

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 20, 1982, pp. 861–873

## Technik der infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse

Von A. Hesse

Harnsteinforschungsstelle der Urologischen Universitätsklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. W. Vahlensieck) und

K. Molt

Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH

(Eingegangen am 6. Juli/1. Oktober 1982)

**Zusammenfassung:** Für die qualitative und quantitative Analyse von Harnsteinen mit Hilfe der Infrarotspektroskopie wird die Technik der Durchführung erprobt und erläutert. Es wurden Infrarotspektren für alle bekannten, in Harnsteinen auftretenden Substanzen aufgenommen und interpretiert. An Beispielen wurden die Methoden der qualitativen und quantitativen Auswertung geprüft. Durch Anwendung einer IR-Datenstation wurden die Grundlagen für eine rechnerunterstützte automatische Auswertung von Infrarotspektren zur Harnsteinanalyse geschaffen.

### *The technique of analysis of urinary calculi by infra-red spectroscopy*

The technical procedure is tested and elucidated for the qualitative and quantitative analysis of urinary calculi by infra-red spectroscopy. Infra-red spectra of all substances, known to occur in urinary calculi were recorded and interpreted. The methods of the qualitative and quantitative evaluation were tested on various examples. Using an infra-red data station, the basis of a computerized automatic evaluation of infra-red spectra for the analysis of urinary calculi was established.

### Einführung

Für eine gezielte Metaphylaxe bei Harnsteinleiden ist die Steinanalyse einer der wichtigsten klinisch-chemischen Befunde. Dabei ist es nicht ausreichend, aus einer Lösung des Harnsteines die vorhandenen Ionen zu bestimmen, zumal Ringversuche zur Qualitätskontrolle der Harnsteinanalyse eine hohe Fehlerquote bei Anwendung von chemischen Methoden ergaben (1). Heute ist es notwendig, aus verschiedenen Zonen des Harnsteines den unveränderten Kristall- oder Molekülzustand der Phasen zu ermitteln. Daraus können differenzierte Aussagen zur Genese und der möglichen Therapie gewonnen werden (2).

Dafür sind Methoden geeignet, die mit geringem Probenmaterial (1–10 mg) auskommen und eine Direktuntersuchung des Materials ermöglichen. Mit der Röntgendiffraktion (3) können alle gut kristallisierten Bestandteile identifiziert werden. Dagegen erlaubt die Infrarotspektroskopie die direkte Identifizierung von Atomgruppen mit kovalenten Bedingungen in Harnsteinen (4, 5). In der vorliegenden Arbeit werden

die Technik der infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse mitgeteilt und für alle bekannten Harnsteinsubstanzen die Infrarotspektren interpretiert sowie die qualitativen und quantitativen Methoden der Harnsteinanalyse erläutert.

### Material und Methode

Aus synthetischen Materialien und Harnsteinsubstanzen wurden Infrarotspektren mit der Kaliumbromid-Preßtechnik hergestellt.

#### Vorbereitung der Probe für die Messung

Unabhängig von der Art der Harnsteinanalyse ist ein richtiges Ergebnis nur zu erhalten, wenn eine repräsentative Probenahme erfolgt. Auch kleine Steine können aus mehreren Komponenten bestehen und untergeordnete Mischanteile für die Auslösung der Steinbildung verantwortlich sein. Deshalb wurde bei uneinheitlicher makroskopischer Struktur eine Analyse aus mehreren Zonen des Harnsteines angefertigt. Könnte dies bei kleineren Steinen nicht erfolgen, wurde die gesamte Probe in einem Achatmörser zermahlen (Tab. 1).

0340-076X/82/0020-0861\$02.00

© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

Tab. 1. Aufwand für eine infrarotspektroskopische Harnsteinanalyse.

1. Beurteilung des Harnsteines	– Gewicht – Oberflächenstruktur – Farbe		
2. Probengewinnung	– Steine > 3 mm	Durchmesser	zersägen und aus verschiedenen Zonen repräsentative Proben nehmen
	– Steine < 3 mm	Durchmesser	insgesamt im Achatmörser zermahlen
3. Probenmenge	– 0,5–1,5 mg	Normalpreßwerkzeug	(Durchmesser des Preßlings 13 mm)
	– 10–20 µg	Mikropreßwerkzeug	(Durchmesser des Preßlings 1,5 mm)
4. Trägermaterial KBr optisch rein	– 250–300 mg	Normalpreßwerkzeug	
	– 5–7 mg	Mikropreßwerkzeug	
5. Vermischen von KBr + Probe	– 20–30 s		in Mahlkapsel aus Achat oder Edelstahl in Schwingmühle vermischen
6. Herstellen der Preßlinge	– unter Vakuum		(Ausschluß von Luftfeuchtigkeit) wird bei 8 t/cm <sup>2</sup> der Preßling gepreßt
7. Gesamtzeit für Probenvorbereitung 1.–6.	– 5 min		
8. Aufnahme des IR-Spektrums	– Analysenzeit 8 min		
9. Auswertung	– in Abhängigkeit von Erfahrung und Methode	2–10 min	
10. Gesamtzeit	– 15–20 min, effektive Arbeitszeit	7–15 min	
11. Kosten an Verbrauchsmaterial	– Strom, 0,05 DM für KBr, 0,60 DM für Schreiberpapier		

Für die infrarotspektroskopische Untersuchung muß das Harnsteinmaterial mit einer inerten Trägersubstanz, die in dem zu untersuchenden Spektralbereich keine Absorptionen zeigt, homogenisiert werden. Dazu eignet sich am besten optisch reines Kaliumbromid. Das Harnsteinmaterial wurde mit der Trägersubstanz in einer Schwingmühle zermahlen. Für eine reproduzierbare Auswertung mit Geräten ohne Datenverarbeitung müssen beide Komponenten vor der Vermischung abgewogen werden. Nach dem Mahlprozeß wurde aus dem Gemisch in einer Preßvorrichtung ein glasklarer Preßling hergestellt. Dieser Preßling wurde dann in den Strahlengang des IR-Spektrometers gebracht und das Spektrum aufgezeichnet.

In Tabelle 1 ist der Aufwand für eine Harnsteinanalyse mit den technischen Daten zusammengefaßt.

#### Aufnahme des Infrarot-Spektrums

Bei konstanten Bedingungen, die für die Untersuchung von Kaliumbromid-Preßlingen abhängig vom Gerät leicht eingestellt werden können, wurde das IR-Spektrum aufgenommen. Dabei ist es für Harnsteinsubstanzen notwendig, ein Gerät zu verwenden, das im Wellenzahlbereich von 4000 cm<sup>-1</sup> bis mindestens 400 cm<sup>-1</sup> messen kann.

#### Ergebnisse

##### Qualitative Analyse

Für die qualitative Analyse wurden Vergleichsspektren von Reinsubstanzen für alle in Harnsteinen auftretenden Verbindungen genommen. In den Tafeln I–VI sind die IR-Spektren für alle wichtigen Harnsteinsubstanzen zusammengestellt. Diese Vorlagen können direkt für eine Auswertung verwendet werden. Zum besseren Verständnis werden im folgenden die Spektren erläutert.

#### 1 Harnsäure

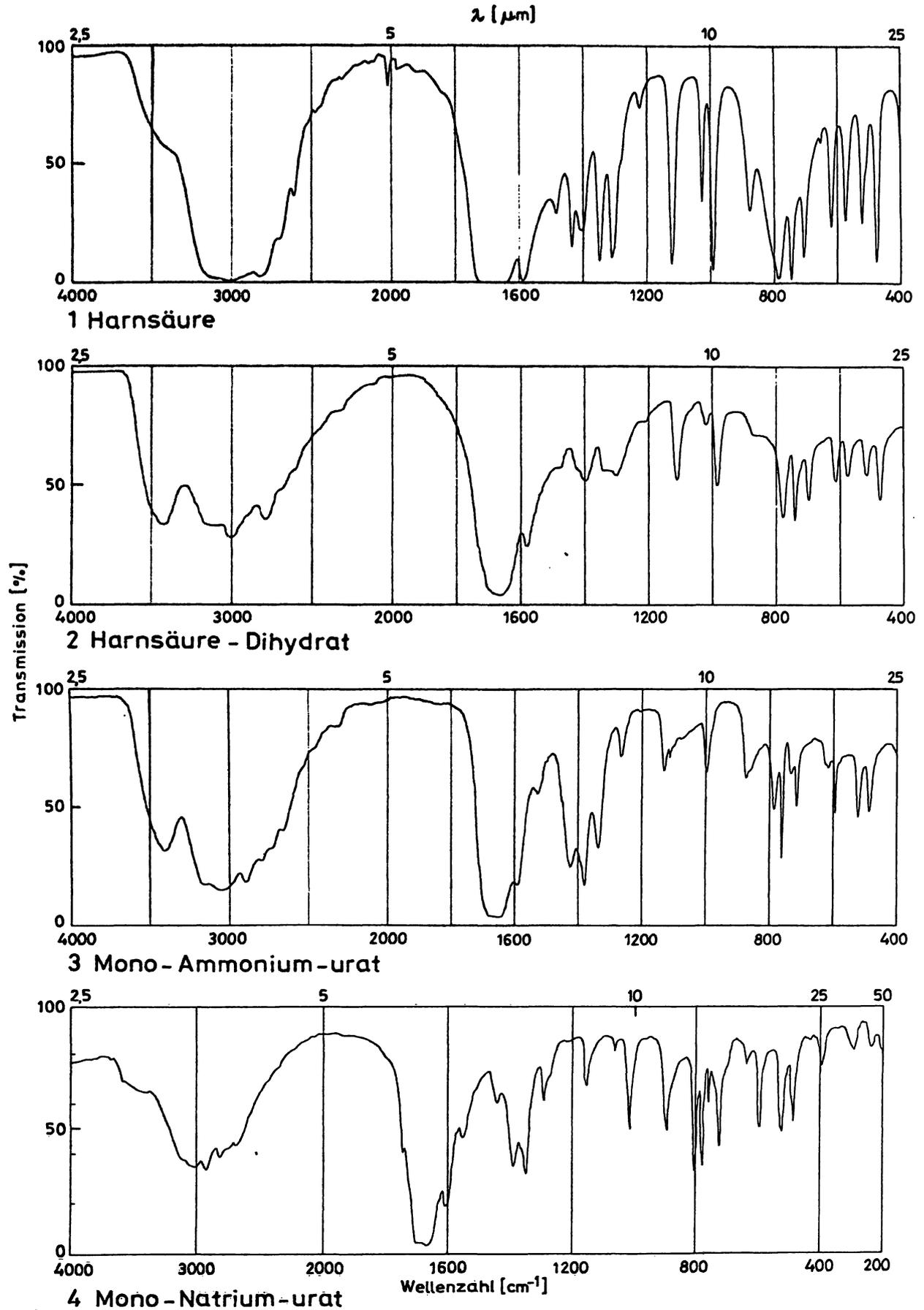
Die IR-Spektren von Harnsäure und ihren Salzen sind sehr bandenreich. Starke Absorptionen sind auch bei Gemischen gut zuzuordnen. Die Bandengruppierung von 400–800 cm<sup>-1</sup> ist besonders wichtig; in diesem Bereich liegen die meisten Unterschiede zu den anderen im Harnstein vorkommenden Purinkörpern. Andere charakteristische Absorptionen liegen bei 1591, 1675, 2825 und 3010 cm<sup>-1</sup>.

#### 2 Harnsäure-Dihydrat

Zur Unterscheidung von wasserfreier Harnsäure ist besonders auf die Veränderungen an der Bande bei 515 cm<sup>-1</sup> zu achten. Die Bande wird breiter und erhält eine Schulter. Des weiteren fehlt gegenüber der Harnsäure die Bande bei 873 cm<sup>-1</sup>, und die Absorptionen bei 1303, 1346, 1403 und 1430 cm<sup>-1</sup> haben eine andere Intensität und Form. Die Hydratwasser-Bande bei 3505 cm<sup>-1</sup> ist ein wichtiges Indiz.

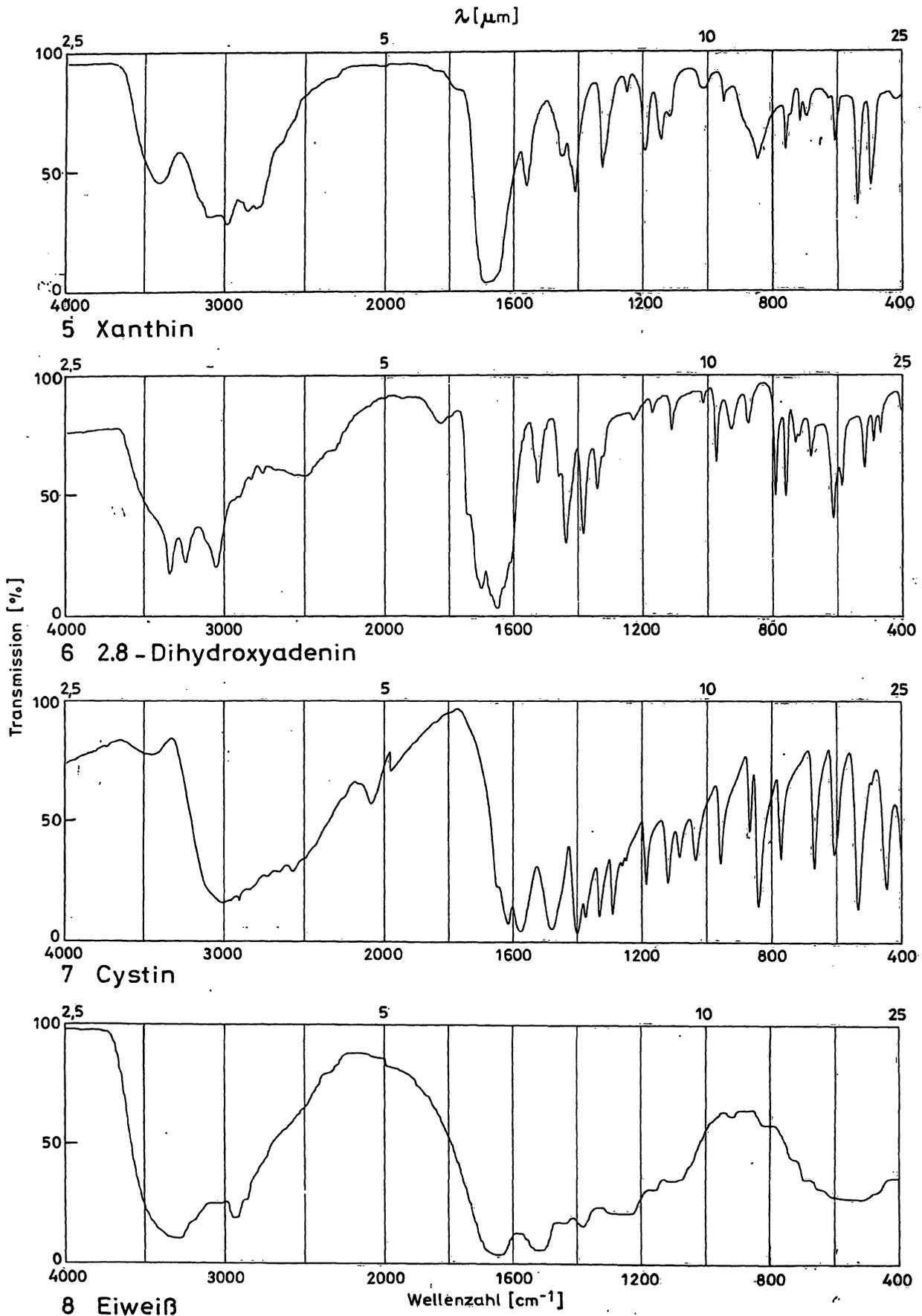
#### 3 Mono-ammoniumurat

Die Bande bei 598 cm<sup>-1</sup> ist eine eindeutige Abweichung zur Harnsäure und zu Harnsäure-Dihydrat. Außerdem ist die Bandengruppierung zwischen 1200–1600 cm<sup>-1</sup> charakteristisch, in diesem Bereich sind auch wichtige Unterschiede zum Mono-natriumurat-Monohydrat.



Tafel I Infrarotspektren von  
 1 Harnsäure  
 2 Harnsäure-Dihydrat

3 Mono-ammonium-urat  
 4 Mono-natrium-urat (beachte den Maßstab!)  
 Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standards zur Harnsteinanalyse



Tafel II Infrarotspektren von  
 5 Xanthin  
 6 2.8-Dihydroxyadenin

7 Cystin  
 8 Eiweiß  
 Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standard zur Harnsteinanalyse



**Walter de Gruyter  
Berlin · New York**

**D. Brandenburg  
A. Wollmer**  
(Editors)

**Insulin  
Chemistry, Structure and  
Function of Insulin  
and Related Hormones**

**Proceedings of the Second International  
Insulin Symposium,  
Aachen, Germany, September 4-7, 1979**

1980. 17 cm x 24 cm. 752 pages. Numerous figures.  
Hardcover. DM 170,-; approx. US \$81.00  
ISBN 3 11 008156 3

These proceedings of the Insulin Symposium present the current state of knowledge and research in the field of Insulin. The problems are presented and discussed from various standpoints (chemistry, biochemistry, biology, crystallography, immunology and medicine).

**Contents:** Introduction  
Sections I-XI

Structure of Insulin · Peptide Synthesis · Semisynthesis and Chemical Modification · Radioactive Labelling and Separation Techniques · Receptors and Hormone-Receptor Interaction · Photo-Induced Hormone-Receptor Coupling · Structure, Binding, Activity · Degradation · Immunology · Biosynthesis, Storage, Evolution · Insulin-Related Hormones.  
Abbreviations · Subject Index · Author Index.

**K. Keck  
P. Erb**  
(Editors)

**Basic and Clinical Aspects  
of Immunity to Insulin**

**Proceedings. International Workshop,  
September 28-October 1, 1980,  
Konstanz, Germany**

1981. 17 cm x 24 cm. XIV, 442 pages. Numerous illustrations.  
Hardcover. DM 140,-; approx. US \$66.75  
ISBN 3 11 008440 6

In order to integrate the large quantities of information available regarding the chemistry and immunology of insulin as well as the clinical aspects of diabetes and its control, it is necessary to establish interdisciplinary lines of communication between specialists in these various fields. It was the intention of a Symposium held in Konstanz, FRG, from September 28 to October 1, 1980, to bring together clinicians, immunologists and chemists active in insulin research, to provide an open forum to exchange ideas and experience, to establish contacts and to intensify cooperation between these groups.

Prices are subject to change without notice.



**Walter de Gruyter  
Berlin · New York**

**F. Lottspeich  
A. Henschen  
K.-P. Hupe**  
(Editors)

**High Performance  
Liquid Chromatography in Protein  
and Peptide Chemistry**

**Proceedings. International Symposium,  
January 1981,  
Max-Planck-Institute for Biochemistry,  
Martinsried/Munich, Germany**

1982. 17 cm x 24 cm. XVIII, 388 pages. Numerous illustrations.  
Hardcover. DM 145,-; approx. US \$69.25  
ISBN 3 11 008542 9

Chromatography is one of the most versatile methods in modern biochemical and pharmacological work. The field is rapidly developing and the book is intended to be an up-to-date survey of the most recent developments of methods related to protein, peptide and amino acid analysis.

**I. Molnar**  
(Editor)

**Practical Aspects of  
Modern HPLC**

**Symposium, December 7-8, 1981, Berlin**

1982. 17 cm x 24 cm. VIII, 449 pages. Numerous illustrations.  
Hardcover. DM 170,-; approx. US \$81.00  
ISBN 3 11 008892 4

**A. Henschen  
H. Graeff  
F. Lottspeich**  
(Editors)

**Fibrinogen**

**Recent Biochemical and Medical Aspects  
Proceedings. International Symposium,  
February 17-18, 1981,  
Max-Planck-Institute for Biochemistry  
Martinsried/Munich, Germany**

1982. 17 cm x 24 cm. X, 400 pages. Numerous illustrations.  
Hardcover. DM 135,-; approx. US \$64.50  
ISBN 3 11 008543 7

**Allen/Bienvenu/  
Laurent/Suskind**  
(Editors)

**Marker Proteins in Inflammation  
Proceedings of the Symposium  
Lyon, France, April 22-25, 1981**

1982. 17 cm x 24 cm. XVI, 608 pages. Numerous illustrations.  
Hardcover. DM 185,-; approx. US \$88.25  
ISBN 3 11 008625 5

Prices are subject to change without notice.

#### 4 Mono-natriumurat-Monohydrat

Natriumurat kommt außerordentlich selten in Harnsteinen vor. Wichtig ist die Unterscheidung von Ammoniumurat; diese ist durch die Banden bei 719, 198, 1338, 1380 und  $1458\text{ cm}^{-1}$  gegeben.

#### 5 Xanthin

Xanthin ist als Harnstein eine Rarität. Als Purin-Derivat besitzt es ein sehr bandenreiches Spektrum. Die Unterscheidung von anderen Purinkörpern ist unproblematisch. Typische Absorptionen liegen bei 497, 537, 613, 849, 1120, 1151, 1200 und  $1697\text{ cm}^{-1}$ .

#### 6 2.8-Dihydroxy-adenin

Die Bandenfolge zwischen  $450\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  unterscheidet sich typisch von anderen Purinkörpern. Charakteristisch sind die Absorptionen bei 3045, 3238 und  $3338\text{ cm}^{-1}$ , die in keinem anderen Harnsteinmaterial auftreten.

#### 7 Cystin

Charakteristische Banden für die -S-S- Banden liegen bei  $400\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ . Die Bandengruppierung zwischen  $1200\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  ist für die Identifizierung in Gemischen wichtig.

#### 8 Eiweiß

Proteine haben eine typische, assoziierte NH-Valenzschwingungsbande bei  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Die Amidbanden I und II bei 1650 und  $1525\text{ cm}^{-1}$  sind ebenfalls charakteristisch. Die CH-Absorptionen bei  $2880\text{ cm}^{-1}$  und  $2970\text{ cm}^{-1}$  geben häufig den Hinweis für das Vorliegen von Eiweißen in Mischsteinen.

#### 9 Whewellit

Die Unterscheidung der beiden Calciumoxalat-Hydrate Whewellit und Weddellit ist anhand der IR-Spektren sehr gut möglich. Für Whewellit liegen die charakteristischen Absorptionen bei 655, 781, 883 und  $948\text{ cm}^{-1}$ , und zum Unterschied zum Weddellit ist die Hydratwasser-Valenzschwingungsbande in 5 Einzelbanden von  $3058\text{--}3488\text{ cm}^{-1}$  aufgespalten.

#### 10 Weddellit

Im Gegensatz zu Whewellit ist die Hydratwasserbande bei  $3488\text{ cm}^{-1}$  breit und nicht aufgespalten. Die C = O-Valenzschwingungsbande liegt bei  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Charakteristisch zur Unterscheidung von Whewellit sind auch die Absorptionen bei 608 und  $910\text{ cm}^{-1}$ .

#### 11 Whitlockit, Apatit

Beide Verbindungen sind chemisch Tricalciumphosphate und deshalb im IR-Spektrum identisch. Das Spektrum ist sehr bandenarm. Die Hauptabsorptionen liegen bei 1032, 562 und  $602\text{ cm}^{-1}$ .

#### 12 Hydroxylapatit

Zur Unterscheidung vom Apatit ist die Bande bei  $631\text{ cm}^{-1}$  charakteristisch. Bei Untersuchung des Bereiches von  $200\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  werden typische Banden nachgewiesen. In Harnsteinen und anderem biologischen Material konnte mit der IR-Spektroskopie ein solches Phosphat nicht nachgewiesen werden.

#### 13 Carbonatapatit

Die Carbonatbanden bei 850, 1414 und  $1457\text{ cm}^{-1}$  sind für dieses Phosphat charakteristisch und geben eine leichte Unterscheidungsmöglichkeit zum Apatit. Das Carbonat substituiert im Ca-Phosphat eine Phosphatgruppe. Es liegt nicht als  $\text{CaCO}_3$  vor.

#### 14 Amorphes Calciumphosphat

Calciumphosphat kann sehr schlecht kristallisiert im Harnstein und auch anderen Biomineralisaten auftreten. Die Aufspaltung der Bande bei 562 und  $602\text{ cm}^{-1}$  (siehe Apatit) ist ein Maß für den Kristallisationsgrad. Im amorphen Ca-Phosphat findet man eine breite Bande bei  $575\text{ cm}^{-1}$ .

#### 15 $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 1\text{ H}_2\text{O}$

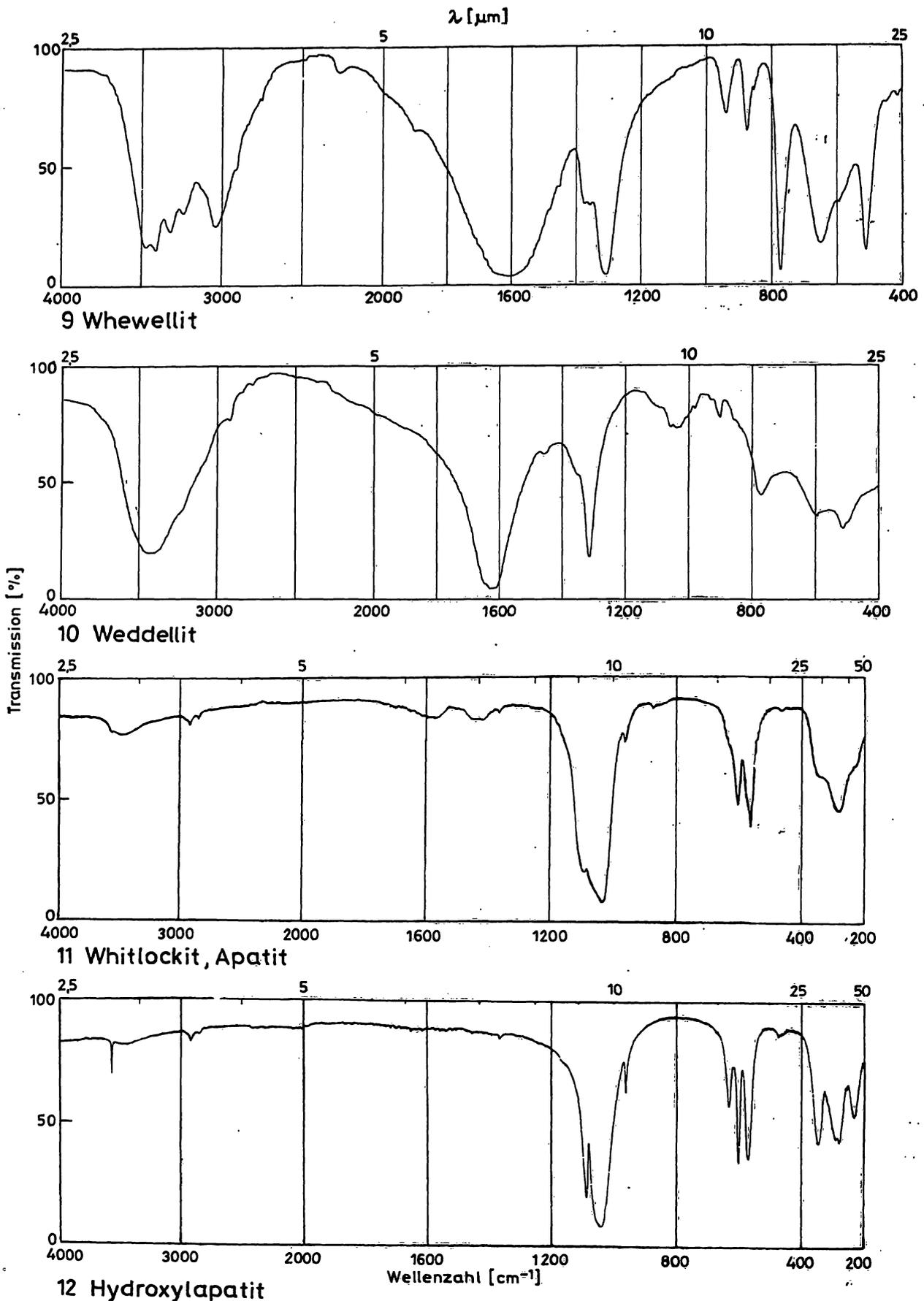
Dieses Magnesiumphosphat ist eine sehr seltene Harnsteinkomponente; es muß als Alterungsprodukt von Struvit angesehen werden. Die Lage der Banden zwischen  $400\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  ist von den Calciumphosphaten deutlich abweichend und bei  $1655\text{ cm}^{-1}$  tritt eine charakteristische Bande für das Kristallwasser im Molekül auf.

#### 16 Struvit

Struvit wird vor allem bei gleichzeitig bestehender Infektion in Steinen gefunden und kann durch die typischen Banden bei 566, 750 und  $990\text{ cm}^{-1}$  auch in Gemischen leicht identifiziert werden.

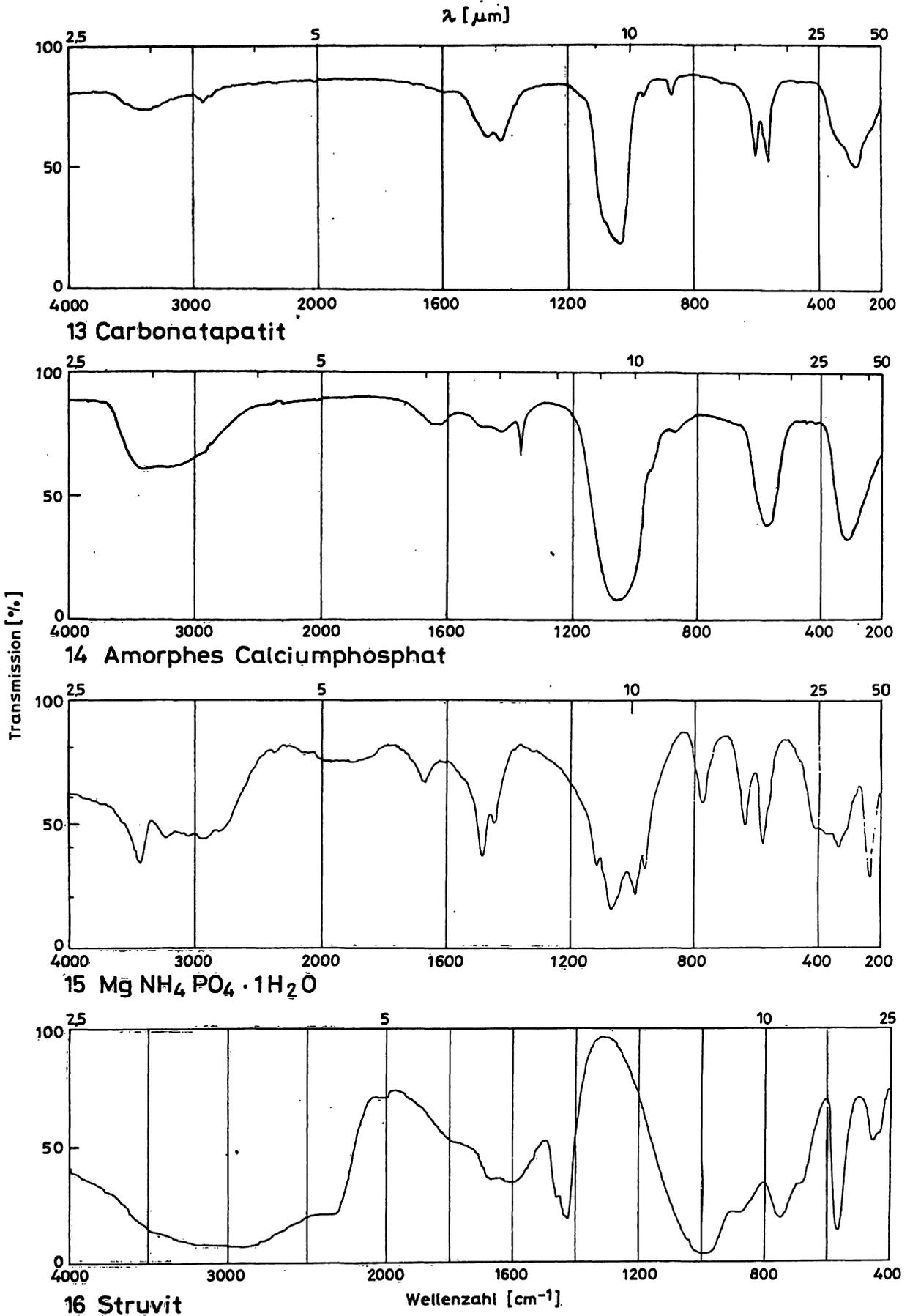
#### 17 Brushit

Durch die mehrfach aufgespaltene Phosphatbande zwischen  $800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  kann dieses saure Calciumphosphat gut von anderen Phosphaten unterschieden werden.



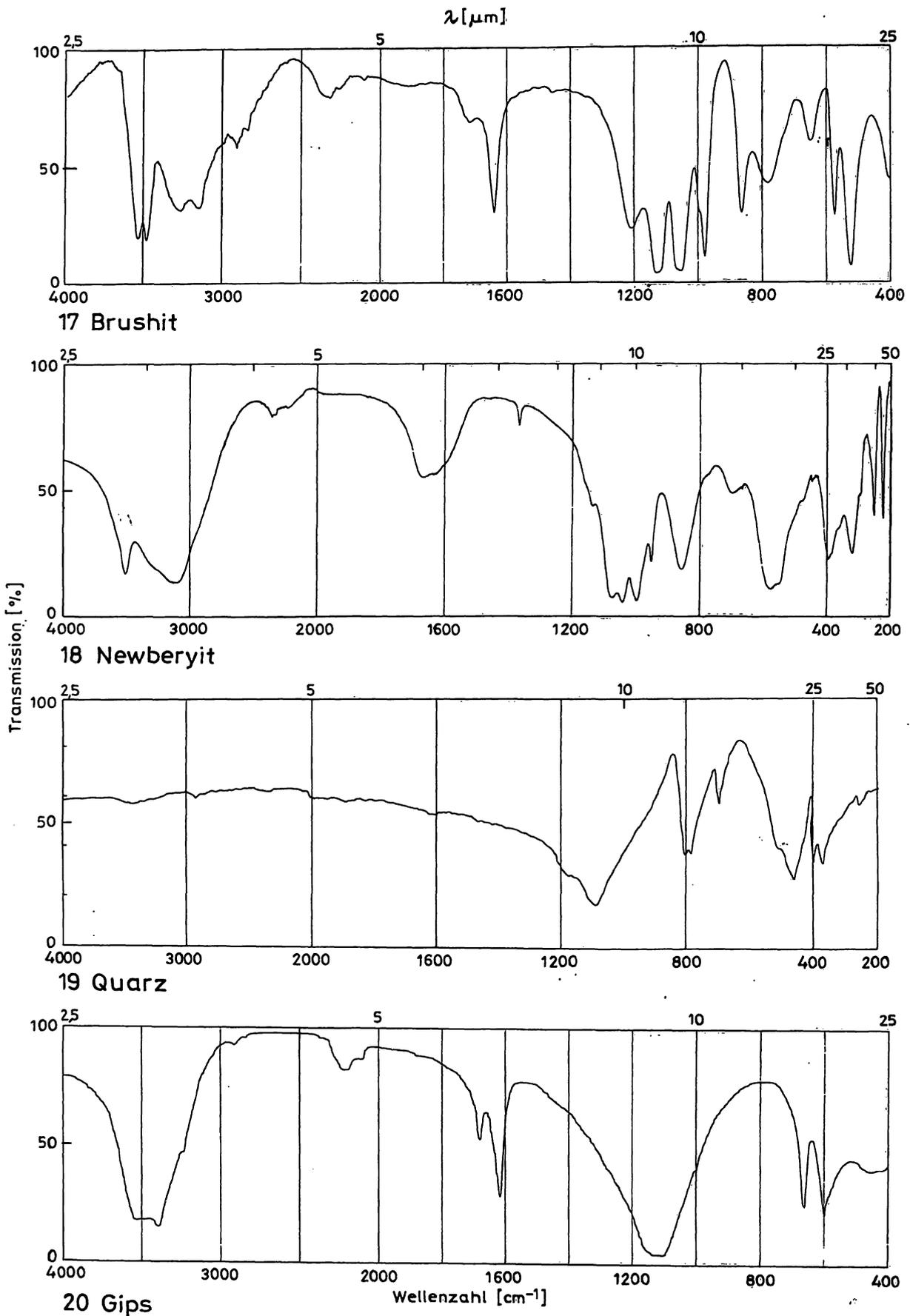
Tafel III Infrarotspektren von  
 9 Whewellit  
 10 Weddellit

11 Whitlockit, Apatit (beachte den Maßstab!)  
 12 Hydroxylapatit (beachte den Maßstab!)  
 Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standards zur Harnsteinanalyse



Tafel IV Infrarotspektren von  
13 Carbonatapatit (beachte den Maßstab!)  
14 Amorphe Calciumphosphat (beachte den Maßstab!)

15 Magnesium-ammonium-phosphat-Monohydrat (beachte den Maßstab!)  
16 Struvit  
Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standards zur Harnsteinanalyse



Tafel V Infrarotspektren von  
 17 Brushit  
 18 Newberyit (beachte den Maßstab!)

19 Quarz (beachte den Maßstab!)  
 20 Gips  
 Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standard zur Harnsteinanalyse

18, 19, 20 *Newberyit, Quarz (SiO<sub>2</sub>), Gips*

Diese Substanzen wurden bisher nur in Harnsteinen von Tieren nachgewiesen. Die IR-Spektren weichen charakteristisch von denen der Harnsteine des Menschen ab. Besonders Gips und Quarz (Kieselstein) werden gelegentlich als Artefakte von den Patienten abgegeben.

Aragonit bzw. Vaterit kann in Gallensteinen und Prostatasteinen vorkommen. Die drei Modifikationen unterscheiden sich in Lage und Zahl der Hauptabsorptionen.

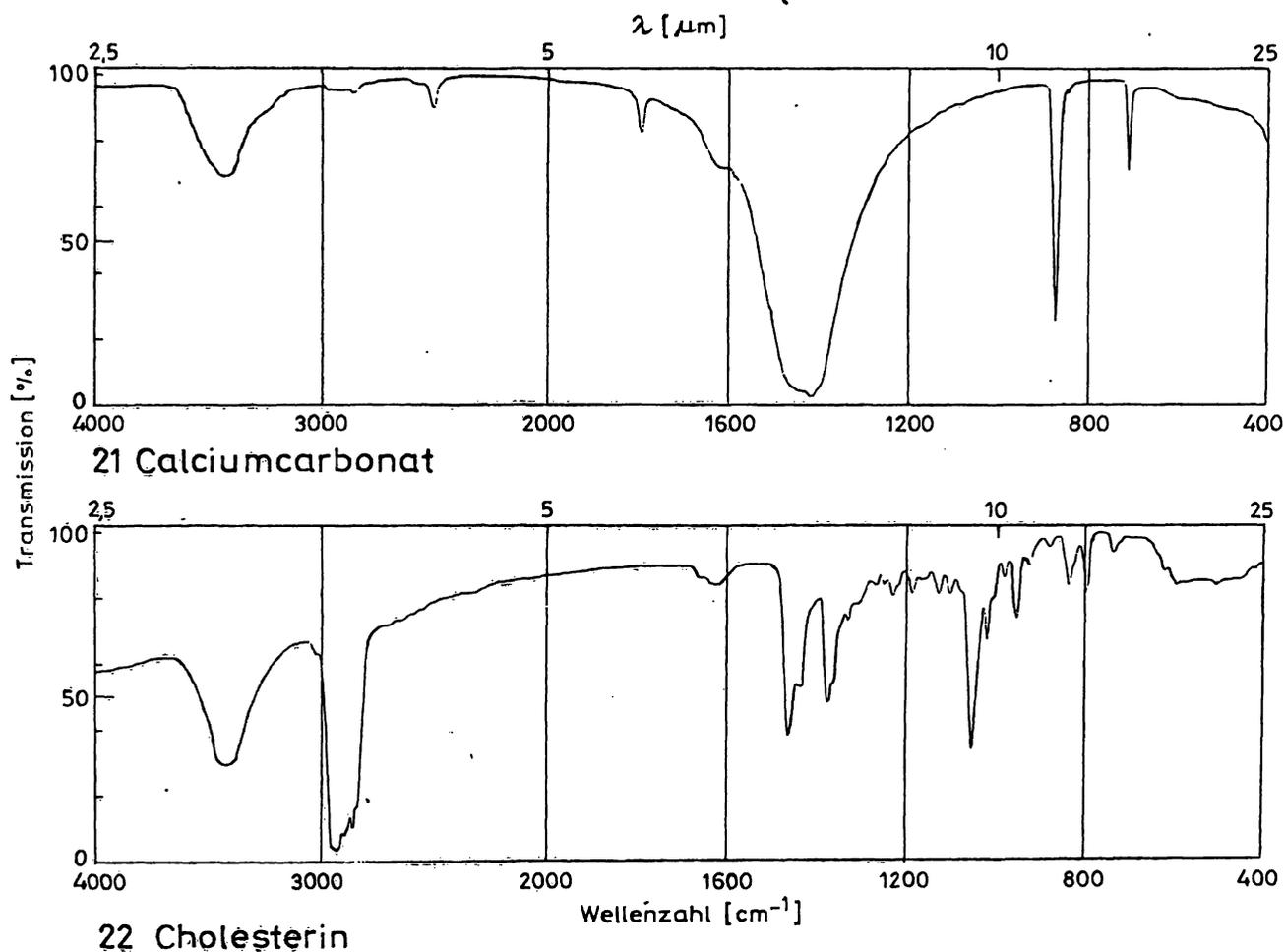
<i>Calcit</i>	708, (842), 872, 1420 cm <sup>-1</sup>
<i>Argonit</i>	700, 712, (852), 860, 878, 1084, 1408 cm <sup>-1</sup>
<i>Vaterit</i>	742, (850), 878, 1090, 1403–1480 cm <sup>-1</sup>

21 *Calciumcarbonat (Calcit)*

Calciumcarbonat kann in 3 Kristallsystemen, als Calcit, Aragonit und Vaterit, kristallisieren. Der Nachweis in Harnsteinen des Menschen ist nicht gesichert. Beim positiven Carbonatnachweis liegt stets Carbonatapatit vor. In Steinen von Tieren wurde Calcit bestimmt.

22 *Cholesterin*

Cholesterin ist ein Hauptbestandteil der Gallensteine. Die Absorption bei 1051 cm<sup>-1</sup> und die Bandengruppen zwischen 1360–1465 cm<sup>-1</sup> sowie 2800–3000 cm<sup>-1</sup> sind typisch.



Tafel VI Infrarotspektren von

21 Calciumcarbonat

22 Cholesterin

Spektren reiner Substanzen als Vergleichs-Standards zur Harnsteinanalyse

### Auswertung zur qualitativen Analyse

Aus den vorangegangenen Erläuterungen der wichtigsten IR-Spektren für reine in Harnsteinen auftretende Verbindungen kann abgeleitet werden, daß durch Zuordnung der charakteristischen Banden eine qualitative Analyse keine Schwierigkeiten bereitet. Auch in Mehrstoffgemischen konnte in einem IR-Spektrum von  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  die einzelne Verbindung im Harnstein ab Anteilen von 0,05–0,10 nachgewiesen werden. Durch eine differenzierte Präparation aus mehreren Steinabschnitten wurde die Analyse noch verbessert. Die Testspektren sollten jeweils mit dem zur Verfügung stehenden Gerät aufgenommen und mit den „Literaturspektren“ verglichen werden. Durch Aufnahme von Teilspektren, bei zu geringer Auflösung oder schlechter Justierung der Geräte können die Spektren ungeeignet für eine eindeutige Auswertung werden. Für die qualitative Analyse stehen verschiedene Auswertungsverfahren zur Verfügung:

1. Zuordnung einzelner charakteristischer Absorptionen anhand von Vergleichsspektren,
2. Aufstellung und Vergleich von Bandentabellen,
3. Rechnerauswertung.

Ohne Datenverarbeitung hat sich für uns die Kombination der Methoden 1) und 2) für die Routineanalyse bewährt.

### Quantitative Analyse

Für eine quantitative infrarotspektroskopische Harnsteinanalyse wurden die bekannten Zweistoff-Kombinationen in Harnsteinen aus synthetischem Material hergestellt. 10-Prozent-Abstufungen sind dafür ausreichend.

Bei Verwendung eines Rechners können die Mischspektren aus den Spektren der Reinsubstanzen simuliert werden.

Die Auswertung erfolgt entweder

1. durch Einordnung in die Testspektren (Transmission oder Absorption),
2. durch manuelle oder rechnerische Auswertung von charakteristischen Banden (Transmission oder Absorption) mit Hilfe von Standardkurven.

Die angegebenen quantitativen Methoden lassen sich an den modernen IR-Geräten durch Aufnahme der Spektren im linearen Absorptionsmaßstab am besten verwirklichen. Die Auswertung wird an nicht koinzidierenden, ausgewählten Analysenbanden vorgenommen. Dabei kann die Bandenhöhe oder Bandenfläche vermessen werden.

Auf einer Minidiskette wurde eine Testbibliothek der wichtigsten in Harnsteinen enthaltenen Substanzen und einiger in der Praxis relevante Mischungen abge-

speichert. Eine Bibliothekssuche einschließlich Interpretation benötigt etwa 20 Sekunden. Als Ergebnis wird eine Folge der ähnlichsten Substanzen ausgedruckt (Tab. 2). Jeder Substanz sind zwei Ziffern zwischen 0 und 9 vorangestellt, welche die Übereinstimmung mit dem aufgenommenen Spektren zeigen, wobei 0 keine und 9 maximale Übereinstimmung bedeutet.

Tab. 2. Rechnerauswertung zur qualitativen infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse. Ausdruck der Reihenfolge ähnlichster Substanzen.

```

NEAREST FIFTEEN SPECTRA FROM LIBRARY :      H64A  PEAKM  05

 9 HA064A WHEWELLIT (CALCIUMOXALAT-MONOHYDRAT)
 5 HA076Z 80% WHEWELLIT + 20% WEDDELLIT
 5 HA073Z 80% WHEWELLIT + 20% HARNSAURE
 3 HA066A 80% WHEWELLIT + 20% APATIT
 3 HA067Z 50% WHEWELLIT + 50% APATIT
 2 HA077Z 50% WHEWELLIT + 50% WEDDELLIT
 1 HA017Z WEDDELLIT (CALCIUMOXALAT-DIHYDRAT)
 0 HA068Z 20% WHEWELLIT + 80% APATIT
 0 HA078Z 20% WHEWELLIT + 80% WEDDELLIT
 0 HA067A WEDDELLIT (CALCIUMOXALAT-DIHYDRAT, SYNTH.)
 0 HA061Z GIPS (CALCIUMSULFAT-DIHYDRAT)
 0 HA003A STRUVIT (MAGNESIUMAMMONIUMPHOSPHAT-HEXAHYDRAT)
 0 HA080Z HOPEIT (ZINKPHOSPHAT-TETRAHYDRAT)
 0 HA006A BRUSHIT (CALCIUMHYDROGENPHOSPHAT-MONOHYDRAT)
 0 HA057Z CALCIUMCARBONAT
  
```

Always compare hard copy spectra before accepting identification

Die erste Ziffer bezieht sich auf die Strukturübereinstimmung, die zweite auf die Übereinstimmung der Bandenlagen. Zusätzlich steht vor jeder ausgedruckten Verbindung ein Hinweis auf die Nummer des Spektrums in einer Spektrensammlung, was einen raschen Spektrenvergleich zur endgültigen Identifizierung ermöglicht. Auf diese Bestätigung des Ergebnisses durch visuellen Vergleich sollte auf keinen Fall verzichtet werden.

Für Gemische steht ein speziell entwickelter Suchalgorithmus (MIXSEARCH) zur Verfügung. Abbildung 1 zeigt ein normiertes Harnsteinspektrum, wobei es

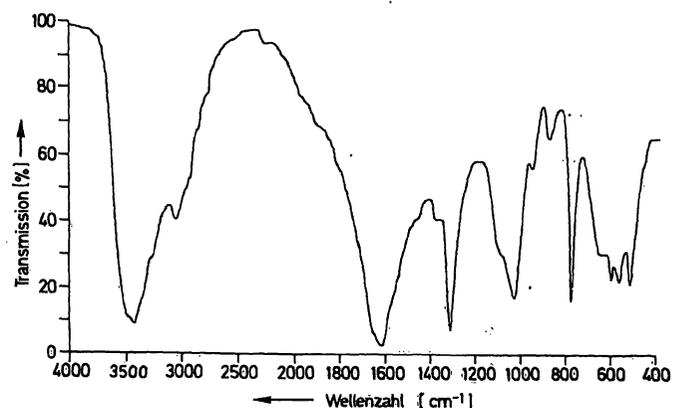


Abb. 1. Normiertes IR-Spektrum eines Ca-Oxalat-/Apatit-Mischsteines.

sich offensichtlich um einen Apatit/Ca-Oxalat-Mischstein handelt. Das Ergebnis der automatischen Bibliothekssuche zeigt Tabelle 3. Die besten Übereinstimmungen weisen Whewellit (9-3), Carbonatapatit (8-3) und ein Gemisch aus 80% Whewellit und 20% Apatit (9-4) auf. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, daß es sich bei der vorliegenden Probe um ein Gemisch handelt. Die Hauptkomponenten werden vom SEARCH-Programm richtig erkannt.

Tab. 3. Rechnerauswertung zur quantitativen infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse.

```

NEAREST FIFTEEN SPECTRA FROM LIBRARY :   H44   MIXS   05

9-4 HA066A 80% WHEWELLIT + 20% APATIT
9-3 HA064A WHEWELLIT (CALCIUMOXALAT-MONOHYDRAT)
9-1 HA067Z 50% WHEWELLIT + 50% APATIT
9-0 HA072Z 20% STRUVIT + 80% APATIT
9-0 HA006A BRUSHIT (CALCIUMHYDROGENPHOSPHAT-MONOHYDRAT)
9-0 HA038A AMMONIUMURAT
9-0 HA079Z RIINDERALBUMIN
9-3 HA040Z CARBONATAPATIT
8-1 HA061Z GIPS (CALCIUMSULFAT-DIHYDRAT)
9-1 HA076Z 80% WHEWELLIT + 20% WEDDELLIT
8-1 HA073Z 80% WHEWELLIT + 20% HARNSAEURE
8-1 HA068Z 20% WHEWELLIT + 80% APATIT
8-0 HA057Z CALCIUMCARBONAT
8-0 HA081Z VATERIT (CALCIUMCARBONAT)
8-0 HA078Z 20% WHEWELLIT + 80% WEDDELLIT

```

Always compare hard copy spectra before accepting identification

Die Vollständigkeit der Bibliothek würde voraussetzen, daß eine große Zahl von der in der Praxis vorkommenden Mischungen synthetisiert und aufgenommen würde, was zwar in Bezug auf die Speicherkapazität des Systems unproblematisch ist, jedoch einen sehr hohen präparativen Arbeitsaufwand erfordert. Da dieser jedoch nur einmal aufzubringen ist, erscheint dies lohnenswert.

#### Rechnerunterstützte Auswertung der IR-Spektren von Harnsteinen

Der Zeitaufwand für ein IR-Spektrum einschließlich Probenpräparation beträgt etwa 10–15 Minuten. Hieran schließt sich jedoch noch die Auswertung an, und dies ist der kritischste Schritt im gesamten Analysenablauf. Um den Informationsgehalt eines IR-Spektrums schnell und richtig auszuwerten, bedarf es einiger Erfahrung. Im allgemeinen wird das Spektrum an Hand charakteristischer Banden zunächst einer bestimmten Verbindungs-kategorie zugeordnet und anschließend zur genauen Identifizierung mit den in Frage kommenden Spektren einer Spektrensammlung verglichen. Hierbei ist zu beachten, daß Harnsteine aus einem Gemisch mehrerer Substanzen bestehen können, was die Auswertung weiter kompliziert.

Sowohl für die Aufgabe der Spektreninterpretation wie auch für die Bibliothekssuche bietet sich die Unterstützung durch einen Computer an. Es kann hierfür ein in der Praxis der analytischen Chemie bereits bewährtes Identifizierungsprogramm mit dem Namen SEARCH, das auf einem on-line mit dem IR-Gerät gekoppelten Tischrechner („IR-Datenstation“) läuft (6), verwendet werden. Das Spektrum wurde dafür mit einer konstanten Schrittweite von  $1\text{ cm}^{-1}$  digitalisiert, rechnerisch geglättet und so normiert, daß die maximale Transmission 100% und die minimale 3,16% (0–1,5 Absorptionseinheiten) beträgt. Die normierte Darstellung ist vorteilhaft für Vergleichszwecke, da die Bandenintensitäten unabhängig von der eingewogenen Substanzmenge werden, vorausgesetzt, daß keine Transmissionswerte unter 3,16% auftreten.

Um letzteres zu vermeiden, wurden Einwaagen von deutlich unter 1 mg Substanz pro 300 mg Kaliumbromid verwendet. Abbildung 2 zeigt das normierte

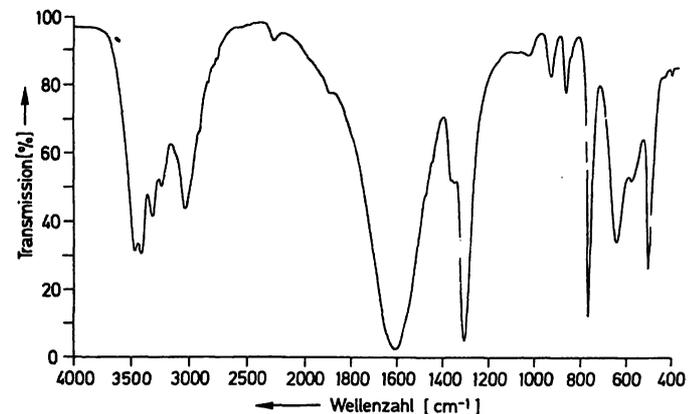


Abb. 2. Normiertes IR-Spektrum von Whewellit.

Spektrum des Whewellits. Hiervon wird automatisch eine Bandentabelle erstellt, die für jede Absorptionsbande die Wellenzahl und den Transmissionswert enthält (Tab. 4). Diese Bandentabelle wird vom SEARCH-Programm ausgewertet. Hierbei erfolgt im ersten Schritt zunächst eine Interpretation mit Ausgabe der möglichen Struktureinheiten (PSU's = Possible Structural Units, Tab. 5). Eine PSU ist hierbei definiert als ein Molekülbaustein, eine funktionelle Gruppe oder eine Kombination von funktionellen Gruppen, die an Hand des IR-Spektrums durch

Tab. 4. Banden (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ) und Transmissionswerte (3,16–100,00 [%]) vom IR-Spektrum des Whewellits.

X:	3601	4000-400	1.00	3.16	100.00	T	S3	M	2A08	H64A
REF. VALUES :	4000	97.9	2000	89.9						
	3486.	32.2	3428.	31.3	3340.	42.3	3257.	51.1	3058.	44.4
	2930.	67.7	2859.	81.7	2771.	88.6	2301.	93.9	1907.	78.5
	1620.	3.3	1383.	52.8	1317.	5.6	1051.	89.8	950.	83.6
	886.	78.8	782.	13.6	661.	34.9	598.	53.0	517.	27.6
END	20 PEAKS FOUND									

eine bestimmte Anordnung charakteristischer Banden erkannt werden können. Nach der Interpretation wird eine automatische Bibliothekssuche durchgeführt. In der Bibliothek sind für jede Substanz die Bandenfrequenzen und die PSU's gespeichert. Bei der Suche werden wahlweise nur die Bandenlagen oder die Bandenlagen *und* die Molekülstruktur verglichen.

Tab. 5. Zuordnung möglicher Struktureinheiten für das IR-Spektrum des Whewellit.

POSSIBLE STRUCTURAL UNITS :	H64A
4704	CARBOXYLIC ACID SALT - POSSIBLY OXALATE
4706	CARBOXYLIC ACID SALT - SHORT CHAIN COMPOUND

PSUs above may be subject to interference. Consult Manual

### Diskussion

Die spektroskopischen Methoden sind wichtige Untersuchungstechniken zur Bestimmung der Struktur von Molekülen. Neben der Geometrie eines Moleküls werden dabei die Elektronenstruktur und damit die Bindungsverhältnisse charakterisiert. In Abhängigkeit von der eingestrahlten Energie bzw. Wellenlänge der Strahlung werden Elektronen-, Schwingungs- und Rotationszustände der Moleküle angeregt. Unter den Bedingungen der hier interessierenden IR-Spektroskopie entsprechen die Absorptionen den Veränderungen der Schwingungszustände im Molekül. Im infraroten Spektralbereich (2,5–50  $\mu\text{m}$  bzw. 4000–200  $\text{cm}^{-1}$ ) können in Molekülen und Kristallen Schwingungen angeregt werden, die eine Änderung des Dipolmomentes des schwingenden Systems bewirken. Durch diese Wechselwirkung der infraroten Strahlung mit der zu untersuchenden Substanz treten in Abhängigkeit von den Schwingungsmöglichkeiten der Moleküle bei bestimmten Wellenlängen ganz charakteristische Schwächungen der eingestrahlten Energie auf. Bestimmte Absorptionen sind charakteristisch für einzelne Atomgruppen in Molekülen. Auf dieser Basis ist auch die eindeutige Unterscheidung der in Harnsteinen auftretenden Substanzen möglich. In Tabelle 6 sind die Absorptionsbereiche für einige Atomgruppen aufgeführt, die zur Identifizierung von in Harnsteinen vorkommenden Substanzen eine Rolle spielen.

In Abhängigkeit von den benachbarten Gruppen und der Gesamtstruktur des Moleküls haben in den einzelnen Verbindungen die Absorptionen eine genaue Lage im Infrarot-Spektrum.

Absorptionen im infraroten Spektralbereich sind unabhängig vom Kristallisationsgrad der Probe. Dadurch ist es möglich, auch schlecht kristallisierte Substanzen – häufig sind die Calciumphosphate in Harnsteinen pseudo-

amorph – und auch amorphe Verbindungen, wie z. B. Eiweiße (organische Matrix), nachzuweisen.

Die Abhängigkeit der Infrarotspektren von den Schwingungsmöglichkeiten des Moleküls kann bei geringen Unterschieden im Molekülbau zu Schwierigkeiten der Identifizierung einzelner Substanzen in Gemischen führen. Bei den in Harnsteinen enthaltenen Substanzen unterscheiden sich Whewellit und Weddellit sowie Harnsäure und Harnsäure-Dihydrat nur durch den Kristallwassergehalt. Für Whewellit und Weddellit erlauben die IR-Spektren auch in Gemischen eine sichere Differenzierung. Dagegen sind die Absorptionen von Harnsäure und Harnsäure-Dihydrat sehr ähnlich, so daß reine Substanzen zwar noch sehr gut ermittelt werden können, aber Harnsäure-Dihydrat als Mischpartner häufig nicht von Harnsäure unterschieden werden kann.

Für eine genaue qualitative und quantitative Harnsteinanalyse ist die Anwendung eines Infrarotspektrometers mit dem Wellenzahlbereich 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  erforderlich. Heute stehen dispersive Gittergeräte und Fourier-IR-Geräte zur Verfügung, wobei letztere im Anschaffungspreis jedoch relativ hoch liegen. Die Investitionskosten für ein geeignetes dispersives Gerät mit Zubehör liegen bei 30000–40000 DM. Die Ausrüstung mit einer Datenstation ist nur für Steinanalysezentren sinnvoll. Es müssen dafür zum jetzigen Zeitpunkt (1982) zusätzlich etwa 40000 DM aufgewendet werden.

Nach den mit der Testbibliothek gesammelten Erfahrungen halten wir es für möglich, daß sich durch systematischen Ausbau dieser Bibliothek ein generell einsetzbares System für die automatische qualitative und halbquantitative Harnsteinanalyse entwickeln läßt. Soll darüber hinaus eine genaue quantitative Analyse erfolgen, muß dies durch direkte Auswertung der Absorptionen von substanzspezifischen Schlüsselbanden erfolgen, wie in einer früheren Arbeit beschrieben (7). Auch hierbei können rechnerunterstützte Verfahren die Genauigkeit und Geschwindigkeit der Auswertung wesentlich verbessern, was wir an anderer Stelle zeigen wollen.

Tab. 6. Charakteristische Absorptionsbereiche von Atomgruppen in Harnsteinen vorkommender Substanzen.

Atomgruppe	Charakteristische Schwingung ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Valenzschwingung	Deformationsschwingung
C–N	2500–3000	1300–1500
C–O	1600–1800	
O–H	3100–3600	1100–1400 1650 (H <sub>2</sub> O)
N–H	3200–3500	1550–1650
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3030–3300	1390–1430
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1000–1100	550–650
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1350–1450	850–900

**Literatur**

1. Hesse, A., Röhle, G. & Voigt, U. (1982) Fortschr. Urol. Nephrol. 17, 306–310.
2. Hesse, A., Hicking, W. & Vahlensieck, W. (1981) GIT Labor-Medizin 4, 19–27.
3. Gebhardt, M. (1979) Harnsteinanalyse mittels Röntgendiffraktion in: Urolithiasis 1 (Vahlensieck, W., ed.) Springer Berlin, Heidelberg, New York, S. 77–121.
4. Beischer, D. E. (1955) J. Urol. (Baltimore) 73, 653–659.
5. Hesse, A., Schneider, W.-J. & Hienzsch, E. (1972) Dtsch. Med. Wochenschr. 97, 1694–1701.
6. Molt, K. (1980) Chemie-Technik 9, 195–200.
7. Hesse, A., Schrumpf, G. & Schilling, I. (1974) Zschr. Urol. 67, 367–376.

Dr. A. Hesse  
Urologische Univ. Klinik  
Sigmund-Freud-Str. 25  
D-5300 Bonn

