

PACS numbers: 61.05.cp, 68.37.Hk, 81.07.Bc, 81.10.Dn, 87.64.Ee, 87.85.J-, 87.85.Rs

## Влияние *L*-аспарагиновой кислоты на кристаллизацию оксалата кальция моногидрата

Ю. В. Таранец<sup>1</sup>, О. Н. Безкровная<sup>1</sup>, И. М. Притула<sup>1</sup>,  
П. В. Матейченко<sup>1</sup>, Д. С. Софронов<sup>2</sup>, В. К. Ключков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт монокристаллов  
НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины,  
просп. Науки, 60,  
61001 Харьков, Украина

<sup>2</sup>ГНУ НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины,  
просп. Науки, 60,  
61001 Харьков, Украина

<sup>3</sup>Институт сцинтилляционных материалов  
НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины,  
просп. Науки, 60,  
61001 Харьков, Украина

Рассмотрено влияние молярного соотношения концентраций ионов кальция и оксалата на морфологию кристаллов моногидрата оксалата кальция (СОМ) — одного из главных компонентов патогенных минералов, из которых состоят почечные камни людей. Изучено влияние добавки *L*-аспарагиновой кислоты (*L*-asp) различной концентрации на морфологию и размер получаемых кристаллов СОМ. Установлено, что добавление *L*-asp ингибирует рост кристаллов СОМ и приводит к уменьшению их размеров. В растворах с концентрациями  $[Ca^{2+}] = 4$  ммоль/л и  $[C_2O_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л при добавлении *L*-asp снижается вероятность образования дендритов, и при концентрации *L*-asp 8–20 ммоль/л происходит образование одиночных кристаллов. В случае концентраций  $[Ca^{2+}] = 4$  ммоль/л и  $[C_2O_4^{2-}] = 4$  ммоль/л даже при высокой концентрации *L*-asp (20 ммоль/л) образуются агрегаты из одиночных кристаллов, что указывает на меньшую степень ингибирования.

Розглянуто вплив молярного співвідношення концентрацій йонів Кальцію й оксалату на морфологію кристалів моногідрату оксалату кальцію (СОМ) — одного з головних компонентів патогенних мінералів, з яких складаються ниркові камені людей. Вивчено вплив добавки *L*-аспарагінової кислоти (*L*-asp) різної концентрації на морфологію і розмір одержуваних кристалів СОМ. Встановлено, що додавання *L*-asp пригнічує ріст кристалів СОМ і приводить до зменшення їхніх розмі-

рів. У розчинах з концентраціями  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л і  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л при додаванні *L*-asp знижується ймовірність утворення дендритів, і при концентрації *L*-asp у 8–20 ммоль/л відбувається утворення поодиноких кристалів. У разі концентрацій  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л і  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 4$  ммоль/л навіть при високій концентрації *L*-asp (20 ммоль/л) утворюються агрегати з поодиноких кристалів, що вказує на менший ступінь інгібування.

The influence of the molar ratio of the concentrations of calcium and oxalate ions on the morphology of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals, the main components of pathogenic minerals constituting human kidney stones, is considered. The effect of the *L*-aspartic acid (*L*-asp) admixture of varying concentrations on the morphology and size of the obtained COM crystals is studied. As established, the addition of *L*-asp inhibits the growth of the COM crystals and reduces their size. The probability of dendrite formation is reduced in the solutions with the concentrations  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  mM and  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0.2$  mM by adding *L*-asp; and isolated crystals are formed at the *L*-asp concentration of 8–20 mM. At the concentrations  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  mM and  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 4$  mM, aggregates of isolated crystals are formed even at high concentration of *L*-asp (20 mM) that testifies to a lower extent of inhibition.

**Ключевые слова:** биоминерализация, кальций оксалат моногидрат, рост кристаллов, сканирующая электронная микроскопия, пересыщение, *L*-аспарагиновая кислота.

**Ключові слова:** біомінералізація, кальцій оксалат моногідрат, ріст кристалів, сканувальна електронна мікроскопія, пересичення, *L*-аспарагінова кислота.

**Key words:** biomineralization, calcium oxalate monohydrate, crystal growth, scanning electron microscopy, supersaturation, *L*-aspartic acid.

*(Получено 13 сентября 2016 г.)*

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Поскольку в мире постоянно возрастает число заболеваний, связанных с патогенным минералообразованием в организме человека, то одним из самых актуальных направлений в области кристаллизации из растворов является изучение кристаллизации в биологических средах из прототипов физиологических жидкостей. Оксалат кальция, в частности, кальций оксалат моногидрат ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , СОМ), является основным компонентом почечных камней. Установлено, что патогенные органоминеральные агрегаты имеют сложный и неоднородный состав. Так, доля смешанных оксалат-фосфатных камней, по данным разных исследователей, колеблется от 6,9 до 59,4%, уратных — от 5 до 50% и т.д.

[1]. Однако в целом наиболее распространёнными среди них являются оксалаты кальция — вевеллит  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  и ведделлит  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Эти вещества — наиболее частые компоненты камней мочеполовой системы и могут входить в состав зубных, желчных камней, камней слюнных желёз.

На процесс зарождения кристаллов СОМ и их дальнейший рост большое значение оказывают даже малые концентрации аминокислот, белков, и других органических молекул, которые содержатся в физиологическом растворе и обнаружены в составе оксалатных почечных камней [2]. Способность большинства аминокислот хорошо растворяться в воде является важным фактором обеспечения их биологического функционирования, влияющего на всасывание аминокислот, их транспорт в организме и т.п. Исследования [3, 4] показали, что такие маленькие молекулы, как лимонная кислота, и макромолекулы (остеопонтин, белок Тамма–Хорсфалла), содержащие кислые функциональные группы, ингибируют процессы образования сом. Ранее в работах [5–7] было установлено, что присутствие аминокислот оказывает различное влияние на рост кристаллов оксалата кальция. Если глутаминовая кислота, лизин, аргинин и глицин обладают сильным ингибирующим действием, то значительным промотирующим действием обладают пролин, валин, серин и метионин.

*L*-аспарагиновая (*L*-asp) кислота относится к молекулам, способным ингибировать образование почечных камней; однако, по мнению разных авторов, эти данные противоречивы. Согласно данным [6, 8], аминокислота *L*-asp ингибирует процессы нуклеации и рост кристаллов за счёт адсорбции её молекул на поверхности кристаллов СОМ. В тоже время, в работе [9] описано существенное промотирование процессов зарождения СОМ, связанное с образованием в растворе оксалата кальция моногидрата комплексов кальция с карбоксильными группами аминокислоты, которые и являются центрами нуклеации кристаллов СОМ (т.е. образования их зародышей).

*L*-аспарагиновая кислота ( $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ ) относится к кислым аминокислотам, так как содержит две карбоксильные группы и одну аминогруппу, которые при определённых условиях могут находиться в ионном состоянии. В водном растворе аминокислоты существуют в виде равновесной смеси диполярного иона, катионной и анионной форм. Положение равновесия зависит от рН среды. У всех аминокислот преобладают катионные формы в сильноокислых (рН 1–2) средах и анионные — в сильнощелочных (рН > 11).

Изоэлектрическая точка (значение рН, при котором концентрация диполярных ионов аминокислоты максимальна, а минимальные концентрации катионных и анионных форм равны) для

*L*-asp равна 3; значения констант диссоциации  $pK$  — 2,1, 3,9 и 9,8 [8, 10]. Молекула *L*-asp при  $pH$  5,8 находятся в основном в анионной форме  $(COO^-)-CH_2-CH(NH_2^+)-COO^-$ , так как ионизированы обе карбоксильные группы. Поэтому кислота *L*-asp способна адсорбироваться на положительно заряженных гранях растущего кристалла. Аминокислоты в водных растворах имеют заряд, и грани одноводного оксалата кальция тоже заряжены [11], то вполне вероятно, что имеет место электростатическое взаимодействие аминокислот с поверхностью синтезируемых кристаллов, приводящее к адсорбции молекул аминокислоты на растущую грань. Кроме того, дополнительная стабилизация образующихся поверхностных соединений может быть обусловлена способностью аминокислот образовывать полидентатные хелатные комплексы с ионами кальция, выходящими на грань {100} [11].

Целью нашей работы было изучить влияние молярного соотношения ионов кальция и оксалата, а также их концентрации в растворе и добавление в раствор аминокислоты *L*-asp, имеющей дополнительную карбоксильную группу, на морфологию и размер получаемых кристаллов СОМ.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза кристаллов СОМ использовали соли — хлорид кальция  $CaCl_2$  и оксалат калия  $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$  (реактивы марки х.ч.). В качестве добавки, ингибирующей рост кристаллов СОМ, использовали *L*-аспарагиновую кислоту (*L*-asp (х.ч.)). Модельные растворы готовили с использованием дистиллированной воды.

Для синтеза кристаллов СОМ нами был выбран наиболее близкий к физиологическим условиям метод получения [12, 13]. Соотношение молярных концентраций компонентов реакции  $[Ca^{2+}]/[C_2O_4^{2-}]$  в модельных растворах было равно 1:1 и 20:1; при этом соотношение 20:1 близко к физиологическим условиям [13, 14]. Процесс кристаллизации СОМ изучали в водных растворах, как без добавок аминокислоты, так и в присутствии *L*-asp. Исследование кристаллизации СОМ проводили в ацетатном буферном растворе ( $pH = 5,8$ ) при температуре  $37^\circ C$  и ионной силе раствора 0,15 М. При приготовлении растворов необходимо было учитывать, чтобы ионная сила модельных растворов была равна ионной силе биологической системы. Даже незначительное увеличение ионной силы вызывает изменение степени ионизованности аминокислот, вследствие чего меняется их конформация, а, следовательно, и биологические функции [8,10]. Поскольку ионная сила биологической жидкости человека равна 0,15 моль/л, то модельный раствор должен был иметь соответствующую концентрацию хлорида калия (0,15 моль/л).

Пересыщение модельных растворов ( $S$ ) вычисляли по формуле:

$$S = \gamma \left\{ \left( \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{C}_2\text{H}_4^{2-}]}{K_{sp}} \right)^{1/2} - 1 \right\}, \quad (1)$$

где в числителе квадратными скобками обозначена молярная концентрация ионов Ca и оксалата, а в знаменателе — произведение растворимости оксалата кальция (при  $37^\circ\text{C}$  —  $2,8 \cdot 10^{-9}$  моль<sup>2</sup>/л<sup>2</sup>) [15]. Коэффициент активности  $\gamma$  определяли из выражения:

$$-\log \gamma = Az_1z_2 \left[ \left( \frac{I^{1/2}}{1 + I^{1/2}} \right) - 0,3I \right]. \quad (2)$$

Здесь  $A = 0,5115$  — константа Дебая–Хюккеля,  $Z_1 = Z_2 = 2$  — заряды ионов;  $I = 0,5\sum(Z^2C)$  — ионная сила раствора. Суммирование проводится по всем типам ионов, присутствующим в растворе, однако в нашем случае концентрация СОМ была очень малой, поэтому величина ионной силы ( $I = 0,15$ ) определялась добавкой индифферентного электролита (хлорид калия) и наличием буферного раствора. Пересыщение растворов оксалата кальция, используемых в работе, варьировалось от 2 до 17.

Фазовый состав и структуру синтезированных образцов оксалата кальция устанавливали с помощью рентгеноструктурного анализа, который был выполнен на дифрактометре ‘Siemens D 500’. С целью получения дополнительной информации о составе полученных осадков был использован метод ИК-спектроскопии. ИК-спектры измерялись на спектрофотометре ‘Spectrum One PerkinElmer’. Образцы готовились методом прессования таблеток с KBr. Запись спектра исследуемых образцов проводили в области от 4000 до 400  $\text{см}^{-1}$ . Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре ‘3220UV’.

Морфология кристаллов изучалась с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием электронного микроскопа ‘6390LV’. Для исследования методом СЭМ образцы подвергали 3-кратной промывке дистиллированной водой с помощью центрифугирования. Оценку среднего гидродинамического диаметра частиц методом динамического светорассеяния (ДСР) проводили на анализаторе Zeta PALS (Brookhaven Instruments Corporation, USA) при угле рассеивания  $90^\circ$ . В качестве источника света использовали гелий-неоновый лазер (длина волны излучения 659 нм). Измерения проводили в специальных полистирольных кюветах (BI-SCP).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты рентгеноструктурного анализа синтезированных осадков свидетельствуют об образовании кристаллов СОМ (рис.

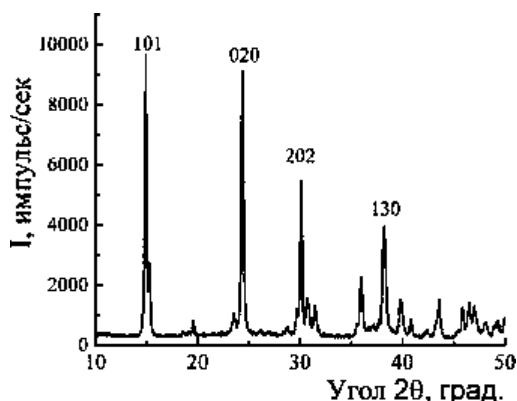


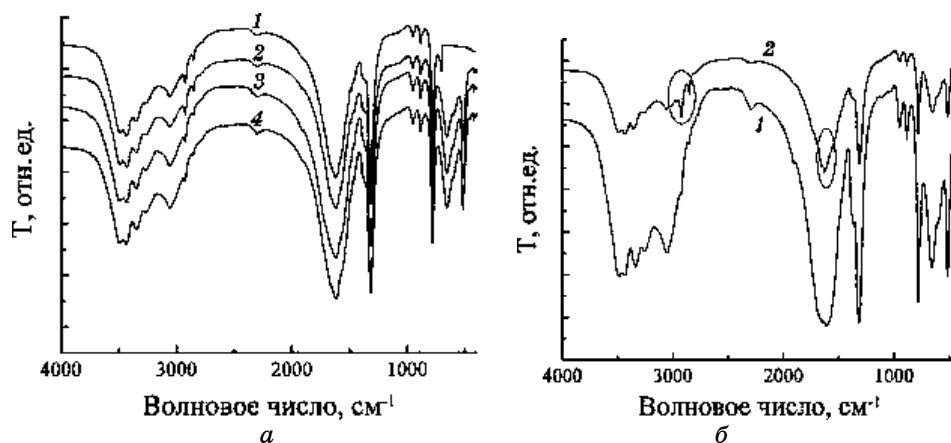
Рис. 1. Дифрактограмма кристаллов СОМ, выращенных при  $s = 11,5$ .<sup>1</sup>

1). Приведённая дифрактограмма была типична для кристаллов СОМ, синтезированных при пересыщении раствора 2–17.

Анализ фазового состава проводился путём сопоставления интенсивностей дифракционных максимумов и экспериментальных значений межплоскостных расстояний с набором соответствующих табличных значений. Основные дифракционные пики моногидрата оксалата кальция наблюдаются при значениях  $2\theta$  равных  $14,93^\circ$  для отражения (101),  $15,29^\circ$  для отражений (110) и  $24,37^\circ$  для отражения (202) [4].

В ИК-спектрах образцов, синтезированных при соотношениях  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$  и  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$  наблюдаются все основные полосы, характерные для кристаллов СОМ (рис. 2, а, б). В ИК-спектрах присутствует типичная группа полос в интервале от  $3477$  до  $3047\text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям ОН-группы, входящей в состав кристаллизационной воды. Две полосы малой интенсивности на  $947$  и  $882\text{ см}^{-1}$ , а также полоса поглощения на  $650\text{ см}^{-1}$  (колебания ОН-группы) также характерны для СОМ. Две интенсивные полосы, расположенные на  $1316$  и  $1615\text{ см}^{-1}$  (колебания СО-группы), используются для идентификации СОМ в их смеси с другими патогенными биоминералами [9]. Две отдельные синглетные полосы на  $780$  и  $517\text{ см}^{-1}$  (колебания СО-группы), присутствующие на спектрах, позволяют отличить моногидрат оксалата кальция от дигидрата, для которого данные полосы не характерны.

В ИК-спектрах образцов СОМ с добавкой *L*-asp наблюдается присутствие полос в интервале от  $3130$  до  $3030\text{ см}^{-1}$ , соответствующих валентным колебаниям аминогруппы, входящей в состав *L*-asp [10]. Как известно, в структуре молекулы *L*-asp кроме аминогруппы имеется ещё и две карбоксильные группы. Полосы валентных колебаний СООН-групп находятся в диапазоне от  $1710$

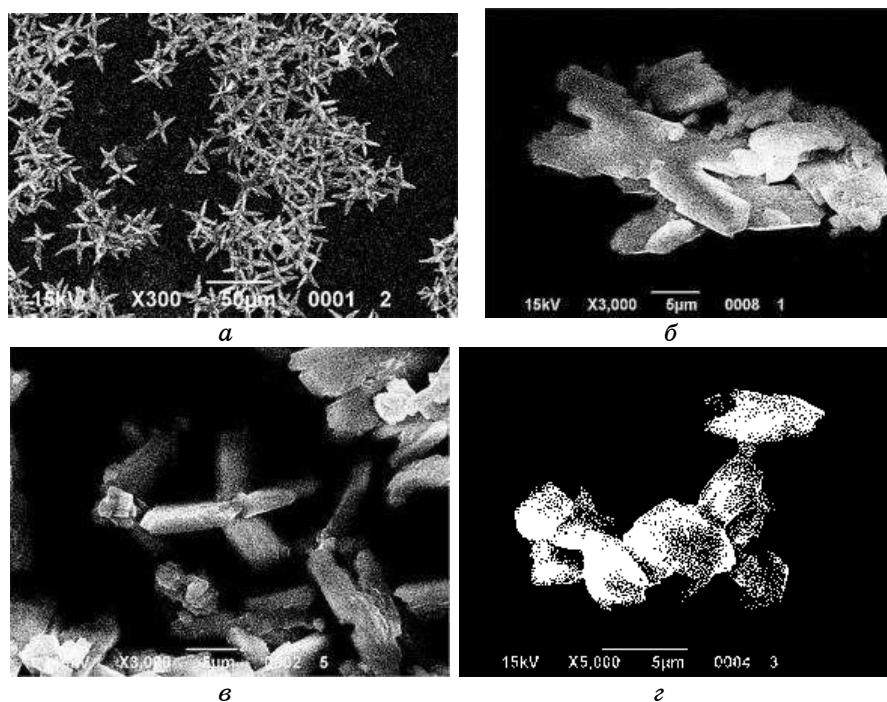


**Рис. 2.** ИК-спектры кристаллов СОМ, выращенных при соотношении  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$  и концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ : 3 ммоль/л (1), 2 ммоль/л (2), 1 ммоль/л (3) и 0.5 ммоль/л (4) (а); и выращенных при соотношении  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л,  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л) без добавки *L*-asp (1), с 10 ммоль/л *L*-asp (2) (б).<sup>2</sup>

до  $1730 \text{ см}^{-1}$  [10]. Однако для исследованных образцов данные полосы поглощения отсутствуют. Это указывает на то, что обе карбоксильные группы *L*-asp находятся в ионизированном состоянии. Полосы валентных колебаний  $\text{COO}^-$  групп сдвигаются от 1645 и 1540 до  $1656 \text{ см}^{-1}$  и  $1403 \text{ см}^{-1}$ . Подобное наблюдалось в работе [16] при изучении в водных растворах адсорбции глутаминовой кислоты на поверхности нанокристаллического диоксида церия. Сдвиг обеих полос поглощения ионизированных карбоксильных групп по сравнению со спектром *L*-asp позволяет предположить, что обе группы  $\text{COO}^-$  взаимодействуют с поверхностью кристаллов СОМ. Таким образом, варьирование соотношения  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}]$  и добавка *L*-asp не оказывают влияния на фазовый состав оксалата кальция (во всех случаях образовывались кристаллы СОМ).

Морфология кристаллов в процессе формирования и роста часто отличается от их равновесной формы. Наблюдаемые отличия в морфологии кристаллов возникают из-за влияния условий, при которых происходит рост кристаллов. Известно, что путём варьирования условий роста (температуры, рН раствора, пересыщения, концентрации исходных компонентов) могут быть получены кристаллы различной формы [17]. Нами было рассмотрено влияние концентрации оксалат-иона на кристаллизацию оксалата кальция при соотношении, близком к физиологическим условиям ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ ) и при стехиометрическом соотношении исходных компонентов ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ).

При концентрациях оксалат-иона 0,3–0,5 ( $2 < s < 3$ ) ммоль/л и соотношении концентраций  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ , образовывались одиночные кристаллы СОМ, имеющие форму гексагональной пластинки. Такая форма для кристаллов СОМ является типичной [18]. При увеличении концентрации до 2 ммоль/л ( $4 < s < 11$ ) образующиеся кристаллы представляли собой двойникованные структуры. Известно, что двойники могут возникать различными способами, например, во время роста (ростовые двойники) и при механическом воздействии (деформационные двойники). В случае кристаллов СОМ образуются контактные двойники роста и проникающие двойники. Если при обычном росте кристалла (при малом пересыщении раствора) строительные единицы присоединяются только к торцам ростовых слоёв, имеющих элементарную высоту, распространяющихся по уже сформированной поверхности [15], то при очень большом пересыщении раствора может иметь место также слоистый рост кристаллов. При этом на растущей грани при случайном столкновении строительных единиц



**Рис. 3.** Фотографии СЭМ кристаллов СОМ, выращенных с добавлением *L*-asp с концентрациями: 0 (*a*), 2 (*б*), 4 (*в*), 8 (*г*) ммоль/л через одни сутки после синтеза ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ;  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л;  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 4$  ммоль/л;  $s = 17$ ).<sup>3</sup>

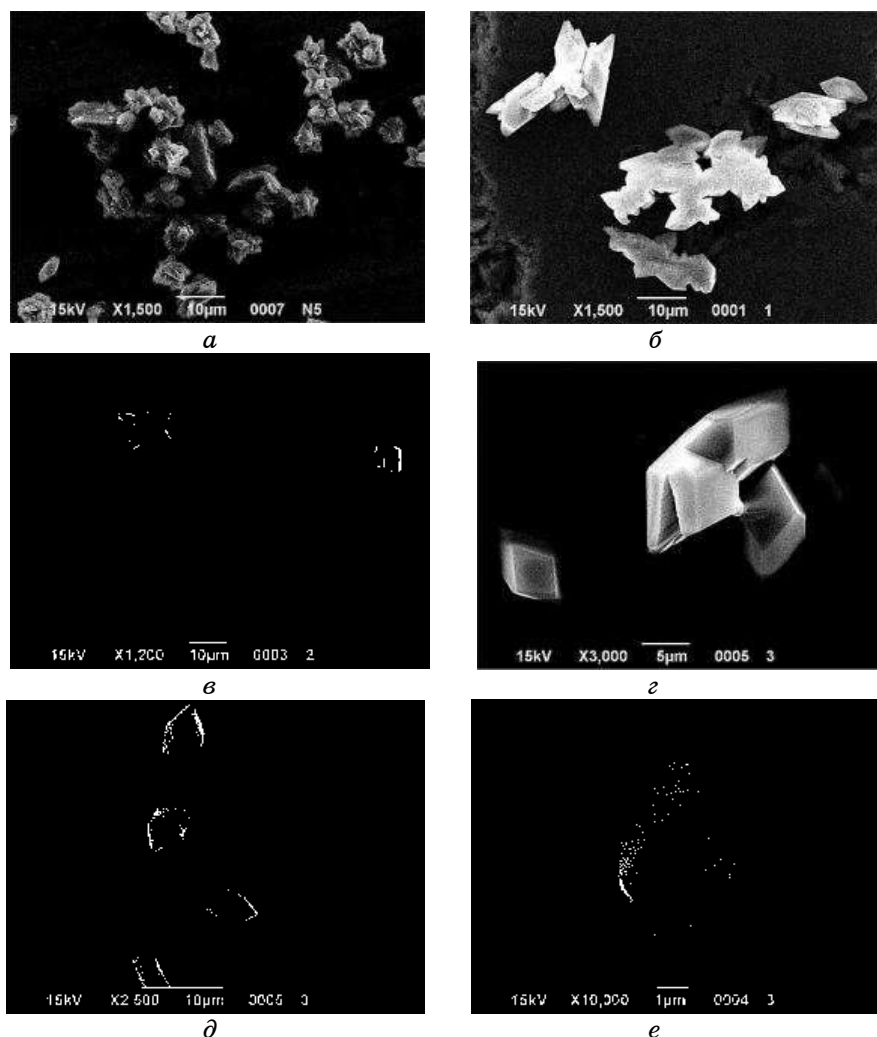


адсорбируются двумерные зародыши, от которых начинают расти слои.

При концентрациях свыше 3 ммоль/л имело место образование дендритных кристаллов СОМ (рис. 3, а). Причиной образования дендритов являлось сильное пересыщение раствора ( $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л,  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 4$  ммоль/л), достигающее 17. При таком высоком пересыщении вершины растущего кристалла больше соприкасаются с пересыщенным раствором, чем их грани. Опережая в росте боковые грани, вершины внедряются вглубь пересыщенного раствора, поэтому рост у вершин идёт быстрее, чем в центре граней. Это объясняется тем, что при росте затрудняется диффузия вещества к кристаллу. Поэтому кристалл быстрее растёт теми своими частями, у которых больше удельная поверхность, т.е. это выступающие части кристалла — его вершины и ребра. Следовательно, дендритные кристаллы СОМ являются формой вершинного роста кристаллов.

Подобная тенденция образования морфологии кристаллов наблюдалась и в случае соотношения  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ . При невысоком пересыщении раствора ( $2 < s < 3$ ) образовывались преимущественно одиночные кристаллы СОМ, однако в данном диапазоне пересыщений имеет место и образование контактных и проникающих двойников. При увеличении пересыщения до 5 образующиеся кристаллы представляют собой сrostки и дендриты (рис. 4, а). Дендритные кристаллы СОМ, выращенные при соотношении концентраций  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$  (при  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л,  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л) не имели вытянутых острых граней (в отличие от случая  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ). Причиной этого явления, с одной стороны, является меньшее пересыщение раствора ( $s = 4,6$ ), благодаря чему рост у вершин и в центре граней происходил практически одинаково. С другой стороны, на рост кристаллов СОМ также влияет нестехиометрия раствора: ионов кальция в растворе в 20 раз больше чем оксалат-ионов; поэтому вероятно, что не все ионы кальция связываются с ионами оксалата; соответственно, на гранях кристалла оседают примеси  $\text{Ca}^{2+}$ , не вошедшие в кристалл.

При введении некоторых аминокислот имеет место как промотирование образования СОМ, так и ингибирование его роста и кристаллизации [19]. Известно, что ингибирование процессов нуклеации происходит на поверхности зародыша, а промотирование — в растворе за счёт связывания аминокислоты с ионами кальция [1]. Поскольку присутствующие в кристаллизационной смеси молекулы *L*-asp при  $\text{pH} \cong 6$  находятся в ионизированном состоянии, то возможна как адсорбция *L*-asp на поверхности растущих кристаллов СОМ, так и образование в растворе комплексов кальция, служащих центрами нуклеации растущих кристаллов СОМ. В ра-



**Рис. 4.** Фотографии СЭМ кристаллов СОМ, выращенных с добавлением *L*-asp с концентрациями: 0 (*a*), 2 (*б*), 4 (*в*), 8 (*г*) и 20 (*д*; *е*) ммоль/л через одни сутки после синтеза ( $[Ca^{2+}]/[C_2O_4^{2-}] = 20:1$ ;  $[Ca^{2+}] = 4$  ммоль/л;  $[C_2O_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л;  $s = 4,6$ ).<sup>4</sup>

боте [2] приведены данные об ингибировании роста кристаллов СОМ (выращенных при соотношении  $[Ca^{2+}]/[C_2O_4^{2-}] = 6$ ) при помощи различных аминокислот, в частности, *L*-asp. При увеличении концентрации аминокислоты увеличивалась степень ингибирования роста кристаллов СОМ.

В нашей работе при добавлении аминокислоты *L*-asp с концентрациями 2–20 ммоль/л в раствор  $[Ca^{2+}]/[C_2O_4^{2-}] = 20:1$  ( $[Ca^{2+}] = 4$

ммоль/л, [C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>] = 0,2 ммоль/л) наблюдалось уменьшение размеров кристаллов СОМ; однако этот эффект проявлялся лишь при концентрациях *L*-asp выше 4 ммоль/л (рис. 4, б–е).

При концентрациях добавки 2 ммоль/л изменение размера кристаллов не происходило, а наблюдалось лишь появление дефектов на медленно растущей грани кристалла {100}. При увеличении концентрации *L*-asp до 8 ммоль/л и выше (до 20 ммоль/л) наблюдалось уменьшение размера кристаллов СОМ, что объясняется адсорбцией аминокислоты на грани кристалла. Аминокислота, адсорбируясь на грани кристалла, может препятствовать её росту; при увеличении концентрации аминокислоты происходит блокировка большего количества активных центров, что способствует дальнейшему замедлению роста кристалла. Этот факт подтверждает то, что при увеличении концентрации *L*-asp снижается вероятность образования дендритов, и увеличивается возможность образования одиночных кристаллов СОМ (рис. 4, е).

При [Ca<sup>2+</sup>]/[C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>] = 1:1 и увеличении концентрации оксалатионов до 4 ммоль/л (концентрация Ca<sup>2+</sup> при этом не изменяется) добавление *L*-asp также приводит к уменьшению кристаллов СОМ (рис. 3). Однако ингибирование происходит намного слабее, что, вероятно, обусловлено высоким пересыщением раствора. При введении *L*-asp в концентрации 8 ммоль/л наблюдается снижение размера кристаллов до 4–5 мкм, однако они представляют собой сростки из одиночных кристаллов.

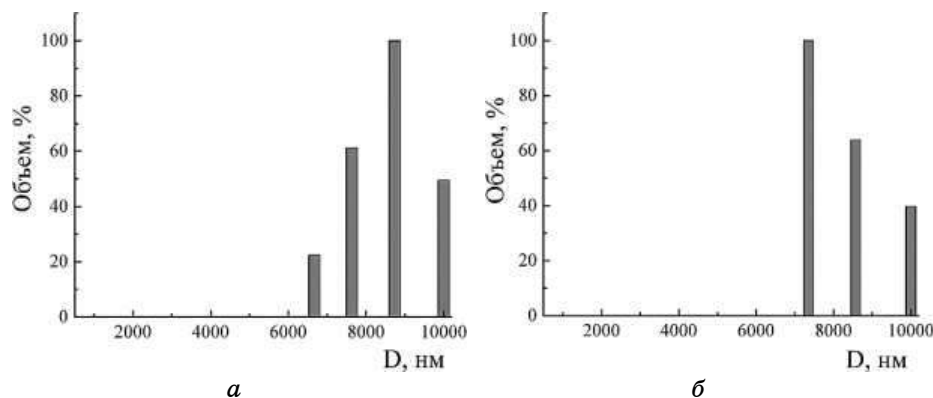
Из литературы известно [15], что у оксалата кальция быстро растущая грань {010} растёт по дислокационному механизму. Наиболее развитая по сравнению с другими грань {100} растёт значительно медленнее. На эту грань дислокации выходят очень редко, и обычно на ней нет источников роста. Но при увеличении пересыщения раствора на стыке зон роста с другими гранями (на пересечении рёбер грани), может образовываться двумерный кристаллический зародыш, от которого распространяется новый слой роста. В тоже время, на поверхность грани {100} кристаллов СОМ выходят ионы Ca<sup>2+</sup>, которые могут способствовать адсорбции молекул аминокислоты *L*-asp за счёт электростатического взаимодействия с её отрицательно заряженными карбоксильными группами. Доминирующим механизмом адсорбции *L*-asp на грань {121} может быть также образование водородных связей между ионами кислорода органической молекулы и протонами, выходящими на эту грань [11].

Такие особенности растущих граней кристаллов СОМ приводят к тому, что добавление аминокислоты *L*-asp в раствор приводит в основном к блокированию роста граней {100} и {121}; быстрый рост грани {010} при торможении роста двух других ведёт к её исчезновению при концентрации *L*-asp в интервале 8–20 ммоль/л

( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ ;  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  ммоль/л;  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0,2$  ммоль/л;  $s = 4,6$ ) (рис. 4, *д-ж*).

Для подтверждения ингибирующего эффекта *L*-asp на кристаллизацию СОМ получены кривые распределения частиц оксалата кальция, позволяющие определить гидродинамический диаметр частиц СОМ ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ) в присутствии 8–20 ммоль/л *L*-asp (рис. 5). При проведении измерений в образцах было обнаружено наличие частиц размером менее 0,5 мкм, а также более крупная фракция (6,5–10 мкм). Данный метод не позволяет характеризовать наличие в растворе частиц размером более 10 мкм. Поскольку для исследования методом ДСР образцы не подвергали промывке (в отличие от метода СЭМ), то мы исключили из дальнейшего рассмотрения наличие фракции размером до 0,5 мкм (которые могут быть как кристаллами СОМ, так и остатками аминокислоты, ассоциированной с ионами кальция в растворе).

Из рисунка 5 видно, что если при концентрации *L*-asp 8 ммоль/л основной вклад в распределение частиц по размерам (в пределах размеров 0,5–10 мкм) вносят частицы с гидродинамическим диаметром около 9 мкм, то при увеличении концентрации аминокислоты до 20 ммоль/л размер частиц уменьшается до 7 мкм. Тенденция снижения размера кристаллических частиц СОМ при увеличении концентрации *L*-asp от 8 до 20 ммоль/л коррелирует с данными, полученными методом СЭМ. В тоже время некоторое отличие в размерах частиц, полученное этими двумя методами, может быть обусловлено тем, что методом ДСР измерялся их гидродинамический диаметр, т.е. с учётом сольватной оболочки. Кроме того, известно, что при исследовании полидисперсных



**Рис. 5.** Распределение частиц СОМ по размерам (по результатам динамического светорассеяния), синтезированных с добавлением *L*-asp: 8 ммоль/л (*а*) и 20 ммоль/л (*б*) при соотношении  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ;  $s = 11,5$ .<sup>5</sup>

образцов с помощью метода ДРС (а синтезированные нами кристаллы СОМ относятся именно к полидисперсным, поскольку имеют различный размер), получаемые размеры частиц могут не соответствовать их реальным размерам в жидкости [20]. Это связано с тем, что интенсивность светорассеяния зависит не только от размеров и концентраций частиц, но также от волнового вектора рассеяния, и от форм частиц, учитывающего внутреннюю интерференцию света в крупных частицах.

#### 4. ВЫВОДЫ

Рассмотрено влияние молярного соотношения ионов кальция и оксалата, а также их концентрации в растворе и концентрации вводимой добавки (*L*-аспарагиновой кислоты) на морфологию и размер кристаллов СОМ. Обнаружено, что увеличение концентрации *L*-asp приводит к увеличению нуклеации кристаллов СОМ и ингибированию их роста. Варьирование концентрации ионов кальция и оксалата, а также добавки *L*-asp не влияют на фазовый состав кристаллов СОМ.

Изучено влияние концентрации ионов кальция и оксалата на габитус кристаллов СОМ. Обнаружено, что при соотношении  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$  при концентрациях 0,3–0,5 ммоль/л образуются одиночные кристаллы СОМ, имеющие форму гексагональных пластин, при 1–2 ммоль/л, кроме одиночных кристаллов, образуются контактные и проникающие двойники, а при концентрациях свыше 3 ммоль/л имеет место образование дендритных кристаллов СОМ.

Выявлено ингибирующее действие аминокислоты *L*-asp на процессы роста кристаллов СОМ. Обнаружено, что добавление *L*-asp (2–20 ммоль/л) в раствор  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$  ( $s = 4,6$ ) приводит к снижению размеров кристаллов СОМ, что особенно характерно для концентраций *L*-asp выше 4 ммоль/л. Установлено, что при концентрациях *L*-asp 8–20 ммоль/л (при  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ ) возможно образование одиночных кристаллов СОМ размером 5 мкм. Снижение размера кристаллов СОМ при повышении концентрации *L*-asp в растворе обусловлено адсорбцией молекул аминокислоты на гранях кристалла, препятствующей её росту. При увеличении концентрации *L*-asp в растворе (при  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ ,  $s = 4,6$ ) происходит блокировка большего количества активных центров, что и способствует дальнейшему замедлению роста кристалла и приводит к образованию одиночных кристаллов СОМ. При соотношении  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$  ( $s = 17$ ) добавление *L*-asp также приводит к уменьшению кристаллов СОМ, однако ингибирование происходит намного хуже, что обусловлено высоким пересыщением раствора.

Авторы выражают благодарность к.х.н. В. Н. Баумеру и А. Н. Пузан (ГНУ НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины) за помощь в проведении рентгеноструктурного анализа образцов оксалата кальция и интерпретации результатов.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА—REFERENCES

1. J. He, R. Lin, H. Long, Y. Liang, and Y. Chen, *J. Colloid Interface Sci.*, **454**: 144 (2015).
2. C. Henneguain, V. Lalanne, M. Daudon, B. Lacour, and T. Drueke, *Urol. Res.*, **21**: 101 (1993).
3. K. Ganter, D. Bongartz, and A. Hesse, *Urology*, **53**: 492 (1999).
4. Sh. Guo, M. D. Ward, and J. A. Wesson, *Langmuir*, **18**: 4284 (2002).
5. O. A. Golovanova, V. V. Korolkov, Yu. O. Punin, and A. S. Vyisotskiy, *Vestnik Omskogo Universiteta*, **2**: 117 (2013) (in Russian); O. A. Голованова, В. В. Корольков, Ю. О. Пунин, А. С. Высоцкий, *Вестн. Омск. ун-та*, **2**: 117 (2013).
6. F. Grases, J. G. March, F. Bibiloni, and E. Amat, *J. Cryst. Growth*, **87**: 299 (1988).
7. J.-M. Ouyang, L. Duan, and B. Tieke, *Langmuir*, **19**: 8990 (2003).
8. D. E. Fleming, W. Bronswijk, and R. L. Ryall, *Clin. Sci.*, **101**: 159 (2001).
9. O. A. Golovanova, Yu. O. Punin, A. S. Vyisotskiy, and V. R. Khannanov, *Khimiya v Interesakh Ustoichivogo Razvitiya*, **19**: 501 (2011) (in Russian); O. A. Голованова, Ю. О. Пунин, А. С. Высоцкий, В. Р. Ханнанов, *Химия в интересах устойчивого развития*, **19**: 501 (2011).
10. H.-D. Jakubke and H. Jeschkeit, *Aminokisloty, Peptidy, Belki* [Aminosäuren, Peptide, Proteine] (Moscow: Mir: 1985) (Russian translation); Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт, *Аминокислоты, пептиды, белки* (Москва: Мир: 1985) (пер. с нем.).
11. B. Grohe, J. O. Young, D. A. Ionescu, and G. Lajoie, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 14946 (2007).
12. J. P. Kavanagh, L. Jones, and P. N. Rao, *Urol. Res.*, **27**: 231 (1999).
13. I. Gutsow, S. Atanasova, and G. Budevsky, *Z. Chem.*, **30**: 299 (1990).
14. Y. Ogawa, T. Miyazato, and T. Hatano, *J. Surg.*, **24**: 1154 (2000).
15. E. V. Petrova, N. V. Gvozdev, and L. N. Rashkovich, *J. Optoelectron. Adv. M.*, **6**, No. 1: 261 (2004).
16. N. N. Vlasova and L. P. Golovkova, *Poverkhnost*, **7**: 77 (2015) (in Russian); Н. Н. Власова, Л. П. Головкова, *Поверхность*, **7**: 77 (2015).
17. A. Millan, *Cryst. Growth Design*, **3**: 245 (2001).
18. A. Millan, *J. Mat. Sci.: Materials in Medicine*, **8**: 247 (1997).
19. E. Akyol and M. Öner, *J. Cryst. Growth*, **401**: 912 (2014).
20. E. Van der Pol, A. G. Hoekstra, A. Sturk, C. Otto, T. G. van Leeuwen, and R. Nieuwland, *J. Thromb. Haemost.*, **8**, No. 12: 2596 (2010).

<sup>1</sup>*Institute for Single Crystals, STC 'Institute for Single Crystals', N.A.S. of Ukraine, Nauky Ave., 60, 61001 Kharkiv, Ukraine*

<sup>2</sup>*State Scientific Institution STC 'Institute for Single Crystals', N.A.S. of Ukraine, Nauky Ave., 60, 61001 Kharkiv, Ukraine*

---

<sup>3</sup>*Institute for Scintillation Materials, STC 'Institute for Single Crystals', N.A.S. of Ukraine, Nauky Ave., 60, 61001 Kharkiv, Ukraine*

<sup>1</sup> Fig. 1. XRD pattern of COM crystals grown at  $s = 11.5$ .

<sup>2</sup> Fig. 2. IR-spectra of COM crystals grown at the ratio  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$  and the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  ions: 3 mM (1), 2 mM (2), 1 mM (3) and 0.5 mM (4) (a); and grown at the ratio  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  mM,  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0.2$  mM) without addition of *L*-asp (1), with 10 mM *L*-asp (2) (б).

<sup>3</sup> Fig. 3. SEM images of COM crystals grown with addition of *L*-asp with concentrations: 0 (a), 2 (б), 4 (в) and 8 (г) mM since one day after synthesis ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ;  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  mM;  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 4$  mM;  $s = 17$ ).

<sup>4</sup> Fig. 4. SEM images of the COM crystals grown with addition of *L*-asp with concentrations: 0 (a), 2 (б), 4 (в), 8 (г) and 20 (д; е) mM since one day after synthesis ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 20:1$ ;  $[\text{Ca}^{2+}] = 4$  mM;  $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 0.2$  mM;  $s = 4.6$ ).

<sup>5</sup> Fig. 5. Size distribution of COM particles synthesized with addition of *L*-asp: 8 mM (a) and 20 mM (б) at the ratio  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] = 1:1$ ;  $s = 11.5$  from dynamic light scattering.