

ИК СПЕКТРОСКОПИЯ И РЕНТГЕНОФАЗОВЫЙ АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ

А. А. Пичугина^{1*}, Л. В. Цыро², Ф. Г. Унгер¹

УДК 544;543.442;543.421/.424

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050, Томск, просп. Ленина, 36, Россия; e-mail: alina.com9@mail.ru

² Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

(Поступила 12 мая 2017)

Методами рентгенофазового анализа и ИК спектроскопии исследован состав неорганической и органической частей желчных камней. Показано, что в состав исследуемых желчных камней входят холестерин, билирубин, билирубинат кальция, карбонат кальция, фосфат и гидрофосфат кальция с преобладанием холестерина. Проведены послойное разделение желчного камня и отделение неорганической части путем отжига. Установлено, что содержание неорганических соединений преобладает во внешнем слое желчного камня, что связано с механизмом их образования. В состав неорганической части входит карбонат кальция двух модификаций — кальцит и ватерит.

Ключевые слова: желчный камень, свободные радикалы, рентгенофазовый анализ, ИК спектроскопия.

The composition of inorganic and organic parts of gallstones is investigated by the methods of X-ray phase analysis and IR spectroscopy. It is shown that cholesterol, bilirubin, calcium bilirubinate, calcium carbonate, and calcium hydrogen phosphate are the parts of gallstones. Meanwhile, cholesterol is prevailing. A layered separation of the gallstone as well as a separation of its inorganic part by the annealing are carried out. It is established that the inorganic compounds predominate in the outer layer of the gallstone, which is related to the mechanism of its formation. The composition of the inorganic part includes calcium carbonate of two modifications: calcite and waterite.

Keywords: gallstone, free radicals, X-ray phase analysis, IR spectroscopy.

Введение. Организм человека создает различные отложения в виде органоминеральных агрегатов, которые играют важную роль в его функционировании. Образование органоминеральных агрегатов происходит в основном в кровеносных сосудах, почках и мочевыводящих путях, желчных путях, слюнных и поджелудочной железах и оказывает негативный эффект на организм человека [1]. К таким новообразованиям относят желчные камни, которые представляют собой органоминеральные агрегаты, состоящие из органических и неорганических фаз. Последние накапливаются в виде различных солей и нерастворимых веществ в желчном пузыре, механизм формирования которых представляет собой сложный процесс, который до конца еще не понятен [2, 3].

Согласно [4—6], образование желчных камней представляет собой комплекс биопроцессов, в котором физические, метаболические, генетические и географические факторы способствуют формированию в желчном пузыре и желчных протоках нерастворимых биоматериалов. По мнению исследователей [7—12], образование и рост желчных камней связаны с наличием центров кристаллизации, которыми могут выступать молекулы холестерина, на которых впоследствии конгломерируются молекулы других веществ (соли кальция, магния, кристаллы билирубина). Однако авторы [13] считают, что многие процессы в живом организме имеют электронно-спиновую природу, т. е. протекают реакции с участием молекул, содержащих неспаренные электроны. Если в такую молекулу, изолирован-

IR-SPECTROSCOPY AND X-RAY PHASE ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF GALLSTONES

A. A. Pichugina^{1*}, L. V. Tsyro², F. G. Unger¹ (¹ National Research Tomsk State University, 36 Lenina Prosp., Tomsk, 634050, Russia; e-mail: alina.com9@mail.ru; ² Surgut State University, Surgut, Russia)

ную в клетке, попадет чужеродный свободный радикал, то естественный процесс жизнедеятельности организма меняется, что приводит к патологическим новообразованиям в виде желчных, мочевых, слюнных камней.

Желчные камни делятся на три основных типа: холестериновые, пигментные и смешанные, имеющие различные форму, размер, цвет и кристаллическую структуру [14—17]. Исследование химического состава желчных камней имеет важное значение, так как дает информацию, необходимую для понимания причины возникновения желчных камней и методов его предотвращения.

Цель настоящей работы — установление химического состава неорганической и органической составляющих желчных камней.

Экспериментальная часть. Объектами исследования служили образцы желчных камней, полученные лапароскопической холецистэктомией у пациентов в возрасте 45—65 лет. Все образцы имели светло-желтую окраску со слоистой структурой. Размер желчного камня варьирует от 5 до 16 мм. Состав желчных камней исследован методом рентгенофазового анализа (РФА). Для этого образцы перетирали в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния с последующим прессованием в кювете и снимали рентгенограммы на дифрактометре Rigaku Miniflex 600 с использованием CuK_α -излучения в интервале $2\theta = 3\text{—}100^\circ$ с шагом сканирования 0.02° и скоростью съемки 5 град/мин. Идентификация дифракционных максимумов проведена с использованием базы данных JSPDS. В дополнение к РФА для установления более точного состава желчных камней измерены ИК спектры образцов, которые растирали до мелкодисперсного состояния, смешивали с микрокристаллическим КВг в соотношении 1:50 с последующим прессованием из полученной смеси микротаблетки. ИК спектры зарегистрированы на спектрофотометре Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR Spectrometer в диапазоне частот $4000\text{—}500\text{ см}^{-1}$. Для более детального исследования состава неорганической и органической частей желчных камней методами РФА и ИК спектроскопии образец № 1 разделен на слои (наружный и внутренний), а для идентификации неорганической части отождествлен в муфельной печи при 700°C в течение 2 ч в инертной атмосфере для удаления органической части камня.

Результаты и их обсуждение. Согласно данным РФА, состав исследуемых желчных камней представлен преимущественно фазами холестерина ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$, PDF №00-007-0742) триклинной сингонии с пространственной группой $P-1$ и десмостерола ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$, PDF № 00-010-0627), имеющего орторомбическую сингонию с пространственной группой $P2_12_12_1$ (рис. 1), с преобладанием фазы холестерина. В образце № 1 помимо фазы холестерина присутствует фаза карбоната кальция в виде

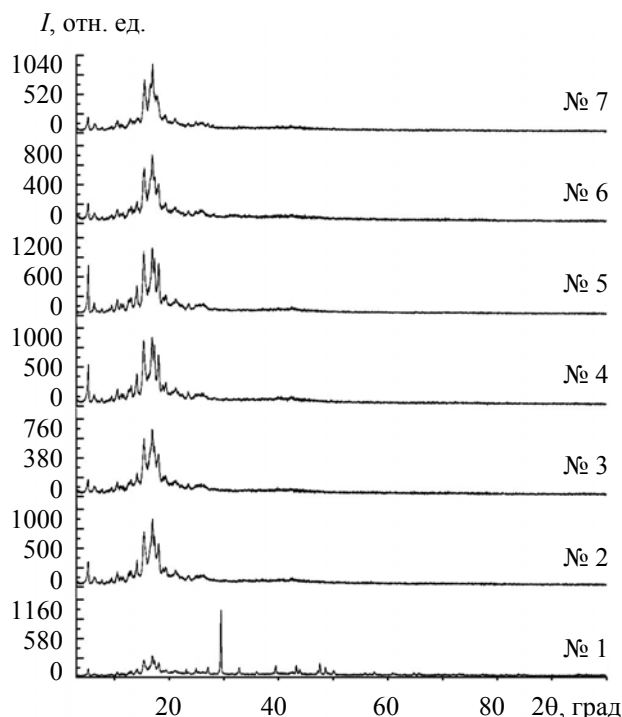


Рис. 1. Рентгенограммы образцов желчных камней

двух модификаций: кальцита (CaCO_3 , PDF № 01-072-4582, тригональная сингония, пространственная группа $R-3c$) и ватерита (CaCO_3 , PDF № 00-025-0127, гексагональная сингония, $P6_3/mmc$).

Для более детального описания состава образцов зарегистрированы ИК спектры желчных камней (рис. 2), из которых видно, что все образцы имеют практически идентичную структуру. Согласно результатам ИК спектроскопии, в спектрах образцов № 1, 2, 5, 6, 7 присутствуют полосы поглощения в области $3750\text{—}3650\text{ см}^{-1}$, соответствующие колебаниям ОН-групп кристаллизационной воды в холестерине, что хорошо подтверждает данные РФА о преобладании в данных образцах фазы холестерина состава $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$.

Область $3500\text{—}3000\text{ см}^{-1}$, присутствующая в ИК спектрах всех образцов, свидетельствует о наличии в их структуре молекулы билирубина, так как данные частоты соответствуют валентным колебаниям NH-группы пиролла в билирубине. Широкий дублет с максимумами 2932 и 2899 см^{-1} соответствует асимметричным колебаниям связей C–H в CH_2 - и CH_3 -группах холестерина. Колебания в области $1670\text{—}1620\text{ см}^{-1}$ характерны для связей $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ в молекуле билирубина, кроме того, данная область соответствует валентным колебаниям связей $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$ в билирубине кальция. Две интенсивные полосы поглощения при 1462 и 1377 см^{-1} относятся к кольцевой деформации холестерина и деформационным колебаниям связей C–H в CH_2 -группе холестерина. Полоса в области $1250\text{—}1235\text{ см}^{-1}$ характерна для асимметричных валентных колебаний COOH -группы в билирубине, а также для колебаний связей $\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ в билирубине кальция.

Колебания в области $1165\text{—}1150\text{ см}^{-1}$ и полосы поглощения при 955 и 593 см^{-1} указывают на присутствие в структуре образцов фосфатов кальция, так как данные полосы относятся к колебаниям PO_4^{3-} в фосфатах и гидрофосфатах кальция. В ИК спектрах присутствует интенсивная полоса поглощения при 1054 см^{-1} , характерная для колебаний C–C-связей кольца в холестерине.

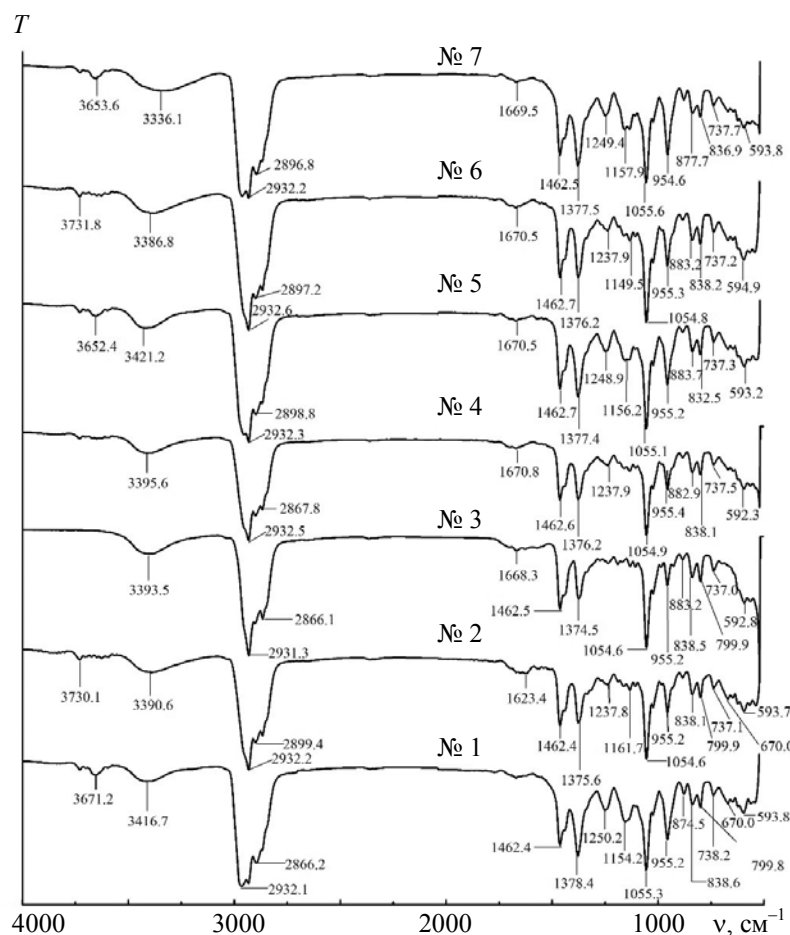


Рис. 2. ИК спектры образцов желчных камней

На наличие карбоната кальция в структуре желчных камней указывают полосы поглощения при 882, 877, 799, 738 и 670 см^{-1} , соответствующие колебаниям CO_3^{2-} , причем, согласно [3], полоса 882 см^{-1} характерна для колебаний связей в ватерите, а полоса 877 см^{-1} — в кальците. В ИК спектрах всех образцов присутствует слабая полоса при 838 см^{-1} , которая соответствует колебаниям связей C—H вне плоскости изгиба билирубина.

Поскольку на рентгенограммах исследуемых образцов в основном проявляются фазы холестерина и десмостерола, можно предположить, что карбонаты, фосфаты и гидрофосфаты равномерно распределяются по всей структуре желчного камня в виде примесей и их количество очень мало для определения методом РФА.

Согласно результатам РФА, в образце № 1 помимо фазы холестерина присутствуют фазы карбоната кальция двух модификаций — кальцита и ватерита. В связи с этим данный образец выбран для более подробного исследования состава. Желчный камень разделили на слои (внутренний и внешний), органическую часть удалили отжигом при 700 °С для исследования неорганической составляющей (рис. 3). Внутренний слой представляет собой смесь фаз 60 мас.% холестерина (PDF № 00-007-0742), 27 мас.% десмостерола (PDF № 00-015-1031) и 13 мас.% карбоната кальция в виде кальцита (PDF № 00-002-0623) (рис. 3, б). При переходе от внутреннего слоя к внешнему (рис. 3, в) в данном слое фазы увеличивается содержание карбоната кальция до 40 мас.% и появляется вторая модификация карбоната кальция — ватерит (PDF № 00-004-0844). По результатам РФА в данном слое отсутствует фаза десмостерола. Отожженный образец (рис. 3, г) представляет собой 100 мас.% фазу карбоната кальция, состоящую из 78 мас.% кальцита и 22 мас.% ватерита.

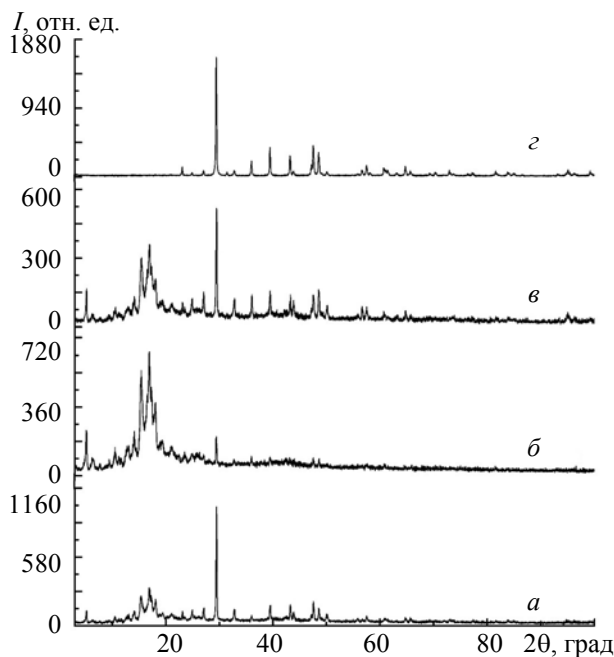


Рис. 3. Рентгенограммы образца желчного камня № 1: а — исходный образец; б — внутренний слой; в — внешний слой; г — отожженный образец

ИК-спектроскопический анализ образцов подтвердил результаты РФА (рис. 4). Как видно, в ИК спектрах внутреннего и внешнего слоев (рис. 4, б, в) присутствуют полосы поглощения, характерные для холестерина, билирубина и его солей, карбоната кальция и фосфатов кальция (табл. 1). Для отожженного образца (рис. 4, г) наблюдаются характерные полосы поглощения для колебаний связей в карбонате кальция, что хорошо подтверждает данные РФА.

Согласно проведенным исследованиям, карбонат кальция встречается как во внутреннем, так и во внешнем слое желчного камня, однако во внутреннем слое его гораздо меньше, чем во внешнем. На основании исследований [13, 18] данный факт можно объяснить тем, что при образовании камня в качестве структурообразующего центра выступают радикалы (частицы с открытыми спин-орбиталями). Избыточное количество радикалов в организме — результат стрессовых явлений либо плохо

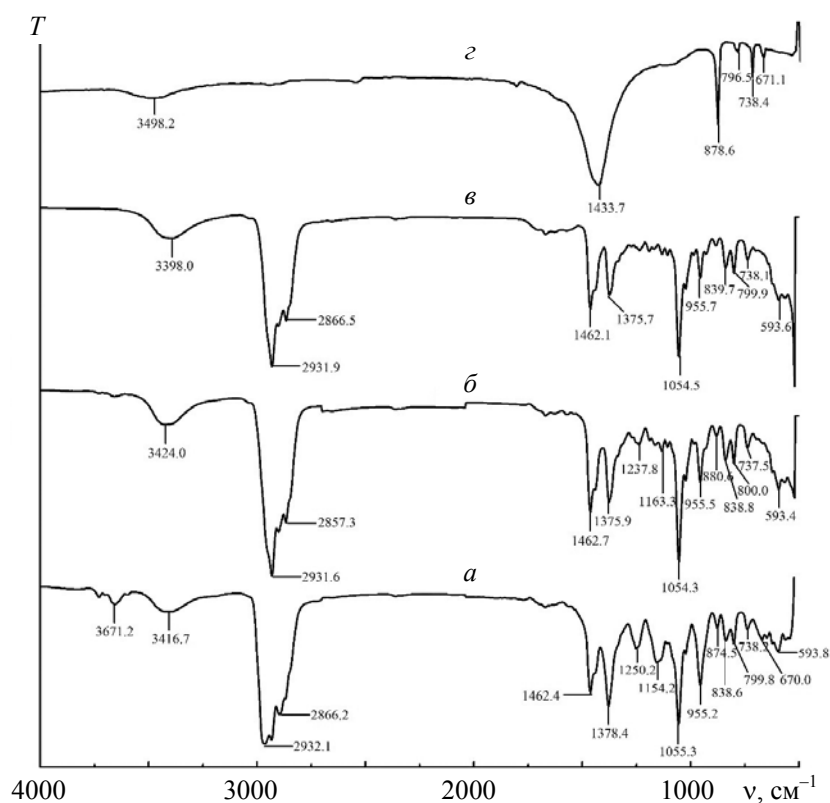


Рис. 4. ИК спектры образца желчного камня № 1: *а* — исходный образец; *б* — внутренний слой; *в* — внешний слой; *г* — отожженный образец

Т а б л и ц а 1. Отнесение полос ИК спектров образца № 1, разделенного на слои

ν, cm^{-1}	Тип колебаний
<i>Полосы поглощения холестерина</i>	
3672	ОН-группа кристаллизационной воды
2931	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, обусловленная растяжением CH_2 - и CH_3 -групп
2866	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ в CH_2 -группе
1462	$\nu(\text{C-H})$, $\delta(\text{C-H})$ в кольце
1377	$\delta(\text{C-H})$ в CH_2 -группе
1054	C-C в кольце
<i>Полосы поглощения билирубина и билирубината кальция</i>	
3500—3000	$\nu(\text{NH})$ -группы пиролла
1670—1620	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C=C})$
1250—1230	$\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$ в билирубине
838	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-H})$, $\delta(\text{N-H})$ в билирубинате кальция C-H вне плоскости изгиба
<i>Полосы поглощения фосфата и гидрофосфата кальция</i>	
1165—1150	P=O
955	PO_4^{3-}
593	PO_4^{3-}
<i>Полосы поглощения карбоната кальция</i>	
882	CO_3^{2-} в ватерите
877	CO_3^{2-} в кальците
799	C-O
738	O-C-O полиморфных модификаций CaCO_3
670	CO_3^{2-}

функционирующих процессов, например пищеварения. Вокруг такого центра формируется сферическое или сфероподобное окружение из молекул, которые испытывают притяжение к центру или, наоборот, создают вокруг него “мешок” отталкиваемых молекул. Молекулы “мешка” являются образованиями с замкнутыми спин-орбиталями, т. е. спин-скомпенсированными, к которым относятся молекулы типа холестерина. Нельзя упускать из внимания факт, что центром сферолитов могут выступать скопления органического вещества — холестерина, адсорбирующего на себя молекулы билирубина, которые являются радикалами — зародышами отложений. Совокупность этих процессов способствует слоистому формированию камня. Такой ассоциат не может быть выведен из организма путем метаболизма, чтобы предотвратить контакт химических реакций организма с радикалами отложений, происходит генерация “мешка”. Несколько циклов таких процессов ведут к укрупнению органоминеральных образований.

Заключение. Методы рентгенофазового анализа и ИК спектроскопии позволяют достаточно экспрессно получить информацию о химическом составе (основных составляющих) желчных камней. Показано, что рентгенофазовый анализ не отражает полного состава желчного камня, так как содержание других компонентов мало по сравнению с холестерином. Методом ИК спектроскопии установлено наличие в составе желчных камней таких компонентов, как билирубин, билирубинат кальция, карбонат кальция, фосфат и гидрофосфат кальция. Послойное разделение желчного камня показывает преобладание неорганических соединений во внешнем слое, что связано с механизмом формирования желчного камня. Неорганическая часть желчного камня представлена фазами карбоната кальция двух модификаций — кальцитом и ватеритом.

- [1] L. Klimek. *Archiv. Found. Engin.*, **11**, N 3 (2011) 117—120
- [2] A. Parviainen, J. M. Suarez-Grau, R. Perez-Lopez, J. M. Nieto, C. J. Carrido, G. Cobo-Cardenas. *Sci. Total Environ.*, **573** (2016) 433—443
- [3] C.-L. Cheng, H.-H. Chang, J.-H. Chen, P.-I. Tsai, Y.-T. Huang, P.-J. Huang, S.-Y. Lin. *Digestive and Liver Disease*, **48**, N 5 (2016) 519—527
- [4] I. Brezestean, N. Har, A. Tantau, M. Gorea, M. M. Venter, S. C. Pinzaru. *Studia UBB Chemia*, **60**, N 1 (2015) 29—43
- [5] J. M. Donovan. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **28**, N 1 (1999) 75—97
- [6] C. W. Ko, S. P. Lee. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **28**, N 1 (1999) 99—115
- [7] M. D. Apstein, M. C. Carey. *Europ. J. Clin. Investig.*, **26**, N 5 (1996) 343—352
- [8] P. Portincasa, A. Moschetta, G. Palasciano. *Lancet*, **368**, N 9531 (2006) 230—239
- [9] N. H. Afdal, B. F. Smith. *J. Hepatol.*, **11** (1990) 669—702
- [10] M. C. Carey. *Am. J. Surgery*, **165** (1993) 410—419
- [11] T. R. Rautray, V. Vijayan, S. Panigrahis. *Nucl. Instrum. Method. Phys. Res. B*, **255** (2007) 409—415
- [12] H. Weerakoon, A. Navarante, S. Ranasinghe, R. Sivakanesan, K. B. Galketiya, S. Rosario. *Plos one*, **10**, N 4 (2015) 1—12
- [13] Ф. Г. Унгер, Л. В. Цыро, А. А. Пичугина, Д. А. Афанасьев, С. А. Киселев. *Вестн. МГТУ им. Н. Э. Баумана. Сер. Естеств. науки*, № 4 (2016) 107—122
- [14] Y. Sun, Z. Yang, G. Shen, Y. Zhou, X. Zhou, J. Wu, G. Xu. *Sci. China B*, **44**, N 5 (2001) 449—456
- [15] I. S. Kim, S. J. Myung, S. S. Lee, S. K. Lee, M. H. Kim. *Yonsei Med. J.*, **44**, N 4 (2003) 561—570
- [16] L. Ravnborg, D. Jeilum, L. R. Redersen. *Scand J. Gastroenterol.*, **25**, N 2 (1990) 720—721
- [17] A. Iordanidis, J. Garcia-Guinca, C. Giosisef, A. Angelopoulos, M. Deulgerahis, L. Papadopoulou. *Spectrosc. Lett.*, **46** (2013) 301—306
- [18] А. А. Пичугина, Л. В. Цыро, Д. А. Афанасьев, С. А. Киселев, Ф. Г. Унгер. *Журн. прикл. спектр.*, **84**, № 1 (2017) 101—105 [A. A. Pichugina, L. V. Tsyro, D. A. Afanasyev, S. A. Kiselev, F. G. Unger. *J. Appl. Spectr.*, **84** (2017) 87—91]