów krystalizacji - którymi mogą być małe kryształki (zarodki kryształów), zanieczyszczenia lub energiczne mieszanie. Dlatego też początkowy szybki spadek temperatury próbki związany jest z uzyskaniem cieczy przechłodzonej. Uruchomienie mieszadła powoduje gwałtowną krystalizację. Wydzielające się ciepło

przemiany fazowej (ciepło krystalizacji, ang. *heat of fusion*) kompensuje ciepło odbierane przez blok termostatujący osmometru. Przez jakiś czas (około 1- 2 min) ustala się stan równowagi (widoczny na rycinie jako plateau), w którym temperatura próbki jest temperaturą krzepnięcia. W tym momencie występują w równowadze dwie fazy (ciekła i stała). Otrzymana wartość obniżenia temperatury krzepnięcia roztworu względem rozpuszczalnika przeliczana jest następnie w procesorze osmometru na mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

### Roztwory izotoniczne

Istotną cechą wielu leków jest ich izotoniczność – ich roztwory powinny zawierać taką samą całkowitą ilość substancji rozpuszczonych, jak w płynie wypełniającym komórki. Pozwala to na uniknięcie wielu problemów podczas stosowania leków w postaci iniekcji, kropli do oczu czy nosa, roztworów do przemywania ran, itp. Aby doprowadzić do izotoniczności roztwór jakiegoś leku, należy zwiększyć całkowite stężenie substancji przez dodanie obliczonej ilości obojętnego fizjologicznie związku chemicznego (najczęściej chlorku sodowego lub glukozy). Potrzebną ilość związku, który zwiększy ciśnienie osmotyczne można wyliczyć w różny sposób. W jednym z nich wykorzystuje się fakt, że roztwory izotoniczne mają identyczne temperatury krzepnięcia. Izotoniczny z osoczem krwi roztwór leku ma temperaturę krzepnięcia obniżoną o 0,52 K w stosunku do wody. Oznaczając przez  $\Delta T_1$  obniżenie temperatury krzepnięcia wody spowodowane przez dodawany lek, przez  $\Delta T_2$  obniżenie temperatury krzepnięcia wody przez NaCl o stężeniu 1 g soli w 100 g wody, a przez  $X$  ilość gramów NaCl, którą należy dodać do roztworu leku o masie 100 g, aby otrzymać roztwór izotoniczny, otrzymuje się następującą zależność:

$$\frac{1}{X} = \frac{\Delta T_2}{0,52 - \Delta T_1} \quad \text{stad} \quad X = \frac{0,52 - \Delta T_1}{\Delta T_2}$$

Drugi sposób polega na wyznaczeniu różnicy wartości ciśnienia osmotycznego krwi, które wynosi w temperaturze 37°C około  $7,7 \times 10^5$  Pa (7,65 atm; 300 mOsm) i przygotowanego roztworu leku:

$$\Pi_{\text{krwi}} - \Pi_{\text{roztworu leku}} = i c R T$$

Z tego równania wylicza się stężenie molowe roztworu NaCl, a następnie masę ( $m$ ) NaCl, którą należy rozpuścić w określonej objętości roztworu leku, aby uzyskać jego izotoniczność z osoczem krwi.

$$m = \frac{(\Pi_{\text{krwi}} - \Pi_{\text{roztworu leku}}) M_{\text{NaCl}} V}{i R T}$$

W kolejnej metodzie obliczania ilości substancji, której dodatek doprowadza roztwór leku do izotoniczności z płynami ustrojowymi wykorzystuje się znajomość tzw. równoważnika chlorku sodu (E). Wielkość ta oznacza ilość gramów NaCl, która po rozpuszczeniu wywiera ciśnienie osmotyczne identyczne z ciśnieniem 1 g substancji leczniczej w objętości równej objętości roztworu chlorku sodowego. Aby znaleźć wartość E mierzy się obniżenie temperatury krzepnięcia badanego roztworu. Dla rozcieńczonych roztworów :

$$\Delta T = Lc$$



gdzie  $L$  jest iloczynem stałej krioskopowej  $K_k$  oraz współczynnika izotonicznego „ $i$ ” vant’Hoffa (w przybliżeniu określa liczbę jonów na które dysocjuje dany związek rozpuszczony w wodzie).

$$L = i K_k$$

Gdy roztwór jest izotoniczny z osoczem, to wtedy wartość  $L = L_{izo}$

$$L_{izo} = \frac{\Delta T}{c_{izo}}$$

Izotoniczny roztwór NaCl posiada stężenie molowe  $0,154 \text{ mol/dm}^3$  i obniża temperaturę krzepnięcia o  $0,52 \text{ K}$ . Stąd  $L_{izo} = \frac{0,52}{0,154} = 3,4 \text{ [ K dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ ]}$

Jeżeli roztwór zawiera  $1 \text{ g}$  leku w  $1000 \text{ cm}^3$  roztworu to  $c = 1 \text{ g / M}$ .

$$\Delta T = 3,4 \frac{E}{58,45}$$

Porównując dwa ostatnie równania stronami otrzymuje się :

$$L_{izo} \frac{1}{M} = 3,4 \frac{E}{58,45} \quad \text{stąd } E = 17 \frac{L_{izo}}{M}$$

Związki podobnie dysocjujące (na taką samą liczbę jonów i o podobnym stopniu dysocjacji) mają podobne wartości  $L_{izo}$ . Wartości  $E$  dla wielu leków są obliczone i przedstawione w tabelach.

### Wykonanie ćwiczenia

1. Korzystając z roztworu soli fizjologicznej (0,9 % NaCl) przygotować po 8-10 ml roztworów NaCl o stężeniach: 0,2 % - 0,8 % (wymienionych w podpunkcie 2)

Aby uzyskać roztwór 0,3 % możemy skorzystać z wzoru:  $C_1V_1 = C_2V_2$ , gdzie wartości z indeksem 1 odnoszą się do roztworu wyjściowego (0,9 %), a 2 do tego który chcemy uzyskać, przykładowo:

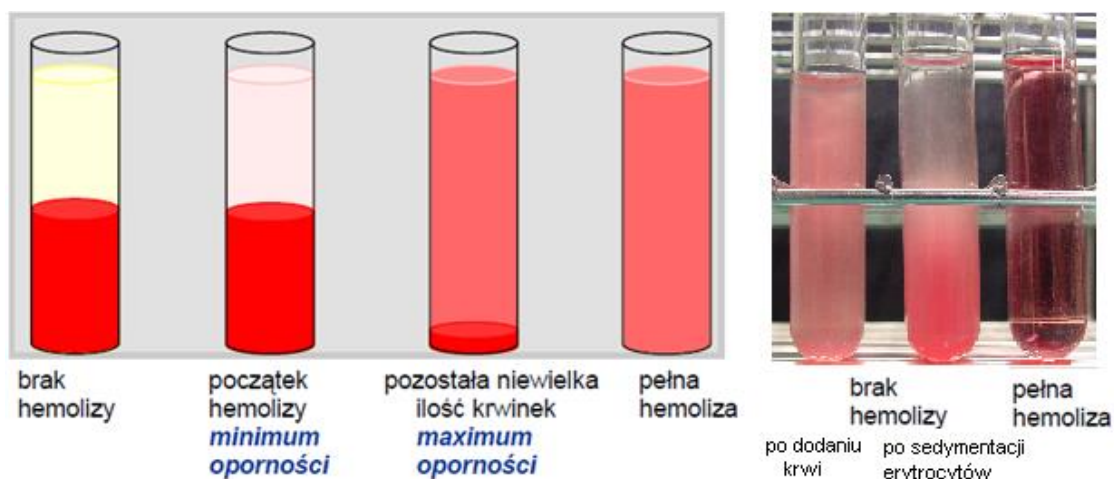
$0,9 \% \times V_1 = 0,2 \% \times 10 \text{ ml} \Rightarrow V_1 = 2,22 \text{ ml}$ , czyli do 2,22 ml soli fizjologicznej należy dodać 7,78 ml wody i wymieszać lub skorzystać z metody krzyżowej, z której wynika, że należy użyć 2 ml soli fizjologicznej (0,9 % NaCl) i 7 ml wody.

2. Do 10 ponumerowanych probówek Ependorfa (przedstawione na ryc. obok) wprowadzić po 1 ml roztworu NaCl o stężeniach: 0,2 %; 0,25 %; 0,3 %; 0,35 %; 0,4%; 0,45%, 0,5%, 0,55 %, 0,6 %, 0,8%.

3. Do każdej z probówek dodać po 1 kropli krwi (sugeruje się użycie pipety automatycznej i wprowadzić do każdego z roztworów po 25 ul) lub erytrocytów zawieszonych w PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna – ang. *Phosphate - Buffered Saline*).

4. Odstawić na 10 minut i następnie wskazać, w których probówkach roztwór nad opadłymi krwinkami jest bezbarwny, oraz te w których nastąpiła hemoliza (czerwone zabarwienie roztworu) - ryc. 9 (poniżej) ilustruje kiedy obserwujemy hemolizę





Aby przyspieszyć opadanie krwinek i ułatwić rozpoznanie, czy zaszła hemoliza można wszystkie próbówki odwirować (200g, 5 min). Wskazać kiedy obserwuje się pierwsze oznaki hemolizy (minimum oporności) oraz pełną hemolizę.

5. Pełną hemolizę możemy zaobserwować jeżeli do 1 ml wody wprowadzimy kroplę krwi/zawiesiny erytrocytów. Można wykonać taką próbę - jako punkt odniesienia.
6. Uwolnioną hemoglobinę oznaczyć spektrofotometrycznie przy 580 nm<sup>2</sup> (po odwirowaniu pobrać z górnej części roztworu po 200 µl supernatantu uzyskanego po odwirowaniu i dodać do 600 µl wody – przed dokonaniem odczytu wyzerować spektrofotometr używając kuwety z czystą wodą). Narysować wykres zależności uwolnionej hemoglobiny (absorbancji) od stężenia NaCl (Ryc. 6). Wyznaczyć graficznie IC<sub>50</sub> (stężenie przy którym obserwuje się 50 % hemolizę). Podać wartości ciśnienia osmotycznego, przy których obserwuje się początki hemolizy (minimum oporności) i pełną hemolizę.
7. Wartość ciśnienia osmotycznego można wyliczyć lub zmierzyć za pomocą osmometru – decyzję o użyciu osmometru podejmuje asystent prowadzący ćwiczenia.  
Do pomiarów należy wykorzystać przygotowane wcześniej roztwory NaCl, odpowiadające tym, w których zaobserwowano hemolizę (Uwaga: osmometr był już wcześniej kalibrowany – nie należy wykonywać kalibracji, a jedynie dokonać pomiaru ciśnienia roztworu (ów) wyznaczonych przez prowadzącego ćwiczenie).

<sup>2</sup> Prowadzący ćwiczenia może wyznaczyć inną długość fali świetlnej do pomiaru zawartości hemoglobiny, np.: 540 nm, 560 nm lub 630 nm.

### **Pomiar ciśnienia osmotycznego - Instrukcja obsługi osmometru Marcel os 3000**

1. Włączyć zasilanie przyciskiem z tyłu przyrządu. Odczekać ok. 3-4 minut na ustabilizowanie się temperatury głowicy pomiarowej.
  2. Podnieść i obrócić głowice pomiarową, a do komory chłodzącej wprowadzamy pustą probówkę Ependorffa. **Pozostawienie pustej komory chłodzącej może spowodować jej oszronienie**, co jest przyczyną błędnych odczytów podczas pomiarów ciśnienia osmotycznego.
  3. Dokonać pomiaru ciśnienia osmotycznego dla wody dejonizowanej. W tym celu do probówki Ependorffa wprowadzamy **400  $\mu$ l** płynu i po zamocowaniu jej na głowicy, umieścić w komorze chłodzącej i dokonać pomiaru (klawisz START).
  4. Po zakończeniu pomiaru należy podnieść i obrócić głowicę pomiarową, a do komory chłodzącej wprowadzamy pustą probówkę Ependorffa. Zamrożona próbkę rozmrozić (najlepiej ogrzać ją przez chwilę w palcach), zdjąć probówkę, naciskając dźwignię zatrasku. Delikatnie przemyć wodą destylowaną, a następnie wytrzeć/wysuszyć koniec czujnika za pomocą bibuły – uważać żeby nie złamać termistora i nie pozostawić na nim włókienek/fragmentów bibuły.
  5. Sprawdzić wskazania przyrządu dla wody dejonizowanej (0000 mOsm/kg) i roztworu wzorcowego NaCl (0400 mOsm/kg). Jeżeli wskazania są zgodne (nie różnią się więcej niż o 5-10 mOsm) można przejść do dalszej części pomiarowej (punkt 7). Jeśli jednak są większe - należy przeprowadzić kalibrację aparatu (punkt 6)
  6. **KALIBRACJA**. Do suchej probówki Ependorffa wprowadzić pipetą automatyczną 400  $\mu$ l wody dejonizowanej. Należy uważać, aby w cieczy nie powstały bąbelki powietrza oraz aby nie rozproszyć wody na ściankach probówki. Probówkę osadzić w uchwycie głowicy pomiarowej. Umieścić głowicę w komorze chłodzącej. Wykonać pomiar naciskając przycisk **START/STOP**. Pomiar przebiega automatycznie. Po zakończonym pomiarze nacisnąć przycisk **KALIBRACJA**, tak aby na wyświetlaczu pokazał się napis „c0.00”. Następnie nacisnąć i przytrzymać przez 3-4 sekundy przycisk **START**, aż na wyświetlaczu wyświetlony zostanie symbol „---,„. Aparat przyjmie wartość „0” dla wykonanego pomiaru (czystej wody).
  - 6a. Powtarzamy procedurę stosując roztwór kalibracyjny chlorku sodu (400 mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Probówkę Ependorffa ze 400  $\mu$ l roztworu kalibracyjnego osadzić w uchwycie głowicy pomiarowej i umieścić głowicę w komorze chłodzącej. Wykonać pomiar naciskając przycisk **START/STOP**. Po zakończonym pomiarze dwukrotnie nacisnąć przycisk **KALIBRACJA**, tak aby na wyświetlaczu aparatu pojawiła się wartość „400 mOsm”. Nacisnąć i przytrzymać przez 3-4 sekundy przycisk **START**, aż na wyświetlaczu wyświetlony zostanie symbol „ ---,„. Aparat przyjmie wartość „400” dla wykonanego pomiaru.
7. Pomiar ciśnienia osmotycznego badanego roztworu odbywa się analogicznie. Do probówki Ependorffa wprowadzamy **400  $\mu$ l** (0,4 ml) **badanego roztworu** i po umieszczeniu głowicy z badaną próbką w komorze chłodzącej rozpoczynamy pomiar. Nacisnąć przycisk

**START/STOP** – aparat rozpocznie automatyczny pomiar. Po zakończonym pomiarze wyświetlony zostaje wynik w mOsm/kg. Wciśnięcie przycisku „°C/mOsm/kg” powoduje wyświetlenie temperatury zamarzania/krzepnięcia mierzonej próby – ponowne wciśnięcie znów pokazuje wartość ciśnienia osmotycznego. Zanotować wartość ciśnienia osmotycznego i temperaturę zamarzania badanych prób.

W przypadku gdy pomiar ciśnienia osmotycznego jest niemożliwy (lub nie wykonano go podczas ćwiczenia) – można wyznaczyć je na podstawie obliczeń teoretycznych. Poniżej przedstawiono przykłady obliczeń ciśnienia osmotycznego.

*Przykład: Jak obliczyć ciśnienie osmotyczne roztworu 0,6 % NaCl ?:*

0,6 % oznacza, że mamy 0,6 grama substancji rozpuszczonej (w tym przypadku NaCl) w 100 g (ml) wody. Ponieważ wartość ciśnienia osmotycznego odnosi się do 1 kg rozpuszczalnika, musimy uwzględnić, że w takiej objętości/ilości wody mamy odpowiednio więcej rozpuszczonej substancji. Z proporcji wynika, że będzie jej 10×więcej, czyli 6 g.

Skoro mamy 6 gram w 1 kilogramie wody, to powstaje pytanie jakiej liczbie moli odpowiada taka ilość NaCl. Z tablic fizykochemicznych wynika, że masa molowa tej soli wynosi 58,445 g/mol. Zatem z proporcji lub z wzoru  $n = m/M$ , możemy wyliczyć liczbę moli w 1 litrze/kg roztworu:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} - 58,445 \text{ g} \\ x \text{ moli} - 6 \text{ g} \end{array} \quad x = 0,103 \text{ mol}$$

Ciśnienie osmotyczne odpowiada ilości moli rozpuszczonych w roztworze wodnym, jednak tylko w przypadku substancji niedysocjującej na jony. Jeśli związek dysocjuje na jony, to wtedy każdy z jonów będzie wywierał odpowiednie ciśnienie osmotyczne. W przypadku NaCl, w roztworze wodnym mamy:



Jak widzimy w powyższym zapisie widoczne są 2 jony, więc ciśnienie osmotyczne tego roztworu będzie 2 × wyższe niż ilość moli NaCl w 1 kilogramie rozpuszczalnika:

$$\Pi = 2 \times 0,103 \text{ mol /kg} = 0,206 \text{ Osm/kg} = \mathbf{206 \text{ mOm}}$$

Zmierzona wartość ciśnienia osmotycznego, może nieznacznie się różnić od wyliczonej. Nawet bezpośrednie pomiary charakteryzują się nieznacznym rozrzutem i dlatego wartości referencyjne dla osocza i płynów izotonicznych (300 mOsm) wynoszą: 292 – 308 mOsm/kg.

Inne przykłady obliczeń ciśnienia osmotycznego

**Zadanie1**

Ile gramów NaCl należy dodać do 4000 g wody aby powstały roztwór wywierał takie samo ciśnienie osmotyczne jak roztwór zawierający 0,111 g CaCl<sub>2</sub> w 2 kg wody. (M<sub>cz</sub> NaCl = 58 g/mol, M<sub>cz</sub> CaCl<sub>2</sub> = 111 g/mol)

*Rozwiązanie:*

0,111g CaCl<sub>2</sub> w 1 litrze roztworu:

$$C = \frac{m}{MV} = \frac{0,111 \text{ g}}{111 \text{ g/mol} \times 2 \text{ kg}} = 0,0005 \text{ mol/kg} = 0,5 \text{ mM}$$

*Roztwór ten teoretycznie powinien wywierać ciśnienie 0,5 mOsm gdyby na błonę działała cząsteczka CaCl<sub>2</sub>.*

*Wiemy jednak, że w roztworach wodnych sole są w 100 % zdysocjowane i na błonę działają jony:*

CaCl<sub>2</sub> → Ca<sup>2+</sup> + 2 Cl<sup>-</sup> w wyniku dysocjacji powstają 3 jony (3 jednostki osmotyczne)

Stąd:  $\Pi = 3 \times 0,5 \text{ mOsm} = 1,5 \text{ mOsm}$

NaCl ma również mieć 1,5 mOsm w kg wody.

NaCl → Na<sup>+</sup> + Cl<sup>-</sup> w wyniku dysocjacji powstają 2 jony ( 2 jednostki osmotyczne)

Stąd: 1 mM - 2 mOsm

x - 1,5 mOsm

x = 0, 75 mM

0, 75 mM - 1 kg

x - 4 kg

x = 3 mM

1 mM - 58 mg

3 mM - x

x = 174 mg

*Rozwiązanie alternatywne:*

Wiedząc, że jeden roztwór (NaCl) dysocjuje na 2 jony, a drugi na 3 jony (CaCl<sub>2</sub>) i że mają takie samo ciśnienie osmotyczne, zatem możemy zapisać jako:

$$\Pi_1 = \Pi_2$$

gdzie  $\Pi = C R T$ ;  $C = m / M V$ ,

a po podstawieniu uzyskamy:

$$2 \cdot \frac{m_{\text{KCl}}}{M_{\text{KCl}} \cdot V_{\text{KCl}}} R \cdot T = 3 \cdot \frac{m_{\text{CaCl}_2}}{M_{\text{CaCl}_2} \cdot V_{\text{CaCl}_2}} R \cdot T$$

Wartości R i T po jednej i drugiej stronie równania możemy skrócić, a biorąc pod uwagę że 1 kg wody = 1 litr i podstawiając dane z zadania uzyskamy:

$$2 \cdot \frac{m_{\text{NaCl}}}{58 \text{ g/mol} \cdot 4 \text{ l}} = 3 \cdot \frac{0,111 \text{ g}}{111 \text{ g/mol} \cdot 2 \text{ l}}$$

Z wycień wynika, że:  $m = 1,5 \times 10^{-3} \times 116 \text{ g} = 0,174 \text{ g}$  (identycznie jak wyliczono wcześniej)

### Zadanie 2.

Wyrazić w miliosmolach i atmosferach ciśnienie osmotyczne roztworu powstałego przez dodanie 393  $\mu\text{g}$  bezwodnego chlorku cyny do 100 mg wody,  $M_{\text{SnCl}_4} = 262 \text{ g/mol}$

*Rozwiązanie:*

$$393 \mu\text{g} = 0,393 \text{ mg} \quad a \quad 100 \text{ mg} = 0,1 \text{ g}$$

$$\text{Zatem: } 0,393 \text{ mg} - 0,1 \text{ g}$$

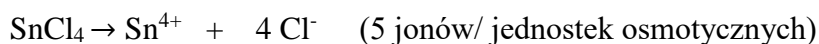
$$x - 1000\text{g}$$

$$x = 3930 \text{ mg} = 3,93 \text{ g}$$

$$1 \text{ mM} - 262 \text{ mg}$$

$$x - 3930 \text{ mg}$$

$$x = 15 \text{ mmoli}$$



$\Pi = 75 \text{ mOsmoli}$ , ponieważ związek dysocjuje na 5 jonów ( $5 \times 15 \text{ mmol}$ )

$$75 \text{ mOsm} = 0,075 \text{ Osm}$$

$$1 \text{ Osm} - 22,4 \text{ atm}$$

$$0,075 \text{ Osm} - x \quad x = 1,68 \text{ atm}$$

### Zadanie 3

Wyrazić w miliosmolach i atmosferach ciśnienie osmotyczne roztworu powstałego przez dodanie 222 mg bezwodnego chlorku wapnia do 10 ml wody,  $M_{\text{CaCl}_2} = 111 \text{ g/mol}$

*Rozwiązanie:*

$$222 \text{ mg} - 10 \text{ ml}$$

$$x - 1000 \text{ ml}$$

$$x = 22200 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mM} - 111 \text{ mg}$$

$$x - 22200 \text{ mg}$$

$$x = 200 \text{ mM}$$

co odpowiada 600 mOsm ponieważ związek dysocjuje na 3 jony ( $3 \times 200 \text{ mM}$ )

$$600 \text{ mOsm} = 0,6 \text{ Osm}$$

$$1 \text{ Osm} - 22,4 \text{ atm}$$

$$0,6 \text{ Osm} - x$$

$$x = 13,44 \text{ atm}$$

### Zadanie 4

Wyrazić w miliosmolach i atmosferach ciśnienie osmotyczne roztworu powstałego przez dodanie 2670  $\mu\text{g}$  bezwodnego chlorku glinu do 1 ml wody,  $M_{\text{AlCl}_3} = 133,5 \text{ g/mol}$

$$2670 \mu\text{g} - 1 \text{ ml}$$

$$2670 \text{ mg} - 1000 \text{ ml}$$

$$1 \text{ mM} - 133,5 \text{ mg}$$

$$x - 2670 \text{ mg}$$

$$x = 20 \text{ mmoli}$$

$\Pi = 80 \text{ mOsm}$  ponieważ w wyniku dysocjacji powstają 4 jony ( $4 \times 20 \text{ mOsm} = 0,08 \text{ Osm}$ )

1 Osmolowy roztwór wywiera ciśnienie osmotyczne równe 22,4 atm

$$1 \text{ Osm} - 22,4 \text{ atm}$$

$$0,08 \text{ Osm} - x$$

$$x = 1,792 \text{ atm}$$