

# PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG THÀNH PHẦN AXÍT URIC TRONG SỎI NIỆU BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ FT-RAMAN

Huỳnh Thành Đạt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 01 tháng 8 năm 2003)

**TÓM TẮT:** Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu phương pháp phân tích định lượng thành phần axít uric trong sỏi niệu người bằng quang phổ FT-Raman. Trong phương pháp này, chúng tôi sử dụng sunfat kali ( $K_2SO_4$ ) và nitrat kali ( $KNO_3$ ) như các chất chuẩn nội được đưa vào vào mẫu với lượng thích hợp. Công việc tạo mẫu trong phương pháp này đơn giản hơn nhiều so với phương pháp hấp thu hồng ngoại IR. Mẫu chỉ cần nghiền và trộn, không đòi hỏi tạo viên nén. Các kết quả phân tích được so sánh với kết quả theo phương pháp hấp thu hồng ngoại.

## I. GIỚI THIỆU

### I.1. Chất chuẩn nội

Chất chuẩn nội sử dụng cho phương pháp phân tích định lượng bằng quang phổ Raman chuẩn nội phải trợ với chất khảo sát và có tín hiệu Raman mạnh và có đỉnh phổ (được chọn làm đỉnh chuẩn nội) nằm tách biệt với các đỉnh phổ của chất khảo sát. Từ các tài liệu tham khảo [3,4,6],  $K_2SO_4$  và  $KNO_3$  đã được chọn để làm chất chuẩn nội trong công trình này.

#### I.1.1. Chất chuẩn nội $K_2SO_4$

Như đã biết, ion sulfat  $SO_4^{2-}$  trong  $K_2SO_4$  có cấu trúc tứ diện  $AB_4$ , thuộc nhóm đối xứng điểm  $T_d$  [1]. Theo tính toán bằng lý thuyết nhóm, nó có 9 dao động chuẩn tắc ( $3 \times 5 - 6 = 9$ ), được biểu diễn như sau:

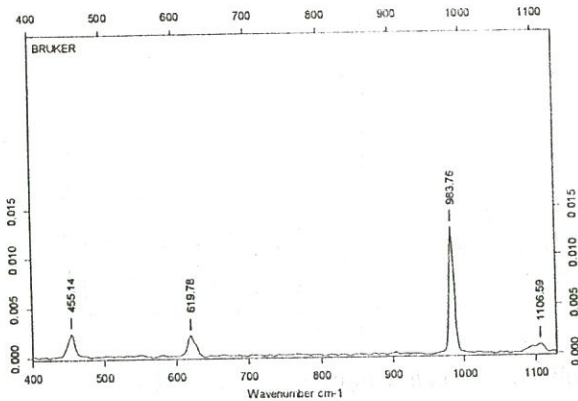
$$\Gamma_{\text{vib}}(T_d) = 1A_1(R) + 1E(R) + 2F_2(IR, R)$$

Như vậy, tất cả 9 dao động chuẩn tắc này đều hoạt động Raman, 4 đỉnh phổ ( $1A_1 + 1E + 2F_2$ ) tương ứng với 4 tần số cơ bản sẽ xuất hiện trong phổ Raman:  $\nu_1$  do dao động hoá trị  $\nu_s(S-O)$  có đối xứng  $A_1$ ;  $\nu_2$  do dao động biến dạng  $\delta_d(O-S-O)$  có đối xứng suy biến bậc hai E;  $\nu_3$  do dao động hoá trị  $\nu_d(S-O)$  có đối xứng suy biến bậc ba  $F_2$ ;  $\nu_4$  do dao biến dạng  $\delta_d(O-S-O)$  có đối xứng suy biến bậc ba  $F_2$ . Như vậy, phân tử  $K_2SO_4$  có 9 dao động chuẩn tắc với 4 tần số cơ bản  $\nu_1, \nu_2, \nu_3$  và  $\nu_4$  xuất hiện trong phổ Raman. Hình 1 là phổ Raman của  $K_2SO_4$  trong vùng phổ  $400 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  và bảng 1 trình bày các đỉnh phổ thực nghiệm. Rõ ràng là tính toán của chúng tôi phù hợp với thực nghiệm.

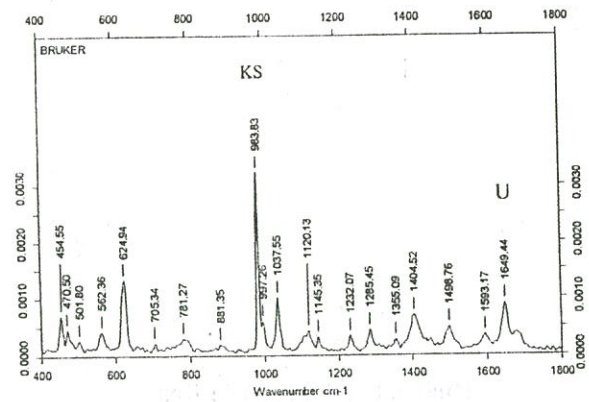
**Bảng 1.** Các kết quả phổ Raman thực nghiệm của  $K_2SO_4$

Ký hiệu	Số sóng ( $\text{cm}^{-1}$ )	Cường độ Raman	Loại đối xứng	Mô tả dao động
$\nu_1$	984	Rất mạnh	$A_1$	$\nu_s$ S-O
$\nu_2$	455	Yếu	E	$\delta_d$ O-S-O
$\nu_3$	1107	Yếu	$F_2$	$\nu_d$ S-O
$\nu_4$	620	Yếu	$F_2$	$\delta_d$ O-S-O

Ghi chú :  $\nu_s$  dao động hoá trị đối xứng;  $\delta_d$  dao động biến dạng suy biến;  $\nu_d$  dao động hóa trị suy biến



Hình 1. Phổ Raman của K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Hình 2. Phổ Raman của hỗn hợp axit uric và K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Từ bảng 1 có thể thấy đỉnh  $\nu_1(A_1)$  với số sóng  $984\text{ cm}^{-1}$  là do dao động hóa trị đối xứng của liên kết S-O có cường độ rất mạnh, nằm khá tách biệt so với các đỉnh phổ của axit uric.

Mặt khác, có thể thấy phổ của hỗn hợp axit uric và K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (hình 2) không có xuất hiện các đỉnh phổ lạ, do đó có thể khẳng định giữa chất khảo sát (axit uric) và K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> không xảy ra phản ứng. Vì thế, có thể sử dụng K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dùng làm *chất chuẩn nội* với đỉnh phổ so sánh là  $984\text{ cm}^{-1}$  (ký hiệu là KS).

### 1.1.2. Chất chuẩn nội KNO<sub>3</sub>

Ion NO<sub>3</sub><sup>-</sup> trong KNO<sub>3</sub> có cấu trúc phẳng AB<sub>3</sub>, thuộc nhóm đối xứng điểm D<sub>3h</sub> [2]. Cũng theo tính toán lý thuyết nhóm, ion này có 6 dao động chuẩn tắc ( $3 \times 4 - 6 = 6$ ) được biểu diễn như sau:

$$\Gamma_{\text{vib}}(D_{3h}) = 1A'_1(R) + 1A''_2(IR) + 2E'(R, IR)$$

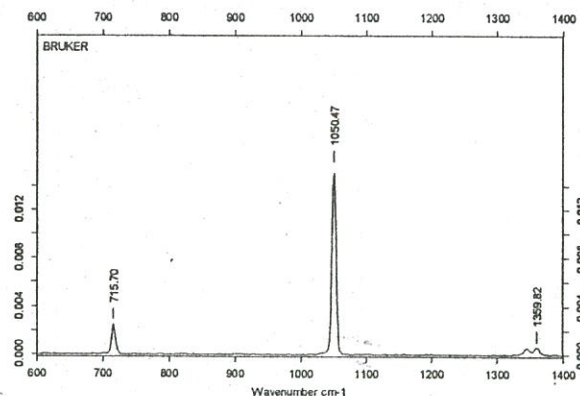
Từ biểu diễn trên có thể thấy rằng, 6 dao động chuẩn tắc chỉ có 5 là hoạt động Raman, 3 đỉnh phổ ( $1A'_1 + 2E'$ ) tương ứng với 3 tần số cơ bản sẽ xuất hiện trong phổ Raman:  $\nu_1$  là do dao động hóa trị  $\nu_s(N-O)$  có đối xứng A'<sub>1</sub>;  $\nu_3$  là do dao động hóa trị  $\nu_d(N-O)$  có đối xứng suy biến bậc hai E';  $\nu_2$  là do dao động biến dạng  $\gamma(NO_3)$  có đối xứng A''<sub>2</sub> không hoạt động Raman mà chỉ hoạt động IR có tần số trong khoảng  $830\text{ cm}^{-1}$ . Hình 3 là phổ Raman của KNO<sub>3</sub> trong vùng phổ  $400 - 1200\text{ cm}^{-1}$  và bảng 2 trình bày các đỉnh phổ thực nghiệm. Rõ ràng là tính toán của chúng tôi cũng phù hợp với thực nghiệm.

Bảng 2. Các kết quả phổ Raman thực nghiệm của KNO<sub>3</sub>

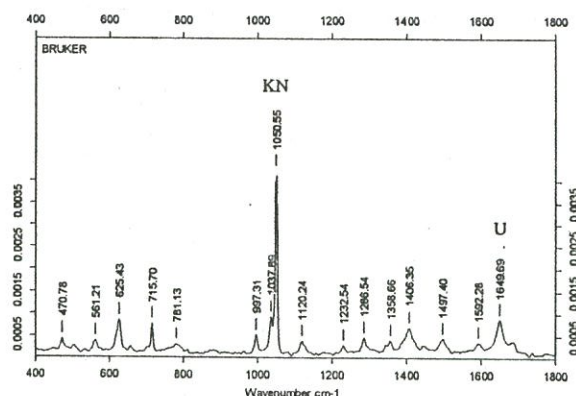
Ký hiệu	Số sóng	Cường độ	Loại đối xứng	Mô tả dao động
$\nu_1$	1.050	Rất mạnh	A' <sub>1</sub>	$\nu_s$ N-O
$\nu_2$	-	-	A'' <sub>2</sub>	$\gamma$ NO <sub>3</sub>
$\nu_3$	1.360	Yếu	E'	$\nu_d$ N-O
$\nu_4$	716	Yếu	E'	$\delta_d$ O-N-O

Tương tự như trên, từ bảng 2 có thể thấy đỉnh  $\nu_1(A'_1)$  với số sóng  $1.050\text{ cm}^{-1}$  là do dao động hóa trị  $\nu_s(N-O)$  có cường độ rất mạnh, nằm khá tách biệt so với các đỉnh phổ của axit uric.





Hình 3. Phổ Raman của KNO<sub>3</sub>



Hình 4. Phổ của hỗn hợp axit uric và KNO<sub>3</sub>

Mặt khác, có thể thấy phổ của hỗn hợp axit uric và KNO<sub>3</sub> (hình 4) không có xuất hiện các đỉnh phổ lạ, do đó có thể khẳng định giữa chất khảo sát (axit uric) và KNO<sub>3</sub> không xảy ra phản ứng. Vì thế, cũng có thể sử dụng KNO<sub>3</sub> dùng làm *chất chuẩn nội* như K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, với đỉnh phổ so sánh là 1.050 cm<sup>-1</sup> được ký hiệu là KN.

## II. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

### II. 1. Phân tích định lượng với chất chuẩn nội K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### II.1.1. Lập đường chuẩn

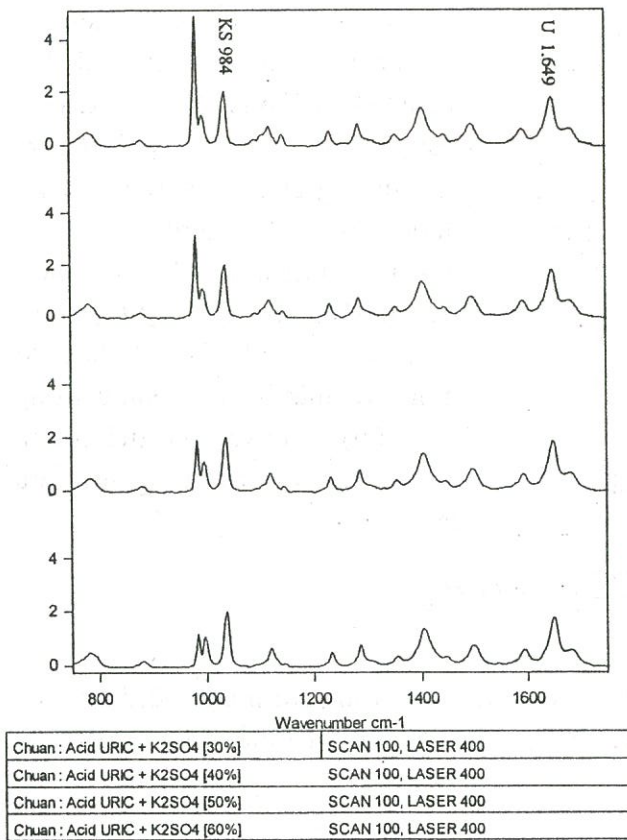
Để phân tích định lượng thành phần axit uric trong sỏi niệu, trước tiên chúng tôi xây dựng đường chuẩn: tỷ lệ diện tích của đỉnh 1.649 cm<sup>-1</sup> (ký hiệu là U) của uric trên diện tích đỉnh KS có số sóng 984 cm<sup>-1</sup> của K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> theo hàm lượng phần trăm axit uric. Lý do chọn đỉnh U làm đỉnh để tính toán bởi lẽ đỉnh này là đỉnh của dao động hoá trị nhóm carbonyl C=O đặc trưng cho thành phần axit uric đang khảo sát. Các thành phần còn lại không tồn tại thành phần nào có nhóm này [5].

Hàm lượng lượng của axit uric trong hỗn hợp axit uric + K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> được chọn ở 4 giá trị: 30, 40, 50, 60%. Tỷ lệ này được chọn trên cơ sở ước lượng hàm lượng của axit uric trong sỏi niệu người theo các kết quả của các tác giả Nguyễn Quang Quyền, Lê Văn Cường [5]. Việc tính diện tích các đỉnh phổ cho 4 phổ ở 4 nồng độ như nói trên được thực hiện theo phương thức "B". Hình 5 là trình bày 4 phổ ứng với 4 hàm lượng axit uric trong hỗn hợp axit uric + K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> với chế độ ghi phổ: cường độ laser 400mW, độ phân giải 4 cm<sup>-1</sup>, số lần quét là 100.

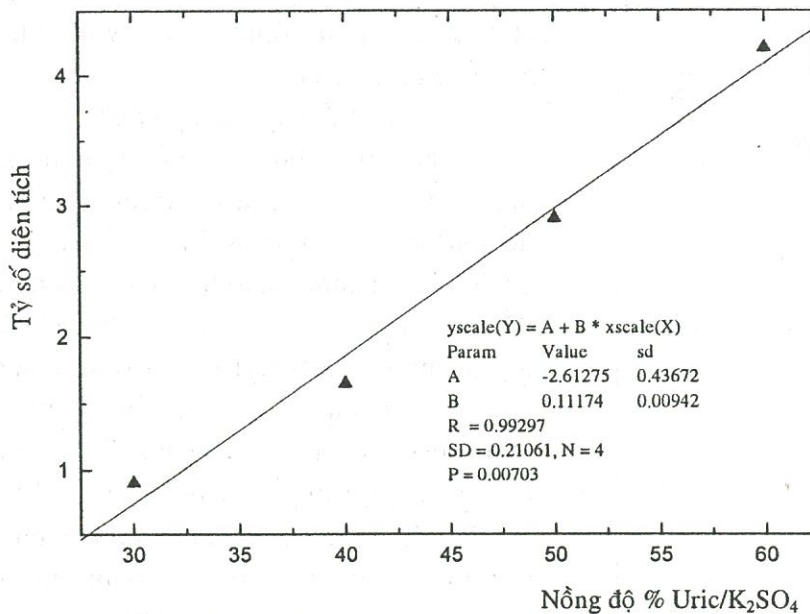
Lưu ý là các phổ này đã được chuẩn hóa với đỉnh U 1.649 cm<sup>-1</sup>, tức là đỉnh này ở các phổ nồng độ khác nhau vẫn bằng nhau về cường độ, chỉ có cường độ đỉnh chuẩn nội là thay đổi theo hàm lượng. Có thể thấy, cường độ đỉnh KS càng giảm khi hàm lượng axit uric càng tăng. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tính tỷ lệ diện tích với chất chuẩn nội K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

TT	Uric (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	% uric/ K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tỷ số S <sub>U</sub> /S <sub>KS</sub>
1	0.0145	0.0340	30%	0.90206
2	0.0194	0.0291	40%	1.65193
3	0.0242	0.0242	50%	2.90027
4	0.0291	0.0194	60%	4.21392



Hình 5. Phổ Raman với hàm lượng uric khác nhau



Hình 6. Đường chuẩn với chất chuẩn  $K_2SO_4$

Quan sát phổ ta thấy, sát cạnh bên phải đỉnh KS có xuất hiện một đỉnh nhỏ của axit uric  $997\text{ cm}^{-1}$  do dao động biến dạng của nhóm N-H. Đỉnh này sẽ làm sai kết quả tính toán diện tích. Đỉnh này sẽ được tách ra khỏi đỉnh KS bằng cách sử dụng chức năng “fitting” trong phần mềm OPUS 3.0.

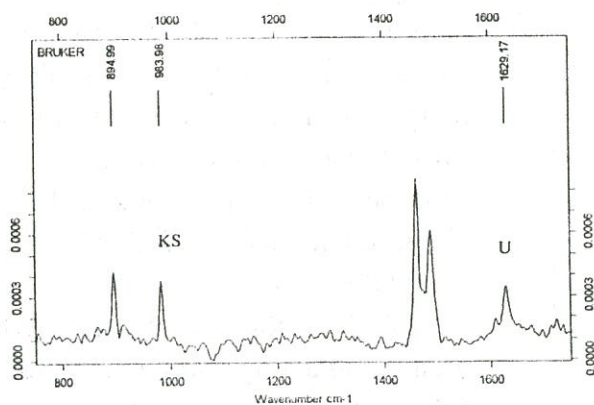
Cột 3 và cột 4 của bảng 3 được biểu diễn thành đường thẳng như trong hình 6. Đó chính là đường chuẩn của axit uric với chất chuẩn là  $K_2SO_4$ . Đường chuẩn này được vẽ bằng phần mềm khoa học Origin 3.0.

### II.1.2. Xác định nồng độ axit uric trong mẫu sỏi niệu

Trên cơ sở đường chuẩn đã được xây dựng (hình 6) chúng tôi tiến hành phân tích định lượng thành phần axit uric có trong mẫu sỏi niệu của bệnh nhân tên là Nguyễn Văn Nhân, 62 tuổi, quê ở Trà Vinh. Sỏi được nghiền thật nhuyễn và trộn thật đều.

Hình 7 là phổ của mẫu sỏi niệu của bệnh nhân này đã nghiền nhuyễn được trộn thật đều với một lượng  $K_2SO_4$  thích hợp và được đo cùng điều kiện như các phổ trên. Cụ thể lượng cân như sau: sỏi niệu là 0,0434 g và  $K_2SO_4$  là 0,0048 g.





Hình 7. Phổ Raman của sỏi niệu của bệnh nhân

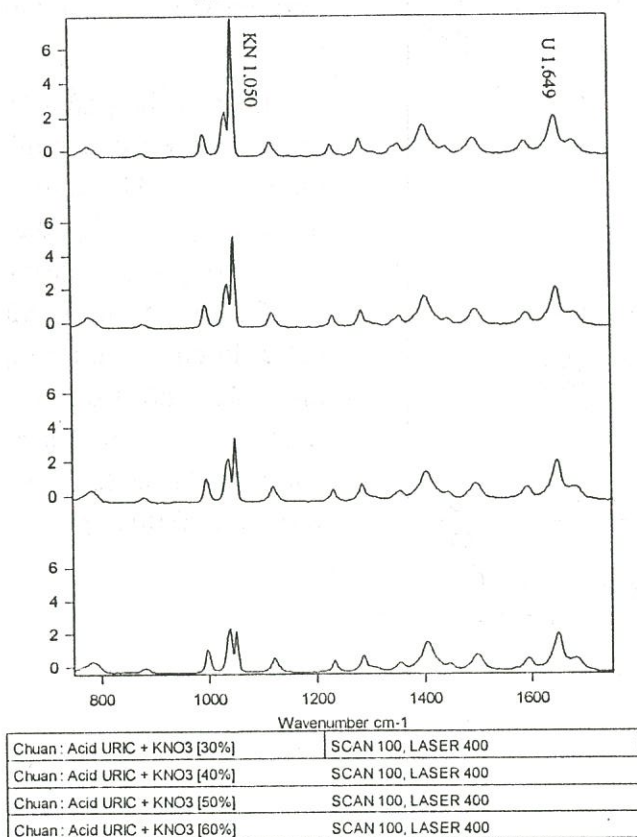
Tiến hành đo diện tích  $S_U$  của đỉnh U và  $S_{KS}$  của đỉnh KS (hình 7) và lập tỷ số  $S_U/S_{KS}$ . Đưa kết quả này ( $S_U/S_{KS} = 2,16034$ ) vào đường chuẩn, chúng tôi tính được hàm lượng axit uric trong hỗn hợp axit uric trong sỏi niệu và chất chuẩn nội  $K_2SO_4$  được trộn vào là : 42,75 % (không kể đến các thành phần khác trong sỏi niệu). Như vậy, có thể suy ra giá trị  $x_U$  axit uric trong sỏi niệu là:

$$x_U = \frac{0,0048 \cdot 0,4275}{1 - 0,4275} g = 0,0036g$$

Tính theo hàm lượng, đã xác định được có 8,29 % axit uric chứa trong sỏi niệu. Để đánh giá độ lặp lại, chúng tôi tiến hành phân tích 5 lần trên một mẫu. Các kết quả của 5 lần phân tích được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích hàm lượng axit uric trong sỏi niệu

Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Trung bình %
8,29	8,58	8,23	8,60	8,10	8,36 ± 0,18



Hình 8. Phổ Raman với hàm lượng uric khác nhau

## II.2. Phân tích định lượng với chất chuẩn nội $KNO_3$

### II.2.1. Lập đường chuẩn

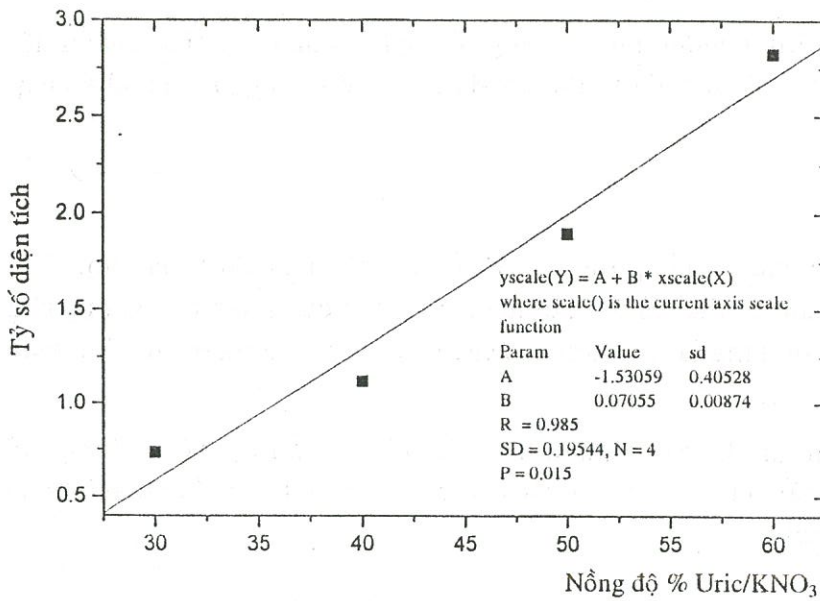
Tương tự như trường hợp trên, nhưng ở đây đỉnh của chất chuẩn chọn để tính toán là đỉnh KN có số sóng là  $1.050 \text{ cm}^{-1}$ . Đỉnh của axit uric được chọn để tính toán vẫn là đỉnh dao động hoá trị của nhóm carbonyl  $C=O$  có số sóng  $1.649 \text{ cm}^{-1}$  (hình 8). Bốn giá trị hàm lượng của axit uric trong hỗn hợp axit uric +  $KNO_3$  cũng như trên, tức là 30, 40, 50, 60% với cùng chế độ ghi phổ như trên. Hình 8 là phổ Raman của 4 mẫu tương ứng với 4 hàm lượng trên.

Kết quả tính tỷ lệ diện tích  $S_U$  đỉnh của đỉnh U trên diện tích  $S_{KN}$  của đỉnh KN của chất chuẩn nội ứng với 4 hàm lượng được trình bày trong bảng 5 dưới đây. Hình 9 là đường chuẩn với chất chuẩn nội  $KNO_3$ .

**Bảng 5.** Kết quả tính tỷ lệ diện tích với chất chuẩn nội KNO<sub>3</sub>

TT	Uric (g)	KNO <sub>3</sub> (g)	% uric/ KNO <sub>3</sub>	Tỷ số S <sub>U</sub> /S <sub>KN</sub>
1	0.0145	0.0340	30%	0.73371
2	0.0194	0.0291	40%	1.1195
3	0.0242	0.0242	50%	1.89823
4	0.0291	0.0194	60%	2.82594

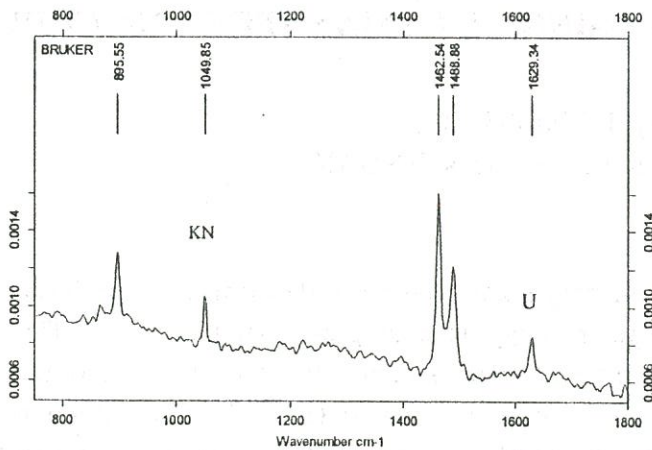
Bên trái sát đỉnh KN của chất chuẩn nội (hình 8) cũng có xuất hiện một đỉnh có số sóng là 1.037 cm<sup>-1</sup> cũng phải cần loại bỏ bằng cách như trên để không ảnh hưởng đến kết quả tính toán.



**Hình 9.** Đường chuẩn với chất chuẩn KNO<sub>3</sub>

*II.2.2. Xác định nồng độ axit uric trong mẫu sỏi niệu.*

Để so sánh kết quả tính toán với 2 chất chuẩn nội K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và KNO<sub>3</sub>, trong trường hợp này chúng tôi cũng sẽ sử dụng mẫu sỏi niệu của cùng một bệnh nhân như trên để phân tích. Trọng lượng của sỏi niệu và chất chuẩn nội cũng được cân cùng lượng như trường hợp trên, tức là : sỏi niệu là 0,0434 g và K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> là 0,0048 g.



**Hình 10.** Phổ Raman của sỏi niệu của bệnh nhân

Tiến hành đo diện tích S<sub>U</sub> của đỉnh U và diện tích S<sub>KN</sub> đỉnh KN (hình 10) và lập tỷ số S<sub>U</sub>/S<sub>KN</sub>. Kết quả:

$$S_U/S_{KN} = 1,6124$$

Tương tự như trên, đưa tỷ số này vào đường chuẩn ta tính được hàm lượng axit uric trong hỗn hợp axit uric trong sỏi niệu và chất chuẩn nội KNO<sub>3</sub> được trộn vào là : 44,55 % (không kể đến các thành phần khác trong sỏi niệu).



Như vậy, có thể suy ra lượng  $x_U$  axit uric trong sỏi niệu là:

$$x_U = \frac{0,0048 \cdot 0,4455}{1 - 0,4455} \text{ g} = 0,0039 \text{ g}$$

Tính theo khối lượng, ta xác định được có 8,96 % axit uric chứa trong sỏi niệu.

Cũng như trên, chúng tôi tiến hành ghi phổ 5 lần trên một mẫu. Các kết quả kết quả được ghi trong bảng 6.

**Bảng 6.** Kết quả phân tích hàm lượng axit uric trong sỏi niệu

Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Trung bình %
8,96	8,58	8,44	8,70	8,99	8,72 ± 0,35

Các kết quả phân tích bằng phương pháp quang phổ FT-Raman với chất chuẩn nội  $K_2SO_4$  hoặc  $KNO_3$  là phù hợp với các tác giả trước đây đã thực hiện bằng phương pháp hấp thụ hồng ngoại [5].

### III. KẾT LUẬN

Từ hai kết quả phân tích phương pháp Raman chuẩn nội với hai chất chuẩn nội khác nhau  $K_2SO_4$  và  $KNO_3$  là như nhau. Vì thế, có thể kết luận rằng, kết quả phân tích không phụ thuộc vào chất chuẩn nội được sử dụng là gì, miễn sao các chất này thoả mãn các điều kiện của chất chuẩn như đã trình bày trên.

Hướng mở rộng của công trình này là phân tích các thành phần có thể có trong sỏi niệu như cholesterol, các hợp chất chứa canxi,... và các của các loại sỏi khác hình thành trong cơ thể người như sỏi thận, sỏi mật,...

*Lời cảm ơn:* Tác giả xin chân thành cảm ơn PGS. BS Lê Văn Cường, Bệnh viện Bình Dân đã cung cấp mẫu sỏi niệu của các bệnh nhân.

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE URIC ACID COMPONENT IN HUMAN URINARY STONES USING FT-RAMAN SPECTROSCOPY

Huynh Thanh Dat

University of Natural Sciences, VNU-HCM

**ABSTRACT:** Uric acid in human urinary stones has been determined quantitatively by the FT-Raman spectroscopy. Raman spectroscopy is a single-beam technique. This has placed limitations on its use for measurement of species concentrations. To overcome these problems, potassium sulphate ( $K_2SO_4$ ) or potassium nitrate ( $KNO_3$ ) were added to the sample an appropriate quantity as an internal standard material. The sampling in the method requiring only a brief period of mixing and grinding (without compressing pellet) is shown to be particularly convenient. The results were compared to that obtained using IR absorption spectroscopy method.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Huỳnh Thành Đạt, *Luận án Tiến sĩ*, trường ĐH KHTN, 2000.
- [2]. Nguyễn Văn Đến, Huỳnh Thành Đạt, Dương Ái Phương, *Ứng dụng lý thuyết nhóm trong quang phổ phân tử*, trường Đại học KHTN, 1999.
- [3]. Nguyễn Hữu Đình, Trần Thị Đà, *Ứng dụng một số phương pháp phổ nghiên cứu cấu trúc phân tử*, Nhà xuất bản Giáo dục, 1999.
- [4]. Nguyen Xuan Nghia et al., *Determination of phenylpropanolamine hydrochloride and acetaminophen in pharmaceutical preparations by Raman spectroscopy method*, Hội nghị Quang học và Quang phổ toàn quốc lần thứ III, Nha Trang, tháng 8/2002.
- [5]. Nguyễn Quang Quyền, Lê Văn Cường, *Nghiên cứu thành phần hóa học và các yếu tố có liên quan của sỏi mật, sỏi niệu tại Việt Nam*, Đề tài cấp Bộ, 1996-1999.
- [6]. Nguyễn Đình Triệu, *Bài tập và thực tập các phương pháp phổ*, NXB ĐHQG Hà Nội, 2001.