

Хемиски институт — Природно-математички факултет — Скопје

## ПРИМЕНА НА ИНФРАЦРВЕНАТА СПЕКТРОСКОПИЈА ЗА АНАЛИЗА НА УРИНАРНИТЕ КАЛКУЛУСИ

К. Стојанова, И. Петров и Б. Шоптрајанов

### УВОД

Познавањето на составот на уринарните калкулуси секако е од интерес, како при лекувањето, така, особено, при обидите да се спречи повторното појавување на уролитијазата. Заради тоа, на ова подрачје доста долго се работи, при што се применуваат различни методи — од класичните хемиски, до современите инструментални методи за анализа.

Најчесто употребуваната клиничка метода е, секако, класичната хемиска квалитативна анализа (1—3) со која може да се докаже присуството на главните јони што влегуваат во составот на уринарните калкулуси:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , како и некои органски компоненти: мочна киселина (и урати), цистин, ксантин. Иако класичните хемиски методи се, релативно, едноставни, тие имаат и некои крупни недостатоци:

— бараат прилично големи количества материјал за анализа;

— не се во состојба да ја утврдат хемиската индивидуалност на составните делови;

— потребно е прилично долго време за изведба итн.

Заради тоа, усилено биле барани други методи за анализа, основани на примената на инструменталните методи.

Од овие, најширока примена нашле кристалографските методи, што може да бидат морфолошки (4—7) и дифракциони (4,8—11).

Морфолошките испитувања се базирани на посматрањето на кристалчињата што ги образуваат уролитите со помош на поларизационен микроскоп. При тоа многу од составните делови

можат да се разликуваат по карактеристичниот облик (хабитус), а со помош на поларизациониот микроскоп (или на друг начин) може да се определат и индексите на прекршувањето, аголот меѓу оптичките оски и сл. што, исто така, може да служи за идентификација.

Една варијанта на овие методи е и т. н. хемиска микроскопија (12), при која што се посматраат не кристалчињата онакви какви што се најдени во калкулусите, туку кристалите на супстанции што се добиени со хемиски реакции помеѓу одделни составни делови на конкрементите и определени реактиви.

**Дифракционите** (главно рентгенски) методи можат, исто така, да бидат различни, главно во зависност од големината на кристалите што стојат на располагање. Рентгенските методи имаат предност над класичните хемиски методи во тоа што се во состојба да разликуваат одделни хемиски супстанции во целост (значи, не само одделни јони), а исто така и во тоа што рентгенските дифракциони методи можат да дадат и информации за структурата на компонентите на уролитите.

Овие методи се, меѓутоа, прилично долготрајни, некои од нив бараат прилично големи монокристали и техниката на работа е доста комплицирана и долготрајна.

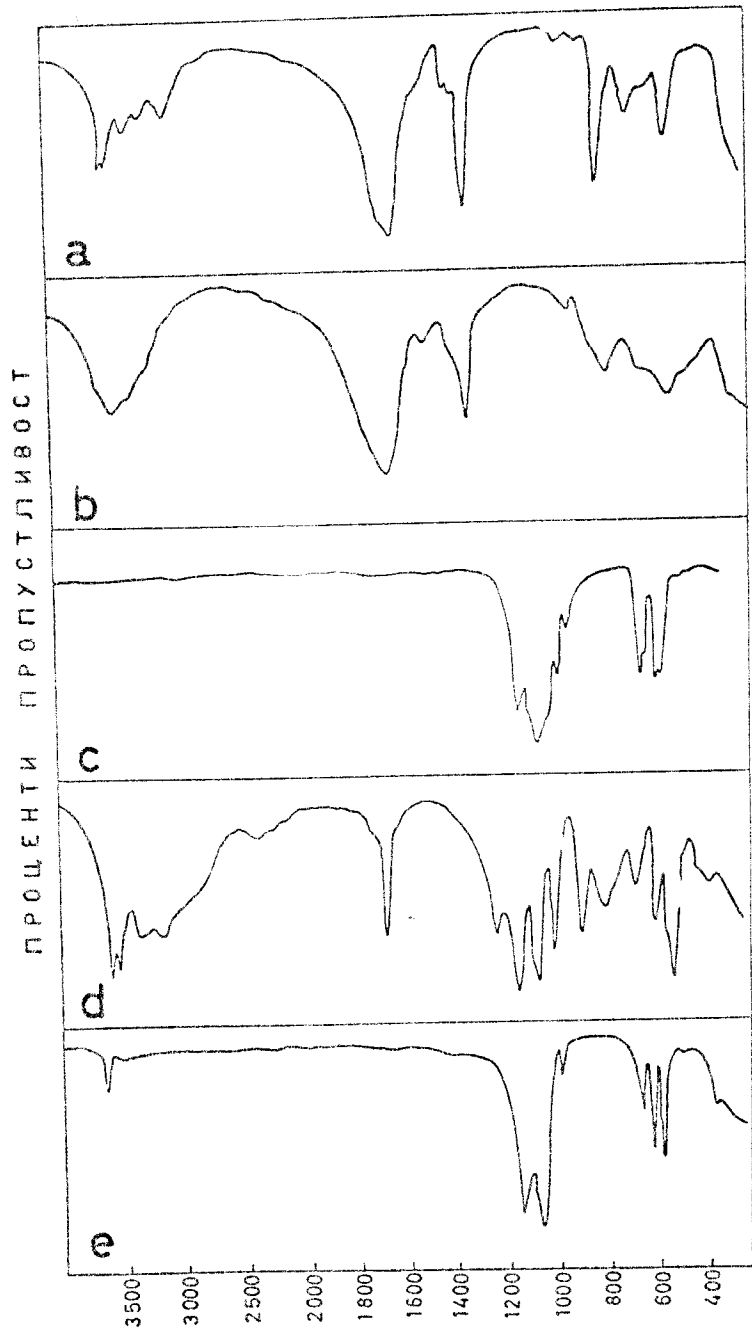
Иако, на пр., Prien (7) и Macaluso et al. (13) се залагале за примена исклучиво на кристалографски методи, биле најдени и усовершени и некои други методи за анализа на уролитите.

Помеѓу другото, за анализата на уринарните калкулуси биле применети и пламената анализа, а исто така и термогравиметријата (14).

Од најголем интерес во овој случај за нас е примената на **инфрацрвената спектроскопија** за вакви цели. За анализата на конкременти во уринарниот тракт инфрацрвената спектроскопија прв ја применил Weischer (15), а подоцна таа била применувана за исти цели релативно често, макар што не секогаш без крупни грешки. Со вакви испитувања се занимавале, на пр., Chihara (16,17), Weissmann et al. (18), Tsay (19), Strates (14) и Otto и Ihmann (20).

Примената на инфрацрвената спектроскопија ги има следниве предности над другите инструментални методи (а и да не зборуваме за класичните хемиски):

- анализата може да се изведе брзо, едноставно и точно;
- не е потребна голема вештина за усвојување на методиката на испитувањето;
- за анализа е dostatно минимално количество од супстанции (околу 1 mg), така што е можно определување на составот на сосем малите конкременти, а исто така и определување на составот на одделните делови на уролитот (зонарниот состав);
- секое соединение дава карактеристичен спектар (Сл. 1—3), па е можно прецизно разликување на составните делови



с.с.

БРАНОВ БРОЈ /см<sup>-1</sup>/

Сл. 1

на калкулусите не само кога овие се состојат само од една компонента, туку (во најголем број случаи) и тогаш кога се работи за смеси од неколку компоненти. Последново е можно заради тоа што спектрите на смесите може задоволително да се интерпретираат како да се настанати со суперпозиција на спектрите на одделните компоненти;

— можно е веднаш да се забележи присуството на нови компоненти и, евентуално, тие можат и да се идентифицираат

Речиси единствениот недостаток на овие методи е прилично високата цена на чинењето на основната апаратура и неопходните додатни делови. Меѓутоа, во последно време може да се набават и прилично евтини, а сепак достатно добри и ефикасни, инфрацрвени спектрофотометри.\* Имајќи ја предвид многустраноста на примената на инфрацрвената спектроскопија при решавањето на низа биохемиски и медицински проблеми (така, на пр., само Chihara и соработниците (17,22—25) ја примениле за контролата на фармаколошкото дејство на некои лекови, за анализа на вкупните липиди при дијабетес, за анализа на артикуларната течност, на човечки и животински жолчни течности и за анализата на жолчните калкулуси), може да се каже дека набавката на ваква опрема од страна на некоја поголема медицинска установа не би претставувала некорисна инвестиција.

### Материјали

Првата работа што е потребна при употребата на инфрацрвената спектроскопија за анализа на уrolитите е познавањето на спектрите на чистите можни компоненти. Вакви податоци делумно веќе постојат во литературата (15—20), но тие се неполни, меѓу нив нема спектри на некои супстанции кои несомнено се конституенти на уrolитите, спектралното подрачје им е, најчесто, ограничено и сл. Поради тоа сметавме за потребно сето ова прашање одново да го проанализираме.

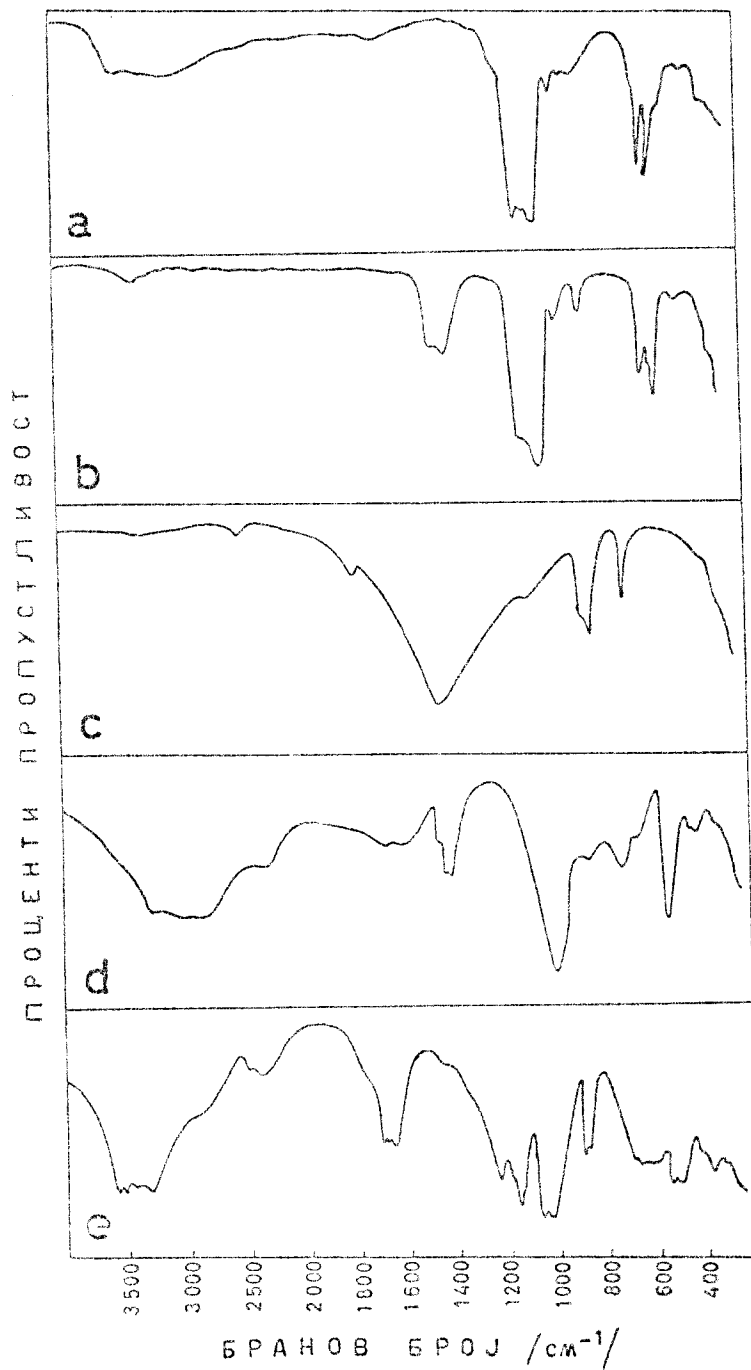
Различни автори како составни делови на уринарните калкулуси ги наведуваат следниве супстанции:

- калциум оксалат монохидрат (вевелит),  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- калциум оксалат дихидрат (веделит),  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- калциумови фосфати и тоа:

$\beta$  трикалциум фосфат (витлокит),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

дикалциум фосфат дихидрат (брушит),  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

\* Така, на пр., фирмата Perkin-Elmer го продава својот Model 700 за околу 3000 долари при што, со сите потребни додатни делови цената веројатно би достигнала до околу 4000 долари.



Сл. 2

- хидроксиапатит,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$   
 карбонатен апатит,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$   
 — магнезиум амониум фосфат хексахидрат (струвит),  
 $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 — калциум карбонат,  $\text{CaCO}_3$   
 — мочна киселина,  $\text{C}_5\text{N}_4\text{H}_4\text{O}_3$   
 — мочна киселина дихидрат,  $\text{C}_5\text{N}_4\text{H}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 — амониум хидроген урат,  $\text{C}_5\text{N}_4\text{H}_3\text{O}_3\text{NH}_4$   
 — натриум хидроген урат,  $\text{C}_5\text{N}_4\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$   
 — цистин,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$   
 — ксантин,  $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$

а исто така и фибрин, сулфонамиди,  $\text{SiO}_2$  и некои други.

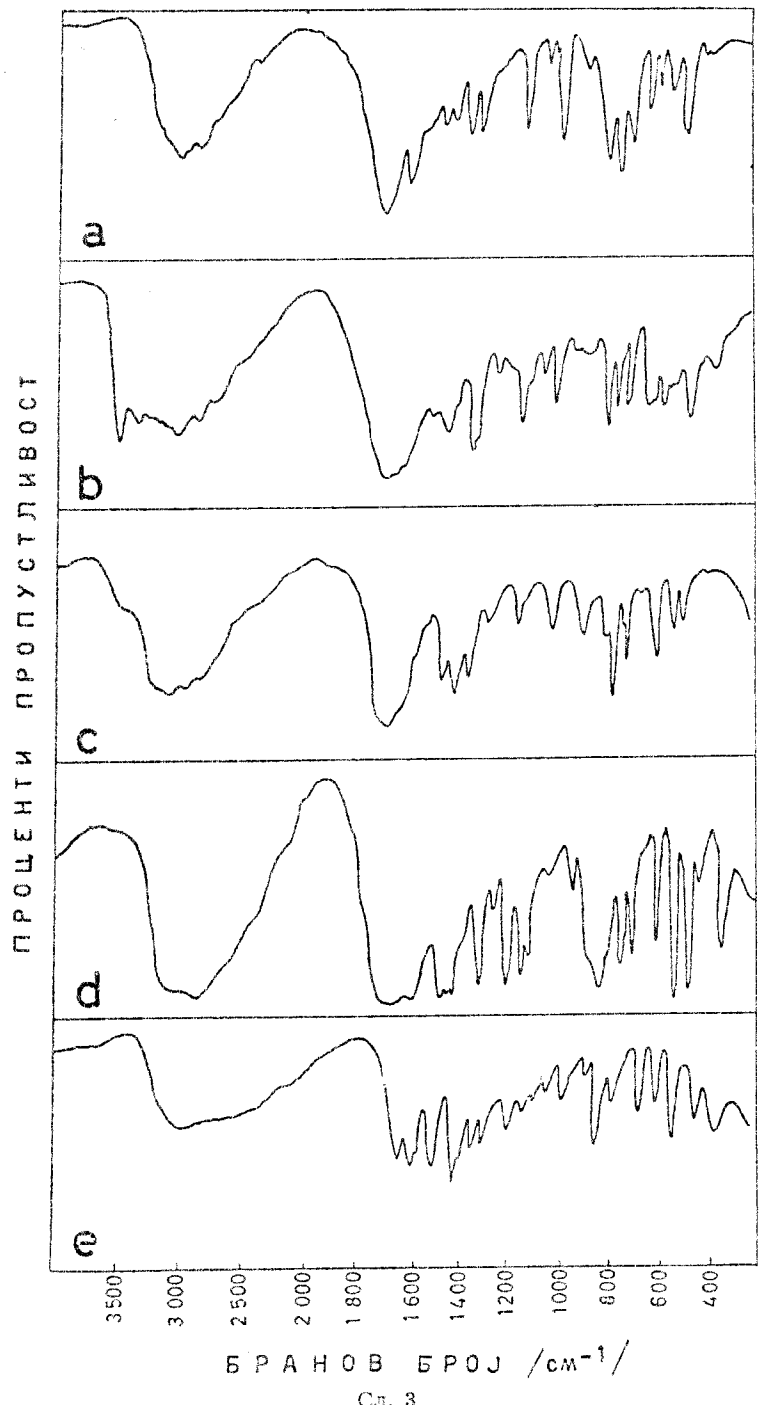
Ние синтетизиравме поголем дел од горенаведените супстанции, а во некои случаи употребивме и комерцијални хемикалии. Синтезите ги вршевме според методите познати во литературата (26—33). Нашиите обиди да синтетизираме мочна киселина дихидрат останаа безуспешни, поради тоа што синтетички добиениот дихидрат е извонредно нестабилно соединение кое уште во текот на препаратацијата или пак во време на операциите на подготовка за снимање на спектар (види подолу) губеше вода и се претвораше во безводна мочна киселина. Меѓутоа, спектарот (покажан на сл. 36) што е снимен од уролитен материјал несомнено припаѓа на ова соединение, затоа што (осветлентите што потекнуваат од кристалната вода) е сосем сличен на спектарот на безводната мочна киселина. Другите, ситни, разлики во спектрите на овие две соединенија не се неочекувани кога се има предвид разликата во кристалните структури (34). На фактот што стабилни кристали на дихидратот на мочната киселина можат да се најдат во уринарните калкулуси веќе порано укажал Ringertz (34).

Калиум бромидот,  $\text{KBr}$  што е потребен при снимањето на спектрите беше р. а. производ на Kemika, Загреб, прекристализиран од вода. Образованите кристали беа филтрирани на вакуум, сушени на воздух, а потоа на  $120^\circ\text{C}$ . Вака добиениот  $\text{KBr}$  беше потоа топен во платинско лонче. Од растопот  $\text{KBr}$  кристализира во плочести кристали, слободни од влага. За да се избегне примањето влага од атмосферата, калиум бромидот беше чуван постојано во сушилна, на температура од околу  $120^\circ\text{C}$ .

### Методи

За снимање на инфрацрвените спектри на тврди супстанции денес се употребуваат, главно, две методи: методата на пресувани дискови и онаа на суспензија.

**Метода на пресувани дискови (таблетки).** Според оваа метода околу 1 mg од супстанцата се помешува со околу 100—300



mg од некој алкален халид (ние употребувавме 300 mg KBr) и добро се иситнува и измешува. Ситнењето и хомогенизирањето најдобро се вршат во вибрациона мешалка, при што супстанцата и калиум бромидот се наоѓаат во специјален патрон од челик кој не пресува (или пак од некој друг погоден материјал, на пр., ахат) во кој има и две-три топчиња од истиот материјал. Добиената хомогена смеша се става во специјален капац, воздухот се евакуира со помош на маслена вакуум пумпа и потоа се подложува на притисок од околу 10 тони/cm<sup>2</sup> (пумпата е и понатаму вклучена).

На ваков начин се добива провиден диск (таблетка) од кој понатаму се снима инфрацрвениот спектар.

Главната предност на оваа метода лежи во фактот што алкалните халиди (покрај KBr се употребуваат уште и KCl, CsBr и други) немаат, во подрачјето во кое се пропусливи за инфрацрвена светлина, сопствени апсорпциони ленти. На тој начин ситот спектар на испитуваната супстанца е достапен за изучување и нема опасност да се пропушти некоја важна лента.

Од друга страна, кај некои органски молекули е забележано дека настануваат промени поради притисокот на кој се подложени во текот на приготвувањето на таблетките, додека пак кај неорганските супстанции понекогаш настанува измена на јони помеѓу супстанцата и матрицата од алкален халид.

**Метода на суспензија.** Според оваа метода цврстата супстанца грижливо се гмечи со некое pogodно средство: парафинско масло („Nujol“), флуорирани парафини („fluorolube“), хексахлоробутадиен и сл. и добиената суспензија се нанесува, во вид на филм со определена дебелина, помеѓу две плочки од некој материјал пропустлив за инфрацрвена светлина (NaCl, KBr, CsBr, AgCl и други). Спектарот тогаш се снима од вака добиениот филм.

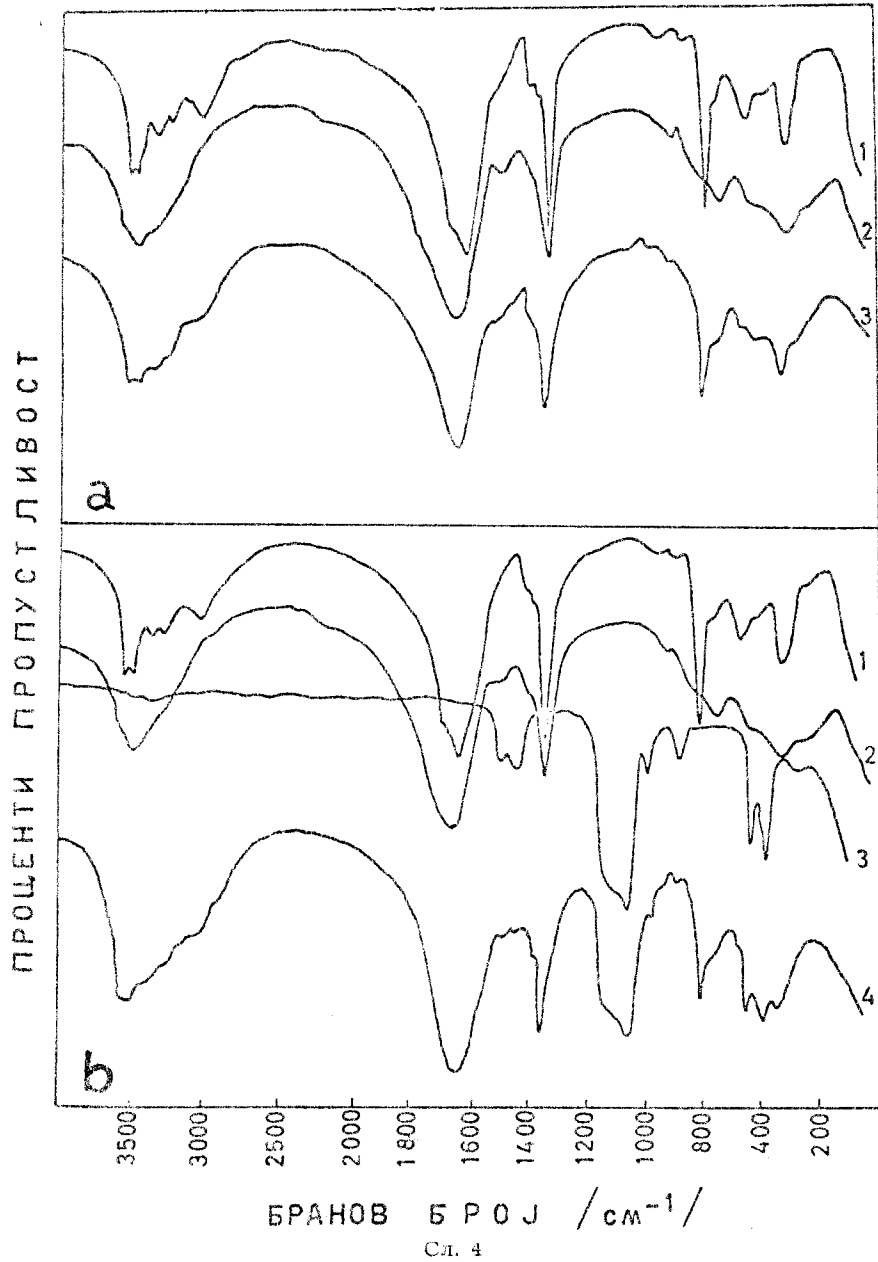
Предноста на оваа метода е во тоа, што до голема мерка е избегната можноста за интеракција со матрицата (земана на јони и сл.), а и супстанцата не е изложена на притисок.

Недостатоците на оваа метода се: релативно поголемо количество супстанца е потребно за анализа, а фактот што маслата имаат и сопствени подрачја на апсорпција, налага или да се применат два или повеќе вида суспензии (што бара и повеќе време и повеќе материјал за анализа) или да се испуштат од вид некои важни и карактеристични ленти од испитуваните супстанции.

Имајќи го горното предвид, ние се решивме за употреба исклучиво на методата на пресувани таблетки, сметајќи дека предностите на оваа метода далеку ги надминуваат нејзините недостатоци.

Сета процедура на подготовка на таблетките и на снимањето на спектарот кај нас траеше околу 40 минути. Меѓутоа, при сериско снимање на спектри, времето потребно за приготвување





на следната таблетка приближно се поклопува со времето потребно за снимање на спектарот на претходната, така што, во овој случај, сета процедури бара сè на сè околу 20—30 минути по спектар.

Спектрите ги снимавме со помош на регистрациониот инфрацрвен спектрофотометар Model 521 на фирмата Perkin-Elmer. Пресата и калапот за приготвување таблети беа производ на компанијата RISC од Лондон.

Спектрите на супстанциите за кои е соопштено дека учествуваат во составот на уринарните калкулуси се покажани на сл. 1—3. Од оваа, прилично долга, листа на супстанции, ние, во испитаните околу 120 калкулуси добиени од скопските клиници, ги најдовме (35) само овие: калциум оксалат моно — и дихидрат (вевелит и веделит), апатити (карбонатен апатит и, веројатно, октакалциум фосфат), магнезиум амониум фосфат хексахидрат (струвит), мочна киселина, нејзиниот дихидрат и амониум урат како и, во два случаја, цистин. Другите составни делови што наводно се среќаваат во уролитите не беа најдени, а за некои, како, на пр. за  $\text{CaCO}_3$ , може скоро со сигурност да се каже дека како чисти и не се среќаваат во калкулусите. Во случаите кога класичната хемиска анализа покажува присуство на калциумови, фосфатни и карбонатни јони секако се работи за карбонатен апатит (кој е сосема јасно дефинирано соединение), а не за меша од калциум фосфат и калциум карбонат.

Спектрите на калкулусите (ние снимавме над 200 спектри во текот на околу две години) се поклопуваат со спектрите на стандардните супстанции употребени за споредување, со тоа што во повеќето случаи се работи за смеси од повеќе од една компонента, така што спектарот на смешата како да е графички збир на спектрите на двете (или трите) компоненти. Со малку искуство можно е веќе на прв поглед да се определат дали се работи за некој фосфат (карактеристични за нив се лентите околу 1000 и 6000—550  $\text{cm}^{-1}$ ), оксалат (карактеристичните ленти лежат околу 3500—3000, 1630, 1320, 950—910 и 780—770  $\text{cm}^{-1}$ ), урат или цистин (последниве соединенија, а и ксантинот, имаат пооглем број ленти карактеристични за секое од нив). Деталното срамнување на спектарот на калкулусот со спектрите на референтните супстанции може потоа да ни покаже за кој токму фосфат, оксалат итн. се работи во конкретниот случај. На сл. 4 се покажани два примера и за анализа на спектри на калкулуси составени од повеќе компоненти: во првиот случај се работи за конкремент составен од вевелит и веделит, а во вториот, покрај горните две компоненти, присутен е и апатит (карбонатен апатит). На сличен начин може да се интерпретираат и спектрите на секоја друга меша.

Како заклучок може да се каже дека методите на инфрацрвената спектроскопија овозможуваат брзо и точно да се идентифицираат конституентите на уринарните калкулуси што

секако е неопходен предуслов, ако се сака студиозно да се пристапи кон испитувањето на причините на уролитијазата и со обиди за спречување на ваквите заболувања со кои нашево подрачје, за жал, изобилува.

#### БЛАГОДАРНОСТ

Калкулусите, употребени во нашава работа, ни беа љубезно ставени на располагање од страна на персоналот на скопските клиника и ние ја ползуваме оваа прилика за ова да им ја изразиме нашата најискрена благодарност.

Искрено се благодариме и за финансиската помош што ни беше укажана од страна на Републичкиот фонд за научноистражувачка работа во Скопје.

#### Summary

The application of infrared spectroscopy in the analysis of urinary calculi is described in detail. The method of alkali halide pressed discs (KBr was used in the present study) is to be preferred over the mull method because of the possibility offered by the former method to examine the whole spectral region and thus be sure that no important band is ignored. The infrared spectra of the most common constituents of urinary calculi are given together with those of some other substances which have been reported as stone-forming compounds. Of the rather long list of compounds reportedly taking part in the formation of urinary calculi, only calcium oxalates (whewellite and weddellite), apatites (carbonatoapatite and, possibly, octacalcium phosphate), magnesium ammonium phosphate hexahydrate (struvite), uric acid and its dihydrate, ammonium urate and cysteine were found in a collection of 120 urinary calculi from Macedonia (the results of this study are reported elsewhere (35)). Examples showing the interpretation of the spectra of calculi containing more than one constituent are presented.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Jensen, A. T.: Acta Chir. Scand., 84, 204, 1940
2. Fišer, M. — Herman: Kliničke biokemiske pretrage. Skolska knjiga. Zagreb, 1956
3. Henry, R. J.: Clinical Chemistry, Principles and Techniques, Hoeber Med. Div. of Harper and Row, New York, 1964
4. Prien, E. L., and Frondel, C.: J. Urol., 57, 949, 1947
5. Prien, E. L.: J. Urol., 61, 821, 1949
6. Prien, E. L.: J. Urol., 73, 627, 1955
7. Prien, E. L.: J. Urol., 89, 917, 1963

8. Smothers, W. J., Siegel, L. H.: *J. Urol.* 71, 647, 1957
9. Herring, L. C.: *J. Urol.* 88., 545, 1962
10. Haugh, I., Lonsdale, K., Mason, P., White, E. G.: *J. Small Anim. Pract.*, 7, 565, 1966
11. Lonsdale, K., Sutor, D. J.: *Science*, 154, 1353, 1966
12. Laskowski, D. E.: *Anal. Chem.*, 37, 1399, 1965
13. Macaluso, M. P., Leone, M., Piazza, B.: *Urologia*, 31, 270, 1964
14. Strates, B. S.: *Experientia*, 22, 574, 1966
15. Beischer, E. E.: *J. Urol.*, 73, 653, 1955
16. Chihara, G., Kurosawa, N., Takasaki, E.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 7, 622, 1959
17. Chihara, G., Kurosawa, N., Mizushima, A., Matsuo, K., Yoshioka, Y., Arimoto, K., Sugano, S.: *Intern. Symp. Molec. Structure and Spectry, Tokyo. Sl. s. a., C 117--1, 1962*
18. Weissman, M., Klein, B., Berkowitz, J.: *Anal. Chem.*, 31, 1334, 1959
19. Tsay, Y. C.: *J. Urol.*, 86, 838, 1961
20. Otto, H., Ihmann, E.: *Frankfurter Z. Pahtol.*, 77, 262, 1967
21. Chihara, G., Doi, S., Kobayashi, E., Mizushima, A., Kurosawa, N., Otko, M., Kaneto, A., Kuzuya, N.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 10, 1184, 1962
22. Chihara, G., Matsuo, K., Mizushima, A., Tanaka, E. et. al.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 10, 1184, 1962
23. Chihara, G., Matsuo, K., Arimoto, K., Sugano, S.: *Chem. Pharm Bull. (Tokyo)*, 10, 1190, 1962
24. Chihara, G., Yamamoto, S., Kameda, H.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 6, 50, 1958
25. Chihara, G., Kobavashi, E., Mizushima, A., Shirakuma, K., Kameda H.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 8, 771, 1960
26. Winchell A. N. and Winchell, H.: *The Microscopical Characters of Artificial Inorganic Solid Substances. Optical Properties of Artificial Minerals*, Academic Press, New York, 1964
27. Vogel, A. I.: *A Text-Book of Quantitative Inorganic Analysis. Theory and Practice*, Longmans, Green and Co., London, 1953
28. H. V. Philipsborn, *Fortsch. Mineral.*, 29--30, 393 1950--1951
29. Honneger, R.: *Vierteljahrsschr naturforsch. Ges Zurich, Beih.* 97, 44 pp CA, 47, 5756, 1959
30. Петров, И., Шоптрајанов, Б.: *Год. зборник на ПМФ*, 16, 123, 1965
31. Fowler, B. O., Moreno, E. C., Brown, W. E.: *Arch. Oral Biol.*, 11, 477, 1966
32. Kühl, G., Nebergall, W. H., *Anorg. Z.: Allgem. Chem.*, 324, 313 1963
33. Brown, W. E., Smith, J. P., Lehr, J. R., Frazier, A. W.: *Nature*, 196, 1050, 1962
34. Ringertz, H.: *Acta Cryst.*, 19, 286, 1965
35. Stojanova, K., Petrov, I., Šoptrajanov, B.: *Iug. Physiol. Pharm. Acta (во печат)*.

## ЛЕГЕНДА ЗА СЛИКИТЕ

Сл. 1 — 3. Инфрацрвени спектри на компонентите на уринарните калкулуси

### Сл. 1

- а. Вевелит,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- б. Веделит,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- в. Витлокит,  $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- д. Брушит,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- е. Хидроксиапатит,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

### Сл. 2

- а. Октакалциум фосфат,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- б. Карбонатен апатит,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$
- в. Калциум карбонат,  $\text{CaCO}_3$
- д. Струвит,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- е. Њубериит,  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

### Сл. 3

- а. Мочна киселина
- б. Мочна киселина дихидрат
- в. Амониум урат
- д. Ксантин
- е. Цистин

Сл. 4. Инфрацрвени спектри на калкулуси и на чистите супстанции од кои тие се составени

- 4а. 1. Вевелит, 2. Веделит, 3. Калкулус составен од вевелит и веделит
- 4б. 1. Вевелит, 2. Веделит, 3. Карбонатен апатит 4. Калкулус составен од вевелит, веделит и карбонатен апатит