

Криоскопический осмометр для исследования криобиологических жидкостей

Cryoscopic Osmometer for Studying Cryobiological Fluids

Проанализированы факторы, влияющие на точность измерений температуры замерзания биологических жидкостей в криоскопическом осмометре: теплоемкость датчика температуры, масса образца, интегральная теплопроводность среды и разность температур между образцом и охладителем. Результаты анализа использованы при разработке криоскопической ячейки для исследования жидкостей с повышенной склонностью к переохлаждению. Криоскопический осмометр с данной ячейкой позволяет измерять температуру замерзания таких систем с точностью $\pm 0,005^\circ\text{C}$.

Ключевые слова: криоскопический осмометр, криобиологические жидкости, криопротекторы, переохлаждение.

Проаналізовано фактори, які впливають на точність вимірювань температури замерзання біологічних рідин у криоскопічному осмометрі: теплоємність датчика температури, маса зразка, інтегральна теплопровідність середовища та різниця температур між зразком і охолоджувачем. Результати аналізу використані у розробці криоскопічної комірки для дослідження рідин з підвищеною схильністю до переохолодження. Криоскопічний осмометр з даною коміркою дозволяє вимірювати температуру замерзання таких систем з точністю $\pm 0,005^\circ\text{C}$.

Ключові слова: криоскопічний осмометр, криобіологічні рідини, криопротектори, переохолодження.

The factors affecting the accuracy of temperature measurements in biological fluids in cryoscopic osmometer: heat capacity of temperature gauge, sample mass, integral heat conductivity of the medium and temperature difference between the sample and coolant, were analyzed. The results of analysis were used when designing cryoscopic cell to investigate the liquids with an increased inclination to overcooling. Cryoscopic osmometer with this cell enables the measuring of freezing temperature of such systems with $\pm 0.005^\circ\text{C}$ accuracy.

Key words: cryoscopic osmometer, cryobiological fluids, cryoprotectants, supercooling.

Криоскопические осмометры применяются для анализа биологических жидкостей на протяжении более пятидесяти лет. В медицинской практике наиболее распространены осмометры для исследования осмотического состояния крови, плазмы, мочи, фармацевтических препаратов и т. п. На рынке научного приборостроения известны производимые в Германии криоскопические осмометры K-7400 компании "Knauer", "Osmomat" фирмы "Gonotec", "OsMoLAB" фирмы "Labtek Services", приборы фирм "Precision Systems Inc." (США), "Аркрей" (Япония), НИП "Буревестник" (Россия). Для измерения осмоляльности конкретных биологических жидкостей разрабатываются узкоспециализированные осмометры. Например, фирмой "Advanced Instruments Inc." (США) производится криоскопический нанолитровый осмометр (модель 3100), позволяющий определять осмоляльность слезы [3, 4, 7], осмометр 3320 (Германия) разработан для контроля осмоляльности молока [5], "Advanced Model 20G Osmometer" (США) широко используется при исследовании осмотического состояния сус-

Cryoscopic osmometers have been applied for analyzing biological fluids for more than 50 years. In medical practice the most popular are the osmometers for investigation of osmotic state of blood, plasma, urine, pharmaceutical preparations *etc.* On the market of scientific professional equipment there are known the produced in Germany cryoscopic osmometers K-7400 of Knauer company, Osmomat of Gonotec, OsMoLAB of Labtek Services, the devices of Precision Systems Inc. (USA), Arkray (Japan), SPC Burevestnik (Russia). To measure the osmolality of certain biological liquids there are designed narrowly-specialized osmometers. For example, the Advanced Instruments Inc. (USA) produces the cryoscopic nanoliter osmometer (model 3100) allowing the determining of tear osmolality [3, 4, 7], osmometer 3320 was designed to control milk osmolality [5], Advanced Model 20G Osmometer is widely applied when investigating the osmotic state of cell suspensions of mammals, cultures of plant cells, processes of bacterial fermentation [2]. However, when analyzing the available literature it has been established that the designers of cryoscopic

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
vd_zin@mail.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: vd_zin@mail.ru

пензий клеток млекопитающих, культур растительных клеток, процессов бактериального брожения [2]. Однако при анализе доступной нам информации установлено, что разработчики криоскопических осмометров не уделяют достаточного внимания разработке приборов для измерения осмоляльности криобиологических жидкостей – биологических жидкостей, содержащих криозащитные вещества. Особенностью заморзания водных систем, содержащих криопротекторы, является склонность к устойчивому длительному переохлаждению, вследствие чего вызывать их кристаллизацию в криоскопическом осмометре достаточно сложно.

Цель работы – разработка прибора для регистрации температуры заморзания и осмоляльности в криобиологических жидкостях; повышение точности криоскопических измерений для анализа систем, отличающихся по температуре заморзания не более чем на 0,01°C.

Для достижения данной цели нами были проанализированы факторы, влияющие на точность измерения температуры заморзания жидкости при помощи криоскопического осмометра, на основании которых разработана измерительная ячейка криоскопического осмометра для исследования криобиологических жидкостей.

Материалы и методы

Криобиологические жидкости готовили на основе дополнительно очищенных криопротекторов: 1,2-пропандиола (1,2-ПД), глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) марки “х. ч.” (“Реахим” Россия).

Исследуемым раствором заполняли криоскопическую ячейку осмометра, в образец погружали термочувствительный датчик, затем ячейку помещали в охладитель с температурой ниже температуры начала кристаллизации льда в исследуемом растворе.

На рис. 1 представлена зависимость температуры исследуемой жидкости в криоскопической ячейке от времени. В переохлажденном образце (точка В на рис. 1) начинается кристаллизация льда (участки ВС – для чистой воды и ВС1 – для водного раствора осмотически активного вещества). В ходе кристаллизации выделяется скрытая теплота фазового перехода, и температура переохлажденного образца в ячейке повышается до значения криоскопической температуры (точки С и С1), соответствующей фазовому равновесию “жидкое-твердое” в исследуемой системе. В течение некоторого времени температура в ячейке поддерживается на одном уровне (участок CD). После завершения кристаллизации льда температура образца понижается (участок DE) и стремится

осмометры не уделяют достаточно внимания развитию аппаратуры для измерения осмоляльности криобиологических жидкостей, *i. e.* биологических жидкостей, содержащих криопротекторы (CPAs). Специфичностью заморзания водных систем, содержащих CPAs, является склонность к стабильному длительному переохлаждению, что приводит к достаточно сложной инициации их кристаллизации в криоскопическом осмометре.

Целью исследования является разработка прибора для регистрации температуры заморзания и осмоляльности в криобиологических жидкостях; повышение точности криоскопических измерений для анализа систем, отличающихся по температуре заморзания не более чем на 0,01°C.

Для достижения этой цели нами были проанализированы факторы, влияющие на точность измерения температуры заморзания жидкости при помощи криоскопического осмометра, на основании которых разработана измерительная ячейка криоскопического осмометра для исследования криобиологических жидкостей.

Materials and methods

Cryobiological fluids were prepared on the base of additionally purified cryoprotectants: 1,2-propane diol (1,2-PD), glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) of "chemically pure" grade (Reakhim, Russia).

The solution under study was placed into cryoscopic cell of the osmometer, thermosensitive gauge was plunged into the sample, then the well was placed into a coolant with the temperature below the one of ice crystallization in the studied solution.

Fig. 1 shows the dependence of temperature of the studied liquid in cryoscopic cell vs. time. In supercooled samples (point B in Fig. 1) ice crystallization starts (sites BC for pure water and BC1 for aqueous solution of osmotically active substance). During crystallization the hidden heat of phase transition liberates, and the temperature of supercooled sample in the cell increases up to the value of cryoscopic temperature (points C and C1), corresponding to "liquid-solid" phase balance in the investigated system. Within certain time the temperature in the cell is maintained at the same level (site CD). After finishing of ice crystallization the sample temperature decreases (site DE) and approaches to a coolant one. Thus by making measurements on the site CD one can with a high accuracy determine the temperature of "liquid-solid" phase balance for the given system. At the first approximation the temperature corresponding to the point C on a cooling curve is assumed as freezing point.

Measurement of freezing temperature and osmolality of cryobiological liquids is complicated with the need of using the coolants, enabling the achieving of lower temperature to obtain deep supercoolings of the studied fluid. However, the increase in the difference of temperatures between coolant and cryoscopic cell rises the

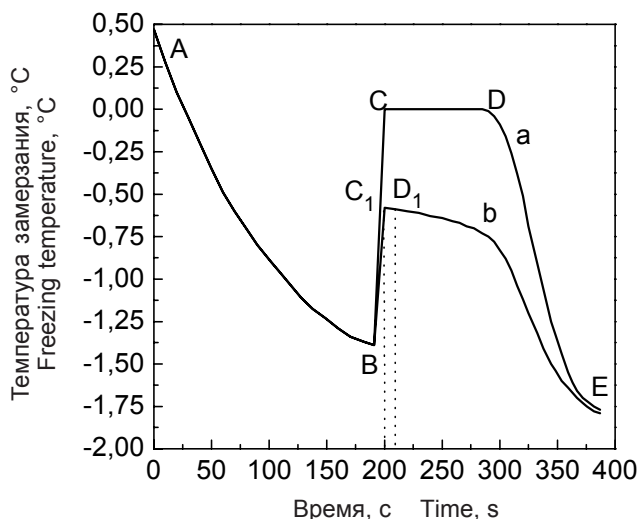


Рис. 1. Типичная кривая охлаждения водных систем: а – чистого растворителя (воды); б – водного раствора осмотически активного вещества (0,9% NaCl).

Fig. 1. Typical curve of cooling aqueous systems: a – pure dissolvent (water); b – solution of osmotically active substances (0.9% NaCl)

к температуре охладителя. Таким образом, проводя измерения на участке CD, можно с высокой точностью определить температуру фазового равновесия “жидкое-твердое” для данной системы. В первом приближении точкой замерзания раствора принято считать температуру, соответствующую точке С на кривой охлаждения.

Измерение температуры замерзания и осмоляемости криобиологических жидкостей усложнено необходимостью использования охладителей, позволяющих достигать более низкой температуры для получения требуемых глубоких переохлаждений исследуемой жидкости. Однако увеличение разности температур между охладителем и криоскопической ячейкой повышает скорость отбора тепла от образца, что уменьшает время его кристаллизации (участок CD).

В данной работе мы проанализировали, каким образом протяженность участка CD влияет на точность измерения температуры замерзания и предложили способ повышения точности измерений в криоскопическом осмометре.

Для изготовления криоскопического осмометра использовали полупроводниковую охлаждающую систему от осмометра ОМКА 1Ц-01 (“Медлабор-техника”, Украина). Криоскопическая ячейка была изготовлена из молибденового стекла С52-1 (ГОСТ 6709-72), калибровка прибора произведена по растворам хлористого натрия марки “ч. д. а” в дистиллированной воде.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием приложения MS Excel пакета программ MS Office 2003.

rate of heat removal from a sample, thereby decreasing the time of its crystallization (site CD).

In this work we analyzed in which way the length of site CD affects the accuracy of freezing temperature measuring and proposed the method of increasing the accuracy of measurements in cryoscopic osmometer.

To make the cryoscopic osmometer there was used semi-conductor cooling system of the ОМКА 1С-01 osmometer (Medlabortekhnika, Ukraine). Cryoscopic cell was made of molybdenum glass С52-1 (All-Union State Standards GOST 6709-72), the device was calibrated on the solutions of sodium chloride of “pure for analysis” grade in distilled water.

The findings were statistically processed using the MS Office 2003 Excel software.

Results and discussion

Taking into account the fact that the sample temperature in cryoscopic cell in the moment of the appearing of crystallization in liquid increases too sharply, the change in temperature of thermosensitive gauge (thermistor) on the site CD of thermogram may be presented as the establishing of heat balance between body rapidly transferred from thermostat with T_1 temperature into the one with T_2 temperature (Fig. 2). Let's believe that heat capacity of the second thermostat is so high that its temperature is not changed when introducing the body studied and heat conductivity of the body itself is much higher than the heat conductivity on its boundary with thermostat. To change the temperature of the body with heat capacity C by the value dT it is necessary to apply the amount of heat to it:

$$dQ = CdT. \quad (1)$$

The heat taken by thermostat within the time dt is described by the expression:

$$dQ = -\lambda(T_2 - T)dt, \quad (2)$$

where λ is heat conductivity on the boundary between body and thermostat; T and T_2 are temperatures of body and thermostat, correspondingly.

Heat dQ in (1) equals dQ in (2) therefore the right parts of these equations may be set equal:

$$CdT = -\lambda(T_2 - T)dt. \quad (3)$$

When integrating the expression (3) we will obtain the change of body temperature with time:

$$T = (T_1 - T_2)e^{-\frac{\lambda t}{C}} + T_2, \quad (4)$$

where T_1 and T_2 are temperatures of body and thermostat in initial moment of time; t is time of body stay in thermostat.

Результаты и обсуждение

Принимая во внимание тот факт, что температура образца в криоскопической ячейке в момент возникновения кристаллизации жидкости повышается очень резко, изменение температуры термочувствительного датчика (термистора) на участке CD термограммы (рис. 2) может быть представлено как установление теплового равновесия между телом, быстро перенесенным из термостата с температурой T_1 в термостат с температурой T_2 . Будем полагать, что теплоемкость второго термостата настолько велика, что его температура не изменяется при внесении исследуемого тела, а теплопроводность самого тела намного выше теплопроводности на его границе с термостатом. Чтобы изменить температуру тела, имеющего теплоемкость C , на величину dT необходимо передать ему количество тепла:

$$dQ = CdT. \quad (1)$$

Тепло, отбираемое термостатом в течение времени dt , описывается выражением:

$$dQ = -\lambda(T_2 - T)dt, \quad (2)$$

где λ – теплопроводность на границе между телом и термостатом; T и T_2 – температура тела и термостата соответственно.

Тепло dQ в (1) равно dQ в (2), поэтому правые части данных выражений можно приравнять:

$$CdT = -\lambda(T_2 - T)dt. \quad (3)$$

Проинтегрировав выражение (3), получим изменение температуры тела от времени:

$$T = (T_1 - T_2)e^{-\frac{\lambda t}{C}} + T_2, \quad (4)$$

где T_1 и T_2 – температуры тела и термостата в начальный момент времени; t – время пребывания тела в термостате.

На рис. 2, а представлена зависимость (4) как модель установления теплового равновесия между измерителем температуры в криоскопической

Рис. 2. Временная зависимость температуры: А – тела, перенесенного из термостата с температурой T_1 в термостат с температурой T_2 ; В – образца в ячейке криоскопического осмометра; T_{cr} – температура кристаллизации образца (криоскопическая температура).

Fig. 2. Time dependence of temperature: А – body transferred from thermostat with temperature T_1 into thermostat with temperature T_2 ; В – sample in well of cryoscopic osmometer; T_{cr} – temperature of crystallization (cryoscopic temperature).

Fig. 2a shows the dependence (4) as the model of setting the heat balance between the temperature measuring device in cryoscopic cell and the studied solution. Fig. 2b demonstrates the fragment of crystallization thermogram (site CD), the point of the start of solution crystallization (point C) is assumed for zero on the time scale, which in the model experiment corresponds to the moment of body transfer from thermostat T_1 into thermostat T_2 . It is obvious that the error of temperature measurement in cell, ΔT (marked with arrows in Fig. 2a) depends on crystallization time of the solution (site CD length). The elongation of site CD to CD' results in the decrease of measurement error down to $\Delta T'$.

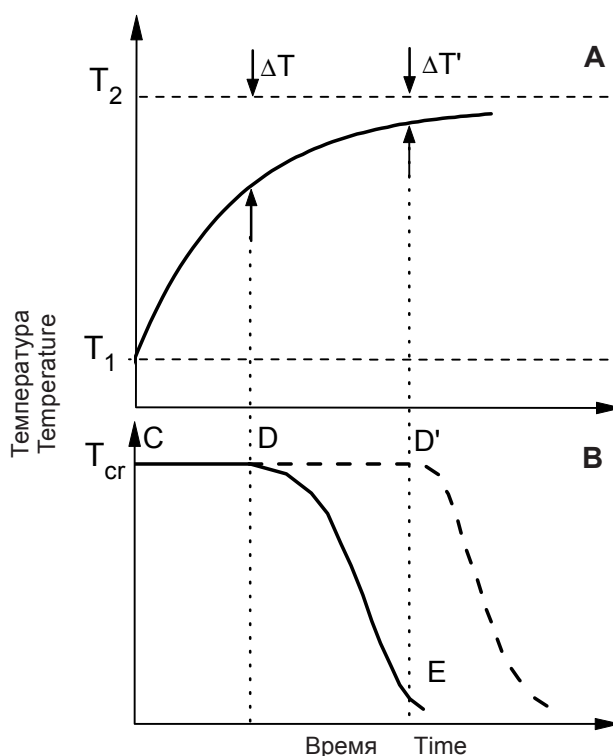
Let's consider how the heat exchange process of cryoscopic cell with coolant affects the crystallization time of the sample (the length of site CD).

Let's emphasize that the sample is at cryoscopic temperature T_{cr} , since at the crystallization moment the sample temperature reaches the value of cryoscopic temperature T_{cr} (Fig. 2b), which does not change within the sample crystallization time.

The heat dQ released at crystallization of the mass element of the sample dm with crystallization heat (melting) L , is described by the expression:

$$dQ = L \cdot dm. \quad (5)$$

The heat is withdrawn from the sample due to the difference of temperatures between the sample (T_{cr}) and coolant (T_c):



ячейке и исследуемым раствором. На рис. 2, б изображен фрагмент термограммы кристаллизации (участок CD), за нуль на шкале времени принята точка начала кристаллизации раствора (точка С), которая в модельном эксперименте соответствует моменту перенесения тела из термостата T_1 в термостат T_2 . Видно, что от времени кристаллизации раствора (протяженности участка CD) зависит погрешность измерения температуры в ячейке ΔT (отмечена стрелками на рис. 2, а). Увеличение протяженности участков CD до CD' приводит к снижению погрешности измерения до $\Delta T'$.

Рассмотрим, каким образом процесс теплообмена криоскопической ячейки с охладителем влияет на время кристаллизации образца (протяженность участка CD).

Примем во внимание, что образец находится при криоскопической температуре T_{cr} , поскольку в момент кристаллизации температура образца достигает значения криоскопической температуры T_{cr} (рис. 2, б), которая не изменяется в течение времени кристаллизации образца.

Тепло dQ , выделившееся при кристаллизации элемента массы образца dm с теплотой кристаллизации (плавления) L , описывается выражением:

$$dQ = L \cdot dm. \quad (5)$$

Тепло отводится от образца за счет разности температур между образцом (T_{cr}) и охладителем (T_c):

$$dQ = -\lambda_i(T_c - T_{cr})d\tau, \quad (6)$$

где λ_i – интегральная теплопроводность на границе образец/охладитель; τ – время выделения скрытой теплоты кристаллизации.

Поскольку тепло dQ в левой части выражений (5) и (6) имеет одинаковое значение, то, приравняв правые части, получим уравнение теплового баланса для образца, погруженного в охладитель [1]:

$$L \cdot dm = -\lambda_i(T_c - T_{cr})dt \quad (7)$$

Проинтегрировав выражение (7), получим время кристаллизации образца массой m :

$$\tau = \frac{L \cdot m}{\lambda(T_{cr} - T_c)}. \quad (8)$$

Данное выражение с некоторым приближением (не учтены теплоемкости образца и ячейки) описывает зависимость длины участка CD на термограмме от теплофизических параметров прибора.

$$dQ = -\lambda_i(T_c - T_{cr})d\tau, \quad (6)$$

where λ_i is integral heat conductivity on the sample/coolant boundary; τ is release time of hidden heat of crystallization.

Since the heat dQ in the left part of the expressions (5) and (6) has an equal values, then when setting equal the right parts we will derive the equation of heat balance for the sample plunged into coolant [1]:

$$L \cdot dm = -\lambda_i(T_c - T_{cr})dt \quad (7)$$

When integrating the expression (7) we obtain the crystallization time of the sample with mass m :

$$\tau = \frac{L \cdot m}{\lambda(T_{cr} - T_c)}. \quad (8)$$

This expression with some approximation (heat capacity of the sample and cells are not taken into account) describes the dependence of the length of site CD in thermogram vs. heat physical parameters of the device.

Crystallization time of the sample increases with the rise of its mass m , reduction of integral heat conductivity λ_i and difference of temperatures between the sample and coolant ($T_{cr} - T_c$). However, when designing the device there are certain restrictions in varying these parameters. When studying biological liquids as a rule the investigator has a small amount of material, which limits possible rise of the sample mass. The reduction of temperature difference ($T_{cr} - T_c$), *i. e.* decrease of the sample supercooling, leads to the reduced probability of crystallization of fluids, requiring deeper supercooling.

So, an actual way for increasing the accuracy of measurements due to the rise in the time of sample crystallization (site CD) is the decrease of integral heat conductivity λ_i .

This idea was fзздшув by us when designing the cell of cryoscopic osmometer. To reduce the heat exchange of the sample with coolant there was created an air gap between them.

After calibration the device was tested in the standard calibrating NaCl solutions with the known values of freezing temperature.

The procedure of the device calibration consisted of two stages: at the first one the temperature dependence of termistor resistance was recorded, with temperature regulating by means of thermostated coolant of osmometer; at the second stage there was examined the relationship between freezing temperature (osmolalty) of calibrating solutions and termistor resistance.

Время кристаллизации образца возрастает при увеличении его массы m , снижении интегральной теплопроводности λ_i и разности температур между образцом и охладителем ($T_{cr} - T_c$). Однако при конструировании прибора существуют определенные ограничения в варьировании данных параметров. При исследовании биологических жидкостей, как правило, исследователь располагает малым количеством материала, это ограничивает возможность увеличения массы образца. Уменьшение разности температур ($T_{cr} - T_c$), т. е. уменьшение переохлаждения образца, приводит к снижению вероятности кристаллизации жидкостей, требующих более глубокого переохлаждения.

Следовательно, реальным путем повышения точности измерений за счет увеличения времени кристаллизации образца (участок CD) является снижение интегральной теплопроводности λ_i .

Данную идею мы использовали при конструировании ячейки криоскопического осмометра. Для уменьшения теплообмена образца с охладителем был создан воздушный зазор между ними.

После калибровки прибор тестировали по стандартным калибровочным растворам NaCl с известными значениями температуры замерзания.

Процедура калибровки прибора состояла из двух этапов: на первом – снимали температурную зависимость сопротивления термистора, регулируя температуру при помощи термостатированного охладителя осмометра; на втором – устанавливали соответствие между температурой замерзания (осмоляльностью) калибровочных растворов и сопротивлением термистора.

Видно, что температурная зависимость сопротивления термистора в диапазоне температур $-10 \dots 10^\circ\text{C}$ достаточно хорошо описывается линейным законом (рис. 3), отклонение от которого не превышает 0,5% от среднего значения сопротивления в данном температурном интервале. На втором этапе выполняли непосредственно калибровку – измеряли осмоляльность стандартных калибровочных растворов NaCl. Полученные результаты испытаний прибора вместе со статистической обработкой представлены в табл. 1.

Проведенное тестирование прибора показало, что понижение температуры замерзания с увеличением концентрации соли имеет линейный характер во всех диапазонах измерений, стандартное отклонение значения осмоляльности от среднего значения составляло не более 1,15 мОсм.

Сопоставляя технические характеристики прибора с характеристиками приборов подобного класса (табл. 2) (см. криоскопические осмометры фирм “Advanced Instruments”, “Precision Systems” (США), “Gonotec”, “Labtek Services” (Германия),

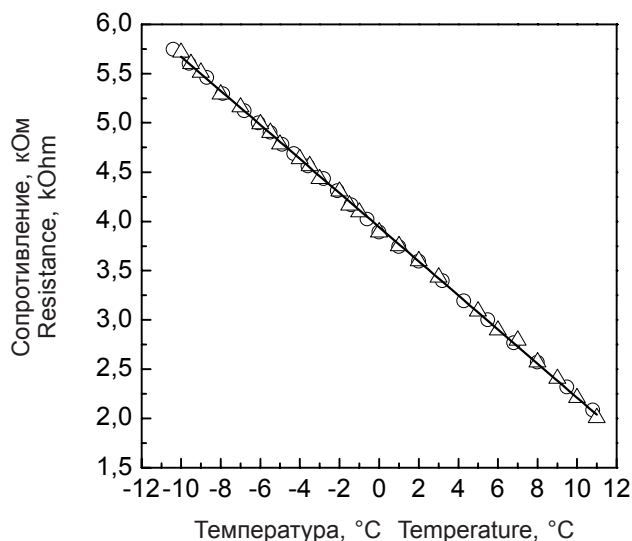


Рис. 3. Сопротивление термистора криоскопического осмометра в тестовом термостате: Δ – охлаждение; \circ – нагревание.

Fig. 3. Resistance of thermistor of cryoscopic osmometer in test thermostat: Δ – cooling; \circ – heating.

It is seen that temperature dependence of thermistor resistance within the temperature range of $-10 \dots 10^\circ\text{C}$ is quite well described with linear law (Fig. 3), the deviation from which does not exceed 0.5% from mean resistance within this temperature range. The second stage comprised the direct calibration: there was measured the osmolality of the standard calibration NaCl solutions. The findings of the device trials together with statistical processing are presented in Table 1.

The device testing has shown that the lowering of freezing temperature with the rise in salt concentration is of linear character within all the ranges of measurements. Standard error of osmolality value vs. the mean made not more than 1.15 mOsm.

When comparing technical parameters of the device with those of similar class (Table 2) (see cryoscopic osmometers of the companies Advanced Instruments, Precision Systems, USA; Gonotec, Labtek Services, Germany; Arkray, Japan *etc.*) one can conclude that it is highly competitive to analogues.

The facilities of the device were assessed on the results of temperature measurements for aqueous solutions of CPAs prepared with physiological solution within the range of low concentrations (Fig. 4).

The figure shows that within the range of low concentrations of aqueous solution the device accuracy enables the reliable recording of linear dependence of freezing temperature of the examined solutions vs. CPAs concentration. This dependence is characteristic for the solutions with low concentrations of the dissolved substance, approaching by their properties the ideal ones [6].

Таблица 1. Значения осмоляльности стандартных калибровочных растворов NaCl, измеренные осмометром с улучшенной криоскопической ячейкой

Table 1. Values of osmolality of standard calibration NaCl solutions, measured by means of osmometer with improved cryoscopic well

Осмоляльность стандартного раствора (ожидаемая), мОсм Osmolality of standard solution (expected), mOsm	Осмоляльность раствора (измеренная), мОсм Osmolality of solution (measured), mOsm				Среднее значение Mean value	Медиана Median	Стандартное отклонение Standard deviation
	1	2	3	4			
100	101	101	99	100	100,25	100,5	0,96
200	200	200	201	200	200,25	200	0,5
276	277	275	277	275	276	276	1,15
300	301	300	300	300	300,25	300	0,5
323	320	322	322	320	321	321	1,15
400	400	401	400	399	400	400	0,82
500	501	500	500	499	500	500	0,82
1000	1008	1007	1008	1006	1007,25	1007,5	0,96
1500	1504	1503	1505	1504	1504	1504	0,82
2000	2002	2000	2000	2001	2000,75	2000,5	0,96
2500	2500	2502	2502	2500	2501	2501	1,15
3000	3002	3004	3002	3004	3003	3003	1,15

“Аркрей” (Япония) и др.), можно сделать вывод, что он не уступает зарубежным аналогам.

Возможности прибора оценивали по результатам измерения температуры замерзания водных растворов криопротекторов, приготовленных на физиологическом растворе в диапазоне низких концентраций (рис. 4).

Из графика видно, что в диапазоне низких концентраций водных растворов точность прибора позволяет надежно регистрировать линейную зависимость температуры замерзания исследуемых растворов от концентрации криопротекторов. Такая зависимость характерна для растворов с низкими концентрациями растворенного вещества, приближающимся по своим свойствам к идеальным [6].

Таким образом, прибор может быть использован для измерения температуры замерзания криобиологических жидкостей и других водных систем, требующих глубокого переохлаждения для возникновения в них кристаллизации водного компонента.

Выводы

Проведен теоретический анализ основных источников погрешностей криоскопического осмо-

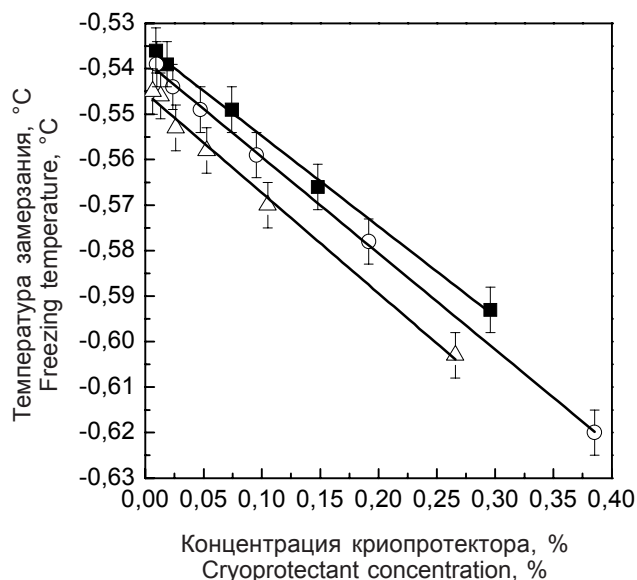


Рис. 4. Температура замерзания растворов криопротекторов, содержащих 0,9% NaCl: ■ – глицерин; ○ – 1,2-пропандиол; △ – ДМСО.

Fig. 4. Freezing temperature of solutions of CPAs containing 0.9% NaCl: ■ – glycerol; ○ – 1,2-propane diol; △ – DMSO.

Таблица 2. Характеристики криоскопического осмометра для исследования криобиологических жидкостей
Table 2. Parameters of cryoscopic osmometer to be used in cryobiological fluids

Характеристика Parameters	Разработанный прибор Designed device	Osmomat 010 (Gonotec)	Advanced Model 3250 Single-Sample Osmometer (Advanced Instruments Inc.)
Объем образца, мкл Sample volume, μl	50 – 120	50	200 – 250
Время измерения, мин Measurement time, min	1 – 5	1	2 – 3
Количество образцов за одно измерение Number of samples per one measuring	1	1	1
Разрешение, мОсм/кг Resolution, mOsm/kg	1	1	1
Воспроизводимость Reproducibility	Стандартное отклонение <0,5% от калибровочного значения Standart deviation < 0.5% from calibration value	Стандартное отклонение <0,5% от калибровочного значения Standart deviation < 0.5% from calibration value	Стандартное отклонение <0,5% от калибровочного значения Standart deviation < 0.5% from calibration value
Линейность Linearity	От 0 до 475 мОсм/кг: ± 2 мОсм/кг; 475 – 3000 мОсм/кг: $\pm 0,5\%$ от прямой линии From 0 to 475 mOsm/kg: ± 2 mOsm/kg; 475 – 3000 mOsm/kg: $\pm 0,5\%$ from linear dependence	–	От 0 до 400 мОсм/кг: ± 2 мОсм/кг; 400 – 4000 мОсм/кг: $\pm 0,5\%$ от прямой линии From 0 to 400 mOsm/kg: ± 2 mOsm/kg; 400 – 4000 mOsm/kg: $\pm 0,5\%$ from linear dependence
Диапазон измерений, мОсм/кг Range of measurements, mOsm/kg	0 – 3000	–	0 – 4000
Дрейф, мОсм/кг в месяц Drift, mOsm/kg per month	1	–	1
Температурные эффекты Temperature effect	< 1 мОсм/кг H_2O на каждые 5°C окружающей среды < 1 mOsm/kg H_2O per each 5°C of environment temperature	–	< 1 мОсм/кг H_2O на каждые 5°C окружающей среды < 1 mOsm/kg H_2O per each 5°C of environment temperature

метра, разработана и изготовлена криоскопическая ячейка для регистрации температуры замерзания и осмоляльности в криобиологических жидкостях, характеризующихся повышенной способностью к переохлаждению. Повышена точность измерения осмоляльности и температуры замерзания жидкостей с низкой концентрацией осмотически активных веществ.

Литература

1. *Лыков А.В.* Теория теплопроводности.– М.: Высш. шк., 1967.– 600 с.
2. *Britta B., Markus F., Birger H.* Freezing point osmometry of milk to determine the additional water content – an issue in general quality control and German food regulation // *Chemistry Central Journal*.– 2008.– Vol. 2, N6.– P. 1–7.
3. *Farris R.L., Stuchell R.N., Mandel I.D.* Tear osmolarity variation in the dry eye // *Trans. Am. Ophth. Soc.*– 1986.– Vol. 84.– P. 250–268.
4. *Farris R.L.* Tear osmolarity – a new gold standard? // *Adv. Exp. Med. Biol.*– 1994.– Vol. 350.– P. 495–503.
5. *Garry E., Pesta M., Zampa N.* Performance characteristics of a new single-sample freezing point depression osmometer [Электронный документ] // [веб-сайт] <http://>

Thus the device may be successfully used to measure freezing temperature of cryobiological fluids and other aqueous systems, requiring a deep supercooling for appearance of crystallization of aqueous component in them.

Conclusions

The main sources of errors of cryoscopic osmometer were theoretically analyzed, there was designed and made a cryoscopic cell to record freezing temperature and osmolality in cryobiological fluids with an increased ability to supercooling. There was increased the accuracy of measurements for osmolality and freezing temperature of liquids with low concentration of osmotically active substances.

References

1. *Lykov A.V.* Theory of heat conductivity.– Moscow: Vysshaya shkola, 1967.– 600 p.
2. *Britta B., Markus F., Birger H.* Freezing point osmometry of milk to determine the additional water content – an issue in

advancedinstruments.silverscapelive.com/documents/file/3320-Brochure-Web.pdf (11.10.2010).

6. *Reif-Acherman S.* The pre-history of cryoscopy: what was done before Raoult? // *Quimica Nova.*– 2009. – Vol. 32, N6.– P. 1677–1684.
7. *Tomlinson A., Khanal S.* Assessment of tear film dynamics: quantification approach // *Ocul. Surf.*– 2005.– Vol. 3, N2.– P. 81–95.

Поступила 02.11.2010
Рецензент Л.Ф. Розанов

general quality control and German food regulation // *Chemistry Central Journal.*– 2008.– Vol. 2, N6.– P. 1–7.

3. *Farris R.L., Stuchell R.N., Mandel I.D.* Tear osmolarity variation in the dry eye // *Trans. Am. Ophth. Soc.*– 1986.– Vol. 84.– P. 250–268.
4. *Farris R.L.* Tear osmolarity – a new gold standard? // *Adv. Exp. Med. Biol.*– 1994.– Vol. 350.– P. 495–503.
5. *Garry E., Pesta M., Zampa N.* Performance characteristics of a new single-sample freezing point depression osmometer [Electronic resource] // [web-site] <http://advancedinstruments.silverscapelive.com/documents/file/3320-Brochure-Web.pdf> (11.10.2010).
6. *Reif-Acherman S.* The pre-history of cryoscopy: what was done before Raoult? // *Quimica Nova.*– 2009. – Vol. 32, N6.– P. 1677–1684.
7. *Tomlinson A., Khanal S.* Assessment of tear film dynamics: quantification approach // *Ocul. Surf.*– 2005.– Vol. 3, N2.– P. 81–95.

Accepted in 02.11.2010