

## **Ćwiczenie 4 - Oznaczanie elektrolitów ( $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ ) w surowicy krwi metodą potencjometryczną z zastosowaniem krzywej wzorcowej.**

### **Wprowadzenie**

Chlorki ( $\text{Cl}^-$ ) - norma w surowicy krwi ludzkiej: 102 – 110 mmol/l

Jon chlorkowy jest głównym anionem płynu pozakomórkowego. Stężenie tego anionu zależy głównie od podaży chlorków z pokarmami oraz utraty tego pierwiastka z moczem lub wydzielinami i wydaliniami przewodu pokarmowego. Zmiany poziomu chlorków są skorelowane ze zmianami poziomu sodu. Do jego wzrostu dochodzi m.in. w hipernatemii i kwasicy nieoddechowej. Hipochloremię stwierdzamy w przypadkach hyponatemii oraz w zasadowicy niegazowej.

Potas ( $\text{K}^+$ ) - norma w surowicy krwi ludzkiej: 3,6 – 5,0 mmol/l

Potas jest dominującym kationem płynu wewnątrzkomórkowego. W płynie zewnątrzkomórkowym znajduje się zaledwie 2% całkowitego potasu. Hipokalemia (obniżony poziom potasu) jest najczęściej wynikiem nadmiernej utraty potasu przez przewód pokarmowy lub nerki w wyniku wymiotów, biegunki, działania hormonów i leków moczopędnych. Niedostateczna ilość potasu występuje najczęściej u chorych po zabiegach operacyjnych, odżywianych przez sondę lub pozajelitowo. Hiperkalemia (podwyższony poziom potasu) jest najczęściej wynikiem nieprawidłowego wydalania potasu z moczem oraz nadmiernego uwalniania potasu z komórek). Powodem hiperkalemii może być wzmożony rozpad komórek, ostra niewydolność nerek lub stosowanie niektórych leków.

Sód ( $\text{Na}^+$ ) - norma w surowicy krwi ludzkiej: 135-145 mmol/l

Sód jest dominującym kationem płynu pozakomórkowego. Utrzymanie stałej ilości sodu w osoczu krwi to wynik hormonalnej regulacji nerkowego wydalania sodu i wody. Wzrost stężenia sodu powodowany jest przez odwodnienie hipertoniczne, zmniejszoną podaż wody, nadmierną utratę wody poprzez nerki, przez skórę, płuca, przewód pokarmowy. Zawartość sodu w organizmie zwiększa też nadmierna ilość sodu w pokarmie, nadmierne podawanie pozajelitowe, zmniejszone wydalanie sodu. Spadek stężenia wywołują: nadmierna utrata sodu przez nerki, niedobór hormonów kory nadnerczy, nadmierna utrata sodu przez przewód pokarmowy (wymioty, biegunki), używanie niektórych leków np. diuretyków.

**Cel ćwiczenia:** *Potencjometryczne oznaczanie zawartości jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  w surowicy krwi z użyciem elektrod jonoselektywnych, zapoznanie się z metodami oznaczeń oraz właściwościami elektrod jonoselektywnych.*

**Sprzęt i materiały:**

Potencjometr,

Elektroda sodowa,

Elektroda chlorkowa

Elektroda referencyjna kalomelowa z kluczem elektrolitycznym (1 M  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )

Roztwór wzorcowy NaCl: 200 mM

Roztwór buforowy octan amonu 0,02 M, pH = 7,0

surowica krwi

3 pojemniki plastikowe o pojemności 100 ml,

2 cylindry, 1 zlewka o pojemności 100 ml,

1 butelka o pojemności 1 litra

pipety automatyczne, końcówki do pipet

mieszadło magnetyczne

2 mieszadełka magnetyczne

**Wykonanie ćwiczenia:**

Przed przystąpieniem do pomiarów należy zestawić układ pomiarowy: elektrodę wskaźnikową (Cl lub Na) i elektrodę odniesienia (kalomelową) umieścić w statywie nad mieszadłem magnetycznym, a następnie podłączyć elektrody do potencjometru (REF – el. odniesienia). Na mieszadle magnetycznym ustawić pojemnik z wodą destylowaną (+ mieszadełko) i zanurzyć w niej elektrody na głębokość ok. 1 cm. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby mieszadełko nie uderzało w elektrody! Włączyć mieszanie i kondycjonować elektrody do uzyskania stałego potencjału (minimum 5 min.).

Dla każdego układu wyznaczyć krzywą wzorcową, a następnie oznaczyć zawartość analizowanego jonu.

**Przygotowanie próbki do analizy:**

Pobrać 80 ml buforu octanowego do suchego pojemnika (X) na 100 ml zaopatrzonego w mieszadełko i dodać 2,0 ml badanej surowicy krwi.

### **Krzywa wzorcowa dla jonów Cl<sup>-</sup>:**

1. Pobrać 80 ml buforu octanowego do suchego pojemnika (Cl) na 100 ml zaopatrzonego w mieszadło, a następnie włożyć opłukane i osuszone elektrody. Uruchomić mieszadło. Poczekać na ustalenie się potencjału (minimum 5 min.).
2. Dodawać pipetą 5 porcji po 0,4 ml roztworu wzorcowego NaCl (200 mM), tak aby sumaryczne objętości dodawanych porcji NaCl wyniosły: 0,4; 0,8; 1,2, 1,6, 2,0 ml. Po każdej dodanej porcji roztworu NaCl należy poczekać (1 min.) na ustalenie się potencjału, odczytać jego wartość i zapisać w tabeli (wzór poniżej).

### **Oznaczenie jonów Cl<sup>-</sup> w surowicy krwi:**

3. Po skończonym pomiarze wyjąć elektrody, opłukać, osuszyć i zanurzyć w pojemniku (X) z badaną próbką. Uruchomić mieszadło. Poczekać na ustalenie się potencjału (około 3 min.), odczytać jego wartość i zapisać w tabeli (wzór poniżej).
4. Następnie wyjąć elektrody, opłukać i zanurzyć w pojemniku z wodą. Nie wylewać badanego roztworu z naczynka analitycznego (X)! Naczynko analityczne (Cl) opłukać wodą i wysuszyć ręcznikiem papierowym.
5. Wykonać dwie serie pomiarowe (pkt. od 1-4).

### **Krzywa wzorcowa dla jonów Na<sup>+</sup>:**

1. Pobrać 80 ml buforu octanowego do suchego pojemnika (Na) na 100 ml zaopatrzonego w mieszadło, a następnie włożyć opłukane i osuszone elektrody. Uruchomić mieszadło. Poczekać na ustalenie się potencjału (minimum 5 min.).
2. Dodawać pipetą 5 porcji po 0,4 ml roztworu bazowego NaCl (200 mM) tak, aby sumaryczne objętości dodawanych porcji NaCl wyniosły: 0,4; 0,8; 1,2, 1,6, 2,0 ml.. Po każdej dodanej porcji roztworu jonów sodowych należy poczekać (1 min.) na ustalenie się potencjału, odczytać jego wartość i zapisać w tabeli (wzór poniżej).

### **Oznaczenie jonów Na<sup>+</sup> w surowicy krwi:**

3. Po skończonym pomiarze wyjąć elektrody, opłukać, osuszyć i zanurzyć w pojemniku (X) z badaną próbką. Uruchomić mieszadło. Poczekać na ustalenie się potencjału (około 3 min.), odczytać jego wartość i zapisać w tabeli (wzór poniżej).
4. Następnie wyjąć elektrody, opłukać i zanurzyć w pojemniku z wodą. Nie wylewać badanego roztworu z naczynka analitycznego (X)! Naczynko analityczne (Na) opłukać wodą i wysuszyć ręcznikiem papierowym.
5. Wykonać dwie serie pomiarowe (pkt. od 1-4).

### **Obliczenia i wyniki:**

1. Wzór tabeli wyników (dla Na<sup>+</sup>)

V <sub>w</sub> , [ml]	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	X
C <sub>Na+</sub> [M]							
Log[ C <sub>Na+</sub> ]							
E [mV]							
C <sub>Na+</sub> [M]							
Log[ C <sub>Na+</sub> ]							
E [mV]							

2. Oblicz stężenia jonów wzorcowych (C<sub>i</sub>), odpowiadające każdemu dodatkowi, korzystając ze wzoru uwzględniającego poprawkę na rozcieńczenie:

$$c_i = \frac{V_w \cdot c_w}{V + V_w} \quad (1),$$

gdzie: V<sub>w</sub>, c<sub>w</sub> to objętość i stężenie dodawanego roztworu wzorcowego, V- początkowa objętość próbki.

- Wykreśl krzywe wzorcowe poszczególnych elektrod w układzie współrzędnych E(mV) w funkcji logC<sub>i</sub> i opisz je równaniami.
- Na podstawie odczytanych wartości potencjału E<sub>x</sub> odczytaj z krzywych wzorcowych zawartości poszczególnych jonów (sodowych, potasowych, chlorkowych) w badanej próbce (C<sub>x</sub>).
- Zawartość oznaczanych jonów (C<sub>xs</sub>) w surowicy wylicz uwzględniając rozcieńczenie.
- Oblicz średnie zawartości tychże jonów i odchylenia standardowe.

#### **Literatura uzupełniająca:**

- L. Stryer *Biochemia*
- W. Szczepaniak *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*
- pod red. T. Bililńskiego i G. Bartosza *Ćwiczenia – Podstawy biofizyki, chemia fizyczna, biochemia, enzymologia, biologia komórki*

#### **Zagadnienia:**

- Rola Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i K<sup>+</sup> w organizmie ludzkim.
- Normy laboratoryjne składu krwi dotyczące Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i K<sup>+</sup> – oryginalna publikacja: <http://www.ratownictwo.republika.pl/artykuly/arttykul11.htm>
- Potencjometria – podstawy metody, elektroda kalomelowa, jonoselektywne elektrody (ISE), potencjometria bezpośrednia, zastosowanie ISE.