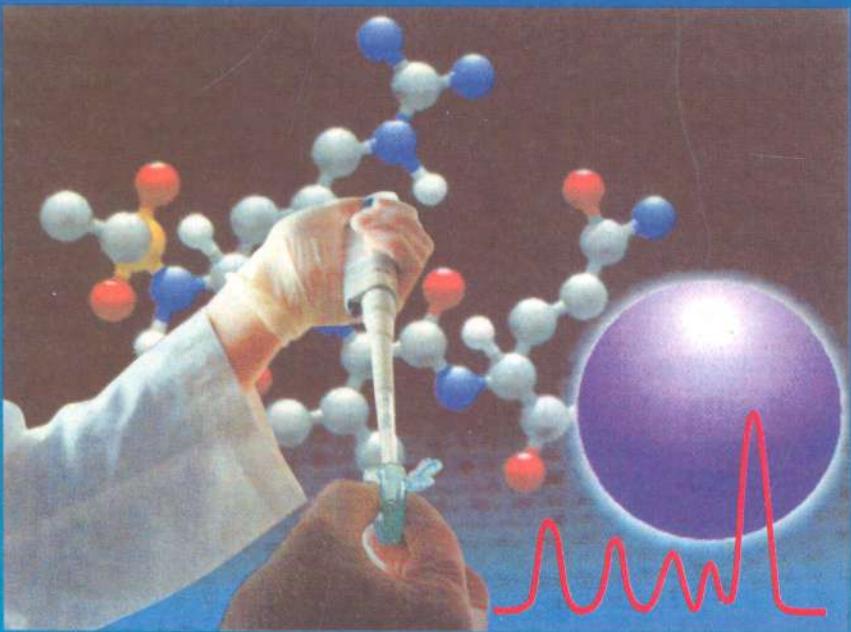


TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
BỘ MÔN HÓA SINH

Thực tập Hóa sinh



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Bộ môn Hoá Sinh

THỰC TẬP

HOÁ SINH

**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2003**

Chủ biên: PGS. TS. Nguyễn Nghiêm Luật

Thư ký biên soạn: PGS. TS. Vũ Thị Phương

Tham gia biên soạn:

PGS. TS. Nguyễn Nghiêm Luật

PGS. TS. Nguyễn Thị Hà

PGS. TS. Hoàng Thị Bích Ngọc

PGS. TS. Vũ Thị Phương

TS. Phạm Thiện Ngọc

TS. Đỗ Thị Thu

ThS. Đặng Ngọc Dung

LỜI NÓI ĐẦU

Sách “*Thực tập Hoá sinh*” do các thày cô giáo Bộ môn Hoá sinh Trường Đại học Y Hà Nội viết đã được Nhà xuất bản Y học xuất bản vào năm 1993 và tái bản vào năm 1995. Lần này, sách được biên soạn lại nhằm mục đích cập nhật những thông tin mới, những thí nghiệm mới phù hợp với những kỹ thuật và máy móc hiện đại mà bộ môn được trang bị hiện nay.

Mục đích của sách “*Thực tập Hoá sinh*” xuất bản lần này chẳng những là để sinh viên nắm bắt được những nguyên tắc cơ bản trong thực hành hoá sinh mà còn để sinh viên có thể thực hiện được những thí nghiệm chứng minh cho các lý thuyết về cấu tạo hoá học và chuyển hoá của các sinh chất và phần nào làm quen với một số xét nghiệm hoá sinh thường được sử dụng trong lâm sàng. Ngoài ra, các tác giả đã bổ sung một số kiến thức chuyên sâu và hiện đại về thực hành hoá sinh để học viên sau đại học cũng có thể sử dụng làm tài liệu tham khảo.

Để phục vụ cho các mục đích trên, nội dung của cuốn sách “*Thực tập Hoá sinh*” gồm hai phần chính:

Phần 1 là phần những nguyên tắc cơ bản về thực hành hoá sinh, gồm 10 chương: An toàn trong phòng thí nghiệm, cách sử dụng và bảo quản dụng cụ, đơn vị và hệ thống đo lường, phương pháp cân, thuốc thử trong phòng thí nghiệm, cách lấy và bảo quản bệnh phẩm, phương pháp quang phổ, điện di, sắc ký và phương pháp kiểm tra chất lượng xét nghiệm.

Phần 2 là phần những thí nghiệm về cấu tạo hoá học và chuyển hoá các chất, gồm 10 chương: Enzym, oxy hoá khử sinh học, cấu tạo hoá học và chuyển hoá glucid, lipid, acid amin và protein, hemoglobin, acid nucleic, sự trao đổi muối - nước, khí máu và sự thăng bằng acid-base.

Ngoài ra, để sinh viên tiện tham khảo giá trị các thông số hoá sinh thường được sử dụng trong thực tế lâm sàng, chúng tôi có giới thiệu thêm *Bảng giá trị các thông số hoá sinh của người Việt Nam bình thường*.

Trong lần xuất bản này, cuốn sách vẫn còn có thể có những sai sót, chúng tôi rất mong nhận được những nhận xét và góp ý của bạn đọc để cuốn sách ngày càng được hoàn chỉnh hơn.

Chúng tôi cũng xin trân trọng cảm ơn DS. Hoàng Trọng Quang và DS. Lê Minh Nguyệt Nhà xuất bản Y học đã tạo điều kiện và đóng góp ý kiến để cuốn sách sớm được giới thiệu với bạn đọc.

Hà Nội, tháng 8 - 2003

Thay mặt các tác giả

PGS. TS. Nguyễn Nghiêm Luật

MỤC LỤC

Phần 1: Những nguyên tắc cơ bản về thực hành hoá sinh	5
Chương 1: An toàn trong phòng thí nghiệm (<i>Nguyễn Nghiêm Luật</i>)	5
Chương 2: Cách sử dụng và bảo quản dụng cụ trong phòng thí nghiệm (<i>Đỗ Thị Thu</i>)	15
Chương 3: Các đơn vị và hệ thống đo lường trong hoá sinh (<i>Vũ Thị Phương</i>)	19
Chương 4: Phương pháp cân (<i>Đỗ Thị Thu</i>)	22
Chương 5: Thuốc thử trong phòng thí nghiệm (<i>Nguyễn Thị Hà</i>)	25
Chương 6: Cách lấy và bảo quản bệnh phẩm (<i>Đặng Thị Ngọc Dung</i>)	50
Chương 7: Phương pháp quang phổ (<i>Nguyễn Nghiêm Luật</i>)	54
Chương 8: Phương pháp điện di (<i>Hoàng Thị Bích Ngọc</i>)	62
Chương 9: Phương pháp sắc ký (<i>Phạm Thiện Ngọc</i>)	70
Chương 10: Kiểm tra chất lượng xét nghiệm (<i>Vũ Thị Phương</i>)	81
Phần 2: Những thí nghiệm về cấu tạo hoá học và chuyển hoá chất	92
Chương 11: Enzym (<i>Nguyễn Nghiêm Luật</i>)	92
Chương 12: Sự oxy hoá khử sinh học (<i>Nguyễn Nghiêm Luật</i>)	109
Chương 13: Cấu tạo hoá học và chuyển hoá carbohydrate (<i>Nguyễn Thị Hà</i>)	113
Chương 14: Cấu tạo hoá học và chuyển hoá lipid (<i>Phạm Thiện Ngọc</i>)	126
Chương 15: Cấu tạo hoá học và chuyển hoá acid amin và protein (<i>Vũ Thị Phương</i>)	137
Chương 16: Cấu tạo và chuyển hoá hemoglobin (<i>Đỗ Thị Thu</i>)	158
Chương 17: Cấu tạo hoá học và chuyển hoá acid nucleic (<i>Phạm Thiện Ngọc</i>)	166
Chương 18: Thăng bằng nước và điện giải (<i>Đặng Ngọc Dung</i>)	170
Chương 19: Khí máu và sự thăng bằng acid – base (<i>Đặng Ngọc Dung</i>)	185
Chương 20: Phương pháp xác định thành phần của nước tiểu bằng máy phân tích nước tiểu tự động (<i>Nguyễn Nghiêm Luật</i>)	195
Bảng: Giá trị các thông số hoá sinh của người bình thường	201
Tài liệu tham khảo	205

Phần 1

NHỮNG NGUYÊN TẮC CƠ BẢN VỀ THỰC HÀNH HÓA SINH

Chương 1

AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

MỤC TIÊU

- Giúp mỗi người làm việc trong phòng thí nghiệm nhận thức được trách nhiệm của mình trong việc tạo nên phòng một thí nghiệm an toàn.
- Giúp mỗi người làm việc trong phòng thí nghiệm hiểu được về an toàn đối với trang thiết bị, hóa chất độc, sinh học, chất phóng xạ và đối với các chất cháy, nổ.
- Từ đó giúp những người làm việc trong phòng thí nghiệm biết cách tổ chức sắp xếp các hóa chất, thiết bị và sử dụng các trang thiết bị cá nhân để phòng và xử lý các sự cố xảy ra.

MỞ ĐẦU

Do tính chất công việc, những người làm việc trong phòng thí nghiệm luôn phải tiếp xúc với các yếu tố có hại như sốc điện, hơi độc, khí nén, chất lỏng dễ cháy, chất phóng xạ, chất ăn mòn, chất độc hay chất nhiễm khuẩn và chấn thương cơ học.

Các sự cố xảy ra trong phòng thí nghiệm thường do hai nguyên nhân sau:

- Môi trường làm việc không an toàn.
- Các nhân viên thao tác, làm việc không đúng quy định về an toàn.

Hiện nay, nhận thức của những người làm việc trong phòng thí nghiệm về an toàn thí nghiệm còn chưa được đầy đủ. Những hiểu biết về an toàn phòng thí nghiệm sẽ giúp những người làm thí nghiệm biết được các yếu tố nguy hại trong phòng thí nghiệm, từ đó có ý thức phòng tránh và biết cách xử lý những sự cố xảy ra, cũng như biết cách tổ chức, quản lý và sắp xếp phòng thí nghiệm bảo đảm an toàn.

1. NHẬN THỨC VỀ AN TOÀN ĐỐI VỚI NHỮNG NGƯỜI LÀM THÍ NGHIỆM

Người phụ trách và người làm thí nghiệm đều phải chịu trách nhiệm về sự an toàn của phòng thí nghiệm. Người phụ trách có trách nhiệm chủ yếu về sự an toàn và phải chia sẻ quyền điều hành hoạt động an toàn cho trưởng labo. Sự quản lý an toàn phòng thí nghiệm được bắt đầu với việc viết bản nội quy an toàn phòng thí nghiệm. Trưởng labo phải quản lý sự hoạt động an toàn tuyệt đối của phòng thí nghiệm.

1.1. Trách nhiệm của người phụ trách

- Thiết lập các phương pháp làm việc và các biện pháp an toàn trong phòng thí nghiệm.
- Giám sát và hướng dẫn những người làm thí nghiệm thực hiện công việc.
- Đưa ra các thông tin về an toàn thí nghiệm, huấn luyện, trang bị bảo hiểm cá nhân và giám sát về mặt y tế đối với các kỹ thuật viên.
- Cung cấp đầy đủ các thiết bị và tạo điều kiện thuận lợi để các kỹ thuật viên thực thi nhiệm vụ.
- Người phụ trách cũng có trách nhiệm bảo đảm an toàn cho bản thân và an toàn cho các cộng sự.
- Sự làm việc hiệu quả, chuẩn xác và an toàn của kỹ thuật viên là yếu tố quyết định để đạt được một nơi làm việc không có sự cố và tai nạn.

1.2.Trách nhiệm của người làm thí nghiệm

- Hiểu biết và tuân theo các phương pháp làm việc trong phòng thí nghiệm đã được thiết lập.
- Có trách nhiệm phục tùng trưởng labo, thân thiện với đồng sự, nghiêm túc và chuẩn xác trong công việc.
- Nhanh chóng thông báo các tình trạng không an toàn cho trưởng labo.
- Cam kết thực hiện công việc một cách an toàn và sử dụng các trang thiết bị bảo vệ các nhân.

2. AN TOÀN VỀ SỬ DỤNG THIẾT BỊ

Các thiết bị phải được chú ý đặc biệt về an toàn khi sử dụng trong phòng thí nghiệm. Người phụ trách phải đề ra các nội quy cho việc sử dụng an toàn các thiết bị, đồng thời yêu cầu người sử dụng phải tuân theo các nội quy để sử dụng một cách an toàn các thiết bị đó.

Tất cả các phòng thí nghiệm phải có các bảng chỉ dẫn nơi có vòi nước cứu hoả, nơi để những dụng cụ chống cháy, các nhân viên phòng thí nghiệm phải tập luyện định kỳ và kiểm tra thao tác chính xác đối với thiết bị cứu hoả.

2.1. Thiết bị bảo quản hóa chất

- Thiết bị an toàn: Dùng để bảo quản và thao tác các chất hoá học và các khí nén.
- Các bình an toàn: Dùng để vận chuyển các acid, kiềm hoặc các dung môi khác là các bình có dung tích 500 mL và các can sử dụng để bảo quản, phân phổi hoặc sắp xếp các chất có khả năng cháy là các can có thể tích lớn hơn 12,7 lít.
- Các buồng an toàn: Sử dụng để bảo quản các chất lỏng dễ cháy.
- Tủ lạnh: Sử dụng để bảo quản các hóa chất dễ cháy.

- Chỉ một số hoá chất cần thiết sử dụng hàng ngày mới được để ngoài thiết bị bảo quản.
- Phải sử dụng các giá đỡ hoặc các bàn kẹp để vận chuyển các bình khí nén và xe đẩy để vận chuyển các thùng lớn.

2.2. Các trang thiết bị bảo vệ cá nhân

Các phần cơ thể hay bị tổn thương khi làm việc trong phòng thí nghiệm là mắt, da, đường hô hấp và tiêu hoá; Vì vậy, việc sử dụng các trang thiết bị bảo vệ cá nhân là rất cần thiết. Các trang thiết bị gồm các vật dụng sau:

- Kính mắt, kính bảo hộ, tấm che mặt hoặc cái tạp dề là những trang thiết bị giúp bảo vệ mắt và mặt người làm thí nghiệm khỏi các chất hoá học bắn ra. Các kính áp tròng không có tác dụng bảo vệ mắt nên không nên đeo khi làm việc ở phòng thí nghiệm. Bất kỳ một dung dịch nào bắn vào mắt đều phải rửa mắt ngay.
- Găng tay và ống tay bằng cao su cần được sử dụng khi thao tác với các hoá chất ăn da. Các găng tay nhựa latex cần được sử dụng hàng ngày trong phòng thí nghiệm, tuy nhiên, các găng tay bằng polyvinyl có thể được sử dụng thay thế đối với những người dị ứng với nhựa latex.
- Các áo choàng trong phòng thí nghiệm (áo choàng labo) phải có đủ độ dài, đủ khuy và được chế tạo từ các vật liệu không thấm chất lỏng.
- Đi ủng đúng tiêu chuẩn; các giày rọ, mũi giày hở hoặc dép sandal đều có thể bị tác hại của chất độc trong phòng thí nghiệm.
- Khẩu trang được sử dụng trong một số quá trình làm việc trong phòng thí nghiệm. Khi sử dụng các chất độc sinh học, hoá học, hoặc các chất độc đặc biệt phải sử dụng khẩu trang đặc chủng phù hợp. Phải sử dụng khẩu trang phòng độc có bộ lọc khí đặc biệt khi làm việc trực tiếp với các bệnh nhân lao hoặc khi thực hiện các thao tác có phơi nhiễm với các hạt khí dung từ hơi thở của bệnh nhân lao. Việc huấn luyện, thực hiện và việc sử dụng các loại khẩu trang cần phải tuân theo các tiêu chuẩn về bảo vệ đường hô hấp.
- Người phụ trách phải cung cấp các áo choàng labo, găng tay hoặc các trang bị bảo vệ khác cho tất cả mọi người làm việc trong phòng thí nghiệm có thể bị phơi nhiễm với các chất độc sinh học hoặc hoá học. Trách nhiệm của người phụ trách là bảo đảm phòng thí nghiệm sạch và duy trì việc sử dụng các trang thiết bị cá nhân của các nhân viên .
- Tất cả các trang thiết bị cá nhân phải được cởi bỏ và sắp xếp ngăn nắp trước khi ra khỏi phòng thí nghiệm.

3. AN TOÀN VỀ SINH HỌC (Tránh nhiễm khuẩn trong phòng thí nghiệm)

Tất cả các mẫu máu và các dịch cơ thể khác được thu lượm, vận chuyển, cầm bằng tay và được sử dụng phải được chú ý một cách chính xác. Các dụng cụ bảo vệ như găng tay, áo choàng, khẩu trang phải được sử dụng nếu hoá chất có thể bắn ra

hoặc rời vãi ra. Khi ly tâm các mẫu sinh học phải đậy nắp ống nghiệm và đậy nắp máy ly tâm để tránh các hạt khí dung mang vi khuẩn lây bệnh phân tán ra không khí xung quanh.

Tất cả các mẫu máu, dịch cơ thể phải được lấy và xử lý hết sức cẩn thận: deo găng tay, mặc áo blu, đeo khẩu trang, đeo kính bảo vệ mắt...v.v

3.1. Vệ sinh cá nhân

- Phải luôn deo găng tay, mặc áo blue trong phòng thí nghiệm. Không mặc áo blu vào phòng ăn, phòng họp, ra đường hoặc về nhà.
- Không ăn, uống, hút thuốc lá trong phòng thí nghiệm.
- Không để bất kỳ thức ăn, đồ uống nào trong tủ lạnh để bệnh phẩm, hoá chất của phòng thí nghiệm.
- Luôn rửa tay bằng xà phòng sau khi làm xét nghiệm.

3.2. Lấy mẫu bệnh phẩm

Các bệnh phẩm thông thường như máu, nước tiểu, dịch chọc dò, dịch não tuỷ của bệnh nhân đều có thể là nguyên nhân truyền bệnh vi khuẩn, virus, vì vậy, những người làm xét nghiệm phải:

- Không sử dụng pipet hút bệnh phẩm trực tiếp bằng miệng. Phải sử dụng pipet có lắp quả b López cao su hoặc pipet tự động.
- Khi có sự cố xảy ra như vỡ ống nghiệm ly tâm, tràn bắn các bệnh phẩm nhiễm khuẩn, mẫu máu ra bàn hoặc phòng thí nghiệm, phải được làm sạch ngay lập tức. Việc làm sạch máy ly tâm phải tuân theo các bước sau:
 - + Mặc áo choàng, đeo các thiết bị bảo vệ thích hợp.
 - + Dùng kẹp gấp các mảnh thuỷ tinh vỡ và các vật nhọn khác.
 - + Thấm các dịch tràn bằng giấy thấm, giấy ăn,... rồi để vào túi nilon riêng.
 - + Làm sạch vị trí bắn với các chất tẩy rửa thích hợp.
 - + Khử trùng vị trí bắn với các dung dịch chất tẩy trùng.
 - + Rửa vị trí nhiễm bẩn bằng nước máy thông thường.
 - + Bỏ tất cả các dụng cụ, vật lây bẩn vào chõi riêng.
 - + Chỉ đóng nắp máy ly tâm khi buồng chứa rotor trong máy đã khô.
- Với các mẫu bệnh phẩm của các bệnh nhân đặc biệt như bệnh nhân bị nhiễm HIV, viêm gan,... có các quy định đặc biệt riêng về thao tác và sử lý.

4. AN TOÀN VỀ SỬ DỤNG HÓA CHẤT.

4.1. Nhận biết các quy ước về nhãn mác

Các dấu hiệu để phân biệt các chất độc hại là điều quan trọng không chỉ để cảnh báo các kỹ thuật viên về các chất độc có hiệu lực mà còn để phân biệt các chất

dặc biệt có thể gây nên tình trạng khẩn cấp như các chất cháy hoặc nổ. Người ta đã quy định các ký hiệu màu sắc ở phía trên của nhãn để dễ phân biệt các loại chất độc hại, để chỉ cần nhìn thoáng qua cũng có thể biết được chất đó thuộc loại chất gì.

Màu xanh da trời là ký hiệu của loại chất có hại cho sức khoẻ: Độc với hô hấp, tiêu hoá, có thể hấp thụ qua da; cần phải bảo quản ở chỗ chắc chắn.

Màu đỏ là ký hiệu của loại chất dễ cháy: Cần phải bảo quản cách xa các chất có thể cháy.

Màu vàng là ký hiệu của loại chất dễ phản ứng và dễ oxy hoá: Có thể phản ứng mạnh với không khí, nước hoặc hoá chất khác, cần bảo quản cách xa các chất dễ cháy hoặc có thể cháy.

Màu trắng là ký hiệu của loại chất ăn mòn: Có thể làm hại cho da, mắt hoặc niêm mạc, phải bảo quản cách xa các loại chất được ký hiệu màu xanh, đỏ và vàng nêu trên.

Màu xám là ký hiệu của các loại hoá chất ít độc: Bảo quản như các chất hoá học thông thường.

4.2. Lưu trữ và sử dụng hoá chất

- Để tránh nhầm lẫn và các sự cố khi sử dụng hoá chất độc hại. Phải có hiểu biết về đặc tính hoá chất sẽ sử dụng. Điều này đặc biệt quan trọng đối với việc vận chuyển, pha chế các hoá chất vì một số có thể tạo ra các chất độc hại, dễ cháy, dễ nổ. Ví dụ:
 - + Acid acetic không pha với acid chromic, acid nitric (HNO_3).
 - + Carbon tetrachlorid không pha với Natri (Na).
 - + Chất lỏng dễ cháy không pha với nước oxy già (H_2O_2), acid nitric (HNO_3).
- Cần sắp xếp, bảo quản hoá chất theo số lượng và đặc tính hoá chất để tránh các sự cố.
- Các hoá chất thường dùng cần sắp xếp riêng.
- Việc sắp xếp không nên chỉ dựa theo vần A, B, C mà còn cần được xếp theo đặc tính của hoá chất. Các loại hoá chất sau cần được sắp xếp riêng rẽ:

+ Chất lỏng dễ cháy	+ Chất rắn dễ cháy
+ Acid vô cơ	+ Acid hữu cơ
+ Chất có thể cháy	+ Chất oxy hoá
+ Acid perchloric	+ Chất phản ứng với nước
+ Chất phản ứng với không khí	
+ Chất phản ứng nhiệt cần phải bảo quản lạnh.	
+ Chất không ổn định (chất dễ nổ).	

4.3. Các chất dễ cháy và các chất có khả năng cháy

Các chất lỏng dễ cháy được sử dụng rất nhiều hàng ngày trong các phòng nghiên cứu hoá sinh là những chất rất nguy hiểm vì chúng dễ cháy hoặc dễ gây nổ. Chúng được xếp loại theo điểm bốc cháy (là nhiệt độ mà ở đó hơi của chúng có khả năng bốc lên để tạo thành một hỗn hợp dễ cháy với không khí).

- Chất lỏng dễ cháy có nhiệt độ bốc cháy < 37,8°C (100°F).
- Chất lỏng có khả năng cháy có điểm bốc cháy ở nhiệt độ ≥ 37,8°C (100°F).

Một số chất lỏng dễ cháy và có khả năng cháy thường được sử dụng là:

Aceton	Isopropanol
Benzen	Methanol
Ethanol	Toluene
Heptan	Xylen

Chú ý các chất dễ cháy còn gồm các loại chất khí và chất rắn như paraffin.

Trước khi mở nút chai chứa các chất dễ cháy cần tránh xa ngọn lửa từ 2-3 m.

Không được đun bình chứa các chất dễ cháy trực tiếp trên ngọn lửa mà phải đun cách thuỷ hoặc đun trên bếp điện kín.

4.4. Các chất ăn mòn.

Bao gồm: Các acid như: Acid acetic, acid sulfuric (H_2SO_4), acid nitric (HNO_3), acid clohydric (HCl), acid tricloacetic (TCA); acid orthophosphoric, acid percloric.

Các kiềm mạnh như: NH_4OH , $NaOH$ và KOH .

- Không được dùng pipet hút trực tiếp bằng miệng các chất ăn mòn (dùng pipet có lắp quả b López cao su, hoặc pipet tự động).
- Việc đổ rót các dung dịch ăn mòn phải thận trọng, từ từ, làm thấp dưới tầm mắt và luôn đeo kính bảo vệ.
- Việc hòa tan các chất ăn mòn ở thể rắn, thể đặc (ví dụ: Hòa $NaOH$ vào nước hoặc hòa loãng các acid đặc) phải hết sức thận trọng vì đây là những phản ứng toả nhiệt, có thể gây bỏng.

Chú ý: khi hòa loãng acid phải *đổ acid vào nước* để lượng acid bao giờ cũng ít hơn nước và phải đổ từ từ. Không được đổ nước vào acid vì điều này sẽ gây toả nhiệt lớn, vỡ bình, bắn acid ra xung quanh và gây nguy hiểm.

Xử lý khi hút phải acid: Dùng $NaHCO_3$ 3% xúc miệng, sau đó xúc miệng bằng nước sạch nhiều lần.

Xử lý khi hút phải kiềm hoặc kiềm dính vào da: Xúc miệng hoặc rửa bằng acid acetic 1%, sau đó xúc miệng hoặc rửa bằng nước nhiều lần.

4.5. Các hoá chất độc

Những hoá chất độc là những chất có thể gây chết người hoặc gây bệnh nếu ăn phải, uống phải, ngửi phải hoặc tiếp xúc trực tiếp qua da, mắt, ... Những chất độc phổ biến trong phòng thí nghiệm là:

Kali cyanur (KCN)	Thiosemicarbazid
$Hg(NO_3)_2$	Chloroform
Natriazid	Methanol, ...
Natri nitroprusiat	

Cần hết sức thận trọng khi thao tác hoặc tiếp xúc với các hoá chất độc.

Phải thực hiện nghiêm chỉnh việc sử dụng các trang thiết bị cá nhân phù hợp khi thao tác với các hoá chất độc.

4.6. Những chất gây ung thư

Trong phòng thí nghiệm, một số hoá chất đã được xác định là những chất gây ung thư. Vì vậy, việc hiểu rõ những hoá chất nào là hoá chất có thể gây ung thư là một điều rất quan trọng (xem bảng sau).

Bảng 1. Những chất gây ung thư và đột biến sử dụng trong các phòng xét nghiệm

Số TT	Các chất hoá học
	• Các chất gây ung thư và đột biến rõ ràng <ul style="list-style-type: none"> 1. Một số chất alkyl hoá (dimethylsulfat, diazomethane, các chất giống ethyl và alkyl). 2. Chất chống chuyển hoá và ức chế (azaserin) 3. Acetamid 4. 4-Aminodiphenyl 5. Orthotoluidin 6. Anisidin, O-dianisidin 7. Benzidin 8. Hợp chất có arsenic, arsenat 9. Dầu croton, các phorbol ester 10. Thionin 11. Một số chất nhuộm hoá mô, đặc biệt là các chất nhuộm DNA như rhodamin, auramin,ponceau 3R, ponceau MX, xanh trypan, ethidium bromid 12. Hydrazin và các dẫn xuất 13. Một số kim loại: Berylli, cadmi, thalli, niken và chì 14. Một số hợp chất của chrom như acid chromic 15. B-naphthylamin 16. B-propiolacton 17. Các dung môi như benzen, 1,4-dioxan, chloroform, carbon tetrachloride, các hydrocarbon halogen hoá khác. 18. Amiang 19. Ethylenoxid 20. Một số kháng sinh: streptozotocin, actinomycin
	• Các chất nghi ngờ gây ung thư: <ul style="list-style-type: none"> 1. Acridin, acriflavin, 2. Các azid 3. Acid cacodylic (hợp chất có arsen) 4. Dinitro fluorobenzen 5. Hydroxylamin 6. Các nitrit 7. Phenol (còn là một chất độc thần kinh) 8. Các chất hoá học sinh phóng xạ : uranyl acetate 9. Một số thuốc trừ sâu : DDT, dieldrin 10. Ozon

5. AN TOÀN VỀ PHÓNG XẠ

Nhiều hoá chất sử dụng trong các phòng thí nghiệm có hoạt tính phóng xạ, ví dụ: Mononucleotid ghi dấu như: methyl-³H-thymidin, uridin - 5- ³H, Acid amin ghi dấu như ¹⁴C-DL-valin, ...

- Khi thao tác với các chất phóng xạ phải đội mũ bảo hiểm, mặc áo choàng, đeo khẩu trang, đeo kính, đeo găng tay cao su và phải hết sức cẩn thận, tránh đánh đổ, rơi vãi.
- Khi thí nghiệm xong, tất cả các hóa chất phóng xạ phải được lưu trữ và có khu vực sử dụng riêng, có dấu hiệu riêng. Các dụng cụ thí nghiệm với chất phóng xạ phải được xử lý và rửa theo một quy trình riêng đảm bảo sạch hoàn toàn chất phóng xạ.
- Thường xuyên kiểm tra việc ô nhiễm phóng xạ và khử phóng xạ theo quy định.
- Số lượng chất phóng xạ nhập, sử dụng và thải phải có sổ kiểm tra chặt chẽ.
- Những người làm nghiên cứu với chất phóng xạ phải được kiểm tra sức khoẻ và thử máu 6 tháng một lần, nếu bảo đảm sức khoẻ mới được tiếp tục làm việc với chất phóng xạ.
- Khi có đồ võ dụng cụ chứa chất phóng xạ, phải lập tức thông báo cho cơ quan chuyên trách xử lý theo quy trình đặc biệt.

6. AN TOÀN VỀ PHÒNG, CHỐNG CHÁY

6.1. Phân loại chất cháy, nổ

Dựa theo tính chất tự nhiên của sự cháy và các thiết bị chữa cháy, người ta chia nguyên liệu cháy thành 4 loại:

- Loại A: Chất liệu rắn thông thường : Giấy, gỗ, nhựa, cao su, vải,...
- Loại B: Chất lỏng và khí dễ cháy như: Xăng, dầu, mỡ, sơn, ...
- Loại C: Các thiết bị điện, động cơ, bộ phận ngắt điện, ...
- Loại D: Kim loại dễ cháy, dễ phản ứng: Magnesi (Mg), Natri (Na), Kali (K)...

6.2. Cách sử trí cháy, nổ

Phải tuỳ theo bản chất cháy mà chữa cho đúng cách, bởi vì nếu dùng sai chất chữa cháy nhiều khi không dập tắt được cháy mà còn nguy hiểm hơn.

- Loại A: Đối với các chất liệu rắn thông thường như: Giấy, gỗ, nhựa, cao su, vải,..., khi các vật liệu này bị cháy có thể dập lửa bằng nước hoặc hoá chất khô.
- Loại B: Đối với các chất lỏng và khí dễ cháy như: Xăng, dầu, mỡ, sơn, ..., khi các vật liệu này bị cháy có thể dập lửa bằng CO₂ hoặc hoá chất khô.
- Loại C: Đối với các thiết bị điện, động cơ, bộ phận ngắt điện, ... : Khi các vật liệu này bị cháy có thể dập lửa bằng CO₂ hoặc hoá chất khô.

- Loại D: Đối với các kim loại dễ cháy như Mg, Na, K, ..., khi các vật liệu này bị cháy có thể dập lửa bằng cách phủ lên kim loại cháy bằng hóa chất dập lửa khô.

6.3. Đối với các thiết bị điện

Phòng thí nghiệm nào cũng sử dụng rất nhiều thiết bị điện, máy móc. Điện giật có thể trực tiếp gây chết người, sốc, bỏng; điện có thể gây cháy, nổ. Vì vậy

- Không đặt các thiết bị điện ở nơi ẩm thấp, ướt át.
- Phải hết sức cẩn thận khi sử dụng các thiết bị có điện thế cao.
- Các thiết bị điện phải có đường dây nối với đất.
- Không bao giờ được vận hành thiết bị điện với bàn tay ướt.
- Phải kiểm tra các dây điện bị sờn, rách. Không làm việc với dây điện bị hở lõi đồng.
- Phải kiểm tra ngay khi thiết bị có tiếng kêu lạ.
- Phải biết chính xác chỗ đặt cầu dao trong phòng thí nghiệm.
- Khi bị điện giật phải lập tức cắt cầu dao điện, cấp cứu người bị giật kịp thời và gửi ngay đến cơ sở cấp cứu gần nhất.

Phòng thí nghiệm phải được thiết kế có đủ các vòi nước chữa cháy sao cho tất cả các vị trí đều có thể có nước cứu hỏa, mỗi phòng thí nghiệm đều phải có bình chữa cháy CO₂.

6.4. Đối với các khí nén

Các khí nén thường được sử dụng trong các phòng thí nghiệm như: O₂, CO₂, N₂, acetylen, propan, butan, ..., để làm thí nghiệm hoặc để đun nấu, có thể gây cháy, nổ, gây ngạt hoặc tổn thương cơ năng. Một số yêu cầu đối với việc sử dụng các khí nén này là:

- Phải biết rõ loại khí ta sẽ sử dụng.
- Các bình khí nén phải được đặt thẳng đứng.
- Các bình khí nén phải luôn được đóng kín.
- Không bao giờ được đặt các chất lỏng dễ cháy và các bình khí nén cùng một chỗ.
- Phải sử dụng bộ phận điều chỉnh (các van) đúng với loại khí được sử dụng.
- Không được tuỳ tiện thử điều chỉnh hoặc đóng, mở khí nén bằng bộ phận điều chỉnh khi không sử dụng khí đó.
- Không được tháo bỏ nắp bảo vệ của bình khí nén khi chưa sử dụng bình khí.
- Không được để đóng băng hoặc gắn chặt van bình khí.
- Phải sử dụng xe đẩy để vận chuyển các bình khí lớn.
- Phải luôn kiểm tra tình trạng an toàn của bình khí và phải định kỳ phải xem có sự rò rỉ khí hay không.

- Phải kiểm tra nhãn mác bình khí để biết về loại khí chứa trong bình.
- Bình hết khí phải được ghi chữ “bình rỗng” trên vỏ bình.

KẾT LUẬN

Để có thể bảo đảm an toàn trong phòng thí nghiệm, người làm thí nghiệm phải thực hiện những điều sau đây:

1. Tạo thói quen làm việc khoa học

- Mặc áo blu, đeo găng tay, đội mũ blu (nữ nên quấn tóc gọn gàng).
- Không ăn, uống, hút thuốc trong phòng thí nghiệm.
- Không bao giờ dùng pipet hút dịch trực tiếp bằng miệng mà phải dùng pipet tự động hoặc quả bóp cao su.
- Rửa tay thường xuyên khi xong thí nghiệm.

2. Giữ gìn ngăn nắp, sạch sẽ nơi làm việc

- Giữ nơi làm việc luôn sạch sẽ, ngăn nắp, không được để bừa bãi các dụng cụ đã sử dụng.
- Các hóa chất để đúng chỗ, dùng xong phải xếp lại gọn gàng ngay.
- Ghi nhãn thuốc thử, hóa chất và dung dịch rõ ràng.
- Ghi nhãn báo hiệu nguy hiểm khi sử dụng các hóa chất độc hại và có khu vực sử dụng riêng.

3. Thực hiện các thao tác kỹ thuật đúng

- Không được vận hành máy khi: Không quen dùng, chưa hiểu biết và chưa được phép dùng.
- Đọc kỹ nhãn hiệu và bản hướng dẫn sử dụng kỹ trước khi sử dụng hóa chất, thiết bị. Phải hiểu rõ đặc điểm, tính năng các loại hóa chất, thiết bị trước khi sử dụng.
- Phải sử dụng các trang thiết bị an toàn cá nhân thích hợp khi làm việc với các hóa chất độc.
- Pha chế, rót, vận chuyển hóa chất phải hết sức cẩn thận
- Hiểu quá trình cấp cứu và biết cách xử lý chuẩn xác khi có sự cố xảy ra.

Chương 2

CÁCH SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN DỤNG CỤ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

MỤC TIÊU

Biết sử dụng và bảo quản những dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm hoá sinh.

NỘI DUNG

Những dụng cụ thường dùng trong phòng thí nghiệm hoá sinh có thể chia thành 2 nhóm dựa theo chất liệu: Những dụng cụ thủy tinh và những dụng cụ bằng plastic hoặc phân theo tính năng sử dụng: Những dụng cụ để đo lường và những dụng cụ không để đo lường.

1. DỤNG CỤ ĐO LƯỜNG

Để hạn chế sai số do những dụng cụ này gây ra khi dùng cần phải lưu ý:

- Những dụng cụ để đo lường phải thật sạch sẽ.
- Sử dụng ở điều kiện nhiệt độ nhất định , thường là ở nhiệt độ phòng (20°C).
- Không được đem dun nóng những dụng cụ này.

1.1. Pipet

Có 2 loại pipet: Pipet thuỷ tinh và pipet tự động.

Pipet thuỷ tinh: Có 2 loại: Pipet định mức và pipet chia độ.

Pipet định mức (pipet có bầu): Trên thân có bầu và có ngấn dùng để lấy những thể tích cần độ chính xác cao. Dung tích của pipet ghi trên bầu, có nhiều loại: 2mL, 5mL, 10mL.

- Loại 1 ngấn: Dung tích của pipet tính từ ngấn đến phía dưới của pipet.
- Loại 2 ngấn: Dung tích của pipet tính từ ngấn trên đến ngấn dưới.

Pipet chia độ: Có nhiều vạch trên thân để chia dung tích trong ống. Loại pipet này dùng để lấy thể tích nhỏ 1/5mL, 1/10mL. Độ chính xác không cao.

Pipet tự động:

Có 2 loại: Pipet cố định và pipet bán cố định.

Pipet cố định: Dung tích của pipet ghi trên thân. Có nhiều loại: 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 500 μ L, 1000 μ L.

Pipet bán cố định: Là loại pipet có thể điều chỉnh thể tích dịch cần lấy theo ý muốn. Trên pipet có ghi dung tích tối thiểu và tối đa. Có nhiều loại pipet bán cố định.

1.2. Buret

Buret thường dùng có dung tích 10mL. Trên thân buret có vạch chia độ tới 1/10mL và có khoá . Buret dùng để chuẩn độ. Khi dùng để tránh sai số về thể tích nên cho chảy với tốc độ chậm. Sau khi dùng xong phải rửa sạch ngay, tráng bằng nước cất, lau khô và bôi mỡ vào khoá để tránh bị kẹt.

1.3. Ống đồng

Ống đồng có nhiều cỡ: 5mL, 10mL, 25mL, 50mL ,100mL, 200mL, dùng để đồng những chất lỏng . Độ chính xác không cao. Thân ống có vạch chia độ. Thân ống đồng càng lớn độ chính xác càng kém.

1.4. Cốc chia độ

Dùng để hòa tan các chất và đồng các dung dịch với dung tích lớn không cần độ chính xác cao.Cốc thường có chân,thân cốc có vạch chia độ. Phần miệng cốc rộng hơn phần đáy cốc. Cốc chia độ có nhiều loại: 100mL, 250mL, 500mL,1000 mL

1.5 Bình định mức

Bình có cổ dài,nhỏ. Trên cổ có ngấn đánh dấu dung tích của bình. Phần đáy hình cầu có ghi dung tích của bình.Bình để pha các dung dịch cần độ chính xác cao và các dung dịch bay hơi. Bình định mức có nhiều cỡ: 10mL, 50mL, 200mL, 500mL, 1000mL.

2. DỤNG CỤ KHÔNG ĐỂ ĐO LƯỜNG

2.1 Dụng cụ bằng thủy tinh

Những bình thuỷ tinh với kích cỡ khác nhau được sản xuất để sử dụng trong phòng thí nghiệm. Những bình này có thể được định cỡ, có thể không. Sự định cỡ chỉ là ước lượng nên không dùng để xác định thể tích chính xác. Những bình này chủ yếu để đựng hoặc chuyển dung dịch từ bình chứa này sang bình khác, gồm các dụng cụ sau:

Cốc có mỏ: Có hình trụ miếng rộng, trên đỉnh có mỏ. Thường dùng để chuyên chất lỏng sang bình khác.

Bình cầu: Đáy bình rộng, cổ hẹp. Loại bình này có dung tích lớn: 1lít, 5lít. Thường dùng để chứa dung dịch.

Bình nón: Có hình thon, cổ hẹp. Thường dùng trong chuẩn độ.

Bộ cát

Bộ chưng cát dùng để cát nước, cát khi thu hồi dung môi đã dùng hoặc để tinh chế dung môi cần độ tinh khiết

Cấu tạo bộ cất: Bộ cất gồm: Một bình cất có ống ngang, một ống sinh hàn, một bình hứng. Các bộ phận này được nối với nhau bằng nút lie tốt.

Bình cất có dung tích 1lít hoặc 5lit. Bình có cổ dài để cất dung môi có độ sôi cao. Bình có 2 cổ để cất dung môi dễ bắn.

Ống sinh hàn: Độ dài ống phụ thuộc dung môi cất. Dung môi có độ sôi thấp như ete, ete dầu hỏa, cồn methylic dùng ống sinh hàn 500- 600 mm. Dung môi có độ sôi cao dùng ống sinh hàn ngắn hơn, khoảng 200 mm.

Phương pháp cất

- Cắt dưới áp suất bình thường: Cắt nước và tinh chế dung môi.
- Cắt phân đoạn dưới áp suất bình thường: Để tách hỗn hợp nhiều dung môi.
- Cắt dưới áp suất giảm: Thường dùng chiết xuất một số chất.
- Cắt phân đoạn dưới áp suất giảm.

2.2. Dụng cụ bằng plastic

Những dụng cụ bằng plastic dùng trong phòng thí nghiệm có ưu điểm so với dụng cụ thuỷ tinh: ít bị vỡ, không đắt và an toàn hơn vì có thể dùng một lần. Nhưng chúng cũng có những nhược điểm như: dễ thấm với khí, dễ bị oxy hoá, bị thay đổi bởi pH và không khử trùng được. Vì vậy khi sử dụng dụng cụ bằng plastic cần chú ý:

- Không sử dụng dụng cụ bằng plastic đối với những chất oxy hoá mạnh
- Những dụng cụ này không để tiếp xúc trực tiếp với lửa hoặc kim loại nóng.

3. BẢO QUẢN DỤNG CỤ THUỶ TINH

3.1. Rửa dụng cụ thuỷ tinh

Những dụng cụ thuỷ tinh sau khi làm xong đều phải rửa sạch ngay. Dung dịch rửa có thể chuẩn bị: 47g natri phosphat (Na_3PO_4), 28g natri oleat. Hoàn thành 500mL với nước cất.

Những dụng cụ bẩn phải ngâm trong dung dịch hỗn hợp: Natri hoặc kali dicromat và acid sulfuric trong 24 giờ. Sau khi ngâm với dung dịch sulfocromic dụng cụ phải rửa sạch với nước thường, tráng bằng nước cất và để khô trên bàn, trên giá hoặc tủ sấy. Chú ý với những dụng cụ đo lường bằng thuỷ tinh phải làm khô bằng không tránh làm biến dạng thuỷ tinh làm thay đổi độ chính xác. Dụng cụ chia độ chính xác cần rửa cẩn thận đảm bảo thật sạch và khô trước khi dùng. Nếu phải dùng dụng cụ thuỷ tinh còn ướt phải tráng từ 2 đến 3 lần bằng dung dịch sẽ dùng.

Riêng dụng cụ thuỷ tinh đựng bạc nitrat (AgNO_3) rửa hoàn toàn bằng nước thường rồi tráng bằng nước cất

Cách pha dung dịch sulfocromic:

Dung dịch đặc gồm: Kali dicromat	50g nghiền nhỏ
Acid sulfuric công nghiệp 500mL	

Gạn lấy dịch rồi thêm vào 1 thể tích acid mới.

- Dung dịch loãng gồm :

Dung dịch Kali dicromat 10% trong nước 1 thể tích

Acid sulfuric công nghiệp 1/2 thể tích

Đổ acid vào dung dịch dicromat rồi lắc đều.

3.2. Mỡ bôi khoá thuỷ tinh

Mỡ bôi khoá buret:

Lanolin

Vaseline

Hai mỡ này lấy lượng bằng nhau. Đun cách thuỷ cho tan hết, trộn đều.

Nếu buret dùng kalipermanganat thì dùng vaselin tinh khiết để bôi.

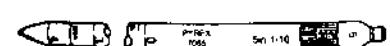
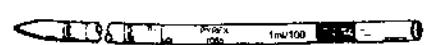
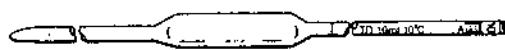
Mỡ bôi khoá chân không:

Farafin

Cao su sống

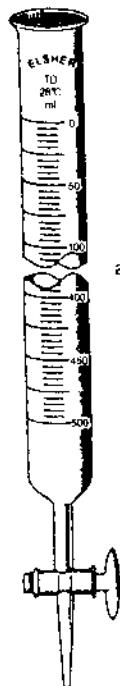
Hai chất này lấy lượng bằng nhau. Đun chảy rồi trộn đều.

MỘT SỐ DỤNG CỤ THƯỜNG DÙNG TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

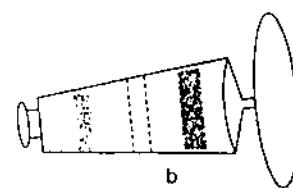


Hình 2.1. Pipet định mức

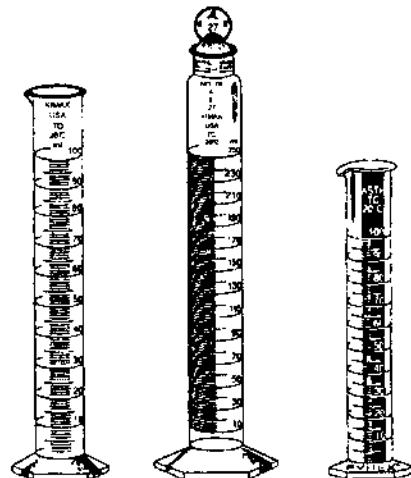
Hình 2.2. Pipet chia độ



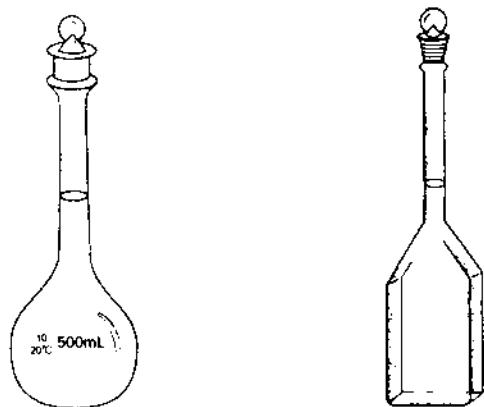
Hình 2.3. a. Buret; b. Khoá Buret



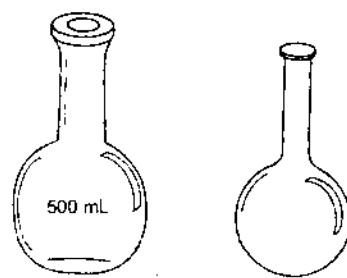
Hình 2.4. Cách sử dụng pipet



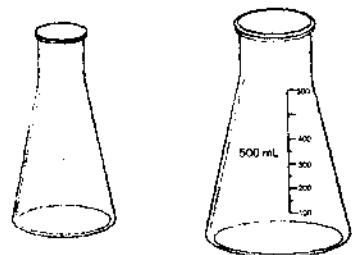
Hình 2.5. Ống đong



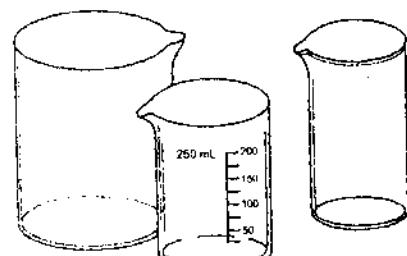
Hình 2.6. Bình định mức



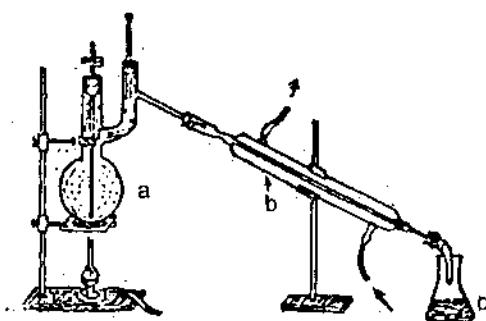
Hình 2.7. Bình cầu



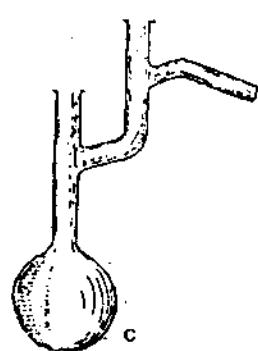
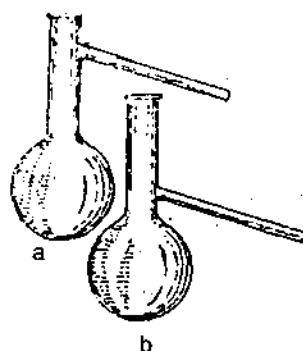
Hình 2.8. Bình nón



Hình 2.9. Cốc có mỏ



Hình 2.10. Bộ cất
a. Bình cất; b. Ống sinh hàn; c. Bình hứng



Hình 2.11. Bình cất
a. Bình cổ ngắn
b. Bình cổ dài
c. Bình 2 cổ

chương 3

CÁC ĐƠN VỊ VÀ HỆ THỐNG ĐO LƯỜNG TRONG HÓA SINH

MỤC TIÊU

1. Sinh viên biết cách đọc đúng tên các loại đơn vị quốc tế sử dụng trong lĩnh vực Hoá sinh.
2. Sinh viên trình bày được cách đổi qua lại giữa các loại đơn vị thường dùng và đơn vị SI.

ĐẠI CƯƠNG

Ngay từ năm 1948, Hội nghị toàn thể về trọng lượng và đo lường Quốc tế đã quyết định định nghĩa các đơn vị dùng cho các lĩnh vực khoa học khác nhau. Đến năm 1960, Danh mục đó gọi là hệ thống đơn vị quốc tế và được gọi tắt là hệ thống SI (Systemes international unites) đã được thiết lập. Hệ thống đơn vị Quốc tế được áp dụng vào trong Y học từ tháng 5 năm 1977 và cho đến nay nhiều nước đã áp dụng trong đó có nước ta.

Hệ thống SI đánh dấu sự phát triển của hệ thống đo lường; có ba loại đơn vị:

- Đơn vị cơ sở (độ dài, khối lượng, thời gian, cường độ dòng điện, nhiệt độ động học, cường độ ánh sáng và lượng chất).
- Đơn vị dẫn xuất (m^2 , m^3 , m/s , mol/L).
- Đơn vị phụ (Radian, Steradian).

Khi sử dụng các đơn vị cơ sở và những đơn vị dẫn xuất biểu thị các thông số sinh học của người, người ta thường dùng những bội số và ước số thập phân của chúng.

1. CÁC ĐƠN VỊ THƯỜNG DÙNG

1.1. Đơn vị khối lượng - Kilogram (Kg) và các bội số

- Kilogram (kg)
- Gam (g) = $0,001\text{ kg} = 10^{-3}\text{ kg}$
- Miligam (mg) = $0,001\text{ g} = 10^{-3}\text{ g}$

- Microgam (μg) = 0,000 001g = 10^{-6} g
- Nanogam (ng) = 0,000 000 001g = 10^{-9} g
- Picrogam (pg) = 0,000 000 000 001g = 10^{-12} g

1.2. Đơn vị lượng chất • mol và các bội số

- Mol
- Milimol (mmol) = 0,001 mol = 10^{-3} mol
- Micromol (μmol) = 0,000 001 mol = 10^{-6} mol
- Nanomol (nmol) = 0,000 000 001mol = 10^{-9} mol
- Picromol (pmol) = 0,000 000 000 001mol = 10^{-12} mol

1.3. Đơn vị thể tích

- Lit (L) = 0,001 m³ = 1dm³
- Decilit (dL) = 0,1L
- Mililit (mL) = 0,001L = 10^{-3} L
- Microlit (μL) = 0,000 001⁻⁶ L

1.4. Đơn vị thời gian

- Giây (s)
- Phút (min) = 60 giây
- Giờ (h) = 60 phút = 3600 giây

1.5. Đơn vị nồng độ

1.5.1. Nồng độ lượng chất:

- Mol /lít (mol/L)
- Milimol / lít (mmol/L)
- Micromol / lít ($\mu\text{mol/L}$)
- Nanomol / lít (nmol/L)
- Picromol/ lít (pmol/L)

1.5.2. Nồng độ khối lượng:

- Gam / lít (g/L)
- Miligam / lít (mg/L)
- Microgam / lít ($\mu\text{g/L}$)
- Nanogam / lít (ng/L)
- Picrogam / lít (pg/L)

1.5.3. Nồng độ dương lượng:

- Equivalan (Eq) = Mol × hoá trị
- Mili Equivalan (mEq) = mmol × hoá trị

1.6. Đơn vị hoạt độ của Enzym

1.6.1. Đơn vị cũ – U:

Một đơn vị hoạt độ của enzym (U) là lượng enzym xúc tác sự biến đổi một micromol cơ chất trong một phút ở những điều kiện xét nghiệm nhất định.

$$1\text{U} = 1\mu\text{mol/phút.}$$

1.6.2. Đơn vị mới - Katal (Kat):

Một đơn vị hoạt độ của enzym (Kat) là lượng enzym xúc tác sự biến đổi một mol cơ chất trong một giây và trong điều kiện xét nghiệm nhất định.

$$1\text{ Kat} = 1\text{mol/giây}$$

$$1\text{ mKat} = 1\text{mmol/giây} = 10^{-3}\text{ Kat}$$

$$1\text{ }\mu\text{Kat} = 1\mu\text{mol/giây} = 10^{-6}\text{ Kat}$$

$$1\text{ nKat} = 1\text{nmol/giây} = 10^{-9}\text{ Kat}$$

2. CHUYỂN ĐỔI GIỮA CÁC ĐƠN VỊ CŨ SANG ĐƠN VỊ SI VÀ NGƯỢC LẠI

2.1. Chuyển đổi từ đơn vị nồng độ lượng chất sang nồng độ khối lượng và ngược lại

$$-\quad \text{g/L} \times \frac{1}{\text{TLPT}} = \text{mol/L} \text{ hoặc } \text{g/L} = \text{mol/L} \times \text{TLPT}$$

$$-\quad \text{mg/L} \times \frac{1}{\text{TLPT}} = \text{mmol/L} \text{ hoặc } \text{mg/L} = \text{mmol/L} \times \text{TLPT}$$

2.2. Chuyển đổi từ đơn vị nồng độ lượng chất sang nồng độ dương lượng và ngược lại

$$1\text{mmol/L} \times \text{hoá trị} = 1\text{mEq/L}$$

$$\text{mEq/L} \times \frac{1}{\text{hoá trị}} = 1\text{mmol/L}$$

2.3. Chuyển đơn vị hoạt độ enzym từ U/l sang Kat/L

$$1\text{U/L} \times 16,67 = 1\text{Kat/L}$$

$$1\text{Kat/L} \times 0,06 = 1\text{U/L.}$$

3. LÝ DO SỬ DỤNG ĐƠN VỊ SI.

- Về pháp lý: Cần thống nhất các loại đơn vị trên toàn thế giới.
- Về khoa học: Biểu thị theo đơn vị mới giúp ta hiểu rõ hơn mối liên quan sinh lý giữa các chất.

Chương 4

PHƯƠNG PHÁP CÂN

MỤC TIÊU

Sinh viên sử dụng được cân dùng trong phòng thí nghiệm một cách chính xác.

NỘI DUNG

Cân được dùng để xác định trọng lượng của vật. Cân là dụng cụ không thể thiếu trong mỗi phòng thí nghiệm. Cân dùng trong phòng thí nghiệm phải là những cân tốt.

1. TIÊU CHUẨN CÂN TỐT VÀ MỘT SỐ LOẠI CÂN THƯỜNG DÙNG

1.1.Tiêu chuẩn cân tốt

Một cân tốt phải có 3 tiêu chuẩn sau:cân đúng,cân tin và cân nhạy

Cân đúng: Khi cân trọng lượng của vật phải đúng bằng trọng lượng của các quả cân đã được thăng bằng.

Cân tin: Khi cân nhiều lần bằng cách đặt vật ở những vị trí khác nhau trên đĩa cân kết quả vẫn không thay đổi.

Cân nhạy: Khi để một lượng chất rất nhỏ lên đĩa cân,cân bị mất thăng bằng

1.2. Một số loại cân thường dùng trong phòng thí nghiệm

Một phòng thí nghiệm thường dùng tối thiểu ba loại cân sau:

Cân đĩa: Dùng để cân những vật có trọng lượng từ 20g đến 10kg.Có thể cân hơn hoặc kém 0,5g.

Cân quang: Cân được vật có trọng từ 0,05g đến 20g. Có thể cân hơn hoặc kém 0,01g.

Cân chính xác: Dùng để cân những trọng lượng từ 1mg đến vài gam. Độ chính xác từ 1/10mg đến 1/100mg. Cân chính xác có nhiều loại:

- Cân dao động tự do còn gọi Cân phân tích
- Cân không dao động
- Cân dây
- Cân ghi tự động
- Cân điện tử

Cân chính xác có độ nhạy 1/10mg là đủ dùng cho phòng thí nghiệm sinh hoá.

2. CẤU TẠO CỦA CÂN

Cân có ba bộ phận chính: Bộ phận dao động,bộ phận cố định,đế cân cùng với những ốc điều chỉnh thăng bằng và lồng kính.

2.1. Bộ phận dao động

Bộ phận dao động gồm: Cán cân ,bộ phận quang treo.

- Cán cân: Trên có những bộ phận như dao cân, kim và những khối kim khí nhỏ để điều chỉnh thăng bằng và độ nhạy.
- Bộ phận quang treo: Hai quang cung như hai đĩa cân đều được đánh dấu bằng chữ hoặc bằng số. Do vị trí của chúng trên cán cân không thể nào xáo lộn được.

2.2. Bộ phận cố định

Gồm: Cột cân, tay cân và những bộ phận hâm

2.3. Đế cân cùng với những ốc điều chỉnh thăng bằng và lồng kính.

Dưới đế cân về phía sau là một chân cố định, về phía trước là 2 ốc để điều chỉnh thăng bằng.Quan sát sự thăng bằng của cân là một quả dọi hoặc một ống thăng bằng dùng bọt khí. Những cân có độ nhạy từ 1/10mg cần có lồng kính để tránh ảnh hưởng của gió, ảnh hưởng của nhiệt độ và đỡ bụi.

3. QUI TẮC SỬ DỤNG CÂN.

Trước khi sử dụng cân phải kiểm tra vài lần độ thăng bằng của điểm o. Khi sử dụng cân phải tuân theo 3 qui tắc sau đây:

- Không bao giờ đặt thêm vào hoặc lấy bớt ra những quả cân,bì,vật để cân dù rất nhỏ khi chưa hâm cân.
- Sau khi đặt thêm hoặc lấy bớt quả cân mới thả cân tự do, rồi quan sát dao động của kim. Kết quả chính xác khi dao động ấy đối xứng với điểm O
- Phải sử dụng cân đúng phương pháp: Đó là phải biết sử dụng quả cân: Đặt vật phải cân lên đĩa cân bên trái, còn đĩa cân bên phải đặt một quả cân mà ta ước lượng nặng hơn vật đem cân. Nếu quả cân đó thật sự nặng hơn vật đem cân thì ta đặt trả vào vị trí trong hộp, rồi thử lại với quả khác bé hơn bên cạnh quả vừa đặt trở về. Tiếp tục như vậy cho đến khi gặp quả cân nhẹ hơn vật cân. Để yên quả cân đó trên đĩa cân rồi đặt bên cạnh một quả cân nhỏ hơn (quả tiếp theo). Nếu quả cân mới thêm nặng quá, thì lại tiếp tục thử với những quả tiếp theo. Còn nếu quả cân mới thêm chưa đủ nặng thì cứ để yên trên đĩa cùng quả thứ nhất. Rồi lại lần lượt thử với những quả cân khác nhỏ hơn. Tiếp tục như thế cho đến khi đạt được thăng bằng.

Cách sử dụng quả cân này phải được áp dụng cho tất cả các loại cân thường và cân chính xác.

4. CÁC PHƯƠNG PHÁP CÂN

Có thể sử dụng những phương pháp cân sau:

4.1. Cân đơn

Đầu tiên kiểm tra vị trí kim gần không. Rồi cân bì. Đạt được thăng bằng thì đặt quả cân đúng bằng trọng lượng cần cân. Thêm dần vật cần cân vào phía bì cho đến khi thăng bằng trở lại.

4.2. Cân kép

Vật định cân được cân 2 lần. Lần đầu đặt lên đĩa bên trái, lần sau đặt lên đĩa cân bên phải. Lấy trung bình cộng kết quả của 2 lần cân .

4.3. Cân điện tử

Thường có bản hướng dẫn sử dụng cân. Có thể tóm tắt một số thao tác chính: Kiểm tra độ thăng bằng của cân. Cân bì. Rồi cho vật cần cân vào bì để cân. Loại cân này thao tác đơn giản, nhanh.

5. BẢO QUẢN CÂN

- Cân phải đặt ở nơi vững chắc, cao ráo, không có ánh sáng chiếu vào. Cân chính xác cần phải đặt ở một nơi cố định.Tốt nhất nên có buồng riêng.
- Khi di chuyển phải nhẹ nhàng, phải tháo quang và đòn cân.
- Không cân quá sức cân. Sức cân là trọng lượng tối đa có thể đặt lên đĩa cân và được ghi trên cán cân.
- Không đổ trực tiếp hóa chất lên đĩa cân
- Đối với cân phân tích phải luôn kiểm tra quả cân.

Chương 5

THUỐC THỦ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

MỤC TIÊU

1. Đánh giá đúng về chất lượng, công dụng của hoá chất dựa trên nội dung của nhãn bao bì hoá chất.
2. Hiểu được các cách biểu thị nồng độ của dung dịch dùng trong phòng thí nghiệm.
3. Pha được các dung dịch chuẩn độ cơ bản và các dung dịch khác có nồng độ cần thiết theo những phương thức hay gấp trong phòng thí nghiệm.

Ngày nay, trong các phòng thí nghiệm tự động hoá cao, dường như việc chuẩn bị các loại thuốc thử do những cán bộ kỹ thuật của phòng thực hiện là ít cần thiết. Hầu hết những vật liệu phục vụ các thí nghiệm được bán bởi các hãng sản xuất và dưới dạng "kit" dùng được ngay. Tuy nhiên, ở những phòng thí nghiệm có liên quan đến việc nghiên cứu khoa học hoặc các phân tích đặc biệt, một số thuốc thử cần phải tự pha chế tại phòng. Bởi vậy, những hiểu biết về hoá chất, dung dịch, dung dịch chuẩn, dung dịch đậm, nước cất... là cần thiết. Chương viết này chủ yếu đề cập đến cách biểu thị nồng độ của dung dịch và cách pha các loại dung dịch chính của phòng thí nghiệm lâm sàng.

1. HOÁ CHẤT VÀ ĐƠN VỊ ĐO LƯỜNG

Các hoá chất tồn tại với khoảng rộng về chất lượng tinh khiết: Loại hoá chất được dụng (analytical reagent grade-AR); loại hoá chất tinh khiết hoá học (chemically pure-CP); loại hoá chất tinh khiết cao (ultrapure); loại hoá chất thuộc Được điển quốc gia... Trên nhãn bì của hoá chất (hoặc thuốc thử) có ghi tỷ lệ% tạp chất và chữ "AR" hay cụm từ "dùng cho xét nghiệm" (for laboratory use). Những loại hoá chất này đảm bảo độ tinh khiết để dùng cho hầu hết các xét nghiệm thông thường của phòng thí nghiệm. Loại hoá chất tinh khiết cao được dùng trong các bước tinh chế những sản phẩm đặc biệt như sắc ký lớp mỏng, hấp thụ nguyên tử, phép đo huỳnh quang, quá trình tiêu chuẩn hoá hoặc những kỹ thuật khác có yêu cầu nghiêm ngặt về độ tinh khiết của hoá chất.

Những nhãn bao bì khác nhằm chỉ ra độ tinh khiết đảm bảo cho các phân tích lâm sàng, bao gồm: Tinh chế (purified), thực hành (practical), kỹ thuật chuyên môn (technical) và thương mại (commercial). Vì không có tiêu chuẩn cho những nhãn trên nên chất lượng của thuốc thử có thể thay đổi từ nơi sản xuất này đến nơi sản xuất khác.

Những mẫu chuẩn được sử dụng trong phòng thí nghiệm lâm sàng thông thường gồm có mẫu chuẩn bậc I (primary standard), mẫu chuẩn bậc II (secondary standard), hoặc mẫu chuẩn tham chiếu (reference standard). Mẫu chuẩn bậc I giành cho các loại thuốc thử hay hoá chất tốt hơn và bằng cách cân hoặc đo lường trực tiếp để pha chế các dung dịch mẫu này với nồng độ được biết chính xác. Mức độ xác thực của mẫu chuẩn bậc I là 99,98% so với đề xuất của Hiệp hội quốc tế về độ tinh khiết và hoá học cho phép (International Union of Pure and Applied Chemistry). Mức độ tinh khiết xác thực này thường cao hơn giới hạn có thể đạt được hay cần thiết giành cho những mẫu chuẩn được sử dụng tại các phòng thí nghiệm lâm sàng. Mẫu chuẩn bậc II là những dung dịch mẫu mà nồng độ xác thực của chúng không thể định lượng bằng cách đo lường chất tan và chỉ xác định được dựa trên kỹ thuật pha chế nó từ dung dịch mẫu chuẩn bậc I theo tính toán. Mẫu chuẩn bậc II đảm bảo sử dụng cho những phân tích lâm sàng và là tiêu chuẩn được dùng phổ biến nhất. Những mẫu chuẩn tham chiếu được phát triển đầu tiên bởi văn phòng quốc gia về các mẫu thử (the National Bureau of standards) và bao gồm những chất khó tinh chế, thí dụ như cholesterol, bilirubin. Những mẫu chuẩn tham chiếu được đưa ra cùng các đặc tính lý, hoá của chúng. Mặc dù những mẫu chuẩn này không đạt được tỷ lệ % tinh khiết đặc biệt như những mẫu chuẩn bậc I, chúng vẫn có thể được sử dụng trong phân tích lâm sàng để xác định nồng độ của các mẫu xét nghiệm hay xác định nồng độ của các mẫu chuẩn bậc II.

Hệ thống đo lường áp dụng trong các phòng thí nghiệm lâm sàng là hệ thống dựa trên hệ phân số thập phân, các đơn vị chuẩn biểu thị về trọng lượng, độ dài, thể tích và thời gian tương ứng là gram, mét, lít và giây.

BẢNG HỆ THỐNG ĐO LƯỜNG

Tiền tố	Ký hiệu	Luỹ thừa của 10	Phân số thập phân
exa	E	10^{18}	1.000.000.000.000.000.000
peta	P	10^{15}	1.000.000.000.000.000
tera	T	10^{12}	1.000.000.000.000
giga	G	10^9	1.000.000.000
mega	M	10^6	1.000.000
kilo	k	10^3	1.000
hecto	h	10^2	100
deka	da	10^1	10
deci	d	10^{-1}	0,1
centi	c	10^{-2}	0,01
milli	m	10^{-3}	0,001
micro	μ	10^{-6}	0,000.001
nano	n	10^{-9}	0,000.000.001
pico	p	10^{-12}	0,000.000.000.001
femto	f	10^{-15}	0,000.000.000.000.001
atto	a	10^{-18}	0,000.000.000.000.000.001

2. DUNG DỊCH VÀ CÁCH BIỂU THỊ NỒNG ĐỘ DUNG DỊCH

Dung dịch có thể được định nghĩa như là một hỗn hợp đồng nhất của hai hay nhiều chất. Chất được gọi là chất tan khi nó được hoà tan trong một dung dịch, khuôn chất lỏng (matrix) dùng để hoà tan chất tan gọi là dung môi.

Nồng độ của một dung dịch là lượng hoá chất (chất tan) có trong một trọng lượng hay một thể tích nhất định của dung dịch và có nhiều cách biểu thị khác nhau. Thông thường, nồng độ của các dung dịch được biểu thị bằng: Nồng độ phần trăm (percent solution), nồng độ phân tử gam/lít (mol/l = molarity), nồng độ phân tử gam/kg dung môi (mol/l = molality), nồng độ đương lượng (normality).

2.1. Dung dịch phần trăm

Các dung dịch này có nồng độ biểu thị bằng phần trăm (%) tức là số lượng chất tan trong 100 đơn vị dung dịch. Ba cách biểu thị dung dịch phần trăm: Trọng lượng/trọng lượng (% w/w), thể tích/thể tích (% v/v) và thông thường nhất là trọng lượng/thể tích (% w/v).

- **Trọng lượng/ thể tích (% w/v)** được dùng là đơn vị đo lường khi chất tan là chất rắn và dung môi ở thể lỏng. Nồng độ % w/v thí dụ như 5% w/v, được hiểu rằng đơn vị đo lường của nồng độ dung dịch là gram/100 ml. Như vậy, dung dịch 5% w/v là tương đương với 5 g chất tan trong 100 ml dung dịch. Khi tính toán dung dịch % w/v người ta muốn xác định có bao nhiêu gram chất tan cần cho 100 ml dung dịch.
- **Trọng lượng/ trọng lượng (% w/w)** là nồng độ phần trăm được tính với trọng lượng của dung dịch và đơn vị đo lường trọng lượng là gram.
- **Thể tích/ thể tích (% v/v)** là nồng độ phần trăm của dung dịch được dùng khi chất tan và dung môi đều là chất lỏng. Đơn vị đo lường đặc trưng là ml chất tan trong 100 ml dung dịch.

2.2. Nồng độ phân tử gam/lít

Là nồng độ của một dung dịch được xác định bằng số phân tử của chất tan trong một lít dung dịch và đơn vị đo lường là mol/L hay M. Một phân tử (mol) chất tan bằng trọng lượng phân tử gam của nó. Biểu thi của hệ thống đơn vị quốc tế (Systeme International - SI -d' Unite's) cho nồng độ phân tử truyền thống là số phân tử chất tan trong thể tích của dung dịch được giới hạn là lít. Biểu thi hệ thống đơn vị quốc tế của nồng độ có thể là mol/L, mmol/L, µmol/L và nmol/L.

2.3. Nồng độ phân tử gam/kg dung môi

Là nồng độ của một dung dịch được xác định bằng số lượng của chất tan trong 1kg dung môi. Nồng độ này đôi khi bị nhầm lẫn với nồng độ phân tử gam/lit, nhưng thực ra việc phân biệt giữa hai cách biểu thị nồng độ dung dịch này cũng dễ dàng bởi vì nồng độ mol/kg luôn luôn được biểu thị bằng trọng lượng/trọng lượng hay phân tử gam/kg và được xác định bằng số phân tử gam (mol)/1000g (1kg) dung môi.

2.4. Nồng độ dương lượng

Được định nghĩa là số dương lượng gam trọng lượng chất tan trong một lít dung dịch (equivalent weight/lít = Eq/L). Một dương lượng gam của một chất tương đương với trọng lượng phân tử của chất chia cho hoá trị của chất đó. Nồng độ dương lượng gọi là nồng độ nguyên chuẩn, ký hiệu là N.

- **Đương lượng của một muối** bằng trọng lượng phân tử của chất chia cho tổng số hoá trị của gốc acid.

Thí dụ:	NaCl	$\text{Cl}^- = 1$,	$\text{Eq} = M$ (trọng lượng phân tử)
	CaCO_3	$\text{CO}_3^{2-} = 2$,	$\text{Eq} = M/2$
	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	$3\text{SO}_4^{2-} = 6$,	$\text{Eq} = M/6$

- **Đương lượng của một acid hay một base** là lượng chất đó ứng với 1 ion H^+ hay OH^- tham gia phản ứng.

Thí dụ:	HCl	$\text{Eq} = M$
	H_2SO_4	$\text{Eq} = M/2$
	H_3PO_4	$\text{Eq} = M/3$
	NaOH	$\text{Eq} = M$
	Ba(OH)_2	$\text{Eq} = M/2$

- **Đương lượng của một chất oxy hoá khử** là lượng chất đó tương ứng với sự trao đổi 1 điện tử trong phản ứng.

Thí dụ: Phản ứng oxy hoá kali iodua bằng sắt (III) sulfat



Vậy $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ có $\text{Eq} = M/2$

2.5. Mili dương lượng

Trong những xét nghiệm hoá sinh, khi định lượng các chất điện giải (đặc biệt đối với các chất điện giải trong huyết tương), người ta biểu thị kết quả bằng nồng độ ion (cation và anion) nhằm thiết lập ion đồ (iono - gramme). Bởi vậy, người ta không biểu thị lượng các chất điện giải bằng g/L và cách biểu thị này không đề cập tới hoá trị khác nhau của mỗi ion, không có ý nghĩa thực tế. Những ion chính có trong máu là K^+ , Na^+ , Cl^- , CO_3^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} . Nồng độ của những ion này được biểu thị bằng mili dương lượng (mEq) dựa vào hoá trị của các ion.

Trọng lượng mili dương lượng của mỗi ion được tính như sau:

$$1 \text{ mEq} = \frac{\text{nguyên tử lượng của ion}}{\text{hoá trị của ion}} = \frac{\text{NTL}}{\text{HT}}$$

$$1 \text{ mEq Na}^+ = \frac{23}{1} \text{ mg} = 23 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq K}^+ = \frac{39}{1} \text{ mg} = 39 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Ca}^{2+} = \frac{40}{2} \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Mg}^{2+} = \frac{24,4}{2} \text{ mg} = 12.2 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Cl}^- = \frac{35,5}{1} \text{ mg} = 35.5 \text{ mg}$$

Nồng độ của ion trong dung dịch tính ra mili dương lượng (mEq) bằng cách chia nồng độ của ion đó biểu thị bằng mg trong 1lít dung dịch cho trọng lượng mili dương lượng của ion:

$$\text{Nồng độ (mEq)} = \frac{\text{nồng độ mg/L}}{\frac{\text{HT}}{\text{NTL}}} = \text{nồng độ mg/L} \times \frac{\text{HT}}{\text{NTL}}$$

Tác dụng thực tế của sự biểu thị nồng độ ion bằng mEq có thể nhận thấy ở 2 thí dụ sau:

a) Huyết tương có hàm lượng ion Na^+ là 3260 mg và hàm lượng ion Cl^- là 3656 mg

Biểu thị ra mili dương lượng, ta có:

$$[\text{Na}^+] = \frac{3260}{23} = 142 \text{ mEq}$$

$$[\text{Cl}^-] = \frac{3656}{35,5} = 103 \text{ mEq}$$

Như vậy, nồng độ của ion Na^+ và ion Cl^- trong huyết tương không cùng nồng độ ion, lượng ion Na^+ thừa (142-103) là 39 mEq sẽ kết hợp với anion khác và chủ yếu dưới dạng natri hydrocarbonat.

b) Nước tiểu chứa 6900 mg Na^+ và 10.650 mg Cl^-

Biểu thị theo mEq, ta có:

$$[\text{Na}^+] \text{ nước tiểu} = \frac{6900}{23} = 300 \text{ mEq}$$

$$[\text{Cl}^-] \text{ nước tiểu} = \frac{10650}{35,5} = 300 \text{ mEq}$$

Như vậy, trong nước tiểu các ion Na^+ đều kết hợp với ion Cl^- và sự bài xuất của 2 ion này có cùng một nồng độ ion (isoionic).

3. CÁCH PHA DUNG DỊCH PHẦN TRĂM

Các dung dịch phần trăm được pha gần đúng bằng cách cân hoặc đong một lượng chất cần thiết để hoà với một trọng lượng hay một thể tích dung dịch.

3.1. Pha 300 g dung dịch NaCl 20% w/w như thế nào?

- Trọng lượng chất tan NaCl cần thiết là:

$$\text{g NaCl} = \frac{20 \text{ g NaCl}}{100 \text{ g}} \times 300 \text{ g dung dịch cần có}$$

$$= 60 \text{ g NaCl}$$

- Trọng lượng của dung môi hoà tan (nước cất) là:

$$300 \text{ g dung dịch cần có}$$

$$\frac{60 \text{ g NaCl}}{240 \text{ g dung môi } (\text{H}_2\text{O})}$$

Hoà tan 60 g NaCl với 240 g H_2O

3.2. Cân bao nhiêu g của glucose để pha 100 ml dung dịch 10% w/v?

- Áp dụng công thức sau:

$$\text{g} = \frac{\text{X g}}{100 \text{ ml}} \times \text{X ml dung dịch cần pha}$$

- Lượng glucose cần thiết là:

$$\text{g} = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml dung dịch cần pha}$$

$$= 10 \text{ g glucose}$$

Cho 10 g glucose vào bình định mức 100 ml, thêm nước cất cho đến khi đạt thể tích toàn phần của dung dịch hòa tan là 100 ml.

3.3. Cân bao nhiêu ethanol để pha được 150 ml dung dịch 15% v/v?

$$\text{mL} = \frac{15 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \text{ ethanol} \times 150 \text{ mL} \text{ dung dịch cần pha}$$

$$= 22,5 \text{ mL ethanol}$$

Trộn 22,5 ml ethanol với 127,5 ml nước cất

3.4. Cân bao nhiêu muối natri carbonat (Na_2CO_3) khan để pha 1500 ml dung dịch Na_2CO_3 5% có tỷ trọng 1.050?

- 1500 mL dung dịch Na_2CO_3 5% có trọng lượng:

$$1500 \times 1.050 = 1575 \text{ g}$$

- Trọng lượng muối Na_2CO_3 cần để pha dung dịch:

$$\frac{100 - 5}{1575 - x} \rightarrow x = \frac{5 \times 1575}{100} = 78,57 \text{ g natri carbonat}$$

3.5. Cân bao nhiêu muối $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ để pha 2000 ml dung dịch Na_2CO_3 5% có tỷ trọng 1.050?

- 2000 mL dung dịch Na_2CO_3 5% có trọng lượng:

$$2000 \times 1.050 = 2100 \text{ g}$$

- Trọng lượng muối Na_2CO_3 khan cần để pha dung dịch:

$$\frac{100 - 5}{2100 - x} \rightarrow x = \frac{5 \times 2100}{100} = 105 \text{ g } \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ khan}$$

- Trọng lượng muối $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ cần để pha dung dịch (phân tử lượng của Na_2CO_3 khan = 106, phân tử lượng của $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ = 286):

$$\frac{106 - 5}{286 - x} \rightarrow x = \frac{106 \times 286}{106} = 280 \text{ g } \text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$$

3.6. Với 300 g muối NaCl pha được bao nhiêu dung dịch NaCl 10% có tỷ trọng 1.071?

Gọi x là thể tích của dung dịch NaCl 10% pha được.

Ta có: $1.071 \times x = 1.071 x \text{ g}$ trọng lượng dung dịch NaCl 10%

$$\frac{100 - 10}{1.071x - 300} \rightarrow x = \frac{100 \times 300}{10 \times 1.071} = 2861 \text{ mL}$$

3.7. Với 60 g muối $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (phân tử lượng ≈ 286) pha được bao nhiêu dung dịch Na_2CO_3 4% có tỷ trọng 1.040?

- Gọi x' là trọng lượng Na_2CO_3 khan (phân tử lượng = 106) tương ứng với 60 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

$$\frac{286 - 106}{60 - x'} \rightarrow x' = \frac{106 \times 60}{286} = 23 \text{ g } \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ khan}$$

- Gọi x là thể tích dung dịch Na_2CO_3 4% pha được:

$$\frac{100 - 4}{1.040x - 23} \rightarrow x = \frac{100 \times 23}{4 \times 1.040} = 540 \text{ mL}$$

3.8. Cần bao nhiêu HCl được dung để pha 2000 ml dung dịch HCl 10% có tỷ trọng 1.047?

- Trọng lượng của thể tích dung dịch HCl 10% cần pha:

$$2000 \times 1.047 = 2094 \text{ g}$$

- Trọng lượng HCl nguyên chất cần để pha dung dịch HCl 10%

$$\frac{100 - 10}{2094 - x} \rightarrow x = \frac{10 \times 2094}{100} = 209,4 \text{ g HCl nguyên chất}$$

- Số lượng HCl được dung cần:

HCl được dung là dung dịch HCl 34% có tỷ trọng 1.169

$$\frac{100 - 34}{x - 209,4} \rightarrow x = \frac{100 \times 209,4}{34} = 616 \text{ g dung dịch HCl 34\%}$$

$$\frac{616}{1.169} = 527,8 \text{ mL dung dịch HCl 34\% có tỷ trọng 1.169}$$

3.9. Với 120 mL dung dịch H_2SO_4 60% có tỷ trọng 1.498, pha được bao nhiêu dung dịch H_2SO_4 5% có tỷ trọng 1.032?

- Trọng lượng của dung dịch H_2SO_4 60%:

$$120 \times 1.498 = 179,76 \text{ g}$$

- Số g H₂SO₄ nguyên chất có trong dung dịch H₂SO₄ 60%:

$$\frac{100 - 60}{179,76 - x} \rightarrow x = \frac{60 \times 179,76}{100} = 107,8 \text{g H}_2\text{SO}_4 \text{ nguyên chất}$$

- Gọi x là thể tích dung dịch H₂SO₄ 5% có tỷ trọng 1.032 pha được.

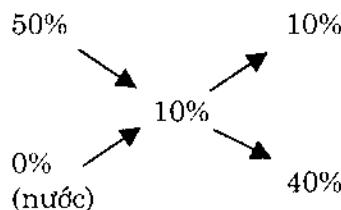
Trọng lượng của dung dịch H₂SO₄ 5% pha được:

$$1.032 \times x = 1.032 x$$

$$\frac{100 - 5}{1.032x - 107,8} \rightarrow x = \frac{100 \times 107,8}{5 \times 1.032} = 2089 \text{ mL}$$

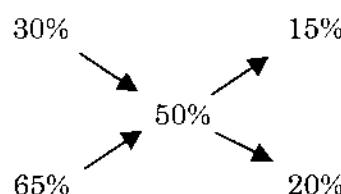
Vậy: Thể tích của dung dịch H₂SO₄ 5% có tỷ trọng 1.032 pha được là 2089 ml.

3.10. Với dung dịch NaOH 50% có tỷ trọng 1.530 pha như thế nào để có dung dịch 10%?



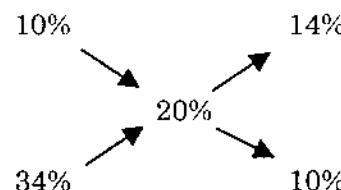
$$\text{Vậy: } \frac{10}{1.530} = 6,5 \text{ mL dung dịch NaOH 50% cần 40 mL nước.}$$

3.11. Với dung dịch NaOH 30% có tỷ trọng 1.333 và NaOH khô (65%) pha thành dung dịch NaOH 50% như thế nào?



$$\text{Vậy: } \frac{15}{1.333} = 11,2 \text{ mL dung dịch NaOH 30% thêm 20g NaOH khô.}$$

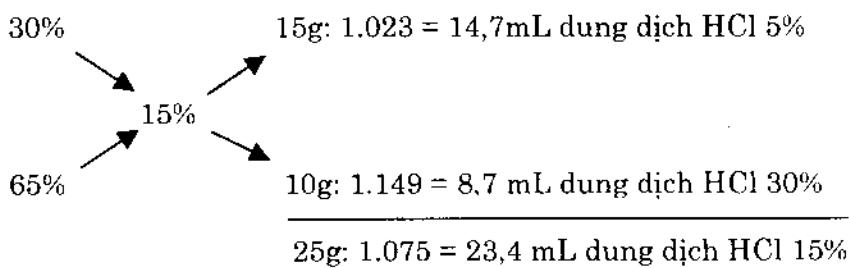
3.12. Với dung dịch HCl 10% có tỷ trọng 1.047 và dung dịch HCl 34% có tỷ trọng 1.169 pha như thế nào để có dung dịch HCl 20%?



Vậy:

$$\frac{14}{1,047} = 3,4 \text{ mL dung dịch HCl 10\% thêm } \frac{10}{1,169} = 8,5 \text{ mL dung dịch HCl 34\%.}$$

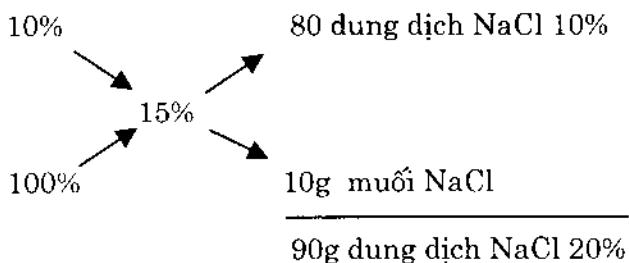
3.13. Với dung dịch HCl 5% tỷ trọng 1.023 và dung dịch HCl 30% tỷ trọng 1.149 pha như thế nào để có 2000 mL dung dịch HCl 15% có tỷ trọng 1.075?



$$\frac{23,4 - 14,7}{200 - x_1} \rightarrow x_1 = \frac{14,7 \times 200}{23,4} = 1256 \text{ mL dung dịch HCl 5\%}$$

$$\frac{23,4 - 8,7}{200 - x_2} \rightarrow x_2 = \frac{8,7 \times 200}{23,4} = 744 \text{ mL dung dịch HCl 30\%}$$

3.14. Với dung dịch NaCl 10% và muối NaCl pha như thế nào để có 1000 mL dung dịch NaCl 20% có tỷ trọng 1.148?



1000 mL dung dịch NaCl 20% cần pha có trọng lượng:

$$1000 \times 1.148 = 1148 \text{ g dung dịch NaCl 20\%}$$

$$\frac{90 - 80}{1148 - x} \rightarrow x = \frac{80 \times 1148}{90} = 1020 \text{ mL dung dịch HCl 10\%}$$

$$1148 - 1020 = 128 \text{ g muối NaCl}$$

4. CÁCH CHUYỂN ĐỔI DUNG DỊCH PHẦN TRĂM SANG DUNG DỊCH CÓ NỒNG ĐỘ PHÂN TỬ GAM HAY NỒNG ĐỘ ĐƯƠNG LƯỢNG

4.1. Tính nồng độ phân tử gam/L của dung dịch NaCl chứa 87 g NaCl trong 1L dung dịch

$$\begin{aligned}\frac{\text{Số mol}}{\text{L}} &= \frac{87\text{g}}{\text{L}} \times \frac{1\text{mol}}{58,5\text{g}} \\ &= \frac{1,49 \text{ mol}}{\text{L}} = 1,49 \text{ mol/L} \text{ hay } 1,49 \text{ M}\end{aligned}$$

4.2. Có bao nhiêu g NaOH trong 500 mL dung dịch NaOH 4M

$$\begin{aligned}g &= \frac{4 \text{ mol}}{\text{L}} \times \frac{40\text{g}}{1 \text{ mol}} \times 500 \text{ mL} \times \frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 80\text{g NaOH}\end{aligned}$$

4.3. Có bao nhiêu mmol HCl trong dung dịch HCl 0,35% (w/v)?

Dung dịch HCl 0,35% w/v có nghĩa 1L dung dịch có 3,5 g HCl

$$\begin{aligned}\frac{\text{mmol}}{\text{L}} &= \frac{3,5\text{g}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol}}{36,5\text{g}} \times \frac{1000 \text{ mol}}{1 \text{ mol}} \\ &= 95,9 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}\end{aligned}$$

Dung dịch HCl 0,35% w/v hay dung dịch HCl 95,9 mM

4.4. Có bao nhiêu phân tử gam NaCl trong dung dịch NaCl chứa 127 g NaCl trong 1000 g nước cất (phân tử lượng NaCl = 58,5)

$$\begin{aligned}\frac{\text{Số mol}}{1000\text{g}} &= \frac{127\text{g}}{1000\text{g}} \times \frac{1\text{mol}}{58,5\text{g NaCl}} \\ &= \frac{2,17 \text{ mol}}{1000\text{g H}_2\text{O}}\end{aligned}$$

4.5. Tính nồng độ đương lượng của dung dịch có chứa 150 g NaCl trong 1 lit (phân tử lượng NaCl = 58,5)

$$\begin{aligned}\frac{\text{eq}}{\text{L}} &= \frac{150\text{g}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{eq}}{1\text{mol}} \times \frac{1\text{mol}}{58,5\text{g}} \\ &= 2,56 \frac{\text{eq}}{\text{L}} = 2,56 \text{ N}\end{aligned}$$

4.6. Tính nồng độ dương lượng của dung dịch chứa 75 g Ba(OH)₂ trong 850 mL nước cất (phân tử lượng Ba(OH)₂ = 171)

$$\begin{aligned}\frac{\text{eq}}{\text{L}} &= \frac{75\text{g}}{850 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{mol}}{171\text{g}} \times \frac{2 \text{ eq}}{1\text{mol}} \\ &= 1,03 \frac{\text{eq}}{\text{L}} = 1,03 \text{ N}\end{aligned}$$

4.7. Tính nồng độ mili dương lượng của dung dịch chứa 25 g BaCl₂ trong 2 lít (phân tử lượng BaCl₂ = 208)

$$\begin{aligned}\frac{\text{mEq}}{\text{L}} &= \frac{25\text{g}}{2\text{L}} \times \frac{1\text{mol}}{208\text{g}} \times \frac{2 \text{ eq}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mEq}}{1 \text{ eq}} \\ &= 120 \text{ mEq/L}\end{aligned}$$

4.8. Tính nồng độ dương lượng của dung dịch 5M H₂SO₄

$$\begin{aligned}\frac{\text{eq}}{\text{L}} &= \frac{5 \text{ mol}}{1\text{L}} \times \frac{2 \text{ eq}}{1\text{L}} \\ &= 10 \frac{\text{eq}}{\text{L}} = 10 \text{ N}\end{aligned}$$

4.9. Tính nồng độ phân tử gam của dung dịch 12N H₃PO₄

$$\begin{aligned}\frac{\text{Số mol}}{\text{L}} &= \frac{1\text{mol}}{3 \text{ eq}} \times \frac{12 \text{ eq}}{1\text{L}} \\ &= 4 \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 4 \text{ M}\end{aligned}$$

4.10. Tính nồng độ % w/v của dung dịch 0,4M NaOH (phân tử lượng của NaOH = 40)

$$\begin{aligned}\frac{\text{g}}{100 \text{ mL}} &= \frac{0,4\text{mol}}{1\text{L}} \times \frac{40\text{g}}{1\text{mol}} \times \frac{0,1 \text{ L}}{100 \text{ mL}} \\ &= \frac{1,6\text{g}}{100\text{mL}} = 16\% \text{ w/v}\end{aligned}$$

4.11. Tính nồng độ phân tử gam của dung dịch HCl 38% có tỷ trọng 1,19

$$\begin{aligned}\frac{\text{mol}}{\text{L}} &= \frac{1\text{mol}}{36,5\text{g}} \times \frac{0,38 \text{ g} \times 1,19}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1\text{L}} \\ &= 12,3 \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 12,3 \text{ M}\end{aligned}$$

4.12. Chuyển dung dịch glucose 90 mg/dL thành dung dịch glucose có nồng độ mmol/L (phân tử lượng của glucose = 180)

$$\frac{\text{mmol}}{\text{L}} = \frac{90\text{mg}}{\text{dL}} \times \frac{10 \text{ dL}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{mol}}{180\text{g}} \times \frac{1\text{g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mmol}}{1\text{mol}}$$
$$= 5 \text{ mmol/L}$$

4.13. Chuyển dung dịch albumin 4,5 g/dL thành dung dịch albumin có nồng độ $\mu\text{mol/L}$ (phân tử lượng của albumin = 65.000)

$$\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} = \frac{4,5\text{g}}{100 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{\text{L}} \times \frac{1\text{mol}}{65.000\text{g}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1\text{mol}}$$
$$= 692 \mu\text{mol/L}$$

5. MỘT SỐ DUNG DỊCH CHUẨN ĐỘ

Những điểm cần chú ý:

- Khi hai dung dịch tác dụng với nhau, dung dịch thứ nhất N_1 lên nguyên chuẩn và dung dịch thứ hai N_2 lần nguyên chuẩn, ta có hệ thức:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

V_1 và V_2 là những thể tích tương ứng với các dung dịch có nồng độ nguyên chuẩn là N_1 và N_2 .

- Một dung dịch nguyên chuẩn chứa lượng P được tính theo công thức:

$$P = \frac{M}{n} \times \frac{V}{1000}$$

M = Phân tử lượng

n = Hệ số chuẩn độ

$n = 1$ với HCl, NaOH

$n = 2$ với H_2SO_4 ...

V = Thể tích của dung dịch

Dung dịch có N lần nguyên chuẩn, ta có:

$$P = \frac{M}{n} \times N \times \frac{V}{1000}$$

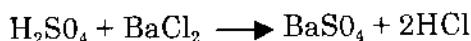
DUNG DỊCH ACID SULFURIC NGUYÊN CHUẨN (49 g H_2SO_4 trong 1 lít)

Đong vào một ống đồng chia độ 33 mL acid sulfuric nguyên chất có tỷ trọng 1.83, đổ từng ít một lượng acid trên vào 500 mL nước cất đựng trong bình cầu. Lắc đều, làm lạnh bình cầu bằng một vòi nước lạnh. Khi dung dịch đã nguội, đổ dung dịch sang bình định mức 1000 mL, thêm nước cất để tráng bình cầu và nước cất vào

bình tới ngán 1000 mL. Đậy nút, lắc đều. Kiểm tra độ chuẩn của dung dịch H_2SO_4 vừa pha bằng các phương pháp sau:

1. Phương pháp cân

Nguyên tắc: Cho $BaCl_2$ tác dụng với H_2SO_4 , ion SO_4^{2-} tủa dưới dạng $BaSO_4$ theo phương trình:



Thuốc thử:

Dung dịch $BaSO_4$ 10%

Acid HCl 10%

Dung dịch $AgNO_3$ 10%

Alcol ethylic nguyên chất

Ête

Cách tiến hành:

- Cho vào một bình nón 10 mL dung dịch H_2SO_4 cần chuẩn độ, 50 mL nước cất và 5 giọt HCl 10%. Dun sôi và lắc đều (lưu ý tránh để bắn dung dịch ra ngoài). Cho từng giọt 20 mL dung dịch $BaCl_2$ 10% và tiếp tục đun 10 phút, vừa đun vừa lắc. Đảm bảo tủa được hoàn toàn bằng cách thử với dung dịch $BaCl_2$ (dung dịch không được tủa thêm).
- Gạn nước trong còn nóng bằng phễu có giấy lọc loại không tro. Rửa tủa còn lại trong bình nón với nước sôi, lắc và để lắng 5 phút. Gạn và lọc như trên. Rửa lại như trên vài lần. Cuối cùng, đổ tủa lên giấy lọc, dùng đũa thuỷ tinh có đầu đũa bọc cao su để kéo tủa khỏi thành của bình nón. Rửa tủa ở trên giấy lọc bằng nước cất đun sôi cho tới khi nước rửa không còn tủa với dung dịch $AgNO_3$ (nhầm loại $BaCl_2$ thừa). Rửa tủa lần cuối bằng alcol rồi bằng ête. Đặt cả phễu và giấy lọc vào tủ sấy $110^{\circ}C$, sấy tới khô hoàn toàn.
- Nhắc cẩn thận tờ giấy lọc từ phễu và đặt giấy vào một chén nung bằng bạch kim hay thạch anh đã cân trước (chén này được đốt nóng đỏ rồi để nguội). Cầm chén nung bằng kìm kim loại và đốt cho tới khi cặn tủa thành than. Để nguội, thêm vào chén 2 - 3 giọt HN_3 , nung chén lại một lần nữa cho tới khi có tàn tro trắng. Để nguội chén trong bình hút ẩm. Cân chén.

Cách tính: Gọi p là lượng $BaSO_4$ tạo thành do kết tủa dung dịch H_2SO_4 cần chuẩn độ và 1g $BaSO_4$ tương ứng với 0,42g H_2SO_4 .

Dung dịch H_2SO_4 cần chuẩn độ có chứa:

$$P = \frac{0,42 \times p \times 1000}{10} \text{ gam } H_2SO_4 \text{ trong 1 lít}$$

Điều chỉnh lại dung dịch hoặc xác định lại hệ số chuẩn độ.

2. Phương pháp chuẩn độ bằng natri carbonat.

Nguyên tắc: Na_2CO_3 bị phá huỷ bởi H_2SO_4 theo phản ứng:



Thuốc thử.

Na_2CO_3 khan, tinh khiết

Heliantin 2% trong nước.

Tiến hành.

Sau khi kiểm tra hoá chất Na_2CO_3 không lẫn muối chlor và sulfat, sấy khô ở 250°C . Đổ nguội Na_2CO_3 trong bình hút ẩm rồi cân chính xác 1,06 g. Cho Na_2CO_3 vào bình nón, hòa với 100 mL nước cất và thêm 1 giọt heliantin 2%. Nhỏ dung dịch H_2SO_4 cần kiểm tra bằng buret cho đến khi dung dịch trong bình nón chuyển màu từ vàng sang đỏ da cam.

Cách tính.

Nếu dung dịch H_2SO_4 N chính xác thì phải dùng hết 20 mL dung dịch H_2SO_4 để chuẩn độ ($1,06 \text{ g Na}_2\text{CO}_3 \approx 20 \text{ mL dung dịch H}_2\text{SO}_4 \text{ N}$) với một giọt dung dịch H_2SO_4 có sai số là $\pm 0,25\%$.

Chú ý:

- Chỉ cần cho 1 giọt heliantin vào bình nón, nếu cho heliantin nhiều thì sự chuyển màu của dung dịch sẽ khó nhận biết.
- Phương pháp này nhanh hơn phương pháp cân và độ chính xác đảm bảo.
- Có thể dùng kalihydrocarbonat (KHC_0_3) tinh khiết và khan thay thế natricarbonat. Trọng lượng phân tử của $\text{KHC}_0_3 = 100$, do vậy, 2g $\text{KHC}_0_3 \approx 20 \text{ mL dung dịch H}_2\text{SO}_4 \text{ N}$. Muối kalihydrocarbonat dễ mất khí CO_2 vì vậy muốn có KHC_0_3 khan cần để muối vào bình hút ẩm ở nhiệt độ phòng cho đến khi trọng lượng muối không đổi (không nên sấy khô trong tủ sấy)
- Dung dịch H_2SO_4 giữ được lâu với điều kiện được bảo quản trong lọ nút kín, không bị bốc hơi.

DUNG DỊCH ACID SULFURIC 0,1N

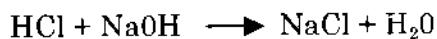
Cho 100 mL dung dịch acid sulfuric nguyên chuẩn N vào một bình định mức 1000 mL. Hoà thêm nước cất vừa đủ tới mức 1000 mL, lắc đều. Kiểm tra lại bằng những phương pháp trên.

DUNG DỊCH ACID CHLORHYDRIC NGUYÊN CHUẨN (36,5 g HCl trong 1 lít)

Acid chlorhydric được dụng thường chứa 30-40g HCl trong 100 mL. Đong 120 mL acid này vào ống đong chia độ, rồi thêm nước cất vừa đủ 1000 mL.

Chuẩn độ dung dịch HCl từ dung dịch NaOH N.

Định lượng dung dịch HCl dựa trên một trong hai phản ứng trung hoà sau đây:



Thuốc thử.

Dung dịch NaOH N hoặc dung dịch Na₂CO₃ N

Heliantin 2% trong nước hoặc phtalein phenol 1% trong alcol

Tiến hành.

- *Với heliantin:* Trong một bình nón cho 10 mL dung dịch NaOH N, 10mL nước cất đã đun sôi và 1 giọt heliantin 2%. Nhỏ dung dịch acid cần chuẩn độ bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón chuyển màu từ vàng sang hồng.

Gọi V là thể tích acid cần chuẩn độ đã dùng để trung hoà 10 mL dung dịch NaOH N.

$$-\text{Độ chuẩn của dung dịch acid là } \frac{10}{V} \times [N]$$

$$-\text{Nồng độ dung dịch HCl là } \frac{V}{10} \times 36,5\text{g/L}$$

- *Với phtalein phenol:* Trong một bình nón cho 10 mL dung dịch acid cần chuẩn độ, 1-2 giọt phtalein phenol 1% và 10 mL nước cất. Nhỏ dung dịch NaOH N bằng buret vào bình nón cho tới khi dung dịch trong bình nón xuất hiện màu hồng bền vững.

Gọi V là thể tích dung dịch NaOH N cần dùng để trung hoà 10 mL dung dịch acid.

$$-\text{Độ chuẩn của dung dịch acid là } \frac{V}{10} \times [N]$$

$$-\text{Nồng độ dung dịch HCl là } \frac{V}{10} \times 36,5\text{g/L}$$

DUNG DỊCH NATRI HYDROXYD NGUYÊN CHUẨN (40g NaOH trong 1 lít)

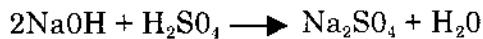
Natri hydroxyd dù rất tinh khiết vẫn luôn luôn ngậm một ít nước và ít nhiều đều bị carbonat hoá. Bởi vậy, pha dung dịch NaOH không có carbonat phải tiến hành như sau:

Cân khoảng 70g NaOH rồi hoà tan vào 100 - 150 mL nước cất đun sôi để nguội (đậy kín nước khi để nguội). Sau khi NaOH tan hết, đổ dung dịch sang một bình thuỷ tinh có đậy nút. Để 3-4 ngày, Na₂CO₃ ít tan trong dung dịch NaOH đậm đặc và tủa lắng xuống đáy bình. Gạn nước trong vào bình định mức 1000 mL, thêm nước

cát đã loại bỏ CO_2 vừa đủ tới vạch định mức. Dung dịch NaOH này có nồng độ xấp xỉ bằng N .

Định lượng NaOH bằng dung dịch H₂S0₄ N

Nguyên tắc. Natri hydroxyd được trung hoà bởi acid sulfuric theo phương trình:



Thuốc thử.

Dung dịch H_2SO_4 N

Heliantin 2% trong nước

Phtalein phenol 1% trong cồn

Tiến hành.

Trong 1 bình nón cho 10 mL dung dịch NaOH cần chuẩn độ và 1 giọt heliantin 2%. Nhỏ dung dịch H_2SO_4 N bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch NaOH chuyển sang màu hồng.

Có thể định lượng ngược lại như sau: Trong bình nón cho 10 mL dung dịch H_2SO_4 N, thêm 20 mL nước cất đã đun sôi và 1-2 giọt phtalein phenol. Nhỏ dung dịch NaOH cần định lượng bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch H_2SO_4 trong bình nón xuất hiện màu hồng bền vững.

Cách tinh.

Gọi V là thể tích dung dịch H_2SO_4 N dùng để trung hoà 10 mL dung dịch NaOH cần chuẩn độ.

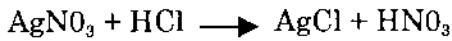
Nồng độ dung dịch NaOH là: $\frac{V}{10} \times 40\text{g}$ (NaOH trong 1 lít).

DUNG DỊCH BẠC NITRAT 0,1N (17g AgNO₃ trong 1 lít)

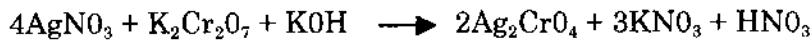
Bạc nitrat được dùng chứa ít nhiều nước kết tinh. Cân 17,3g AgNO_3 , hoà tan với 100mL nước cất hai lần và thêm nước cất vừa đủ 1000 mL.

Định lượng bạc nitrat bằng dung dịch HCl 0,1N

Nguyên tắc: Bạc bị tủa bởi một lượng acid chlorhydric nhất định thành bạc chlorur. Lượng bạc nitrat thừa sẽ được phát hiện bởi kali cromat trong môi trường trung tính.



Vàng Xanh lá cây



Thuốc thử.

Dung dịch HCl 0,1 N
 Calci carbonat
 Heliantin 2% trong nước
 Dung dịch kalicromat 10%.

Tiến hành.

Trong một bình nón, cho vào 10 mL dung dịch HCl 0,1 N, 1 giọt dung dịch heliantin 2% và một ít CaCO_3 . Lắc bình nón đến khi dung dịch có heliantin chuyển sang màu vàng da cam. Thêm 5 giọt dung dịch kalicromat 10%. Nhỏ dung dịch AgNO_3 cần chuẩn độ bằng buret vào bình nón cho tới khi dung dịch trong bình nón chuyển màu sang đỏ gạch (bạc cromat tan ở nhiệt độ nóng và môi trường acid, vì vậy quá trình chuẩn độ phải tiến hành ở nhiệt độ thấp và môi trường trung tính). Ở môi trường kiềm mạnh, bạc sẽ tủa dưới dạng AgOH nên phải trung hoà môi trường acid bằng CaCO_3 , không được trung hoà bằng NaOH .

Cách tính.

Gọi V là thể tích dung dịch AgNO_3 cần chuẩn độ để định lượng 10 mL dung dịch HCl 0,1N. Độ chuẩn của dung dịch AgNO_3 là:

$$\frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

Chú ý: Dung dịch AgNO_3 phải pha bằng nước cất tốt, bảo quản trong lọ màu, kín và sạch, dung dịch sẽ giữ được lâu. Tuy nhiên, sau một thời gian bạc sẽ bị khử và bám ở thành chai đựng và ít nhiều độ chuẩn của dung dịch bị thay đổi.

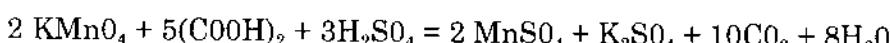
DUNG DỊCH KALI PEMANGANAT 0,1N (3,16 g pemanganat trong 1 lít)

$$\text{Dung dịch KMnO}_4 \text{ N chứa: } P = \frac{M}{\text{hoá trị}} = \frac{158}{5} = 31,6 \text{ g pemanganat trong 1L}$$

Dung dịch KMnO_4 0,1N, chứa 3,16 g pemanganat trong 1 lít KMnO_4 , không bao giờ tinh khiết. Cân 3,3 g KMnO_4 , cho vào một bát men trắng có mổ. Hoà tan dần với từng ít nước cất nóng, gạn sang bình định mức 1000 mL, khi pemanganat tan hết thì thêm nước cất vừa đủ 1000 mL. Lắc đều. Để vài ngày, tránh ánh sáng (đựng trong lọ màu). Định lượng bằng một trong những phương pháp sau:

1. Định lượng pemanganat bằng dung dịch acid oxalic 0,1N

Nguyên tắc: Trong môi trường acid sulfuric, acid oxalic bị oxy hoá bởi kali pemanganat theo phương trình:



Thuốc thử:

- Acid sulfuric tinh khiết (acid không được có phản ứng với pemanganat, kiểm tra bằng cách thêm 1 giọt KMnO₄ vào 10 mL dung dịch acid và màu hồng xuất hiện bền vững).
- Acid oxalic 0,1N (C₂O₄H₂, 2H₂O = 126)

Cân chính xác 6,3 g acid oxalic tinh khiết (126:20). Kiểm tra độ chuẩn bằng dung dịch NaOH 0,1N ở nhiệt độ nóng với chỉ thị màu phtalein phenol (tương tự như định lượng dung dịch HCl 0,1N).

Tiến hành.

Cho vào bình nón:

Acid oxalic 0,1N	10 mL
Acid sulfuric	1-2 mL

Dun 50-60°C (thực hiện phản ứng ở nhiệt độ nóng để sự oxy hoá nhanh và hoàn toàn), không đun trên 60°C để tránh sự phân huỷ của acid oxalic. Nhỏ pemanganat kali bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón xuất hiện màu hồng bền vững.

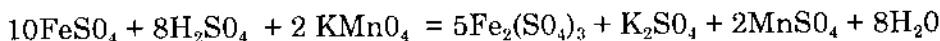
Cách tính.

Gọi V là thể tích KMnO₄, cần dùng để định lượng 10 mL dung dịch acid oxalic 0,1N.

$$\text{Độ chuẩn của pemanganat} = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

2. Định lượng pemanganat bằng dung dịch sắt (II) sulfat 0,1N.

Nguyên tắc: Trong môi trường acid sulfuric, pemanganat kali oxy hoá sắt (II) sulfat thành sắt (III) sulfat theo phản ứng:



Thuốc thử:

- Acid sulfuric đậm đặc
- Natri hydro carbonat (NaHC0₃)
- Dung dịch sulfat kép sắt và amoni 0,1N (muối Mohr).

Muối Mohr {FeSO₄-(NH₄)₂SO₄.6H₂O} vững bền, dễ tinh khiết.

Cho 50 mL nước cất đun sôi để nguội vào bình định mức 100 mL. Thêm 4 mL acid sulfuric tinh khiết, một ít NaHC0₃ để đẩy không khí ra khỏi bình. Khi hết hiện tượng sủi bọt, cho thêm 3,92 g muối Mohr (3,92g FeSO₄-(NH₄)₂SO₄.6H₂O - cân chính xác). Thêm nước cất đun sôi để nguội vừa đủ 100 mL. Đậy nút, lắc đều.

Tiến hành.

Cho vào bình nón:

Nước cất đun sôi, để nguội	100 mL
Acid sulfuric đậm đặc	10 mL
NaHCO ₃	một ít
Dung dịch muối Mohr 0,1N	10 mL

Nhỏ dung dịch KMnO₄ bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón xuất hiện màu hồng bền vững.

Cách tính.

Gọi V là thể tích dung dịch KMnO₄ dùng để định lượng 10 mL dung dịch muối Mohr 0,1N

$$\text{Độ chuẩn của KMnO}_4 = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

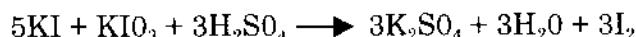
Chú ý: Bảo quản dung dịch KMnO₄ trong lọ màu.

DUNG DỊCH NATRI HYPOSULFID 0,1N (24,8g Na₂S₂O₃.5H₂O trong 1 lít)

Cân 25-26g hyposulfid, cho vào bình định mức 1000 mL. Thêm khoảng 200 mL nước cất đun sôi, để nguội. Lắc tối tan, thêm nước cất vừa đủ 1000 mL.

1. Định lượng dung dịch natri hyposulfid bằng acid sulfuric 0,1N

Nguyên tắc: Hỗn hợp kali iodid và kali iođat ở môi trường acid sulfuric sẽ phản ứng theo phương trình:



Iod giải phóng sẽ bị khử bởi natri hyposulfid:



Thuốc thử:

- Acid H₂SO₄ 0,1N
- Dung dịch KI 10% không có iod tự do
- KIO₃
- Hồ tinh bột 0,2%: Hoà 2g tinh bột vào 10 mL nước lạnh. Thêm 0,05g thuỷ ngân chlorur (HgCl₂) để giữ hồ tinh bột được lâu. Đổ từng ít một dung dịch hồ tinh bột vào một lít nước sôi, vừa đổ vừa khuấy. Tiếp tục đun sôi khoảng 30 phút. Để nguội. Thêm nước cất vừa đủ 1000 mL.

Tiến hành.

Cho vào bình nón:

Dung dịch KI 10%	10 mL
Nước cất đã loại CO ₂	100 mL
KIO ₃	0,2-0,3g

Lắc tan, dung dịch không có màu. Thêm 10 mL dung dịch H_2SO_4 0,1N

Nhỏ dung dịch natri hyposulfid bằng buret tới khi dung dịch trong bình nón xuất hiện màu vàng nhạt. Thêm vài giọt hồ tinh bột 0,2%, tiếp tục nhỏ dung dịch natri hyposulfid vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón mất hoàn toàn màu xanh.

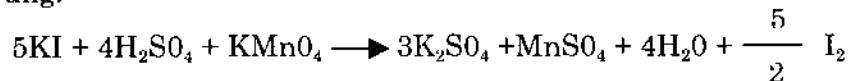
Cách tính.

Gọi V là thể tích natri hyposulfid dùng để định lượng 10 mL dung dịch kalipemanganat 0,1N

$$\text{Độ chuẩn của natri hyposulfid} = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

2. Định lượng natri hyposulfid bằng kali pemanganat 0,1N

Nguyên tắc: Trong môi trường acid sulfuric, iodur bị oxy hóa bởi pemanganat theo phản ứng:



Iod giải phóng được định lượng bằng hyposulfid.

Thuốc thử:

- Kali pemanganat 0,1N
- Dung dịch kali iodur 10%

Iodur có thể lắn iodat, muối iodat ở môi trường acid sẽ tác dụng với iodur để giải phóng iod. Kiểm tra iodur không có iodat bằng cách lấy một ít dung dịch kali iodur và thêm vào vài giọt acid sulfuric 50% và phản ứng phải không có màu

- Acid sulfuric 50%
- Hồ tinh bột 2%

Tiến hành.

Cho vào bình nón:

Dung dịch kali iodur 10%	10 mL
Acid sulfuric 50%	1-2 mL
Dung dịch kali pemanganat 0,1N	10 mL

Nhỏ dung dịch hyposulfid bằng buret vào bình nón cho tới khi dung dịch trong bình nón có màu vàng nhạt. Thêm vài giọt hồ tinh bột, tiếp tục định lượng tới khi màu xanh của dung dịch trong bình nón mất hoàn toàn.

Cách tính.

Gọi V là thể tích natri hyposulfid dùng để định lượng 10 mL dung dịch kali pemanganat 0,1N

$$\text{Độ chuẩn của natri hyposulfid} = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

Chú ý: Dung dịch natri hyposulfid không giữ được lâu. Khi dùng phải kiểm tra lại. Có thể ổn định dung dịch này để giữ được lâu hơn bằng 0,1g % natri borat.

DUNG DỊCH IOD 0,1N (12,7g iod trong 1 lít)

Dung dịch iod 0,1N có thể pha thẳng từ iod tinh khiết bằng cách cân chính xác 12,7g iod trong 1 lít. Dung dịch này có thể làm dung dịch chuẩn để định lượng hyposulfid.

Tuy nhiên, iod là chất oxy hoá mạnh, dễ bay hơi, vì vậy, tốt hơn là pha một dung dịch iod với lượng 12,7g càng chính xác càng tốt và sau đó, định lượng lại dung dịch này bằng dung dịch natri hyposulfid 0,1N đã được chuẩn độ.

Iod không tan trong nước, tan rất nhiều trong dung dịch đậm đặc kali iodur. Cho 25 g KI không có chứa KI_0_3 vào bình định mức 1000 mL, thêm 30-40 mL nước cất. Khi KI trong bình tan hết, cho 12,7g iod và lắc tới tan hết, thêm nước cất vừa đủ 1000 mL.

Định lượng iod bằng natri hyposulfid 0,1N

Cho vào bình nón: 10 mL dung dịch iod cần chuẩn độ và 20 mL nước cất. Nhỏ dung dịch natri hyposulfid 0,1N bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón có màu vàng nhạt, thêm vài giọt hồ tinh bột 0,2% và tiếp tục định lượng tới khi dung dịch trong bình nón mất màu hoàn toàn.

Gọi V là thể tích natri hyposulfid dùng để định lượng 10 mL dung dịch iod.

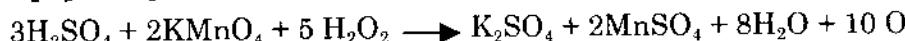
$$\text{Độ chuẩn của iod} = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

DUNG DỊCH HYDROPEROXID (H_2O_2)

Pha dung dịch hydroperoxyd như sau: cân khoảng 1g dung dịch H_2O_2 đậm đặc, pha loãng thành 100 mL với nước cất bằng bình định mức 100 mL. Lấy 10 mL dung dịch này để chuẩn độ.

Định lượng hydroperoxyd bằng kali pemanganat 0,1N

Nguyên tắc: Định lượng hydroperoxyd bằng kali pemanganat dựa trên tính khử của H_2O_2 theo phương trình:



$$\text{Dung dịch } H_2O_2 \text{ nguyên chất chứa: } P = \frac{M}{n} = \frac{34}{2} = 17g H_2O_2 \text{ trong 1 lít}$$

Dung dịch hydroperoxyd có thể biểu thị bằng nồng độ phần trăm.

Thí dụ: Dung dịch H_2O_2 đậm đặc chứa 27,5-31% H_2O_2 , dung dịch H_2O_2 loãng chứa 2,7-3,3% H_2O_2 .

Ngoài ra, dung dịch H_2O_2 có thể biểu thị nồng độ bằng "thể tích", tức là số lít oxygen mà 1 lít dung dịch H_2O_2 có thể giải phóng khi bị phân huỷ (người ta không gọi là số lít mà gọi là thể tích). Thí dụ: H_2O_2 được dung có 10 thể tích (10V) nghĩa là 1 lít H_2O_2 (10V) khi phân huỷ sẽ giải phóng 10 lít oxy gen ($5 H_2O_2 \rightarrow 5 H_2O + 5 O_2$).

1 H_2O_2 tương ứng với 1 oxy

$$H_2O_2(N) = \frac{H_2O_2}{2} = \frac{1}{4} O_2 = 5,6 \text{ lít oxygen}$$

Độ chuẩn của H_2O_2 theo thể tích oxy bằng nồng độ chuẩn N của dung dịch H_2O_2 nhân với 5,6.

Tiến hành:

Trong một bình nón, cho:

Nước cất	100 mL
H_2SO_4 đặc	5 mL
Dung dịch H_2O_2 cân định lượng	10 mL

Nhỏ dung dịch kali pemanganat 0,1N bằng buret vào bình nón cho đến khi dung dịch trong bình nón có màu hồng nhạt bền vững. Cần làm 2-3 lần lặp lại như trên, lấy kết quả gần giống nhau.

Cách tính:

Gọi V là thể tích kali pemanganat 0,1N dùng để định lượng 10 mL dung dịch H_2O_2 .

$$\text{Độ chuẩn của dung dịch } H_2O_2 = \frac{10}{V} \times \frac{N}{10}$$

Để biểu thị dung dịch H_2O_2 theo nồng độ phần trăm hay theo nồng độ thể tích chỉ cần thay N/10 bằng trị số 1,7g/L hay 0,56 lít.

Chú ý: Dung dịch H_2O_2 để lâu dễ hỏng, cần bảo quản trong lọ có nút thuỷ tinh, ở tủ lạnh và tránh những chất hữu cơ.

Những điểm cần chú ý khi sử dụng các dung dịch chuẩn độ

Các dung dịch chuẩn độ phải bảo quản trong lọ thuỷ tinh trung tính, tránh ánh sáng, đậy bằng nút thuỷ tinh (trừ một số dung dịch đặc biệt).

Không cho ống hút vào lọ đựng dung dịch chuẩn độ. Phải đổ dung dịch chuẩn độ vào một cốc với lượng xấp xỉ thể tích cần dùng, sau đó dùng ống hút để lấy dung dịch trong cốc. Dung dịch thừa trong cốc không được đổ lại vào lọ đang đựng dung dịch chuẩn độ.

Trường hợp trời nóng, trước khi dùng cần lắc lọ đựng dung dịch chuẩn độ để hòa nhũn giọt nước bốc hơi của dung dịch đóng ở thành lọ, tránh làm sai độ chuẩn của dung dịch.

6. DUNG DỊCH ĐÊM

Dung dịch đêm là những dung dịch có khả năng giảm sự thay đổi nồng độ ion H^+ và OH^- - tức là pH của dung dịch, khi thêm vào dung dịch đó một acid mạnh hay một base mạnh. Dung dịch đêm thường có hai loại:

- Hỗn hợp của một acid yếu và muối của acid đó với một base mạnh. Thí dụ: acid acetic và natri acetat, kali dihydrophosphat và natri hydrophosphat.

- Hỗn hợp của một base yếu và muối của base đó với một acid mạnh. Thí dụ: amoniac và amoni chlorur.

DUNG DỊCH ĐÊM KALI DIHYDROPHOSPHAT VÀ NATHI HYDROPHOSPHAT (4,94 < pH < 9,18)

Để có dung dịch với pH cần thiết, trộn lần hai dung dịch kali dihydrophosphat và natri hydrophosphat theo chỉ dẫn sau:

Dung dịch KH_2PO_4 M/5 (mL)	Dung dịch Na_2HP_4 M/5 (mL)	pH	Dung dịch KH_2PO_4 M/5 (mL)	Dung dịch Na_2HP_4 M/5 (mL)	pH
9,90	0,10	4,94	4,00	6,00	6,98
9,75	0,25	5,29	3,00	7,00	7,17
9,50	0,50	5,59	2,00	8,00	7,38
9,00	1,00	5,91	1,00	9,00	7,73
8,00	2,00	6,24	0,50	9,50	8,04
7,00	3,00	6,47	0,25	9,75	8,34
6,00	4,00	6,64	0,10	9,90	8,67
5,00	5,00	6,81	0,00	10,00	9,18

Dung dịch kali dihydrophosphat: KH_2PO_4 (M/5): 9,078g/lít

Dung dịch natri hydrophosphat: Na_2HP_4 (M/5): 11,876g/lít

DUNG DỊCH ĐÊM ACID ACETIC VÀ NATRI ACETAT (3,6 < pH < 5,6)

Acid acetic M/5 (mL)	Natri acetat M/5 (mL)	pH	Acid acetic M/5 (mL)	Natri acetat M/5 (mL)	pH
18,5	1,5	3,6	8,0	12,0	4,8
17,6	2,4	3,8	5,9	14,1	5,0
16,4	3,6	4,0	4,2	15,8	5,2
14,7	5,3	4,2	2,9	17,1	5,4
12,6	7,4	4,4	1,9	18,1	5,6
10,2	9,8	4,6			

Dung dịch acid acetic M/5: 12,005g CH_3COOH trong 1 lít

Dung dịch natri acetat M/5: 27,217g $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$ trong 1 lít

7. MỘT SỐ CHỈ THỊ MÀU THÔNG THƯỜNG

Chỉ thị màu	pH chuyển màu	Số giọt trong 10 mL	Cách pha		Màu	
			%	Dung môi	Acid	Base
Tím methyl	0,1 - 1,5	3-8	0,5	Nước	Vàng	Xanh
Tím methyl	1,5 - 3,5	1-4	0,5	-	Xanh	Tím
Tropeolin 00	1,3 - 3,2	1	0,1	-	Đỏ	Vàng
Xanh thymol	1,2 - 2,8	1-2	0,1	Alcol 20°	Đỏ	Vàng
β-dinitrophenol	2,4 - 4,0	1-2	0,1	Alcol 50°	K. màu	Vàng
vàng dimethyl	2,9 - 4,0	1	0,1	Alcol 90°	Đỏ	Vàng
Xanh bromophenol	3,0 - 4,6	1	0,1	Alcol 20°	Vàng	Tím xanh
Đỏ congo	3,0 - 5,2	1	0,1	Nước	Xanh	Đỏ
Heliantin	3,1 - 4,4	1	0,1	-	Đỏ	Da cam
Natri alizarin	3,7 - 5,2	1	0,1	-	Vàng	Tím
Xanh bromocresol	4,0 - 5,6	1	0,1	Alcol 20°	Vàng	Xanh
Đỏ methyl	4,4 - 6,2	1	0,2	Alcol 50°	Đỏ	Vàng
Đỏ sim bromocresol	5,2 - 6,8	1	0,1	Alcol 90°	Vàng	Đỏ sim
Đỏ chlorophenol	5,4 - 6,8	1	0,1	Alcol 20°	Vàng	Đỏ
Xanh bromothymol	6,2 - 7,6	1	0,1	Nước	Vàng	Xanh
P.nitrophenol	5,0 - 7,0	1-5	0,1	-	K. màu	Vàng
Đỏ phenol	6,8 - 8,0	1	0,1	-	Vàng	Đỏ
Acid rozolic	6,8 - 8,0	1	0,1	Alcol 20° Alcol 90°	Vàng	Đỏ
Đỏ cresol	7,2 - 8,2	1	0,1	Alcol 20° Alcol 20°	Vàng	Đỏ
α naphtolphataein	7,3 - 8,7	1-5	0,1	Alcol 20°	Hồng	Lục
Tropeolin 000	7,6 - 8,9	1	0,1	Nước	Vàng	Đỏ hồng
Phenolphthalein	8,0 - 10,0	1-5	0,1	Alcol 20° Alcol 90°	K. màu	Đỏ
Xanh thymol	8,0 - 9,6	1-5	0,1	Alcol 20° Alcol 70°	Vàng	Xanh
α naphtol benzol	9,0 - 11,0	1-5	0,1	Nước	Vàng	Xanh
Thymol phtalein	9,4 - 10,6	1	0,1	Alcol 70° Alcol 20°	K. màu	Xanh
Vàng alizarin	10,0 - 12,0	1	0,1	Alcol 90° Alcol 90°	Vàng	Tím hoa cà
Tropeolin 0	11,0 - 13,0	1	0,1	Nước	Vàng	Nâu vàng

Chương 6

CÁCH LẤY VÀ BẢO QUẢN BỆNH PHẨM

MỤC TIÊU

Biết cách lấy và bảo quản bệnh phẩm của bệnh nhân (máu, huyết thanh, huyết tương và nước tiểu) một cách chính xác để làm xét nghiệm hoá sinh.

1. LẤY VÀ BẢO QUẢN MẪU MÁU

1.1. Chuẩn bị dụng cụ

Thông thường mẫu máu để phân tích các chỉ số hoá sinh là máu tĩnh mạch, cũng có khi là máu động mạch hoặc mao mạch. Dụng cụ để lấy máu bao gồm:

Ống nghiệm thuỷ tinh 5-10 mL, nút ống nghiệm,

Kim tiêm, bơm tiêm (nên dùng loại kim tiêm, bơm tiêm vô khuẩn, dùng một lần).

Dây thắt (nên bằng cao su mềm, độ đàn hồi tốt).

Tất cả các loại dụng cụ cần phải sạch và khô.

Các chất chống đông có thể sử dụng như heparin, natri citrat, natri oxalat; sự lựa chọn chất chống đông tuỳ thuộc vào mục đích xét nghiệm

1.2. Chuẩn bị bệnh nhân

Nói chung nên lấy máu bệnh nhân vào buổi sáng sớm, bệnh nhân đã nhịn đói 12 tiếng, nồng độ các chất trong máu phản ánh tương đối trung thực thông số thực của bệnh nhân, đồng thời tránh các yếu tố có thể gây sai số.

Trước khi lấy máu cần cho bệnh nhân nghỉ trong khoảng 15-20 phút, cần giải thích cho bệnh nhân cách lấy máu để bệnh nhân không bị bất ngờ khi tiến hành lấy máu. Trong một số xét nghiệm như phân tích các rối loạn thăng bằng acid-base khi lấy máu cần giải thích kỹ càng để bệnh nhân ở trạng thái bình tĩnh, và lấy máu nhẹ nhàng, không gây đau đớn, lo lắng cho bệnh nhân, tránh gây tăng thông khí, dẫn đến nhiễm kiềm hô hấp, các thông số định lượng sẽ bị sai lệch.

1.3. Cách lấy máu

Lấy máu tĩnh mạch:

Thường lấy ở tĩnh mạch khuỷu tay. Có thể để bệnh nhân nằm hoặc ngồi, tay duỗi thoải mái trên vật cứng. Dùng dây thắt, thắt ở vị trí trên khuỷu tay 2-3cm, chọc kim

vào tĩnh mạch, kéo nhẹ bơm tiêm kiểm tra xem kim đã chắc chắn vào tĩnh mạch hay chưa. Bỏ dây thắt rồi mới lấy máu để tránh hiện tượng ứ máu. Ứ máu có thể làm tăng lượng CO_2 , O_2 và thay đổi tính chất lý hoá và thành phần máu.

Lấy máu động mạch: Việc lấy máu động mạch tương đối phức tạp, có thể gây nguy hiểm cho bệnh nhân, vì vậy chỉ những bác sĩ, kỹ thuật viên có kinh nghiệm mới nên tiến hành thủ thuật này. Khi lấy máu động mạch chỉ nên dùng bơm tiêm, để máu tự động chảy vào bơm tiêm (do áp lực của máu trong động mạch), không nên tạo áp lực âm trong bơm tiêm. Nên tráng bơm tiêm bằng heparin.

Lấy máu ở trẻ em: Máu toàn phần có thể lấy máu ở mao mạch.

Vị trí lấy máu thông thường nhất là lấy ở gót chân. Dùng khăn ẩm và ấm làm ấm vị trí lấy máu, sát khuẩn rồi dùng kim vô khuẩn để lấy máu. Loại bỏ giọt máu đầu tiên vì có lỗ dịch tổ chức. Những giọt máu tiếp theo nên hứng vào ống thuỷ tinh chứa heparin.

Máu máu để xét nghiệm hoá sinh gồm ba loại: Máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh. Máu sau khi lấy ra khỏi cơ thể sẽ bị đông lại do trong thành phần có ion Ca^{++} . Loại bỏ ion Ca^{++} thì máu sẽ không đông. Các chất loại bỏ ion Ca^{++} gọi là chất chống đông máu. Có nhiều loại chất chống đông như EDTA (muối ethylen diamine tetraacetic acid), kali oxalat, natri citrat. EDTA thường được dùng cho các xét nghiệm huyết học (15mg/mL). Kali oxalat ngày nay ít được sử dụng, natri, citrat thường được dùng cho các xét nghiệm phân tích các yếu tố chống đông (dung dịch 3,28%). Heparin ($0,01\text{-}0,1\text{mL/mL máu}$) có chứa chất kháng thrombin và kháng yếu tố Xa. Heparin thường được sử dụng khi làm các xét nghiệm hoá sinh máu như: phân tích khí máu, phân tích hoá sinh lâm sàng và cấp cứu. Máu có chứa chất chống đông gọi là máu toàn phần, ly tâm lấy phần dịch ở trên gọi là huyết tương, trong huyết tương có chứa các yếu tố đông máu. Khi máu không chứa chất chống đông cục máu đông sẽ hình thành theo cơ chế đông máu tự nhiên. Ly tâm lấy phần dịch ở trên gọi là huyết thanh.

1.4. Cách tách huyết thanh

Sau khi lấy máu vào ống nghiệm, đậy ống nghiệm bằng nút cao su hoặc bông mõr rồi để ở nhiệt độ phòng trong vài giờ. Nếu cần có huyết thanh nhanh để phân tích thì có thể cầm ống nghiệm trong lòng bàn tay hoặc có thể để ống nghiệm ở tủ ấm cốt giữ cho máu ở nhiệt độ khoảng 30°C . Như vậy cục huyết sẽ hình thành một cách tự nhiên để tiết ra huyết thanh nhiều nhất. Khi cục máu đã đông, dùng que thuỷ tinh nhỏ hoặc sợi bạch kim nhẹ nhàng tách phần cục huyết dính vào thành ống. Cục huyết sẽ dễ co lại, và nhanh tiết huyết thanh. Gạn lấy phần huyết thanh trong hoặc dùng pipet để hút huyết thanh. Nếu huyết thanh lẩn hồng cầu, đem ly tâm lại (3000 vòng/phút trong 5 phút), lấy phần huyết thanh. Một số xét nghiệm cần lấy huyết thanh ngay (ví dụ định lượng kali, natri huyết tránh sự khuyếch tán từ hồng cầu ra) thì li tâm ngay sau khi cục máu đông hình thành và tách cục huyết khỏi dính vào thành ống, thời gian không nên quá 1 giờ.

1.5. Cách lấy máu toàn phần hay huyết tương

Xét nghiệm dùng máu toàn phần hay huyết tương để tránh hoặc loại trừ sai số có thể gặp do hoại huyết và ngăn ngừa các chất khuyếch tán từ hồng cầu vào huyết

tương. Một số chất chống đông được sử dụng như đã nói đến ở trên. Thường chất chống đông được cho sẵn vào ống đựng mẫu máu, khi cho máu vào cần lắc đều liên tục để tránh máu đông lại. Ly tâm lấy phần dịch ở trên.

1.6. Cách bảo quản mẫu máu

Thời gian bảo quản cho phép với các mẫu huyết thanh và huyết tương là khoảng 4 giờ ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và trên 1-2 ngày ở 2-8°C. Muốn giữ lại mẫu lâu hơn thì cần để nhiệt độ dưới 0°C. Đối với các mẫu để định lượng enzym cần tuân theo các qui định cụ thể của phương pháp định lượng.

Trên thực tế có những chất tương đối bền vững ở nhiệt độ 20°C trong khoảng thời gian dài hơn như Cl, K, Na, Mg, Fe, hemoglobin, acid uric, cholesterol, triglycerid, phosphatid...

2. LẤY VÀ BẢO QUẢN NƯỚC TIỂU

2.1 Dụng cụ

Bình chứa nước tiểu, thông thường dùng bình thuỷ tinh có chia độ theo mL hoặc lit. hoặc ống nghiệm thuỷ tinh 10mL-15mL, được rửa sạch sấy khô và có nút.

2.2 Lấy và bảo quản nước tiểu

Cách lấy nước tiểu:

- Với các xét nghiệm định tính thông thường, dùng nước tiểu bất kì thời gian nào trong ngày; lấy nước tiểu giữa dòng, bỏ phần đầu (do dễ có tạp nhiễm bởi dịch nhày, tế bào bong, vi khuẩn).
- Một số trường hợp nên lấy vào thời gian thích hợp như:
 - + Viêm tiết niệu thì nên lấy nước tiểu buổi sáng ngủ dậy.
 - + Nghi ngờ glucose niệu thì lấy nước tiểu sau bữa ăn 2 giờ.
 - + Urobilinogen dễ phát hiện khoảng 14-16 giờ.
- Với các xét nghiệm định lượng các chất thường phải thu gom nước tiểu 24h. Thường cho thêm vào mỗi bình vài giọt thymol trong rượu hoặc 5mL xyanua 4%. Đến giờ án định cho bệnh nhân đái hết, vứt bỏ phần nước tiểu đó. Trong 24 giờ tiếp theo hứng tất cả nước tiểu bệnh nhân đái ra vào một bình sạch, chú ý hứng cả phần nước tiểu khi bệnh nhân đi đại tiện. Ngày hôm sau, vào giờ thứ 24, cho bệnh nhân đái lần cuối cùng vào bình. Đo thể tích nước tiểu 24 giờ và lấy 0,5lit gửi đến phòng thí nghiệm kèm theo các tài liệu như: Thể tích nước tiểu 24 giờ, tên, tuổi, giới tính bệnh nhân, chế độ ăn, khối lượng nước uống, những thuốc đã dùng, trạng thái nghỉ ngơi hay hoạt động của bệnh nhân, chẩn đoán.

Bảo quản mẫu nước tiểu: Nói chung khi phân tích các chất trong nước tiểu nên dùng nước tiểu tươi, để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Nếu chưa phân tích mẫu ngay có thể để mẫu nước tiểu ở 2-8°C trong vòng 3 ngày, đối với mục đích phân tích hormone hoặc nồng độ thuốc, ở điều kiện này thuốc không bị phân huỷ. Nếu cần giữ

mẫu lâu hơn 3 ngày thì phải để mẫu $< 0^{\circ}\text{C}$. Nói chung không nên dùng hóa chất để bảo quản nước tiểu.

3. LẤY VÀ BẢO QUẢN MỘT SỐ DỊCH KHÁC

3.1. Dịch vị

Xét nghiệm dịch vị có mục đích là để chẩn đoán các bệnh trong dạ dày, phát hiện vi khuẩn gây bệnh.

Dịch vị lấy sau khi bệnh nhân nhịn đói 12 giờ. Khi bị hẹp môn vị hoặc hang vị thì phải rửa dạ dày từ chiều hôm trước. Các thuốc ảnh hưởng đến sự bài tiết dịch vị phải được ngừng sử dụng ít nhất 24 giờ trước khi làm các nghiệm pháp. Trước đây, dịch vị được lấy bằng ống hút Einhorn. Dịch vị để chẩn đoán tế bào, nghiên cứu tác dụng của HCl, pepsin trong dịch vị. Ngày nay, chẩn đoán các bệnh dạ dày thường được dùng kỹ thuật nội soi. Kỹ thuật này cho phép bác sĩ quan sát niêm mạc dạ dày, tình trạng bài tiết dịch và lấy dịch vị cũng như lấy mẫu niêm mạc dạ dày để phân tích.

Mẫu dịch vị sau khi lấy nên phân tích sớm.

3.2. Dịch não tuỷ

Dịch não tuỷ là lớp dịch ở trong các khoang dưới màng nhện bao bọc xung quanh não tuỷ, ở trong ống nội tuỷ, não thất, bảo vệ cho trung ương thần kinh đối với các biến đổi về áp lực, và sang chấn. Mỗi thương tổn dù nhỏ của não tuỷ đều ảnh hưởng đến tính chất của dịch não tuỷ. Phân tích những biến đổi đó có thể chẩn đoán được một số bệnh về thần kinh, theo dõi được sự tiến triển của bệnh.

Lấy dịch não tuỷ tương đối phức tạp đòi hỏi bác sĩ có kinh nghiệm. Khi chọc dịch não tuỷ nên hứng bệnh phẩm vào hai ống nghiệm riêng có nút cao su. Trong trường hợp xuất huyết màng não hai ống đều lắn máu. Trong trường hợp dịch não tuỷ có lắn máu nhưng do chọc phải mạch máu thì chỉ ở ống một có máu, ống hai không có.

Nên tiến hành phân tích mẫu ngay tránh hiện tượng phân huỷ đường.

3.3. Cách lấy sữa

Quy tắc lấy sữa: Lấy 3 mẫu sữa, mỗi mẫu lấy khoảng 10-20 mL, lấy ở cả hai bên vú với lượng sữa bằng nhau, trộn lẫn với nhau.

- Mẫu đầu được lấy vào buổi sáng sớm trước lúc cho bú bữa đầu trong ngày.
- Mẫu thứ hai được lấy vào giữa lúc đang cho bú bữa trưa.
- Mẫu thứ ba lấy vào buổi tối sau khi cho bú xong bữa tối.

Lấy mẫu như vậy để tránh những biến đổi sinh lý. Khi lấy mẫu nên ghi tuổi của sữa (như lấy mẫu sữa vào tháng thứ mấy). Có thể lấy mẫu sữa trong cùng một lúc: mẫu đầu lấy trước khi cho bú; mẫu thứ hai khi đang cho bú; mẫu thứ ba sau khi cho bú, khối lượng ba lần bằng nhau.

Bảo quản mẫu: Sữa có thể để ở $0-4^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ.

Chương 7

PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được bản chất của ánh sáng, các định luật về sự hấp thụ ánh sáng.
2. Trình bày được sơ đồ khói của một máy quang phổ.
3. Trình bày được những ứng dụng của phương pháp quang phổ.
4. Trình bày được cách tìm λ_{max} của một chất hóa học, cách vẽ đường chuẩn và xác định nồng độ của một dung dịch.

Trong mấy chục năm gần đây, trên cơ sở phát triển mạnh mẽ của các ngành khoa học kỹ thuật, phương pháp quang phổ đã phát triển mạnh mẽ và được ứng dụng rộng rãi trên toàn thế giới.

Phương pháp quang phổ đơn giản, dễ thực hiện, có độ chính xác và tin cậy cao. Phương pháp quang phổ đã mang lại nhiều thành tựu khoa học mới cho nhiều ngành khoa học như: Hoá sinh, Hoá phân tích, Hoá vô cơ, Hoá hữu cơ, Hoá lý, Hoá dược, Hoá địa chất, Hoá pháp y, ...

Cường độ hấp thụ quang phổ của nhiều hợp chất mạnh ở các vùng tử ngoại và khả kiến cho phép định lượng các hợp chất này với những lượng rất nhỏ (khoảng vài $\mu\text{g/L}$ hoặc 10^{-4}mol/L).

1. CƠ SỞ LÝ THUYẾT CỦA PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

1.1. Bản chất của ánh sáng

Ánh sáng là một dạng của vật chất, vừa có tính chất hạt, vừa có tính chất sóng.

Về tính chất sóng: Ánh sáng có bản chất sóng điện từ, lan truyền trong không gian có chất và không có chất (chân không). Vận tốc lan truyền của ánh sáng trong chân không là $C = 3 \times 10^{10} \text{ cm/giây} = 3 \times 10^5 \text{ km/giây}$. Dựa vào tính chất sóng, người ta đã giải thích được các hiện tượng giao thoa, nhiễu xạ và phân cực của ánh sáng.

Vùng khả kiến mà mắt người có thể nhận biết được chỉ là một vùng rất nhỏ trong phổ điện từ. Một đặc trưng rất quan trọng về bản chất sóng của ánh sáng, cũng như của quang phổ hấp thụ, là bước sóng của ánh sáng (còn gọi là độ dài sóng, ký hiệu là λ).

Ở các vùng khác nhau của phổ điện từ, ánh sáng đều có chung một bản chất, nhưng khác nhau rất nhiều về độ lớn của bước sóng. Ánh sáng có thể được biểu diễn bằng hai đại lượng đặc trưng: Bước sóng ánh sáng (λ) và tần số ánh sáng (v). Sự liên quan giữa bước sóng và tần số ánh sáng là:

$$\lambda = C/v \quad (1)$$

Ở đây: C là vận tốc ánh sáng = 3×10^{10} cm/giây.

Đơn vị độ dài bước sóng thường được sử dụng ở vùng:

- Tử ngoại và khả kiến là mμ hoặc nm ($1m\mu = 10^{-3}\mu = 10^{-6}$ mm = 10^{-9} m).
- Hồng ngoại là μ
- Sóng radio là m.

Về đại lượng tần số ánh sáng, trừ trường hợp sóng vô tuyến sử dụng đơn vị kilo chu kỳ (Kc) hoặc mega chu kỳ (Mc), còn ở các vùng khác của quang phổ, người ta sử dụng đơn vị số sóng (v) là số các sóng trên một đơn vị khoảng cách, được tính bằng cm. Số sóng được liên hệ với bước sóng và tần số bởi phương trình:

$$v = 1/\lambda \quad (2)$$

Ví dụ: Số sóng hồng ngoại $v = 500/cm$ nghĩa là có 500 sóng trên 1 cm, đường đi của tia hồng ngoại có bước sóng:

$$\lambda = 1cm/500 = 10^4\mu/500 = 20\mu.$$

Về tính chất hạt: Ánh sáng có bản chất lượng tử, được thể hiện ở các hiện tượng quang điện, quang hóa và hấp thụ ánh sáng. Ánh sáng được truyền đi trong không gian dưới dạng các hạt photon (còn gọi là quang tử) mang năng lượng. Năng lượng và tần số của hạt photon được liên hệ với nhau bởi phương trình:

$$E = hv = h.C/\lambda \quad (3)$$

Ở đây: E là năng lượng photon.

$$h \text{ là hằng số Planck} = 6,62 \times 10^{-27} \text{ erg.giây.}$$

Năng lượng của các photon ở các vùng khác nhau của phổ điện từ được xác định bằng công thức:

$$E (\text{erg}) = h \cdot C/\lambda = 6,62 \times 10^{-27} \text{ erg.giây} \times 3 \times 10^{17} \text{ nm/giây/nm.}$$

1.2. Sự chuyển động phân tử và các mức năng lượng của phân tử vật chất

Cấu tạo phân tử của vật chất phức tạp hơn nhiều so với cấu tạo nguyên tử, vì vậy, chuyển động phân tử cũng rất phức tạp. Chuyển động của phân tử vật chất bao gồm chuyển động của các nguyên tử, chuyển động dao động và chuyển động quay của bản thân phân tử.

Chuyển động của các điện tử trong phân tử tạo thành các đám mây điện tử, trong đó có những điện tử không liên kết và những điện tử tạo thành liên kết phân tử.

Chuyển động dao động là sự thay đổi tuần hoàn vị trí tương đối của các hạt nhân nguyên tử trong phân tử.

Chuyển động quay của phân tử là sự thay đổi tuần hoàn sự định hướng của phân tử trong không gian. Các dạng chuyển động phân tử xảy ra đồng thời và có tương tác lẫn nhau. Mỗi dạng chuyển động phân tử đều có năng lượng đặc trưng. Năng lượng phân tử gồm ba dạng năng lượng: năng lượng điện tử (E_e), năng lượng dao động (E_{dd}) và năng lượng quay (E_q):

$$E_{\text{phân tử}} = E_e + E_{dd} + E_q$$

Như vậy, một phân tử có một dãy các mức năng lượng lượng tử hoá. Phân tử vật chất chỉ có thể nhận (thu) hoặc mất (phát) năng lượng theo từng lượng tử một, nghĩa là từng bước tương ứng với sự chênh lệch giữa các mức năng lượng của phân tử một cách gián đoạn. Sự chuyển dịch giữa các mức năng lượng điện tử đòi hỏi một năng lượng lượng tử lớn hơn nhiều so với sự chuyển đổi giữa các mức năng lượng dao động, còn sự chuyển đổi giữa các mức năng lượng dao động lại đòi hỏi một mức năng lượng lớn hơn nhiều so với sự chuyển đổi giữa các mức năng lượng quay:

$$E_e^1 - E_e^0 >> E_{dd}^1 - E_{dd}^0 >> E_q^1 - E_q^0$$

theo tỷ lệ 100 : 10 : 1

Điều hết sức thú vị là độ lớn của sự biến thiên các mức năng lượng điện tử hóa trị của phân tử $E_e^1 - E_e^0$ tương ứng với mức năng lượng của các hạt ánh sáng (photon) có bước sóng λ trong vùng tử ngoại và khả kiến (200-800 nm), nghĩa là ta có:

$$E_e^1 - E_e^0 \text{ (của phân tử chất hấp thụ)} = h\nu = h.C/\lambda \text{ (của hạt ánh sáng)}$$

Đây chính là cơ sở lý thuyết của phương pháp quang phổ.

1.3. Sự tương tác giữa ánh sáng và các phân tử vật chất

Quang phổ hấp thụ thực chất là quá trình tương tác giữa các hạt photon của ánh sáng với các phân tử vật chất. Khi ta chiếu một chùm tia ánh sáng trắng gồm các hạt photon có các mức năng lượng lượng tử khác nhau đi qua một dung dịch chất hấp thụ trong suốt, dung dịch chỉ hấp thụ chọn lọc những photon nào có mức năng lượng phù hợp với các mức năng lượng điện tử, năng lượng dao động và năng lượng quay của nó. Điều này có nghĩa rằng phân tử vật chất chỉ hấp thụ những photon nào có mức năng lượng phù hợp để có thể đưa phân tử từ mức năng lượng phân tử này đến mức năng lượng phân tử khác, sao cho:

$$\Delta E = E^1 - E^0 = E_{\text{photon}} = h\nu = h.C/\lambda$$

Như vậy, các phân tử vật chất có cấu trúc khác nhau sẽ cho những phổ hấp thụ với các đỉnh có tần số (bước sóng) đặc trưng khác nhau.

Quá trình hấp thụ photon xảy ra trong một khoảng thời gian rất ngắn (khoảng 10^{-8} giây). Sau khi hấp thụ photon, mức năng lượng của phân tử vật chất tăng lên, phân tử chuyển sang trạng thái kích thích không bền vững, sau đó, phân tử ngay lập tức trả lại năng lượng thừa và trở lại trạng thái ban đầu bền vững. Năng lượng thừa có thể được trả lại dưới dạng bức xạ ánh sáng có bước sóng dài hơn (năng lượng thấp hơn) như ánh sáng huỳnh quang hoặc lân quang hoặc thành chuyển động nhiệt của phân tử.

1.4. Các định luật về sự hấp thụ ánh sáng

1.4.1. Định luật Lamber/ Bouger: Cường độ của một chùm tia sáng đơn sắc khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ tỷ lệ nghịch với chiều dày của lớp dung dịch mà nó đi qua:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kl}$$

Ở đây: I_0 là cường độ chùm sáng tới, I_t là cường độ chùm sáng đã truyền qua môi trường, k là hệ số hấp thụ và l là chiều dày của môi trường chất hấp thụ.

1.4.2. Định Luật Beer: Sự giảm cường độ dòng sáng khi đi qua một dung dịch chất hấp thụ phụ thuộc vào số lượng các tiểu phần chất hấp thụ mà ánh sáng gặp phải trên đường đi của chùm sáng, nghĩa là phụ thuộc và nồng độ C của dung dịch chất hấp thụ:

$$k = aC$$

Ở đây: a là hằng số hấp thụ, C là nồng độ chất hấp thụ.

1.4.3. Định luật Lamber-Beer: Kết hợp 2 phương trình trên, ta có:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-aCl}$$

Một số đại lượng về hấp thụ ánh sáng:

- Độ thấu quang T:

$$T = I_t/I_0 = 10^{-aCl}$$

- Độ hấp thụ quang A (còn gọi là mật độ quang OD):

$$A = OD = \lg 1/T = \lg 1/10^{-aCl} = \lg 10^{aCl} = aCl.$$

- Độ tắt (E): Nếu C là nồng độ phần trăm ($C=1g/100mL$) và độ dày của cốc đo là 1cm thì lúc này độ hấp thụ quang A = $A^{1\%}_{1cm}$ được gọi là độ tắt E.
- Hệ số tắt phân tử gam (ϵ): Nếu C là nồng độ phân tử gam (1mol/L) thì độ hấp thụ quang được gọi là hệ số tắt phân tử gam và được ký hiệu là ϵ . Hệ số tắt ϵ là một đặc trưng quan trọng của phổ hấp thụ của một chất hóa học, nó thể hiện khả năng hấp thụ mạnh hay yếu của chất khảo sát ở các bước sóng đặc trưng. Những chất có $\epsilon < 10^2$ là những chất hấp thụ quang phổ yếu, những chất có $\epsilon > 10^4$ là những chất hấp thụ quang phổ mạnh. Hệ số tắt ϵ phụ thuộc vào:
 - + Bản chất của dung môi: Dung môi tốt để hoà tan chất cần khảo sát là dung môi hoà tan tốt chất cần đo, không phản ứng với chất cần đo và phải trong suốt trong vùng phổ cần khảo sát. Giới hạn dưới của một số dung môi là:

Nước cất	200 nm	Cyclohexan	200 nm
Methanol	210 nm	Ether	220 nm
Chloroform	250 nm	Benzen	275 nm

 - + Các máy quang phổ hiện nay thường được cấu tạo để đo phổ tử ngoại và khả kiến (có bước sóng từ 200-800 nm). Không khí trong suốt trong vùng này nên có thể sử dụng hệ thống quang học bằng thạch anh, sử dụng cuvet thạch anh (ký hiệu là QS) để đo trong vùng phổ tử ngoại 200 – 400 nm và sử dụng cuvet thuỷ tinh (ký hiệu là OS) để đo trong vùng phổ khả kiến 400 – 800 nm.
 - + Bản chất của chất tan: Chất khảo sát có hệ số tắt mol càng lớn thì độ nhạy của phương pháp càng cao.

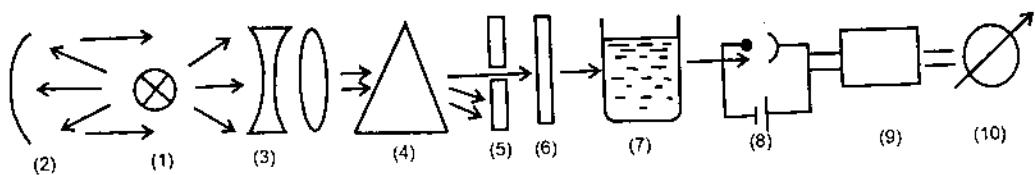
- + Độ dài của bước sóng ánh sáng tới: Muốn định lượng một chất hòa tan dưới dạng dung dịch, cần phải xác định bước sóng của tia tới cho độ hấp thụ cực đại, nghĩa là cho hệ số tắt mol cực đại, gọi là λ_{max} .
- + Nhiệt độ môi trường và thời gian hiện màu: Hệ số tắt mol phụ thuộc vào nhiệt độ của dung dịch, vì vậy, khi đo phô, cần phải giữ cho dung dịch ở một nhiệt độ ổn định. Hệ số tắt mol còn phụ thuộc vào thời gian hiện màu, vì vậy, cần phải đo phô vào thời gian màu ổn định nhất.

2. CẤU TẠO CỦA MÁY QUANG PHÔ

Các máy đo quang sử dụng trong các phòng thí nghiệm hoá sinh thường gồm hai loại: Máy quang kế (photometer) và máy quang phổ kế (spectrophotometer). Điều khác nhau cơ bản giữa 2 loại máy này là máy quang phổ kế có bộ phận tạo phô liên tục (sử dụng lăng kính hoặc cách tử), nghĩa là tạo các chùm tia đơn sắc có bước sóng đặc trưng theo ý muốn, trong khi máy quang kế không có bộ phận tạo phô, chỉ có kính lọc màu tạo ra tia đơn sắc có bước sóng tương ứng với màu của kính lọc màu.

Một máy quang phổ thường có 10 bộ phận chủ yếu sau:

1. Nguồn sáng: đèn tungsten (w) cho ánh sáng khả kiến và đèn hydrogen hoặc deutrium (D_2) cho phô phát xạ liên tục trong vùng tử ngoại;
2. Gương phản xạ: có tác dụng hất toàn bộ các tia sáng từ nguồn sáng về một phía;
3. Hệ thống thấu kính hội tụ và phân kỳ: có tác dụng chỉnh cho các tia sáng đi song song với nhau;
4. Bộ phận tạo ánh sáng đơn sắc (monochromator) là lăng kính (reflectance grating) hoặc cách tử (prism) (máy quang kế không có bộ phận này);
5. Khe sáng: có tác dụng chỉ cho một tia đơn sắc đi qua;
6. Kính lọc phụ: có tác dụng lọc các tia tạp còn lại khỏi dòng sáng của tia đơn sắc;
7. Cuvet chứa dung dịch hấp thụ;
8. Bộ phận phát hiện (detector) là tế bào quang điện (phototube) hoặc ống nhân quang (photomultiplier tube); có tác dụng tiếp nhận dòng tia đơn sắc sau khi đã bị dung dịch đo hấp thụ một phần, tạo nên một dòng quang điện;
9. Bộ phận khuếch đại (amplifier): có vai trò khuếch đại dòng quang điện;
10. Bộ phận thể hiện kết quả đo phô: đồng hồ đo (meter) hoặc bộ phận ghi (recorder): thể hiện độ hấp thụ quang A hoặc độ truyền qua T (Hình 7.1).



Hình 7.1: Sơ đồ khái của một máy quang phổ: (1) Đèn W (hoặc D₂), (2) Gương cong, (3) Hệ thống thấu kính, (4) Lăng kính hoặc cách tử, (5) Khe sáng, (6) Kính lọc phụ, (7) Cuvet đựng dung dịch chất hấp thụ, (8) Tế bào quang điện hoặc ống nhân quang, (9) Bộ khuếch đại, (10) Đồng hồ đo chỉ độ hấp thụ quang A hoặc độ truyền qua T.

3. ỨNG DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

Phương pháp quang phổ là một phương pháp phân tích, định lượng các chất hoá học, được ứng dụng trong nhiều ngành khoa học: hoá sinh, hoá phân tích, hoá vô cơ, hoá hữu cơ, hoá lý, hoá địa chất, hoá dược, hoá pháp y và nhiều ngành khoa học khác, cụ thể như sau:

3.1. Phân tích và giải thích phổ của chất hoá học

Các hydrocarbon no chỉ có các liên kết đơn nên chỉ chứa các điện tử σ, do vậy chỉ có thể có sự chuyển dịch $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Năng lượng đòi hỏi cho quá trình chuyển đổi này là 185 Kcal/mol, tương ứng với năng lượng của các photon thuộc vùng tử ngoại xa, tử ngoại chân không, nghĩa là chúng không hấp thụ (trong suốt) trong vùng tử ngoại gần. Vì vậy, một số hydrocarbon (ví dụ: hexan, octan ...) được sử dụng làm dung môi cho một số chất để đo ở vùng tử ngoại.

Các chất có liên kết đôi có quá trình chuyển đổi điện tử $\pi \rightarrow \pi^*$ nên có một đỉnh hấp thụ mạnh (λ_{\max}) ở vùng có bước sóng 190 nm với $\epsilon > 10^4$, khi được gắn thêm nhóm thế vào liên kết đôi thì đỉnh hấp thụ chuyển về bước sóng dài hơn.

Các phân tử có 2 liên kết đôi tách biệt có phổ hấp thụ không khác gì so với phân tử chỉ có một liên kết đôi. Tuy nhiên, các phân tử có các liên kết đôi luân hợp (ví dụ: 1,3-butadien) thì có đỉnh hấp thụ chuyển về bước sóng dài hơn. Khi mở rộng sự luân hợp, phân tử có mạch luân hợp càng dài thì đỉnh hấp thụ cực đại càng chuyển dịch sang đỏ, cường độ hấp thụ càng tăng và có thể có λ_{\max} ở vùng khả kiến.

Các phân tử có nhân thơm và nhân thơm dị vòng có các liên kết đôi luân hợp, có sự chuyển đổi điện tử $\pi \rightarrow \pi^*$ nên có λ_{\max} nằm trong khoảng trên dưới 200 nm. Ví dụ: benzen là chất có nhân thơm đơn giản nhất có 3 đỉnh hấp thụ là 184 nm, 204 nm và 256 nm.

Các phân tử sinh học như các acid amin thơm và dị vòng như phenyl alanin, tyrosin, tryptophan và histidin có đỉnh hấp thụ trong vùng tử ngoại vào khoảng 280 nm; các peptid có đỉnh hấp thụ vào khoảng 200 đến 220 nm; các protein có λ_{\max} vào khoảng 280 nm là nhờ sự hấp thụ tử ngoại của các acid amin thơm và dị vòng

như tyrosin, tryptophan và một phần là nhờ phenyl alanin. Acid nucleic cũng hấp thụ mạnh ở bước sóng 280 nm. Hemoglobin có λ_{max} ở 559 nm, tuy nhiên, khi kết hợp với oxy, HbO_2 có 3 đỉnh hấp thụ là 415, 542 và 578 nm. MetHb có đỉnh hấp thụ ở 634 nm, khi kết hợp với CN- thì chất này biến hành CyanMetHb, không còn đỉnh hấp thụ ở 635 nm nữa, nhờ phản ứng này có thể định lượng MetHb trong dung dịch.

3.2. Định lượng chất hóa học

Nhiều chất hóa học có thể tạo màu nhờ phản ứng với các chất hóa học khác, màu tạo được có độ hấp thụ tối đa ở một bước sóng nào đó; bước sóng đó được sử dụng để đo mật độ quang học, từ đó tính ra nồng độ chất cần khảo sát dựa vào định luật Lamber- Beer.

Ví dụ: protein + Cu^{2+} (môi trường kiềm) → phức hợp màu tím hồng (hấp thụ mạnh ở bước sóng 546 nm). Đo màu ở bước sóng 546 nm, đối chiếu với dung dịch protein mẫu được tiến hành trong cùng điều kiện, xác định được nồng độ protein trong dung dịch cần khảo sát.

3.3. Định lượng hoạt độ enzym

Hoạt độ enzym có thể được xác định bằng cách xác định hoặc bằng lượng cơ chất mất đi hay bằng lượng sản phẩm tạo thành, hoặc bằng sự thay đổi nồng độ coenzym tương ứng. Ví dụ: Các coenzym NADH, NADPH có hai đỉnh hấp thụ ở 265 và 340 nm, khi bị oxy hoá thành NAD^+ và NADP^+ thì không còn đỉnh hấp thụ ở 340 nm nữa. Vì vậy, việc đo sự giảm mật độ quang ở bước sóng 340 nm chính là cơ sở để tính toán lượng NAD^+ hoặc NADP^+ được tạo thành, nghĩa là xác định được hoạt độ của enzym dehydrogenase tương ứng.

4. THỰC HÀNH

4.1. Tìm bước sóng cực đại của một dung dịch chất hấp thụ

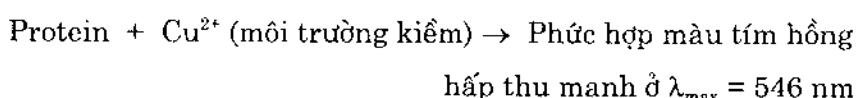
Khảo sát phổ của NAD^+ (hoặc NADP^+) và NADH (hoặc NADPH) trong khoảng bước sóng từ 200 đến 400 nm.

Khảo sát phổ của acid amin thơm (phenylalanin hoặc tyrosin) trong khoảng bước sóng từ 200 đến 400 nm.

4.2. Vẽ đồ thị chuẩn và xác định nồng độ của một dung dịch protein

4.2.1. Vẽ đồ thị chuẩn của một dung dịch protein

Nguyên tắc: Dựa trên kỹ thuật Gornall, sử dụng thuốc thử biuret:



Tiến hành: Lấy 5 ống nghiệm, ghi số ống nghiệm, lần lượt cho vào từng ống như sau:

Thuốc thử (mL)	Ống nghiệm số				
	0	1	2	3	4
NaCl 0,9%	0,020				
Protein 20g/L		0,020			
Protein 40g/L			0,020		
Protein 60g/L				0,020	
Protein 80g/L					0,020
Thuốc thử Biure	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Lắc kỹ, để 30 phút ở nhiệt độ phòng, đo mật độ quang ở bước sóng 546nm, đối chiếu với ống trắng (ống số 0).

Vẽ đồ thị chuẩn với trục hoành là nồng độ dung dịch protein (g/L) và trục tung là mật độ quang, sau đó tính hệ số hấp thụ quang. Hệ số hấp thụ quang được tính tại mỗi điểm dựa theo nguyên tắc:

Trong khoảng mật độ quang OD <0,60, mật độ quang phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ dung dịch chất hấp thụ, ta có:

$$C_{thử}/ C_{mẫu} = D_{thử}/ D_{mẫu} \longrightarrow C_{thử} = C_{mẫu} \times D_{thử}/ D_{mẫu}$$

Hệ số hấp thụ quang tại mỗi điểm được tính bằng công thức: $F = C_{mẫu} / D_{mẫu}$.
Lấy tổng tất cả các hệ số hấp thụ tương ứng với các nồng độ protein khảo sát chia cho số nồng độ protein khảo sát, ta có hệ số hấp thụ quang (trung bình) của dung dịch protein.

Chú ý: Theo định luật Lamber- Beer, nếu mật độ quang OD>0,60, nó sẽ không còn tăng tuyến tính khi tăng nồng độ chất hòa tan, vì vậy, ống thử cần được pha loãng bằng NaCl 0,9%, khi đó, kết quả $C_{thử}$ sẽ phải nhân với độ pha loãng.

4.2.2. Xác định nồng độ protein trong một mẫu huyết thanh:

Lấy một ống nghiệm, ghi số, lần lượt cho vào: huyết thanh 0,020 mL, thuốc thử Biure 1,000 mL. Lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 546 nm. Tính nồng độ protein theo công thức:

$$\text{Nồng độ protein huyết thanh: } C_{thử} = C_{mẫu} \times D_{thử}/ D_{mẫu} = \text{Hệ số } F \times D_{thử} (\text{g/L}).$$

Chương 8

PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI

MỤC TIÊU

Sau khi học xong bài này học viên phải trình bày lại được :

1. Nguyên tắc chung của phương pháp điện di protein trên chất giá.
2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự di chuyển của phân tử protein khi điện di.
3. Cách thao tác kỹ thuật điện di protein trên giấy.

NỘI DUNG

Sự chuyển động của các phân tử huyền phù hoặc keo trong điện trường được gọi là sự điện di.

Để nghiên cứu các dung dịch keo và đặc biệt là các protein người ta dùng các phương pháp điện di sau:

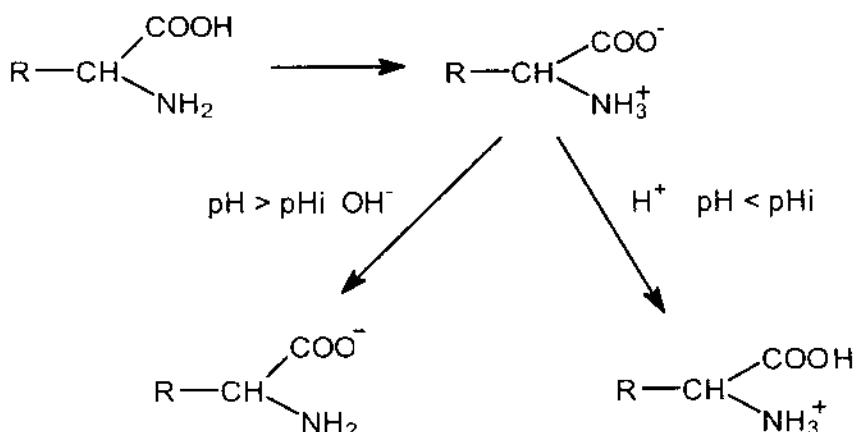
- Phương pháp điện di dưới kính hiển vi (hiện phương pháp này không còn được sử dụng nữa).
- Phương pháp điện di trong dung dịch tự do, còn gọi là phương pháp giới hạn linh động. Ngày nay phương pháp điện di mao quản dựa trên nguyên lý của phương pháp này.
- Phương pháp điện di trên chất giá; hiện là phương pháp thông dụng nhất, còn gọi là phương pháp điện di vùng. Các chất giá thường được dùng là: giấy, thạch, Agar- agar, agarose, acetat cellulose, gel tinh bột, polyacrylamid...

Trong phạm vi bài viết này chỉ đề cập đến phương pháp điện di protein huyết thanh trên chất giá.

1. NGUYÊN TẮC CHUNG

Trong dung dịch đậm có pH khác với pHi của protein, các phân tử protein sẽ tích điện và khi có dòng điện đi qua các phân tử protein sẽ chuyển dịch về các điện cực trái dấu.

Protein là chất đa điện li, được cấu tạo bởi các acid amin, trong phân tử protein có các nhóm carboxyl (-COOH) và nhóm amin (-NH₂) tự do, vì vậy cũng như acid amin, protein có tính chất lưỡng tính. Trong môi trường kiềm pH > pHi của protein, các tiểu phân protein tích điện âm, ngược lại trong môi trường acid pH < pHi của protein, tiểu phân protein tích điện dương. Khi có dòng điện chạy qua, các phân tử protein tích điện, di chuyển về các điện cực trái dấu.



Điện tích của các tiểu phân protein càng lớn khi pH của môi trường càng khác xa với pH_i của protein

Trong môi trường dung dịch đậm pH 8,6, hầu hết các protein của huyết thanh đều tích điện âm, và chúng sẽ di chuyển về cực dương. Các thành phần protein khác nhau của huyết thanh sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau.

2. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN TỐC ĐỘ DI CHUYỂN

2.1. Vai trò của tiểu phân protein

2.1.1. Trọng lượng phân tử và cấu hình của tiểu phân protein

Trọng lượng phân tử và cấu hình của tiểu phân protein ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ di chuyển. Các protein có trọng lượng phân tử nhỏ di chuyển nhanh. Các protein có cấu hình hình cầu (albumin) di chuyển nhanh hơn các protein có cấu hình hình bầu dục (blobulin) và các protein dạng sợi (fibrin). Dung dịch keo protein có độ nhớt đáng kể, độ nhớt cản trở sự linh động của phân tử protein. Lực tác dụng trên một phân tử có điện tích Q trong điện trường có cường độ E được gọi là lực F.

$$F = E \cdot Q$$

Nếu phân tử ở trong môi trường không có độ nhớt thì phân tử thường xuyên được kích thích. Phân tử protein chịu một lực hãm của độ nhớt. Với phân tử protein hình cầu, bán kính R thì độ nhớt làm chậm chuyển động, cản lực F. Lực cản F' được biểu thị theo định luật Stokes.

$$F' = 6\pi \cdot R \cdot \eta \cdot v$$

η : Hệ số độ nhớt

v : Tốc độ di chuyển

R : Bán kính tiểu phân protein

Muốn phân tử protein ở trạng thái linh động thì F phải triệt tiêu F' nghĩa là $F = F'$

$$E \cdot Q = 6\pi \cdot R \cdot \eta \cdot v$$

$$v = E \cdot Q / 6\pi \cdot R \cdot \eta$$

Với điện trường 1V/cm $\rightarrow v = Q / 6\pi \cdot R \cdot \eta$

Như vậy nếu đường kính R càng lớn tốc độ di chuyển càng giảm.

2.1.2. Trạng thái hydrat hoá của tiểu phân protein.

Protein là chất keo ưa nước. Ở dạng dung dịch protein tích điện, phân tử nước lưỡng cực sẽ gắn vào protein ở đầu có diện tích trái dấu với diện tích của protein. Phân tử protein được bao bì bằng các phân tử nước lưỡng cực. Đó là trạng thái hydrat hoá. Trạng thái hydrat hoá phụ thuộc vào các nhóm ion tự do trong phân tử protein, càng nhiều nhóm ion tự do khả năng hydrat hoá càng lớn. Trạng thái hydrat hoá cũng phụ thuộc vào dung dịch đậm. pH của dung dịch đậm càng xa pH_i của protein khả năng hydrat hoá càng lớn. Protein càng hydrat hoá thì đường kính của phân tử keo ưa nước protein càng lớn (mixen protein), tính linh động của protein tăng.

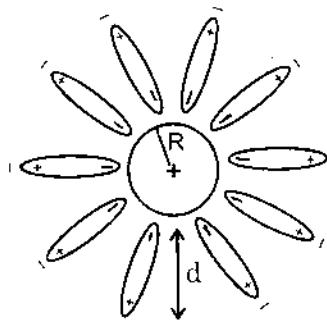
$$v = Q \cdot d / 4\pi R^2 \cdot \eta$$

Q : Diện tích của phân tử protein

R : Bán kính của phân tử protein

d : Chiều dày lớp điện kép

η : Độ nhớt của dung dịch



Như vậy chiều dày của lớp điện kép tăng làm tăng tính linh động của tiểu phân protein.

2.1.3. Thế điện động

Sự tích điện của một phân tử chất keo albumin hay globulin là do sự phân li của các nhóm carboxyl (-COOH), nhóm amin (-NH₂), nhóm hydroxyl (-OH) và sự hấp thu của phân tử với các ion của dung dịch đậm. Hiệu ứng Debeye Hückel làm cho bề mặt protein có một lớp điện tích trái dấu với protein. Nồng độ lớp ion này cao hơn nồng độ của ion trong dung dịch. Giữa diện tích của phân tử protein và lớp điện tích trên bề mặt protein tạo nên một đơn vị điện động (coi như một tụ điện) đó là một thế năng điện động. Theo lý thuyết tĩnh điện:

$$\xi = 4\pi \delta d/D$$

ξ : Hiệu điện thế giữa hai tấm tụ điện

D : Hằng số điện môi

d : Khoảng cách của hai tấm tụ điện

δ : Diện tích / 1cm²

- Sự biến thiên của điện tích phụ thuộc vào pH của dung dịch đậm, pH của dung dịch đậm càng khác xa với pH_i của protein thì điện tích càng lớn.

- Sự biến đổi bề dày của lớp điện kép d biến thiên theo lực ion của dung dịch đậm, dung dịch đậm càng loãng , lực ion càng giảm , khoảng cách giữa hai tấm tụ điện càng tăng , thế điện động tăng. Thế điện động tăng tỷ lệ thuận với tốc độ di chuyển.

2.2.Vai trò của dung dịch đậm

Dòng điện chạy qua dung dịch chất điện li sẽ gây ra sự thay đổi thành phần hóa học của dung dịch và do đó pH của dung dịch thay đổi . pH của dung dịch là một trong những yếu tố quyết định nhất của việc điện di cho nên cần phải giữ cho pH của dung dịch trong suốt quá trình điện di không thay đổi. Chính vì vậy người ta phải dùng dung dịch đậm.Khi chọn dung dịch đậm cần phải chú ý hai yêu cầu:

- Phải giữ cho protein ở trạng thái bền vững, không bị biến tính
- Phải có tác dụng tách tối hỗn hợp protein thành các cấu tử.

Các chỉ số cơ bản của dung dịch đậm là: Bản chất của các ion trong thành phần của dung dịch đậm, pH, lực ion μ

2.2.1. pH của dung dịch đậm

pH của dung dịch đậm là yếu tố quan trọng nhất đối với phương pháp điện di. Khi điện di cần tính đến các yếu tố sau đây:

Nếu pH của dung dịch rất acid (< 3) hoặc rất kiềm (> 10) thì protein có thể bị biến tính , protein sẽ không di chuyển.

Protein có tính chất lưỡng tính, dấu và lượng điện tích của protein phụ thuộc vào giá trị của pH, pH càng xa pH_i của protein tính linh động của protein càng lớn. Nếu xác định được giá trị tính linh động của protein ở các pH khác nhau và thiết lập được đường cong tính linh động theo pH chúng ta có thể tính được pH_i của protein.

2.2.2. Lực ion của dung dịch đậm

Như đã nói ở trên tính linh động của protein phụ thuộc vào thế điện động. Đại lượng này phụ thuộc vào độ dày của lớp điện kép khuếch tán trên bề mặt của phân tử protein. Việc tăng lực ion sẽ làm giảm chiều dày lớp điện kép khuếch tán và do đó làm giảm tính linh động. Ngược lại lực ion giảm (khi dung dịch đậm được pha loãng) tính linh động của phân tử tăng. Nhưng nếu lực ion quá thấp sẽ làm giảm dung tích điện, đồng thời làm giảm tính hòa tan của protein nghiên cứu.

2.2.3. Bản chất của ion

Tính linh động của protein còn phụ thuộc vào bản chất các ion của dung dịch đậm. Mức độ liên kết của các ion với protein khác nhau. Hằng số phân li các ion của các muối cũng khác nhau . Nếu hai dung dịch đậm có cùng pH nhưng khác nhau về bản chất ion thì kết quả điện di cũng khác nhau. Việc chọn dung dịch đậm phụ thuộc vào điều kiện của thí nghiệm, đặc biệt phụ thuộc vào tính chất của protein nghiên cứu.

2.3. Điện thế và cường độ dòng điện

2.3.1. Điện thế

Người ta dùng đại lượng Gradient thế hiệu $G = dv/dl$ là đại lượng đặc trưng cho mức phân bố của thế hiệu theo chiều dài của băng điện di. Gradient điện thế càng lớn tốc độ di chuyển của protein càng cao. Tuy vậy nếu thế hiệu tăng quá cao sẽ làm

bay hơi hơi nước nhiều và sẽ ảnh hưởng đến tốc độ điện di. Thông thường với điện di tách protein, điện thế được dùng phổ biến là 120 – 400 V. Tuy nhiên còn phụ thuộc vào chất giá, với chất giá là polyacrylamid để phân tách protein có khi dùng tới điện thế 1200 V.

2.3.2. Cường độ dòng điện

Cường độ dòng điện không ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ điện di. Mỗi loại chất giá khác nhau dùng một cường độ dòng điện khác nhau.

2.4. Nhiệt độ và độ bay hơi.

Một dòng điện đi qua một chất dẫn điện tất nhiên kèm theo sự tăng nhiệt độ bởi hiệu ứng Jun. Biểu thức của năng lượng này như sau:

$$W = I^2 R / 4,186 = V \cdot I / 4,186$$

W : Nhiệt, tính bằng Calo/giây

V : Điện thế hai đầu chất dẫn điện, tính bằng Vol

I : Cường độ dòng điện, tính bằng Ampe

R : Điện trở của chất giá

Nhiệt độ tăng, hơi nước bốc hơi, điều kiện điện di bị thay đổi liên tục. Vì vậy người ta làm giảm sự tăng nhiệt độ bằng cách băng điện di được đặt trên giá đỡ có dòng nước lạnh chảy qua, hoặc chậu điện di được để trong tủ lạnh với các trường hợp điện di phân tách các enzym.

2.5. Ảnh hưởng của chất giá

Chất giá ảnh hưởng đến khả năng phân tách các protein. Với những chất giá có tính cách là giá đỡ đơn thuần như giấy, agar – agar, acetat cellulose thì khả năng phân tách các protein kém, với protein huyết thanh chỉ tách được 5 – 6 thành phần.

Các chất giá có tính chất là sàng phân tử như gel tinh bột, gel polyacrylamid thì khả năng phân tách tốt hơn, với protein huyết thanh có thể tách được 19 – 21 thành phần.

3. ĐIỆN DI PROTEIN HUYẾT THANH TRÊN GIẤY

3.1. Máy điện di

Gồm hai bộ phận chính:

- Nguồn điện. Nguồn điện thực chất là bộ phận biến đổi dòng điện hai chiều của thành phố thành dòng điện một chiều.
- Chậu điện di gồm hai máng điện di, trong máng chứa dung dịch đệm mỗi máng có một điện cực dương hoặc âm.

3.2. Các dung dịch

Dung dịch đệm: Dung dịch đệm Veronal pH 8,6

Veronal natri 10,3 g

Veronal acid 1,84 g

Nước cất vừa đủ 1000mL

Dung dịch có định và nhuộm màu:

Xanh bromophenol 0,100g

HgCl₂ 50 g

Acid acetic tinh khiết 50 mL

Nước cất vừa đủ 1000mL

Dung dịch rửa 1:

Acid acetic 2% trong nước.

Dung dịch rửa 2:

Natri acetat 10 g

Acid acetic 20 mL

Nước cất vừa đủ 1000 mL

Dung dịch chiết rút màu:

Natri carbonat 20g

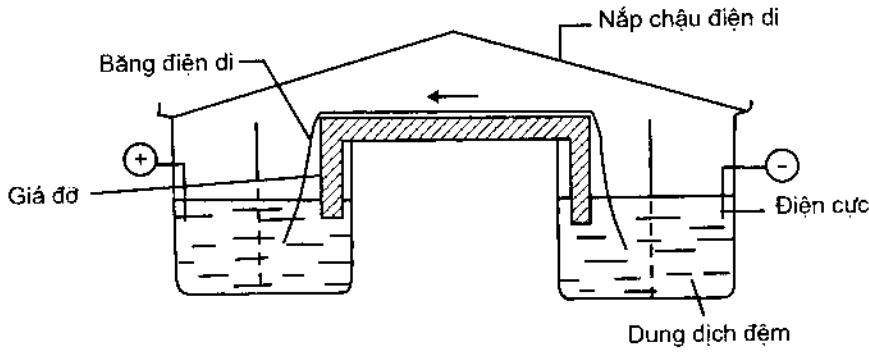
Alcol methylic 300 mL

Nước cất 700 mL

3.3. Tiến hành

Đổ dung dịch đệm vào hai máng của điện di, chú ý hai máng phải có mức dung dịch ngang nhau để tránh “hiệu ứng Xiphông”

- Chuẩn bị băng điện di: Các băng giấy điện di được cắt theo kích thước 25 cm x 2,5 cm, dùng bút chì kẻ vệt xuất phát ở vị trí 1/3 theo chiều dài của băng điện di. Thấm ướt băng điện di bằng dung dịch đệm, đặt băng trên một tấm giấy lọc sạch. Dùng pipet vi lượng đặt 20µl huyết thanh theo vệt xuất phát. Đặt băng điện di lên giá sao cho băng điện di vuông góc với mép của máng điện di, vệt xuất phát ở gần phía cực âm vì các protein sẽ di chuyển về cực dương trong quá trình điện di. Nên đặt một băng điện di với huyết thanh có trộn lăn bleu bromophenol để dễ theo dõi sự di chuyển của protein trong quá trình điện di. Đậy nắp chậu điện di.
- Kiểm tra các điện cực một lần nữa, nối điện cực vào máy.
- Bật công tắc ở đầu máy, điều chỉnh thế hiệu và cường độ thích hợp. Thế hiệu thường dùng cho điện di protein huyết thanh là: 220 V, cường độ là 0,5 mA /1cm chiều ngang của băng điện di.
- Theo dõi vệt màu trên băng điện di có trộn bleu bromophenol. Khi vệt màu cách vệt xuất phát khoảng 5 cm thì ngắt điện, thông thường trong khoảng 3 giờ.
- Ngắt điện.



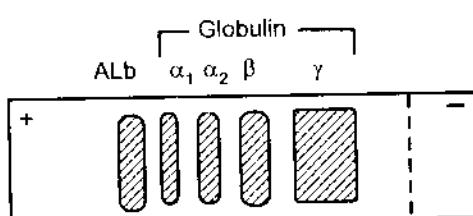
Sơ đồ: Chậu điện di

- Mở nắp chậu điện di, chú ý tránh để các giọt nước trên nắp chậu nhỏ vào băng điện di.
- Theo dõi vệt màu của băng điện di huyết thanh có trộn bleu bromophenol. Vết màu cách khoảng 5 cm thì ngắt điện, tương ứng khoảng thời gian 3 giờ.
- Lên màu băng điện di
 - + Ngâm băng điện di vào dung dịch cố định tối thiểu 3 giờ hoặc qua một đêm.
 - + Ngâm băng điện di trong dung dịch rửa 1 ba lần, mỗi lần 5 phút cho tới khi nền của băng điện di sạch.
 - + Ngâm băng điện di trong dung dịch rửa 2 trong 15 phút
 - + Lấy băng điện ra, để khô ở nhiệt độ phòng .

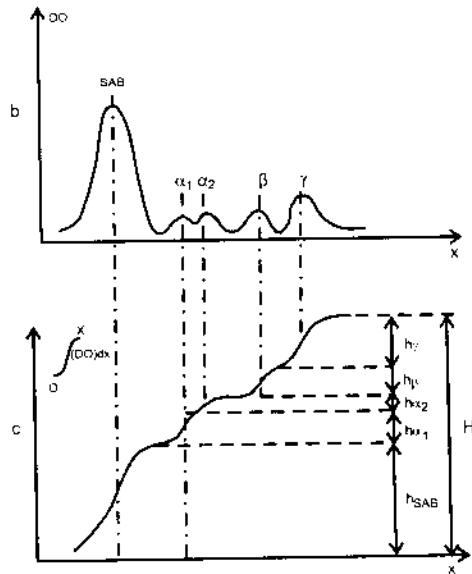
3.4. Kết quả: Điện di protein huyết thanh trên giấy tách được 5 – 6 thành phần: từ cực dương đến cực âm lần lượt là albumin, globulin α_1 , α_2 , β_1 , β_2 và γ

Có thể tính kết quả bằng máy đo màu trên băng điện di. (hình 8.2)

Tính kết quả bằng cách chiết rút màu. Băng điện di được cắt thành những mảnh nhỏ theo hình



Hình 8.1. Vết cắt chia các phân đoạn protein



Hình 8.2. Kết quả điện di được đo màu trực tiếp trên máy Dencitometre

Mỗi mẫu nhỏ tương ứng với một vết protein ,được ngâm trong các ống nghiệm mỗi ống chứa 3mL dung dịch chiết rút màu.sau 30 phút màu tan hết trong dung dịch.

Soi màu ở bước sóng 560 nm so với ống trắng là dung dịch chiết rút màu. Tính tỷ lệ phần trăm của các thành phần

Tỷ lệ phần trăm các thành phần protein trong huyết thanh bình thường là:

Albumin:	$56,6 \pm 7,1\%$
Globulin α_1	$5,3 \pm 1,7\%$
Globulin α_2	$7,8 \pm 3,0\%$
Globulin β	$11,5 \pm 2,3\%$
Globulin γ	$18,6 \pm 4,7\%$

4. ỨNG DỤNG CỦA KỸ THUẬT

Kỹ thuật điện di được dùng để phân tách các acid amin, các protein trong dung dịch chất cần phân tách. Trong Y học, kỹ thuật điện di protein trên các chất giá như giấy, acetat cellulose, gel tinh bột, gel polyacrilamid thường được sử dụng trong các phân tích như;

- Điện di phân tách các protein trong huyết thanh: dùng các chất giá là giấy, acetat cellulose, agar – agar.
- Điện di phân tách hemoglobin: dùng chất giá là giấy , gel tinh bột.
- Điện di phân tách các isoenzym trong huyết thanh: dùng các chất giá là agarosse, acetat cellulose, gel polyacrilamid.

Chương 9

PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các nguyên lý cơ bản và ứng dụng của các phương pháp sắc ký.
2. Thực hiện được kỹ thuật sắc ký phân tách hỗn hợp acid amin trên giấy.

A. CƠ SỞ LÝ THUYẾT

1. NGUYÊN TẮC CHUNG

Sắc ký là một phương pháp tách và phân tích các chất trong một hỗn hợp dựa vào sự phân bố khác nhau của các chất giữa hai pha động và pha tĩnh:

- Pha tĩnh (stationary phase) còn gọi là pha cố định là phần chất liệu hoặc dung dịch được giữ cố định trong quá trình sắc ký. Pha tĩnh có tác dụng giữ các chất lại.
- Pha di động (mobile phase): là phần khí (sắc ký khí), dung dịch (sắc ký lỏng) chảy qua pha tĩnh. Pha di động có tác dụng kéo các chất đi.

Hai pha này luôn tiếp xúc với nhau nhưng không trộn lẫn vào nhau. Các chất có ái lực càng lớn với pha tĩnh sẽ di chuyển càng chậm trong quá trình sắc ký và ngược lại.

2. CÁC PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ CƠ BẢN

2.1. Sắc ký khí

Pha di động là một khí. Mẫu phân tích được hóa hơi ở nhiệt độ cao và nhờ có khí chứa trong bom khí dẫn vào cột phân tách nằm trong buồng điều nhiệt và quá trình phân tách các chất diễn ra ở đây. Cột sắc ký khí thường có đường kính nhỏ (chỉ tính bằng milimet) và xoắn lò xo trong buồng điều nhiệt. Tuỳ theo pha tĩnh người ta phân loại:

2.1.1. Sắc ký khí-rắn: Pha tĩnh là một chất rắn và cơ chế phân tách các chất dựa trên nguyên lý của sắc ký hấp phụ.

2.1.2. Sắc ký khí - lỏng: Pha tĩnh là một chất lỏng và cơ chế phân tách các chất dựa trên nguyên lý của sắc ký phân bố.

Sắc ký khí thường dùng trong phân tích, phát hiện các chất và sử dụng cột sắc ký chuyên dụng. Phương pháp này có ưu điểm là thời gian sắc ký ngắn, lượng mẫu ít, độ chính xác cao.

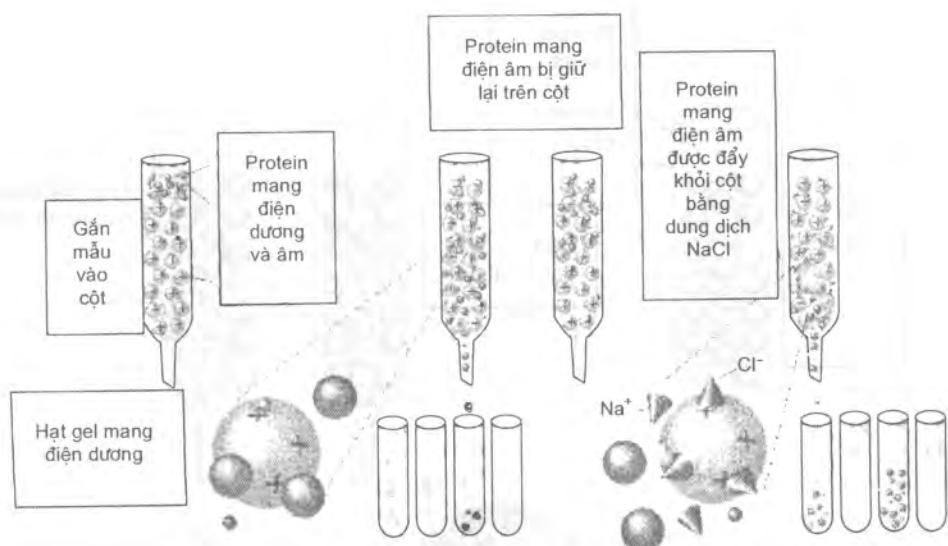
2.2. Sắc ký lỏng

Pha động là một chất lỏng. Có nhiều cách phân loại khác nhau.

2.2.1. Dựa trên đặc tính của pha tinh (cơ chế của quá trình phân tách): có các loại sắc ký sau:

Sắc ký hấp phụ: Còn được gọi là SK lỏng rắn. Các chất trong một hỗn hợp được phân tách dựa trên sự hấp phụ khác nhau của chúng trên bề mặt một chất liệu rắn được sử dụng làm pha tinh.

Sắc ký trao đổi ion (hình 9.1): Pha tinh là một chất rắn mang điện tích. Quá trình phân tách các chất chủ yếu dựa trên khả năng trao đổi ion giữa các chất và pha tinh mang ion. Sắc ký trao đổi ion gồm hai quá trình riêng rẽ :



Hình 9.1. Sự phân tách các chất trên cơ sở sắc ký trao đổi ion

- Gắn chất phân tích mang điện (hoà tan trong pha động) vào ion mang điện tích trái dấu ở pha cố định.
- Đẩy chất phân tích mang điện được giữ trên pha tinh bằng một dung dịch chứa chất mang điện khác (dung dịch đẩy) có ái lực liên kết ion với pha tinh lớn hơn chất phân tích.

Sắc ký phân bố: Pha tinh là một chất lỏng, còn gọi là sắc ký lỏng-lỏng. Các chất được phân tách dựa trên sự phân bố khác nhau của mỗi chất hoà tan vào hai pha lỏng không trộn lẫn với nhau. Mỗi chất có hệ số phân bố riêng trong một hệ dung môi nhất định.

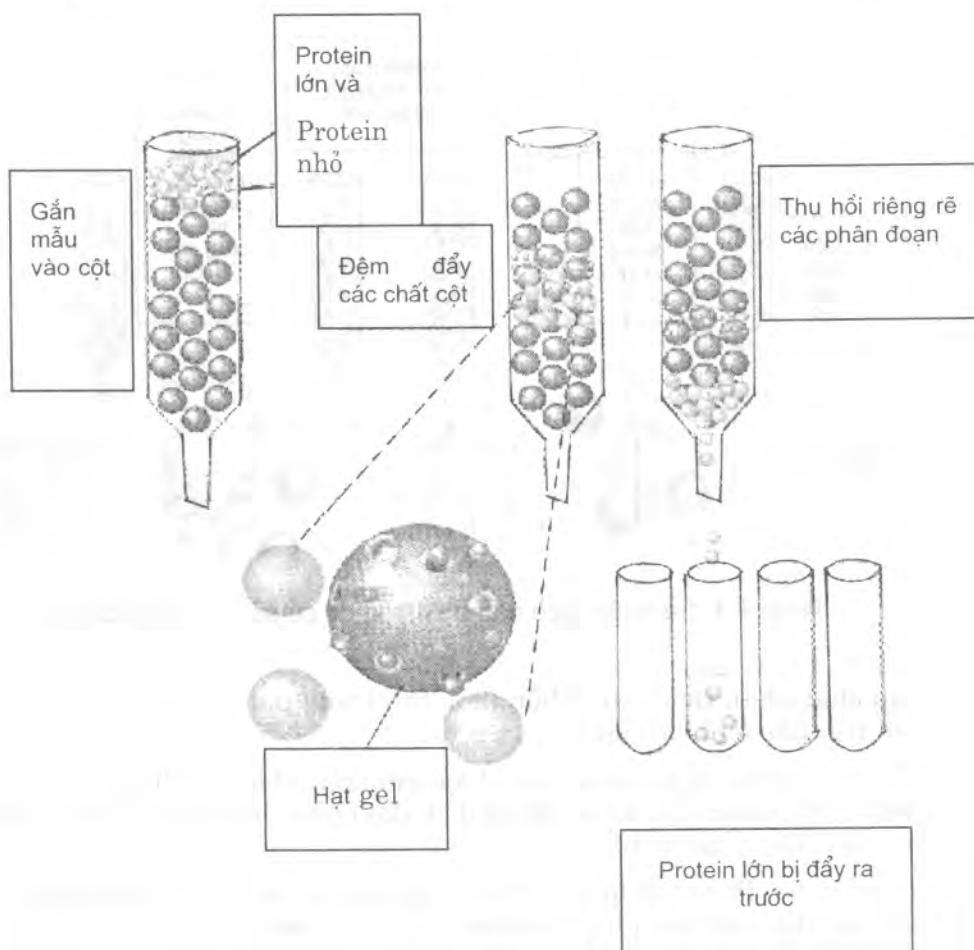
$$K = \frac{Cs}{Cm}$$

Cs : Nồng độ chất trong pha tinh.

Cm: Nồng độ chất trong pha động.

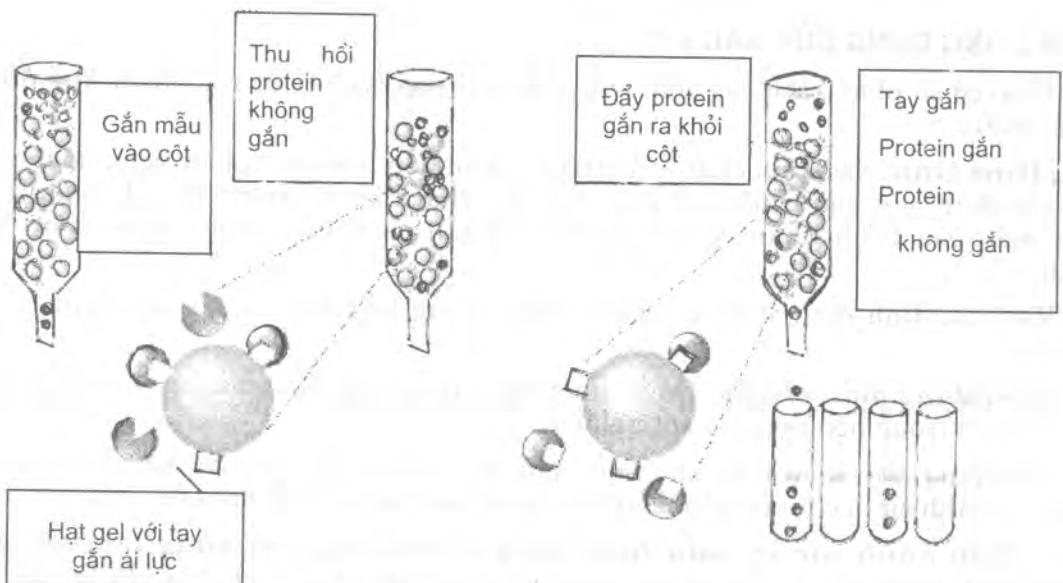
K: Đại lượng đặc trưng cho từng chất phụ thuộc vào bản chất chất tan và nhiệt độ. K càng lớn chất di chuyển càng chậm.

Sắc ký lọc gel (hình 9.2): Còn gọi là sắc sàng phân tử (molecular sieve chromatography) trên cơ sở chất liệu hạt gel xốp với kích thước hạt gel cũng như lỗ hạt gel có thể tạo được theo ý muốn. Trong quá trình sắc ký, các chất được phân tách trên cơ sở kích thước và hình dạng của các phân tử trong mẫu phân tích. Những phân tử lớn của pha lỏng không qua được các lỗ gel nên di chuyển qua các chỗ trống, đường đi ngắn hơn nên di chuyển nhanh ra khỏi cột trước. Các phân tử nhỏ chui qua các lỗ của hạt gel, đường đi vòng vèo dài hơn nên di chuyển chậm.



Hình 9.2. Sự phân tách các chất trên cơ sở sắc ký lọc gel.

Sắc ký ái lực (Hình 9.3): Pha cố định là một chất giá có phân tử lớn, trơ, trên đó gắn một chất có ái lực sinh học đặc hiệu với một loại cấu tử hoà tan của mẫu phân tích. ái lực gắn sinh học thường là các phản ứng kiểu enzym-cơ chất, kháng nguyên-kháng thể.



Hình 9.3: Sự phân tách các chất trên cơ sở sắc ký ái lực.

2.2.2. Phân loại dựa trên hình dạng pha tĩnh.

Sắc ký giấy: Pha tĩnh thường là nước được giữ ở các hạt cellulose của tờ giấy.

Sắc ký lớp mỏng: Pha tĩnh là chất hấp phụ được hòa thành nhũ dịch sau đó trãi lên phiến kính thành một lớp mỏng, rồi sấy khô để hoạt hóa.

Sắc ký cột: Chất liệu làm pha tĩnh được nhồi vào cột. Tuỳ loại chất liệu tạo cột mà có tất cả các loại sắc ký theo nguyên lý ở trên. Ngoài ra tuỳ áp lực trên cột trong quá trình sắc ký mà phân chia thành:

- **Sắc ký cột mở :** Cột thuỷ tinh làm sắc ký không có khả năng chịu lực và hệ thống sắc ký được thông tự nhiên với khí trời.
- **Sắc ký lồng cao áp (FPLC hoặc HPLC):** Cột sắc ký được làm bằng thuỷ tinh hoặc bằng thép chịu lực. Pha di động được bơm vào cột với áp lực cao trong một hệ thống sắc ký kín.

2.2.3. Phân loại theo cách tiến hành.

Sắc ký khai triển: Cho hỗn hợp sắc ký lên pha tĩnh, cho pha di động chạy qua pha tĩnh. Các chất phân tách nằm trên pha tĩnh và được phát hiện ngay trên pha tĩnh.

Sắc ký rửa giải: Giống như sắc ký khai triển, nhưng pha di động tiếp tục cho chảy qua pha tĩnh cho tới khi các chất phân tích được đẩy ra khỏi pha tĩnh.

Sắc ký thay thế: Trong nhiều trường hợp chất phân tích được gắn vào pha tĩnh với ái lực mạnh và chúng chỉ được đẩy khỏi pha tĩnh bằng một dung dịch chứa chất đẩy có ái lực với pha tĩnh mạnh hơn để thay thế chất phân tích.

Sắc ký đăng điện tập trung: Mẫu phân tích gắn vào pha tĩnh trong sắc ký cột bằng liên kết ion. Dung dịch đẩy tạo ra một gradient pH trên cột sắc ký và các chất sẽ được đẩy khỏi cột (pha tĩnh) ở pH đúng bằng pH_i của mỗi chất.

3. CÁC ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ

Trên cơ sở phân tách các chất của một hỗn hợp, sắc ký có rất nhiều ứng dụng khác nhau:

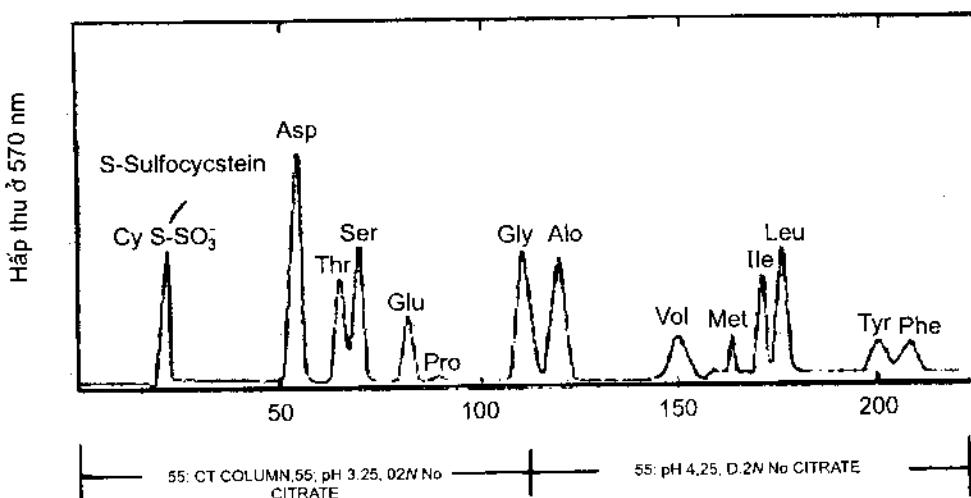
3.1. Định tính: Xác định chất hoặc thành phần hỗn hợp chất phân tích nào đó (ví dụ: xác định một loại thuốc trừ sâu hoặc độc chất nào đó trong dịch thức ăn ở dạ dày, máu của bệnh nhân; xác định thành phần acid amin trong dịch chiết đậu xanh, v.v...).

Việc xác định định tính các thành phần trong hỗn hợp có thể tiến hành bằng hai cách :

3.1.1. Sử dụng mẫu chuẩn: Đó là dung dịch của những chất ở dạng tinh khiết mà giả thiết có trong hỗn hợp cần xét nghiệm.

Đặt dung dịch mẫu tinh khiết và mẫu thử trên cùng giấy sắc ký (nếu sắc ký giấy), so sánh sự di chuyển của mẫu tinh khiết với các vết của mẫu xét nghiệm.

3.1.2. Tiến hành sắc ký mẫu tinh khiết và mẫu thử với cùng loại sắc ký, cùng điều kiện (thường là sắc ký lồng trên cột hoặc sắc ký khí) và ghi lại sắc ký đồ. Tuỳ thuộc vào bản chất hoá học và cấu trúc phân tử của các chất mà mỗi chất được đẩy ra khỏi cột sắc ký và được phát hiện ở những thời điểm khác nhau (gọi là thời gian lưu t). Trên cơ sở thời gian lưu t mà có thể biết mẫu thử có chứa chất cần tìm hay không.



Hình 9.4. Sắc ký trao đổi ion xác định thành phần acid amin của lòng trắng trứng gà thủy phân bằng lysozym và khử bằng dithiothreitol.

3.2. Bán định lượng

Thường dùng trong sắc ký giấy xác định lượng acid amin trong dịch chiết xuất nào đó. Trong trường hợp này, acid amin cần xác định hàm lượng trong dịch chiết được tiến hành sắc ký đồng thời với acid amin chuẩn có lượng đã biết. Sau khi nhuộm màu hiện các vết sắc ký có thể:

- Đo diện tích của mẫu acid amin chuẩn và acid amin trong mẫu thử có thể tính toán sơ bộ lượng acid amin có trong mẫu thử. Cách này ít chính xác.

- Làm thôi màu các vết sắc ký đã lên màu bằng những dung môi thích hợp sau đó định lượng bằng phương pháp so màu.

3.3. Định lượng với độ chính xác cao

Thường dùng sắc ký lỏng hoặc sắc ký khí trên cột vì có khả năng phân tách các chất rất cao và sự ổn định của kỹ thuật. Trên cơ sở sắc ký đồ của mẫu chuẩn (ở dạng tinh khiết và có nồng độ biết sẵn) và sắc ký đồ của mẫu thử có thể tính được một cách chính xác lượng chất nghiên cứu có trong mẫu thử.

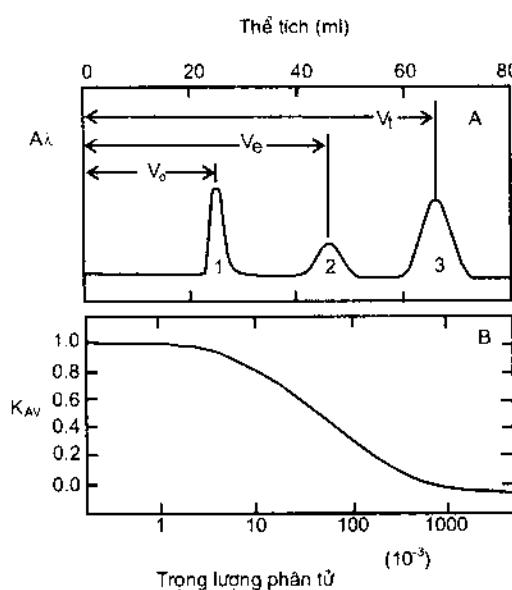
3.4. Xác định độ tinh khiết của một sản phẩm

Thường sử dụng sắc ký lỏng hoặc sắc ký khí trên cột. Thông thường mỗi một chất tuỳ theo đặc tính hoá lý phân tử mà được đẩy ra khỏi cột sắc ký với một đỉnh duy nhất ở một thời điểm nhất định trên sắc ký đồ. Khi một sản phẩm nào đó xuất hiện hai đỉnh trên sắc ký đồ thì chắc chắn sản phẩm đó chứa hai chất khác nhau, có nghĩa là chưa tinh khiết. Khi sắc ký đồ chỉ xuất hiện một đỉnh, thì cần kiểm tra lại sản phẩm bằng một hoặc hai loại sắc ký khác (ví dụ thay sắc ký lọc gel bằng sắc ký trao đổi ion và sắc ký phân bố). Ở hai loại sắc ký mới này, nếu sắc ký đồ vẫn chỉ xuất hiện một đỉnh thì mới chắc chắn sản phẩm đã tinh khiết. Tất nhiên độ tin cậy của mỗi loại sắc ký khác nhau là khác nhau, ví dụ sắc ký ái lực có độ đặc hiệu cao sẽ có độ tin cậy cao hơn.

3.5. Xác định trọng lượng phân tử của protein, ngay cả khi protein chưa được tinh khiết hoàn toàn

Trong trường hợp này thường áp dụng sắc ký lọc gel. Các chất được đẩy ra khỏi cột sắc ký phụ thuộc vào kích thước và trọng lượng phân tử (TLPT) của mỗi chất. Trên cơ sở sắc ký các chất có TLPT chuẩn trong cùng điều kiện sẽ tính toán được TLPT của chất cần xác định.

Cơ sở thực nghiệm xác định TLPT một chất trên cơ sở sắc ký lọc gel được trình bày ở (hình 9.5).



Hình 9.5.

- A- Sắc ký đồ của một hỗn hợp 3 thành phần:
- Chất chỉ đi qua ở bên ngoài hạt gel
 - Chất đi qua một phần bên trong các hạt gel
 - Chất đi qua tất cả các phần bên trong của các hạt gel.
- B - Liên quan giữa sắc ký đồ và TLPT của một chất trên cơ sở Kav.

Chú thích:

Vo : Thể tích ngoài hạt gel của cột sắc ký.

Vt : Thể tích toàn bộ cột sắc ký (bao gồm cả thể tích ngoài hạt gel và thể tích trong các hạt gel).

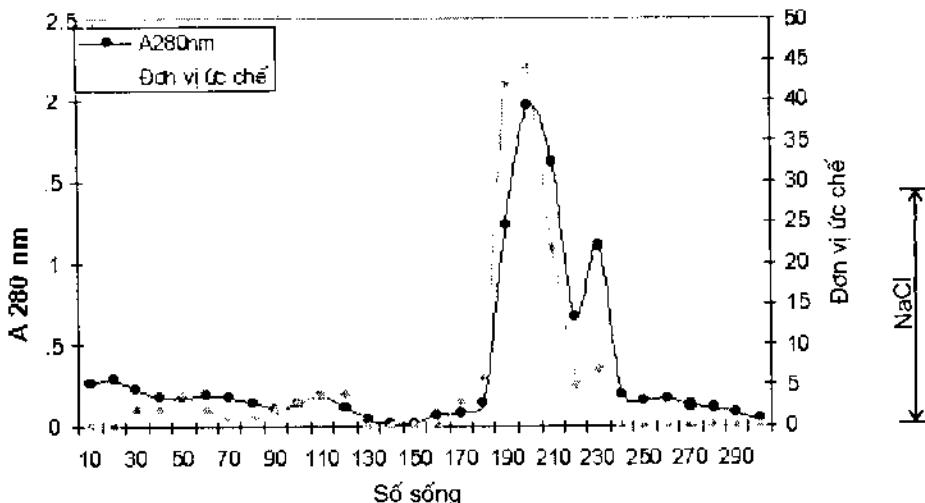
Ve : Thể tích đẩy của một chất nào đó ra khỏi cột sắc ký

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Mỗi một chất, tuỳ theo Ve mà sẽ có Kav riêng. Trên cơ sở giá trị của Kav có thể suy ra TLPT của chất đó như theo đường chuẩn ở hình B.

3.6. Tinh chế một chất

Sắc ký là một kỹ thuật không thể thiếu trong quá trình tinh chế một chất từ các nguồn khác nhau và quá trình tinh chế một chất từ nguồn nào đó thường là sự kết hợp của nhiều loại sắc ký khác nhau. Ví dụ như hình 9.6 minh họa một bước sắc ký trao đổi ion trong quá trình tinh chế Alpha1 antitrypsin từ huyết tương người. Trên sắc ký đồ cho thấy một số đỉnh hấp thụ MĐQH ở 280 nm (đỉnh xác định protein), chứng tỏ Alpha1 antitrypsin chưa được tinh khiết, cần phải thu hồi và tinh chế tiếp.



Hình 9.6. Ví dụ sắc ký trao đổi ion tinh chế Alpha1 antitrypsin huyết tương người

- Ngoài ra, sắc ký còn được sử dụng cho các mục đích khác như : loại muối, cô đặc máu..v.v.

B. THỰC HÀNH SẮC KÝ ACID AMIN TRÊN GIẤY

1. NGUYÊN TẮC

Dựa trên nguyên tắc của sắc ký phân bố. Pha tinh thường là nước được giữ ở giấy sắc ký. Pha di động thường là dung môi hữu cơ bão hòa, nước di chuyển trên tờ giấy sắc ký theo mao dẫn. Giấy ở đây có vai trò giá tựa cho dung môi cố định.

Sự phân tách acid amin dựa trên độ hoà tan khác nhau của acid amin trong hai chất lỏng ít trộn lẫn với nhau : một dung môi là nước và một dung môi là chất hữu cơ (alcol isopropyllic, alcol butylic, phenol,.v.v) bão hòa nước.

Trong những điều kiện nhất định (nhiệt độ, dung môi, loại giấy,.v.v) tốc độ di chuyển của mỗi acid amin được đặc trưng bởi một trị số nhất định gọi là Rf.

$$Rf = \frac{A}{B}$$

A : Khoảng dịch chuyển của acid amin

B: Khoảng dịch chuyển của dung môi.

Acid amin nào càng ít tan trong pha tĩnh và tan nhiều trong pha di động thì tốc độ di chuyển càng nhanh, nghĩa là Rf càng lớn và ngược lại.

Dựa trên trị số Rf chuẩn của mỗi acid amin mà ta có thể định tính được các acid amin trong một hỗn hợp.

2. GIẤY SẮC KÝ

Giấy dùng trong sắc ký là loại giấy phải tinh khiết, trung tính về hoá học, đồng nhất về tỷ trọng.

Giấy sắc ký có bản chất là cellulose có độ tinh khiết và giữ nước cao. Thường là giấy Whatman (Mỹ), FN (Đức).

3. PHA DI ĐỘNG

Dung môi được chọn làm pha di động dựa trên 3 điểm sau:

- Đạt được độ phân tách mẫu phân tích mong muốn
- Ổn định
- Dễ sử dụng, không độc.

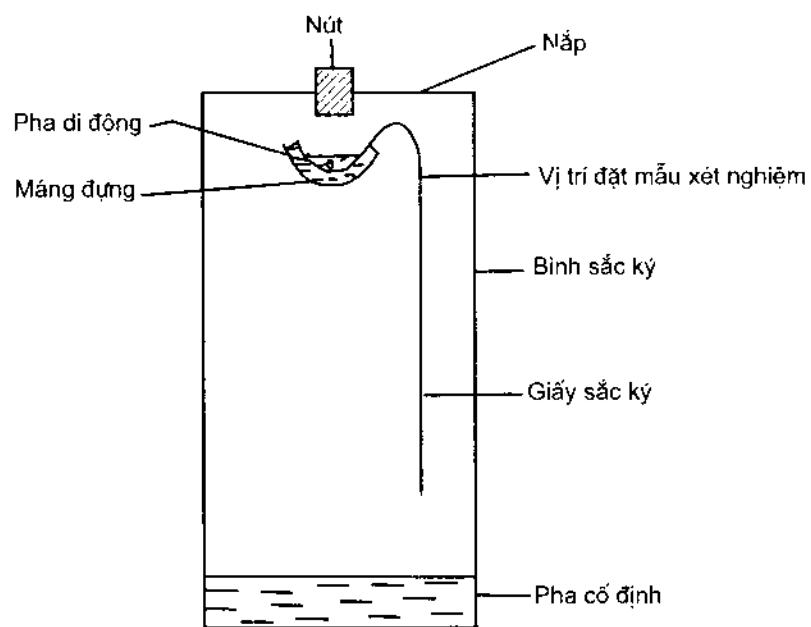
Với phân tích mẫu acid amin, thường là một dung môi hữu cơ và nước, đôi khi có thêm những thành phần khác như acid, base để làm tăng hoặc giảm độ hoà tan một số chất. Tỷ lệ các thành phần của hệ dung môi dùng cho phân tích acid amin như sau:

	Butanol : acid acetic : nước		
	4	1	5
Hoặc	Butanol : Pyridin : nước		
	2	1	5

4. CÁC KỸ THUẬT SẮC KÝ GIẤY

4.1. Sắc ký một chiều đi xuống (hình 9.7).

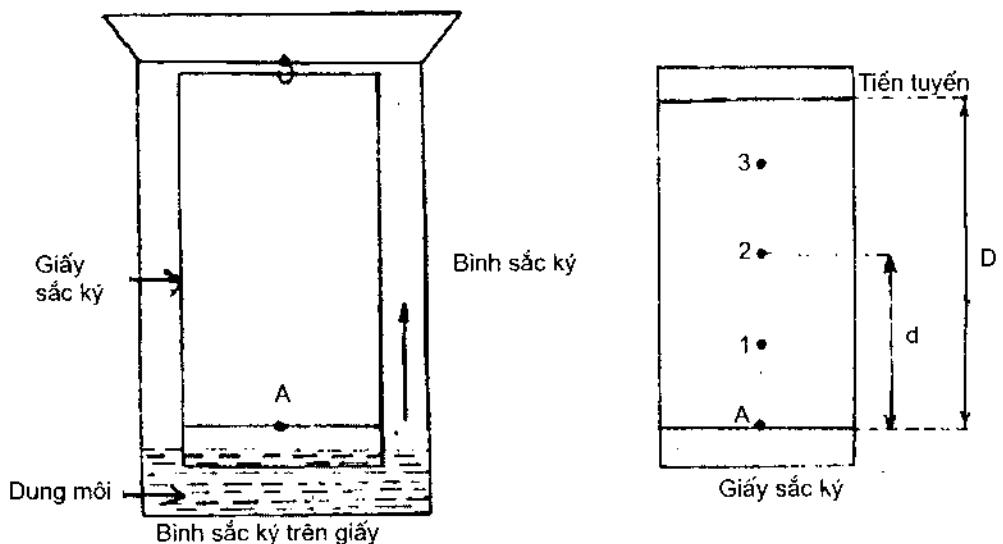
Đầu giấy sắc ký (phía có chấm các mẫu phân tích) được nhúng vào pha di động chứa trong một máng treo ở phía trên bình sắc ký. Giấy nhúng vào dung môi ở máng treo được chặn giữ vào máng bằng một đũa thuỷ tinh nặng. Dung môi theo mao dẫn đi từ trên xuống kéo theo các chất trong mẫu phân tích đã chấm trên giấy.



Hình 9.7. Sắc ký một chiều đi xuống

4.2. Sắc ký một chiều đi lên (sẽ thực hành kỹ thuật này).

Các bước tiến hành cụ thể như sau (hình 9.8):



Hình 9.8. Sắc ký một chiều đi lên của hỗn hợp 3 acid amin

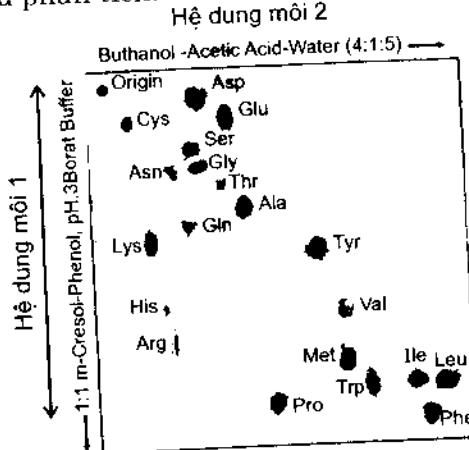
4.2.1. Chấm mẫu thử: Vị trí chấm mẫu thử được đánh dấu trước bằng bút chì nằm trên đường kẻ sẵn (cách đầu giấy sết nhúng vào dung môi khoảng 3cm). Giữa các vết chấm phải cách nhau 2,5-3,0 cm để tránh chập vào nhau trong quá trình chạy sắc ký. Lượng mẫu thử cần chấm tùy thuộc lượng acid amin có trong dung dịch (khoảng 5-10 mg). Dùng các pipet vi lượng để chấm mẫu. Vết chấm phải tròn, nhỏ; nếu lượng dịch chấm nhiều thì chấm nhiều lần sau mỗi lần chấm dùng máy sấy tóc để sấy khô để tránh vết chấm loang rộng.

4.2.2. Chạy sắc ký: Trong kỹ thuật sắc ký này, đầu giấy sắc ký được nhúng vào pha di động đặt ở đáy bình sắc ký (sao cho các vết chấm cách mặt dung môi khoảng 1,5 cm). Dung môi sẽ thẩm lên tờ giấy theo mao dẫn và kéo theo các mẫu phân tích đã chấm trên tờ giấy. Khác với trường hợp sắc ký đi xuống, sự thẩm lên của dung môi ở đây chịu ảnh hưởng của trọng trường, nên khi sắc ký chạy qua 25 cm dung môi sẽ di chuyển rất chậm. Do đó trong sắc ký loại này không nên chạy dài hơn, các chất sẽ phân tán (khuyếch tán).

4.3. Sắc ký hai chiều (hình 9.9).

Đôi khi mẫu phân tích chứa nhiều chất có cấu tạo hóa học gần giống nhau (VD: acid amin có Rf gần giống nhau; dùng một loại dung môi không tách được triệt để. Trong trường hợp này, có thể dùng sắc ký hai chiều sẽ tách tốt hơn.

Sắc ký hai chiều cho phép tận dụng khả năng phân tách của hai hệ dung môi khác nhau trên cùng một mẫu phân tích.



Hình 9.9. Sắc ký hai chiều của hỗn hợp các acid amin tự nhiên

5. PHÁT HIỆN VẾT SẮC KÝ VÀ XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT

5.1. Hiện hình các vết có thể bằng phương pháp lý học (ánh sáng tử ngoại) hoặc hóa học (các thuốc thử thích hợp để hiện màu).

Acid amin được phát hiện bằng thuốc thử ninhydrin.

Khi dung môi chạy gần đến mép trên của giấy sắc ký (sắc ký một chiều di lên), lấy giấy sắc ký ra cho bay hơi hết dung môi ở nhiệt độ thường hoặc ở 60°-80°C. Phun hoặc tráng thuốc thử ninhydrin đều khắp tờ giấy sắc ký, sau đó sấy khô ở 80° - 100°C.

5.2. Xác định các chất

Có thể xác định các chất bằng phương pháp sau:

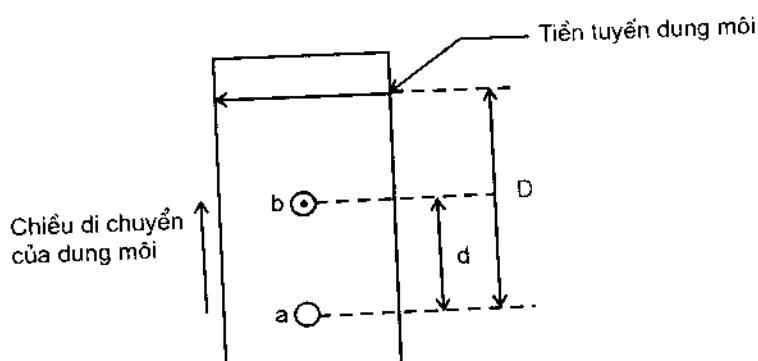
5.2.1. Xác định Rf (retension factor): Sau khi chạy sắc ký, đánh dấu tiền tuyến dung môi rồi phơi khô cho bay hết dung môi (nếu không đánh dấu trước sẽ không xác định được điểm tiền tuyến này). Phun ninhydrin, hiện màu các vết acid amin ở 80°C rồi tính Rf của mỗi vết sắc ký theo công thức (hình 9.10).

So sánh Rf của các vết sắc ký với Rf chuẩn của các acid amin đã biết (chạy ở cùng điều kiện sắc ký) rồi suy ra thành phần acid amin của mẫu thử. Tuy nhiên, Rf có thể bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố mặc dù đã sử dụng cùng một hệ dung môi sắc ký như: độ dày, độ xốp, độ tinh khiết của giấy và nhiệt độ trong quá trình sắc ký. Vì vậy, người ta cũng ít dùng phương pháp này với Rf chuẩn.

$$Rf = \frac{d}{D}$$

d = khoảng cách di chuyển của chất cần xét nghiệm

D = khoảng cách di chuyển bởi dung môi di động



Hình 9.10. Cách xác định Rf của chất trong sắc ký giấy

a = điểm xuất phát mang chất cần xét nghiệm

b = vết của chất cần xét nghiệm sau khi chạy sắc ký

5.2.2. Dùng chất chuẩn: Thông thường và chính xác là sử dụng các chất chuẩn (VD: các acid amin tinh khiết đã biết). Các acid amin chuẩn được chấm bên cạnh mẫu thử và cùng chạy sắc ký một lần. Trên cơ sở các acid amin chuẩn có thể suy ra thành phần acid amin của mẫu thử.

6. ĐỊNH LƯỢNG CÁC CHẤT SAU CHẠY SẮK KÝ

- Có thể ước lượng sơ bộ hàm lượng các acid amin trong mẫu thử trên cơ sở so sánh diện tích của các vết acid amin mẫu thử với diện tích của các vết acid amin chuẩn có hàm lượng đã biết.
- Xác định hàm lượng các acid amin bằng cách cắt riêng các vết, thôii màu bằng dung môi thích hợp và đo đậm độ dung dịch thôii màu bằng phương pháp quang phổ. Tính hàm lượng các acid amin trên cơ sở mật độ quang học của các acid amin chuẩn đã biết sẵn nồng độ.

Chương 10

KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các loại sai số và các bước tiến hành kiểm tra chất lượng (KTCL) xét nghiệm trong các giai đoạn làm xét nghiệm.
2. Giải thích được ý nghĩa của việc KTCL xét nghiệm trong xét nghiệm lâm sàng.

ĐẠI CƯƠNG

Chất lượng của các xét nghiệm đóng vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh. Nhiệm vụ cơ bản của cán bộ làm công tác xét nghiệm Y sinh học đặc biệt là xét nghiệm Hoá sinh là đảm bảo kết quả xét nghiệm của mình phải chính xác gần với trị số thực của nó. Vì vậy việc KTCL xét nghiệm là một trong những phương pháp nhằm đảm bảo kết quả xét nghiệm đáng tin cậy.

Khái niệm về KTCL xét nghiệm đã được đề cập đến từ những năm 1950. Nhiều nước trên thế giới, việc KTCL xét nghiệm đã trở thành thường quy ở các phòng xét nghiệm Y học (Hoá sinh, Huyết học, Virokhuẩn, Ký sinh trùng...). Năm 1967 Hội thảo quốc tế về KTCL xét nghiệm (ISQC - International Symposium on qualitycontrol) được tổ chức lần đầu và từ đó cho đến nay định kỳ 3 năm họp một lần ở nhiều nước trên thế giới.

Ở Việt Nam công tác KTCL xét nghiệm bắt đầu được đề xuất từ 1976 và nay đã được đưa vào chương trình giảng dạy.

Mục đích của việc KTCL xét nghiệm là để phát hiện ra các sai số trong quá trình làm xét nghiệm, qua đó hạn chế đến mức tối đa các sai số nhằm đảm bảo kết quả xét nghiệm chính xác. Kết quả xét nghiệm sẽ giúp cho việc tăng cường chất lượng phòng dịch, chẩn đoán, điều trị, theo dõi tiên lượng bệnh góp phần vào công tác chăm sóc và bảo vệ sức khoẻ toàn dân.

Đảm bảo cho việc thực hiện tốt KTCL xét nghiệm cần phải thực hiện tốt 3 giai đoạn của quá trình làm xét nghiệm:

1. Giai đoạn trước xét nghiệm: Là giai đoạn chuẩn bị làm xét nghiệm, chuẩn bị cho việc lấy bệnh phẩm, chuẩn bị bệnh nhân, chuẩn bị thuốc thử và các dụng cụ cần thiết cho xét nghiệm.
2. Giai đoạn xét nghiệm: Gồm tất cả các bước tiến hành xét nghiệm, tiến hành làm bằng tay hoặc làm bằng máy, tính kết quả xét nghiệm.
3. Giai đoạn sau xét nghiệm: Sử dụng kết quả xét nghiệm vào các mục đích đặt ra.

Ở các giai đoạn trên đều có thể có những nguyên nhân dẫn đến sai số. Vì vậy, cần phối hợp mọi khâu, mọi giai đoạn để khắc phục và loại trừ sai số để cho kết quả xét nghiệm có đủ độ tin cậy.

1. KTCLXN Ở GIAI ĐOẠN TRƯỚC KHI LÀM XÉT NGHIỆM

Trong giai đoạn này việc đảm bảo lấy mẫu xét nghiệm một cách chính xác góp phần không nhỏ vào kết quả tin cậy của xét nghiệm. Lấy mẫu làm xét nghiệm là khâu đầu tiên của công tác xét nghiệm. Nếu khâu này có một cán bộ chuyên trách đảm nhận thì quy trình lấy mẫu sẽ được đảm bảo. Tuy nhiên phần này các cán bộ làm công tác xét nghiệm đều phải nắm được các nguyên tắc cơ bản và thành thạo các kỹ thuật lấy bệnh phẩm, góp phần hạn chế sai số của kết quả xét nghiệm và đảm bảo chất lượng xét nghiệm ở giai đoạn đầu tiên này.

1.1. Cách lấy và bảo quản bệnh phẩm làm xét nghiệm (xem chương 6...).

1.2. Những thay đổi sinh lý của kết quả xét nghiệm

Một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm:

- *Giới:* Một số chất như hemoglobin, acid uric nam cao hơn nữ, các enzym GOT, GPT nam giao động rộng hơn nữ, các hormon... phụ thuộc vào giới.
- *Tuổi:* Một số chất có nồng độ thay đổi theo lứa tuổi:
 - Trẻ sơ sinh có bilirubin, phosphatase kiềm cao hơn, ure, creatinin, protein, glucose huyết thanh thấp hơn người lớn.
 - Creatinin, cholesterol, phosphatase kiềm huyết thanh ở người cao tuổi cao hơn ở người trưởng thành.
- *Chế độ ăn và tình trạng dinh dưỡng* của cơ thể cũng ảnh hưởng đến nồng độ một số chất trong huyết thanh. Sau bữa ăn triglycerid, đường, ure tăng nhẹ, gama GT, AST tăng nhẹ sau uống rượu, chất cetonic niệu tăng khi đói.... Thuốc lá làm tăng HbCO máu, cà phê làm tăng phân huỷ đường, lipid và làm acid béo huyết thanh tăng.
- *Chế độ luyện tập* có thể làm tăng CK (creatinin kinase), tăng AST (aspartat aminotransferase), xuất hiện hemoglobin niệu, tăng một số hormon như adrenalin, hormon sinh dục.
- *Một số thuốc bệnh nhân dùng* cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả một số xét nghiệm.
 - Morphin và cocaine làm tăng amylase.
 - Sulfonamid, rimifon làm tăng bilirubin.
 - Corticoid làm tăng cholesterol...

1.3. Chuẩn bị dụng cụ để lấy bệnh phẩm.

- Bơm tiêm
- Ống nghiệm chứa máu.
- Bộ và ống nghiệm chứa nước tiểu.

Tất cả phải vô khuẩn, khô để chống nhiễm khuẩn và vỡ hỏng cầu.

2. KTCL Ở GIAI ĐOẠN XÉT NGHIỆM

Trong giai đoạn này, các bước tiến hành xét nghiệm có thể dẫn đến sai số như:

- Bước lấy bệnh phẩm hoặc pha loãng bệnh phẩm.
- Lấy thuốc thử để lên màu phản ứng.
- Trộn đều và để thời gian phản ứng.
- Đo màu và tính kết quả.

Ở mỗi bước trong quá trình tiến hành xét nghiệm đều có thể có các sai số không thể tránh khỏi mặc dù người làm xét nghiệm thao tác rất thận trọng. Mục đích KTCL xét nghiệm giai đoạn này là để phát hiện được các sai số trong quá trình làm xét nghiệm và hạn chế đến mức thấp nhất những sai số. Sai số lý thuyết xảy ra trong quá trình làm xét nghiệm là sai số kỹ thuật.

2.1. Các loại sai số kỹ thuật

Sai số bất ngờ (Random error): Là sai số khó tránh và xảy ra một cách ngẫu nhiên và có thể do các nguyên nhân.

- Đo thuốc thử hỏng.
- Dụng cụ để đo thể tích không chuẩn xác.
- Máy đo và các thiết bị làm xét nghiệm không ổn định.
- Thao tác của người làm xét nghiệm chưa thuần thực.

Sai số hệ thống (Systematic error): Nguyên nhân của sai số này gặp khi:

- Chất lượng thuốc thử xấu.
- Kỹ thuật xét nghiệm không đặc hiệu.
- Hoá chất chuẩn sai hoặc không chính xác.

Loại bỏ sai số này chỉ có thể thực hiện được khi ta phát hiện được nguyên nhân gây sai số.

Sai số bất thường (Gross error): Là sai số "thô bạo" thường xảy ra do:

- Không thực hiện đúng trình tự làm xét nghiệm.
- Nhầm lẫn thuốc thử, dụng cụ đo lường, nhầm bước sóng khi đo màu.
- Tính kết quả sai.

Loại sai số này có thể tránh được nếu các xét nghiệm viên thận trọng trong quá trình làm xét nghiệm và tổ chức tốt phòng xét nghiệm.

Các loại sai số phải được khắc phục trong quá trình làm xét nghiệm. Khắc phục và loại trừ các sai số trong quá trình xét nghiệm là KTCL xét nghiệm.

2.2. KTCL xét nghiệm trong phòng xét nghiệm

Trong một phòng xét nghiệm thực hiện KTCL xét nghiệm còn được gọi là nội KTCL.

Mục đích:

- Đánh giá những kết quả xét nghiệm thực hiện ở mỗi phòng xét nghiệm.
- Đảm bảo tính tin cậy của các kết quả xét nghiệm.
- Giúp cho mỗi phòng xét nghiệm tự đánh giá được giá trị của kỹ thuật xét nghiệm cùng sự hoạt động có hiệu quả phòng xét nghiệm của mình.
- Đánh giá tay nghề của mỗi một cán bộ làm xét nghiệm.
- So sánh kết quả xét nghiệm của phòng mình với những kết quả xét nghiệm của những phòng xét nghiệm khác áp dụng cùng loại kỹ thuật.

Chương trình KTCL xét nghiệm bao gồm:

- Kiểm tra độ chính xác (Precision).
- Kiểm tra độ xác thực (Accuracy).

Một kết quả xét nghiệm được coi là tin cậy khi nó có đủ hai thông số là độ chính xác và độ xác thực.

$$\text{Chính xác} + \text{Xác thực} = \text{Tin cậy}$$

Qua các thông số thống kê ta có thể xác định được độ tin cậy của kết quả xét nghiệm.

2.2.1. Kiểm tra độ chính xác:

- **Khái niệm độ chính xác:**

Độ chính xác là kết quả xét nghiệm thu được phân tán ít so với trị số trung bình (\bar{x}). Độ chính xác tương ứng với khoảng cách giữa kết quả xét nghiệm riêng lẻ với trị số trung bình. Sự phân tán của các kết quả xét nghiệm thu được càng nhỏ thì độ chính xác càng cao và đồ thị hình chuông hẹp. Ngược lại, sự phân tán của các kết quả xét nghiệm thu được càng lớn độ chính xác càng thấp và đồ thị hình chuông dẹt.

Độ chính xác thấp là do nguyên nhân sai số bất ngờ, sai số bất thường, những sai số này có thể tránh được.

Nguyên tắc kiểm tra độ chính xác là kiểm tra tính "lặp lại" các kết quả xét nghiệm (làm nhiều lần xét nghiệm với cùng một kỹ thuật trên cùng một mẫu xét nghiệm).

- **Huyết thanh kiểm tra (mẫu để kiểm tra).**

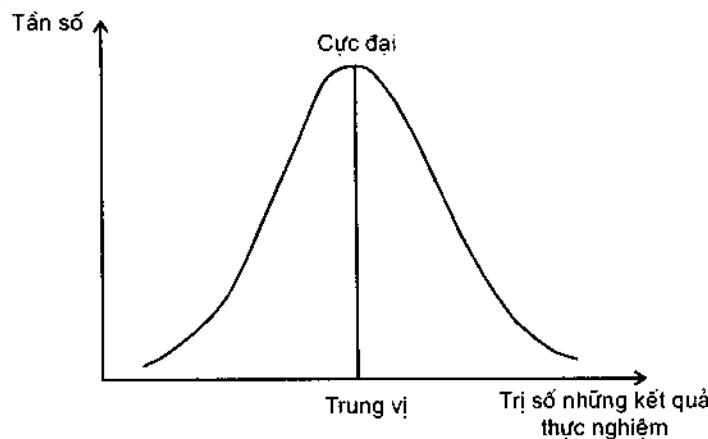
- Tự chế tạo lấy huyết thanh kiểm tra. Nếu phòng xét nghiệm tự tạo lấy huyết thanh kiểm tra cần chú ý:

* Nồng độ các thành phần trong huyết thanh kiểm tra độ chính xác không được biết nhưng không được rơi vào vùng bệnh lý.

* Thu thập huyết thanh dùng làm mẫu kiểm tra bằng cách: hàng ngày thu thập các mẫu huyết thanh thừa trong phòng xét nghiệm (loại các huyết thanh vỡ hồng cầu, huyết thanh đục, tăng bilirubin), huyết thanh được tập chung vào chai 2-3 lit, đặt trong tủ lạnh - 20°C, khi đủ số lượng cho nhu cầu kiểm tra, làm tan huyết thanh ở nhiệt độ thường rồi trộn đều, khuấy từ trong một giờ tránh sủi bọt sau đó lọc hoặc ly tâm 3000v/phút/30giây để loại cục sợi huyết. Hỗn hợp được gọi là huyết thanh kiểm tra sẽ được chia thành nhiều lọ nhỏ, vô khuẩn chứa 10 - 20 ml đậm kín bảo quản ở - 20°C. Khi tiến hành kiểm tra, mỗi lần lấy ra 1 lọ kiểm tra độ chính xác (khi dùng huyết thanh kiểm tra cần làm tan và trộn đều trước khi làm kiểm tra). Huyết thanh kiểm tra này có thể ổn định từ 6 tháng đến 1 năm (có thể cho thêm 10 - 20 mg methiotal cho 100ml huyết thanh để chống nhiễm khuẩn).

- Dùng mẫu chuẩn để làm huyết thanh kiểm tra.
- *Những thông số thống kê sử dụng trong việc kiểm tra độ chính xác:*
 - Sự phân phôi chuẩn - Đường cong Gauss (hình 10.1):

Phân phôi chuẩn là sự phân phôi đối xứng qua trị số trung bình, đường cong hình chuông hoặc đường cong phân bố chuẩn - phân bố đều.



Hình 10.1. Đường cong Gauss

- Trị số trung bình (x đọc là x ngang): Là thông số được tính theo công thức:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

\bar{x} trùng với trung vị khi phân phôi chuẩn là phân phôi đều, khi số lượng kết quả là số lớn.

Trị số trung bình \bar{x} và trung vị chưa cho ta thấy sự phân tán của các trị số kết quả.

Khắc phục điều này có thông số phương sai, độ lệch chuẩn và hệ số phân tán.

- Phương sai (Variance):

Công thức tính V:

$$V = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

$\sum (x_i - \bar{x})^2$ là tổng số bình phương các hiệu số của mỗi trị số kết quả với trị số trung bình.

n là số lượng các trị số riêng biệt.

- Độ lệch chuẩn (SD - standard deviation)

SD được đọc là sigma - δ .

Công thức tính δ :

$$\delta = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n-1}$$

với điều kiện n < 30.

Độ lệch chuẩn đánh giá sự phân tán của các trị số riêng biệt bằng trị số tuyệt đối. Một phân bố được gọi là chuẩn thì:

68% trị số nằm trong giới hạn $\bar{x} \pm 3\delta$.

95% trị số nằm trong giới hạn $\bar{x} \pm 2\delta$.

99,7% trị số nằm trong giới hạn $\bar{x} \pm \delta$.

Thông thường người ta lấy giới hạn $\bar{x} \pm 2\delta$ là vùng của các giá trị bình thường trong phân phối chuẩn.

- Hệ số phân tán (CV - Coefficient of variation)

CV là tỷ số biểu thị dưới dạng phần trăm của độ lệch chuẩn trên trị số trung bình.

$$CV = \frac{\delta}{\bar{x}} \cdot 100$$

Thông thường CV của các kỹ thuật xét nghiệm các thông số bình thường như: Định lượng glucose huyết thanh, cholesterol huyết thanh, acid uric huyết thanh, bilirubin huyết thanh, creatinin huyết thanh... cho phép < 5%. Các xét nghiệm về enzym, hormon... có độ giao động sinh học lớn, CV cho phép từ 5 - 10%.

- Để thuận lợi cho việc KTCL xét nghiệm cần lập bảng tính toán sau:

n	Kết quả x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
	x_1		
	x_2		
	...		
	x_n		
	Σx_i		$\Sigma (x_i - \bar{x})^2$

Từ bảng trên tính ra được \bar{x} , δ , CV...

- Quy trình thực hiện kiểm tra độ chính xác

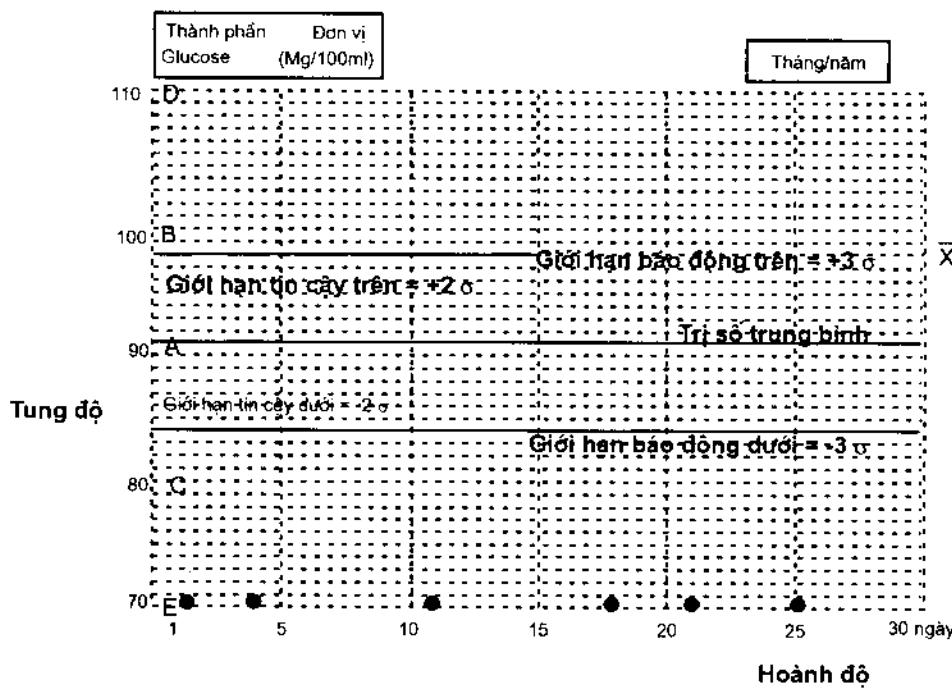
1. Thiết lập bảng tính toán các thông số đánh giá độ chính xác

Các thông số sẽ được tính toán: \bar{x} , s , CV%

Chữ ký của người phụ trách.

2. Bảng kiểm tra độ chính xác (hình 10.2)

- Dùng bảng kiểm tra độ chính xác cho phép theo rỗi việc kiểm tra độ chính xác trong thời kỳ kiểm tra.
 - Bảng kiểm tra độ chính xác được vẽ trên một tờ giấy kẻ ô ly, ở trục hoành ghi ngày làm xét nghiệm, trục tung có 5 điểm; điểm giữa tương ứng với giá trị \bar{x} , hai điểm trên dưới kế tiếp là tương ứng với giá trị $\bar{x} \pm 2\delta$, hai điểm trên dưới tiếp theo tương ứng với giá trị $\bar{x} \pm 3\delta$. Từ 5 điểm thiết lập 5 đường kẻ ngang theo hoành độ.



Hình 10.2. Bảng kiểm tra độ chính xác

3. Các bước tiến hành kiểm tra độ chính xác

- Bước một tiến hành kiểm tra độ chính xác thời kỳ sơ bộ: Thời kỳ này huyết thanh kiểm tra được sử dụng để định lượng các chất riêng biệt trong 20 ngày. Kết quả định lượng này được sử dụng để tính toán các thông số \bar{x} , δ cho từng loại xét nghiệm theo bảng tính toán các thông số đánh giá độ chính xác, các thông số này dùng để vẽ các bảng kiểm tra độ chính xác cho từng loại xét nghiệm.
- Bước hai tiến hành kiểm tra độ chính xác thời kỳ chính thức: Huyết thanh kiểm tra được làm song song cùng với lô xét nghiệm thường quy. Kết quả tính toán được sẽ sử dụng vào 2 bảng.
 - + Bảng tính toán số liệu hàng ngày kiểm tra độ chính xác (ghi ngày làm xét nghiệm và kết quả vào bảng).
 - + Bảng kiểm đã được xác lập từ kiểm tra độ chính xác thời kỳ sơ bộ (đánh dấu vào bảng kiểm đúng vị trí và ngày làm xét nghiệm).

Chú ý giai đoạn này không dùng giá trị của các mẫu kiểm tra độ chính xác được làm cùng với lô xét nghiệm để điều chỉnh kết quả xét nghiệm thường quy.

4. Đánh giá độ chính xác

Qua kết quả tiến hành kiểm tra độ chính xác thời kỳ chính thức ta có thể đánh giá việc kiểm tra độ chính xác qua:

- Qua bảng kiểm tra: xác định các trường hợp sau:
 - Số trị số nằm ngoài giới hạn báo động.
 - Số trị số nằm trong giới hạn tin cậy.

Kết luận về kiểm tra độ chính xác qua 2 thông số trên. Độ chính xác tốt là không hoặc dưới 5% số điểm kiểm tra rời khỏi vùng giới hạn tin cậy.

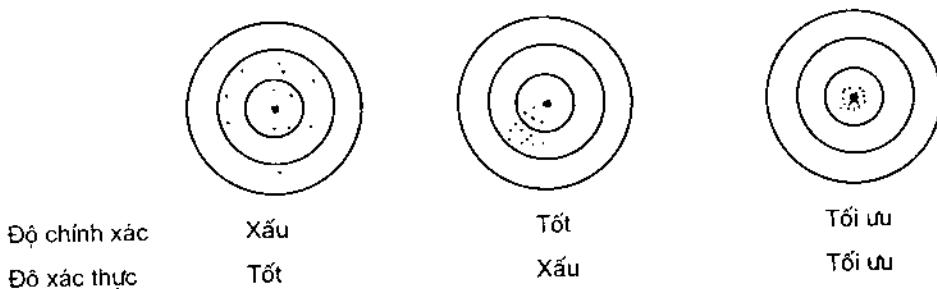
- Qua hệ số phân tán: Qua bảng tính toán số liệu hàng ngày trong 1 tháng ta tính được CV. Hệ số phân tán (CV) trong điều kiện làm xét nghiệm bình thường đối với các thông số nồng độ protein huyết thanh, glucose huyết thanh, ure máu, acid uric máu... chỉ cho phép CV < 5%. Nếu với các xét nghiệm đặc biệt như nồng độ creatinin, cholesterol, bilirubin, hoạt độ các enzym thì CV có thể cho phép từ 5-10%.

2.2.2. Kiểm tra chất lượng xét nghiệm- kiểm tra độ xác thực

Mỗi chất trong mẫu thử đều có trị số thực của nó, việc xác định trị số thực của mỗi thành phần trong một mẫu huyết thanh hay mẫu chuẩn hết sức khó khăn. Những kết quả có trị số gần đến thực là trị số có độ xác thực cao. Mục đích kiểm tra độ xác thực của kỹ thuật là phát hiện và loại bỏ những sai số hệ thống có thể xảy ra trong quá trình làm xét nghiệm.

Một phương pháp xét nghiệm thu được kết quả đúng khi kết quả xấp xỉ bằng trị số thực của nó.

Các tình huống trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm có thể gặp giống như bối cảnh.



Trị số thực là khái niệm lý tưởng rất khó thực hiện được trên thực tế mà chỉ có giá trị số thực theo quy ước. Người ta phải làm lặp lại nhiều lần trên cùng mẫu và kết quả cũng lặp lại nhiều lần được coi là số thực.

- *Các thông số đánh giá độ xác thực:*

- Thông số d biểu thị mức độ xác thực tuyệt đối, được xác định bằng hiệu số giữa trị số thực và trung bình các mẫu kiểm tra.

$$d = |x_o - \bar{x}|$$

\bar{x} có thể là trung bình của nhiều mẫu kiểm tra cũng có thể là một mẫu xét nghiệm nào đó cần kiểm tra.

- Thông số D biểu thị mức độ xác thực tương đối, được xác định bằng tỷ số $\frac{d}{x_o}$.

Tính theo tỷ lệ phần trăm:

$$D = \frac{|x_o - \bar{x}|}{x_o} \cdot 100$$

- **Cách tiến hành kiểm tra độ xác thực.**

Người ta xen vào lô xét nghiệm hàng ngày mẫu kiểm tra chất lượng xét nghiệm - kiểm tra độ xác thực.

Trị số thực của mẫu kiểm tra ký hiệu là x_0 . Thông thường người ta thường làm xen cùng với mẫu kiểm tra độ chính xác.

- **Mẫu kiểm tra độ xác thực - các loại chuẩn:** Có nhiều loại chuẩn.

- Chuẩn cấp một: Hoá chất tinh khiết, trọng khối được xác định bằng phương pháp cân, từ đó pha thành dung dịch chuẩn cấp 1.
- Chuẩn cấp hai: Hoá chất tinh khiết, mà trọng khối xác định bằng phương pháp hoá học, từ đó pha thành dung dịch chuẩn cấp 2 và đối chiếu với dung dịch chuẩn cấp 1.
- Mẫu chuẩn: Dung dịch mẫu chứa nhiều thành phần tương tự huyết thanh, thành phần trong mẫu được xác định bằng các xét nghiệm hoá học.

Ngày nay người ta pha kít để sử dụng và mỗi kít có thể có dung dịch chuẩn tiện lợi cho người sử dụng. Trên thực tế người ta có các dung dịch chuẩn và huyết thanh kiểm tra. Huyết thanh kiểm tra có hai loại:

- + Loại có chứa các chất nồng độ tương đương với trị số bình thường (N).
- + Loại có chứa các chất mà nồng độ tương đương bệnh lý (P).

- **Tiêu chuẩn đánh giá độ xác thực**

Độ xác thực của mỗi kỹ thuật xét nghiệm càng cao thì hiệu số d và D càng nhỏ, kết quả xét nghiệm chỉ được phép chênh lệch so với trị số thực trong những giới hạn sau:

- Tiêu chuẩn 3 hệ số phân tán (CV)

$$D < 3CV$$

Hoặc có thể so sánh d với δ hàng ngày.

$$|x_0 - \bar{x}| < 3\delta.$$

- Tiêu chuẩn 5 hoặc 10%.

Các xét nghiệm thông thường với kỹ thuật chuẩn, đặc hiệu độ xác thực chấp nhận ở mức D% nhỏ hơn 5%.

Các xét nghiệm với kỹ thuật ít đặc hiệu hoặc các xét nghiệm có độ giao động sinh học lớn D% có thể tới 10%.

- Phiếu kiểm tra độ xác thực.

Ngày kiểm tra	Mẫu kiểm tra x_0	\bar{x} (x_i)	$d = x_0 - \bar{x} $	$D\% = \frac{d}{x_0} \cdot 100$	Nhận xét
1					
2					
3					

- Bảng đánh giá độ xác thực của một chất qua 2 tiêu chuẩn.

Chất kiểm tra	D%	CV%	Tiêu chuẩn a- D < 3CV b- D < 10%	Nhận xét
Ví dụ: glucose	5,0	4,3	a- $3CV = 3 \times 4,3 = 12,9\%$ b- 10%	đạt đạt

2.3 Ngoại KTCLXN

Ngoại KTCLXN được dùng để KTCLXN giữa các phòng xét nghiệm ở các vùng khác nhau trên một quốc gia hoặc nhiều quốc gia trên thế giới.

Việc tiến hành KTCLXN tuân thủ các quy định của trung tâm điều phối. Các phòng xét nghiệm tham gia KTCLXN cùng tiến hành làm kiểm tra trên cùng một mẫu huyết thanh kiểm tra, kết quả gửi về trung tâm xử lý và cho kết luận.

3. KTCLXN GIAI ĐOẠN SAU KHI LÀM XÉT NGHIỆM

Giai đoạn này chủ yếu là sử dụng kết quả xét nghiệm và vận dụng kết quả xét nghiệm vào thực tế lâm sàng.

Phần 2

NHỮNG THÍ NGHIỆM VỀ CẤU TẠO HÓA HỌC VÀ CHUYỂN HÓA CHẤT

Chương 11

ENZYM

MỤC TIÊU

1. Về enzym học cơ bản, học viên trình bày được hoạt động của enzym thuỷ phân, enzym oxy hoá khử, các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzym (nhiệt độ, pH, chất hoạt hoá và ức chế), tính đặc hiệu của enzym.
2. Về sử dụng enzym trong lâm sàng, học viên trình bày được nguyên tắc phản ứng, cách tiến hành đo hoạt độ enzym và biện luận được kết quả đo hoạt độ một số enzym trong huyết thanh bệnh nhân.

1. ENZYM HỌC CƠ BẢN

Thí nghiệm 1. Hoạt động của enzym thuỷ phân (amylase)

Nguyên tắc: Tinh bột hoặc glycogen dưới tác dụng của amylase, với sự có mặt của các phân tử nước sẽ bị thuỷ phân thành các sản phẩm trung gian là các dạng dextrin, rồi thành maltose. Nhận biết quá trình thuỷ phân, nghĩa là quá trình tạo thành các loại dextrin khác nhau, bằng phản ứng tạo màu của chúng với iod; nhận biết sự tạo thành maltose bằng thuốc thử Fehling.

Thuốc thử:

Dung dịch tinh bột hoặc glycogen 1% trong nước.

Dung dịch iod 5 mmol/L trong KI 3%

Thuốc thử Fehling (xem chương glucid).

Enzym amylase: Lấy từ nước bọt. Nhổ nước bọt vào một cốc thuỷ tinh nhỏ, để yên vài phút cho tan bớt bọt, hút lấy phần trong cho sang một ống nghiệm khác để sử dụng. Pha loãng nước bọt thành 1/20 để làm thí nghiệm: cho vào một ống nghiệm to:

- Nước cát 19 mL.
- Nước bọt 1 mL.

Lắc đều. Ta được dịch nước bọt pha loãng 1/20.

Tiến hành: Chuẩn bị một khay sứ có nhiều lỗ. Cho vào một ống nghiệm nhỏ:

- Dung dịch tinh bột 1% 2 mL
- Nước bọt 1/20 1 mL

Lắc đều, theo dõi phản ứng thuỷ phân tinh bột xảy ra trong ống nghiệm bằng cách cứ mỗi phút một lần, lấy một giọt dịch thuỷ phân trong ống nghiệm cho vào trộn với một giọt iod trên một lỗ của khay sú. Khi nào dịch ở ống nghiệm không làm thay đổi màu của iod nữa, nghĩa là phản ứng thuỷ phân đã kết thúc, không cần thử phản ứng với iod nữa. Lấy một ống nghiệm khác làm phản ứng Feling:

Thuốc thử Feling 1 mL

Dung dịch thuỷ phân trong ống nghiệm 10 giọt

Lắc đều. Đun cách thuỷ sôi 5 phút. Nhận xét. Giải thích.

Thí nghiệm 2. Hoạt động của enzym oxy hoá khử (aldehyd dehydrogenase)

Nguyên tắc: Aldehyd formic + xanh methylen (dạng oxy hoá có màu xanh da trời) với sự xúc tác của aldehyd dehydrogenase (có trong dịch gan nghiên) trong điều kiện yếm khí sẽ tạo thành acid formic và xanh methylen dạng khử (không màu).

Thuốc thử:

- Dung dịch xanh methylen 0,01% trong nước
- Dung dịch aldehyd formic 0,4% trong nước
- Dầu vaselin (dạng lỏng)
- Dịch nghiên gan (chứa enzym aldehyd dehydrogenase)

Nghiên gan tươi trong cối sú, thêm 6 mL nước, khuấy đều, gạn hoặc lọc lấy dịch gan.

Tiến hành: Cho vào 2 ống nghiệm:

	Ống số 1	Ống số 2
Dịch gan nghiên (mL)	2	2 Đun sôi 3 phút
Xanh methylen (giọt)	1	1
Aldehyd formic (giọt)	1	1
	Lắc đều	Lắc đều
Dầu vaselin (giọt)	10	10

Không lắc, để yên ở nhiệt độ 400C trong 30 phút. Quan sát và giải thích sự biến đổi màu ở hai ống nghiệm.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phản ứng enzym

Nguyên tắc: Nhiệt độ cung cấp năng lượng hoạt hoá cho phản ứng enzym, nhiệt độ khoảng 40°C làm enzym có hoạt tính lớn nhất, nhưng nhiệt độ cao lại gây biến tính enzym, song khi ở nhiệt độ 0°C enzym lại không hoạt động.

Thuốc thử:

- Dung dịch tinh bột 1%

- Dung dịch iod 5 mmol/L trong KI 3%
- Nước bọt pha loãng 1/100

Tiến hành: Cho vào 3 ống nghiệm:

	Ống số 1	Ống số 2	Ống số 3
Nước bọt 1/100 (mL)	1 Để trong đá 15'	1 Để 45°C trong 15'	1 Đun sôi 2', lấy ra để trên giá
Dung dịch tinh bột (mL)	4	4	4

Lắc đều, tiếp tục để các ống ở các nhiệt độ tương ứng. Giả sử phản ứng ở ống số 2 (ở 45°C) xảy ra nhanh nhất, lấy ngay một giọt dịch trong ống 2 làm phản ứng màu với iod trên lỗ đầu tiên của khay sứ. Sau đó cứ mỗi phút một lần, lấy một giọt dịch ở ống số 2 thử với iod trên các lỗ tiếp theo của khay sứ cho đến khi nó không làm chuyển màu iod nữa, nghĩa là tại ống số 2 phản ứng thuỷ phân tinh bột đã kết thúc, thì dừng lại. Ngay lập tức cho ngay vào cả 3 ống, mỗi ống 2 giọt iod. Màu của 3 ống thể hiện tiến trình phản ứng tại thời điểm cho iod vào (cũng là thời điểm dừng phản ứng tại mỗi ống). Quan sát màu của các ống và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của pH đến tốc độ phản ứng enzym

Nguyên tắc: pH ảnh hưởng đến trạng thái ion hoá của enzym. Mỗi enzym có một pH tối ưu cho hoạt động của nó, pH môi trường càng gần pH tối ưu, tốc độ phản ứng càng cao, nghĩa là enzym hoạt động càng mạnh.

Thuốc thử:

- Các dung dịch đệm phosphat có pH 5,6; 6,8 và 8,0.
- Dung dịch tinh bột 1% trong NaCl 0,9%
- Dung dịch iod 5 mmol/L trong KI 3%
- Nước bọt pha loãng 1/100

Tiến hành: Cho vào 3 ống nghiệm:

	Ống số 1	Ống số 2	Ống số 3
Dung dịch đệm phosphat pH 5,6 (mL)	1		
Dung dịch đệm phosphat pH 6,8 (mL)		1	
Dung dịch đệm phosphat pH 8,0 (mL)			1
Dung dịch tinh bột trong NaCl (mL)	1	1	1
Nước bọt 1/100 (mL)	1	1	1

Lắc đều, để các ống ở nhiệt độ 37°C. Giả sử phản ứng ở ống số 2 (ở pH 6,8) xảy ra nhanh nhất, lấy ngay một giọt dịch trong ống số 2 làm phản ứng màu với iod

trên lỗ đầu tiên của khay sứ. Sau đó cứ mỗi phút một lần, lấy một giọt dịch ở ống số 2 thử với iod trên các lỗ tiếp theo của khay sứ cho đến khi nó không làm chuyển màu iod nữa, nghĩa là tại ống số 2 phản ứng thuỷ phân tinh bột đã kết thúc, thì dừng lại. Ngay lập tức cho ngay vào cả 3 ống, mỗi ống 2 giọt iod. Màu của 3 ống thể hiện tiến trình phản ứng tại thời điểm cho iod vào (cũng là thời điểm dừng phản ứng tại mỗi ống). Quan sát màu của các ống và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của chất hoạt hoá và ức chế đến tốc độ phản ứng enzym

Nguyên tắc: Chất hoạt hoá là chất làm tăng cường hoạt tính xúc tác của enzym hoặc làm enzym từ trạng thái không hoạt động thành trạng thái hoạt động, còn chất ức chế là chất có khả năng làm giảm hoặc mất hoạt tính xúc tác của enzym.

Thuốc thử:

- Dung dịch tinh bột 1%
- Dung dịch iod 5 mmol/L trong KI 3%
- Nước bọt pha loãng 1/20
- Dung dịch NaCl 1%
- Dung dịch CuSO₄ 1%

Tiến hành: Cho vào 3 ống nghiệm:

	Ống số 1	Ống số 2	Ống số 3
Nước bọt 1/20 (mL)	2	2	2
Nước cất (giọt)	10		
Dung dịch NaCl 1% (giọt)		10	
Dung dịch CuSO ₄ 1% (giọt)			10
Dung dịch tinh bột (mL)	2	2	2

Lắc đều. Giả sử phản ứng ở ống số 2 (ở điều kiện có NaCl) xảy ra nhanh nhất, lấy ngay một giọt dịch trong ống số 2 làm phản ứng màu với iod trên lỗ đầu tiên của khay sứ. Sau đó cứ mỗi phút một lần, lấy một giọt dịch ở ống số 2 thử với iod trên các lỗ tiếp theo của khay sứ cho đến khi nó không làm chuyển màu iod nữa, nghĩa là tại ống số 2 phản ứng thuỷ phân tinh bột đã kết thúc, thì dừng lại. Ngay lập tức cho ngay vào cả 3 ống, mỗi ống 2 giọt iod. Màu của 3 ống thể hiện tiến trình phản ứng tại thời điểm cho iod vào (cũng là thời điểm dừng phản ứng tại mỗi ống). Quan sát màu của các ống và giải thích kết quả chất nào là chất hoạt hoá, chất nào là chất ức chế đối với enzym amylase.

Thí nghiệm 6: Tính đặc hiệu cơ chất của enzym thuỷ phân

Nguyên tắc: Amylase và saccharase là hai enzym thuỷ phân liên kết glucosid, nhưng amylase chỉ thủy phân liên kết 1-4 α-glucosid của tinh bột còn saccharase chỉ thủy phân liên kết 1-2 β-glucosid của saccharose.

Thuốc thử:

- Dung dịch tinh bột 1%
- Dung dịch saccharose 1%
- Nước bọt pha loãng 1/100
- Dung dịch saccharase: Được điều chế từ men bia bằng cách nghiền 10 g men bia khô cho nát mịn. Thêm 5 mL nước cất, khuấy thật kỹ, lọc lấy nước, bảo quản trong tủ lạnh.
- Dung dịch iod 5 mmol/L trong KI 3%
- Thuốc thử Feling (xem phần glucid).

Tiến hành: Cho vào 4 ống nghiệm:

	Ống số 1	Ống số 2	Ống số 3	Ống số 4
Dung dịch tinh bột 1% (mL)	1	1		
Dung dịch saccharose 1% (mL)			1	1
Nước bọt 1/100 (giọt)	10	10		
Dung dịch saccharase (giọt)			10	10

Lắc đều, để ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút, lấy ra. Lấy 4 ống nghiệm khác đánh số từ 1 đến 4, sau đó nhỏ vào mỗi ống 10 giọt dung dịch ở ống có số tương ứng ở trên. Thêm vào mỗi ống 1 giọt iod. Lắc đều.

Thêm vào dịch còn lại ở mỗi ống 1 mL thuốc thử Feling. Lắc đều, đun sôi cách thủy 5 phút. Quan sát màu của các ống và biện luận kết quả thí nghiệm.

2. ENZYM SỬ DỤNG TRONG LÂM SÀNG

2.1. Những khái niệm cơ bản về enzym học lâm sàng

Việc xác định các hoạt độ enzym trong huyết thanh đang trở nên một việc không thể thiếu được trong chẩn đoán, chẩn đoán phân biệt, trong theo dõi quá trình điều trị nhiều bệnh. Việc xác định hoạt độ enzym nhất định, cũng có tác dụng thực tế trong tiên lượng cũng như trong sàng lọc một số bệnh.

Đến nay, trên 2000 enzym trong tế bào đã được tách chiết, tinh sạch và mô tả một cách tỷ mỷ. Tuy nhiên, số các enzym được định lượng trong huyết tương, huyết thanh, nước tiểu hoặc các dịch sinh vật khác của cơ thể để phục vụ các chẩn đoán trong lâm sàng hiện nay chỉ khoảng trên một chục.

Bình thường trong huyết tương người khoẻ mạnh cũng có hoạt độ tương đối hằng định của các enzym có nguồn gốc từ tế bào của các mô hoặc do sự bài tiết vào huyết tương. Trong quá trình bệnh lý, do có sự thay đổi tính thấm màng tế bào, tổn thương hoặc hoại tử tế bào, các enzym nguồn gốc tế bào được giải phóng vào huyết tương, làm hoạt độ của chúng trong huyết tương tăng lên.

Người ta không thể định lượng được số lượng tuyết đối của các protein enzym trong huyết tương bởi vì hàm lượng của chúng trong huyết tương nhỏ đến nỗi không thể tách và xác định được chúng bằng những phương pháp định lượng thông thường. Tuy nhiên, có thể đo khả năng của chúng xúc tác cho những phản ứng hóa học, nghĩa là đo “hoạt độ enzym” (enzyme activity), hoạt độ thể hiện số lượng của enzym trong huyết thanh và sự thay đổi số lượng enzym có thể phục vụ cho các mục đích chẩn đoán trong lâm sàng.

Đơn vị quốc tế của hoạt độ enzym được định nghĩa là lượng enzym làm biến đổi một micromol (μmol , 10^{-6}M) cơ chất trong một phút ở các điều kiện xác định về pH, nồng độ cơ chất và các chất hoạt hoá, ở nhiệt độ 25°C . Đơn vị quốc tế của hoạt độ enzym được ký hiệu là U/L (đơn vị/lit).

Cách đo hoạt độ enzym. Hoạt độ enzym có thể được đo bằng hai cách sau:

- Đo hai điểm – “điểm đầu và điểm cuối”: Huyết tương chứa enzym được ủ với tất cả các chất tham gia phản ứng trong một khoảng thời gian nhất định, sau đó phản ứng enzym được dừng lại và nồng độ cơ chất còn lại hoặc sản phẩm được tạo thành được xác định. Thông thường, điều này có thể được thực hiện với sự kèm theo của sự biến đổi thêm nữa của cơ chất hoặc sản phẩm phản ứng thành một chất màu.
- Đo liên tục- “đo động học enzym” (kinetic test): Khi các coenzym NAD^+ hoặc NADP^+ tham gia vào phản ứng như là chất cho hoặc nhận hydro, có thể đo trực tiếp sự thay đổi nồng độ các coenzym này bằng phương pháp quang phổ. Các coenzym này ở dạng khử (NADH hoặc NADPH) hấp thụ mạnh ở bước sóng tử ngoại 340 nm , trong khi dạng oxy hoá của chúng (NAD^+ hoặc NADP^+) không hấp thụ ở bước sóng này.

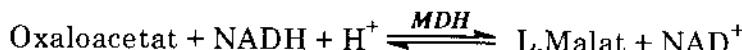
Ngày nay, việc đo hoạt độ enzym được thực hiện trong các điều kiện phản ứng được chuẩn hoá nên các phòng thí nghiệm khác nhau đã có thể đạt được các kết quả tương đối đồng nhất.

2.2. Cách xác định hoạt độ một số enzym trong huyết tương

Các phương pháp xác định hoạt độ enzym giới thiệu dưới đây đều sử dụng kit của hãng La Roche và được thực hiện trên máy quang kế bán tự động Photometer 4010 của Cộng hoà liên bang Đức:

2.2.1. Đo hoạt độ aspartat transaminase (AST) huyết tương: (phương pháp chuẩn tối ưu):

Nguyên tắc:



Phản ứng làm giảm nồng độ NADH để tạo thành NAD^+ , nên có thể đo hoạt độ enzym AST bằng độ giảm độ hấp thụ quang của NADH ở bước sóng 340nm .

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin, không được vỡ hồng cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 8%, ở 20-25°C là 10%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Đệm và cơ chất 30 lọ × 3mL

Lọ 1a: Enzym/ coenzym/ α-ceto glutarate: 30 viên.

Hoà tan 1 viên thuốc thử lấy từ lọ 1a vào dung dịch chứa trong lọ 1 rồi đặt vào nhiệt độ thí nghiệm. Thuốc thử ổn định trong 3 ngày ở +2 đến +8°C, 10 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 100µL huyết tương vào lọ chứa sẵn 1,00 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 37°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đo trên máy quang kế ở bước sóng 340 nm. Đọc kết quả sau 1, 2 và 3 phút. Tính kết quả:

Hoạt độ AST huyết tương (U/L) = $1745 \times \Delta A_{340}$ nm

Ý nghĩa lâm sàng : AST có nhiều ở gan, tim, cơ.

- Hoạt độ AST bình thường trong huyết tương do ở 37°C:

Nam: 10-50 U/L

Nữ : 10-35 U/L.

- Hoạt độ AST tăng chủ yếu gấp trong các trường hợp:

Nhồi máu cơ tim

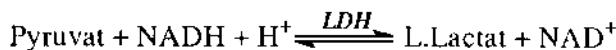
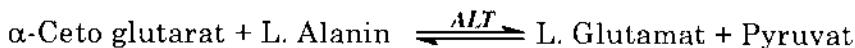
Bệnh nhu mô gan

Bệnh cơ xương

Thiếu oxy mô, ...

2.2.2. Đo hoạt độ alanin transaminase (ALT) huyết tương: "phương pháp chuẩn tối ưu":

Nguyên tắc:



Phản ứng làm giảm nồng độ NADH để tạo thành NAD⁺, nên có thể đo hoạt độ enzym ALT bằng độ giảm độ hấp thụ quang của NADH ở bước sóng 340nm theo thời gian.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin, không được vỡ hồng cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 3 ngày là 10%, ở 20-25°C là 17%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Đệm và cơ chất 30 lọ × 3 mL

Lọ 1a: Enzym/ coenzym/ α-ceto glutarate: 30 viên.

Hoà tan 1 viên thuốc thử lấy từ lọ 1a vào dung dịch chứa trong lọ 1 rồi đặt vào nhiệt độ thí nghiệm. Thuốc thử ổn định trong 3 ngày ở +2 đến +8°C, 10 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 100µL huyết tương vào lọ chứa sẵn 1,00 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 37°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đọc kết quả sau 1, 2 và 3 phút. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ ALT huyết tương (U/L)} = 1745 \times \Delta A_{340 \text{ nm}}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- ALT có nhiều ở gan, có ít ở các mô khác.
- Hoạt độ ALT bình thường trong huyết tương
 - Nam : 10-50 U/L
 - Nữ : 10-35 U/L
- Hoạt độ ALT tăng chủ yếu trong các bệnh gan:

Viêm gan cấp, mạn,
Hoại tử gan,
Tắc mật, ...

2.2.3. Đo hoạt độ alkaline phosphatase (ALP) huyết tương: "phương pháp chuẩn tối ưu":

Nguyên tắc:



Phản ứng tạo thành p-Nitrophenyl có màu đỏ, nên có thể đo hoạt độ enzym ALP bằng độ tăng độ hấp thụ quang của p-Nitrophenyl ở bước sóng 405nm theo thời gian.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin, không được vỡ hồng cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 0%, ở 20-25°C là 10%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Đem 30 lọ × 3mL

Lọ 1a: Cơ chất: 30 viên.

Hoà tan 1 viên thuốc thử lấy từ lọ 1a vào dung dịch chứa trong lọ 1 rồi đặt vào nhiệt độ thí nghiệm. Thuốc thử ổn định trong 3 ngày ở +2 đến +8°C, 10 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 405nm. Hút 10µL huyết tương vào lọ chứa sẵn 0,60 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 37°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đọc kết quả sau 1, 2 và 3 phút. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ ALP huyết tương (U/L)} = 3300 \times \Delta A_{405 \text{ nm}}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- ALP có nhiều ở gan, xương, nhau thai và biểu mô ruột.
- Hoạt độ ALP bình thường trong huyết tương:

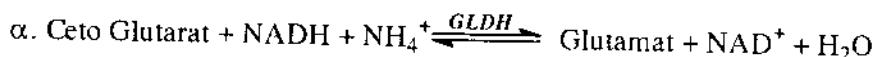
Nam : 10-50 U/L

Nữ : 4,8-13,5 U/L.

- Hoạt độ ALP tăng chủ yếu gấp trong các trường hợp bệnh loãng xương, còi xương, u xương, gãy xương đang hàn gắn, viêm tuỷ xương, tắc mật, xơ gan, viêm gan, ...

2.2.4. Đo hoạt độ glutamat dehydrogenase (GLDH) huyết tương: “phương pháp chuẩn tối ưu”:

Nguyên tắc:



Phản ứng biến NADH thành NAD⁺, nên có thể đo hoạt độ enzym GLDH huyết tương bằng độ giảm độ hấp thụ quang của NADH ở bước sóng 340nm.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin, không được vỡ hông cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 3 ngày là 5%, ở 20-25°C là 15%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: ADP/ NADH/ LDH 19 lọ × 2,5 mL

Lọ 1a: Đệm/ EDTA/ amoni acetat: 1 × 60mL.

Lọ 2: α-ceto glutarat (1 × 3mL)

Chuẩn bị dung dịch 1: Hoà tan các chất có trong 1 lọ số 1 trong 2,5 mL dung dịch lọ 1a. Dung dịch 1 ổn định trong 5 ngày ở +2 đến +8°C, 8 giờ ở 15-25°C.

Chuẩn bị dung dịch 2: Sử dụng dung dịch ở lọ 2, không pha loãng.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 100μL huyết tương vào lọ chứa sẵn 0,500 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 25°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đọc độ hấp thụ quang A1. Sau 5 phút, đọc độ hấp thụ quang A2. Thêm dung dịch 2: 20 μL. Trộn kỹ, đọc độ hấp thụ quang A3. Sau 5 phút, đọc độ hấp thụ quang A4. Tính kết quả:

$$\Delta A_{340 \text{ nm}} = (A_3 - A_4) - (A_1 - A_2)$$

$$\text{Hoạt độ GLDH huyết tương (U/L)} = 197 \times \Delta A_{340 \text{ nm}}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- GLDH có nhiều trong ty thể của tế bào của tất cả các mô. Tuy nhiên, sự tăng hoạt độ enzym này trong huyết tương chỉ xuất hiện trong hoại tử tế bào gan.
- Hoạt độ GLDH bình thường trong huyết tương đo ở 37°C;

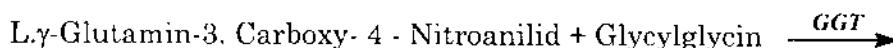
Nam : < 3 U/L

Nữ : < 4 U/L.

- Hoạt độ GLDH tăng chủ yếu gấp trong trường hợp có hoại tử tế bào gan như thiếu oxy mô, tổn thương gan do nhiễm độc, vì vậy GLDH đóng một vài trò quan trọng trong chẩn đoán phân biệt các bệnh của gan, đặc biệt khi kết hợp với việc định lượng hoạt độ các enzym aminotransferase như AST và ALT.
- Hoạt độ GLDH huyết tương không tăng trong các trường hợp viêm gan nói chung, ví dụ, viêm gan do virus.

2.2.5. Đo hoạt độ gamma glutamyl transferase (GGT) huyết tương: “phương pháp Persijn JP và Van der Slik” (1976):

Nguyên tắc:



Phản ứng tạo thành 5- Amino-2-Nitrobenzoat có màu đỏ, nên có thể đo hoạt độ enzym GGT bằng độ tăng độ hấp thụ quang của 5- Amino-2-Nitrobenzoat ở bước sóng 405nm.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, không được vỡ hồng cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 0%, ở 20-25°C là 0%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Đệm 30 lọ × 2 mL

Lọ 1a: Viên thuốc thử glycyl glycin/ cơ chất: 1 × 30 viên.

Chuẩn bị dung dịch 1: Hoà tan 1 viên có trong lọ 1a vào dung dịch có trong lọ 1. Dung dịch 1 ổn định trong 10 ngày ở +2 đến +8°C, 5 ngày ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 405nm. Hút 100μL huyết tương vào lọ chứa sẵn 1,000 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 37°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đọc kết quả sau 1, 2 và 3 phút. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ GGT huyết tương (U/L)} = 1158 \times \Delta A_{405} \text{ nm/phút}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- GGT có nhiều trong gan, thận và tuy.
- Hoạt độ GLDH bình thường trong huyết tương đo ở 37°C:

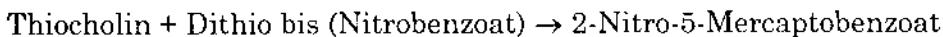
Nam : 9-40 U/L

Nữ : 9-35 U/L.

- Hoạt độ GLDH tăng chủ yếu gấp trong trường hợp tắc mật, bệnh gan do alcol, viêm gan cấp, mạn tính, xơ gan, các bệnh gan khác, viêm tuy, suy tim do tắc nghẽn.

2.2.6. Đo hoạt độ cholinesterase (CHE) huyết tương: “phương pháp Knedel M và Bottiger” (1967):

Nguyên tắc:



Phản ứng tạo thành 2-Nitro-5-Mercaptobenzoat có màu đỏ, nên có thể đo hoạt độ enzym CHE bằng độ tăng độ hấp thụ quang của 2-Nitro-5-Mercaptobenzoat ở bước sóng 405nm.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin hoặc EDTA, không được vỡ hồng cầu. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 0%, ở 20-25°C là 0%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Cơ chất/ chromogen 20 lọ × 2 mL

Lọ 1a: Đệm: 1 lọ × 70 mL.

Hoà tan các chất có trong lọ 1 vào 3 mL dung dịch lấy từ lọ 1a. Dung dịch này ổn định trong 2 giờ ở +2 đến +8°C, 2 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 405nm. Hút 10 μ L huyết tương vào lọ chứa sẵn 1,500 mL thuốc thử hỗn hợp đã để sẵn ở 37°C. Lắc kỹ, đổ vào cuvet. Đọc kết quả sau 30, 60 và 90 giây. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ CHE Huyết tương (U/L)} = 45.420 \times \Delta A_{405} \text{ nm}/30 \text{ giây.}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

CHE được gan bài tiết vào máu.

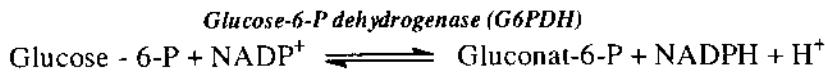
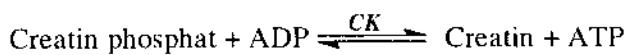
- Hoạt độ CHE bình thường trong huyết tương do ở 37°C:

Ở nam và ở nữ là 3,5-8,5 kU/L.

- Hoạt độ CHE giảm chủ yếu gấp trong bệnh gan mạn tính (do suy giảm chức năng tổng hợp protein enzym) hoặc ngộ độc hóa chất trừ sâu phospho hữu cơ hoặc carbamat (do enzym bị ức chế hoạt tính theo cơ chế ức chế cạnh tranh).

2.2.7. Đo hoạt độ creatin kinase (CK) huyết tương: “phương pháp chuẩn tối ưu”:

Nguyên tắc:



Phản ứng biến NADP⁺ thành NADPH + H⁺, nên có thể đo hoạt độ enzym CK huyết tương bằng độ tăng độ hấp thụ quang của NADPH ở bước sóng 340nm.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin hoặc EDTA. Suy vỡ hồng cầu đến nồng độ hemoglobin 200 mg Hb/L không gây trở ngại cho phép đo. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 2%, ở 20-25°C là 2%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn loại MPR1:

Lọ 1: Đệm 30 lọ × 2,5 mL

Lọ 1a: Cơ chất và coenzym: 2 × 15 viên.

Lọ 2: α-ceto glutarate (1 × 3mL)

Chuẩn bị dung dịch MPR1: Hoà tan 1 viên thuốc thử từ lọ 1a vào dung dịch ở lọ 1. Dung dịch 1 ổn định trong 7 ngày ở +2 đến +8°C, 12 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 50µL huyết tương vào lọ chứa sẵn 2,5 mL, thuốc thử hỗn hợp (1+1a), để yên 1 phút ở 37°C rồi đổ vào cuvet. Đọc độ hấp thụ quang ban đầu, rồi đọc độ hấp thụ quang lặp lại chính xác sau 1, 2, 3 phút. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ CK huyết tương (U/L)} = 4127 \times \Delta A_{340} \text{ nm/phút.}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- CK có nhiều trong cơ xương và cơ tim. Có ba loại isoenzym của CK là CK-BB, CK-MM và CK-MB. CK-BB chủ yếu được thấy ở não. Huyết thanh người bình thường có rất ít CK-BB. Phần lớn CK có mặt trong huyết tương bình thường là CK-MM có nguồn gốc từ cơ xương. CK có trong cơ tim chứa một tỷ lệ cao của CK-MB (khoảng 30%).
- Hoạt độ CK bình thường trong huyết tương đo ở 37°C:

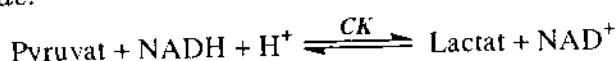
Nam : 24-195 U/L

Nữ : 24- 170 U/L.

- Hoạt độ CK tăng chủ yếu gấp trong trường hợp nhồi máu cơ tim, cơn myoglobin cơ niệu kịch phát, sốt cao ác tính, sau phẫu thuật, chấn thương cơ, luyện tập nặng, chứng co giật, viêm cơ, loạn dưỡng cơ.

2.2.8. Đo hoạt độ lactat dehydrogenase (LDH) huyết tương: "phương pháp chuẩn tối ưu":

Nguyên tắc:



Phản ứng biến NADH thành NAD⁺, nên có thể đo hoạt độ enzym CK huyết tương bằng độ giảm độ hấp thụ quang của NADH ở bước sóng 340nm theo thời gian.

Chất liệu: Huyết thanh hoặc huyết tương chống đông bằng heparin. Suy vỡ gây trở ngại cho phép đo. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 2 ngày là 0%, ở 20-25°C là 0%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn loại MPR1:

Lọ 1: Đệm Tris 30 lọ × 3 mL

Lọ 1a: Coenzym NADH: 1 × 30 viên.

Lọ 1b: Cơ chất pyruvat (1 × 3mL)

Chuẩn bị dung dịch MPR1: Hoà tan 1 viên thuốc thử từ lọ 1a vào dung dịch ở lọ 1, sau đó cho tiếp 1 viên từ lọ 1b. Dung dịch 1 ổn định trong 5 ngày ở +2 đến +8°C, 32 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 50 μ L huyết tương vào lọ chứa sẵn 3 mL thuốc thử hỗn hợp (1+1a+1b). Trộn đều, đổ vào cuvet, sau 30 giây, đọc độ hấp thụ quang ban đầu. Đọc độ hấp thụ quang lặp lại chính xác sau 1, 2, 3 phút. Tính kết quả:

Hoạt độ LDH huyết tương (U/L) = $9682 \times \Delta A_{340} \text{ nm}/\text{phút}$.

Ý nghĩa lâm sàng:

- LDH có nhiều trong các mô khác nhau. Có 5 loại isoenzym của LDH là LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ và LDH₅. LDH₁ chủ yếu được thấy ở cơ tim và hồng cầu, trong khi LDH₅ có nhiều trong cơ xương và gan.
- Hoạt độ LDH bình thường trong huyết tương đo ở 37°C:
 - + Nam : 135-225 U/L
 - + Nữ : 134- 215 U/L
- Hoạt độ LDH tăng chủ yếu gấp trong trường hợp tổn thương cấp của gan, cơ xương, thận, thiếu máu nguyên hồng cầu khổng lồ và thiếu máu tan huyết.

2.2.9. Đo hoạt độ α -hydroxy butyrate dehydrogenase (α -HBDH = isoenzym LDH1) huyết tương: “phương pháp chuẩn tối ưu”:

Nguyên tắc:



Phản ứng biến NADH thành NAD⁺ nên có thể đo hoạt độ isoenzym α -HBDH huyết tương bằng độ giảm độ hấp thụ quang của NADH ở bước sóng 340nm theo thời gian.

Chất liệu: Huyết thanh hoặc huyết tương chống đông bằng EDTA. Sự vỡ gây trở ngại cho phép đo. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 7 ngày là 5%, ở 20-25°C là 5%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn loại MPR1:

Lọ 1: Đệm-cơ chất; 30 lọ × 3 mL

Lọ 1a: Coenzym NADH: 1 × 30 viên.

Chuẩn bị dung dịch MPR1: Hoà tan 1 viên thuốc thử từ lọ 1a vào dung dịch ở lọ 1, sau đó cho tiếp 1 viên từ lọ 1b. Dung dịch 1 ổn định trong 1 ngày ở +2 đến +8°C, 5 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 340nm. Hút 100µL huyết tương vào lọ chứa sẵn 3 mL thuốc thử hỗn hợp (1+1a). Trộn đều, đổ vào cuvet, sau 30 giây, đọc độ hấp thụ quang ban đầu. Đọc độ hấp thụ quang lặp lại chính xác sau 1, 2, 3 phút. Tính kết quả:

Hoạt độ α -HBDH huyết tương (U/L) = $4921 \times \Delta A_{340}$ nm/phút.

Ý nghĩa lâm sàng:

– α -HBDH (isoenzym LDH₁) có nhiều trong cơ tim và hồng cầu.

– Hoạt độ α -HBDH bình thường trong huyết tương đo ở 37°C:

Nam và nữ : 72- 182 U/L.

– α -HBDH có thời gian bán huỷ tương đối dài trong huyết tương (4-5 ngày). Hoạt độ α -HBDH tăng chủ yếu gấp trong nhồi máu cơ tim. Sau nhồi máu cơ tim, hoạt độ của α -HBDH tăng lên chậm và đạt mức độ cao nhất ở ngày thứ 2-3, sau đó giảm dần trong một tuần hoặc lâu hơn. Vì α -HBDH cũng có trong hồng cầu nên hoạt độ của nó cũng tăng trong tắc nghẽn phổi hoặc trong cơn tan máu ở bệnh hồng cầu liêm.

2.2.10. Đo hoạt độ acid phosphatase (ACP) huyết tương: “phương pháp chuẩn tối ưu”:

Nguyên tắc:



1-naphthol + 4-chloro-2 methyl phenyl diazonium → chất màu diazo màu đỏ, có thể đo được ở bước sóng 405 nm.

Phản ứng tạo chất màu diazo, nên có thể đo hoạt độ enzym ACP huyết tương bằng độ tăng độ hấp thụ quang của chất diazo màu đỏ ở bước sóng 340nm theo thời gian.

Chất liệu: huyết thanh hoặc huyết tương chống đông bằng EDTA. Sự vỡ hồng cầu nhẹ (<200 mg Hb/dL) không gây trở ngại cho phép đo.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn:

Lọ 1: Cơ chất/ chromogen 18 lọ × 3 mL

Lọ 1a: Đệm: 1 × 40 mL

Lọ 2: Tartrat: 1× 9 viên

Lọ 3: Chất ổn định mẫu: acid acetic 1× 10 mL. Khi không cần đo ngay, muốn làm ổn định mẫu huyết thanh, cho một giọt (30µL) dung dịch từ lọ 3 vào 1 mL huyết thanh, trộn đều, mẫu huyết thanh sẽ được ổn định trong 3 ngày ở +4°C, 24 giờ ở 15-25°C.

Chuẩn bị dung dịch thuốc thử 1a: Hoà tan thuốc thử từ lọ 1 vào 2 mL dung dịch đệm ở lọ 1a, sau đó cho tiếp 1 viên từ lọ 2 và hòa tan bằng cách lắc nhẹ. Bảo quản tránh ánh sáng. Các dung dịch 1 ổn định trong 5 ngày ở +2 đến +8°C, 24 giờ ở 15-25°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 405 nm. Hút 200µL huyết tương vào lọ thuốc thử 1a hoặc 1b đã để sẵn ở 25°C. Trộn đều, đổ vào cuvet, sau 5 phút, đọc độ hấp thụ quang ban đầu A₁. Đọc độ hấp thụ quang lặp lại chính xác sau 5 phút A₂. Tính kết quả:

- Hoạt độ acid phosphatase toàn phần huyết tương (U/L) = $122 \times \Delta A_{405 \text{ nm}} / \text{phút}$ đối với dung dịch 1a.
- Hoạt độ acid phosphatase tuyến tiền liệt huyết tương (U/L) = $122 \times (\Delta A_{\text{dung dịch 1a}} - \Delta A_{\text{dung dịch 1b}})$.

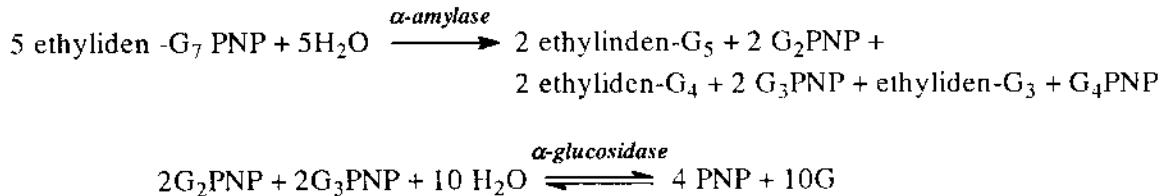
Ý nghĩa lâm sàng:

- ACP có nhiều trong tuyến tiền liệt.
- Hoạt độ ACP bình thường trong huyết tương đo ở 37°C
Ở nam và nữ là 4,8-13,5 U/L.

- Hoạt độ ACP tăng chủ yếu gấp trong trường hợp u tuyến tiền liệt: tăng 20% khi u chưa di căn và tăng lên 80% khi u đã di căn, vì vậy ACP được coi như một dấu ấn ung thư tuyến tiền liệt. ACP cũng tăng trong viêm tuyến tiền liệt và đôi khi tăng trong phì đại tuyến tiền liệt lành tính.

2.2.11. Đo hoạt độ α-amylase huyết tương hoặc nước tiểu: “phương pháp chuẩn tối ưu”:

Nguyên tắc:



Phản ứng biến G₂PNP và G₃PNP thành PNP là chất có màu đỏ gây nên sự tăng độ hấp thụ quang có thể đo được ở bước sóng 405 nm.

Chất liệu: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin hoặc EDTA, nước tiểu.. Sự giảm hoạt độ enzym huyết thanh ở 4°C sau 5 ngày là 0%, ở 20-25°C là 0%.

Thuốc thử: Sử dụng kit pha sẵn loại MPR1:

Lọ 1: Đệm 30 lọ × 3 mL

Lọ 1a: Cơ chất/ enzym: 1× 30 viên.

Chuẩn bị dung dịch MPR1: Hoà tan hoà tan 1 viên thuốc thử từ lọ 1a vào dung dịch ở lọ 1. Dung dịch 1 ổn định trong 2 tuần ở +2 đến +8°C.

Cách tiến hành: Chọn bước sóng 405 nm. Hút 50 μ L huyết tương, huyết thanh hoặc nước tiểu vào lọ chứa sẵn 3 mL thuốc thử hỗn hợp (1+1a). Trộn kỹ, để yên 3 phút ở 37°C rồi đổ vào cuvet. Đọc độ hấp thụ quang ban đầu, rồi đọc độ hấp thụ quang lặp lại chính xác sau 1, 2, 3 phút. Tính kết quả:

$$\text{Hoạt độ } \alpha\text{-amylase huyết tương (U/L)} = 9788 \times \Delta A_{405} \text{ nm/phút.}$$

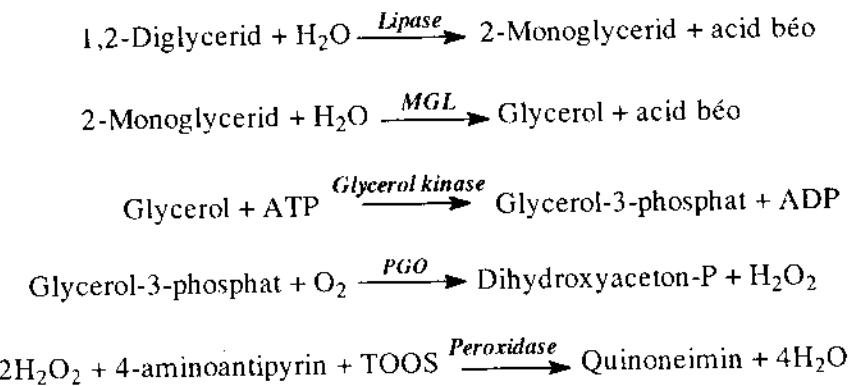
$$\text{Hoạt độ } \alpha\text{-amylase nước tiểu (U/L)} = 19261 \times \Delta A_{405} \text{ nm/phút.}$$

Ý nghĩa lâm sàng:

- α -amylase có nhiều trong tuyến nước bọt và tuy ngoại tiết.
- Hoạt độ α -amylase bình thường trong huyết tương đo ở 37°C:
 - Nam và nữ : 17- 115 U/L.
 - Hoạt độ α -amylase tăng chủ yếu gấp trong trường hợp viêm tuy cấp, loét thủng hành tá tràng, tắc ruột, các rối loạn ở bụng khác, suy thận giảm niệu cấp, nhiễm cetonic do đái tháo đường, viêm tuyến nước bọt, quai bị, sử dụng morphin, co thắt cơ Oddi.

2.2.12. Đo hoạt độ lipase huyết tương: “phương pháp đánh giá acid béo được giải phóng” hoặc “phương pháp đo độ đặc”, hoặc theo phương pháp đo quang dưới đây do bằng kit của hãng Biosystems:

Nguyên tắc: Lipase xúc tác phản ứng thuỷ phân diglycerid thành monoglycerid và acid béo. Hoạt độ của lipase được xác định bằng tốc độ hình thành quinoneimin, đo ở bước sóng 550 nm, qua các phản ứng xúc tác bởi monoglycerid lipase (MGL), glycerol kinase, glycerol phosphat oxidase (GPO) và phản ứng tạo màu xúc tác bởi peroxidase:



(ở đây: TOOS = N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin)

Chất liệu: Huyết thanh. Lipase trong huyết thanh ổn định trong 5 ngày ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Thuốc thử:

- Thuốc thử A. 33 mL MES/BES 36mmol/L, cholic acid 5 mmol/L, pH 6,8.

- 3 Thuốc thử B. Đổi với 10 mL: Albumin người 0,27%, monoglycerid lipase > 860 U/L, glycerol kinase . 1340 U/L, ATP 0,66 mmol/L, 1,2-diglycerid 1,1 mmol/L, N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine (TOOS) 2 mmol/L.
- Thuốc thử C. 10,5mL. Tris 200 mmol/L, deoxycholat 36 mmol/L, 4- aminoantipyrin 6 mmol/L, pH 8,7.
- Lipase chuẩn: 3 mL. Hoạt độ lipase được ghi trên nhãn lọ.

Cách tiến hành: Chuẩn bị thuốc thử: Cho các chất chứa trong lọ B vào 10 mL thuốc thử A, xoay nhẹ, ổn định 28 ngày ở 2-8°C.

Đo hoạt độ enzym trong huyết thanh:

1. Đặt thuốc thử vào máy đo quang ở 37°C.

2. Lấy pypet cho vào cuvet:

- Thuốc thử đã chuẩn bị 750 μ L

- Huyết thanh/ chuẩn 15 μ L.

3. Trộn đều và cho vào máy quang kế. Bấm đồng hồ bấm giây, sau 3-5 phút cho thêm: Thuốc thử C 250 μ L, trộn đều.

4. Đọc độ hấp thụ quang ban đầu và đọc mỗi phút một lần, trong 3 phút.

Tính toán: Độ khác nhau trung bình về độ hấp thụ quang trong một phút.

Hoạt độ lipase huyết thanh (U/L) = $\Delta A_{\text{thử}/\text{phút}} \times \text{Hoạt độ chuẩn} / \Delta A_{\text{chuẩn}/\text{phút}}$.

Ý nghĩa lâm sàng

- Lipase có nhiều trong tuy, có một ít trong dạ dày, tá tràng, gan và lưỡi.
- Hoạt độ lipase bình thường trong huyết tương đo ở 37°C ở nam và ở nữ là 7-59 U/L.
- Hoạt độ lipase tăng chủ yếu gấp trong trường hợp viêm tuy cấp, viêm tuy mạn, tắc ống tuy và các bệnh ở ổ bụng có liên quan đến tuy. Sử dụng xét nghiệm lipase tốt hơn khi kết hợp với định lượng hoạt độ α-amylase.

Chương 12

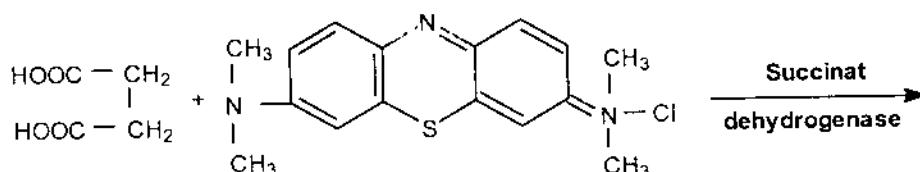
SỰ OXY HÓA KHỬ SINH HỌC

MỤC TIÊU

Trình bày được nguyên tắc, cách tiến hành và giải thích được kết quả của các thí nghiệm về hoạt động của enzym succinat dehydrogenase, catalase và của phản ứng tìm creatin trong cơ.

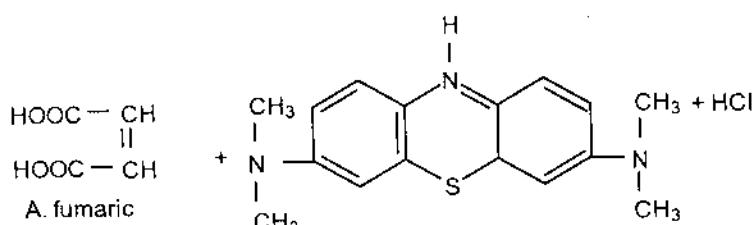
Thí nghiệm 1. Hoạt động của succinat dehydrogenase của cơ.

Nguyên tắc: Succinat dehydrogenase của dịch cơ nghiên xúc tác phản ứng chuyển hydro từ acid succinic sang chất nhận hydro xanh methylen, biến acid succinic thành acid fumaric và xanh methylen dạng oxy hóa có màu xanh da trời thành xanh methylen dạng khử không có màu.



A. Succinic

Xanh methylen (Màu xanh da trời)



Xanh methylen (không màu) dạng khử

Thuốc thử:

- Dung dịch acid succinic 0,1N:
 - + Hoà tan 5,9 g acid succinic vào 600 mL nước cất.
 - + Trung hoà bằng NaOH 0,1N tới pH = 7.
 - + Hoàn thành nước cất vừa đủ 1000 mL.

- Vaseline dạng lỏng.
- Dung dịch xanh methylen 0,02% trong nước.
- Dung dịch đệm pH=6,8:
 - + Dung dịch Na_2HPO_4 0,2M 49mL.
 - + Dung dịch NaH_2PO_4 0,2M 51mL.
- Dịch cơ tươi nghiền.

Tiến hành: Cho vào 3 ống nghiệm ghi số:

	Ống số 1	Ống số 2	Ống số 3
Dung dịch đệm phosphat pH 6,8 (mL)	1	1	1
Dịch cơ tươi nghiền (mL)	1	1	1 (đun sôi)
Nước cất (mL)	1		
Acid succinic 0,1N (mL)		1	1
Xanh methylen 0,02% (giọt)	3	3	3

Lắc đều. Nhỏ nhẹ nhàng 0,5 mL vaselin vào mỗi ống tạo nên một lớp phủ trên bề mặt dung dịch. Đặt vào tủ ấm 37°C trong 20 phút. Nhận xét màu ở 3 ống nghiệm và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 2. Hoạt động của catalase

Nguyên tắc: Catalase (từ gan) là một enzym thuộc loại oxy hoá khử, xúc tác phản ứng phân huỷ H_2O_2 tạo thành nước và giải phóng O_2 .



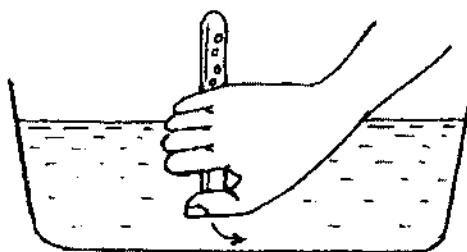
Có thể phát hiện sự có mặt của khí O_2 sinh ra bằng áp lực đẩy vào ngón tay bịt ống nghiệm và làm bùng cháy tàn lửa của một nén hương.

Thuốc thử và nguyên liệu:

Dung dịch H_2O_2 1% trong nước.

Gan nghiền.

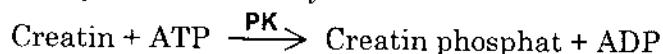
Tiến hành: Cho vào một ống nghiệm to: 1g gan đã nghiền nhuyễn. 10 mL nước cất. Bịt chặt đầu ống nghiệm bằng ngón tay cái, lắc thật kỹ để các tế bào và mô gan vỡ hết giải phóng catalase vào nước. Thêm nhanh dung dịch H_2O_2 1% đến đầy ống nghiệm. Bịt chặt ống nghiệm bằng ngón tay cái, lắc kỹ sẽ thấy khí sinh ra đẩy mạnh vào ngón tay cái, lật ngược ống nghiệm vào chậu nước, thả từ từ ngón tay cho nước dịch gan trong ống nghiệm chảy vào chậu, giữ ống nghiệm ở vị trí úp để khí sinh ra khỏi bay mất. Nhắc ống nghiệm ở tư thế đứng ra khỏi chậu nước, dùng một que thuỷ tinh gọt hết bọt trong ống nghiệm. Dưa từ từ một que hương đang có tàn lửa vào phía đáy ống nghiệm, tàn hương sẽ bùng cháy (có thể kèm theo một tiếng nổ nhỏ nếu có nhiều O_2 được tạo thành) khi tàn hương gặp O_2 đậm ở phía đáy bình.



Hình 12. Thả ngón tay từ từ cho nước trong ống nghiệm chảy ra chậu, oxy dồn lên đọng ở đáy ống nghiệm.

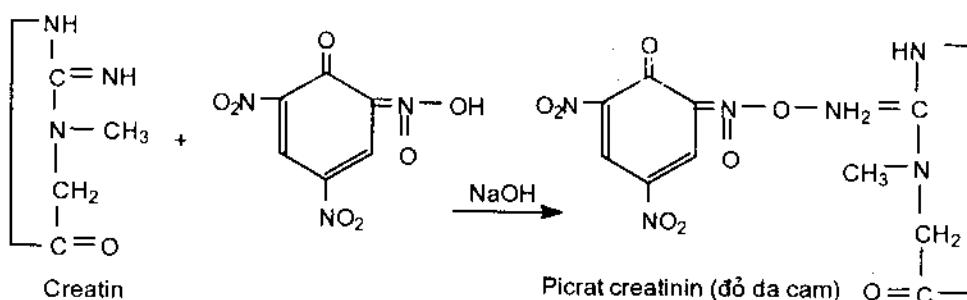
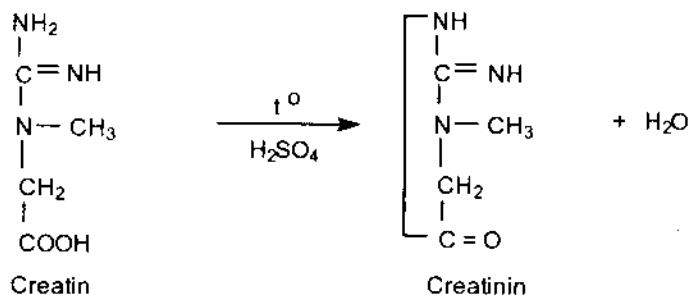
Thí nghiệm 3. Phản ứng tìm creatinin trong cơ

Creatin phosphat là một chất hữu cơ trong phân tử có một liên kết phosphat giàu năng lượng, đây là dạng dự trữ năng lượng quan trọng cho hoạt động của cơ. Creatin phosphat được tạo thành trong cơ nhờ phản ứng phosphonyl hoá với sự tham gia của ATP và sự xúc tác của enzym creatin:



Mỗi ngày có khoảng 2% creatin và creatin phosphat biến đổi thành creatinin bằng cách loại đi một phân tử nước hoặc một phân tử acid phosphonic.

Nguyên tắc: Trong môi trường acid và nhiệt độ sôi, creatin bị mất nước, đóng vòng thành creatinin, creatinin sinh ra kết hợp với picrat kiểm tạo thành picrat creatinin có màu đỏ da cam.



Thuốc thử:

- Dịch lọc cơ sau khi đã loại protein.
- Dung dịch acid sulfuric 10%
- Dung dịch NaHCO_3 10%
- Dung dịch acid picric bão hòa:
Acid picric tinh khiết 2g.

Nước cất 50 mL.

Lắc kỹ, để tủ ấm 37°C trong 24 giờ; gạn lấy nước trong.

- Dung dịch picrat kiềm (pha khi sử dụng):
Acid picric bão hòa 5 thể tích
Nước cất 5 thể tích
 NaOH 20% 2 thể tích

Tiến hành:

- Tạo dịch lọc phi protein:

Cơ tươi nghiền 1g

Nước cất 5mL

Đun sôi để kết tủa protein, lọc hoặc quay ly tâm để loại bỏ tủa, ta được dịch phi protein.

- Làm phản ứng màu: Cho vào một ống nghiệm:

Dịch lọc phi protein 1mL

Acid sulfuric 10% 2 giọt

Đun sôi cách thuỷ sôi 30 phút, làm lạnh. Trung hoà bằng 2 giọt NaHCO_3 10%. Thêm 1 mL dung dịch picrat kiềm, dung dịch trong ống nghiệm sẽ chuyển sang màu da cam.

Chương 13

CẤU TẠO HÓA HỌC VÀ CHUYỂN HÓA CARBOHYDRAT

MỤC TIÊU

- Trình bày được những nguyên tắc của các thí nghiệm minh họa những đặc điểm cơ bản về cấu tạo, tính chất hóa học của monosaccharid, disaccharid, polysaccharid và thực hiện được những thí nghiệm này.
- Làm được phản ứng Benedict và cho kết quả đúng về định lượng sơ bộ đường khử trong mẫu thử nước tiểu.
- Làm được phản ứng định lượng glucose máu và cho kết quả có thể chấp nhận được.

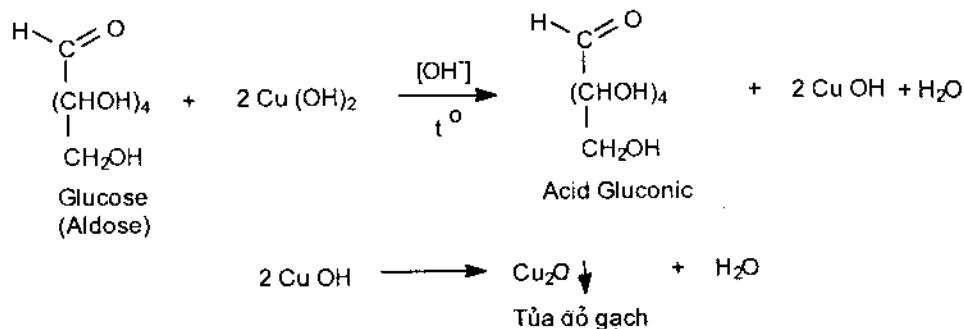
1. HÓA SINH HỌC CƠ BẢN CỦA CARBOHYDRAT

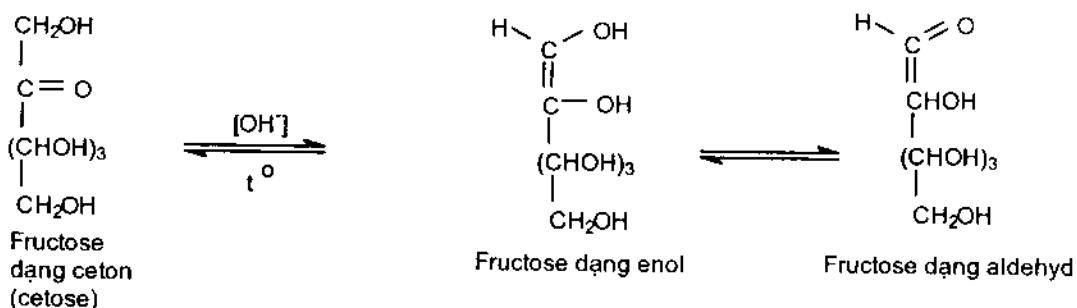
Thí nghiệm 1. Xác định tính khử của monosaccharid bằng phản ứng Fehling

Nguyên tắc

Các monosaccharid (aldehyd-alcol và ceton-alcol) đều chứa nhóm chúc khử (aldehyd hoặc ceton) cho nên chúng có tính khử, biểu hiện là chúng có thể khử các ion kim loại của muối kim loại nặng để giải phóng kim loại hoặc oxyd kim loại có hoá trị thấp hơn và các monosaccharid sẽ bị oxy hoá thành acid.

Phản ứng Fehling: Trong môi trường kiềm và đun nóng, các monosaccharid khử đồng II (Cu^{2+}) hydroxyd thành đồng I (Cu^+) hydroxyd, chất này sẽ bị mất nước tạo thành đồng I oxyd kết tủa màu đỏ gạch.





Thuốc thử

Thuốc thử Fehling:

-	Dung dịch A: CuSO ₄ .5H ₂ O kết tinh	35g
	H ₂ SO ₄ đặc	6 mL
	Nước cất vừa đủ	1000 mL
-	Dung dịch B: Muối seignett (Na.K tartrat)	200g
	NaOH 40%	375 mL
	Nước cất vừa đủ	1000 mL

Trước khi dùng, trộn lẫn dung dịch A và dung dịch B với tỷ lệ 1:1. Thuốc thử Fehling trong suốt, có màu xanh lam.

Các dung dịch monosaccharid

Dung dịch glucose 1%, dung dịch fructose 1%, dung dịch pentose (arabinose hoặc ribose) 1%.

Tiến hành

Trong 4 ống nghiệm đánh số từ 1 đến 4, cho:

	1	2	3	4
Thuốc thử Fehling	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Nước cất	10 giọt			
Dung dịch glucose 1%		10 giọt		
Dung dịch fructose 1%			10 giọt	
Dung dịch pentose 1%				10 giọt

Lắc đều, đun sôi trong 2 phút.

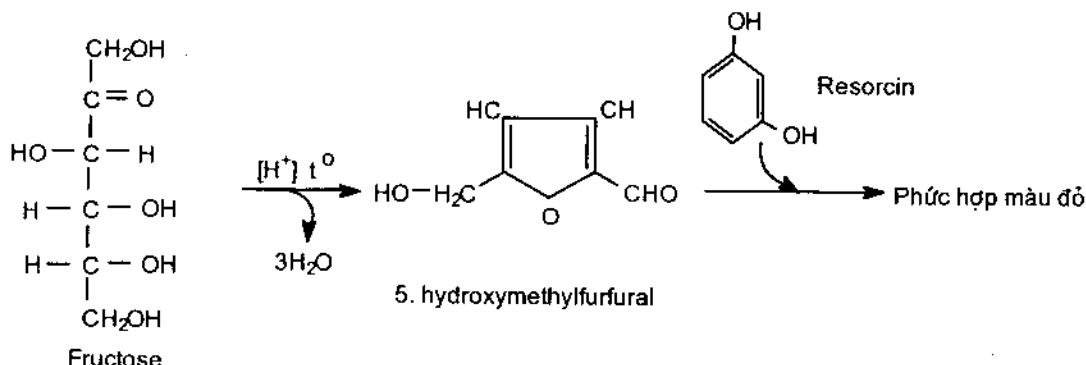
Nhận xét và giải thích kết quả của các ống nghiệm.

Thí nghiệm 2. Xác định cetose bằng phản ứng Selivanoff

Nguyên tắc

Trong môi trường acid vô cơ và dun nóng, các cetohexose bị mất nước và tạo thành oxymethylfurfural (5 hydroxy methylfurfural). Chất này ngưng tụ với resorcin tạo hợp chất có màu đỏ.

Các aldohexose cũng cho phản ứng này, song phản ứng xảy ra rất chậm. Bởi vậy, phản ứng Selivanoff được coi là phản ứng đặc hiệu của cetohexose.



Thuốc thử

Thuốc thử Selivanoff:

- Dung dịch A: Alcol ethylic 96° 376 mL
H₂S0₄ đặc 100 mL
- Dung dịch B: Resorcin 2,5g
Alcol ethylic 96° 50 mL

Khi dùng, trộn dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ 20:1

Các dung dịch:

Dung dịch glucose 1%, dung dịch fructose 1%, dung dịch saccharose 1%, dung dịch maltose 1%.

Tiến hành

Trong 5 ống nghiệm đánh số từ 1 đến 5, cho:

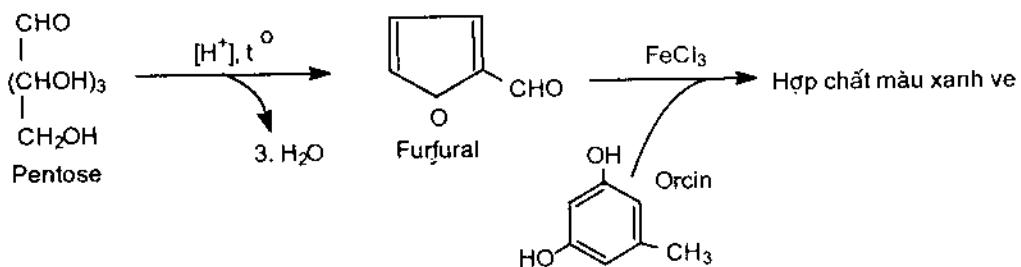
	1	2	3	4	5
Nước cất	5 giọt				
Dung dịch glucose 1%		5 giọt			
Dung dịch fructose 1%			5 giọt		
Dung dịch maltose 1%				5 giọt	
Dung dịch saccharose 1%					5 giọt
Thuốc thử Selivanoff	1 mL				

Lắc đều và đun sôi cách thuỷ các ống trong 1 phút. Nhận xét kết quả. Tiếp tục đun cách thuỷ sôi lại trong 3 phút. Nhận xét kết quả và giải thích.

Thí nghiệm 3. Xác định pentose bằng phản ứng Bial

Nguyên tắc

Trong môi trường acid vô cơ và đun nóng, các pentose bị mất nước và tạo thành furfural. Chất này phản ứng với orcin với sự xúc tác của sắt III chlorur sẽ tạo thành hợp chất có màu xanh ve.



Thuốc thử

Thuốc thử Orcin:

FeCl ₃ .6H ₂ O	1g
HCl đặc	1000 mL
Orcin 6% trong alcol ethylic 96°	35 mL

Các dung dịch:

Dung dịch glucose 1%, dung dịch ribose hoặc arabinose (pentose) 1%.

Tiến hành

Trong 3 ống nghiệm đánh số từ 1 đến 3, cho:

	1	2	3
Thuốc thử Orcin	1 mL	1 mL	1 mL
Nước cất	10 giọt		
Dung dịch glucose 1%		10 giọt	
Dung dịch pentose 1%			10 giọt

Lắc đều các ống. Đun sôi cách thuỷ trong 10 phút. Nhận xét và giải thích kết quả của các ống nghiệm.

Thí nghiệm 4. Xác định tính khử của disaccharid

Nguyên tắc

Những disaccharid có nhóm chức khử trong phân tử nên có khả năng khử đồng II hydroxyd theo nguyên tắc của phản ứng Fehling.

Thuốc thử

Thuốc thử Fehling (xem phần thí nghiệm 1)

Các dung dịch khác

Dung dịch saccharose 1%, dung dịch lactose 1%, dung dịch maltose 1%.

Tiến hành

Trong 3 ống nghiệm đánh số từ 1 đến 3, cho:

	1	2	3
Thuốc thử Fehling	1 mL	1 mL	1 mL
Dung dịch saccharose 1%	10 giọt		
Dung dịch lactose 1%		10 giọt	
Dung dịch maltose 1%			10 giọt

Lắc đều các ống. Đun sôi cách thuỷ trong 5 phút. Nhận xét và giải thích kết quả của các ống nghiệm.

Thí nghiệm 5. Xác định thành phần cấu tạo của disaccharid

Nguyên tắc

Trong môi trường acid, dưới tác dụng của nhiệt độ, liên kết glucosid trong phân tử disaccharid bị thuỷ phân và tạo thành 2 monosaccharid cấu tạo của disaccharid.

Xác định sự có mặt của các monosaccharid tự do bằng phản ứng khử và các phản ứng màu đặc hiệu.

Saccharose khi bị thuỷ phân sẽ tạo thành glucose và fructose. Xác định sự có mặt của 2 monosaccharid này bằng phản ứng Fehling và xác định sự có mặt của fructose bằng phản ứng Selivanoff.

Thuốc thử

- Dung dịch saccharose 1%
- Dung dịch HCl N
- Thuốc thử Fehling (xem phần thí nghiệm 1)
- Thuốc thử Selivanoff (xem phần thí nghiệm 2)

Tiến hành

- Thuỷ phân saccharose:

Cho vào một ống nghiệm: Dung dịch saccharose 1%	1 mL
HCl N	2 giọt

Lắc đều ống nghiệm, đun cách thuỷ sôi trong 5 phút.

- Xác định thành phần cấu tạo của saccharose.

+ Phản ứng Fehling:

Cho vào một ống nghiệm: Thuốc thử Fehling 1 mL
Dịch thuỷ phân saccharose 10 giọt

Lắc đều ống nghiệm, đun cách thuỷ sôi trong 5 phút. Nhận xét và giải thích kết quả trong ống nghiệm.

+ Phản ứng Selivanoff.

Cho vào một ống nghiệm: Thuốc thử Selivanoff 1 mL
Dịch thuỷ phân saccharose 10 giọt

Lắc đều ống nghiệm, đun cách thuỷ sôi trong 1 phút. Nhận xét và giải thích kết quả trong ống nghiệm.

Thí nghiệm 6. Phản ứng của polysaccharid với iod

Nguyên tắc

Ở nhiệt độ bình thường, các polysaccharid kết hợp với iod tạo ra các màu khác nhau tuỳ thuộc vào mức độ phân nhánh và trọng lượng phân tử của các polysaccharid. Màu tạo thành sẽ giảm khi tăng nhiệt độ của môi trường.

Tinh bột cho màu xanh với iod

Glycogen cho màu đỏ với iod

Các dạng dextrin (trọng lượng phân tử nhỏ hơn) tác dụng với iod cho màu khác nhau từ xanh tím đến tím nhạt, đỏ, vàng sẫm và mất màu theo mức độ giảm dần của trọng lượng phân tử.

Thuốc thử

- Dung dịch iod 5 mM trong KI 3%
- Dung dịch hồ tinh bột 1%
- Dung dịch glycogen 1%, dung dịch cellulose 1%.

Tiến hành

Trong 4 ống nghiệm đánh số từ 1 đến 4, cho:

	1	2	3	4
Nước cất	1 mL			
Dung dịch hồ tinh bột 1%		1 mL		
Dung dịch glycogen 1%			1 mL	
Dung dịch cellulose 1%				mL
Dung dịch iod 5 mM	2 giọt	2 giọt	2 giọt	2 giọt

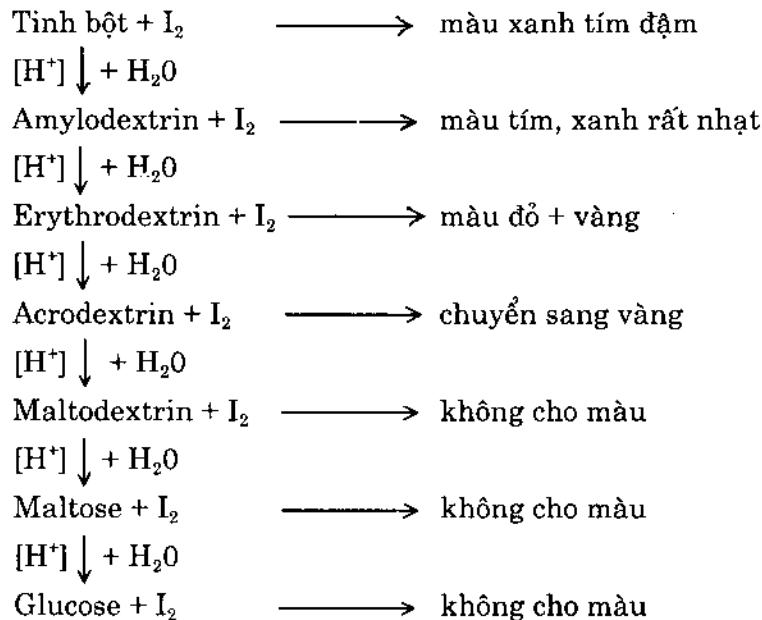
Lắc đều các ống. Nhận xét màu của chúng.

Thí nghiệm 7. Thuỷ phân polysaccharid bằng acid vô cơ

Nguyên tắc

Trong môi trường acid, dưới tác dụng của nhiệt độ, các liên kết glucosid trong phân tử polysaccharid (như tinh bột, glycogen, cellulose...) bị thủy phân, làm cho phân tử polysaccharid bị phân tách nhỏ dần và khi quá trình thủy phân hoàn thành, phân tử polysaccharid bị thủy phân hoàn toàn thành các thành phần cấu tạo nên chúng là glucose.

Với tinh bột, quá trình thủy phân của nó như sau:



Thuốc thử

- Dung dịch iod (xem phần thí nghiệm 6)
- Dung dịch hồ tinh bột 1%
- HCl hoặc H_2SO_4 , đặc
- Thuốc thử Fehling (xem phần thí nghiệm 1)

Tiến hành

Trong bình nón chịu nhiệt, cho:

Dung dịch hồ tinh bột 1%	20 giọt
HCl hoặc H_2SO_4 đặc	10 giọt

Lắc đều bình nón, lấy ngay 1 giọt hỗn hợp dung dịch làm phản ứng màu với 1 giọt dung dịch iod trên lỗ đầu tiên của khay sứ có nhiều lỗ. Đun sôi hỗn hợp dung dịch bằng đèn cồn, sau đó cứ 1-2 phút lấy một giọt dung dịch đang sôi trong bình nón làm phản ứng màu với 1 giọt dung dịch iod trên các lỗ tiếp theo của khay sứ, cho đến khi dịch trong bình nón không làm chuyển màu của iod thì ngừng đun.

Nhận xét sự chuyển màu ở các lỗ trên khay sứ.

Trong một ống nghiệm cho:

Thuốc thử Fehling	1 mL
Dịch thuỷ phân trong bình nón	10 giọt

Lắc đều ống nghiệm và đun sôi trong 5 phút. Nhận xét và giải thích kết quả xảy ra trong ống nghiệm.

Thí nghiệm 8. Chiết suất glycogen từ gan (hoặc cơ)

Nguyên tắc

Glycogen là polysaccharid dự trữ ở người và động vật, được tập trung nhiều ở gan và cơ.

Sau khi phá huỷ tổ chức gan hoặc cơ bằng môi trường kiềm mạnh và nhiệt độ, glycogen được giải phóng và bị kết tủa bởi alcol ở nhiệt độ lạnh, sự có mặt của natri sulfat làm tăng hiệu suất của quá trình tủa glycogen. Glycogen được hòa tan bằng nước cất nóng.

Thuốc thử

- Dung dịch KOH 30%
- Dung dịch Na₂SO₄ bão hòa
- Alcol ethylic 96°
- Dung dịch iod 5mM (xem phần thí nghiệm 6)
- Thuốc thử Fehling (xem phần thí nghiệm 1)
- Dung dịch H₂SO₄ 5N
- Dung dịch NaOH 5N

Tiến hành

Chiết suất glycogen:

Cho vào một ống nghiệm to: gan (hoặc cơ) tươi	2g
Dung dịch KOH 30%	3 mL

Dun cách thuỷ sôi, vừa đun vừa lắc cho đến khi tổ chức gan (hoặc cơ) tan hết trong dung dịch KOH. Làm lạnh trong đá. Thêm 0,2 mL dung dịch Na₂SO₄ bão hòa, lắc đều. Cho thêm 5 mL alcol ethylic 96°, lắc đều để trong đá 5 phút. Ly tâm hoặc lọc để lấy tủa. Sau đó rửa sạch tủa bằng alcol ethylic 96°.

- Nếu lấy tủa và rửa tủa bằng ly tâm thì tiến hành như sau: Cho dịch ống nghiệm to sang ống ly tâm, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, gạn bỏ nước và lấy tủa, cho 3 mL alcol ethylic 96° vào ống ly tâm chứa tủa, dùng que thuỷ tinh nhỏ ngoáy kỹ, ly tâm lại như trên và gạn bỏ dịch trong, lấy lại tủa. Rửa tủa lần thứ hai như trên.

- Nếu lấy tủa và rửa tủa bằng cách lọc thì dùng giấy lọc không gấp nếp, lọc xong cũng rửa tủa 2 lần bằng alcol ethylic 96°, mỗi lần rửa với 3 mL alcol: hút alcol bằng pipet (ống hút chia độ), thả từ từ alcol từ pipet xuống tờ giấy lọc có chứa tủa và di chuyển vòng quanh tờ giấy lọc trên phễu để vừa rửa vừa kéo tủa tập trung vào đáy giấy lọc, khi alcol chảy hết sẽ được tủa glycogen trên giấy lọc.

Sau khi rửa tủa, hoà tan tủa glycogen bằng 3 mL nước cất nóng 60°C.

Kiểm tra dịch glycogen chiết suất:

- Phản ứng với iod: trong 1 ống nghiệm, cho:

Dịch glycogen chiết suất	10 giọt
Dung dịch H ₂ SO ₄ 5N	1 giọt

Lắc đều, cho thêm:

Dung dịch iod 5 mM	2 giọt
--------------------	--------

Lắc đều, màu nâu sẽ xuất hiện.

- Phản ứng Fehling: trong 1 ống nghiệm, cho:

Thuốc thử Fehling	1 mL
Dịch glycogen chiết suất	10 giọt

Lắc đều, đun cách thuỷ sôi 5 phút. Nhận xét kết quả.

Thuỷ phân dịch glycogen chiết suất và xác định thành phần cấu tạo.

- Trong 1 ống nghiệm, cho:

Dịch glycogen chiết suất	1,5 mL
Dung dịch H ₂ SO ₄ 5N	1,5 mL

Lắc đều và đun cách thuỷ sôi trong 30 phút. Trung hoà dịch thủy phân bằng NaOH 5N.

- Thử phản ứng Fehling:

Trong 1 ống nghiệm, cho:

Thuốc thử Fehling	1 mL
Dịch thuỷ phân đã trung hoà	20 giọt

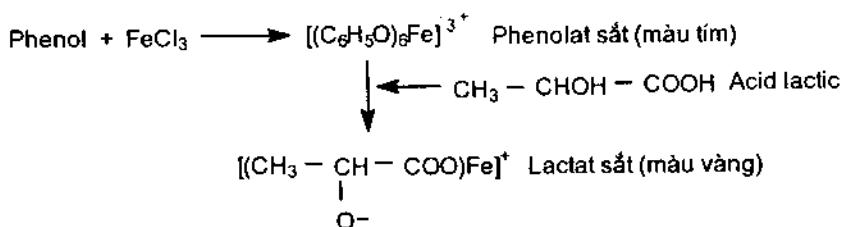
Lắc đều và đun cách thuỷ sôi trong 5 phút. Nhận xét và giải thích kết quả của ống nghiệm.

Thí nghiệm 9. Xác định acid lactic trong cơ

Nguyên tắc

Acid lactic là sản phẩm của quá trình đường phân yếm khai cơ chất của quá trình này là glycogen và glucose. Acid lactic được tạo ra chủ yếu ở cơ trong trạng thái hoạt động.

Acid lactic được chiết xuất từ cơ tươi. Phát hiện sự có mặt của nó trong dịch chiết bằng phản ứng của acid lactic với phenolat sắt để tạo thành lactat sắt có màu vàng.



Thuốc thử

- Dung dịch phenol 1%
 - Dung dịch sắt III chlorur ($FeCl_3$) 1%
 - Dung dịch acid lactic máu 1%

Tiến hành

Chiết suất acid lactic từ cơ:

Lấy khoảng 2g cơ tươi và nghiền nát trong cối sứ. Thêm 5 mL nước cất, tiếp tục nghiền kỹ, gạn lấy nước trong vào 1 ống nghiệm, thêm tiếp 3 mL nước cất vào ống nghiệm và lắc kỹ, rồi đun sôi dịch nước trong để protein bị đông vón lại. Lọc lấy nước trong, đó là dịch chiết cơ.

Phản ứng phát hiện acid lactic trong dịch chiết cơ.

Trong 2 ống nghiệm, cho:

	1	2
Dung dịch phenol 1%	1 mL	1 mL
Dung dịch FeCl_3 1%	2 giọt	2 giọt
Lắc đều. Mùa tím xuất hiện ở 2 ống nghiệm		
Dung dịch acid lactic máu 1%	2 giọt	
Dịch chiết cơ		2 giọt

Lắc đều và nhận xét màu của 2 ống nghiệm

2. HOÁ SINH HỌC CARBOHYDRAT ỨNG DỤNG TRONG LÂM SÀNG

Thí nghiệm 10. Định tính và sơ bộ định lượng đường niệu bằng kỹ thuật Benedict

Nước tiểu bình thường không có các loại đường khử nói chung. Ở trạng thái bệnh lý, trong nước tiểu có thể xuất hiện các loại đường khử như glucose, galactose,

fructose, pentose... Kỹ thuật Benedict được trình bày dưới đây nhằm phát hiện đường khử trong nước tiểu và không phân biệt được loại đường khử gì, tuy nhiên đại đa số các trạng thái bệnh lý đều liên quan tới sự có mặt của glucose trong nước tiểu. Người ta phải dùng những kỹ thuật đặc hiệu để phát hiện và định lượng loại đường nhất định khi cần thiết.

Nguyên tắc. Dựa trên nguyên tắc của phản ứng Fehling và dựa trên màu của tủa được tạo thành để đánh giá sơ bộ về lượng đường khử trong mẫu nước tiểu.

Thuốc thử

Thuốc thử Benedict:

- | | | |
|----------------|--|--------|
| - Dung dịch A: | Natri citrat | 173g |
| | Na ₂ CO ₃ kết tinh | 200g |
| | Nước cất đun nóng | 700 mL |
| | Lắc cho tan hết | |
| - Dung dịch B: | CuSO ₄ . 5H ₂ O | 17,3g |
| | Nước cất | 100 mL |
| | Lắc cho tan hết | |

Đổ dần dung dịch B vào dung dịch A, vừa đổ vừa lắc cho đều. Thêm nước cất vừa đủ 1000 mL, đun cách thuỷ sôi hỗn hợp và lọc.

Tiến hành

Cho vào ống nghiệm:

- | | |
|--------------------|-----------|
| Thuốc thử Benedict | 2,5 mL |
| Nước tiểu | 8-10 giọt |

Lắc đều, đun cách thuỷ sôi trong 3 phút. Nhận định kết quả.

Nhận định kết quả

- Nếu dịch trong ống thử có màu xanh lam trong, không có tủa: phản ứng âm tính, nước tiểu không có đường.
- Nếu dịch trong ống thử chuyển màu từ xanh lam sang xanh lá cây, đáy ống thử có tủa vàng nhạt: phản ứng dương tính (+), lượng đường trong nước tiểu khoảng 5g/lít.
- Nếu dịch trong ống thử có màu xanh lá cây thẫm, đáy ống nghiệm có tủa vàng thẫm lẩn đỗ gạch: phản ứng dương tính (++) , lượng đường trong nước tiểu khoảng 5-10g/lít.
- Nếu dịch trong ống thử chuyển thành màu vàng, đáy ống nghiệm có tủa đỗ gạch ngả sang màu xám: phản ứng dương tính (+++), lượng đường khử trong nước tiểu khoảng 10-20g/lít.

Ý nghĩa lâm sàng

- Glucose niệu xuất hiện khi glycose máu tăng cao > 9,5 mmol/L (hay > 1,7g/L):
 - + Đái đường tuy: phổ biến nhất.
 - + Các bệnh có liên quan tới các tuyến nội tiết khác như: u tuyến yên, u tuyến thượng thận...
 - + Đái đường do các bệnh ở thận. Thí dụ: trong hội chứng Fanconi, đường niệu là do khả năng tái hấp thu glucose của ống thận bị giảm hoặc mất, mặc dù glucose máu ở mức bình thường.
- Galactose niệu: đứng hàng thứ 2 sau glucose niệu, có thể gặp ở phụ nữ có thai và cho con bú, ở trẻ ăn sữa có mắc bệnh bẩm sinh do thiếu hụt enzym chuyển hóa galactose.

Thí nghiệm 11. Định lượng glucose máu bằng phương pháp enzym đo quang "GOD-PAP"

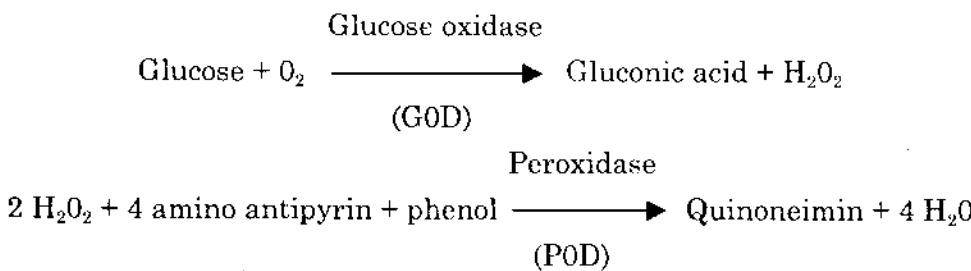
Glucose tự do trong máu là dạng glucid vận chuyển của cơ thể. Nguồn cung cấp glucose máu bao gồm thức ăn đưa từ ngoài vào (nhờ quá trình tiêu hoá và hấp thu ở ống tiêu hoá) và sự phân ly glycogen của mô gan. Các mô trong cơ thể sử dụng glucose máu như nguồn cung cấp năng lượng cho chúng.

Hàm lượng glucose máu được duy trì hàng định trong khoảng 4,2-6,1 mmol/L (76-110 mg/dL) lúc đói và được điều hòa bởi hệ thống thần kinh - nội tiết.

Nguyên tắc

Định lượng glucose máu bằng phương pháp enzym đo quang (enzymatic photometric) dựa theo nguyên tắc sau:

Định lượng glucose máu sau khi oxy hoá glucose bởi enzym glucose oxidase. Chất màu để đo quang là quinoneimin, được tạo ra từ 4-aminoantipyrin và phenol tác dụng với hydrogen peroxid (H_2O_2) dưới xúc tác của peroxidase (phản ứng Trinder).



Đo mật độ quang học ở bước sóng 546 nm, so với mẫu glucose chuẩn.

Thuốc thử

Thuốc thử của hãng Dia Sys Diagnostic Systems GmbH-Germany:

Đệm phosphat pH 7,5	250 mmol/L
Phenol	5 mmol/L
4 Aminoantipyrin	0,5 mmol/L

Glucose oxidase (GOD)	≥ 10 kU/L
Peroxidase (POD)	≥ 1 kU/L
Dung dịch glucose máu	100 mg/dL (5,55 mmol/L)

Mẫu thử:

Huyết thanh.

Huyết tương chống đông bằng heparin hoặc EDTA.

Xét nghiệm được tiến hành chậm nhất trước 1 giờ sau khi lấy máu.

Để tránh sự phân huỷ glucose, dùng chất ức chế NaF hay KF (dùng 20 μ L dung dịch NaF 2g/100 mL cho 1 mL máu) có thể để máu 1 ngày ở 20-25°C và 7 ngày ở 4-8°C.

Tiến hành

Thực hiện các bước bởi hệ thống tự động nếu có thể được.

Bước sóng: 500 nm hoặc 546 nm

Công đo: 1 cm

Nhiệt độ: 20-25°C hoặc 37°C

Đo với ống trắng thuốc thử.

	Ống trắng	Ống thử	Ống mẫu
Thuốc thử	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Nước cất	10 μ L		
Huyết thanh (hoặc huyết tương)		10 μ L	
Dung dịch Glucose máu			10 μ L

Trộn đều, ủ trong 20 phút ở nhiệt độ 20-25°C hoặc trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C.

Đọc mật độ quang học đối chiếu với ống trắng trong vòng 60 phút.

Cách tính

$$\text{Glucose (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ mẫu thử}}{\Delta A \text{ Glucose máu}} \times C. \text{ Glucose máu (mg/dL)}$$

$$\text{Glucose (mmol/L)} = \text{glucose (mg/dL)} \times 0,05551$$

Nhận định kết quả

- *Glucose máu tăng ($>6,1$ mmol/L):* Gặp trong bệnh đái đường do tuy, bệnh cường tuyến thượng thận, u tuyến yên, nhiễm độc tuyến giáp, choáng do chấn thương (gãy xương đùi, chấn thương sọ não...)
- *Glucose máu giảm ($<4,2$ mmol/L):* Gặp trong đói kéo dài, u thận tuy (u adenoma, carcinoma), thiểu năng các tuyến nốt tiết: vỏ thượng thận, tuyến giáp, tuyến yên, tổn thương vùng dưới đồi; bệnh về gan (xơ gan nặng...); nhiễm độc các chất như Asen, CCl₄...

Chương 14

CẤU TẠO HÓA HỌC VÀ CHUYỂN HÓA LIPID

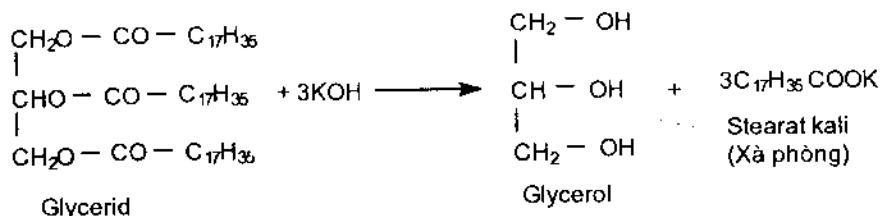
MỤC TIÊU

- Trình bày được nguyên tắc, cách tiến hành và làm được các thí nghiệm về hóa học lipid.
- Trình bày được nguyên tắc, cách tiến hành, làm được các thí nghiệm và nêu được ý nghĩa của các thí nghiệm về chuyển hóa lipid.

Thí nghiệm 1. Phản ứng xà phòng hoá acid béo.

Nguyên tắc:

Dưới tác dụng của kiềm, glycerid bị thuỷ phân tạo thành glycerol và muối kali của acid béo (xà phòng).



Thuốc thử:

- Dầu lạc hoặc mỡ
- Dung dịch KOH trong alcol (0,5 mol/L = 28g/L)
- Nước cất

Dụng cụ:

- Đũa thuỷ tinh, ống nghiệm
- Bếp và nồi đun cách thuỷ

Tiến hành:

Cho vào ống nghiệm to 10 giọt dầu lạc hoặc mỡ lợn. Thêm vào bát sứ 5 mL KOH 0,5M trong alcol, lắc đều. Đặt ống nghiệm vào vào nồi đun sôi cách thuỷ khoảng 30 phút, vừa đun vừa lắc nhẹ. Khi dung dịch trở nên quánh, thêm nước cất

nóng để hoà tan xà phòng (vừa đủ khoảng 6mL). Lấy 2 mL dịch trong ống nghiệm cho vào một ống nghiệm khác cùng với 5 mL nước cất. Lắc mạnh, sẽ thấy xuất hiện bọt xà phòng. Học sinh có thể làm thêm ống chứng với dung dịch trước khi đun để so sánh.

Thí nghiệm 2: Sự nhũ tương hoá lipid

Nguyên tắc:

Dầu, mỡ không hoà tan trong nước. Khi lắc mạnh dầu, mỡ với nước sẽ tạo thành nhũ tương không bền; vì sau khi để yên một thời gian, dung dịch sẽ lại phân chia thành hai lớp : lớp dầu, mỡ ở trên và lớp nước ở dưới. Nếu thêm chất nhũ hoá, ví dụ Na_2CO_3 , protein, muối mật vào dầu, mỡ sẽ tạo thành nhũ tương bền.

Thuốc thử:

- Dầu lạc
- Dung dịch Na_2CO_3 1% trong nước
- Dung dịch gelatin 2% hoặc protein lòng trắng trứng 1%
- Mật (pha loãng 1/3 với nước cất)
- Alcol-ether tỷ lệ 1/1

Tiến hành:

Dùng 5 ống nghiệm, cho vào các dung dịch sau:

Thuốc thử	Ống nghiệm					
	1	2	3	4	5	6
Nước cất	1mL					1mL
Na_2CO_3 1%		1mL				
Gelatin hoặc lòng trắng trứng			1mL			
Mật pha loãng				1mL		
Alcol-ether					1mL	
Dầu lạc	2 giọt	2 giọt	2 giọt	2 giọt	2 giọt	2 giọt
Lecithin						

Lắc kỹ các ống nghiệm, quan sát hiện tượng nhũ tương hóa và hiện tượng khác ở các ống và giải thích các hiện tượng xảy ra.

Thí nghiệm 3. Chiết xuất lecithin

Nguyên tắc:

Dựa vào tính chất của lecithin tan trong alcol nóng nhưng không tan trong aceton.

Nguyên liệu và dụng cụ:

- Lòng đỏ trứng, alcol 95°, Aceton
- Bếp điện kín

Tiến hành:

- Cho vào cốc thuỷ tinh có mỗ :

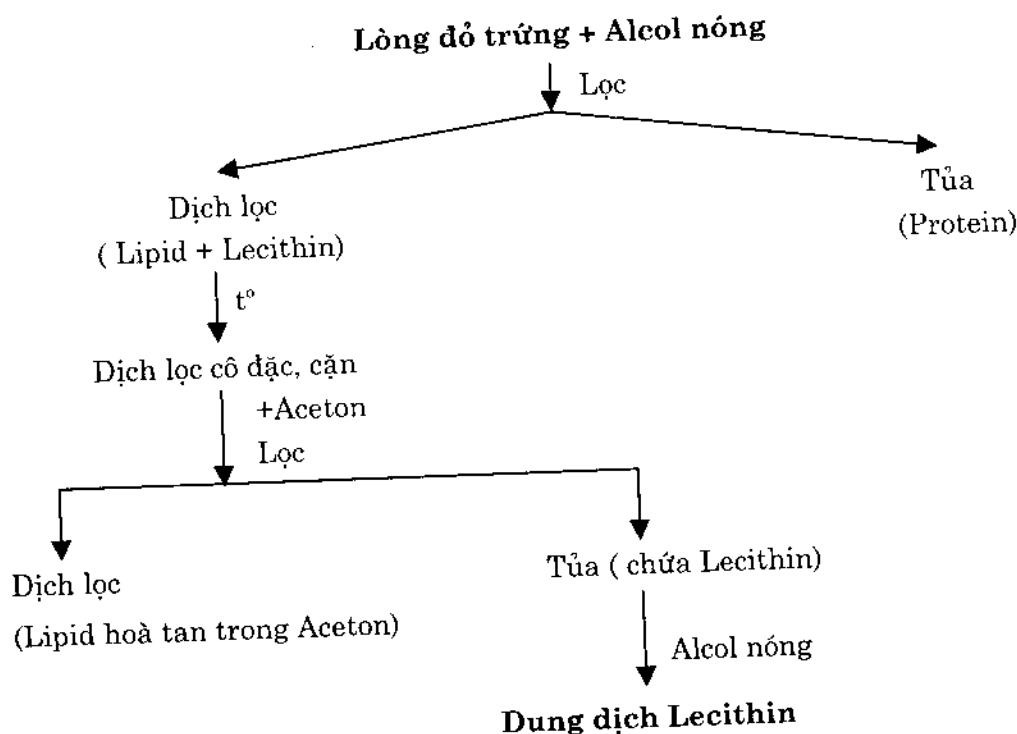
Lòng đỏ trứng: 1 quả

Alcol 95°, nóng: 40mL

Dùng đũa thuỷ tinh trộn kỹ 5-10 phút . Lecithin và các lipid khác tan trong alcol, còn protein bị túa. Lọc lấy dịch trong vào một bát sứ nhỏ.

- Cố dịch lọc trên bếp điện kín để bốc hơi alcol đến khi dịch sánh lại
- Thêm vào dịch sánh 10 mL aceton : Lecithin bị túa, gạn lấy túa. Các lipid khác hoà tan trong dịch lọc.
- Hoà tan túa trong 20 mL alcol nóng, ta được dung dịch Lecithin. Dùng dung dịch này để tiến hành thuỷ phân Lecithin và xác định các thành phần cấu tạo ở thí nghiệm tiếp theo.

SƠ ĐỒ QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT LECITHIN TỪ LÒNG ĐỎ TRỨNG



**Thí nghiệm 4. Thuỷ phân lecithin và xác định thành phần cấu tạo
Nguyên tắc:**

Lecithin bị thuỷ phân trong môi trường acid nóng, giải phóng các thành phần cấu tạo : glycerol, acid béo, H_3PO_4 và cholin.

Nguyên liệu, thuốc thử:

- Dung dịch lecithin chiết xuất từ lòng đỏ trứng ở thí nghiệm 3.
 - Dung dịch iod bão hòa trong KI 20%.
 - NaOH 10%.
 - Dung dịch nitrat bạc-amoniac: Hoà tan 2,6 g bạc nitrat trong 50 mL nước cất. Sau đó thêm dần amoniac cho đến khi tan kết tủa. Cuối cùng thêm nước cất cho đủ 100 mL.
 - Bột KHSO_4 (hay NaHSO_4).
 - Dung dịch molypden
 - Amoni molypdat 7,5 g
 - Nước cất 40 mL
 - Acid nitric đặc 50 mL

Tiến hành:

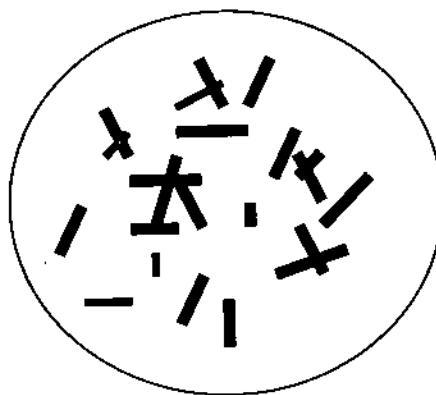
- Thuỷ phân lecithin: cho vào ống nghiệm :
Dung dịch lecithin trong Alcol 1,5 mL
 H_2SO_4 10% 1,5 mL
Đun sôi cách thuỷ sôi 20 phút.
 - Xác định thành phần cấu tạo của lecithin

Lecithin bị thuỷ phân sẽ cho ra các thành phần: Acid béo, glycerol, cholin, và acid phosphoric.

- a. Acid béo. Sau khi dung dịch thuỷ phân Lecithin ở trên để nguội, nếu có acid béo sẽ xuất hiện trên bề mặt dung dịch thuỷ phân những giọt mỡ (acid béo).
 - b. Cholin.

Trung hoà dịch thuỷ phân bằng 4 giọt NaOH 10%

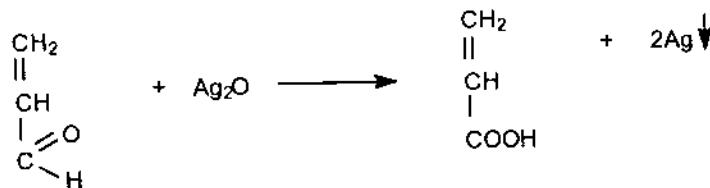
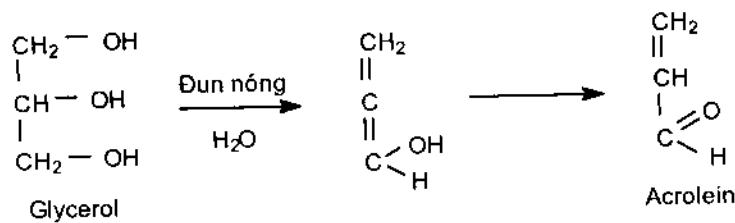
Nhỏ một giọt dịch thuỷ phân lên một phiến kính, thêm một giọt dung dịch iod bão hòa trong KI và đậy bằng một lam kính mỏng. Soi dưới kính hiển vi, nếu dịch thuỷ phân có cholin sẽ xuất hiện các tinh thể cholin periodid có dạng các mảnh cát màu nâu.



Hình 14.1. Tinh thể periodur cholin

c. Glycerol

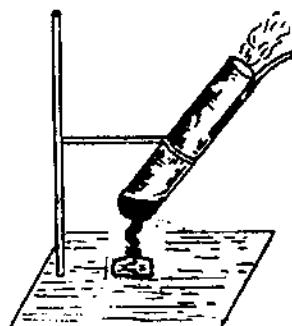
- Nguyên tắc: Khi đun nóng với chất khử nước (KHSO_4), glycerol sẽ bị mất hai phân tử nước, biến thành aldehyd acrilic (acrolein). Nhận biết acrolein bằng:
 - + Mùi mỡ cháy
 - + Khử Ag_2O thành Ag kim loại có màu trắng xám (do nhóm chức aldehyd của acrolein)



- Tiến hành:

- + Cho 10 giọt dịch thuỷ phân vào một ống nghiệm. Làm bốc hơi dung dịch trên nồi cách thuỷ còn lại glycerol.
- + Cho 4 giọt glycerol (hoá chất chuẩn) vào một ống nghiệm khác (dùng làm ống chứng).
- + Cho vào cả 2 ống, mỗi ống 200 mg bột KHSO_4 (hoặc NaHSO_4). Đun cẩn thận hỗn hợp này cho đến khi có khói trắng bốc lên. Nhận biết mùi acrolein.

- + Lấy một mảnh giấy lọc thấm ướt dung dịch oxid bạc và cho vào miệng của hai ống nghiệm: ống chứng và ống thử.
- Trên giấy xuất hiện vệt đen (Ag).



Hình 14.2. Phản ứng xác định glycerol

d. Acid phosphoric

- Nguyên tắc: H_3PO_4 tác dụng với amoni molypdat và acid nitric để tạo thành amoni phosphomolypdat màu vàng chanh.
- Tiến hành:

Cho vào một ống nghiệm:

Dịch thuỷ phân	10 giọt
Dung dịch molypden	3 giọt

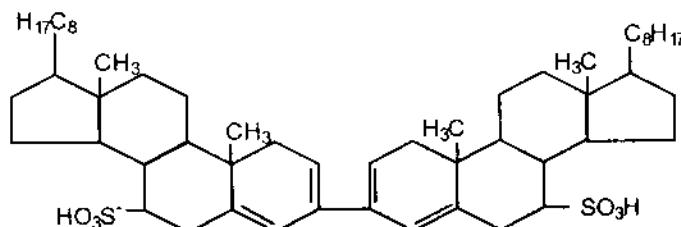
Đun sôi trực tiếp hoặc cách thuỷ.

Chất lỏng dần dần có màu vàng chanh và có tủa amoni phospho molypdat.

Thí nghiệm 5. Phản ứng màu định tính cholesterol (Phản ứng Liebermann Burchard)

Nguyên tắc:

Phản ứng màu của cholesterol dựa trên cơ chế chung, dưới tác dụng khử nước của acid sulfuric, hai phân tử cholesterol bị mất đi hai phân tử nước và kết hợp lại với nhau ở vị trí C3 tạo ra một hợp chất có công thức thô là $C_{54}H_{88}$ rồi sau đó phản ứng với hai phân tử H_2SO_4 để sinh ra hợp chất màu đỏ. Nếu có anhydrid acetic thì sẽ sinh ra hợp chất màu xanh trong đó chỉ có một gốc acid sulfuric.



Bicholestadien - disulfuric

Thuốc thử:

Dung dịch cholesterol 0,3% trong chloroform

Acid sulfuric đậm đặc

Tiến hành:

Cho vào một ống nghiệm:

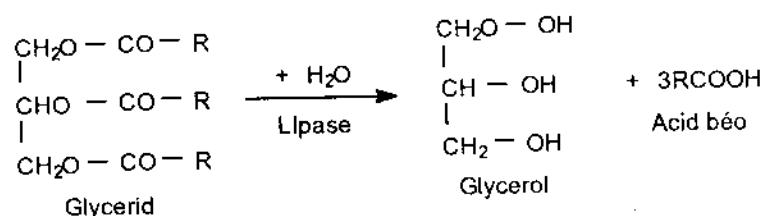
Dung dịch cholesterol 0,3%	10 giọt
Anhydrid acetic	3 giọt
Acid sulfuric đậm đặc	1 giọt

Lắc đều, dung dịch chuyển từ màu hồng tím, xanh rồi xanh lá cây.

Thí nghiệm 6. Thuỷ phân triglycerid bằng enzym lipase

Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm dưới tác dụng của lipase có trong dịch tuy các triglycerid bị thủy phân tạo thành glycerol và acid béo.



Sự có mặt của acid béo sau khi thủy phân sẽ làm thay đổi pH của môi trường. Nhận biết sự thay đổi pH của dịch thủy phân bằng chỉ thị màu phenolphthalein.

Thuốc thử:

– Dung dịch sữa 5% trong nước

– Dịch tuy 5% trong nước:

Sau khi giết chết con vật (ví dụ gà) lấy nhanh tuy, thái nhỏ trộn lẩn với 3-4 mL muối mật, nghiền trong cối sứ với cát hoặc thuỷ tinh trong 30 phút. Cho hỗn hợp vào trong cốc thuỷ tinh và cho thêm 4 thể tích dung dịch glycerol 60% (2 phần glycerol + 1 phần nước). Thêm vài tinh thể thymol và để 2-3 ngày. Sau đó lọc qua vải thưa hoặc ly tâm. Bảo quản lạnh giữ được một năm. Khi dùng pha loãng dịch này thành 5% trong nước.

– Phenolphthalein 1% trong alcol

– Dung dịch Na carbonat 0,1% trong nước.

Tiến hành:

Dùng 2 ống nghiệm có đánh số lần lượt cho các chất sau.

Thuốc thử	Ống nghiệm	
	1	2
Dung dịch sữa 5% (giọt)	10	10
Phenolphthalein 1%(giọt)	1	1
NaCO ₃ 0,1%	Nhỏ từng giọt đến khi dung dịch có màu hồng nhạt	
Dịch tuy 5% (giọt)	5	0
Nước cất (giọt)	0	5

Lắc đều, đặt cả 2 ống ở nhiệt độ 40°C trong 30 phút. Nhận xét sự đổi màu ở các ống.

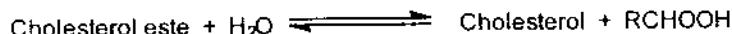
Thí nghiệm 7. Định lượng cholesterol toàn phần huyết thanh theo phương pháp enzym do màu (phương pháp CHO-PAP với hoá chất kit của Human)

Nguyên tắc

Theo phương pháp CHO – PAP (Trin.P.(1969).Ann. Clin. Biochem. 6:24):

Cholesterol có trong huyết tương được chuyển thành cholesteron và H₂O₂ do các enzym cholesterol esterase và cholesterol oxidase xúc tác. Sau đó H₂O₂ kết hợp với chất hiện màu nhờ tác dụng của enzym peroxidase để chuyển thành hợp chất có màu đính hấp thụ cực đại ở 532 nm.

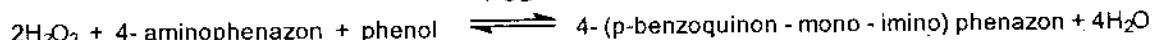
Cholesterol oxydase



Cholesterol oxydase



POD



Thuốc thử:

Thuốc thử hỗn hợp gồm:

- Dệm Phosphat (pH=6,5) 100 mmol/L
- 4-Aminophenazon 0,25 mmol/L
- Phenol 5 mmol/L
- Peroxidase >5KU/L

- Cholesterolemesterase	>150 U/L
- Cholesteroloxidase	>100 U/L
- Sodium azid	0,05%
Cholesterol chuẩn	200 mg/dL tương đương 5,17 mmol/L

Tiến hành:

Sử dụng máy 4010 của hãng Boehringer mannheim (Đức)

Cho các chất vào 3 ống nghiệm đã đánh số như sau:

Thuốc thử	Ống trắng	Ống chuẩn	Ống thử
H ₂ O	10 µL		
Cholesterol chuẩn 5,17 mmol/L		10µL	
Huyết thanh hoặc huyết tương			10µL
Thuốc thử hỗn hợp	1000µL	1000µL	1000µL

Lắc đều, để 10 phút ở nhiệt độ phòng. Trong vòng 60 phút, đo MDQH của ống mẫu và ống thử theo ống trắng ở bước sóng 546 nm (hoặc 500 nm).

Nếu đã xác định được hệ số trước theo ống chuẩn, có thể tiến hành thí nghiệm đơn giản hơn như sau: Cho vào một ống nghiệm

Huyết thanh: 10µL

Thuốc thử hỗn hợp: 1000µL

Lắc đều, để 10 phút ở nhiệt độ phòng, đo MDQH ở bước sóng 546 nm (hoặc 500 nm) trong vòng 60 phút.

Tính kết quả:

- Tính kết quả của ống thử dựa theo nồng độ cholesterol của ống chuẩn.

- Tính kết quả theo hệ số:

$$\text{mg/dL} = 853 \times \Delta A\ 546$$

$$\text{mmol/L} = 22,1 \times \Delta A\ 546$$

Ý nghĩa lâm sàng

- Ở người bình thường cholesterol huyết thanh < 5,7 mmol/L, khi giá trị tăng trên 5,7 là có nghi ngờ tăng cần phối hợp với các xét nghiệm khác. cholesterol huyết thanh được coi là cao khi vượt quá 6,7 mmol/L
- Cholesterol tăng trong các bệnh:
 - + Cao thứ phát: Đái tháo đường, thiểu năng tuyến giáp, viêm tuy cấp, viêm tuy mạn, thận hư nhiễm mõi.
 - + Cao nguyên phát: Bệnh bẩm sinh tăng lipoprotein.

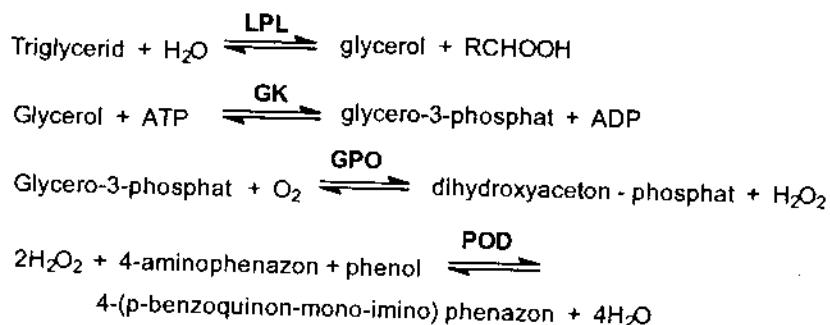
- Cholesterol giảm hiếm gặp hơn, tuy nhiên có thể gặp
 - + Bệnh bẩm sinh về chuyển hoá: Thiếu A, hoặc B-lipoprotein
 - + Cholesterol < 2 mmol/L gặp trong suy giảm chức năng tế bào gan.

Thí nghiệm 8. Định lượng triglycerid huyết thanh theo phương pháp enzym

Nguyên tắc:

Theo phương pháp GPO- PAP (Trin.P.(1969).Ann. Clin. Biochem.6:24).

Triglycerid có trong huyết tương được chuyển thành dihydroxyaceton-phosphat và H₂O₂ bởi các enzym lipoprotein lipase (LPL), glycerol kinase (GK), glycero-3-phosphat- oxidase (GPO). Sau đó, H₂O₂ được kết hợp với một chất hiện màu và nhờ tác dụng của enzym peroxidase (POD) chuyển thành hợp chất có màu hồng, dính hấp thụ cực đại ở 546 nm.



Thuốc thử:

Thuốc thử hỗn hợp :

- Đệm pH=7,5	50 mmol/L
- 4-chlorophenol	5 mmol/L
- 4-aminoantipyrin	0,25 mmol/L
- Mg ²⁺	4,5 mmol/L
- ATP	2 mmol/L
- Lipase	>1300 U/L
- Peroxidase	> 500 U/L
- Glycerokinase	> 400 U/L
- Glycerol 3 phosphooxidase	>1500 U/L
Dung dịch chuẩn triglycerid	2,28 mmol/L

Tiến hành:

Sử dụng máy 4010 của hãng Boehringer Manheim

Các thuốc thử đã được chuẩn bị sẵn.

Cho lần lượt thuốc thử vào 3 ống nghiệm đã đánh số sẵn như sau:

Thuốc thử	Ống trắng	Ống chuẩn	Ống thử
H ₂ O	10µL		
D _d triglycerid chuẩn 2,28 mmol		10µL	
Huyết thanh (hoặc huyết tương)			10µL
Thuốc thử hỗn hợp	1000µL	1000µL	1000µL

Lắc đều, để 10 phút ở nhiệt độ phòng. Trong vòng 60 phút, đo MĐQH của ống mẫu và ống thử theo ống trắng ở bước sóng 546 nm (hoặc 500 nm).

Nếu đã xác định được hệ số trước theo ống chuẩn, có thể tiến hành thí nghiệm đơn giản hơn như sau: Cho vào một ống nghiệm

Huyết thanh : 10 µl

Thuốc thử hỗn hợp: 1000 µl

Lắc đều, để 10 phút ở nhiệt độ phòng, đo MĐQH ở bước sóng 546 nm (hoặc 500 nm) trong vòng 60 phút.

Tính kết quả:

- Tính kết quả dựa theo nồng độ ống chuẩn
- Tính kết quả theo hệ số:

$$\text{mg/dL} = 1040 \times \Delta A 546$$

$$\text{mmol/L} = 11,9 \times \Delta A 546$$

Ý nghĩa lâm sàng:

Triglycerid huyết thanh do hai nguồn :

- Ngoại sinh: các tế bào niêm mạc ruột tổng hợp các chylomicon từ các thành phần lipid thức ăn được hấp thu. Các chylomicon chứa rất nhiều TG (86%) theo đường bạch mạch và vào máu.
- Nội sinh: TG được tạo ra ở tế bào gan, gắn với apoprotein và đưa vào máu dưới dạng VLDL.

Chỉ định xét nghiệm:

- Chẩn đoán sớm nguy cơ xơ vữa động mạch và phân loại các dạng có lipid máu cao.
- Theo dõi hiệu quả chế độ ăn và thuốc làm giảm lipid máu.

Chương 15

CẤU TẠO HÓA HỌC, CHUYỂN HÓA ACID AMIN VÀ PROTEIN

MỤC TIÊU

1. Sinh viên trình bày được các phản ứng minh họa tính chất và chuyển hóa acid amin, protein và ứng dụng.
2. Sinh viên trình bày được các xét nghiệm định lượng protein và các sản phẩm chuyển hóa của chúng trong máu.
3. Sinh viên trình bày được xét nghiệm tìm protein trong nước tiểu.

HOÁ HỌC

Có 20 acid amin thường gặp, chúng được chia thành 5 nhóm, các nhóm khác nhau ở đặc tính và cấu tạo của gốc R. Từ 20 acid amin thường gặp và các dẫn xuất của chúng, tổ hợp thành 10^{12} phân tử protein khác nhau. Các acid amin và các protein có các tính chất hóa học đặc trưng và được minh họa qua các thí nghiệm sau:

1. ACID AMIN

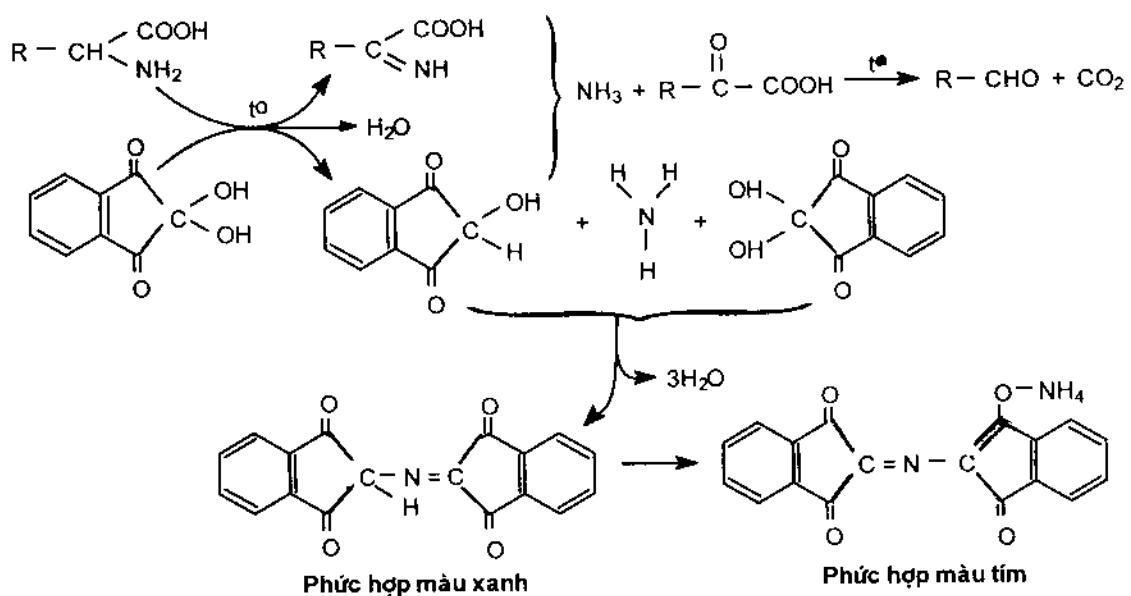
Thí nghiệm 1: Phản ứng ninhydrin tìm acid amin

Nguyên tắc:

Ninhydrin là chất oxy hoá mạnh, có khả năng khử carboxyl oxy hoá acid α amin tạo thành CO_2 , NH_3 và aldehyd kém 1 carbon so với acid amin ban đầu. Sau đó ninhydrin và ninhydrin bị khử (hydrindantin) phản ứng với NH_3 tự do tạo thành phức hợp màu tím có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng $\lambda = 570 \text{ nm}$. Cường độ màu phụ thuộc vào nồng độ acid amin.

Những acid amin không phải là α amin cũng phản ứng với ninhydrin tạo phức hợp màu nhưng không giải phóng CO_2 . Với acid amin prolin và 4 hydroxyprolin tạo màu vàng với ninhydrin.

Cơ chế phản ứng ninhydrin với acid amin



Thuốc thử:

Dung dịch ninhydrin 0,1%

- Ninhidrin 0,1g
- Alcol 96° 10 mL

Hoà tan rồi thêm

- Nước cất vừa đủ 100 mL

Các dung dịch:

- Dung dịch glycine 0,1%
- Dung dịch tryptophan (tyrosin) 0,1%
- Dung dịch alanin 0,1%
- Dung dịch protein lòng trắng trứng 0,1%
- Dung dịch gelatin 0,1%

Tiến hành:

	Ống 1	Ống 2	Ống 3	Ống 4	Ống 5
- Dung dịch glycine 0,1% (mL)	1				
- Dung dịch tryptophan (tyrosin) 0,1% (mL)		1			
- Dung dịch alanin 0,1% (mL)				1	
- Dung dịch protein lòng trắng trứng 0,1% (mL)			1		
- Dung dịch gelatin 0,1% (mL)				1	1
Thuốc thử ninhydrin 0,1% (giọt)	5	5	5	5	5

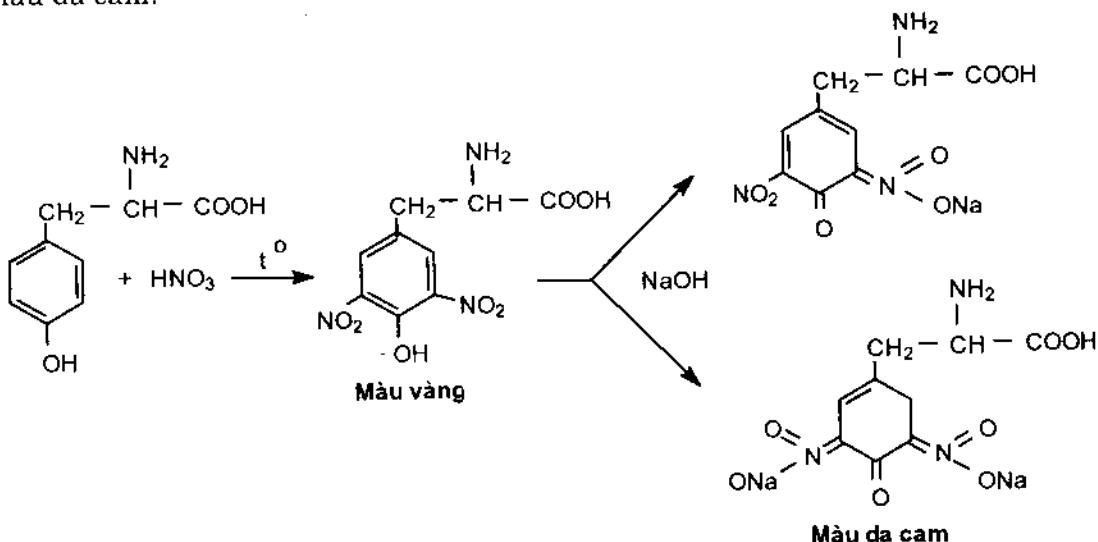
Dùng cách thuỷ sôi 10 phút sẽ thấy xuất hiện màu.

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 2. Phản ứng xantoprotein tìm acid amin vòng

Nguyên tắc:

Dưới tác dụng của HNO_3 nhân thơm của acid amin bị gắn nitro tạo thành các dẫn xuất nitro màu vàng, trong môi trường $NaOH$ sẽ tạo thành dạng muối natri màu da cam.



Thuốc thử:

- Acid nitric đậm đặc
- Dung dịch $NaOH$ 10% (hay amoniac đậm)
- Dung dịch protein 0,1%
- Dung dịch glycine 0,1%
- Dung dịch tryprophan 0,1%
- Dung dịch gelatin 0,1%

Tiến hành:

Trong 4 ống nghiệm: 1,2,3,4

	1	2	3	4
Dung dịch protein 0,1% (mL)	1			
Dung dịch glycine 0,1% (mL)		1		
Dung dịch tryprophan 0,1% (mL)			1	
Dung dịch gelatin 0,1% (mL)	3	3	3	1
Acid nitric đậm đặc (giọt)				3
Đun cách thuỷ sôi 5 phút (nếu có acid amin vòng sẽ xuất hiện màu vàng) để nguội thêm:				
NaOH 10% (giọt)	10	10	10	10

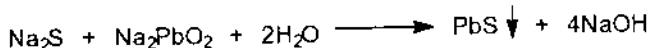
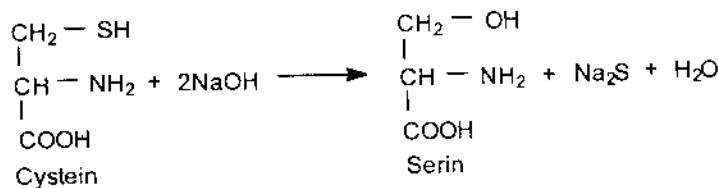
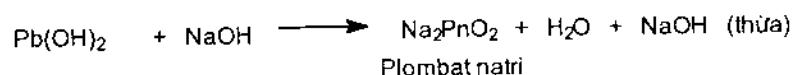
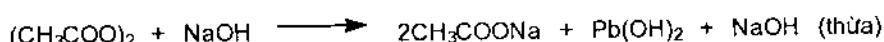
Lắc đều và quan sát màu của thí nghiệm

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 3. Phản ứng tạo PbS phát hiện acid amin có S

Nguyên tắc:

Trong môi trường kiềm và đun nóng cystin, cystein sẽ phản ứng với muối chì tạo thành chì sulfur (PbS) kết tủa màu đen xám. Cơ chế phản ứng như sau:



Lượng tủa phụ thuộc vào lượng cystein và cystin có trong dung dịch. Methionin là acid amin có chứa S, nhưng S ở dạng liên kết bền vững nên không có phản ứng trên.

Thuốc thử:

Dung dịch chì acetat $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 5%

Dung dịch NaOH 2N

Dung dịch protein trứng 1%

Dung dịch keratin 0,1%

Dung dịch cystein 0,1%

Dung dịch methionin 0,1%

Tiến hành:

Trong 4 ống nghiệm ghi số lần lượt cho vào đó:

	1	2	3	4
Dung dịch protein trứng 1% (mL)	1			
Dung dịch keratin 0,1% (mL)		1		
Dung dịch cystein 0,1% (mL)			1	
Dung dịch methionin (glycin) 0,1% (mL)				1
Dung dịch NaOH 2N (mL)	1	1	1	1
Dung dịch chì acetat $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 5% (giọt)	1	1	1	1

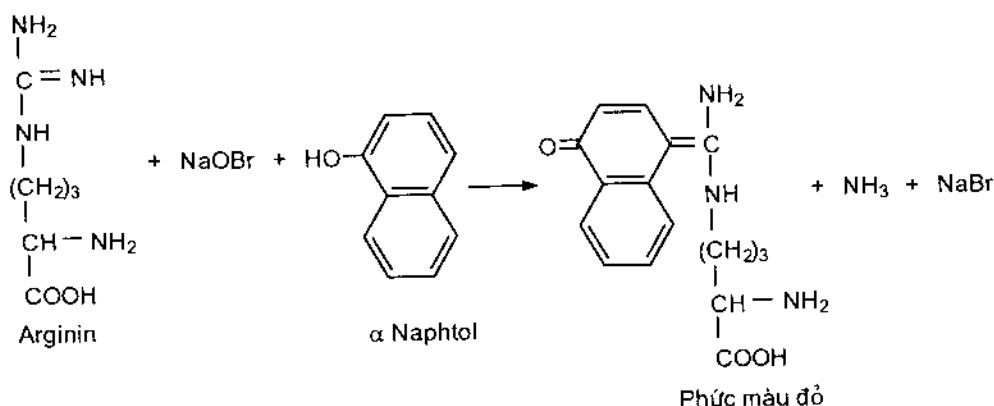
Lắc đều đun cách thuỷ sôi, ống nào có chứa acid amin có lưu huỳnh sẽ có màu xám đen do PbS được tạo thành.

Nhân xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 4. Phản ứng Sakaguchi tim arginin

Nguyên tắc:

Arginin tác dung với α naphtol và natrihypobromid (NaOBr) tạo thành sản phẩm ngưng tụ có màu đỏ.



Thuốc thử:

- Dung dịch arginin 0,1%
 - Dung dịch protein trứng 0,1%
 - Dung dịch glycine 0,1%
 - Dung dịch α naphtol 0,1%
 - + α naphtol 0,1g
 - + Alcol ethylic 70° 100mL
 - Dung dịch natrihypobromid (NaOBr)

Hoà tan 2g Brom (tương đương 1mL) trong 100mL NaOH 5%. Pha trong tủ hút. Dung trong chai màu, dùng được trong 15 ngày.

Tiến hành:

Dùng 3 ống nghiêm ghi số.

	1	2	3
Dung dịch arginin 0,1% (mL)	0,5		
Dung dịch protein trứng 0,1% (mL)		0,5	
Dung dịch glycin 0,1% (mL)			0,5
Dung dịch α naphtol 0,1% (mL)	0,5	0,5	0,5
Dung dịch natrihypobromid (NaOBr) (giọt)	5	5	5

Lắc đều quan sát màu

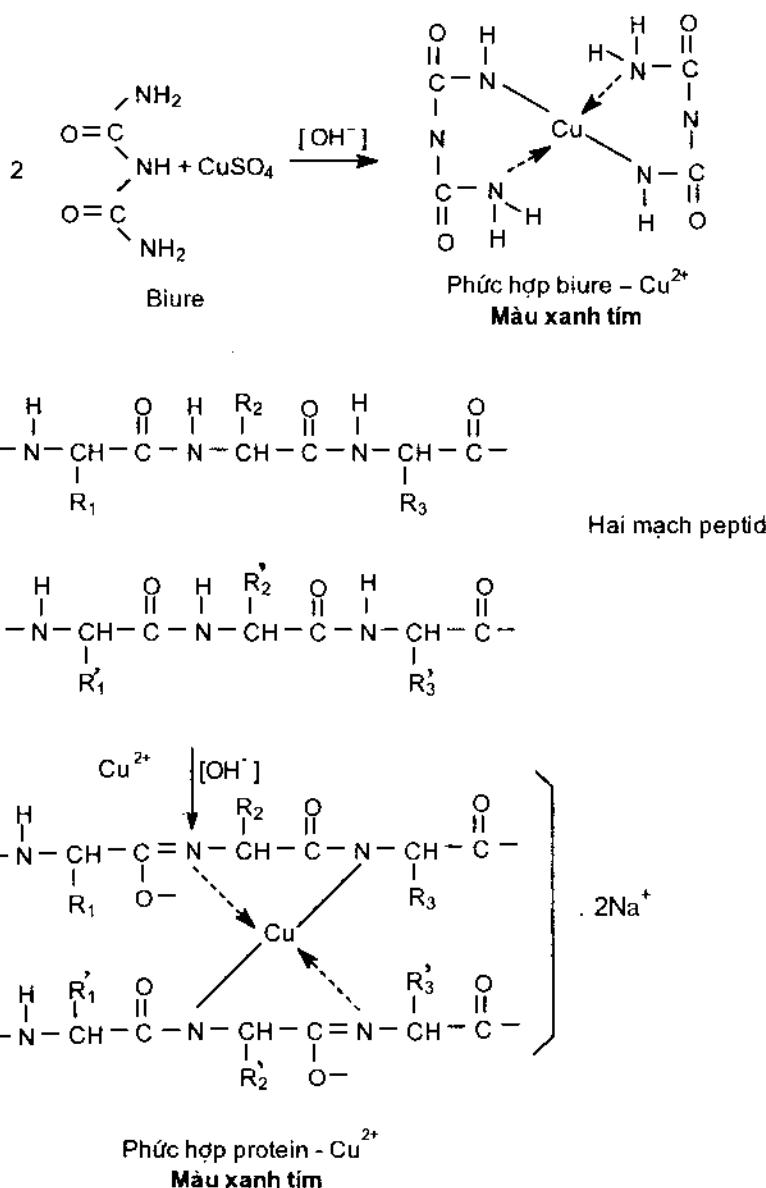
Nhận xét và giải thích kết quả.

2. PROTEIN

Thí nghiệm 5. Phản ứng biure

Nguyên tắc:

Trong môi trường kiềm, các liên kết peptid trong protein sẽ tạo ra với ion Cu^{2+} một phức hợp màu tím. Một số hợp chất có 2 nhóm amit như biure, oxamid cũng cho phản ứng biure dương tính.



Trong môi trường kiềm mạnh, phức hợp màu ở dưới dạng anion. Phản ứng này tạo phức hợp có màu bền, ổn định, được dùng để định lượng protein.

Thuốc thử:

- Các dung dịch protein và acid amin:
 - + Dung dịch protein trứng 0,1%
 - + Dung dịch gelatin 0,1%
 - + Dung dịch glycine 0,1%
- Thuốc thử biure (pha theo Gornall)
 - + CuSO₄.5H₂O 1,5g
 - + Na, K tartrat 6g

Hoà tan trong

- + Nước cất 500mL
- + KI 1g
- + NaOH 10% 300mL
- + Nước cất vừa đủ 1000mL

Bảo quản trong lọ pyrex hay polyethylen, đậy nút kín.

Tiến hành: Trong 3 ống nghiệm

	1	2	3
- Dung dịch protein trứng 0,1% (giọt)	10		
- Dung dịch gelatin 0,1% (giọt)		10	
- Dung dịch glycine 0,1% (giọt)			10
- Thuốc thử biure (giọt)	10	10	10

Lắc đều, phản ứng được coi là dương tính khi có màu tím rõ rệt.

Nhận xét và giải thích kết quả.

SỰ KẾT TỦA PROTEIN

Protein hòa tan trong nước thành dung dịch keo ưa nước. Trong dung dịch các tiểu phân protein cùng loại tích điện cùng dấu, xung quanh tiểu phân protein có lớp áo nước (phân tử lưỡng cực liên kết với các nhóm phân cực như -OH, -COOH, -NH₂, = NH...). Nhờ hai yếu tố trên, protein tồn tại dưới dạng dung dịch keo bền vững.

Protein sẽ kết tủa rõ ràng nếu đồng thời làm mất hai yếu tố hòa tan trên như sau:

- *Làm mất điện tích của tiểu phân protein bằng cách:*
 - Đưa pH của dung dịch protein về pH đồng điện (pHi) của protein đó, khi pH của dung dịch bằng với pHi của protein, đa số các protein ở dạng lưỡng cực, không mang điện tích.
 - Thêm chất điện giải NaCl, (NH₄)SO₄... các ion này sẽ trung hoà điện tích của tiểu phân protein.

Làm mất lớp áo nước bằng cách:

- Gây biến tính protein, cấu trúc của protein sẽ bị đảo lộn bằng cách đun sôi, thêm muối kim loại nặng, thêm acid, kiềm mạnh và các tác nhân lý học...
- Thêm các chất hút nước như alcol ethylic, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tanin....

Thí nghiệm 6. Tủa protein bằng cách đun sôi và các yếu tố khác

Nguyên tắc:

Khi đun sôi các tiểu phân protein bị mất lớp áo nước. Nếu chúng bị trung hoà điện tích bằng NaCl hoặc bằng cách đưa pH của dung dịch chứa protein gần bằng hoặc bằng pH_i của protein thì protein sẽ bị kết tủa.

Thuốc thử:

- Dung dịch protein lòng trắng trứng không chứa NaCl:
Lọc lòng trắng trứng gà qua vải thưa (lòng trắng sẽ mất các chất nhòn). Trộn lẫn một thể tích lòng trắng với 15 thể tích nước cất, trộn kỹ rồi lọc lại sẽ có dung dịch protein trứng khoảng 1%.
- Dung dịch acid acetic 1%
- Dung dịch NaOH 10%
- Dung dịch NaCl bão hòa
- Dung dịch acid acetic 10%

Hoà tan 38g NaCl trong 1 lít nước cất sôi, để nguội thêm Na_2CO_3 cho tới phản ứng kiềm nhẹ với phenolphthalein rồi lọc. (Độ hòa tan của NaCl ở 100°C là 39,2g, ở 0° là 35,6g).

Tiến hành:

Dùng 5 ống nghiệm có ghi số. Cho lần lượt các dung dịch theo bảng

	1	2	3	4	5
Dung dịch protein trứng không có NaCl (mL)	1	1	1	1	1
Dung dịch acid acetic 1% (giọt)		2			
Dung dịch acid acetic 10% (giọt)			5	5	
Dung dịch NaCl bão hòa (giọt)				2	
Dung dịch NaOH 10% (giọt)					2

Đun sôi các ống nghiệm và nhận xét sự kết tủa.

Nhận xét và giải thích kết quả

Thí nghiệm 7. Tủa bằng acid hữu cơ

Nguyên tắc:

Phản ứng kết tủa protein bằng acid hữu cơ xảy ra không thuận nghịch. Người ta thường dùng acid tricloacetic $\text{Cl}_3\text{C COOH}$, acid sulfosalisilic $\text{C}_6\text{H}_3\text{OHCOOHSO}_3\text{H}$.

Acid tricloacetic làm kết tủa protein, nhưng không tủa peptid và acid amin nên được dùng để loại bỏ protein ra khỏi huyết thanh trong việc định lượng các chất không phải là protein có trong huyết thanh.

Acid sulfosalicilic được dùng để phát hiện protein trong nước tiểu và trong các dịch sinh vật.

Phản ứng tủa protein bằng acid sulfosalicilic.

Thuốc thử:

- Dung dịch protein 0,1%
- Dung dịch acid sulfosalicilic 20%

Tiến hành:

Cho vào một ống nghiệm:

- 5 giọt dung dịch protein 0,1%
- 2 giọt dung dịch acid sulfosalicilic 20%
- sẽ thấy có tủa trắng protein

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 8. Tủa protein bằng acid vô cơ.

Nguyên tắc:

Dưới tác dụng của acid vô cơ đậm đặc, protein bị kết tủa, tủa sẽ làm hoà tan trở lại khi cho thừa acid, trừ acid nitric.

Tủa protein bằng acid nitric và acid sulfuric.

Thuốc thử:

- Dung dịch protein 0,1%
- Acid nitric đặc
- Acid sulfuric đặc

Tiến hành:

	1	2
- Dung dịch protein 0,1% (giọt) nhỏ từ từ vào thành ống	5	5
- Acid nitric đặc (giọt)	5	5
- Acid sulfuric đặc (giọt)		
Có tủa protein xuất hiện. Sau đó lắc nhẹ thêm		
Acid nitric đặc (giọt)	5	
Acid sulfuric đặc (giọt)		5

Lắc đều

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 9. Tủa protein bằng muối kim loại nặng

Nguyên tắc:

Protein tạo với muối kim loại nặng (đồng, sắt, chì, bạc...) thành những phức hợp không tan trong nước. Lợi dụng tính chất này người ta dùng sữa, trứng để giải độc trong những trường hợp ngộ độc do ăn phải muối thuỷ ngân, chì... trong giai đoạn cơ thể chưa kịp hấp thu.

Tủa protein bằng muối chì

Thuốc thử:

- Dung dịch protein 0,1%
- Dung dịch chì acetat 5%

Tiến hành:

Trong một ống nghiệm cho:

- 10 giọt dung dịch protein 0,1%
 - 2 giọt dung dịch chì acetat 5%
- Lắc nhẹ sẽ thấy kết tủa.

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 10. Tủa protein bằng dung môi hữu cơ.

Nguyên tắc:

Protein kết tủa bông hoặc bị vẩn trong dung môi hữu cơ như alcol, aceton, ether... Phản ứng tủa do protein bị mất áo nước, tủa càng dễ dàng nếu có thêm các chất điện giải NaCl. Kết tủa bằng alcol có thể là thuận nghịch nếu tiến hành ở nhiệt độ thấp (0° đến -15°C) và tủa được tách khỏi alcol một cách nhanh chóng. Các kết tủa này thường được áp dụng để tách chiết enzym.

Kết tủa protein bằng alcol ethylic

Thuốc thử:

- Dung dịch protein 0,1%
- Alcol ethylic
- Dung dịch NaCl bão hòa.

Tiến hành:

Cho vào một ống nghiệm

- 5 giọt dung dịch protein
- 1 ml alcol ethylic

Dung dịch sẽ vẩn đục

- Thêm 1 giọt NaCl bão hòa

Tủa protein xuất hiện rõ rệt.

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 11. Xác định điểm đắng điện của albumin trứng

Nguyên tắc:

Người ta sử dụng một thang dung dịch đệm có pH khác nhau biết trước, với sự hỗ trợ của chất khử nước là tanin, trong điều kiện đó dung dịch đệm nào cho tủa albumin mạnh nhất có nghĩa là pH của nó gần với pH của albumin nhất.

Thuốc thử:

- Dung dịch đệm acetat có pH là 3,6; 3,8; 4,75; 5,6; 5,8; được pha từ:
 - + Dung dịch Na acetat 0,2M
 - + Dung dịch acid acetic 0,2M theo các tỷ lệ:

PH của dung dịch	Dung dịch Na acetat 0,2M (mL)	Dung dịch acid acetic (mL)
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,8
4,75	0,5	0,5
5,6	9,1	0,9
5,8	9,4	0,6

- Dung dịch tanin 0,1%
- Dung dịch albumin trứng 0,1%

Tiến hành:

Dùng 5 ống nghiệm ghi số

	1	2	3	4	5
Dung dịch đệm pH = 3,6 (mL)	1				
Dung dịch đệm pH = 3,8 (mL)		1			
Dung dịch đệm pH = 4,75 (mL)			1		
Dung dịch đệm pH = 5,6 (mL)				1	
Dung dịch đệm pH = 5,8 (mL)					1
Dung dịch albumin trứng (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dung dịch tanin (mL)	1	1	1	1	1

Lắc đều để 5 phút - so sánh độ đục

Nhận xét và giải thích kết quả.

PHÂN ĐOẠN PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP DIÊM TÍCH (phương pháp dùng muối)

Điểm tích là phương pháp dùng các muối trung tính như NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$... để kết tủa protein. Nguyên nhân kết tủa là do các tiểu phân protein trung hoà điện tích. Các protein khác nhau sẽ tủa ở những nồng độ muối khác nhau. Vì vậy có thể tách riêng các protein ra khỏi hỗn hợp. Thí dụ globulin có trọng lượng phân tử lớn

hơn albumin, trong nước globulin tích điện (-) ít hơn albumin, globulin kết tủa ở nồng độ amoni sulfat nửa bão hoà, còn albumin kết tủa ở nồng độ bão hoà. Sự kết tủa này thuận nghịch, khi giảm nồng độ muối bằng cách pha loãng với nước hay thẩm tích thì globulin và albumin sẽ hoà tan trở lại. Kết tủa bằng cách này các protein không bị biến tính nghĩa là các tính chất hoá lý, sinh vật học không bị thay đổi. Người ta thường dùng phương pháp này để chiết suất các protein hoạt tính.

Thí nghiệm 12. Phương pháp diêm tích

Phân đoạn albumin và globulin của lòng trắng trứng bằng amoni sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Phương pháp diêm tích)

Nguyên tắc:

Ở dung dịch có nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nửa bão hoà các tiểu phân globulin bị trung hoà điện tích và kết tủa, ở nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà albumin bị trung hoà điện tích và kết tủa.

Thuốc thử:

Dung dịch protein 1%

Dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà

Bột amoni sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (bột mịn)

Tiến hành:

Trong ống nghiệm cho 2mL dung dịch lòng trắng trứng 1%, thêm 2mL dung dịch amoni sulfat bão hoà để được dung dịch amoni sulfat nửa bão hoà, globulin sẽ tǔa. Sau 5 phút lọc để loại tǔa globulin. Trong dịch còn lại albumin. Thêm một ít bột amoni sulfat cho đến bão hoà (còn dư một ít bột amoni sulfat không tan) tǔa albumin sẽ nổi lên trên.

Thêm nước cất vào ống nghiệm để làm mất nồng độ bão hoà của amoni sulfat, tǔa albumin sẽ hoà tan trở lại, dùng dung dịch hoà tan tǔa ở trên làm phản ứng biuret.

Trong 1 ống nghiệm cho:

10 giọt dung dịch hoà tan

10 giọt thuốc thử biuret

Lắc đều, quan sát màu của ống thử - giải thích.

Nhận xét và giải thích kết quả.

CHUYỂN HÓA ACID AMIN

Thí nghiệm 13. Phản ứng trao đổi amin

Phản ứng trao đổi amin là phản ứng thường gặp trong chuyển hóa của acid amin, phản ứng được xác định thông qua hoạt động của enzym trao đổi amin . glutamat pyruvat transaminase (GPT)

Nguyên tắc:

GPT xúc tác phản ứng chuyển nhóm amin từ acid glutamic (acid amin) sang cho acid pyruvic (acid α ketonic) để tạo thành acid α cetoglutaric và alanin. Phản ứng này là phản ứng thuận nghịch, ở đây cơ chất sử dụng là alanin và acid α cetoglutaric. Sau khi tạo thành, acid pyruvic sẽ tác dụng với 2-4 dinitrophenyl hydrazin (DNP) trong môi trường kiềm tạo thành 2-4 dinitrophenylhydrazone pyruvat Na có màu nâu đỏ.

Thuốc thử:

- Dung dịch đệm phosphat 0,1M pH = 7,4 pha từ hai dung dịch:
 - + Dung dịch $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M
 - + Dung dịch KH_2PO_4 0,1M
 Trộn lẫn hai dung dịch trên để có dung dịch pH = 7,4. Theo dõi bằng pH kế hoặc giấy đo pH.
- Dung dịch 2-4 dinitrophenyl hydrazin 20mg% trong HCl N bảo quản trong chai màu nút mài, để tủ lạnh.
- Dung dịch cơ chất:

L alanin	0,445g
(hoặc DL alanin 0,89g)	
Acid α cetoglutaric	0,01g

Hòa tan chúng trong 40mL dung dịch đệm phosphat 0,1M pH = 7,4 điều chỉnh pH = 7,4 bằng NaOH N. Thêm dung dịch đệm phosphat vừa đủ 50mL. Bảo quản trong tủ lạnh.

- Dung dịch NaOH 5%
- Dung dịch NaCl 0,9%
- Tạo dung dịch enzym: nghiền 1-2 g cơ tươi trong cối sứ cho thật mịn thêm 3mL dung dịch NaCl 0,9%. Tiếp tục nghiền mạnh, thêm tiếp 3mL dung dịch NaCl 0,9%. Ngoài thật kỹ, gạn lọc lấy phần nước trong.

Tiến hành:

Trong 2 ống nghiệm to lần lượt làm như sau:

	1	2
Dung dịch enzym (mL)	1	1
Dung dịch đệm phosphat (mL)	1 không đun	đun sôi 2 phút
Dung dịch cơ chất (mL)	0,5	0,5
Lắc đều để cả hai ống ở 37°C trong 30 phút		
Dung dịch 2-4 DNP (ml)	0,5	0,5
Lắc đều để ở nhiệt độ phòng 5 phút		
NaOH (mL)	1	1

Lắc đều: quan sát màu ở hai ống

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 14. Định lượng protein toàn phần trong huyết thanh

Nguyên tắc: Dựa trên nguyên tắc phản ứng biure

Protein (Có chứa từ 2 liên kết peptid trỏ lên) + Cu²⁺ $\xrightarrow{[OH^-]}$ tạo phức màu xanh tím.

Độ đậm đặc (mật độ quang) của phức hợp màu xanh tím tỷ lệ thuận với nồng độ protein. Phức hợp màu có phổ hấp thụ cực đại ở λ 540nm.

Thuốc thử:

Dung dịch chuẩn có nồng độ protein 50g/L

Thuốc thử R1

- Kali natri tartrat	9 g/L
- Natri hydroxyd	0,2 mol/L
- Kali iodur	5 g/L

Thuốc thử R2.

- CuSO ₄	150 g/L
---------------------	---------

Pha thuốc thử với tỷ lệ 5ml dung dịch R1 với 245 ml dung dịch R2. Thuốc thử bền vững 6 tháng ở 2 - 8°C.

Bệnh phẩm: Huyết thanh.

Tiến hành: Trong 3 ống nghiệm.

	1 Trắng	2 Chuẩn	3 Thử
Huyết thanh (μ L)	0	0	20
Chuẩn (μ L)	0	20	0
Thuốc thử (mL)	1	1	1

Lắc đều để 5 phút ở nhiệt độ phòng. Đo màu trên máy quang kế (4010) λ 540 (546) nm, chế độ C/ST, chuẩn đặt 50, chỉnh máy bằng ống trắng.

Kết quả: Máy cho kết quả ngay.

- Có thể để chế độ đo A ta được mật độ quang.

$$\text{Kết quả nồng độ protein g/L} = \frac{A \text{ thử}}{A \text{ chuẩn}} \times 50$$

- Có thể đo ở chế độ C/F, đặt hệ số 190. Máy cho ra kết quả ngay.

Chú ý: Nếu huyết thanh có nồng độ bilirubin cao cần làm ống trắng thử.

Ống 4 (trắng huyết thanh)

Huyết thanh 20 µL

Thuốc thử R1 1mL

Lắc đều để 5 phút đo A trắng huyết thanh.

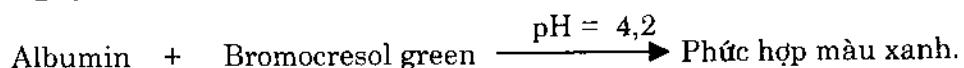
$$\text{Kết quả nồng độ protein g/L} = \frac{A \text{ thử} - A \text{ trắng huyết thanh}}{A \text{ chuẩn}} \times 50$$

Nhận định kết quả:

- Trị số protein toàn phần huyết thanh bình thường 62 - 80 g/L.
- Tăng: ít có giá trị trên lâm sàng và gặp trong:
 - + U tuy.
 - + Mất nước (ia chảy, nôn, bổng....)
 - + Thiếu năng vỗ thượng thận (bệnh Addison)
- Giảm: Thường gặp và có ý nghĩa trong các bệnh:
 - + Giảm do suy dinh dưỡng.
 - + Giảm do bệnh gan (viêm, xơ gan)
 - + Giảm do bệnh thận (viêm thận, thận hư....)
 - + Giảm do tăng phân huỷ: (dài đường, suy kiệt do ung thư, sốt kéo dài..)
 - + Giảm do mất protein qua đường ruột, qua da....

Thí nghiệm 15. Định lượng albumin huyết thanh

Nguyên tắc:



Độ đậm đặc của phức hợp màu tỷ lệ thuận với nồng độ albumin. Phức hợp màu có phổ hấp thụ cực đại ở λ 600 (578, 620) nm.

Thuốc thử:

Dung dịch chuẩn albumin 50 g/L (724,5 µmol/L).

Thuốc thử: Bromocresol green 0,14 g/L pha trong đậm succinat pH 7,2 (75 mmol/L), Brif 35 và sodium merthiolat.

Bệnh phẩm: Huyết thanh

Tiến hành: Trong 3 ống nghiệm.

	1 (Trắng)	2 (Chuẩn)	3 (Thử)
Huyết thanh (µL)	0	0	10
Chuẩn (µL)	0	10	0
Thuốc thử (mL)	2,5	2,5	2,5

Lắc đều để 5 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, đo màu trên máy quang kế λ 578 (620) nm, chỉnh máy bằng ống trắng, đo theo chế độ A, C/ST đều được.

Kết quả: - Máy cho kết quả ngay (chế độ C/ST)

- Nếu đo A kết quả tính theo:

$$\text{Nồng độ albumin g/L} = \frac{\text{A thử}}{\text{A chuẩn}} \times 50$$

Nhận định kết quả:

- | | | |
|-----------------------|------|-------------|
| - Giá trị bình thường | Nam: | 38 - 49 g/L |
| | Nữ: | 37 - 48 g/L |

Trung bình $56 \pm 6\%$ tổng lượng protein toàn phần huyết thanh.

- Tăng không có ý nghĩa.
- Giảm thường gặp trong:
 - + Suy dinh dưỡng do thiếu protein.
 - + Bệnh lý dẫn đến suy giảm chức năng gan.
 - + Bệnh lý thận gây tăng đào thải albumin ra nước tiểu.

Thí nghiệm 16. Định lượng fibrinogen

Nguyên tắc:

Fibrinogen trong huyết tương được kết tủa bằng CaCl_2 . Định lượng fibrinogen bằng thuốc thử Biure.

Thuốc thử:

- Dung dịch natrihydroxyd 10%.
- Thuốc thử biure (tương tự thuốc thử của phản ứng định lượng protein toàn phần huyết thanh).
- Dung dịch CaCl_2 2,5%. ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- Dung dịch NaCl 9%.

Bệnh phẩm: Huyết tương chống đông bằng natricitrat

Tiến hành:

- Giai đoạn kết tủa fibrinogen.

Lấy:
+ 0,8 mL huyết tương
+ 0,5 mL NaCl 9%
+ 0,2 mL CaCl_2 2,5%.

Lắc đều để yên ở nhiệt độ phòng cho đến khi tạo tủa.

- Ly tâm mạnh gạn hết phần nước tránh làm mất cục fibrinogen (có thể dùng que thuỷ tinh cuốn và ép hết nước).
- Rửa tua fibrinogen bằng 3 mL NaCl 0,9% qua 3 lần.
- Cho vào tua fibrinogen 4 ml thuốc thử biure để tan hết sau đó đo màu trên máy quang kế giống như định lượng protein toàn phần.
- *Kết quả:*

$$\text{Nồng độ fibrinogen g/L} = A \times \frac{\text{Hệ số protein}}{6}$$

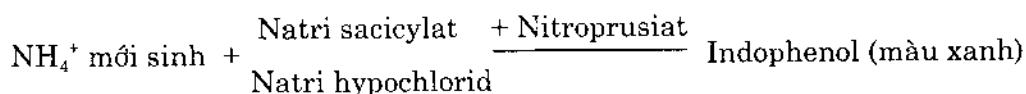
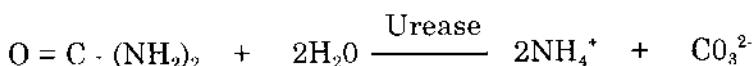
Nhận định kết quả :

- Giá trị bình thường 2,5 - 5 g/L.
- Tăng nhẹ trong hầu hết các bệnh nhiễm khuẩn, tăng cao hơn trong thấp khớp cấp, viêm phổi (tới 20 g/L).
- Giảm khi tế bào gan bị suy chức năng.

Thí nghiệm 17. Định lượng ure huyết thanh (nước tiểu, dịch não tuỷ) phương pháp enzym

Nguyên tắc:

Ure dưới tác dụng của enzym urease bị phân huỷ thành amoni và CO₂. Amoni mới sinh sẽ tác dụng với natri salicylat và natri hypochlorid với sự có mặt của nitroprusiat sẽ tạo phức hợp màu xanh (Indophenol).



Độ đậm đặc màu xanh tỷ lệ thuận với lượng ure, màu của phản ứng có phổ hấp thụ ở λ 580 nm.

Thuốc thử:

Lọ 1:	Đệm: phosphat	120 mmol/L
	Natri salicylat	60 mmol/L
	Natri nitroprusiat	5 mmol/L
	EDTA	1 mmol/L
Lọ 2:	Đệm: phosphat	120 mol/L
	Natri hydroxyd	60 mmol/L
	Natri hypochlorid	10 mmol/L

Lọ 3: Enzym urease \geq 500 U/L + lọ chuẩn nồng độ ure 13,3mmol/L (BUN = 6,2mmol/L)

- Pha lọ 1 và lọ 2 bằng nước cất; lượng nước cất tuỳ thuộc vào mã số thuốc thử của kít, ta được thuốc thử 1 và thuốc thử 2.
- Pha lọ thuốc thử 1 với lọ 3 ta được thuốc thử 1a.

Bệnh phẩm:

- Huyết thanh hoặc huyết tương (chống đông bằng EDTA).
- Nước tiểu pha loãng 1/10 bằng nước cất.

Tiến hành:

	1 (Trắng)	2 (Chuẩn)	3 (Thử)
Huyết thanh, nước tiểu 1/10 (μ L)	0	0	10
Chuẩn (μ L)	0	10	0
Thuốc thử 1a (mL)	1	1	1
Trộn đều đủ 10 phút sau đó thêm.			
Thuốc thử 2 (mL)	1	1	1

Trộn đều ủ 37°C trong 5 phút. So màu trên máy quang kế λ 578 (580) nm đối chiếu với ống trắng.

Kết quả:

$$\text{Nồng độ ure huyết thanh mmol/L} = \frac{\text{A thử}}{\text{A chuẩn}} \times 13,3$$

$$\text{Nồng độ BUN (Blood urea nitrogen) mmol/L} = \frac{\text{A thử}}{\text{A chuẩn}} \times 6,2$$

Nếu kết quả cao trên 66,6 mmol/L phải pha loãng bệnh phẩm theo tỷ lệ 1/10 bằng nước cất.

Nồng độ ure nước tiểu tính theo công thức trên sau đó nhân với số lần pha loãng.

Ý nghĩa lâm sàng:

- Trị số bình thường của người.

Ure máu: 2,5 - 7,5 mmol/L

Ure nước tiểu: 333 - 583 mmol/L

- Ure máu giảm không có ý nghĩa nhiều trên lâm sàng. Có thể gặp trong những trường hợp chế độ ăn nghèo protein, ở người đái tháo đường, người mang thai và các trường hợp teo gan, suy giảm chức năng gan nặng.

- Ure máu tăng: có ý nghĩa trên lâm sàng.
- Ure máu tăng nhẹ trong ăn nhiều protein, các trường hợp nhiễm khuẩn, sốt cao, sau mổ và chấn thương.
- Ure máu tăng nhiều trong các trường hợp bệnh lý của thận như suy thận, viêm cầu thận, nhiễm độc ống thận, sỏi thận....

PROTEIN NIỆU

- Nước tiểu bình thường không có hoặc có rất ít protein, bằng các phương pháp phát hiện thông thường không phát hiện được. Nếu phát hiện có protein trong nước tiểu là bất thường, bất thường có thể là sinh lý hoặc bệnh lý.
- Các loại protein có thể xuất hiện trong nước tiểu:
 - + Các protein của huyết thanh.
 - + Một số loại globulin đặc biệt.
 - + Protein nhiệt tan.
 - + Một số chất tiết của đường sinh dục tiết niệu (các muco protein, gluco protein...) - loại protein này không có tính chất bệnh lý và gọi là protein giả.

Định tính protein trong nước tiểu

Thí nghiệm 18. Tìm protein bằng phương pháp dùng nhiệt độ

- **Nguyên tắc:** Protein có mặt trong nước tiểu sẽ bị kết tủa dưới tác dụng của nhiệt độ trong môi trường acid nhẹ và có mặt chất điện giải.
- **Thuốc thử:**
 - + Acid acetic 10%
 - + Nacl 30%
- **Tiến hành:**

Trong ống nghiệm cho:

Nước tiểu cần thử	2ml
Acid acetic 10%	2 giọt
Nacl 30%	5 giọt

Lắc đều, đun 1/3 trên của phần dịch (xem hình ...) cho đến sôi- quan sát phần đã đun so sánh với phần không đun. Nếu phần đun có tua trắng nước tiểu có protein.

- **Nhận xét và giải thích kết quả.**

Thí nghiệm 19. Tìm protein bằng phương pháp dùng acid

Định tính protein niệu đồng thời phân biệt protein thật và protein giả.

- **Nguyên tắc:** Acid nitric làm kết tủa các protein thật của nước tiểu ở ngay bề mặt tiếp xúc giữa acid với nước tiểu. Các protein giả (musin) cũng bị tủa, nhưng ở vị trí cách xa mặt tiếp xúc.

- **Thuốc thử:**

Acid nitric được dùng

- **Tiến hành:**

Trong một ống nghiệm nhỏ, cho khoảng 1mL acid đặc, để ống nghiệm nghiêng 45° , dùng một ống hút đầu nhô, cho nhẹ nhàng khoảng 1,5 ml nước tiểu cần thử theo thành ống nghiệm sao cho phần nước tiểu ở trên không xáo trộn với phần acid ở dưới. Để đứng ống nghiệm trên giá, quan sát bề mặt tiếp xúc của 2 phần dịch.

Kết quả có thể xuất hiện trong các trường hợp sau:

- Nếu thấy trên bề mặt tiếp giáp không có hiện tượng tủa là phản ứng âm tính: nước tiểu không có protein.
- Nếu thấy trên bề mặt tiếp giáp xuất hiện 1 vành tủa trắng gọn là phản ứng dương tính: nước tiểu có protein
- Nếu thấy trên bề mặt tiếp giáp không có vành tủa nhưng ở phần cao hơn (nằm trong nước tiểu) có 1 lớp tủa mờ không gọn tức là trong nước tiểu có chứa protein giả, không có ý nghĩa bệnh lý.

Thí nghiệm 20. Định lượng protein trong nước tiểu bằng phương pháp soi độ đặc dùng quang kế.

Nguyên tắc:

Dùng acid trichloacetic kết tủa protein trong nước tiểu, soi quang kế, làm song song với 1 dung dịch mẫu protein đã biết sẵn nồng độ, từ đó tính ra lượng protein có trong nước tiểu thử.

Thuốc thử:

- Dung dịch acid trichloacetic 5% trong nước
- Dung dịch protein mẫu 1g/100mL (1% trong NaCl 9%).

Tiến hành: Trong 2 ống nghiệm: thử và mẫu

	Thử	Mẫu
Nước tiểu trong(mL)	0,5	
Dung dịch protein mẫu (mL)		0,5
Acid trichloacetic (mL)	1,5	1,5

- **Tính kết quả:**

$$\text{Protein g \%} = \frac{E \text{ thử}}{E \text{ mẫu}}$$

- *Ghi chú:*

- + Nước tiểu thử phải trong, nếu đục phải nhô acid acetic với số lượng 10 giọt trong 10mL nước tiểu, lắc đều để 10 phút, lọc lấy phần trong để xét nghiệm.
- + Sau khi tính ra kết quả g/100mL phải quy ra lượng protein đào thải trong 24 giờ.

Nhận xét và giải thích kết quả.

Thí nghiệm 21. Xác định protein Ben- Joné

Nguyên tắc: protein Bence-Joné có đặc tính là bị đồng vón ở 50-60°C,nếu tiếp tục đun đến nhiệt độ sôi, tủa bị tan hết và sau đó lại tủa lại ở nhiệt độ thường.

Thuốc thử:

- + Acid acetic 10%
- + Nacl 2%

Tiến hành:

Cho vào một ống nghiệm:

3ml nước tiểu

5 giọt acid acetic 10%

3ml NaCl 2%

Lắc đều, nếu thấy đục phải lọc lấy nước trong sau đó đun phần trên của ống nghiệm (xem thí nghiệm 1), thỉnh thoảng quan sát trên nền đèn. Tiếp tục đun đến sôi vài giây, lấy ra để nguội lại trên giá.

Nếu nước tiểu có protein Bence- Joné (không có protein thật), sẽ xuất hiện tủa khi đun nóng, tan hết khi sôi và tủa lại khi để nguội.

Nhận định kết quả:

Protein niệu (protein thật) gặp trong:

- Bệnh thận cấp và mãn: Viêm thận cấp- viêm thận mãn, thận nhiễm mõ, thoái hoá thận, lao thận...
- Bệnh ngoài thận: Sốt, nhiễm độc nói chung, suy tim, nhiễm độc thai nghén.

Protein nhiệt tan gặp trong: bệnh đa u tuỷ xương (bệnh kaler) và leucose.

Chương 16

CẤU TẠO VÀ CHUYỂN HÓA HEMOGLOBIN

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc:
 - Định lượng bilirubin trong huyết thanh
 - Tìm sắc tố mật trong nước tiểu
 - Tìm hemoglobin niệu
2. Định lượng được bilirubin trong huyết thanh
3. Tìm được sắc tố mật, tìm hemoglobin trong nước tiểu

Đại cương: Hemoglobin (Hb) là một protein của hồng cầu(HC), chiếm khoảng 34% khối lượng của HC. Người trưởng thành có khoảng 150g Hb trong 1lít máu toàn phần. Trong đó HbA₁ chiếm khoảng 98%, HbA₂ xấp xỉ 2%. Chức năng của Hb là vận chuyển khí CO₂ và O₂. Hemoglobin có tính chất giống enzym peroxidase.

Hồng cầu trưởng thành có đời sống trung bình là 120 ngày. Hồng cầu già sẽ phá huỷ và thoái hoá ở tổ chức võng mạc. Sản phẩm thoái hoá Hb là bilirubin. Bilirubin được vận chuyển trong máu dưới dạng kết hợp với albumin huyết thanh đến gan liên hợp với glucuronat tạo thành bilirubin liên hợp. Bilirubin liên hợp đưa vào túi mật rồi xuống ruột. Nhờ vi khuẩn ruột bilirubin biến đổi thành urobilinogen. Một phần những sắc tố này được tái hấp thu trở vào máu về gan và đào thải qua thận ra nước tiểu, một phần đào thải qua phân.

1. XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT GIỐNG PEROXIDASE CỦA HEMOGLOBIN (Phản ứng Adler)

Nguyên tắc: Hemoglobin có tác dụng phân huỷ H₂O₂ giải phóng oxy hoạt động. Chất này sẽ oxy hoá dung dịch benzidin trong acid acetic thành màu xanh ve

Thuốc thử:

- Dung dịch Benzidin:
 - + Benzidin 0,15g
 - + Acid acetic 5mL
- Dung dịch H₂O₂ 10 thể tích

- Dung dịch Hb 0,01%
- Dung dịch HC 0,05%(v/v)

Cách chuẩn bị dung dịch HC: lấy 2mL máu toàn phần có chống đông , đem ly tâm 3000 g/phút trong 10 phút. Hút loại bỏ huyết tương và bạch cầu. Rồi rửa HC bằng NaCl 0,9% với thể tích gấp 10 lần thể tích máu trong 2 lần . Sau mỗi lần rửa ly tâm 5000 g/phút trong 5 phút, loại bỏ nước , giữ lại HC. Lấy 0,5ml HC cho vào 1000ml dung dịch NaCl 0,9%.

Tiến hành: Dùng 3 ống nghiệm

	1	2	3
Dung dịch benzidin	1mL	1mL	1mL
Nước cất	1mL		
Dđ Hb 0,01mg%		1mL	
Dđ HC 0,05%			1mL
Dđ H ₂ O ₂	10 giọt	10 giọt	10 giọt

Quan sát màu ở các ống. Giải thích kết quả

2. ĐỊNH LƯỢNG BILIRUBIN TRONG HUYẾT THANH

Bilirubin toàn phần trong huyết thanh bình thường từ 2 đến 10 mg%. Trong đó bilirubin tự do khoảng 2-8mg%, còn bilirubin liên hợp dưới 2mg%

2.1. Kỹ thuật Jendrassik-Graff

Nguyên tắc: Bilirubin phản ứng với acid sulfanilic và natri nitrit tạo thành chất màu azo. Dung dịch màu có phổ hấp thụ cực đại tại bước sóng 530nm.

- Nếu có caffeine định lượng được bilirubin toàn phần
- Không có caffeine định lượng được bilirubin trực tiếp
- Bilirubin gián tiếp = Bilirubin toàn phần - Bilirubin trực tiếp

Thuốc thử

- a. Dung dịch bilirubin máu 5mg%
- b. Dung dịch natri clorid 0,9%
- c. Dung dịch caffeine:

- Caffein 50g
- Natri benzoat 75g
- Natri acetat 125g
- Nước cất vừa đủ 1000 mL

d. Thuốc thử diazo: Gồm dung dịch acid sulfanilic và dung dịch natri nitrit

- Dung dịch acid sulfanilic:

+ Acid sulfanilic 1g

+ Acid clo hydric đậm đặc 15mL

+ Nước cất vừa đủ 1000mL

- Lắc cho tan hết, rồi lọc lấy dịch trong

- Dung dịch Natri nitrit 0,5% trong nước. Pha khi dùng

- Thuốc thử diazo:

+ Dung dịch acid sulfanilic 80mL

+ Dung dịch Natri nitrit 0,5% 2mL

Trộn đều và dùng ngay sau khi pha

Tiến hành

Định lượng bilirubin toàn phần

	Ống trắng	Ống mẫu	Ống thử
Dung dịch bilirubin mẫu 5mg%		1mL	
Huyết thanh	1mL		1mL
Dung dịch caffein	3,5mL	3,5mL	3,5mL
Dung dịch natri clorid 0,9%	0,5mL		
Thuốc thử diazo		0,5mL	0,5mL

Lắc đều để ở nhiệt độ phòng, chờ 20 phút. Đo MDQH ở bước sóng 530nm.

Chỉnh máy bằng ống trắng.

Tính kết quả: $Ct = Et / Em \times 5$

2.2. Phương pháp dùng thuốc thử pha sẵn (dùng kit của hãng Boehringer 123.919)

Dựa trên nguyên tắc của kỹ thuật Jendrassik-Graff

Nguyên tắc: Khi có caffein, bilirubin toàn phần kết hợp với acid diazo sulfanilic tạo thành azobilirubin. Thêm tartrat tạo thành dung dịch có màu xanh. Dung dịch màu có phổ hấp thụ cực đại ở bước sóng 578nm. Không có caffein định lượng được bilirubin trực tiếp

Tiến hành

Định lượng bilirubin toàn phần: Dùng 2 ống nghiệm nhỏ

	Ống trắng	Ống thử
Thuốc thử 1 (a.sulfanilic)	100µL	100µL
Thuốc thử 2(natrinitrit)		25µL
Thuốc thử 3(caffein)	500µL	500µL
Huyết thanh	100µL	100µL
Lắc đều, chờ 10-60phút		
Thuốc thử 4(tartrat)	500µL	500µL

Trộn đều để ở nhiệt độ phòng, chờ từ 5 - 30 phút. Đo MDQ ở λ 578 nm, chế độ C/F hệ số 185 đơn vị là $\mu\text{mol/L}$ (hệ số 10,8 đơn vị là mg%). Đổi chiếu với ống trắng

Định lượng bilirubin trực tiếp: Dùng 2 ống nghiệm nhỏ.

	Ống trắng	Ống thử
Thuốc thử 1	0,20mL	0,20mL
Thuốc thử 2		0,05mL
Dung dịch NaCl 0,9%	2mL	2mL
Huyết thanh	0,20mL	0,20mL

Trộn đều để chờ 5 phút tại 20- 25°C. Đo mật độ quang ở bước sóng 546mm. Chỉnh máy bằng ống trắng.

Tính kết quả: mg% = Et . 14,4

mol / L = Et . 246

2.3. Ý nghĩa lâm sàng

Giá trị bình thường: Bilirubin toàn phần huyết thanh 3-17 $\mu\text{mol/L}$

Bilirubin liên hợp 0-13 $\mu\text{mol/L}$

Bilirubin trong huyết thanh tăng trong hội chứng vàng da:

- Vàng da trước gan: Do phá huỷ quá nhiều HC bởi những nguyên nhân:
Tan máu di truyền bệnh về lách, HC hình liềm. Tan máu mắc phải do truyền máu, do thuốc gây tan máu, nhiễm độc chì. Vàng da sinh lý ở trẻ sơ sinh
- Vàng da tại gan : Khi các tế bào gan bị tổn thương trong viêm gan virus, nhiễm độc.
- Vàng da sau gan còn gọi vàng da do tắc mật. Thường gặp nhất do sỏi mật, ung thư đường mật, ung thư tụy, đường mật bị hẹp.

3. TÌM SẮC TỐ MẬT TRONG NƯỚC TIỂU

3.1. Tìm bilirubin trong nước tiểu(kỹ thuật Harrisson)

Nguyên tắc: Dùng bari clorid để tạo thành bilirubinat kết tủa. Rồi oxy hoá tǔa bằng FeCl_3 tạo màu xanh ve

Thuốc thử:

- Dung dịch BaCl_2 : 10% trong nước
- Dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bào hoà
- Thuốc thử Fuxe gồm:
 - + Acid Tricloacetic 25% 100mL
 - + Dung dịch FeCl_3 10% 10mL

Hoặc pha thuốc thử Fuxe theo cách sau: Hoà tan 25g acid tricloacetic trong một ít nước cất, thêm 0,9gam FeCl_3 . Hoàn thành 100mL với nước cất.

Tiến hành: Dùng 1 ống nghiệm lần lượt cho vào:

Nước tiểu tươi	5mL
Dung dịch BaCl_2	2,5mL
Dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bào hoà	2- 3 giọt

Lắc đều, đem lọc lấy tǔa . Đợi cho chảy kiệt nước rồi mở rộng giấy lọc.Nhỏ vào giữa tǔa 1 giọt thuốc thử Fuxe. Nếu có bilirubin sẽ xuất hiện một vòng xanh ve xung quanh giọt thuốc thử

Hoặc có thể tiến hành như sau:

Cắt giấy lọc với kích thước $5 \times 1\text{cm}$. Ngâm vào dung dịch bari clorid bào hoà, đem phơi khô hoặc sấy khô. Nhúng một đầu mẫu giấy vào nước tiểu khoảng 10 giây. Lấy ra và nhỏ vào phần giấy ướt 2 giọt thuốc thử Fuxe. Nếu có bilirubin sẽ xuất hiện màu xanh ve.

3.2. Tìm Urobilinogen(phương pháp Erhlich)

Nguyên tắc: Urobilinogen tác dụng với thuốc thử Erhlich tạo thành màu đỏ.

Thuốc thử:

Thuốc thử Erhlich:

- Paradimethylamino benzaldehyd 0,7g
- Nước cất 100mL
- Acid HCl tinh khiết 150mL

Tiến hành: Cho vào một ống nghiệm.

Nước tiểu (đã để nguội)	5mL
Thuốc thử Erhlich	2-3 giọt

Lắc đều, quan sát kết quả:

- Nước tiểu không chuyển màu. Khi đun nóng chuyển sang đỏ. Phản ứng âm tính (bình thường)
- Nước tiểu chuyển sang màu đỏ ở nhiệt độ thường. Phản ứng dương tính.

3.3. Nhận định kết quả

Bilirubin có trong nước tiểu trong các trường hợp vàng da tại gan : Do các tế bào gan bị tổn thương hoặc do sự bài tiết các sản phẩm từ gan bị tổn thương trong viêm gan do virus và nhiễm độc. Trong các trường hợp vàng da sau gan do tắc mật, phổ biến nhất là sỏi đường mật, K đường mật, K tuy.

Urobilinogen bình thường vẫn có trong nước tiểu. Tăng urobilinogen trong nước tiểu khi tổn thương gan: Xơ gan, K gan, vàng da do tắc mật, nhiễm độc, nhiễm khuẩn và trong trường hợp ruột bị tổn thương.

4. TÌM HEMOGLOBIN TRONG NƯỚC TIỂU.

4.1. Nguyên tắc:

Dựa trên tính chất giống enzym peroxidase của Hb

Một số chất cho phản ứng màu dương tính như với Hb gồm: Các peroxidase, bạch cầu, các muối đồng II....Trong nước tiểu một số chất ức chế phản ứng như: Acid uric, các sắc tố bình thường của nước tiểu. Để loại bỏ các nguyên nhân gây sai số này, cần phải tiến hành chiết xuất Hb.

4.2. Chiết xuất Hb:

Sự chiết xuất Hb trong nước tiểu khác nhau, phụ thuộc có hay không có protein niệu. Nên phải định tính protein nước tiểu:

Trường hợp không có protein niệu

- | | |
|--------------------------|-------|
| - Cho vào bình dung tích | 250mL |
| - Nước tiểu | 100mL |
| - Amoniac | 5mL |
| - Acid acetic tinh khiết | 8mL |
| - Ethyl acetat | 25mL |

Lắc đều sau mỗi lần thêm hóa chất. Để yên 10 phút. Hứng phần nhũ ở trên vào một phễu đặt trên 1 ống đồng. Trong phễu có 1 miếng bông lớn nhưng không nén chặt. Dùng đũa thủy tinh để gấp 4 mép của miếng bông vào giữa lòng phễu, ấn mạnh tay, chất lỏng chảy vào ống đồng và chia thành 2 lớp rõ rệt. Lớp ete ở trên dùng để làm phản ứng màu.

Trường hợp có protein niệu

Lần lượt cho các chất sau vào 1 bát sứ loại 250mL.

- Nước tiểu 100mL
- Amoniac 5mL
- Acid acetic tinh khiết 5mL

Dùng sôi và lọc qua giấy lọc không gấp nếp, dùng 30mL nước cất sôi để rửa tủa.
Chờ chảy hết, cho giấy lọc có chứa kết tủa vào 1 bình gạn 250mL, rồi thêm:

- Nước cất 15mL
- Acid acetic tinh khiết 5mL

Lắc mạnh để giấy lọc nát thành nhữngh mảnh nhỏ. Đổ thêm vào bình 20ml etyl acetat. Lắc mạnh, lọc qua phễu trong có một miếng bông tẩm ướt etyl acetat. Trong phần nước lọc lớp ete nằm ở trên dùng để làm phản ứng màu.

4.3. Phản ứng màu

Phản ứng với pyramidon(phản ứng Thevenon và Rotan)

Thuốc thử:

- Dung dịch cồn- pyridin gồm:
 - + Cồn ethylic 95° 100mL
 - + Pyridin 3mL
- Pyramidon

Tiến hành: Lần lượt cho vào 1 ống nghiệm

- Pyramidon 0,50g
- Dung dịch cồn pyridin 5mL

Lắc cho tan hết pyramidon. Thêm 2mL dịch chiết xuất, lắc đều. Thêm nhẹ nhàng 1ml H₂O₂, nếu xuất hiện màu xanh tím(mất màu nhanh) phản ứng dương tính.

Phản ứng với Benzi din (phản ứng Adter)

Thuốc thử:

- Dung dịch Benzidin gồm:
 - + Benzidin 0,15g
 - + Acid acetic 5mL
- Dung dịch H₂O₂ 10 thể tích

Tiến hành: Cho vào 1 ống nghiệm

- Dung dịch benzidin 1mL
- Dung dịch H₂O₂ 10 giọt
- Dịch chiết xuất 1mL

Nếu xuất hiện màu xanh ve , phản ứng dương tính.

4.4. Nhận định kết quả

Để phân biệt hồng cầu niệu với Hb niệu, phải ly tâm nước tiểu và soi cặn ở kính hiển vi để phát hiện HC.

- Hb niệu, khi phản ứng màu dương tính, nhưng nước tiểu không có HC gấp trong một số bệnh có kèm theo sự phá huỷ mạnh HC: do tan máu, do sốt rét, thương hàn, ngộ độc kali clorat, phenol, phospho.
- Hồng cầu niệu, khi các phản ứng màu dương tính, soi cặn nước tiểu có hồng cầu. Nguyên nhân do: viêm niệu đạo (do lậu, do chấn thương), lao hoặc K tuyễn tiền liệt, sỏi bàng quang, viêm thận, lao thận, K thận, sỏi thận, giun chỉ.

Chương 17

CẤU TẠO HÓA HỌC VÀ CHUYỂN HÓA ACID NUCLEIC

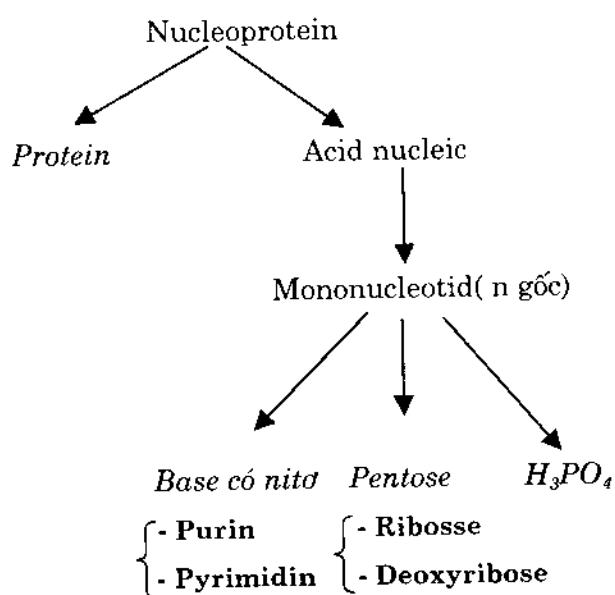
MỤC TIÊU

- Trình bày được nguyên tắc phản ứng và xác định được các thành phần của nucleoprotein.
- Trình bày được nguyên tắc định lượng được ý nghĩa lâm sàng của xét nghiệm định lượng acid uric trong huyết thanh và nước tiểu.

Thí nghiệm 1. Tách nucleoprotein từ men bia và xác định các thành phần.

1. Nguyên tắc:

Men bia là nguyên liệu giàu nucleoprotein. Trong môi trường acid và đun nóng, nucleoprotein trong men bia sẽ bị thuỷ phân theo sơ đồ sau :



- Phát hiện protein bằng phản ứng Biurê.
- Phát hiện base purin theo nguyên tắc: Trong môi trường kiềm, các base purin tác dụng với AgNO₃ tạo thành muối bạc của base purin có dạng tủa xốp trắng, để lâu ngoài ánh sáng sẽ chuyển sang màu nâu xám.

- Phát hiện ribose bằng phản ứng Orcin.
- Phát hiện H_3PO_4 bằng phản ứng tạo thành amoniphospho molypdat có màu vàng chanh.

2. Thuốc thử và nguyên liệu

- Men bia
- Acid sulfuric 5%
- Dung dịch NaOH 10%
- Thuốc thử Biurê
- Thuốc thử Orcin
- Thuốc thử molypden
- Dung dịch amoniac đặc
- Dung dịch $AgNO_3$ 2N

3. Tiến hành:

Tách và thuỷ phân nucleoprotein từ men bia :

Cho vào ống nghiệm lớn 0,5g men bia khô đã tán nhỏ 10 mL H_2SO_4 5%, trộn đều. Đậy ống nghiệm bằng ống sinh hàn ngược. Đun cách thuỷ sôi trong 1 giờ. Để nguội, lọc qua giấy lọc, lấy dịch lọc để tìm các sản phẩm thuỷ phân.

- Tìm các sản phẩm thuỷ phân:

+ Xác định protein bằng phản ứng Biurê:

Trong một ống nghiệm:	10 giọt dịch lọc
	2 giọt NaOH 10% (để trung hoà)
	10 giọt thuốc thử Biurrê

Lắc đều nhận xét màu

+ Xác định ribose bằng phản ứng Orcin

Trong một ống nghiệm :	1mL thuốc thử Orcin
	5 giọt dịch lọc

Đun cách thuỷ sôi, hoặc đun trực tiếp sẽ thấy xuất hiện màu xanh lá cây.

+ Xác định acid phosphoric bằng cách tạo thành amoniphospho molypdat.

Trong một ống nghiệm :	5 giọt dịch thuỷ phân
	10 giọt thuốc thử molypden

Đun cách thuỷ sôi, dịch có màu vàng chanh. Để nguội có kết tủa màu vàng.

+ Xác định base purin

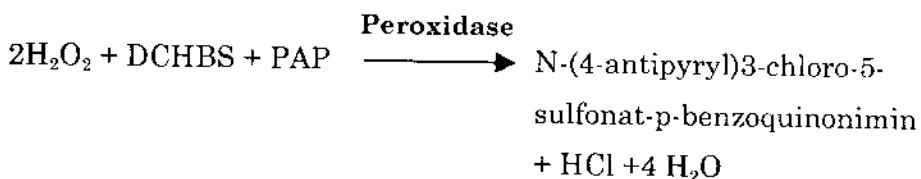
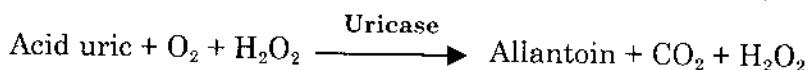
Trong một ống nghiệm : 1mL dịch thuỷ phân
0.5 mL amoniac đặc
5 giọt AgNO₃ 2N.

Lắc đều có tủa xốp trắng. Để lâu ngoài ánh sáng tủa chuyển dần thành màu nâu xám.

Thí nghiệm 2. Phản ứng định lượng acid uric trong huyết thanh và nước tiểu.

Acid uric là sản phẩm thoái hoá cuối cùng của các base nitơ purin (adenin, guanin) ở người. Từ các tổ chức, acid uric được đưa vào máu và đào thải ra khỏi cơ thể qua đường nước tiểu. Có thể định lượng acid uric trong huyết thanh hoặc nước tiểu.

1. Nguyên tắc (phương pháp PAP)



Acid uric do tác dụng của uricase sẽ bị oxy hoá tạo thành allatoin, CO₂, và H₂O₂. Tiếp theo, H₂O₂ phản ứng với acid 3,5-diclor-2-hydroxybenzensulfonic (DCHBS) và 4-aminophenazon (PAP) nhờ enzym peroxidase tạo ra phức chất màu tím đỏ.

2. Thuốc thử (của hãng Human)

RGT : - Đệm phosphat (pH 7.0) 50 mmol/L

- 4-Aminophenazon 0,3 mmol/L
- DCHBS 4 mmol/L
- Uricase > 200 U/L
- Peroxidase > 1000 U/L

STD : - 3 mL Standard acid uric 8mg/dL hoặc 476 mmol/L

Thuốc thử sau khi đã pha để ở 15°C -25°C, tránh ánh sáng, RGT ổn định trong 2 tuần.

3. Bệnh phẩm :

- Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng heparin hoặc EDTA.

- Nước tiểu : Pha loãng trước khi định lượng: 1 thể tích nước tiểu + 10 thể tích nước cát.

4. Tiến hành:

	Trắng	Thử	Mẫu
Mẫu chuẩn (STD)			20 μ L
Huyết thanh hoặc nước tiểu		20 μ L	
Thuốc thử RGT	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

Lắc, để 10 phút ở 20°C – 25°C, hoặc 5 phút ở 37°C. Đo MĐQH của các ống trong vòng 15 phút ở bước sóng 520 nm đối chiếu với ống trắng.

5. Tính kết quả :

Nồng độ acid uric trong huyết thanh

$$C = 8 \times \frac{E_{\text{thử}}}{E_{\text{mẫu}}} \text{ mg/dL} \text{ hoặc } C = 476 \times \frac{E_{\text{thử}}}{E_{\text{mẫu}}} \text{ } \mu\text{mol/L}$$

Nồng độ acid uric trong nước tiểu

$$C = 88 \times \frac{E_{\text{thử}}}{E_{\text{mẫu}}} \text{ mg/dL} \text{ hoặc } C = 5235 \times \frac{E_{\text{thử}}}{E_{\text{mẫu}}} \text{ } \mu\text{mol/L}$$

Chú ý: Kết quả chính xác khi nồng độ acid uric dưới 20 mg/dL hoặc 1190 umol/L. Khi nồng độ acid uric trong mẫu thử quá cao, vượt quá giới hạn trên phải pha loãng mẫu thử với nước muối 0,9% theo tỷ lệ 1/1 và nhân kết quả với 2.

6. Nhận định kết quả:

Bình thường :

Huyết thanh : Nam : 3,4 - 7,0 mg/dL hoặc 200 - 420 μ mol/L

Nữ : 2,4 - 5,7 mg/dL hoặc 140 - 340 μ mol/L

Nước tiểu : 250 - 750 mg/24 giờ hoặc 1,5 - 4,5 mmol/ 24 giờ.

Hàng ngày, lượng acid uric trong nước tiểu có tăng giảm theo chế độ ăn nhiều thịt hay nhiều rau. Trong bệnh thống phong (Gout) lúc cơn, acid uric giảm đột ngột sau đó tăng cao. Acid uric niệu còn gặp trong bệnh đa bạch cầu, bong nặng, viêm phổi.

Chương 18

THĂNG BẰNG NƯỚC VÀ ĐIỆN GIẢI

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc đo một số thông số điện giải máu: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} và Cl^-
2. Trình bày được ý nghĩa lâm sàng của các thông số điện giải máu nêu trên.

MỞ ĐẦU

Khi chúng ta nhìn nhận cơ thể người như một khối tế bào nổi trên dịch ngoại bào thì dịch cơ thể được phân ra hai phần quan trọng là dịch nội bào và dịch ngoại bào. Các cơ quan trong cơ thể nối với nhau bởi hệ thống vận chuyển các chất bao gồm các mạch máu, hệ thống này cung cấp các chất dinh dưỡng và loại bỏ các chất cặn bã của quá trình chuyển hóa. Rối loạn thăng bằng nước và các chất điện giải là lĩnh vực quan trọng cần quan tâm trong y học.

1. NƯỚC TRONG CƠ THỂ

Nước chiếm 60% thành phần cơ thể. Lượng nước cấu tạo cơ thể thay đổi theo lứa tuổi: 75% lúc mới sinh, giảm dần còn dưới 50% khi đã già. Mô chứa nhiều nước nhất là não (90%) và ít nhất là mô mỡ (10%). Những ion ưa nước khác nhau và các phân tử trung tính được hòa tan trong nước, những phân tử protein dưới dạng phân tử keo, và các phân tử lipoprotein khuếch tán trong nước dưới dạng các hạt mixen. Nước tham gia như các chất phản ứng, chất tạo thành trong nhiều phản ứng hóa học: trong chu trình glycolyse, acid citric và chuỗi hô hấp tế bào. Tất cả mọi tình trạng thừa và thiếu nước đều làm tổn thương đến chức năng của các tổ chức. Cấu trúc bền vững của tế bào và hoạt động của hàng loạt enzym nội bào phụ thuộc vào sự đủ nước của tế bào.

1.1. Phân bố và thăng bằng nước trong cơ thể

Khoảng 2/3 tổng lượng nước trong cơ thể thuộc dịch nội bào và 1/3 thuộc dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào bao gồm dịch kẽ và bạch huyết (15% trọng lượng cơ thể), huyết tương (3%), các dịch khác như nước tiểu, dịch tiêu hóa...

Cơ thể trao đổi nước với môi trường một cách hằng định. Trong tình trạng bình thường, lượng nước uống vào bằng lượng nước thải ra. Nguồn nước chính đưa vào cơ thể là ăn, uống và lượng nước mất đi chủ yếu do đào thải qua nước tiểu. Ngoài ra mất nước do mồ hôi, thở gọi là mất nước "không biết" chiếm khoảng 500mL/ngày. Tuy nhiên thể tích này có thể tăng lên tới vài lít sau tiết mồ hôi khi tập thể dục nặng hay sốt cao gây tăng thông khí.

Thành mao mạch ngăn cách huyết tương với dịch kẽ cho nước và các chất điện giải thẩm qua dễ dàng nhưng lại hạn chế các protein. Chức năng này của thành mao mạch gây hiện tượng: khi dịch ngoại bào và huyết tương có nồng độ các ion và các phân tử có phân tử lượng thấp tương tự nhau, nồng độ protein ở huyết tương cao gấp 4-5 lần ở dịch kẽ. Tổng nồng độ các protein mang điện dương của huyết tương khoảng 150 mmol/L, trong đó ion Na^+ của nó khoảng 140 mmol/L. Hầu hết các ion (-) của huyết tương như Cl^- có nồng độ trung bình 100mmol/L, HCO_3^- 25mmol/L. Các anion còn lại được gọi là các "anion gap" (khoảng trống anion) bao gồm phosphat, sulphat, protein, các acid hữu cơ (lactac, citrat, pyruvat, acetoacetat, 3-hydroxybutyrat).

1.2. Áp suất thẩm thấu (ASTT) và thể tích dịch cơ thể.

Thể tích tương quan của dịch nội bào và ngoại bào phụ thuộc vào lượng các chất gây ASTT ở các khu vực này. Tất cả các phân tử hòa tan trong nước của cơ thể đều tạo áp suất thẩm thấu theo tỉ lệ nồng độ phân tử gam trong dung dịch. 1mmol một chất hòa tan trong 1kg H_2O ở 37°C tạo ra một ASTT gần bằng 19mmHg. Trong điều kiện sinh lý bình thường, nồng độ trung bình các chất gây ASTT ở dịch ngoại bào là 290 mmol/Kg H_2O và duy trì cân bằng với dịch nội bào.

Một sự thay đổi nồng độ các ion tạo ASTT trong dịch các khu vực tạo ra một sự chênh lệch ASTT và hậu quả là thay đổi sự vận chuyển nước giữa các khu vực. Nước khuyếch tán từ nơi có ASTT thấp tới nơi ASTT cao cho đến khi đạt được thăng bằng về ASTT. Vì vậy sự tương quan thể tích giữa khu vực nội bào và ngoại bào phụ thuộc nồng độ các ion gây ASTT tại các khu vực này. Ion Na^+ quan trọng hơn cả đối với khu vực ngoại bào. Glucose huyết tương có nồng độ 5mmol/L không ảnh hưởng lên ASTT, nhưng trong đái tháo đường glucose huyết tương có thể cao tới 50mmol/L, ở nồng độ này glucose ảnh hưởng tới ASTT.

Sự phân bố nước giữa trong và ngoài mao mạch của khu vực ngoại bào phụ thuộc vào nồng độ protein huyết tương. Protein, đặc biệt albumin tạo ASTT khoảng 3,32kPa (25mmHg), áp suất này nay gọi là áp suất keo. AS keo được cân bằng bởi AS thuỷ tinh là AS đẩy nước ra khỏi mao mạch. Ở phần mao động mạch AS thuỷ tinh lớn hơn AS keo nên đẩy nước và các phân tử trọng lượng thấp trong huyết tương ra khỏi lòng mạch. Ngược lại, ở mao tĩnh mạch AS keo lớn hơn AS thuỷ tinh và kéo nước ở khoảng gian mạch máu vào lòng mạch. Khi giảm AS keo huyết tương (giảm nồng độ Abl huyết tương) sẽ làm tăng vận chuyển nước ra ngoài mạch gây phù.

1.3. Điều hoà thể tích máu

Thể tích máu đủ là yếu tố quan trọng để duy trì áp suất máu và đưa các chất đến các cơ quan. Điều hoà Na và nước đều liên quan đến điều hoà thể tích máu. Hệ renin -angiotensin-aldosterol đáp ứng ngay với tình trạng giảm thể tích máu. Renin được bài tiết gần cầu thận, đáp ứng với sự giảm dòng máu tới thận (cả áp suất lẫn thể tích máu). Renin làm biến đổi angiotensin thành angiotensinI rồi thành angiotensinII. Angiotensin II gây co mạch rồi nhanh chóng làm tăng áp suất máu và tăng bài tiết aldosterol do đó làm tăng giữ Na^+ và nước kèm theo.

Thừa nước:

Khi nước được đưa và cơ thể quá nhiều (ví dụ trong bệnh khát nước) bệnh nhân bắt đầu bị giảm ASTT, hormon chống bài niệu (ADH - Antidiuretic hormone) và cảm giác khát đều bị ức chế. Khi thiếu ADH thì nước không được tái hấp thu, hậu quả là một lượng lớn nước tiểu bị bài tiết, nhiều nhất lên tới 10 - 20L/ngày. ASTT giảm và giảm Na⁺ máu thường xảy ra ở bệnh nhân giảm chức năng bài tiết nước thận.

Thiếu nước:

Khi thiếu nước thì đầu tiên ASTT huyết tương tăng, rồi sự bài tiết ADH và cảm giác khát bị khích thích. Mặc dù ADH có tác dụng làm giảm mức mất nước qua thận một cách tối đa nhưng cảm giác khát là yếu tố chính chống lại giảm ASTT và tăng Na⁺ huyết. Trên thực tế tăng Na⁺ huyết thường được chú ý ở trẻ sơ sinh, bệnh nhân mất ý thức, hoặc ở những người không thể uống nước hay mất cảm giác khát.

2. CÁC CHẤT ĐIỆN GIẢI

2.1. Khái niệm

Các chất điện giải là những chất phân li thành các ion trong dung dịch. Ion là những nguyên tử hay một nhóm nguyên tử mang điện tích. Những chất điện giải mang điện tích dương là các cation, các chất điện giải mang điện tích âm là anion. Các cation chính là Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺. Những anion chính là Cl⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻, SO₄²⁻, các acid hữu cơ và protein. Phân bố các chất điện giải khác nhau giữa các khu vực khác nhau trong cơ thể. Nồng độ các chất điện giải thường được thể hiện bằng mEq/L thay bằng mg/dL. Hệ thống miliequivalent cho phép tính toán một cách dễ dàng sự thăng bằng điện giải. Nồng độ ion dương trong 1 lít huyết tương tương đương với nồng độ ion âm nếu tính theo mEq. Mỗi lít huyết tương có 154 mEq ion dương và 154 mEq ion âm. Một cách biểu hiện nồng độ các chất điện giải nữa là milimol/L (mmol/L). Hiện nay nồng độ mmol/L thuộc là hệ thống đo lường quốc tế.

Các ion quan trọng nhất trong dịch cơ thể là Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, Phosphat, bicarbonat. NaCl 0,9% là thành phần ion chính của dịch ngoại bào. K⁺ là cation chính của dịch nội bào.

Bảng 18.1. Thành phần điện giải trong dịch cơ thể

	Na ⁺	K ⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻
	mmol/L)			
- Huyết tương	140	4	25	100
- Dịch dạ dày	50	15	0-15	140
- Dịch ruột non	140	10	Thay đổi	70
- Trong phân khi tiêu chảy	50-140	30-70	20-80	Thay đổi
- Trong màng, dịch màng phổi, dịch màng bụng	140	5	40	100
- Mồ hôi	12	10	-	12

2.2. Na^+

Na^+ là ion dương chủ yếu của dịch ngoại bào, nồng độ Na^+ vào khoảng 136–145 mmol/L. Chức năng chính của Na^+ là duy trì phân bố nước bình thường và ASTT của huyết tương. Do hoạt động thẩm thấu này, sự thay đổi lượng Na^+ trong cơ thể phản ánh hay gây ra thay đổi thể tích huyết tương. Nếu Na^+ huyết tương bị mất thì ASTT huyết tương giảm, và để cố gắng làm tăng bằng ASTT giữa các khu vực, nước có xu hướng chảy vào trong tế bào dẫn đến giảm thể tích huyết tương. Ngược lại, nồng độ Na^+ cao quá mức thì ASTT huyết tương tăng. Đáp ứng với tình trạng tăng Na^+ là thận tăng cường giữ nước để khôi phục ASTT huyết tương. Do vậy, rõ ràng là tổng lượng Na^+ và lượng nước cơ thể liên quan đến nhau một cách phức tạp. Một chức năng khác của Na^+ là vai trò duy trì tăng bằng acid-base (nhờ cơ chế trao đổi Na^+ , K^+ ở cầu thận) và sự kích thích của cơ và thần kinh.

Lượng Na^+ trong khẩu phần ăn hàng ngày ăn vào khoảng 100-200 mmol/ngày. Na^+ được hấp thu ở ruột non, tuy nhiên thận là cơ quan điều hòa chính nồng độ Na^+ .

Giảm Na^+ huyết: Giảm Na^+ huyết khi nồng độ Na^+ trong huyết tương < 136mmol/L. Nồng độ này phản ánh tỉ lệ Na^+ với thể tích huyết tương và không cho biết tổng lượng Na^+ trong cơ thể. Do vậy, giảm Na^+ huyết có thể xảy ra trong các trường hợp tổng lượng Na^+ cơ thể thấp, bình thường hoặc cao và có thể trong trường hợp thể tích dịch ngoại bào giảm, bình thường hoặc tăng. Hiện nay giảm Na^+ huyết được phân loại theo 3 nhóm nguyên nhân : Mất Na^+ , hoà loãng thể dịch, mất Na^+ giả (Bảng 18.2).

Bảng 18.2. Nguyên nhân giảm Na^+ huyết

Nguyên nhân		
Mất Na^+	Mất Na^+ tại thận:	Lợi tiểu, thiếu aldosterol, bệnh Addison
	Mất Na^+ ngoài thận:	Dạ dày ruột: tiêu chảy, nôn Da: bong, sưng chấn
Thể dịch loãng	SI ADH (hội chứng rối loạn ADH) Phù:	Xung huyết tim, xơ gan, Hội chứng cầu thận
Giảm Na^+ giả :	Tăng đường huyết	Tăng lipid máu, Tăng protein máu

Tăng Na^+ huyết: Khi nồng độ Na^+ huyết tương cao hơn 145 mmol/L. Tăng Na^+ huyết xảy ra do mất nước hay tăng Na^+ . Tăng Na^+ huyết do mất nước quá mức kéo theo Na^+ như trong mất nước qua ống tiêu hoá trong nôn, tiêu chảy và tăng tiết mồ hôi quá mức vì sốt cao hay tập thể dục cường độ cao. Mất nước nguyên nhân hormon như trong bệnh đái tháo đường thường liên quan tới thiếu hụt bài tiết ADH. Khi thiếu ADH tái hấp thu nước giảm dẫn đến bài tiết nước tiểu quá nhiều.

Do mất nước ASTT tăng sẽ kích thích trung tâm cảm giác khát, nước được uống vào. Tuy nhiên nếu đủ lượng nước uống vào Na^+ huyết và ASTT có thể vẫn tăng lên.

Tăng Na^+ huyết do tăng Na^+ : Thường xảy ra cấp tính do uống hoặc truyền nhiều dung dịch NaCl hay NaHCO_3 ưu trương. Trong tăng aldosterol tiền phát (hội chứng Conn) liên quan với cường chức năng tuyến thượng thận, dẫn đến tăng sản xuất Aldossterol. Aldossterol tăng làm tăng quá trình tái hấp thu và bài tiết K^+ .

Triệu chứng của tăng Na^+ huyết là những triệu chứng về thần kinh và do sự vận chuyển nước từ trong tế bào ra ngoài vào huyết tương để làm thăng bằng về ASTT. Sự mất nước tế bào não làm mất chức năng hoạt động thần kinh với các triệu chứng như: ngủ lịm, nhược cơ, biểu hiện xuất huyết, hôn mê và chết.

2.3. Kali

K^+ là ion dương chủ yếu ở dịch nội bào, 90% K^+ cơ thể ở dịch nội bào trong khi chỉ có 2% ở dịch ngoại bào do đó có sự chênh lệch lớn về nồng độ K^+ giữa dịch nội bào và ngoại bào. Nồng độ K^+ nội bào khoảng 150 mmol/L còn huyết tương chỉ có 3,5 - 5 mmol/L.

Sự chênh lệch nồng độ Na^+ , K^+ được duy trì hai bên màng tế bào nhờ enzym Na^+/K^+ - ATPase, enzym này bơm Na^+ từ nội bào ra ngoại bào, và K^+ theo chiều ngược lại.

K^+ có hai chức năng sinh học chính. K^+ đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá tế bào thông qua việc tham gia điều hoà nhiều quá trình hoạt động nội bào. Khi xảy ra sự mất thăng bằng K^+ một loạt chức năng tế bào bị ảnh hưởng. K^+ cũng đóng vai trò quan trọng trong kích thích thần kinh cơ. Tỉ lệ nồng độ K^+ giữa dịch nội bào và ngoại bào cũng ảnh hưởng điện thế nghỉ của màng trên màng tế bào. Điện thế nghỉ cho phép tạo ra điện thế hoạt động cần thiết cho chức năng thần kinh cơ bình thường. Vì vậy sự tăng giảm nồng độ K^+ có thể làm đảo lộn tỉ lệ K^+ dẫn đến chứng loạn nhịp tim và liệt cơ.

Tầm quan trọng của nồng độ K^+ huyết tương:

K^+ ảnh hưởng lên sự co cơ tim, trong cả hai trường hợp: tăng K^+ huyết và giảm K^+ huyết đều đe dọa sự sống. Việc định lượng K^+ trong huyết thanh là xét nghiệm quan trọng cần thực hiện trên lâm sàng. Nồng độ K^+ huyết tương khoảng 3,5-5 mmol/L. Vì nồng độ K^+ nội bào lớn hơn nhiều lần, một sự thay đổi nhỏ nồng độ K^+ giữa dịch ngoại bào và nội bào cũng có thể dẫn đến sự biến đổi lớn nồng độ K^+ huyết tương.

Giảm K^+ huyết: Khi giá trị K^+ huyết tương nhỏ hơn 3,5mmol/L. K^+ đi vào được tế bào cơ xương và tế bào gan phụ thuộc insulin. Sự bài tiết quá mức insulin có thể xảy ra khi ăn quá nhiều carbohydrate, đặc biệt chế độ dinh dưỡng quá mức dẫn đến giảm K^+ huyết thoáng qua.

Trong trường hợp nhiễm kiềm, ion H^+ trao đổi qua màng tế bào với ion K^+ . Vì ion H^+ thiếu trong dịch nội bào khi nhiễm kiềm nên H^+ di chuyển từ trong tế bào ra ngoại bào và K^+ chuyển vào trong tế bào để duy trì cân bằng về ion dương. Sự di chuyển này của ion K^+ gây giảm K^+ huyết.

Tăng aldosterol tiên phát được biết như hội chứng Conn, do U tuỷ thượng thận dẫn đến tăng tổng hợp aldosterol. Aldosterol tăng làm tăng bài tiết K⁺ qua thận. Tăng aldosterol thứ phát do aldosterol bị kích thích vì hệ renin-angiotensin.

Tình trạng phù như trong xơ gan, hội chứng thận hư thường kết hợp với tăng aldosterol thứ phát. Khi phù hình thành thì xuất hiện giảm thể tích huyết tương. Thể tích huyết tương giảm được nhóm các tế bào đặc biệt ở cầu thận nhận biết và hoạt động kích thích hệ renin-angiotensin gây hậu quả là tăng aldosterol.

Thuốc lợi niệu tác dụng lên ống lợn gần làm tăng dòng nước tiểu qua ống bằng cách kích thích tái hấp thu NaCl và tăng bài tiết K⁺.

Giảm K⁺ huyết còn thường thấy ở bệnh nhân nôn kéo dài, tiêu chảy kéo dài, hoặc lạm dụng thuốc nhuận tràng gây mất K⁺ qua phân.

Những triệu chứng trên lâm sàng do K⁺ huyết tăng thường liên quan tới giảm K⁺ tế bào cơ, chức năng thận, và loạn nhịp tim. K⁺ thấp làm trạng thái khử cực tế bào cơ kéo dài gây nhược cơ và liệt. Những triệu chứng nhược cơ như: chuột rút, liệt nhẹ, tetani.

Bảng 18.3.Nguyên nhân tăng và giảm K⁺ huyết

Giảm K ⁺	Nguyên nhân	Tăng K ⁺	Nguyên nhân
K ⁺ bào tế bào tăng:	Thừa insulin Nhiễm kiềm	Tăng phân huỷ tế bào	
Mất K ⁺ qua thận:	Cường aldosterol	Biến đổi hấp thu K ⁺ tế bào:	
Dùng lợi niệu	Giảm K huyết giả		Nhiễm acid Thiếu insukin
Mất K ⁺ quá nhiều qua ống tiêu hoá:	Nôn Tiêu chảy Lạm dụng thuốc thuốc nhuận tràng	Rối loạn bài tiết thận: Tiêu huyệt...	Suy thận Giảm aldosterol

Tăng K huyết:

Khi giá trị K⁺ lớn hơn 5,0 mmol/L. Nguyên nhân chính gây tăng K⁺ được trình bày trong bảng 18.3. Khẩu phần ăn nhiều K⁺ hiếm khi gây tăng K⁺ huyết trừ khi có rối loạn chức năng thận gây giảm bài tiết K⁺. Tổn thương tổ chức làm giải phóng K nội bào gây tăng K⁺ huyết.

Trong nhiễm acid, H⁺ di chuyển vào tế bào để cố gắng làm tăng pH huyết tương, K⁺ chuyển ra ngoài làm tăng K⁺ ngoại bào với tỉ lệ 0,06mmol/L cho tăng 0,1 đơn vị pH.

Suy thận cấp là một nguyên nhân chính gây tăng K⁺ huyết do thận chỉ có ý nghĩa trong sự loại bỏ K⁺ khi giảm aldosterol và cũng gây ra giảm khả năng bài tiết K⁺ của thận. Suy thận mạn thường không gây tăng K⁺ một cách có ý nghĩa cho tới tốc độ lọc cầu thận < 15-20 mL/phút.

Tăng K⁺ giả là hiện tượng quan sát thấy trong nghiên cứu in vitro : K⁺ giải phóng ra từ hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu trong quá trình đông máu. Điều này có thể thấy ở bệnh nhân có bạch cầu cao (>100 000/mm³) và tiểu cầu cao (>500 000/mm³). Ngoài ra, K⁺ huyết còn có thể thấy ở bệnh nhân bất thường màng hồng cầu, K⁺ huyết có thể lên tới 7 - 9 mmol/L. Tăng K⁺ huyết giả còn có thể phát hiện bằng so sánh nồng độ K⁺ trong huyết thanh và trong huyết tương chống đông bằng heparin. Giá trị K⁺ huyết thanh thường là cao hơn 0,2 – 0,3 mmol/L so với K⁺ huyết tương. Nếu sự khác nhau lớn hơn giá trị này thì người ta cho là tăng K⁺ giả. Vì insulin tạo điều kiện thuận lợi cho K⁺ đi vào tế bào gan và cơ, thiếu insulin sẽ ức chế sự di chuyển này và làm tăng K⁺ ngoại bào.

Triệu chứng tăng K⁺ huyết thường liên quan tới nhuộm cơ, rối loạn nhịp tim. Nồng độ K⁺ huyết >7 mmol/L là tình trạng nguy hiểm tới tính mạng cần được cấp cứu.

2.4. Cl⁻

Clor là ion âm chủ yếu của dịch ngoại bào. Nồng độ Cl⁻ khoảng 99-109 mmol/L. Về một khía cạnh nào đó chuyển hoá Cl⁻ liên quan chặt chẽ với chuyển hoá Na⁺. Vì mối liên quan này mà chức năng của Cl⁻ là duy trì thăng bằng thể dịch và ASTT. Nồng độ Cl⁻ thường biến đổi tương đương với Na⁺ trong quá trình giữ thăng bằng acid-base của cơ thể. Cl⁻ đóng vai trò quan trọng trong giữ thăng bằng ion âm và dương do trao đổi với HCO₃⁻. Dòng Cl⁻ vào trong tế bào trao đổi với HCO₃⁻ di ra. Trung bình thức ăn hàng ngày chứa 70 - 200 mmol Cl⁻ dưới dạng muối NaCl, KCl. Cl⁻ được hấp thu ở ruột non. Điều hòa nồng độ Cl⁻ liên quan với Na⁺ ở ống lợn gần và sự tái hấp thu Na⁺ ở quai Helen.

Giảm Cl⁻ huyết xảy ra khi nồng độ Cl⁻ < 99 mmol/L. Nguyên nhân gây giảm Cl⁻ huyết được trình bày ở bảng 18.4. Bình thường mất Cl⁻ qua đường tiêu hoá không đáng kể. Tuy nhiên, Cl⁻ trong ống tiêu hoá liên quan với H⁺ dưới dạng HCl. Mất dịch dạ dày ruột do nôn kéo dài, rửa dạ dày qua xông, dẫn tới giảm Cl⁻ huyết.

Dùng lợi tiểu và lạm dụng thuốc nhuận tràng làm tăng bài tiết Na⁺ qua thận cũng làm tăng bài tiết Cl⁻ vì có mối liên quan giữa hai ion này.

Trong nhiễm kiềm chuyển hoá nồng độ HCO₃⁻ tăng cao, để bù lại trạng thái điện âm do HCO₃⁻, Cl⁻ bị tăng bài tiết do đó gây giảm Cl⁻ huyết.

Tăng Cl⁻:

Khi Cl⁻ huyết >109 mmol/L. Nguyên nhân tăng Cl⁻ huyết xem bảng 18.4. Nói chung mọi tình trạng tăng Na⁺ huyết đều dẫn đến tăng Cl⁻ huyết. Tuy nhiên một số trường hợp Cl⁻ huyết tăng nhưng Na⁺ lại bình thường như trong mất thăng bằng acid-base như nhiễm acid chuyển hoá có HCO₃⁻ giảm. Để duy trì nồng độ ion âm bình thường trong trường hợp này, Cl⁻ cần được giữ lại do đó làm tăng Cl⁻ huyết.

NaHCO₃ có thể bị mất qua ống tiêu hoá do nôn kéo dài hoặc nhiễm acid do ống thận gây giảm tái hấp thu HCO₃⁻ ở ống thận.

Trên lâm sàng xét nghiệm định lượng Cl⁻ trong mồ hôi có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán bệnh xơ hoá nang ở trẻ sơ sinh và trẻ em. Đây là một bệnh di truyền tác động đến các tuyến ngoại tiết bao gồm tuyến tiết nhày, tuyến mồ hôi và một số tuyến khác. Đặc điểm lâm sàng quan trọng của bệnh là dịch nhày bị tăng

tiết gây cảm trớ phổi và đường hô hấp trên gây rối loạn hô hấp. Tỉ lệ bệnh là 1/2000 trẻ sơ sinh. Một xét nghiệm quan trọng để chẩn đoán là điện giải mồ hôi, trong đó định lượng thấy nồng độ Na^+ và Cl^- tăng lên. Bình thường Cl^- mồ hôi khoảng $<40 \text{ mmol/L}$. Ở bệnh nhân xơ hoá nang, Cl^- mồ hôi tăng lên từ $60-200 \text{ mmol/L}$. Nếu nồng độ Cl^- trong mồ hôi $>70 \text{ mmol/L}$ thì có thể chẩn đoán là bệnh xơ hoá nang.

Bảng 18.4. Nguyên nhân gây tăng và giảm Cl^- huyết

Giảm Cl^-	Tăng Cl^-
- Mất Cl^- qua ống tiêu hoá : + Nôn kéo dài + Bơm rửa dạ dày qua xông	- Mất nước - Nhiễm toan ống thận
- Bóng	
- Mất Cl^- qua thận: + Lợi tiểu + Nhiễm kiềm chuyển hoá	- Nhiễm acid chuyển hoá: + Mất NaHCO_3 + Nhiễm độc sa lisilat

2.5. Ca^{2+}

Hơn 99% Ca cơ thể là ở xương, 1% trong máu, còn trong tế bào rất ít. Nồng độ Ca^{2+} trong máu ở người khoảng $1,8 \text{ mmol/L}$ cao gấp 5000 -10 000 lần Ca^{2+} trong tế bào cơ và cơ tim. Để duy trì sự chênh lệch nồng độ quá lớn này là duy trì dòng ion Ca^{2+} đi vào trong tế bào nhanh chóng. Ca^{2+} máu ở dưới một số dạng: 45% là ion Ca^{2+} tự do trong máu tuần hoàn, 40% gắn với protein chủ yếu là albumin, 15% gắn với ion âm như HCO_3^- , citrat, phosphat, lactat. Ca^{2+} ở dạng kết hợp này có thể biến đổi nhanh chóng trong khi phẫu thuật, hồi sức cấp cứu... Do vậy định lượng ion Ca^{2+} không thể dựa trên tổng lượng Ca^{2+} .

Giảm Ca^{2+} huyết:

Giảm Ca^{2+} huyết tiên phát trong trường hợp thiếu hormon cận giáp. Nồng độ Ca^{2+} huyết thanh không được điều hoà, xương cố giữ Ca^{2+} dự trữ và thận thì tăng bài tiết Ca^{2+} . Hoạt động của tuyến cận giáp đòi hỏi chuyển hoá bình thường vitaminD, thiếu tác động của Vitamin D cũng dẫn đến giảm Ca^{2+} huyết.

Giảm Ca^{2+} huyết có thể biểu hiện đồng thời với giảm albumin huyết, nguyên nhân thường là do bệnh gan mạn tính, hội chứng thận hư, và suy dinh dưỡng. Nói chung giảm 1g/dL albumin huyết thanh thì giảm $0,2\text{mmol/L}$ tổng lượng Ca^{2+} .

Khoảng 50% bệnh nhân viêm tuy cấp có giảm Ca^{2+} huyết. Nguyên nhân là do tăng gắn Ca^{2+} ở ruột khi hoạt động của lipase tăng.

Bệnh nhân sau mổ hay phải chăm sóc tăng cường việc duy trì nồng độ ion Ca^{2+} trong máu ở mức bình thường giúp cho hoạt động cơ tim và duy trì đủ áp suất máu.

Triệu chứng khi giảm Ca^{2+} huyết chủ yếu là kích thích thần kinh cơ (chuột rút, tetani) và mất điều hoà nhịp tim (loạn nhịp tim, nhồi máu cơ tim). Những triệu chứng này xuất hiện khi nồng độ Ca^{2+} huyết $<1,88\text{mmol/L}$.

Tăng Ca²⁺ huyết:

Khi Ca²⁺ huyết thanh > 2,6 mmol/L. Tăng Ca²⁺ huyết chủ yếu gặp trong cường cận giáp tiên phát. Nguyên nhân thứ hai gặp trong một số loại u ác tính, Ca²⁺ huyết tăng là yếu tố chỉ điểm để chẩn đoán U. Nhiều loại khối u tăng tổng hợp peptid liên quan tới hormon cận giáp, các peptid này gắn với các receptor hormon cận giáp bình thường gây tăng nồng độ Ca²⁺ huyết.

Triệu chứng của tăng Ca²⁺ huyết: Tăng Ca²⁺ huyết nhẹ không có triệu chứng gì, nếu tăng Ca²⁺ huyết mức trung bình hoặc nặng thì biểu hiện các triệu chứng về thần kinh (ngủ gà, ức chế, thẫn thờ, hôn mê), triệu chứng về tiêu hoá (táo bón, buồn nôn, chán ăn, loét dạ dày), triệu chứng về thận(viêm cầu thận, vôi hoá cầu thận).

2.6. Mg²⁺

Mg²⁺ là ion thứ hai có nồng độ cao trong dịch nội bào. Khoảng 31% tổng lượng Mg²⁺ cơ thể là trong dịch nội bào trong khi 67% tập trung ở xương, khoảng 1-2% trong huyết thanh với nồng độ từ 0,075 đến 0,96 mmol/L. Mg²⁺ trong huyết thanh có 35% gắn với protein còn lại ở dạng ion Mg²⁺ tự do. Mg²⁺ nội bào có chức năng xúc tác một số phản ứng enzym trong vận chuyển, dự trữ và sử dụng năng lượng. Các phản ứng này có sự tham gia của ATP, ATP được Mg²⁺ hoạt hoá. Mg²⁺ còn đóng vai trò quan trọng trong chuyển hoá đường, chất béo, acid nucleic, protein.

Nguyên nhân gây tăng và giảm Mg²⁺ huyết được trình bày ở bảng 18.5.

Bảng 18.5. Nguyên nhân tăng và giảm Mg²⁺ huyết

Giảm Mg ²⁺	Tăng Mg ²⁺
Do hấp thu hay tiêu hoá:	
Hấp thu	Suy thận
Suy dinh dưỡng	Ngộ độc Mg ²⁺ : Giảm độ acid dạ dày
Giảm Mg ²⁺ trong:	Hội chứng giảm hấp thu
	Tiêu chảy
	Nghiện rượu
Mất Mg ²⁺ qua thận:	
	Dùng lợi tiểu
	Cường aldosterol
	Cường cận giáp nguyên phát

2.7. Khoảng trống anion gap

Trên thực tế các ion này được tính theo công thức:

$$\text{Anion gap} = \{ [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] \} - \{ [\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-] \}$$

$$= 12-20 \text{ mmol/L}$$

Theo cách tính này khoảng trống khoảng 12 -20 mmol/L, số lượng này có thể tăng lên gấp vài lần khi có rối loạn các anion hữu cơ và vô cơ, hoặc cả 2 trong suy thận và nhiễm acid trong đái tháo đường. Kali là cation chủ yếu của dịch nội bào, nồng độ K^+ nội bào khoảng 110mmol/L gấp 30 lần so với K^+ ngoại bào. Nồng độ Na^+ , Cl^- dịch nội bào chỉ khoảng 10mmol/L và 4mmol/L. Các anion trong nội bào bao gồm: Protein, phosphat, và một số chất khác không khuyếch tán được qua màng tế bào. Việc tính anion gap có giá trị trên lâm sàng khi có rối loạn thăng bằng acid-base. Hầu hết các máy phân tích điện giải tự động hiện nay đều tính toán được thông số này.

Anion gap tăng do giảm các cation không định lượng được trong các trường hợp giảm K^+ , Ca^{2+} hoặc Mg^{2+} , tuy nhiên điều này hiếm gặp trên lâm sàng. Các loại acid vô cơ như phosphat, sulphat tích tụ lại do giảm chức năng thận hoặc sự tích tụ các acid hữu cơ trong nhiễm acid lactic, acetoacetic thường là nguyên nhân gây tăng anion gap. Để trung hòa các anion tích tụ này lượng Cl^- , HCO_3^- giảm đi dẫn đến tăng anion gap.

Ngộ độc đường tiêu hoá các chất như: methanol, ethylen glycol, salicilat cũng gây tăng anion gap. Dùng liều cao thuốc kháng sinh như penicillin, carbenicillin chứa Na^+ gây giảm anion định lượng được do đó làm tăng anion gap.

Giảm anion gap ít gặp, trên lâm sàng có thể gặp trong trường hợp tăng albumin máu. Sự giảm anion protein có thể do bù trừ khi các anion định lượng được tăng lên.

3. ĐIỀU HÒA THĂNG BẰNG ĐIỆN GIẢI

Khi không có sự chênh lệch thẩm thấu qua màng tế bào, cơ chế đáp ứng để duy trì thể tích dịch tế bào là bơm Na^+ - K^+ . Úc chế bơm này (dùng ouabain) do tăng nồng độ Na^+ và giảm K^+ trong tế bào, và vì vậy, gây giảm điện thế màng. Để duy trì sự trung hòa điện tích, ion Cl^- đi vào tế bào ngược với Na^+ . Lượng ion đi vào tế bào lớn hơn lượng ion đi ra, điều này tạo nên một sự chênh lệch thẩm thấu dẫn đến vận chuyển nước vào trong tế bào.

3.1. Hoạt động của bơm Na^+ - K^+ được điều hòa bởi nồng độ Na^+ nội bào

Nếu nồng độ Na^+ nội bào tăng lên, hoạt động của bơm Na^+ - K^+ tăng lên và ion Na^+ bị bơm ra ngoài tế bào. Với cách hoạt động này tế bào tự bảo vệ nhờ thay đổi thể tích dịch. Tuy nhiên thể tích tế bào cũng có thể được điều hòa nhờ những chất tạo sự thẩm thấu trong tế bào. Ví dụ, những tế bào não thích ứng với sự tăng ASTT ngoại bào bằng cách tăng nồng độ các acid amin.

3.2. Thận

Chức năng chính của thận là duy trì thành phần, ASTT, và thể tích dịch ngoại bào. Điều hòa thăng bằng acid- ase liên quan chặt chẽ với chức năng này. Thận loại bỏ các sản phẩm cặn bã của chuyển hóa như ure, acid uric, creatinin, giữ lại những chất dinh dưỡng như glucose, acid amin, protein. Thận cũng tham gia chuyển hóa và loại bỏ nhiều chất độc và thuốc khỏi cơ thể. Chức năng của thận được điều hòa bởi hệ thống nội tiết gồm các hormon peptid và steroid. Thận cũng là một cơ quan nội tiết, nó sản xuất ra renin, $1,25(OH)_2$ vitaminD và erythropoietin có tác động lên áp suất máu, calci nội môi và các sản phẩm của hồng cầu.

3.3. ADH và hệ angiotensin trong rối loạn nước và điện giải

Thông thường, mặc dù lượng nước hấp thu thay đổi lớn, ASTT huyết thanh vẫn duy trì trong giới hạn hẹp. Các thụ thể thẩm thấu kích thích giải phóng ADH và cảm giác khát của vùng dưới đồi đáp ứng với sự biến đổi ASTT huyết tương. Sự biến đổi thể tích tuần hoàn dẫn đến bài tiết ADH do kích thích các thụ thể nhạy cảm với áp suất.

Sự dư nước làm tăng thể tích huyết tương, dòng máu tới thận và dộ lọc cầu thận (GFR). Hiện tượng này ức chế sự sản xuất renin và toàn bộ hệ renin angiotensin. Do đó nồng độ aldosterol giảm dẫn đến giảm tái hấp thu Na^+ và mất Na^+ qua nước tiểu. Sự thừa nước cũng làm loãng huyết tương gây giảm ASTT. Hơn nữa, thông qua hoạt động của các thụ thể thẩm thấu ở dưới đồi, sự giảm ASTT ức chế cảm giác khát và sự bài tiết ADH. Giảm ADH dẫn đến tăng bài tiết nước. Tóm lại, đáp ứng với sự dư nước là sự tăng điều hoà nước và bài tiết Na^+ . Thiếu nước (mất nước) dẫn đến giảm dòng máu qua thận và sau đó là giảm thể tích huyết tương. Hiện tượng này kích thích hệ angiotensin, aldosterol gây tăng tái hấp thu Na^+ . Mất nước làm đặc huyết tương gây tăng ASTT huyết tương, kích thích cảm giác khát và bài tiết ADH, do đó tăng tái hấp thu nước ở ống lợn gần. Tóm lại, đáp ứng với sự mất nước là sự giữ Na^+ và nước.

4. ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG NƯỚC VÀ ĐIỆN GIẢI

Đây là yếu tố quan trọng trên lâm sàng. Để giúp việc chẩn đoán và điều trị bệnh trên lâm sàng, ngoài việc khám thực thể và hỏi tiền sử bệnh cần định lượng những thông số sau để đánh giá tình trạng nước và điện giải:

- Nồng độ các chất điện giải huyết thanh: tối thiểu cần các thông số như nồng độ Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , ure và creatinin huyết thanh.
- Tình trạng thăng bằng acid base: nồng độ ion H^+ trong máu hay pH, pCO_2 , pO_2 .
- Nồng độ albumin huyết thanh, ASTT huyết thanh.,
- Thể tích nước tiểu.

Đối với bệnh nhân rối loạn nước và điện giải nằm tại bệnh viện thì việc lập biểu đồ thể dịch hàng ngày bao gồm lượng nước hấp thu và đào thải là việc cần làm.

5. PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CÁC YẾU TỐ THĂNG BẰNG NƯỚC VÀ ĐIỆN GIẢI

5.1. Xác định ASTT

- Mẫu: thường dùng huyết thanh hoặc nước tiểu, huyết tương không được sử dụng vì ảnh hưởng của các yếu tố đông máu sẽ gây sai số.
- Phương pháp định lượng: định lượng ASTT dựa trên đặc tính hoà tan của một dung dịch có số phân tử hoà tan trong một kg dung môi (đặc tính phụ thuộc số lượng), như sự thay đổi điểm đông và áp suất hơi. Xác định độ hạ điểm đông và sự giảm áp suất hơi (điểm sương hay độ nhiệt ngưng) là hai

phương pháp thường được sử dụng để xác định ASTT. Có một số loại dụng cụ để đo ASTT gọi là thẩm thấu kế (osmometer) được bán trên thị trường.

Loại ASTT kế hoạt động dựa trên nguyên tắc đo độ hạ điểm đông được tiêu chuẩn hoá nhờ dùng dung dịch NaCl tham chiếu. Huyết thanh và nước tiểu đem phân tích được li tâm bỏ cặn. Lấy một lượng mẫu nhất định vào cốc đựng mẫu, cho vào máy phân tích. Trong máy mẫu sẽ bị làm lạnh xuống -7°C và bắt đầu quá trình đóng băng. Khi nhiệt độ đạt trạng thái cân bằng điểm đông sẽ được xác định. Kết quả ASTT huyết thanh và nước tiểu sẽ được thể hiện bằng mOsmol/kg.

Mẫu	ASTT (mOsmol/kg)
Huyết thanh	275 - 295
Nước tiểu (24h)	300 - 900
Tỉ số: Nước tiểu/huyết thanh	1.0 - 3.0

5.2. Phân tích một số ion huyết thanh

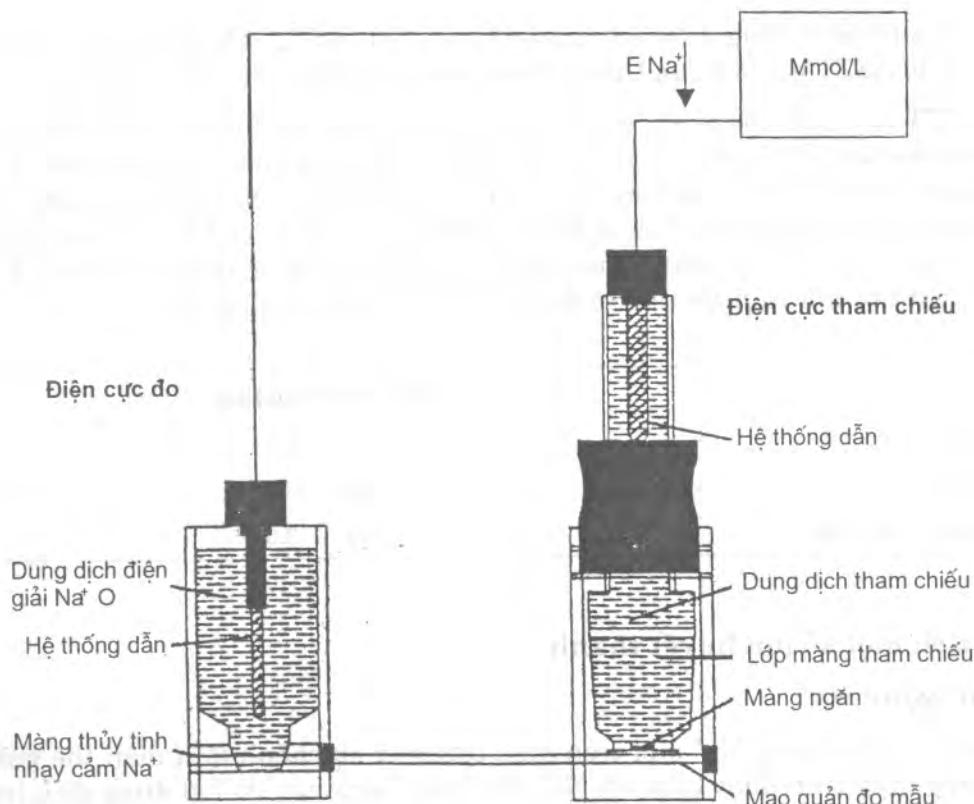
5.2.1. Định lượng Na^+

Nguyên tắc định lượng Na^+ dựa trên hiện tượng là sự chênh lệch điện thế giữa hai bên màng thuỷ tinh nhạy cảm với Na^+ , sự chênh lệch này do hai dung dịch hai bên màng có giá trị Na^+ khác nhau. Sự chênh lệch điện thế này ($E \text{ Na}^+$) tương ứng với nồng độ ion Na^+ của hai dung dịch. Dung dịch đậm bên trong điện cực có nồng độ Na^+ cố định biết trước $\text{Na}^+ 0$ vì vậy hiệu điện thế $E \text{ Na}^+$ tương đương với giá trị nồng độ Na^+ của mẫu $\text{Na}^+ x$ cần phải đo. $E \text{ Na}^+$ được tính như sau:

$$E \text{ Na}^+ = -61,5 \text{ mV} \times (\text{Na}^+ x - \text{Na}^+ 0) \text{ ở } 37^\circ\text{C}$$

(61,5 là yếu tố Nernst).

Hệ thống dẫn của điện cực gồm hai điện cực: 1 điện cực đo và 1 điện cực tham chiếu. Điện cực đo gồm có hệ thống dẫn nối với phía ngoài màng thuỷ tinh mao dẫn qua dung dịch đậm dẫn điện. Điện cực tham chiếu có hệ thống dẫn nối bên trong màng thuỷ tinh mao dẫn qua dung dịch điện giải tham chiếu và mẫu cần đo. Nhờ hệ kết nối như vậy, sự chênh lệch điện tích do Na^+ của mẫu và $\text{Na}^+ 0$ giữa hai bên màng thuỷ tinh nhạy cảm Na^+ được dẫn tới bộ phận khuyếch đại và đo.



Hình18. Cấu tạo điện cực và sơ đồ đo Na^+

Lấy mẫu: Huyết thanh, huyết tương, nước tiểu đều có thể dùng để định lượng Na . Khi dùng mẫu huyết tương có thể chống đông bằng heparin. Vỡ tế bào máu không ảnh hưởng nhiều tới nồng độ Na .

5.2.2. Định lượng K^+

Nguyên tắc định lượng K^+ dựa trên hiện tượng chênh lệch điện thế giữa bên màng PVC (có khả năng cho ion K^+ thẩm qua), màng này ngăn cách hai dung dịch có nồng độ K^+ khác nhau. Sự chênh lệch điện thế này ($E \text{ K}^+$) tương ứng với sự chênh lệch nồng độ ion K^+ của hai dung dịch. Dung dịch đậm bên trong có nồng độ K^+ 0 không đổi vì vậy chênh lệch điện thế $E \text{ K}^+$ tương ứng với nồng độ K^+ của mẫu cần định lượng.

$$E \text{ K}^+ = -61,5 \text{ mV} \times (K^+ x - K^+ O) \text{ ở } 37^\circ\text{C}.$$

(-61,5 là yếu tố Nernst)

Cấu tạo điện cực K^+ giống như điện cực Na^+ , khi thay màng PVC nhạy cảm K^+ và dung dịch đậm K^+O .

Lấy mẫu: Huyết thanh, huyết tương, nước tiểu đều có thể dùng để định lượng K^+ . Tuyệt đối tránh gây vỡ tế bào máu vì nồng độ K^+ rất cao trong hồng cầu. Nên phân tích ngay sau khi tách huyết thanh hoặc huyết tương.

5.2.3 Định lượng Ca^{2+}

Nguyên tắc định lượng Ca^{2+} dựa trên hiện tượng chênh lệch điện thế giữa bên màng PVC (có khả năng cho ion Ca^{2+} thâm qua), màng này ngăn cách hai dung dịch có nồng độ Ca^{2+} khác nhau. Sự chênh lệch điện thế này ($E \text{ Ca}^{2+}$) tương ứng với sự chênh lệch nồng độ ion Ca^{2+} của hai dung dịch. Dung dịch đệm bên trong có nồng độ $\text{Ca}^{2+}0$ không đổi vì vậy chênh lệch điện thế $E \text{ Ca}^{2+}$ tương ứng với nồng độ Ca^{2+} của mẫu cần định lượng.

$$E \text{ Ca}^{2+} = -30,75 \text{ mV} \times (\text{Ca}^{2+}x - \text{Ca}^{2+}0) \text{ ở } 37^\circ\text{C}.$$

(-30,75 là yếu tố Nernst)

Cấu tạo điện cực Ca^{2+} giống như điện cực đo Na^+ , khi thay màng PVC nhạy cảm Ca^{2+} và dung dịch đệm $\text{Ca}^{2+}0$.

Lấy mẫu: Huyết thanh, huyết tương đều có thể dùng để định lượng Ca^+ . Khi dùng mẫu huyết tương có thể chống đông bằng heparin.

5.2.4. Định lượng ion Cl^-

Nguyên tắc định lượng ion Cl^- và phương pháp đo tương tự như định lượng các ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Ở đây $E \text{ Cl}^-$ được tính như sau:

$$E \text{ Cl}^- = -61,5 \text{ mV} \times (\text{Cl}^-x - \text{Cl}^-0) \text{ ở } 37^\circ\text{C}.$$

(-61,5 là yếu tố Nernst)

Điện cực đo có màng PVC thâm Cl^- và dung dịch đệm Cl^- được sử dụng.

Clo huyết: Bình thường 97–100 mmol/L

Cl^- thường đi kèm Na^+ nên các nguyên nhân gây tăng hay giảm Na^+ cũng tương tự với Cl^-

5.2.5. Định lượng Li^+

Nguyên tắc định lượng ion Li^+ và phương pháp đo tương tự như định lượng các ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Ở đây $E \text{ Li}^+$ được tính như sau:

$$E \text{ Li}^+ = -61,5 \text{ mV} \times (\text{Li}^+x - \text{Li}^+0) \text{ ở } 37^\circ\text{C}.$$

(-61,5 là yếu tố Nernst)

Điện cực đo có màng PVC thâm Li^+ và dung dịch đệm Li^+ được sử dụng.

Lithi huyết: Là yếu tố vi lượng, sự phân bố ở hai khu vực nội và ngoại bào tương đương nhau, Li^+ có thể được vận chuyển qua màng nhờ bơm $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.

Bình thường: 0,003–0,009 mmol/L

Li^+ được dùng trong điều trị bệnh tâm thần (trầm cảm) và nhất thiết phải định lượng để điều chỉnh liều điều trị. Khi nồng độ Li^+ trong huyết tương 1,6 – 2,0 mmol/L có thể đã có triệu chứng nhiễm độc.

5.3. Phân tích các yếu tố điện giải trong nước tiểu

Định lượng các chất điện giải trong nước tiểu nói chung không có giá trị chẩn đoán cao trên lâm sàng vì có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới sự bài tiết các chất điện giải ra nước tiểu. Các yếu tố khác như thức ăn, lượng nước, thăng bằng acid-base, thuốc uống, bệnh tật... đều ảnh hưởng tới nồng độ các chất điện giải trong nước tiểu. Tuy nhiên, việc định lượng các chất điện giải trong nước tiểu cũng cho chúng ta một số thông tin có ích trong một số trường hợp nhất định.

Khi Na^+ huyết thanh giảm, đáp ứng bình thường của thận là giảm bài tiết Na^+ và Na^+ niệu giảm. Vì vậy, khi chức năng thận bình thường, Na^+ niệu $< 20\text{mmol/L}$ do mất Na^+ ngoài thận như mất qua ống tiêu hoá, một nguyên nhân làm giảm Na^+ máu. Trái lại, nếu Na^+ niệu $> 20\text{ mmol/L}$ kèm theo Na^+ huyết thanh giảm điều này chứng tỏ mất Na^+ qua thận và do chức năng thận bị tổn thương, không giữ được Na^+ .

Nồng độ K^+ nước tiểu ít có giá trị lâm sàng như nồng độ Na^+ nhưng có thể dùng để những trường hợp giảm K^+ huyết không giải thích được. K^+ niệu $< 10\text{ mmol/L}$ phản ánh chức năng thận giữ K^+ bình thường, nguyên nhân khác gây mất K^+ như mất qua ống tiêu hoá, hay khẩu phần ăn không đủ. K^+ niệu $> 10\text{ mmol/L}$ chỉ điểm giảm chức năng thận do điều trị thuốc lợi tiểu, nhiễm kiềm, quá mức aldosteron, bệnh thận...

Tỉ số Na^+/K^+ : Định lượng K^+ niệu còn giúp tính tỉ lệ Na^+/K^+ . Bình thường tỉ số $\text{Na}^+/\text{K}^+ = 2:1$ tức nồng độ Na^+ niệu gấp đôi K^+ niệu. Trong bệnh tăng nồng aldosterol tỉ số này bị đảo ngược, có thể tới 1:40, điều này cho thấy tăng tái hấp thu Na^+ và tăng đào thải K^+ . Trong thiểu năng aldosterol tỉ số này có thể lên tới 10:1. Theo dõi lượng K^+ niệu còn quan trọng trong phát hiện sự mất cân bằng K^+ mạn tính trước khi K^+ huyết thanh giảm trong một số bệnh.

Cl^- : Định lượng Cl^- thường dùng trong đánh giá tình trạng nhiễm kiềm chuyển hoá. Cl^- niệu $< 10\text{ mmol/L}$ thường do mất Cl^- qua dạ dày và dùng lợi tiểu trong khi Cl^- niệu $> 10\text{ mmol/L}$ trong rối loạn chức năng thận.

Chương 19

KHÍ MÁU VÀ SỰ THĂNG BẰNG ACID - BASE

MỤC TIÊU

- Trình bày được nguyên tắc đo các thông số khí máu và thăng bằng acid-base: pH, pCO_2 , HCO_3^- , pO_2 và SaO_2 .
- Trình bày được ý nghĩa lâm sàng của các thông số khí máu và thăng bằng acid-base nêu trên.

MỞ ĐẦU

Hằng ngày một lượng lớn O_2 , CO_2 , H^+ luân chuyển trong cơ thể người. Quá trình chuyển hóa tạo ra CO_2 , CO_2 hòa tan trong nước dưới tác dụng của enzym carbonic anhydrase (CA) hình thành acid carbonic (H_2CO_3), acid này phân ly tạo ion H^+ . Mặc dù CO_2 được tạo ra từ nhiều nguồn khác nhau nhưng pH máu vẫn luôn hằng định, nồng độ ion H^+ vẫn được duy trì ở mức 36-43 nmol/L hay pH=7,47-7,44. Đó là trạng thái hằng định nội môi về acid - base. Sự duy trì thăng bằng acid-base liên quan đến phổi, hồng cầu và thận.

Sự rối loạn thăng bằng acid - base trong một số trường hợp bệnh lý có thể ảnh hưởng trực tiếp và sâu sắc đến mọi quá trình chuyển hóa. Vì vậy, việc phát hiện sớm những rối loạn cũng như kịp thời phục hồi những rối loạn thăng bằng acid-base cho cơ thể bệnh nhân là một trong những vấn đề quan trọng trong hồi sức cấp cứu.

1. SỰ ĐIỀU HÒA THĂNG BẰNG ACID-BASE DO CÁC HỆ ĐỆM CỦA CƠ THỂ

Bảng 19.1. Những hệ đệm chính trong cơ thể con người

Hệ đệm	Acid	Base tương ứng	Hoạt động đệm
Hemoglobin	HHb	Hb ⁻	Hồng cầu
Protein	Hprot	Prot-	Nội bào
Phosphat	H_2PO_4	HPO_4^{2-}	Nội bào
Bicarbonat	$CO_2 \cdot H_2CO_3$	HCO_3^-	Ngoại bào (huyết tương)

1.1. Hệ đệm bicarbonat

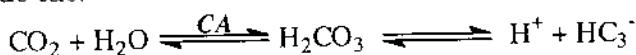
Là hệ đệm chủ yếu vì nó duy trì sự cân bằng áp suất khí vì vậy tạo ra một hệ thống mở có khả năng đệm lớn. CO_2 tạo ra trong các mô, khuyếch tán qua màng tế bào và hòa tan vào huyết tương. Hệ số hòa tan CO_2 trong nước là 0,23 nếu phân áp CO_2 tính theo đơn vị kPa (hoặc 0,03 mmHg). Vì vậy, ở điều kiện bình thường $pCO_2 = 5,3$ kPa (40 mmHg; 1kPa= 7,5 mmHg; 1mmHg= 0,133kPa). Nồng độ CO_2 hòa tan (dCO_2) là :

$$dCO_2 (\text{mmol/L}) = 5.3 \text{kPa} \times 0.23 = 1.2 \text{ mmol/L}$$

Phương trình Henderson- Hasselbalch cho phép tính pH cho hệ đệm này như sau:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{0,23 \times \text{pCO}_2}$$

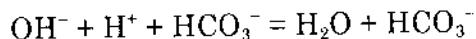
pH=7.4 (nồng độ ion H⁺ 40nmol/L) là pH trung bình của dịch ngoại bào ở điều kiện nồng độ HCO₃⁻ bình thường và pCO₂ bình thường. Thông thường nồng độ HCO₃⁻ trong huyết tương khoảng 24 mmol/L nhờ phản ứng có enzym carbonic anhydrase (CA) xúc tác:



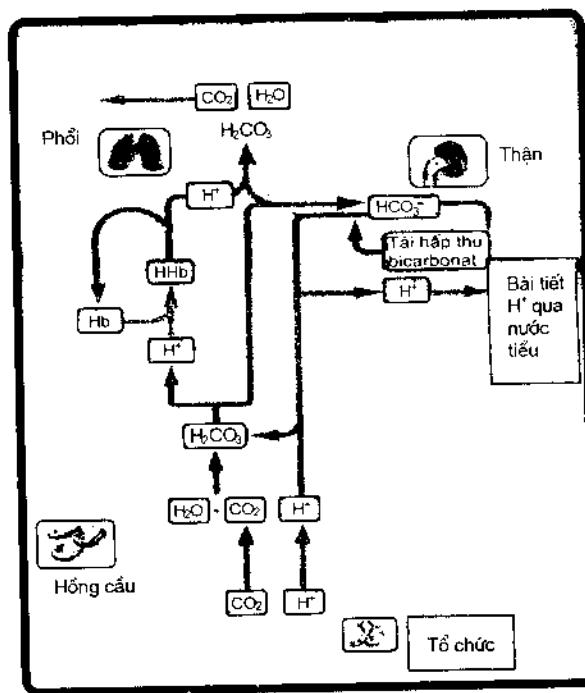
pK của đệm bicarbonat là 6,1. Thay nồng độ bicarbonat vào phương trình Henderson- Hasselbalch ta có:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{24}{1,2}$$

Đệm bicarbonat có tác dụng hạn chế tối đa sự thay đổi nồng độ ion H⁺ khi tăng acid cũng như tăng base trong huyết tương. Khi acid tăng, phản ứng trên xảy ra theo chiều từ phải qua trái giải phóng CO₂, CO₂ được loại trừ qua phổi. Khi base tăng acid carbonic sẽ trung hòa OH⁻ trong nước :



Hệ đệm bicarbonat kết nối với môi trường xung quanh thông qua trao đổi khí ở phổi.

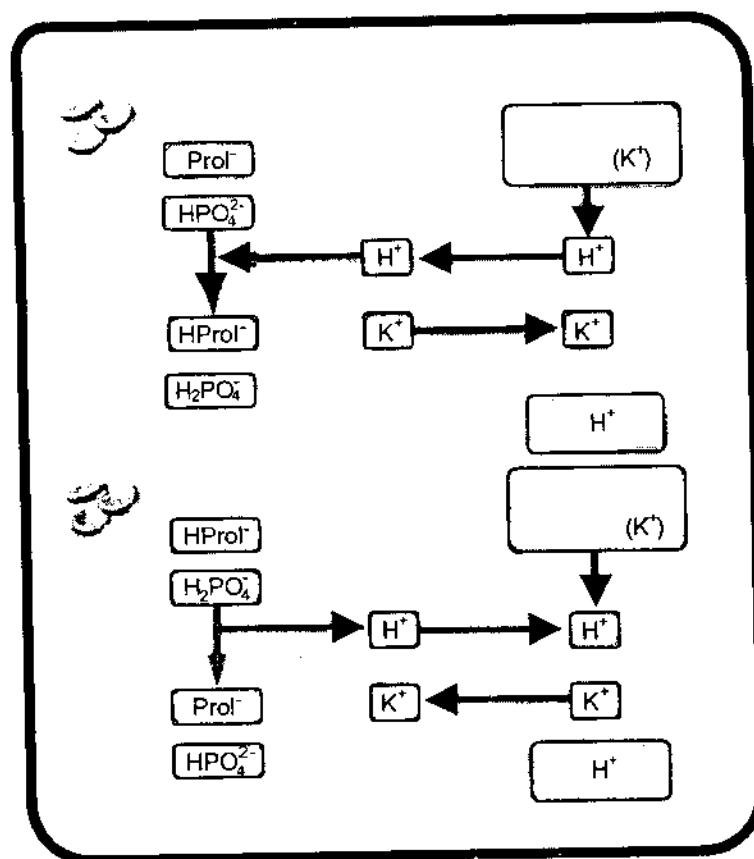


Hình 19.1. Thăng bằng acid-base

Nguồn hydro trong cơ thể là từ acid không bay hơi được các cơ quan sản xuất ra, và CO_2 . Các tổ chức tạo ion H^+ nhờ phản ứng tạo HCO_3^- . Phổi thận và hồng cầu đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì pH máu. Phổi điều hoà sự trao đổi khí với không khí bên ngoài, CO_2 được vận chuyển dưới dạng HCO_3^- và gắn với Hb trong hồng cầu. Trong hệ đệm Hb ion H^+ được tạo ra từ H_2CO_3 . Các acid không bay hơi được đào thải qua thận và ở thận cũng diễn ra quá trình tái hấp thu HCO_3^- .

1.2. Hệ đệm nội bào

Acid tạo ra do các quá trình chuyển hóa và ion H^+ được tạo ra theo phản ứng tạo CO_2 cũng được đệm nhờ hệ đệm nội bào. Hệ đệm nội bào hay hệ đệm trong tế bào chủ yếu là đệm protein và đệm phosphat. Ion H^+ được sản xuất ra ở huyết tương vào trong các tế bào bằng cách trao đổi với ion K^+ . Điều này rất quan trọng vì thông qua sự trao đổi H^+ của huyết tương mà nồng độ K^+ huyết tương tăng lên. Ngược lại, sự tăng bicarbonat ở khoang gian bào có thể được đệm nhờ ion H^+ được tạo ra từ trong tế bào. Trong trường hợp này, ion H^+ đi vào huyết tương nhờ trao đổi với K^+ , và nồng độ ion K^+ huyết tương sẽ giảm đi. Do vậy, khi nồng độ ion H^+ tăng lên (trong nhiễm acid máu) sẽ dẫn tới tăng nồng độ ion K^+ huyết tương, và khi nồng độ ion H^+ giảm (trong nhiễm base máu) dẫn tới tăng nồng độ ion K^+ trong huyết tương. Tóm tắt hệ đệm nội bào được mô tả trong hình 19.2.



Hình 19.2. Hệ đệm nội bào

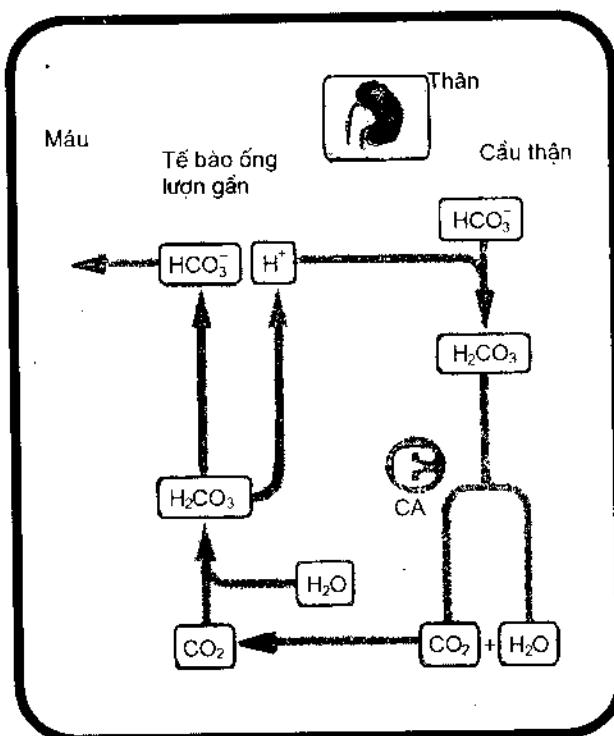
Trái với hệ đệm trong máu những hệ đệm nội bào là đệm protein và phosphat. Ion H^+ trong huyết tương vào tế bào nhờ sự trao đổi K^+ . Ion H^+ tăng dần lên trong huyết tương có thể dẫn đến tăng K^+ trong huyết tương và sự thiếu hụt ion H^+ trong huyết tương sẽ làm giảm nồng độ K^+ trong huyết tương.

2. RỐI LOẠN THĂNG BẰNG ACID-BASE

Phổi và thận đóng vai trò điều hòa nhanh chóng các tác nhân gây ra mất cân bằng nội môi về acid-base, giảm tối đa sự thay đổi pH huyết tương và có khả năng hoạt động bù trừ khi các rối loạn xảy ra.

Bảng 19.2. Sự bù trừ trong rối loạn thăng bằng acid-base hô hấp và chuyển hóa.

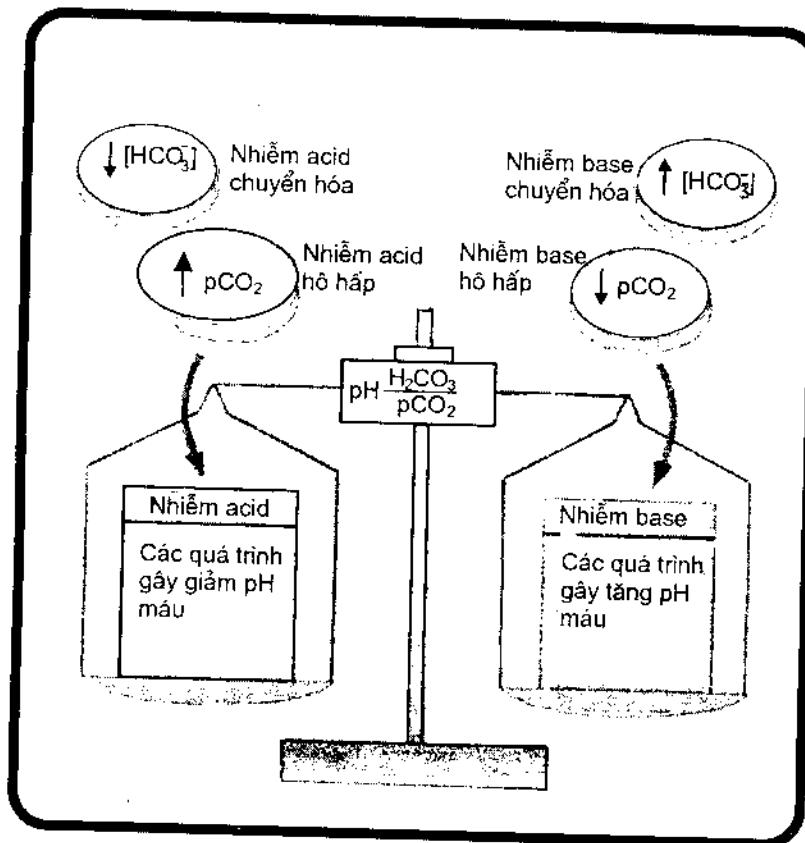
Loại rối loạn	Biến đổi ban đầu	Hoạt động bù	Thời gian bù
Nhiễm acid chuyển hóa	Giảm nồng độ HCO_3^-/ht	Giảm pCO_2 Tăng pCO_2	Phút/giờ
Nhiễm base chuyển hóa	Tăng HCO_3^-/ht	Tăng tái hấp thu HCO_3^- ở thận: tăng HCO_3^-/ht	Phút/ giờ
Nhiễm acid hô hấp	Tăng pCO_2	Giảm tái hấp thu HCO_3^- ở thận: giảm HCO_3^-/ht	Ngày
Nhiễm base hô hấp	Giảm pCO_2		Ngày



Hình 19.3. Sự tái hấp thu Bicarbonat ở thận

Tình trạng rối loạn thăng bằng acid-base được phân loại theo nguyên nhân của chúng. Đầu tiên tình trạng rối loạn thăng bằng acid-base được phân làm hai loại: nhiễm acid và nhiễm base. Trong đó nhiễm acid là tình trạng nồng độ ion H^+ tăng lên trong cơ thể dẫn đến giảm pH máu. Nhiễm base là tình trạng giảm nồng độ ion H^+ trong cơ thể hay huyết tương dẫn đến tăng pH huyết tương.

Nhiễm acid máu lại được phân làm nhiễm acid hô hấp và nhiễm acid chuyển hóa. Nhiễm kiềm cũng phân thành hai loại như vậy. Như vậy có bốn loại rối loạn chuyển hóa thăng bằng acid-base chính, ngoài ra rối loạn hỗn hợp cũng có thể xảy ra.



Hình 19.4. Rối loạn thăng bằng acid base.

Sự tăng pCO_2 hay giảm HCO_3^- dẫn đến nhiễm acid. Sự giảm pCO_2 hoặc tăng HCO_3^- dẫn đến nhiễm base. Nếu sự thay đổi pCO_2 là chủ yếu thì gọi là rối loạn hô hấp. Nếu sự thay đổi chủ yếu với bicarbonat gọi là rối loạn chuyển hóa.

2.1. Nhiễm acid hô hấp

Nhiễm acid hô hấp thường xảy ra ở người mắc các bệnh phổi mạn tính, giảm thông khí phổi do mọi nguyên nhân, ở mức độ trầm trọng sẽ dẫn đến rối loạn này. Các bệnh ở phổi như: bệnh gây cảm trở đường hô hấp mạn tính, bệnh hen có co thắt khí phế quản... Tất cả những bệnh này có thể gây giảm cung cấp oxy cho mô (giảm pO_2) và ứ đọng CO_2 làm tăng pCO_2 , pH huyết tương giảm và tăng nồng độ bicarbonat.

2.2. Nhiễm acid chuyển hóa

Nhiễm acid chuyển hóa xảy ra khi các sản phẩm acid không bay hơi tăng quá mức bình thường, hoặc quá trình chuyển hóa hay bài tiết của chúng giảm.

Một ví dụ điển hình về nhiễm acid chuyển hóa là bệnh đái tháo đường ở giai đoạn ketoacid, acetoacetat, hydroxybutyrate tăng trong huyết tương. Nhiễm acid sinh lý cũng có thể xảy ra khi gắng sức, trong điều kiện bình thường, acid lactic tăng lên nhanh chóng do sự chuyển hóa của cơ. Tuy nhiên nhiễm acid lactic có thể nguy hiểm đến tính mạng khi một lượng lớn lactate sinh ra như là hậu quả của sự thiếu oxy trong mô, ví dụ như trong shock.

Sự bài tiết acid hữu cơ bị suy giảm còn do suy giảm chức năng thận trong các bệnh thận, đây cũng là một nguyên nhân gây nhiễm acid chuyển hóa.

2.3. Nhiễm base hô hấp

Nhiễm base hô hấp thường rất hiếm và ý nghĩa lâm sàng không cao. Nhiễm base nhẹ xảy ra khi gắng sức, lo âu, stress hay sốt, hậu quả của tăng thông khí, hoặc trong thời kỳ mang thai.

2.4. Nhiễm base chuyển hóa

Nhiễm base chuyển hóa khi có sự sản xuất bicarbonat quá mức xảy ra. Hầu hết thường do giảm kali máu. Nhiễm base nặng có thể xảy ra như là hậu quả của mất ion H^+ từ dạ dày ra ngoài do nôn nhiều, hay hút rửa dạ dày, ví dụ rửa dạ dày sau mổ hoặc trong trường hợp truyền một lượng lớn bicarbonat tĩnh mạch cho bệnh nhân khi điều trị cấp cứu ngừng tim.

2.5. Rối loạn thăng bằng acid-base hỗn hợp

Rối loạn thăng bằng acid-base hỗn hợp thường dẫn đến thay đổi lớn hơn về pH máu so với rối loạn đơn. Các rối loạn hỗn hợp được tóm tắt ở bảng 19.3 dưới đây.

Bảng 19.3. Những biểu hiện về hóa sinh của rối loạn thăng bằng acid-base hỗn hợp

Nhiễm acid hô hấp và chuyển hóa			
Rối loạn	pH	pCO ₂	Bicarbonat
Nhiễm acid chuyển hóa	↓	↓	↓
Nhiễm acid hô hấp	↓	↑	↑
Nhiễm acid hỗn hợp chuyển hóa và hô hấp	↓↓	↑	Giảm không bù ↓

Nhiễm base hô hấp và chuyển hóa (hiếm)			
Rối loạn	pH	pCO ₂	Bicarbonat
Nhiễm base chuyển hóa	↑	↑	↑
Nhiễm base hô hấp	↑	↓	↓
Nhiễm base hỗn hợp chuyển hóa và hô hấp	↑↑	↓	↑

2.6. Những nguyên nhân rối loạn thăng bằng acid-base thường gặp trên lâm sàng

Bảng 19.4. Những nguyên nhân rối loạn thăng bằng acid-base thường gặp trên lâm sàng

Nhiễm acid chuyển hóa	Nhiễm acid hô hấp	Nhiễm kiềm chuyển hóa	Nhiễm kiềm hô hấp
<ul style="list-style-type: none"> - Đái đường - Nhiễm acid lactic - Tổn thương thận - Ả chày nặng - Rửa dạ dày ruột - Mất bicarbonat ở ống thận - Giảm đào thải H^+ ở ống thận 	<ul style="list-style-type: none"> - Bệnh đường hô hấp mạn tính - Hen nặng - Ngưng tim ức chế trung tâm hô hấp - Nhược cơ hô hấp - Biến dị lồng ngực - Dị vật hô hấp 	<ul style="list-style-type: none"> - Nôn - Bơm rửa dạ dày - Giảm kali huyết - Truyền tĩnh mạch bicarbonat 	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng thông khí - Các bệnh phổi liên quan đến tăng thông khí - Thiếu máu - Ngộ độc salicylat

3. PHÂN TÍCH KHÍ MÁU

Để đánh giá sự cân bằng acid-base, trên lâm sàng người ta có thể dùng những phương pháp khác nhau. Ngày nay, các thông số pH, pCO_2 , pO_2 , nồng độ bicarbonat và nồng độ ion H^+ trong máu thường được đo để đánh giá trạng thái thăng bằng acid-base của cơ thể.

Định lượng khí máu là một xét nghiệm quan trọng. CO_2 và O_2 được định lượng khi có nghi ngờ về giảm chức năng hô hấp hay tình trạng có thể liên quan đến rối loạn thăng bằng acid-base như trong trạng thái nhiễm cetonic trong bệnh đái tháo đường. Trong trường hợp giảm chức năng hô hấp kết quả định lượng khí máu có thể chỉ ra sự cần thiết phải thở oxy và nếu nặng hơn thì phải hỗ trợ hô hấp.

Để định lượng khí máu cần lấy máu động mạch, thường lấy máu ở động mạch quay (cẳng tay), đôi khi phải lấy máu ở động mạch đùi. Thông thường định lượng pCO_2 , pO_2 , pH, và nồng độ ion H^+ . Nồng độ bicarbonat được tính toán theo phương trình Henderson-Hasselbalch. Những thông số trên đưa ra một bức tranh toàn cảnh về tình trạng đậm trong máu. Máy phân tích acid-base được thiết kế để thực hiện và tính toán các thông số này một cách tự động. Các giá trị bình thường của pH, pCO_2 , pO_2 được trình bày ở bảng 19.5.

Bảng 19.5. Các giá trị khử máu và thăng bằng acid-base ở người bình thường

	Máu động mạch	Máu tĩnh mạch
Nồng độ H^+	36 – 43 mmol/L	35-45 mmol/L
pH	7,37-7,44	7,35- 7,45
pCO_2	4,6- 6,0 kPa	4,7- 6,7 kPa
pO_2	10,5 – 13,5 kPa	4,0 – 6,7 kPa
Bicarbonat	23 - 30 mmol/L	
Base đậm (BB)		

Giá trị bình thường của khí máu. pH, pCO₂, pO₂, bicarbonat là những thông số quan trọng. Giá trị pH nhỏ hơn 7,0 và lớn hơn 7,7 là tình trạng nguy kịch, có thể dẫn đến tử vong. Nồng độ bicarbonat được tính toán từ giá trị pH và pCO₂.

3.1. Nguyên tắc chung định lượng khí máu

Khí máu được định lượng bằng phương pháp đo điện thế (potentiometry): Dựa trên sự đo lường hiệu điện thế giữa hai điện cực nhúng trong một dung dịch ion.

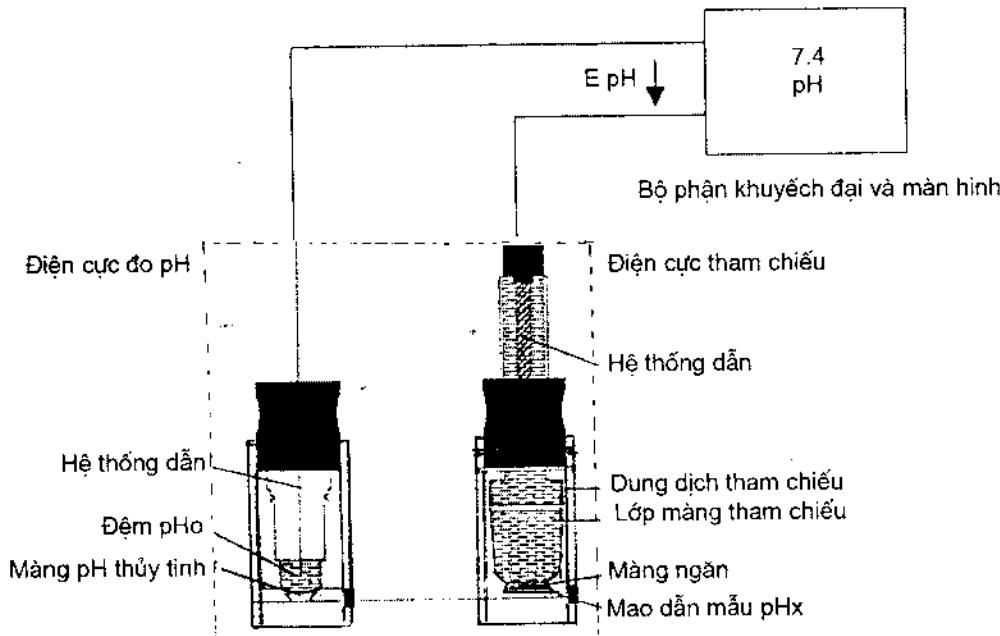
3.2. Nguyên tắc xác định pH

Sự xác định pH dựa trên hiện tượng khác nhau về điện thế xảy ra ở màng tạo bằng thuỷ tinh đặc biệt nhạy cảm với pH khi màng này tiếp xúc với hai dung dịch có pH khác nhau.

Sự khác nhau về điện thế tương ứng với sự khác nhau về pH của hai dung dịch.

$$E_{\text{pH}} = 61,5 \text{ mV} * (\text{pH}_x - \text{pH}_o) \text{ (ở } 37^{\circ}\text{C})$$

Dung dịch bên trong điện cực có pH_o với giá trị không đổi. Vì vậy hiệu điện thế E pH là tương ứng với giá trị pH của pH_x cần được xác định. Sơ đồ cấu tạo điện cực đo pH (Sơ đồ 19.5):



Hình 19.5. Sơ đồ cấu tạo điện cực

3.3. Nguyên tắc xác định pCO₂ (theo Sveringhaus)

Xác định pCO₂ được dựa trên nguyên tắc định lượng pH gián tiếp. Giá trị pH được xác định bằng dung dịch bicarbonat (pH_x), dung dịch này được tách từ mẫu và được xác định nhờ màng Teflon có thể thấm CO₂. Qua màng này, CO₂ khuyếch tán từ mẫu vào dung dịch bicarbonat cho đến khi đạt đến sự cân bằng giữa hai dung dịch. Kết quả là sự thay đổi pH ở dung dịch bicarbonat tương ứng trực tiếp với sự khuyếch tán CO₂ qua màng.

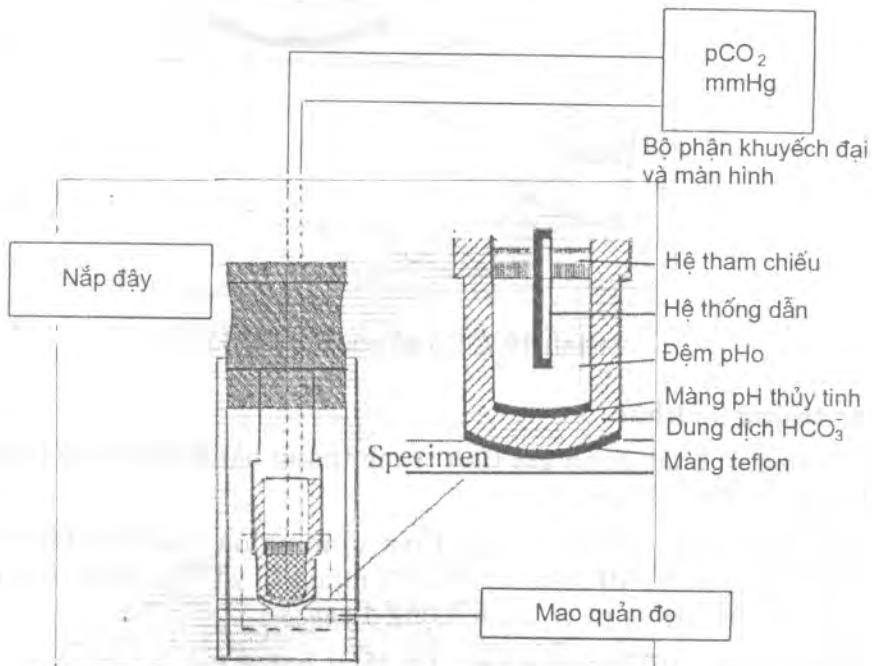
$$PH = 6,1 + \log \frac{HCO_3^-}{S \times pCO_2} \text{ phương trình Henderson Hasselbach}$$

HCO_3^- nồng độ bicarbonat tính theo mmol/L

pCO_2 carbon dioxide partial pressure theo mmHg

$S = 0.03 \text{ mmol/L} \times \text{mmHg}$

Sự thay đổi pH được xác định như là sự chênh lệch điện thế hai bên màng pH ngăn cách dung dịch bicarbonat và một dung dịch tham chiếu với pH định sẵn (pH_o). Hệ thống dẫn phụ tạo đường dẫn điện ra bên ngoài màng pH qua dung dịch dẫn bicarbonat. Dây dẫn điện bên trong điện cực tạo đường dẫn điện với phần trong màng pH qua dung dịch tham chiếu. Sự khác nhau về điện thế hình thành được truyền đến bộ phận khuyếch đại và màn hình. Sơ đồ cấu tạo điện cực đo pCO_2 (Sơ đồ 19.6).



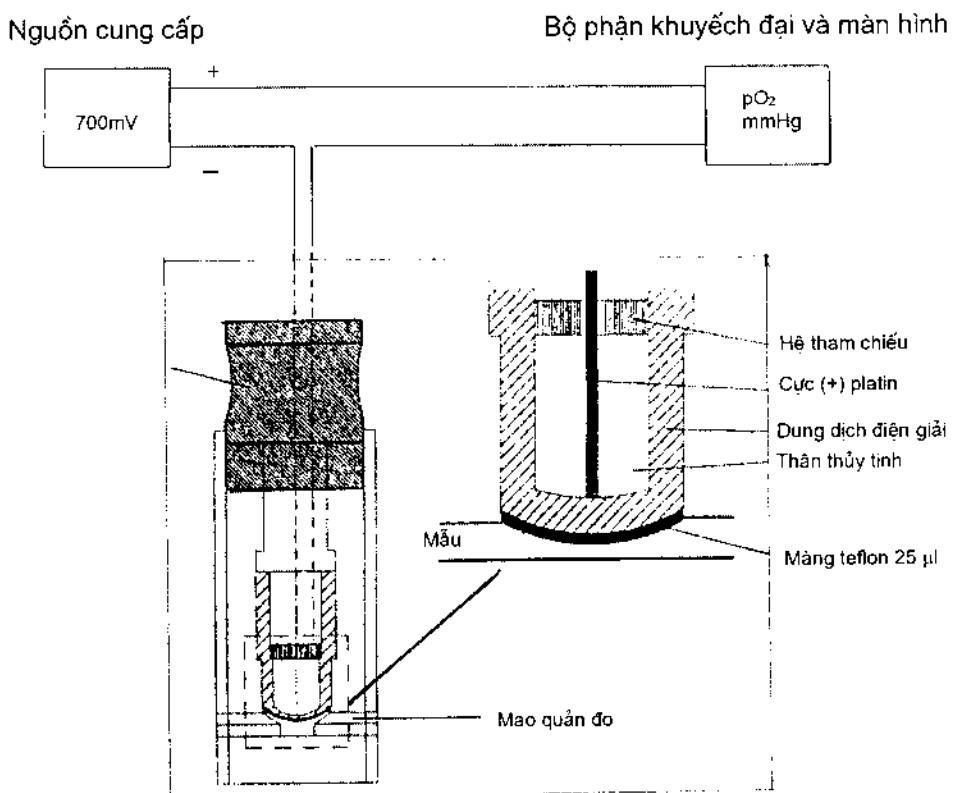
Hình 19.6. Sơ đồ cấu tạo điện cực đo pCO_2

3.4. Nguyên tắc định lượng pO_2 (theo Clack)

Sử dụng nguyên lý Polarography để xác định pO_2 . Dòng điện và điện áp đặc trưng được sử dụng trong phép đo. Các phân tử oxy có sẵn trong mẫu khuyếch tán qua màng điện cực Teflon và bị suy giảm điện hóa trên điện cực âm platin ở điện áp phân cực xác định không đổi là -800 mV.

Thông qua các điện tử phát ra từ điện cực âm đi đến điện cực dương (hệ tham chiếu), tạo nên dòng điện trong chất điện giải. Dòng điện sẽ được khuyếch đại và thể hiện trên máy đo.

Cường độ dòng điện sinh ra do sự thay đổi nồng độ sẽ tỷ lệ với số lượng các phân tử oxy khuyếch tán qua màng Teflon. Sơ đồ cấu tạo điện cực đo pO_2 (Sơ đồ 19.7)



Hình 19.7. Sơ đồ nguyên tắc đo pO_2

3.5. Các thông số khác

Các thông số khác đánh giá tình trạng thăng bằng acid-base được tính toán từ các thông số đo được ở trên:

- Kiểm dư (BE – Base excess): Được định nghĩa như lượng bicarbonat trên(+) và dưới(-) lượng BE bình thường (0 mmol/L) và phụ thuộc vào nồng độ Hb và giá trị của pH và pCO₂ định lượng được.
 - Kiểm đệm (BB-buffer base): Là tổng lượng các anion đệm của máu toàn phần (Hb, bicarbonat, protein, phosphat).
 - Dự trữ kiểm (RA-reserve alcalin): Là lượng bicarbonat có trong huyết tương để nhập trung hòa tức khắc các acid xâm vào máu, đây chính là lượng HCO₃⁻ trong máu. Bình thường 23-30 nmol/L.
 - Bicarbonat chuẩn (SB-standard bicarbonate) (HCO₃⁻ S): Nồng độ HCO₃⁻ chuẩn là thông số cho phần không thông khí của thăng bằng acid-base mà lại bị tác động của chức năng phổi. Bình thường từ 10 – 50 mmol/L.
 - Bicarbonat thực (AB-actual bicarbonate) (HCO₃⁻ A): Là thông số cho phần thăng bằng acid-base không do thông khí. Nồng độ HCO₃⁻ trong huyết tương ở pCO₂ 40mmHg, nhiệt độ 37°C, và Hb hoàn toàn bão hòa oxy.
 - O₂ SAT (Oxygen saturation of the Hemoglobin): Độ bão hòa oxy chỉ tỉ lệ phần trăm đã gắn của Hb với oxy. O₂ SAT phụ thuộc nồng độ Hb.

Chương 20

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN CỦA NƯỚC TIỂU BẰNG MÁY PHÂN TÍCH NƯỚC TIỂU TỰ ĐỘNG

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc hoạt động chung và sơ đồ khối của một máy phân tích nước tiểu tự động.
2. Trình bày được những ứng dụng của máy phân tích nước tiểu tự động.

Máy phân tích nước tiểu sử dụng que thử 10 thông số được sử dụng để xác định định tính tỷ trọng nước tiểu, pH, số bạch cầu, nitrit, protein, glucose, thể cетонic, urobilinogen, bilirubin và máu trong nước tiểu được dựa trên nguyên tắc quang kế khúc xạ (reflectance photometry). Máy phân tích nước tiểu tự động có nhiều loại khác nhau, ví dụ: các máy phân tích nước tiểu tự động Diditron®, Miditron® Junior, Dimitron® Junior II và Urilux®*.

1. NGUYÊN TẮC HOẠT ĐỘNG CỦA MÁY PHÂN TÍCH NƯỚC TIỂU TỰ ĐỘNG

1.1. Nguyên tắc hoạt động chung của máy phân tích nước tiểu tự động

Máy phân tích nước tiểu tự động là một máy quang kế khúc xạ được sử dụng để đo bán định lượng 10 thông số trong nước tiểu bằng cách sử dụng thanh nhúng nước tiểu. Các bóng đèn 2 cực (diode) phát ra ánh sáng được sử dụng như nguồn sáng và thời gian đo được tối ưu hóa để phản ứng hóa học và sự tạo màu xảy ra trong các vùng phản ứng của thuốc thử.

Đầu đo trong máy chứa 3 bóng đèn có các bước sóng khác nhau. Que thử được đặt ở một vị trí cố định và đầu đo di chuyển trên mỗi miếng dệm thuốc thử, bắt đầu từ vị trí “tham chiếu” - nơi hệ thống quang học bắt đầu hoạt động.

Trong quá trình đo, máy kiểm tra vị trí của thanh thử dưới đầu đo bằng cách thực hiện sự kiểm tra một cách chính xác dòng ánh sáng khúc xạ được đo. Nếu que nhúng được đặt thiếu chính xác dưới đầu đo, máy sẽ thông báo một tín hiệu “lỗi”.

1.2. Nguyên tắc phản ứng của từng xét nghiệm riêng biệt trên thanh thử

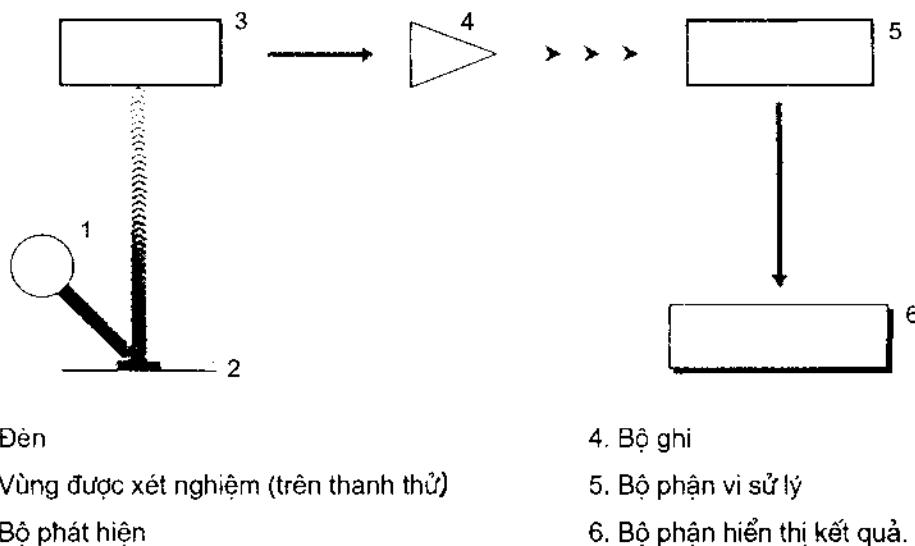
1. *Tỷ trọng nước tiểu:* Thủ nghiệm này phản ánh nồng độ ion trong nước tiểu và tương quan chặt với phương pháp đo khúc xạ. Với sự có mặt của các cation, các proton sẽ được giải phóng bởi một thuốc thử hỗn hợp, tạo nên sự thay đổi màu của chất chỉ thị bromthymol có màu xanh da trời sang màu xanh lá cây rồi sang màu vàng.

Sự có mặt của protein nồng độ từ 100 đến 500 mg/dL hoặc các cetoacid, tỷ trọng nước tiểu đọc được có xu hướng tăng. Sự tăng tỷ trọng do nồng độ glucose > 1000 mg/dL (>56 mmol/L) không được thể hiện ở thử nghiệm này.

2. *pH nước tiểu*: Giấy trên thanh thử chứa các chất chỉ thị: đỏ methyl, phenolphthalein và xanh bromthymol. Giá trị pH thường được thấy ở những người khỏe mạnh nằm trong khoảng giữa 5 và 6.
3. *Các bạch cầu (leukocytes)*: Xét nghiệm này thể hiện sự có mặt của các enzym esterase của các bạch cầu có hạt (granulocyte). Các enzym esterase có tác dụng thuỷ phân este của indoxylo và indoxylo được giải phóng sẽ phản ứng với muối diazonium để cho một sản phẩm màu tím. Phản ứng này không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các vi khuẩn, trichomonad hoặc hồng cầu có mặt trong nước tiểu. Formaldehyd (một chất làm ổn định) và các thuốc có imipenem, meropenem và acid clavulanic có thể gây phản ứng dương tính giả. Nếu bẩn thận nước tiểu có màu (ví dụ, do sự có mặt của bilirubin hoặc nitrofuratoин), phản ứng màu có thể bị tăng cường do sự thêm màu vào. Sự bài tiết protein trong nước tiểu vượt quá 500 mg/dL và glucose vượt quá 2 g/dL có thể làm giảm cường độ màu của phản ứng; cũng có thể gặp tình trạng này khi sử dụng cephalixin và gentamicin với các liều hàng ngày cao.
4. *Nitrit*: Xét nghiệm này dựa trên nguyên tắc của xét nghiệm của Griess đặc hiệu với nitrit. Phản ứng thể hiện sự có mặt của nitrit, vì vậy có thể phát hiện một cách gián tiếp các vi khuẩn tạo nên nitrit có trong nước tiểu bằng sự đổi màu từ hồng đến đỏ của thanh thử. Ngay cả một màu hồng nhạt cũng là một chỉ dẫn có ý nghĩa về sự có mặt của vi khuẩn trong nước tiểu.
5. *Protein*: Xét nghiệm này dựa trên nguyên tắc về sự thay đổi nồng độ protein phụ thuộc vào một chất chỉ thị về pH. Chất chỉ thị này đặc biệt nhạy với albumin, quinin, quinidin, chloroquin, tolbutamid và sự tăng pH (đến 9) không ảnh hưởng đến xét nghiệm này. Kết quả dương tính giả có thể thấy sau khi tiêm truyền polyvinylpyrrolidon (chất thay thế máu) hoặc khi lọ đựng nước tiểu có chứa chlorhexidin hoặc chứa các vết của các chất tẩy có các nhóm amoni bậc bốn.
6. *Glucose*: Sự xác định glucose trong nước tiểu được dựa trên phản ứng đặc hiệu glucoseoxidase/ peroxidase. Xét nghiệm này không bị ảnh hưởng bởi tỷ trọng, pH của nước tiểu và cũng không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của thể cетонic trong nước tiểu.Ảnh hưởng của acid ascorbic đã được loại trừ một cách hiệu quả nồng độ glucose 100 mg/dL hoặc cao hơn cũng không bị kết quả âm tính giả ngay cả ở những nồng độ acid ascorbic cao.
7. *Các thể cетонic*: Xét nghiệm này dựa trên nguyên tắc của phản ứng Legal và có độ nhạy với acetoacetic hơn là với aceton. Các chất phenylceton và phtalein tạo nên màu đỏ trên thanh thử, do đó chúng rất khác với màu tím tạo nên bởi các thể cетонic. và điều này có thể dẫn đến kết quả dương tính giả. Các chất captoril, mesna (muối natri của acid 2-mercaptopethanesulphonic) và các chất chứa các nhóm sulfhydryl có thể gây nên kết quả dương tính giả.

8. *Urobilinogen*: Xét nghiệm này dựa trên nguyên tắc là muối diazonium phản ứng tức thì với urobilinogen để tạo nên một chất azo có màu đỏ. Xét nghiệm này đặc hiệu đối với urobilinogen và không bị ảnh hưởng bởi những yếu tố gây nhiễu. Sẽ không có màu hoặc sẽ có màu nhạt hơn màu của nồng độ urobilinogen là 1mg/dL (17 µmol/L) thấy trong những mẫu bình thường.
9. *Bilirubin*: Nguyên tắc của xét nghiệm này dựa trên sự kết hợp của bilirubin với muối diazonium sẽ cho màu đỏ. Ngay cả nước tiểu cho phản ứng màu hồng nhạt nhất cũng là phản ứng dương tính, nghĩa là có tình trạng bệnh lý. Các thành phần khác của nước tiểu chỉ cho màu vàng với thuốc thử này.
10. *Hồng cầu*: Hemoglobin và myoglobin xúc tác cho sự oxy hoá chất chỉ thị là hydroperoxid hữu cơ chứa trong giấy của thanh thử. Các giá trị được in ra thể hiện số hồng cầu nguyên vẹn. Các giá trị trong khoảng 5-10 hồng cầu (RBCs=red blood cells)/ µL cũng được áp dụng cho số lượng hemoglobin được giải phóng từ 5-10 hồng cầu/ µL. Ở các nồng độ 5-10 hồng cầu/ µL và cao hơn, sự tan huyết nhiều có thể dẫn đến các giá trị cao hơn các nồng độ tương ứng của số lượng các hồng cầu nguyên vẹn. Acid ascorbic hầu như không ảnh hưởng đến xét nghiệm này.

2. SƠ ĐỒ KHỐI CỦA MÁY PHÂN TÍCH NƯỚC TIỂU TỰ ĐỘNG



3. CÁCH SỬ DỤNG

3.1. Cách vận hành máy

Trong bài viết này, chúng tôi giới thiệu tóm tắt các thao tác trong quá trình sử dụng máy phân tích nước tiểu tự động loại Miditron Junior, loại máy đang được sử dụng một cách phổ biến ở nước ta. Việc sử dụng máy này rất đơn giản. Để thực hiện việc đo các thông số nước tiểu theo kiểu bình thường (normal mode) theo chế độ tự động, tiến hành như sau:

3.1.1. Chuẩn máy

Bật công tắc, màn hình hiện chữ “ready < start>”, đèn báo hiện màu đỏ, ấn phím “calibrate”.

Màn hình hiện chữ “insert cal strip”, đèn báo hiện màu xanh lá cây, đưa thanh chuẩn vào máy.

Khi màn hình hiện chữ “press <calibr>”, đèn báo vẫn hiện màu xanh lá cây, lại ấn phím “calibrate”.

Khi màn hình hiện chữ “calibrating”, đèn báo hiện màu đỏ, chờ 1 phút, máy sẽ in kết quả chuẩn máy. Nếu quá trình chuẩn máy tốt, các giá trị của độ phản quang sẽ thể hiện bằng các giá trị %. Nếu quá trình chuẩn máy sai, màn hình sẽ hiện chữ “Cal. Err. **”, phải thực hiện lại quá trình chuẩn bằng một thanh chuẩn mới.

Sau khi máy được chuẩn, tiến hành đo mẫu nước tiểu bằng thanh thử.

3.1.2. Đo mẫu nước tiểu

Sử dụng nước tiểu tươi, không được ly tâm. Trộn kỹ mẫu nước tiểu. Không để mẫu nước tiểu đứng yên quá 2 giờ trước khi thử.

Có thể chọn một trong hai cách đo mẫu nước tiểu sau đây:

- **Cách đo bình thường** (normal mode): Cách này đo mỗi mẫu hết 36 giây, như vậy có thể đo 100 mẫu trong 1 giờ. Cách đo bình thường được tiến hành như sau:
 1. Màn hình hiện chữ “ready < start>” thể hiện máy đang ở chế độ đo bình thường, đèn báo hiện màu đỏ, ấn nút “start”, một tiếng “bíp” sẽ xuất hiện và màn hình hiện chữ “prepare strip”, lấy một thanh thử ra khỏi hộp.
 2. Sau khoảng 4 giây, một tiếng “bíp” thứ hai xuất hiện, màn hình hiện chữ ‘dip strip 1’, đèn báo hiện màu xanh lá cây nhấp nháy, nhúng sâu thanh thử vào mẫu nước tiểu số 1 một cách nhanh chóng (tối đa 1 giây). Khi rút thanh thử, chú ý gọt nước tiểu thừa bám vào mép bên thanh thử.
 3. Khi màn hình hiện chữ “insert strip 1”, đèn báo hiện màu xanh lá cây, đặt thanh thử 1 vào máy.
 4. Sau khoảng 20 giây, thanh thử 1 được máy chuyển vào vị trí đo và màn hình hiện chữ “please wait”, đèn báo hiện màu đỏ, đầu đo di chuyển qua và kiểm tra thanh thử nếu thanh thử nằm đúng vị trí đo. Sau đó màn hình hiện chữ “dip strip 2”, tiếp tục lặp lại quá trình này để đo thanh thử với mẫu nước tiểu thứ hai, rồi với các mẫu nước tiểu tiếp theo.
 5. Thanh thử thứ nhất được đo trong khoảng 60 giây sau khi được nhúng vào nước tiểu. Khi việc đo mỗi thanh thử được hoàn thành, các kết quả sẽ được tự động in ra. Máy sẽ tự động kiểm tra sự có mặt của thanh thử ở vị trí đo, nếu không có thanh thử, máy sẽ tự động trở lại vị trí ban đầu với sự hiện chữ “ready <start>” trên màn hình.

- *Cách đo nhanh:* Việc đo nhanh được thực hiện nhanh khi số lượng mẫu đo không nhiều. Mỗi mẫu đo nhanh mất 12 giây, như vậy có thể đo 300 mẫu trong 1 giờ. Máy ở *cách đo bình thường* khi chữ “ready <start>” xuất hiện. Ấn phím “set” để vào *cách đo nhanh*, màn hình sẽ chuyển sang chữ “fast mode <start>”. Sau đó tiến hành đo như sau:

1. Ấn nút <start>, một tiếng “bíp” xuất hiện và màn hình hiện chữ “prepare strip”. Lấy một thanh thử ra khỏi hộp.
2. Sau khoảng 4 giây, một tiếng “bíp” thứ hai xuất hiện, màn hình xuất hiện chữ “dip strip 1” và đèn xanh lá cây nhấp nháy. Nhúng thanh thử số 1 vào mẫu nước tiểu rồi rút nhanh ra, không để dính thừa nước tiểu.
3. Khi chữ “insert strip 1” xuất hiện, cài thanh thử số 1 vào vị trí chờ của máy, đèn xanh vẫn sáng.
4. Sau 12 giây, một tiếng “bíp” sẽ xuất hiện, màn hình xuất hiện chữ “dip strip 2” và đèn xanh nhấp nháy. Nhúng thanh thử thứ 2 vào mẫu nước tiểu tương ứng và quá trình được thực hiện như ở trên. Thanh thử 1 sau đó được máy chuyển từ vị trí chờ vào vị trí đo. Khi chữ “insert strip 2” xuất hiện, cài thanh thử số 2 đã nhúng nước tiểu vào khay bất kỳ lúc nào khi đèn xanh đang sáng.
5. Màn hình hiện chữ “please wait” và đèn bật đỏ. Sau 12 giây, máy sẽ kêu “bíp” và chữ “dip strip 3” xuất hiện. Nhúng thanh thử thứ 3 vào mẫu nước tiểu thứ ba rồi lại tiếp tục tiến hành như trên với các thanh khác.
6. Sau khi đã nhúng thanh thử thứ 6 vào nước tiểu và đặt vào vị trí chờ đo, thanh thử 2 sẽ được chuyển từ vị trí chờ đo vào vị trí đo và được đo. Chữ “dip strip 7” lại xuất hiện và đèn xanh lại nhấp nháy.
7. Sau khoảng 4 giây, chữ “insert strip 3” xuất hiện, cài thanh thử thứ 3 vào khay của máy khi đèn xanh sáng.
8. Sau đó cứ theo các mệnh lệnh trên màn hình và tiếng “bíp” để nhúng một thanh thử mới và cài vào khay khi đèn xanh bật sáng.
9. Sau khi các mẫu nước tiểu được đo, các số liệu sẽ được tự động in ra. Việc in có thể được dừng lại bằng cách bấm vào nút <start> hoặc được tiếp tục bằng cách ấn vào nút <reprint/ send>, hoặc lại ấn nút <start> để ra khỏi chương trình in.
10. Khi không còn thanh thử nào được đo nữa, cách đo nhanh sẽ bị đứt quãng với sự xuất hiện dòng chữ <empty waste tray>. Muốn đo thêm nữa, phải lập lại quá trình nêu trên.

3.2. Đánh giá kết quả

Sau khi thanh thử được tiếp nhận bởi máy phân tích nước tiểu, nó sẽ được đọc bởi tia sáng khúc xạ. Các kết quả sẽ được in trên giấy dưới dạng báo cáo với các thuật ngữ “neg.” (âm tính), “pos.” (dương tính) hoặc giá trị nồng độ. Căn cứ vào giá trị của các kết quả của các thông số được ghi trên băng giấy, có thể biết được tình trạng bình thường hoặc bệnh lý của mẫu nước tiểu được phân tích.

Chú ý: Trong trường hợp không có máy phân tích nước tiểu, cũng có thể xác định các kết quả trên thanh thử sau khi nhúng thanh thử vào nước tiểu cần phân tích bằng mắt thường, mỗi giá trị được thể hiện tương ứng với giới hạn nồng độ xác

định. Tuy nhiên, khi một kết quả có sự khác nhau về độ nhạy của mắt và của hệ thống quang học của máy thì sẽ không có sự giống nhau giữa kết quả đọc bằng mắt và kết quả đọc bằng máy phân tích nước tiểu.

Do sự hiểu biết về ảnh hưởng của một số thuốc hoặc chất chuyển hóa của chúng trên các xét nghiệm còn chưa được sáng tỏ hoàn toàn, cho nên, trong trường hợp ngờ, cần phải lặp lại xét nghiệm sau khi ngừng sử dụng các thuốc đó một thời gian. Ví dụ, một lượng lớn acid ascorbic được đào thải theo nước tiểu có thể gây nên sự giảm một cách giả tạo hoặc dẫn đến các kết quả âm tính giả đối với nitrit và bilirubin. Một số thuốc có thể biến thành màu đỏ trong môi trường acid (ví dụ, phenopyryridine), điều này có thể dẫn đến kết quả dương tính giả hoặc làm biến đổi màu đỏ trên thanh thử đối với nitrit, protein, urobilinogen và bilirubin.

Chỉ sử dụng các lọ được rửa kỹ, bảo đảm sạch để đựng nước tiểu làm xét nghiệm. Việc đọc các kết quả dương tính giả đối với các xét nghiệm máu và glucose nước tiểu có thể là do các chất tẩy có trong lọ lấy nước tiểu.

Không được thêm các chất bảo quản vào nước tiểu.

Không được để các mẫu nước tiểu tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời bởi vì ánh sáng sẽ oxy hóa bilirubin và urobilinogen, vì vậy dẫn đến các kết quả thấp một cách giả tạo đối với hai thông số này.

4. ỨNG DỤNG CỦA MÁY PHÂN TÍCH NƯỚC TIỂU TỰ ĐỘNG

Thanh thử nước tiểu sử dụng trong máy phân tích nước tiểu tự động được cấu tạo đơn giản, dễ sử dụng, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Thanh thử nước tiểu là một thanh thử nhiều thông số, được sử dụng để xác định 10 thông số, bao gồm: tỷ trọng, pH, bạch cầu, nitrit, protein, glucose, thể cетонic, urobilinogen, bilirubin và máu trong nước tiểu.

Lợi ích của nó là cho phép phát hiện những thay đổi bệnh lý trong nước tiểu một cách nhanh chóng, chính xác và đáng tin cậy.

GIÁ TRỊ CÁC THÔNG SỐ HÓA SINH CỦA NGƯỜI BÌNH THƯỜNG

Số TT	Tên thông số	Chất liệu mẫu	Giá trị ở người Việt Nam [2]	Giá trị ở người Hoa Kỳ [4]
1	Acid Lactic	Huyết thanh	$1,75 \pm 0,32$ mmol/L	
2	Acid phosphatase (ACP)	Huyết thanh		Nam: 2,5-11,7 U/L Nữ: 0,3-9,2 U/L
3	Acid uric	Huyết thanh	Nam: $293,05 \pm 53,00$ Nữ: $197,00 \pm 42,50$	Nam: 208-428 μ mol/L Nữ: 155-357 μ mol/L
4	Alanin aminotransferase (ALT)	Huyết thanh	$11,24 \pm 4,20$ U/L (đo ở 25°C)	6-37 U/L
5	Albumin	Huyết thanh	Nam: $56,67 \pm 5,28$ g/L Nữ: $53,72 \pm 4,26$ g/L	35-55g/L
6	Alkaline phosphatase (ALP)	Huyết thanh		30-90 U/L
7	Amoniac	Huyết thanh		17,6-41 μ mol/L
8	α -Amylase	Huyết thanh Nước tiểu		95-290 U/L 35-400 U/giờ
9	α -Hydroxybutyric acid dehydrogenase (α -HBDH)	Huyết thanh		72-182 U/L
10	Amoniac	Huyết tương		11-35 mmol/L
11	Anion gap (khoảng trống anion)	Tính toán		10-20 mmol/L
12	Aspartat aminotransferase (AST)	Huyết thanh	$25,10 \pm 8,50$ U/L	5-30 U/L
13	Bilirubin toàn phần liên hợp	Huyết thanh		3-17 μ mol/L 0- 3 μ mol/L
14	Calci (Ca^{2+}) (tổn phần)	Huyết thanh	$2,10 \pm 0,11$ mmol/L	2,15-2,65 mmol/L
15	Calci ion hoá	Huyết thanh		1,16-1,32 mmol/L
16	CHE	Huyết thanh	8359 ± 2538 U/L	Nam: 4600 - 11500 U/L Nữ: 3900-1080 U/L
17	Cholesterol (tổn phần) Cholesterol ester/ toàn phần	Huyết thanh	$4,37 \pm 0,41$ mmol/L	3,6-5,2 mmol/L 65-75%
18	CK-MB	Huyết thanh		Nam: < 20 U/L Nữ: < 15 U/L
19	Clor (Cl)	Huyết thanh Nước tiểu (24h)	$111,13 \pm 2,07$ mmol/L	98-107 mmol/L 110-250 mmol/L

Tiếp bảng giá trị các thông số hoá sinh của người bình thường

20	CO ₂ (tổn phần)	Huyết thanh		22-29 mmol/L
21	Cortisol	Huyết tương	315,51 ± 112,20 nmol/L Sáng: 318,56 ± 110,56 Tối: 197,41 ± 72,73	Sáng: 221-552 nmol/L Tối: < 138 nmol/L
22	Creatin kinase (CK)	Huyết thanh	26,73 ± 66,33 U/L	Nam: 15-160 U/L Nữ: 15-130 U/L
23	Creatinin	Huyết thanh	Nam: 83,33 ± 20,50 Nữ: 64,95 ± 19,80	Nam: 53-106 µmol/L Nữ: 44-97 µmol/L
24	Điện di protein huyết thanh:	Huyết thanh		
	Albumin		56,3 ± 3,52%	53 - 65%
	Globulin α1		2,5 ± 0,52%	2,5 - 5%
	Globulin α2		8,83 ± 1,34%	7 - 13%
	Globulin β		11,6 ± 1,22%	8 - 14%
	Globulin γ		20,6 ± 2,82%	12 - 22%
	Tỷ lệ A/G		1,31 ± 0,99	1,50 - 2,50
25	Độ thanh thải creatinin	Nước tiểu	Nam: 119 ± 23,70 Nữ: 1144 ± 21,6	Nam: 97-137 mL/phút Nữ: 88-128 mL/phút
26	Độ thẩm thấu (Osmolality)	Huyết thanh Nước tiểu (24 giờ)		275-295 mOsmol/kg 300-900 mOsmol/kg
27	Fructosamin	Huyết thanh	227 ± 29 µmol/L	
28	Gamma-glutamyl transferase (GGT)	Huyết thanh	20,2 ± 1,7 U/L	Nam: 6-45 U/L Nữ: 5-30 U/L
29	Globulin	Huyết thanh	33,45 ± 3,55 g/L	12-30 g/L
30	Các globbulin miễn dịch:	Huyết thanh		
	IgG		13,68 ± 0,93 g/L	8-12 g/L
	IgA		3,26 ± 0,11 g/L	0,7-3,12 g/L
	IgM		0,93 ± 0,17 g/L	0,5-2,8 g/L
	IgD		-	0,005-0,2 g/L
	IgE		0,44 ± 0,17 mg/L	0,1-0,6 mg/L
31	Glucose (khi đói)	Huyết tương Dịch não tuỷ	4,95 ± 0,63 mmol/L	3,9-6,0 mmol/L 2,2-3,9 mmol/L
32	Glutamat dehydrogenase (GLDH)	Huyết thanh		Nam: < 7,0 U/L Nữ: < 5,0 U/L

Tiếp bảng giá trị các thông số hoá sinh của người bình thường

33	HDL-C	Huyết thanh	<45 tuổi: $1,32 \pm 0,26$ >45 tuổi: $1,35 \pm 0,27$	Nam: 0,75-1,6 mmol/L Nữ: 1,0-1,94 mmol/L
34	Hemoglobin glycosyl hoá (hầu hết là HbA _{1C})	Máu toàn phần	$5,3 \pm 0,36$ %	4,5-8,0 %
35	Isoenzym của LDH	Huyết thanh		
	LDH-1			14-26%
	LDH-2			29-39%
	LDH-3			20-26%
	LDH-4			8-16%
	LDH-5			6-16%
36	Kali (K ⁺)	Huyết thanh	$4,46 \pm 0,44$ mmol/L	3,4-5 mmol/L Mới sinh: 3,7-5,9 mmol/L
37	Khí máu và thăng bằng acid-base:	Máu toàn phần (động mạch)		
	pH		$7,39 \pm 0,01$	7,38-7,42
	pCO ₂		$42,30 \pm 2,41$ mmHg	35-45 mmHg
	HCO ³⁻		$25,20 \pm 1,03$ mmol/L	22-26 mmol/L
	pO ₂		$102,10 \pm 4,21$ mmHg	80-90 mmHg
	SaO ₂		$97,71 \pm 2,03$ %	96-97%
	BE		-	0 ± 2 mmol/L
38	Lactat dehydrogenase (LDH)	Huyết thanh	$117,12 \pm 26,25$ U/L	Nam: 135-225 U/L Nữ: 135-215 U/L
39	LDL-C	Huyết thanh	<45 tuổi: $2,40 \pm 0,53$ >45 tuổi: $2,80 \pm 0,69$	1,49-3,40 mmol/L
40	Lipase	Huyết thanh		7-59 U/L
41	Magnesi (Mg ²⁺)	Huyết thanh Nước tiểu		0,63-1,0 mmol/L 3,00-5,00 mmol/ 24 giờ
42	Natri (Na ⁺)	Huyết thanh Nước tiểu	$142,30 \pm 6,26$ mmol/L	135-145 mmol/L 40-220 mmol/ L
43	Nitơ ure máu (blood urea nitrogen: BUN)	Huyết thanh		2,5-6,4 mmol/L ure
44	Phosphat	Huyết thanh		0,87-1,45 mmol/L
45	Protein (tổn phần)	Huyết thanh	Nam: $73,10 \pm 6,06$ g/L Nữ: $74,33 \pm 4,82$ g/L	65-83 g/L

Tiếp bảng giá trị các thông số hoá sinh của người bình thường

46	Sắt	Huyết thanh	Nam: $13,63 \pm 4,57 \mu\text{mol/L}$ Nữ: $14,85 \pm 5,15$	Nam: $11,6-30,4 \mu\text{mol/L}$ Nữ: $8,9-30,4 \mu\text{mol/L}$
47	T_3	Huyết thanh	Nam $1,97 \pm 0,45 \text{ nmol/L}$ Nữ: $2,10 \pm 0,42$	$1,3-3,1 \text{ nmol/L}$
48	T_3 tự do	Huyết thanh	Nam: $4,93 \pm 0,87 \text{ pmol/L}$ Nữ: $4,90 \pm 0,96$	$1,4-4,4 \text{ pg/mL}$
49	T_4 tự do	Huyết thanh	Nam: $16,91 \pm 3,95 \text{ pmol/L}$ Nữ: $16,50 \pm 3,75$	$0,8-2,0 \text{ ng/dL}$
50	Testosteron	Huyết thanh		Nam: $5,2-22,9 \text{ nmol/L}$ Nữ: $< 2,1 \text{ nmol/L}$
51	Thyroxin (T_4)	Huyết thanh	Nam: $100,04 \pm 19,32$ Nữ: $105,27 \pm 24,32$	$58-167 \text{ nmol/L}$
52	Transferrin	Huyết thanh		$25-50 \mu\text{mol/L}$
53	Triglycerid	Huyết thanh	<40 tuổi: $1,20 \pm 0,48$ >40 tuổi: $1,53 \pm 0,70$	$0,11-2,15 \text{ mmol/L}$
54	Troponin T	Huyết thanh		$< 0,1 \mu\text{g/L}$
55	TSH	Huyết thanh	$1,81 \pm 0,93 \text{ mU/L}$	$0,5-5,0 \text{ mU/L}$
56	Ure	Huyết thanh	$4,8 \pm 0,5 \text{ mmol/L}$	$< 8,3 \text{ mmol/L}$

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đức Trình, Nguyễn Hồng Quế, Hoàng Bích Ngọc: *Thực tập Hoá Sinh*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội 1995.
2. Lê Ngọc Trọng, Lê Nam Trà, Nguyễn Văn Tường: *Các giá trị sinh học người Việt Nam thập kỷ 1990 - 2000*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội 2003.
3. Anderson SC and Cockayne S: *Clinical Chemistry-concepts and applications*. W B Saunder company, Philadelphia - London - Toronto - Montreal - Sydney-Tokyo, 1993.
4. Michael LB, Janet LDE and Edward PF: *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia - Baltimore - New York - Buenos Aires - Hong Kong - Sydney - Tokyo, 2000.
5. Richard R: Clinical laboratory medicine: *Clinical application of laboratory data. Sixth edition*. Mosby. St. Louis - Baltimore - Berlin - Boston - Carbad - Chicago - London- Madrid- Naples - New York - Philadelphia - Sydney- Tokyo -Toronto, 1995.
6. Williams JM: *Clinical chemistry*. Third edition. Mosby. London, 1997.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

THỰC TẬP HOÁ SINH

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

Biên tập: DS. LÊ MINH NGUYỆT

Sửa bản in: LÊ MINH NGUYỆT

Trình bày bìa: CHU HÙNG

In 1.000 cuốn, khổ 19x27cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.

Giấy phép xuất bản số: 96-1522/XB-QLXB ngày 20/12/2002.

In xong và nộp lưu chiểu quý IV năm 2003.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

Địa chỉ: 352 Đội Cấn - Ba Đình - Hà Nội
Điện thoại: 04.7625934 - 7627819 - Fax: 84.4.7625923
E-mail: xuatbanyhoc@netnam.vn

MS 61 - 619.7
YH - 2003



GIÁ: 28.000Đ

017 152