

# Taloženje nestabilne hidratne faze kalcijeva oksalata

---

**Hamzić, Arijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:696751>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Arijana Hamzić

**TALOŽENJE NESTABILNE  
HIDRATNE FAZE KALCIJEVA  
OKSALATA**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Arijana Hamzić

**TALOŽENJE NESTABILNE  
HIDRATNE FAZE KALCIJEVA  
OKSALATA**

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Neposredna voditeljica: dr. sc. Nives Matijaković Mlinarić

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Znanstvena grana:** Anorganska kemija

## TALOŽENJE NESTABILNE HIDRATNE FAZE KALCIJEVA OKSALATA

**Arijana Hamzić**

**Rad je izrađen na:** Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

**Mentor:** doc. dr. sc. Anamarija Stanković

**Neposredna voditeljica:** dr. sc. Nives Matijaković Mlinarić

**Sažetak:** Biomineralizacija je proces nastajanja funkcionalnih biominerala u živim organizmima (kosti, zubi, školjke). U slučaju da dođe do stvaranja neželjenih biominerala govorimo o patološkoj biomineralizaciji (karijes, kamenci, ...). Bubrežni kamenci su primjer patološke biomineralizacije koji uzrokuju kroničnu bolest – urolitijazu. U današnje vrijeme zbog načina života, loše prehrane i raznih vanjskih čimbenika bubrežni kamenci su postali sve češći pojam rasprave. U 80% slučajeva bubrežni kamenci su kalcij oksalatnog sastava. U bubrežnim kamencima najčešće prevladavaju kalcijev oksalat monohidrat (COM) i kalcijev oksalat dihidrat (COD), dok se kalcijev oksalat trihidrat (COT) vrlo rijetko nađe u sastavu kamenaca, ali je pretpostavka da je on prvi oblik koji nastane te transformira u stabilniji oblik. U ovom diplomskom radu cilj je bio sintetizirati nestabilnu hidratnu fazu u što čistijem obliku te analizama optičke mikroskopije, infracrvene spektroskopije, rendgenske difrakcije i termogravimetrijske analize okarakterizirati dobivene kristale i istražiti njihova svojstva. Provedene su sinteze pri tri temperature (25; 36,5 i 48 °C) i tri ionske jakosti (0,01; 0,05 i 0,1 mol dm<sup>-3</sup>). Zaključeno je da pri 25 i 36,5 °C nastaje COT dok povišenjem temperature na 48 °C nastaje COM neovisno o ionskoj jakosti.

**Ključne riječi :** bubrežni kamenci, ionska jakost, kalcijev oksalat monohidrat (COM), kalcijev oksalat trihidrat (COT), temperatura.

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Diplomski rad obuhvaća:** 57 stranica, 42 slike, 5 tablica, 37 literaturnih navoda

**Rad prihvaćen:** 29. rujna. 2024. godine

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

doc. dr. sc. Anamarija Stanković

izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek  
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**  
Name of study programme: **Graduate study programme in Chemistry; research program**  
**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Scientific branch:** Inorganic chemistry

## **PRECIPITATION OF THE UNSTABLE HYDRATED PHASE OF CALCIUM OXALATE**

**Arijana Hamzić**

**The paper was created on:** Department of Chemistry  
**Supervisor:** Assist. Prof. Anamarija Stanković  
**Principal investigator:** dr. sc. Nives Matijaković Mlinarić

**Abstract:** Biomineralization is the process of formation of functional biominerals in living organisms (bones, teeth, shells). When undesirable biominerals are formed, we are talking about pathological biomineralization (caries, stones, ...). Kidney stones are an example of pathological biomineralization that causes a chronic disease - urolithiasis. Nowadays, kidney stones are an increasingly frequent topic of conversation due to lifestyle, poor diet and various external factors. In 80% of cases, kidney stones are calcium oxalate. In kidney stones, calcium oxalate monohydrate (COM) and calcium oxalate dihydrate (COD) predominate most frequently, while calcium oxalate trihydrate (COT) is rarely found in the composition of stones, but it is believed to be the first hydrate phase formed and then transforms into a more stable form. The aim of this work was to synthesize the unstable hydrate phase in as pure form as possible and to characterize the crystals obtained and study their properties using optical microscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and thermogravimetric analyzes. The syntheses were carried out at three temperatures (25, 36.5 and 48 °C) and three ionic strengths (0.01, 0.05 and 0.1 mol dm<sup>-3</sup>). It was found that COT is formed at 25 and 36.5 °C, while increasing the temperature to 48 °C produces COM regardless of the ionic strength.

**Keywords:** kidney stones, ionic strength, calcium oxalate monohydrate (COM), calcium oxalate trihydrate (COT), temperature.

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 57 pages, 42 figures, 5 tables, 37 references

**Thesis accepted:** September 29, 2024

**Reviewers:**

Assist. Prof. Anamarija Stanković

Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović

Assoc. Prof. Tomislav Balić

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek  
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

# *Žahvale*

Najprije jedno veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Anamariji Stanković što mi je pružila priliku da uz njeno vodstvo izradim ovaj diplomski rad. Hvala Vam na svim savjetima, na motivaciji i na svakoj lijepoj riječi koja mi je dodatno davala vjetar u leđa.

Najveće hvala dugujem svojoj dragoj obitelji, svojim roditeljima Almi i Almiru i svom bratu Amaru na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Hvala Vam što ste bili uz mene u svakom trenutku, bio on lijep ili ružan. Hvala vam što ste me gurali naprijed i kada mi je bilo najteže i što ste mi maksimalno olakšali moje studentske dane. Najveće hvala i mom dečku Nikoli. Hvala Ti što si vjerovao u mene čak i kada nisam vjerovala u samu sebe.

Hvala i mojoj kolegici Josipi koja je provodila dane samnom u laboratoriju. Hvala ti što si mi pomagala kad god si mogla i što si mi pravila društvo.

I za kraj, veliko hvala mojim najdražim prijateljicama Sari, Ivi, Leticiji, Aleksandri i Ivani. Hvala Vam što ste samnom proživjele ovaj predivan period mog života, što ste uvijek bile tu za mene, što ste samnom prolazile svaki djelić ovog iskustva. Hvala Vam za sve lijepe trenutke, za sva druženja i zajednička učenja.



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI DIO .....	2
2.1. Biomineralizacija.....	2
2.1.1. Patološka biomineralizacija.....	5
2.2. Taložni procesi .....	5
2.2.1. Prezasićenost .....	6
2.2.2. Nukleacija.....	6
2.2.3. Rast kristala .....	8
2.2.4. Kinetika rasta kristala .....	10
2.2.5. Složeni mehanizmi .....	11
2.2.6. Starenje.....	11
2.3. Urolitijaza.....	12
2.4. Bubrežni kamenci.....	13
2.4.1. Vrste bubrežnih kamenaca .....	15
2.5. KALCIJEVI OKSALATI.....	16
2.5.1. Kalcijev oksalat monohidrat (COM).....	18
2.5.2. Kalcijev oksalat dihidrat (COD).....	19
2.5.3. Kalcijev oksalat trihidrat (COT).....	20
2.6. METODE ANALIZE I IDENTIFIKACIJE .....	22
2.6.1. Optička mikroskopija .....	22
2.6.2. Infracrvena spektroskopija (IR).....	22
2.6.3. Rendgenska difrakcija (XRD) .....	27
2.6.4. Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	33
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	35
3.1. Popis kemikalija .....	35
3.2. Pribor i aparatura .....	35
3.3. Priprema otopina .....	35
3.4. Sinteza nestabilne faze kristala kalcijeva oksalata .....	37

3.5. Karakterizacija kristala kalcijeva oksalata trihidrata.....	39
3.5.1. Optička mikroskopija (OM) .....	39
3.5.2. Infracrvena spektroskopija Furierovom transformacijom (FTIR).....	40
3.5.3. Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD) .....	40
3.5.4. Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	41
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	42
4.1. Sinteze pri 25 °C.....	42
4.1.1. Optička mikroskopija .....	42
4.1.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 25 °C.....	44
4.1.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 25 °C.....	45
4.2. Sinteze pri 36,5 °C.....	45
4.2.1. Optička mikroskopija .....	46
4.2.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C.....	47
4.2.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C .....	48
4.2.4. Termogravimetrijska analiza uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C .....	48
4.3. Sinteze pri 48 °C .....	49
4.3.1. Optička mikroskopija .....	49
4.3.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 48 °C.....	51
4.3.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 48 °C.....	52
4.3.4. Termogravimetrijska analiza uzoraka sintetiziranih pri 48 °C .....	52
5. ZAKLJUČAK .....	54
6. LITERATURA.....	55



## 1. UVOD

Biom mineralizaciju shvaćamo kao proces kojim neki organizmi pretvaraju određene ione koji se nalaze u otopini u čvrste mineralne tvorbe. Biom mineralizacija može biti opisana i kao rezultat aktivnosti u stanici koje omogućuju određene fizikalno-kemijske procese za rast kristala i nastanak minerala. Najveći postotak (oko 50%) poznatih biom minerala zauzimaju minerali koji u svojoj strukturi sadrže kalcij. Biom mineralizacija se može podijeliti u dva oblika. Prvi oblik biom mineralizacije je normalna mineralizacija koja je proces nastajanja funkcionalnih anorgansko-organskih hibridnih materijala (biom minerala) u živim organizmima kao što su zubi, razni kosturi, formiranje školjki itd. S druge strane, drugi oblik biom mineralizacije je patološka ili abnormalna mineralizacija koja se često opisuje kao proces nastajanja neželjenih biom minerala. U tom slučaju nastaju patološki mineralizirane tvorbe kao što su karijes, zubni kamenci, žučni kamenci i u našem slučaju bubrežni kamenci koji uzrokuju kroničnu bolest urinarnog trakta-urolitijazu.

Urolitijaza je bolest koju uzrokuje nakupljanje čvrstih minerala u urinarnom traktu zbog raznih endogenih i egzogenih čimbenika. Zbog današnjeg modernog i užurbanog života te loših navika u prehrani u populaciji se sve češće pojavljuje ova kronična bolest. Javlja se kada kristali koji stvaraju kamence prezasiće urin zbog svoje visoke koncentracije. Tada se počnu nakupljati unutar bubrega u obliku bubrežnih kamenaca. Bubrežni kamenci pojavljuju se kod oko 5% populacije a češće se pojavljuju kod muškaraca nego kod žena. Pojavljivanje bubrežnih kamenaca najčešće se pripisuje genetici i okolišnim čimbenicima.

Bubrežne kamence opisujemo kao mineralne nakupine koji se nalaze slobodni ili pričvršćeni u raznim dijelovima bubrega ili urinarnog trakta. Oko 80% bubrežnih kamenaca sastoji se od kalcijevih oksalata ( $\text{CaOx}$ ). Kalcijevi oksalati su široko rasprostranjeni spojevi u prirodi, te su zastupljeni u tri hidratna oblika: kalcijev oksalat monohidrat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , COM), kalcijev oksalat dihidrat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , COD) i kalcijev oksalat trihidrat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , COT). Kalcijev oksalat monohidrat je najzastupljeniji i najstabilniji među ostalim oblicima, dok se kalcijev dihidrat i trihidrat smatraju metastabilnim fazama i prekursorima za stvaranje monohidrata. U bubrežnim kamencima najčešće su prisutni COM i COD, dok je COT vrlo rijetko prisutan.

Cilj ovog rada je sintetizirati nestabilnu hidratnu fazu kalcijeva oksalata u što čistijem obliku. Cilj je i uz pomoć optičke mikroskopije proučiti izgled kristala nestabilne hidratne faze te uz pomoć infracrvene spektroskopije, rendgenske difrakcije i termogravimetrijske analize okarakterizirati te proučiti svojstva nestabilne hidratne faze kalcijeva oksalata.

## 2. LITERATURNI DIO

### 2.1. Biomineralizacija

Biomineralizacija je, jednostavno rečeno, proces kojim organizmi pretvaraju ione u otopini u čvrste minerale. Ovoj nepotpunoj definiciji treba dodati da je pretvorba rezultat staničnih aktivnosti koje omogućuju potrebne fizikalno-kemijske promjene za stvaranje minerala i rast kristala. Krajnji rezultat je jasno očit, jer razni mikroorganizmi, životinje i biljke tvore veliku raznolikost minerala [1].

Tema biomineralizacije je raznolika kao i niz organizama koji se odnose na mineralizirane strukture i obuhvaća različite discipline. Biomineralizacija zauzima važno mjesto u biološkim i medicinskim studijama. Broj vrsta minerala biološkog podrijetla trenutno prelazi 60. Najbrojniji biominerali grupirani prema anionima su fosfati, zatim oksidi i karbonati. Oko 25 % biominerala je hidratizirano, a 25 % amorfno [1].

Pojam biomineral ne odnosi se samo na mineral koji proizvode organizmi, već i na činjenicu da su gotovo svi ovi mineralizirani proizvodi kompozitni materijali koji se sastoje od mineralnih i organskih komponenti. Nadalje, nakon što su nastale u kontroliranim uvjetima, biomineralne faze često imaju svojstva kao što su oblik, veličina, kristalnost, izotopni sastavi i sastavi elemenata u tragovima prilično različita od svojih anorganski formiranih parnjaka. Izraz "biomineral" odražava svu tu složenost [2].

Minerali koji sadrže kalcij čine oko 50 % poznatih biominerala. To ne iznenađuje jer kalcij ispunjava mnoge temeljne funkcije u staničnom metabolizmu. Ova dominacija minerala koji sadrže kalcij je ono što je dovelo do raširene uporabe izraza kalcifikacija. Pojam se odnosi na stvaranje fosfata, karbonata, oksalata i drugih vrsta minerala koji sadrže kalcij. Također oko 25 % biominerala je amorfno u smislu da ne difraktiraju X-zrake. Amorfni silicijev dioksid obično stvaraju organizmi i opsežno je istražen [2].

Kao prirodna zaštitna struktura, biomineralizacija je proces u kojem se organska i anorganska tvar međusobno spajaju pod regulacijom živih organizama. Biomineralizirani kristali razlikuju se od pravilne strukture i površine umjetnih kristala. Ovisno o okolišu uzgoja, biomineralizirani kristali pokazuju različite fizikalne i kemijske karakteristike, koje je teško simulirati i proizvesti in vitro, dok je proces formiranja biomineralizacije vrlo sličan. Biomineralizacija je raširena pojava koja dovodi do stvaranja dobro organiziranih biominerala, što se odnosi na stvaranje anorganskih minerala u organizmima. Anorganski minerali ne samo da pomažu u zaštiti živih organizama, poput zrelih ljuštura mekušaca,

ljuštura ramenonožaca i kutikula rakova, već također pomažu u održavanju organizama i osjećaju signala iz okoline, poput kostiju, zuba, kostura bodljokožaca, kostura koralja i spužve [2].

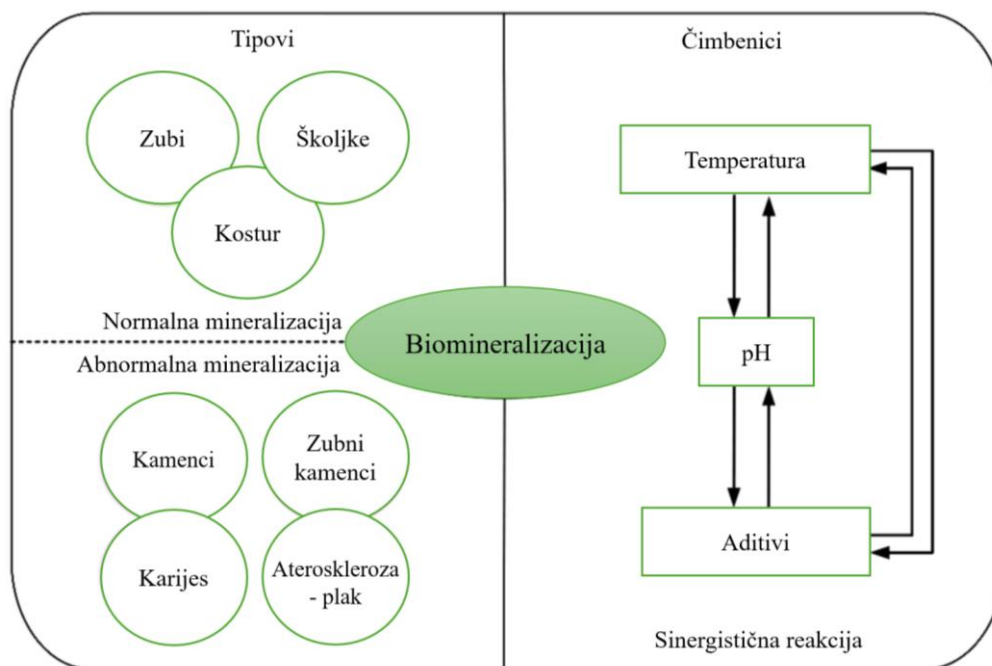
Biom mineralizacija uključuje biologiju, kemiju, kristalografiju, znanost o materijalima, mineralogiju i medicinu, a druge su discipline također dovele do specijalizacije u tim područjima. Proučavanje karakteristika mehanizma formiranja biom mineralizacije nije samo korisno za razvoj i korištenje novih nanomaterijala, već također pomaže u liječenju abnormalne mineralizacije koja je uzrokovana bolestima ljudskog tijela, kao što su osteoporoza, osteomalacija, hipofosfatazija, bubrežni kamenci i ateroskleroza [3].

Prema stupnju biološke kontrole minerala, biom mineralizacija se može podijeliti u dvije kategorije: biološka indukcija i biološka kontrola. Bioinducirana biom mineralizacija je proces uzrokovan fiziološkim aktivnostima organizama, kao što su metabolizam, udisanje kisika, izdisanje ugljičnog dioksida disanjem, kao i uspostavljanje staničnih stijenki, koje mijenjaju fizikalne i kemijske uvjete okoliša. Ovu mineralizaciju ne vode specifična stanična tkiva ili biološke makromolekule, što rezultira proizvoljnom orijentacijom kristala i nedostatkom jedinstvene morfologije. Negativno nabijene stanične stijenke (sadrže karboksilne i fosfatidilne skupine) spajaju  $Fe^{3+}$  ione elektrostatskom interakcijom, a  $Fe^{3+}$  ioni reagiraju sa silicijevom kiselinom u željezni silikat. Ovaj proces rijetko kontroliraju stanice, a njegov kristalni oblik sličan je onom željeznog silikata koji se proizvodi u anorganskim otopinama. Biološki kontrolirana mineralizacija je proces koji je uzrokovan biološkim fiziološkim aktivnostima i kontroliran biologijom u tri aspekta: prostoru, strukturi i kemiji. Javlja se u ograničenim prostorima. Biom mineralna organska tvar formirana je s visokim sadržajem, jedinstvenom navikom kristalizacije, ujednačene veličine, ujednačenog oblika i pravilnog rasporeda [3].

Mineralizacija u organizmima može se podijeliti u četiri faze. (1) Organske makromolekule unaprijed su sastavljene u uređene strukture. Netopljiva organska tvar u organizmima gradi organizirano mikroreakcijsko okruženje prije taloženja minerala, koje određuje mjesto anorganske nukleacije i funkciju stvaranja minerala. Ova faza je preduvjet biom mineralizacije. (2) Molekularno prepoznavanje organsko-anorganskih sučelja koja kontroliraju nukleaciju i rast kristala. (3) Regulacija rasta koja omogućuje početno sastavljanje kristala u podjedinicama. (4) Presing stanica, formiranje biom minerala s višerazinskom strukturom sastavljanjem minerala podjedinice.

Vjeruje se da biom mineralizaciju kontroliraju različiti čimbenici. Formiranje biom minerala

često je rezultat sinergističkog djelovanja različitih čimbenika, uključujući pH, temperaturu i matricu [3]. Kao što je prikazano na **slici 1.**, biomineralizacija se može podijeliti u dvije vrste, normalna mineralizacija i abnormalna mineralizacija, a proces formiranja uglavnom regulira temperatura, pH i aditivi [3].



**Slika 1.** Vrste biomineralizacije i čimbenici [3].

Biomineralizacija je proučavanje biološki proizvedenih materijala, kao što su školjke, kosti i zubi, te procesi koji dovode do stvaranja tih organsko-anorganskih kompozita. Mehanička, optička i magnetska svojstva ovih materijala organizmi iskorištavaju u različite svrhe. Ta su svojstva često optimizirana za određenu funkciju u usporedbi sa svojstvima bioloških materijala sličnog sastava. Kemičari materijala zainteresirani su iznimnim kontrolnim organizmima koji vrše nad sastavom, kristalografijom, morfologijom i materijalnim svojstvima biomateriala i blagim uvjetima (fiziološka temperatura, tlak i pH) potrebnim za njihovo formiranje. Utjecaj kemije u području biomineralizacije može se otprilike podijeliti u tri različita područja: (1) karakterizacija kristalne građe, sastava i biokemije bioloških materijala; (2) projektiranje sustava *in vitro* modela za odgovaranje na pitanja iz biologije, kao što su hipoteze o ispitivanju u vezi s interakcijama između organske matrice i kristala te ulogom biomakromolekula u kontroli nukleacije i rasta kristala; i (3) razvoj novih sintetičkih metoda, koje se temelje na biološkim sustavima, za kontrolu svojstava kristalne morfologije, polimorfa i materijala, što dovodi do

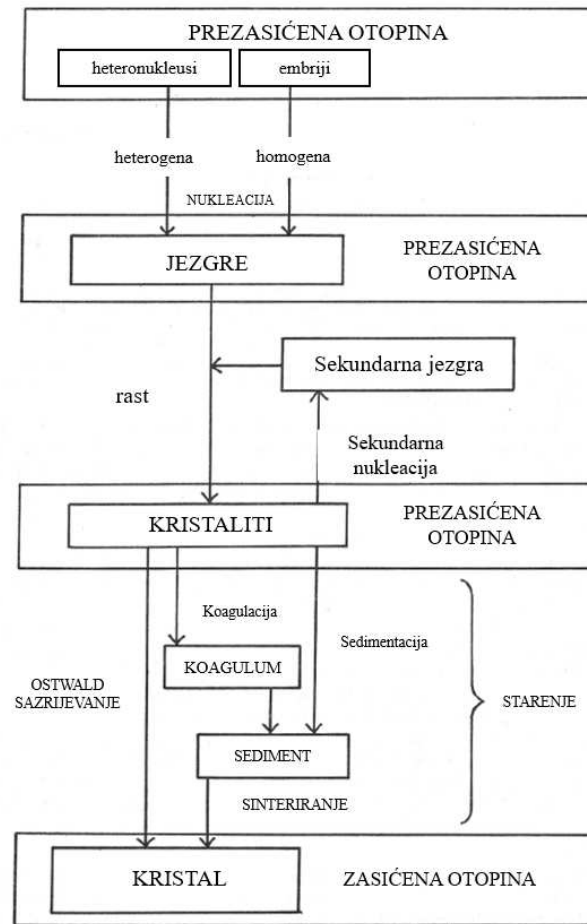
novih klasa organsko-anorganskih kompozita [4].

### 2.1.1. Patološka biomineralizacija

Postoje dva oblika mineralizacije: jedan je normalna mineralizacija, kao što su kostur, zubi i školjke, formiranje školjki i tako dalje. Drugi je abnormalna mineralizacija, kao što su kamenci, zubni kamenci i karijes zubi, i tako dalje. Postoje dvije teorije koje objašnjavaju ovu biomineralizaciju. Teorija kristalizacije otopine i teorija mineralizacije prekursora tekuće faze izazvane polimerom. Za teoriju kristalizacije otopine, molekule kolagena tipa I same se okupljaju u nativnu "šupljinu". "Šupljina" sadrži negativno nabijene aminokiseline,  $\text{COO}^-$  se može vezati na  $\text{Ca}^{2+}$ , što dovodi do taloženja  $\text{Ca}^{2+}$  u "šupljini". Za teoriju mineralizacije prekursora tekuće faze, visoko hidratizirane amorfne kalcijeve fosfatne nanometarske kapi prodiru u pore i šupljine kolagenih vlakana, hidrati gube vodu i kristaliziraju se u porama i šupljinama kolagenih vlakana. Kalcifikacija ateroskleroze (AS) plak je tipičan uzorak abnormalne mineralizacije [3].

### 2.2. Taložni procesi

Taloženje je formiranje jedne ili više novih faza sastava različitih od onih u izvornom višekomponentnom jednofaznom sustavu. Faze procesa taloženja prikazane su na **slici 2** [5]. Taloženje počinje nukleacijom na česticama nečistoća ili stvaranjem embrija. Jezgre rastu u vidljive kristalite. Ponekad je proces rasta popraćen stvaranjem novih (sekundarnih) jezgri tako da su prisutni kristaliti dviju ili više skupina veličina. Kristali mogu tvoriti stabilnu suspenziju ili mogu koagulirati. Kada kristaliti ili koagulirane nakupine u tekućini postanu veći, teže se talože. Ovo je obično zadnji korak procesa i čini se da je rast pojedinačnih čestica prestao. Ali ako se sustav promatra jako dugo, vidljivo je da se manji kristaliti ponovno otapaju, a veći dalje rastu. Termodinamički sustav nije stabilan dok se sva otopljena tvar u višku od količine koja odgovara topljivosti ne sjedini u jedan kristal te je to teoretski završetak [5].



**Slika 2.** Shema procesa taloženja [5].

### 2.2.1. Prezasićenost

Taloženje je moguće samo ako je otopina prezasićena. Zasićena otopina može se učiniti prezasićenom promjenom temperature ili frakcioniranjem isparavanjem ili kristalizacijom otapala. Drugi način izrade prezasićene otopine je miješanje dviju otopina ili tekućina koje reagiraju kemijski (npr. taloženje elektrolita iz vodene otopine) ili na neki drugi način (isoljenje; dodavanje lošeg otapala otopini u dobrom otapalu) [5].

### 2.2.2. Nukleacija

Taloženje ne počinje pri bilo kojem prezasićenju jer mali kristali imaju veću ravnotežnu koncentraciju od velikih kristala. Ako se kristal u otopini podijeli na više malih kristala, međusklop se povećava. Međusklop razdvaja dvije različite faze koje mogu imati različite kristalne strukture i/ili sastav i stoga također uključuje čvrsto/tekuće sučelje. Ako je izvorni kristal bio u ravnoteži topivosti s otopinom, mali kristali to ne mogu biti. Zapravo će se

početi otapati, čak i pri maloj konačnoj prezasićenosti. Što je čestica manja, to je veća prezasićenost potrebna da bi čestica bila u ravnoteži s otopinom. Kristali koji su manji od određene kritične veličine će se otopiti ako dođu u dodir s otopinom umjerene prezasićenosti - kritična veličina ovisi o omjeru koncentracije i topivosti, dok kristali veći od kritične veličine počinju rasti i rastu sve brže i brže, kako postaju veći (ako se koncentracija otopljene tvari održava konstantnom). Ali znamo da se kristali često pojavljuju iz umjereno prezasićene otopine [5]. Postoje dvije vrste nukleacija a to su heterogena i homogena nukleacija.

#### a) Heterogena nukleacija

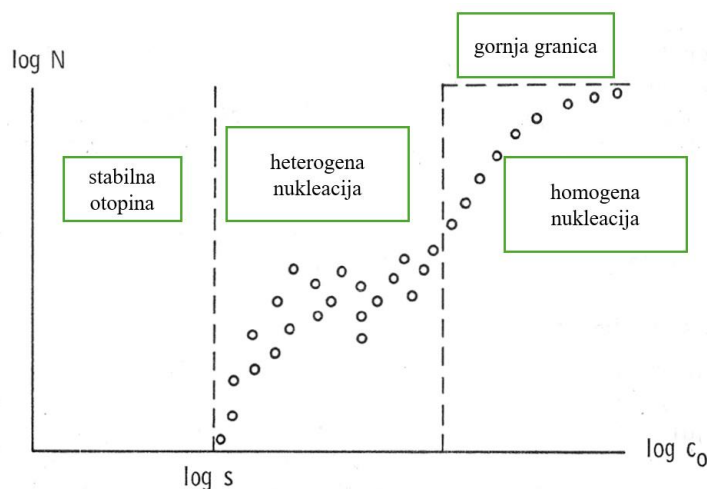
Svaka otopina koja nije izuzetno dobro očišćena sadrži veliki broj nevidljivih čvrstih čestica. 100 čestica po  $\text{mm}^3$  sasvim je normalno čak i u filtriranim tekućinama. Zapravo, nemoguće je potpuno ukloniti te čestice. Oni mogu djelovati kao heteronukleusi, tj. katalizatori za inicijaciju taloženih kristala, pri čemu se otopljena tvar adsorbira na čestice kako bi formirala sloj koji je veći od površine kristala kritične veličine, te stoga može rasti u otopini. Ovo je normalan način nukleacije nove faze [5].

#### b) Homogena nukleacija

Čak i pri umjerenom prezasićenosti postoji primjetan broj embrija, tj. subkritični centar kristalne strukture u ravnoteži s otopinom, a mali dio njih doseže kritičnu veličinu toplinskom fluktuacijom. Kada se to dogodi veća je šansa da će centar dalje rasti nego šansa da će se ponovno raspasti. Embriji kritične veličine tako igraju ulogu sličnu aktiviranom kompleksu kinetike kemijske reakcije. Homogena nukleacija opažena je u dvije vrste eksperimenata. U prvom tipu rast heteronukleusa ograničen je dijeljenjem sustava na vrlo velik broj malih dijelova, tako da samo mali dio od njih sadrži jednu ili više heteronukleusa. To je učinjeno stvaranjem emulzije kapljica u drugoj tekućini koja se ne miješa s otapalom. Metoda je korištena u proučavanju homogene nukleacije iz tekućih metala (emulgiranih u ulju). Slična tehnika je proučavanje magle kapljica koje kristaliziraju u plinu nosaču. U drugom tipu eksperimenata vrlo brzo se proizvodi vrlo visoka supersaturacija tako da je broj čestica s homogenom jezgrom mnogo veći od broja prisutnih heteronukleusa. To je bila metoda korištena u klasičnom radu o homogenoj nukleaciji para hlapljivih tekućina poput etanola i vode. Također je primijenjen za taloženje teško topivih elektrolita iz otopine.

**Slika 3.** prikazuje broj čestica formiranih u jedinici volumena kao funkciju koncentracije. U slučaju heterogene nukleacije broj čestica je otprilike konstantan tijekom procesa taloženja, a čestice su gotovo iste veličine. Kada se odvija homogena nukleacija, broj kristala se povećava s vremenom. Brzina nukleacije jako ovisi o koncentraciji i približava se nuli čim

koncentracija padne za relativno mali iznos. Gornja granica određena je brzinom miješanja, koagulacijom ili fenomenom starenja.  $N$  označava broj čestica nastalih u jedinici volumena,  $c_0$  je početna koncentracija,  $s$  je topljivost [5].



**Slika 3.** Broj čestica nastalih u nizu pokusa taloženja kao funkcija početne koncentracije [5].

### 2.2.3. Rast kristala

Nukleacija u otopini nikada nije promatrana izravno, jer su jezgre izuzetno male, često sadrže manje od 100 molekulskih jedinica (molekula, atoma ili iona), formirane su na nasumičnim položajima i izrazito su nestabilni i odmah počinju rasti. Stoga se jezgre ne mogu promatrati dok se ne razviju kroz rast. Kristali rastu stalnim dodavanjem jednog sloja molekularnih jedinica na drugi. Jedinice stižu na površinu kristala difuzijom, ponekad potpomognute konvekcijom, i postavljaju se na kristalnu rešetku. Proces koji određuje brzinu može biti difuzija kroz otopinu. Kombinacija difuzije i konvekcije i jedan ili više procesa u sučelju kristal-otopina. Kinetičke jednadžbe difuzije i (laminarne) konvekcije dobro su poznate i uvijek je moguće saznati u kojoj je mjeri određeni proces rasta kontroliran difuzijom i konvekcijom, ako su brzina, veličina i oblik kristala, koncentracija i drugi parametri poznati. Međutim, izračuni mogu biti prilično komplicirani. Kada molekularna jedinica stigne na granicu kristal-tekućina, općenito će se adsorbirati, kretati duž sučelja i (djelomično) desolvatirati prije nego što uđe na svoje buduće mjesto u kristalnoj rešetki. Dodavanje novih slojeva kristalu može slijediti najmanje četiri različita obrasca.

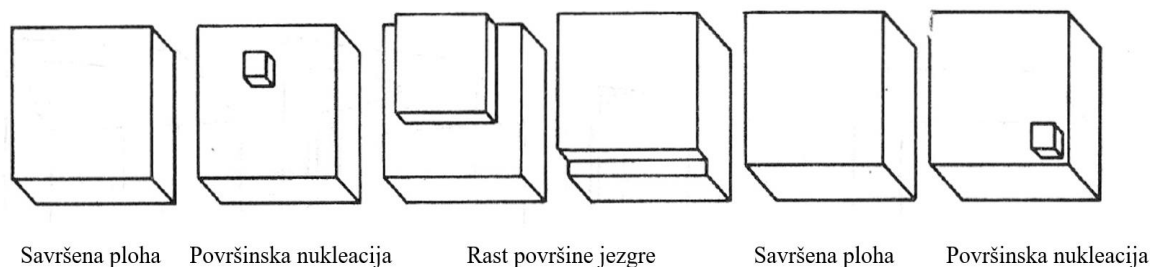
#### A. Izraslina na savršenoj kristalnoj plohi

##### 1) Stvaranje mononuklearnog sloja

Na savršenoj kristalnoj plohi vrlo mali površinski embriji su nestabilni i otapaju se, ali veće



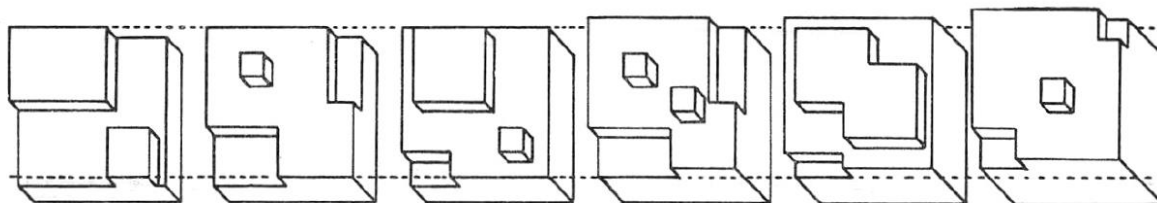
površinske jezgre rastu. Pri niskim stupnjevima prezasićenosti to rezultira vrlo sporom površinskom nukleacijom nakon koje slijedi rast, koji je relativno spor, ali dovoljno brz da se sloj proširi po cijeloj površini prije nego što se formira sljedeća površinska jezgra. Svaki sloj potječe iz površinske jezgre. Proces je prikazan na **slici 4.** [5].



**Slika 4.** Prikaz stvaranja mononuklearnog sloja [5].

## 2) Stvaranje polinuklearnog sloja

Stope nukleacije rastu brže s koncentracijom nego stope rasta. Pri višim koncentracijama to će rezultirati istovremenom prisutnošću nekoliko jezgri na plohama kristala. Površinske jezgre koje pripadaju istom sloju rastu jedna u drugu. Svaki sloj potječe iz više od jedne površinske jezgre, ali slojevi u konačnom kristalu jednako su savršeni kao u slučaju stvaranja mononuklearnog sloja. Na plohi kristala ne može se formirati novi sloj bez površinske nukleacije, koja posljedično postaje usko grlo za rast. Površinska nukleacija može se dogoditi samo kada je prezasićenost prilično velika (koncentracija je mnogo puta veća od topljivosti). Površinska nukleacija se uglavnom opaža u kontroliranim laboratorijskim eksperimentima. Većina velikih kristala raste pri mnogo manjim prezasićenostima od onih potrebnih za površinsku nukleaciju. Stvaranje polinuklearnog sloja prikazano je na **slici 5.** [5].



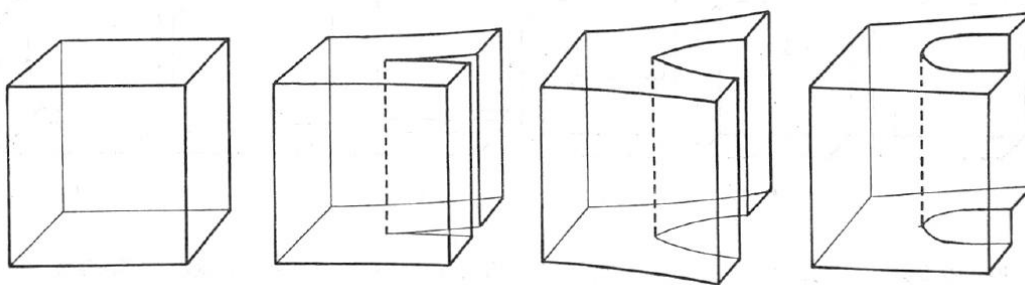
**Slika 5.** Polinuklearni rast [5].

## B. Izraslina na nesavršenoj kristalnoj plohi

### 1) Spiralni korak (vijčana dislokacija) rasta

Većina makroskopskih kristala ima mnoge defekte rešetke koji se nazivaju dislokacije.

Jedna vrsta je dislokacija vijka. Kristal s dislokacijom vijka može se vizualizirati kao savršeni kristal presječen do pola, iskrivljen i ponovno spojen, s nesavršenošću vidljivom samo na dvije suprotne strane, ali ne i na strani gdje je napravljen rez. Svi horizontalni slojevi kristala prikazani na **slici 6.** sada su dijelovi jednog vijčanog sloja (ili nekoliko vijčanih slojeva ako je izobličenje veće od debljine jednog sloja) koji se vijugaju oko osi dislokacije vijka prikazane isprekidanom linijom. Kada kristal ima vijčanu dislokaciju, on može rasti bez površinske nukleacije, budući da stepenica na plohi gdje završava vijčana dislokacija neće nestati, koliko god kristal rastao, i stoga djeluje kao trajni katalizator za rast, učinkovit čak i pri vrlo malim prezasićenjima [5].



**Slika 6.** Prikaz nastanka kristala u blizini dislokacije vijka [5].

## 2) Hrapava površina

Nukleacija je posljedica Gibbsove slobodne energije. Ako je međufazna napetost mala, nukleacija više nije potrebna. U taloženjima iz otopina vrlo topljivih tvari međupovršinska napetost može postati toliko mala da ne rasteže sučelje u ravninu. Umjesto toga, sučelje postaje molekularno grubo. Ovo se često nalazi u metalnim sustavima, ali vjerojatno nikad u vodenim otopinama. Kada je površina hrapava, stopa rasta može biti vrlo brza, čineći provođenje toplote faktorom koji kontrolira brzinu, a makroskopski će površina slijediti izotermu ravnotežne temperature [5].

### 2.2.4. Kinetika rasta kristala

Mnogi važni zaključci koji se tiču molekularnih mehanizama rasta kristala mogu se temeljiti na rezultatima kinetičkih mjerenja. Brzina rasta definirana je kao brzina (u odnosu na fiksnu točku u kristalu) pomaka plohe u smjeru normale. Brzina se može kontrolirati: 1. difuzijom u okolnoj tekućini; 2. konvekcija u tekućini; 3. molekularni procesi na površini, kao što su adsorpcija, površinska difuzija, desolvatacija i uklapanje jedinica u strukturu površine.

1. Rast kontroliran difuzijom slijedi dobro poznate Fickove zakone difuzije. Kada su koncentracija u otopini, topljivost i oblik kristala poznati, može se izračunati difuzijska stopa

rasta. Stoga se često koristi najjednostavniji slučaj, sferna čestica, kao aproksimacija. Dvije su važne značajke kontrole difuzije: brzina je proporcionalna efektivnoj koncentraciji i brzina je obrnuto proporcionalna radijusu sferne čestice tj. male čestice rastu brže (linearno) od većih.

2. U slučaju konvekcije u otopini, prijenos tvari do površine rastuće čestice povećava se iznad brzine čisto difuzijski kontroliranog procesa. Izračuni su komplicirani, ali su provedeni za sferne čestice koje se kreću u otopini.

3. Njihov utjecaj na apsolutnu stopu rasta može biti vrlo izražen, ali se vjerojatno može izraziti nekim više ili manje konstantnim faktorom u izrazu stope. Zanimljivosti koje nam omogućuju pretpostavke o mehanizmima rasta povezane su s utjecajem strukture površine. Ako je površina kristala savršena, za rast je neophodna nukleacija. U slučaju mononuklearnog rasta svaka površinska jezgra daje cijeli sloj, a budući da je površinska nukleacija slučajan proces, brzina je proporcionalna površini [5].

#### 2.2.5. Složeni mehanizmi

U mnogim slučajevima na procese rasta utječe više od jednog od opisanih mehanizama, koji odgovaraju ekstremnim slučajevima. Ako i difuzija i površinska reakcija utječu na brzinu, sporiji od ova dva mehanizma bit će najvažniji jer su dva mehanizma uzastopna. Ako se polinuklearni mehanizam i površinski spiralni mehanizam natječu, onaj brži će odrediti brzinu budući da ta dva mehanizma djeluju neovisno, paralelno jedan s drugim [5].

#### 2.2.6. Starenje

Doprinos međufazne napetosti Gibbsovoj slobodnoj energiji proporcionalan je površini međufaze. Stoga sustav nije stabilan sve dok površina međufaze nije što manja. Smanjenje površine precipitata naziva se starenje. Ovaj proces se odvija kroz:

- a) rekristalizaciju primarnih čestica, transformirajući iglice, tanke ploče ili dendrite u kompaktniji oblik lutanjem površine adsorbiranih molekularnih jedinica ili transportom kroz matičnu tekućinu,
- b) transformaciju kristala iz metastabilne modifikacije u stabilnu modifikaciju otapanjem i ponovnim taloženjem,
- c) agregaciju primarnih čestica nakon čega slijedi sinteriranje (međusobno srastanje) i
- d) Ostwaldovo sazrijevanje, tj. rast većih čestica na račun manjih.

Male čestice imaju veću Gibbsovu slobodnu energiju po molekularnoj jedinici nego veće čestice, zbog većeg sučelja po molekularnoj jedinici tj. topljivost male čestice veća je od topljivosti velike čestice. Ako je otopina u kontaktu s tri veličine kristala i u ravnoteži sa srednjom veličinom, mali kristali će smatrati da je otopina podzasićena i stoga će se otopiti, dok će velike čestice smatrati da je prezasićena i rasti. Slijedi da otopina ne može biti u ravnoteži s talogom koji se sastoji od kristala dvije ili više veličina. Ako se otopina ostavi s polidisperznim talogom, koncentracija će prije ili kasnije dosegnuti vrijednost između topljivosti najvećih i najmanjih čestica, i ostati u tom intervalu dok se male čestice otapaju, a velike rastu, sve dok na kraju samo ostaje jedan veliki kristal. Tijekom starenja koncentracija je blizu ravnotežne koncentracije čestice polumjera jednako aritmetičkoj sredini polumjera svih čestica. To opisuje Ostwaldovo sazrijevanje [5].

### 2.3. Urolitijaza

Urolitijaza potječe od grčkih riječi *ouron* (urin) i *lithos* (kamen). Urolitijaza se odnosi na nakupljanje tvrdih, čvrstih i nemetalnih minerala u urinarnom traktu. To je drevna i česta bolest čija je klinička pojava i prezentacija opisana u Hipokratovim aforizmima. Stvaranje kamenca u bubrezima jedna je od najstarijih i najraširenijih bolesti poznatih čovjeku. Stvaranje kamenaca mokraćnog sustava je u cijelom svijetu, ne štedeći zemljopisne, kulturne ili rasne skupine. Stope recidiva procjenjuju se na oko 10 % godišnje, ukupno 50 % u razdoblju od 5-10 godina i 75 % u razdoblju od 20 godina. Urolitijaza je prilično česta u zemljama u razvoju i nerazvijenim zemljama, gdje je recidiv kamenca u mokraćnom mjehuru prilično čest zbog toga što se proteini u prehrani uglavnom dobivaju iz biljnih izvora. Mokraćni kamenac i dalje zauzima važno mjesto u svakodnevnoj urološkoj praksi. Zabilježen je prosječni životni rizik od stvaranja kamenaca u rasponu od 5-10 %. Može se uočiti dominacija muškaraca nad ženama s vrhuncem incidencije između četvrtog i petog desetljeća života [6].

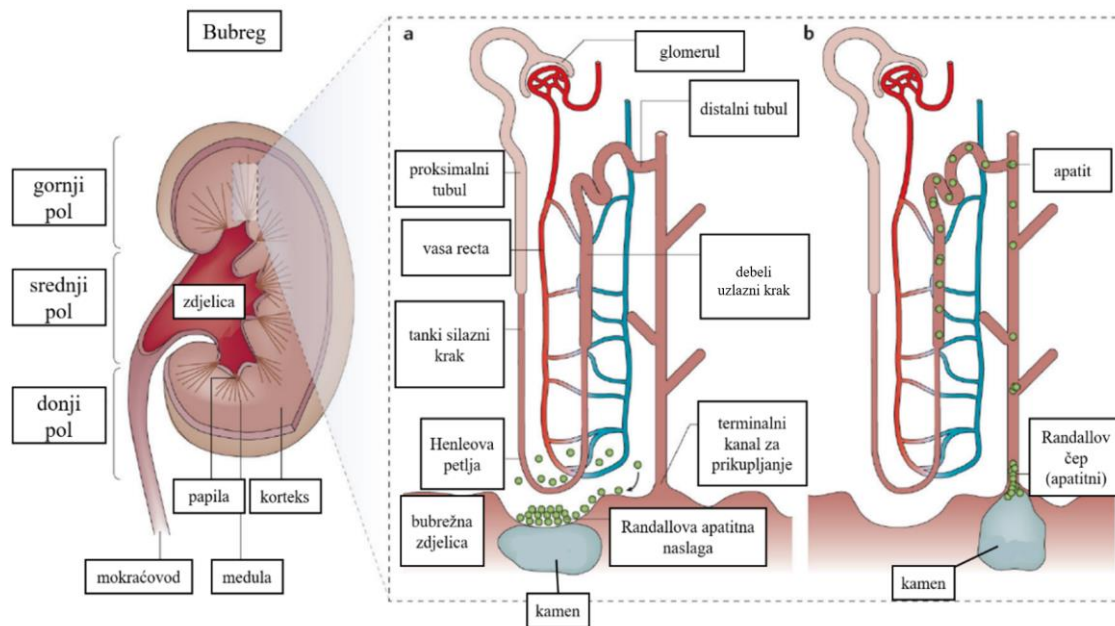
Urolitijaza je metabolička bolest uzrokovana različitim egzogenim i/ili endogenim čimbenicima, često nasljedne prirode, a određena je prisutnošću kamenca u mokraćnom sustavu. Uzroci i mehanizam nastanka kamenca ostaju nepoznati u urologiji. Još uvijek nema konačne teorije o razvoju urolitijaze. Glavne teorije litogeneze svode se na vodeću ulogu sljedećih čimbenika: povećanje razine litogenih iona, nedostatak inhibitora kristalizacije i agregacije kristala, prisutnost aktivatora stvaranja kamenca u urinu i lokalne promjene u bubrezima [7].

Urolitijaza nastaje kada kristali, od kojih se sastoje kamenci, prezasiće urin zbog prisutnosti u visokoj koncentraciji te kada se počnu skupljati i kristalizirati unutar parenhima bubrega, tvoreći bubrežne kamence. Ti će se kristali skupiti i nastaviti povećavati s potencijalom da migriraju u ureter i postanu simptomatični. Ako kamenac uzrokuje opstrukciju i ne dopušta prolaz urina kroz ureter, hidronefroza se može pojaviti kao sekundarna dilatacija uretera i bubrežne zdjelice uzvodno. Kamenje je bolno unutar uretera jer će, dok prolaze kroz ureter, povećana luminalna napetost i hidronefroza dovesti do otpuštanja prostaglandina, što će rezultirati grčevitim bolom povezanim sa stanjem [8].

Stanje postojanja bubrežnih kamenaca naziva se nefrolitijaza. Urolitijaza je složen proces za koji su se tijekom stoljeća koristili mnogi lijekovi, a kamenci se nalaze u svim dijelovima urinarnog trakta i bubrega [6].

#### 2.4. Bubrežni kamenci

Bubrežni kamenci (kamenci) su mineralne nakupine u bubrežnim čašicama i zdjelici, prikazane na **slici 7.**, koje se nalaze slobodne ili pričvršćene na bubrežne papile. Kamenci koji se razvijaju u urinarnom traktu (poznati kao nefrolitijaza ili urolitijaza) nastaju kada urin postane pretjerano prezasićen u odnosu na mineral, što dovodi do stvaranja kristala, rasta, agregacije i zadržavanja u bubrežima. Približno 80 % bubrežnih kamenaca sastoji se od kalcijeva oksalata (CaOx) pomiješanog s kalcijevim fosfatom (CaP). Kamenci koji se sastoje od mokraćne kiseline, struvita i cistina također su česti i čine približno 9 %, 10 % odnosno 1 % kamenaca. Urin također može postati prezasićen određenim relativno netopivim lijekovima ili njihovim metabolitima, što dovodi do kristalizacije u bubrežnim sabirnim kanalima (kamenci nastali kao posljedica medicinskog liječenja). Slabo topljivi kontaminanti iz hrane također mogu kristalizirati i formirati kamence. Na slici je vidljivo da stvaranje kamenaca kreće kao taloženje kalcijeva fosfata (CaP) u intersticiju (apatit), rastu prema van dopirući do površine bubrežne papile, postaju izloženi urinu zdjelice i uspostavljaju jezgru za taloženje kalcijeva oksalata (CaOx), što dovodi do stvaranja CaOx kamenaca pričvršćenih za CaP bazu, poznatih kao Randall-ovi plakovi. Nasuprot tome na **slici 7b**, u mehanizmu slobodnih čestica, na primjer, CaP, kristali mokraćne kiseline ili cistina nastaju u bubrežnim tubulima, kreću se s urinom, agregiraju i začepuju terminalne kanale za prikupljanje. Ovi čepovi, koji se nazivaju Randallovi čepovi ili lezije, izloženi su urinu zdjelice. Taloženje CaOx kristala na CaP čepovima dovodi do stvaranja CaOx bubrežnih kamenaca [9].



**Slika 7.** Makroskopska i mikroskopska morfologija bubrega i lokalizacija kamenaca [9].

Bubrežni kamenci pogađaju do 5 % populacije, s doživotnim rizikom pojave bubrežnih kamenaca od oko 8-10 %. Povećana učestalost bubrežnih kamenaca u industrijaliziranom svijetu povezana je s boljim životnim standardom i snažno je povezana s rasom ili etničkom pripadnošću i regijom stanovanja. Također se vidi sezonska varijacija, s visokom zasićenošću kalcijevim oksalatom u urinu kod muškaraca tijekom ljeta i kod žena tijekom rane zime [10]. Nefrolitijaza je češća u muškaraca nego u žena tijekom većeg dijela odraslog života, osim u šestom desetljeću, gdje incidencija pada kod muškaraca, ali raste kod žena. Postoje velike geografske varijacije u učestalosti i sastavu kamenaca, i identificirani su regionalni pojasevi, gdje se povećana učestalost pripisuje genetskim i okolišnim čimbenicima, kao što su vruća klima (gubitak tekućine) i izloženost suncu (vitamin D) [11].

Bubrežni kamenci sastoje se od anorganskih i organskih kristala povezanih s proteinima. Kristalizacija i kasnija litogeneza mogu se dogoditi s mnogim otopljenim tvarima u urinu. Vapnenački kamenci još uvijek su daleko najčešći nefroliti, čineći više od 80 % kamenaca. Kamenci mokraćne kiseline predstavljaju oko 5-10 %, iza kojih slijede cistinski, struvitni i uratni kamenci amonijeve kiseline, dok kamenci mješovitog sastava nisu rijetkost [11]. Bubrežni kamenci široko se kategoriziraju u vapnenaste kamence (koji sadrže kalcij), koji su radio-nepropusni, i nevapnenačke kamence. Nedavni dokazi pokazuju da je stvaranje bubrežnih kamenaca rezultat nanobakterijske bolesti slične *Helicobacter pylori*

infekciji i peptičkom ulkusu (čir). Na daljnju kristalizaciju i rast kamenca utječu endogeni i prehrambeni čimbenici. Volumen urina, koncentracija otopljene tvari i omjer inhibitora kamenaca (citrata, pirofosfata i mokraćnih glikoproteina) i promotora važni su čimbenici koji utječu na stvaranje kristala. Kristalizacija se događa kada koncentracija dvaju iona prijeđe njihovu točku zasićenja u otopini [10].

#### 2.4.1. Vrste bubrežnih kamenaca

Četiri glavne vrste kamenaca nazvane su po svojim sastavima. Kalcijevi kamenci su najčešći i pojavljuju se kao kristali kalcijevog oksalata (CaOx) i kalcijevog fosfata (CaP), sami ili u kombinaciji. Većina bubrežnih kamenaca djelomično ili potpuno se sastoji od CaOx, koji postoji kao monohidrat ili dihidrat. Pojedinačni kristali kalcijeva oksalata monohidrata (COM) su tanki i nalik na ploču, i općenito poprimaju oblik "bučice" kroz zbrajanje, kao što se vidi u urinarnim sedimentima. Unutar kamenaca, COM kristali su radijalno raspoređeni u profile u obliku lepeze s jasnim koncentričnim slojevima, pokazujući rast kristala i kamenja prema van. Kristali kalcijeva oksalata dihidrata (COD) imaju karakterističan tetragonalni bipiramidalni oblik i u urinarnom sedimentu i u bubrežnim kamencima. CaOx kamenci općenito sadrže i COM i COD kristale. COM kamenci su češći od čistih COD kamenaca. Kod miješanih kamenaca COD kristali su pretežno prisutni na površini kamena, koja izgleda nazubljeno. Nasuprot tome, čisti COM kamenci imaju glatke površine. Hiperkalcijurija, hiperoksalurija i hipocitaturija glavni su čimbenici rizika nastanka kamenaca [9].

CaP se uglavnom nalazi kao bazični CaP (apatit), kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (brušit) ili trikalcijev fosfat (whitlockite). Čisti CaP kamenci su rijetki. Apatit je najčešći kristal u bubrežnim kamencima i često je praškasta masa koja ispunjava prostore između drugih vrsta kristala, uglavnom kristala CaOx. Whitlockite je vrlo rijedak u bubrežnim kamencima i mokraćnim sedimentima. Brušit se često pojavljuje u bubrežnim kamencima i prisutan je u obliku rozeta radijalno raspoređenih tankih kristala poput oštrice [9].

Kamenci mokraćne kiseline pojavljuju se kod osoba koje su pretile i otporne na inzulin. Za razliku od tipova kalcijevih kamenaca, pretjerano kiseli urin (pH < 5,5) prepoznat je kao glavna abnormalnost odgovorna za nefrolitijazu mokraćne kiseline. Osim netopivosti mokraćne kiseline pri niskom pH urina i dehidracije, stanja koja dovode do prekomjernog izlučivanja mokraćne kiseline, poznata kao hiperurikozurija, također su povezana s stvaranjem kamenca mokraćne kiseline. Većina kamenaca mokraćne kiseline su kompaktni,



izgledaju poput kamenčića, sa središnjom jezgrom labavo agregiranih bezvodnih kristala mokraćne kiseline okruženih zrakastim stupčastim bezvodnim kristalima mokraćne kiseline organiziranim u koncentrične slojeve. Neki kamenci imaju kompaktni vanjski sloj koji okružuje poroznu trošnu unutrašnjost koja se sastoji od bezvodne mokraćne kiseline, dihidrata mokraćne kiseline i COM kristala pomiješanih s organskim materijalom [9].

Struvitni kamenci, također poznati kao 'infektivni kamenci', predstavljaju 7-8 % svih kamenaca u svijetu i obično su uzrokovani povećanom proizvodnjom amonijaka kao sekundarnom infekcijom organizmima koji proizvode ureazu. Naknadna alkalna mokraćna dovodi do stvaranja kristala magnezijevog amonijevog fosfata heksahidrata. Struvit i pridruženi kristali karbonatnog apatita mogu brzo narasti u veliko kamenje koje se naziva „kamenac jelenjeg roga“, prikladno nazvan po svojim izbočinama poput roga koje zauzimaju bubrežnu zdjelicu i bubrežne čašice. Struvitno kamenje veliki su agregati ortorombičnih struvitnih kristala u obliku 'poklopca lijesa' prekrivenih sferulitskim karbonatnim apatitnim kristalima i pomiješanih sa staničnim ostacima, koji često uključuju bakterije [9].

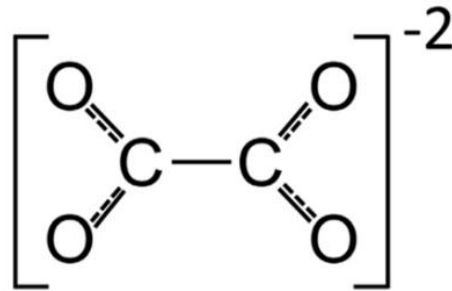
Cistinski kamenci nastaju kao rezultat autosomno recesivnog defekta u bubrežnom prijenosniku aminokiseline cistin. Nedostatak reapsorpcije cistina dovodi do povećanog izlučivanja cistina mokraćom. Pri normalnom pH urina, cistin je netopljiv i stvara cistinske kristale koji se mogu agregirati i formirati ponovljene bubrežne kamence i kamence u mokraćnom mjehuru. Cistinsko kamenje je kompaktno, jantarne boje, blago neprozirno i homogene unutrašnjosti. Veće povećanje kamenca i urinarnih naslaga otkriva jedinstvenu i karakterističnu heksagonalnu strukturu kristala cistina [9].

## 2.5. KALCIJEVI OKSALATI

Kristalni oksalati su široko rasprostranjeni u prirodi. Uočeni su u stijenama, tlu i među raznim živim organizmima, uključujući biljke i životinje. Mineralozi ih obično klasificiraju kao "organske kristale". Unatoč prividnoj proturječnosti ova dva izraza, sada je jasno da živi organizmi tvore većinu tih kristalnih faza koristeći iste biokemijske i fiziološke strategije koje se koriste za "normalno" formiranje biominerala [12]. Oksalati su antinutritivni spojevi prisutni u povrću kao što je špinat, blitva, cikla ili rabarbara. Ovi spojevi su jaka organska kiselina sa sposobnošću stvaranja soli topljivih u vodi vezanjem na minerale kao što su natrij ili kalij, kao i soli netopljivih u vodi vezanjem na kalcij, željezo ili cink. Općenita struktura oksalata prikazana je na **slici 8**. Tradicionalno se unos oksalata



hranom povezivao s patofiziologijom rizika od bolesti bubrežnih kamenaca, a u studijama na ljudima primijećena je veza između oksalata ishranom i stvaranja bubrežnih kamenaca. Vežano uz sadržaj oksalata, važno je uzeti u obzir da topivi oksalati imaju veći utjecaj na bioraspoloživost i rizik od stvaranja kamenaca od netopivih oksalata [13]. Kalcijev oksalat je daleko najrasprostranjeniji biomineral ove vrste, a posebno je čest u biljkama. Prisutnost drugih metalnih oksalata iznimno je rijetka u biološkim sustavima, uključujući one magnezija, bakra i mangana, koji su otkriveni u različitim vrstama lišajeva [12].



**Slika 8.** Općenita struktura oksalata [13].

Oksalna kiselina je najmanji i najjednostavniji dikarboksilat i sveprisutna je u okolišu (u tlu, vodi i aerosolima), što objašnjava široku rasprostranjenost oksalata. Kalcijevi oksalati su vrlo česti biominerali i mogu se naći npr. u ugljenim bazenima, bitumenskom škriljvcu, pridnenim sedimentima, na dodiru stijena s guanom, lišajevima, gljivama ili nekim višim biljkama pa čak i na površini spomenika. To je ponajviše zbog afiniteta oksalata prema dvovalentnim kationima, što se očituje u sposobnosti stvaranja netopljivih taloga, te zbog toga što izvori kalcija (karbonatne stijene i subfosili) aktivnije djeluju na slabe organske kiseline. Kalcijevi oksalati se također nalaze među precipitatima patogenih minerala u ljudskoj koštanoj srži, miokardu, zglobovima, plućima, jetri, štitnoj žlijezdi, crijevnoj sluznici, očima i mokraćnom sustavu. Oksalati stoga obuhvaćaju nekoliko područja kao što su medicina, biologija, mineralogija, znanost o materijalima itd [14].

Kalcijevi oksalati u prirodi su zastupljeni s tri hidratna oblika: kalcijev oksalat monohidrat, whewellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; COM), kalcijev oksalat dihidrat, weddellit ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; COD) i kalcijev oksalat trihidrat, kaoksit ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; COT). Bezvodni oblici poznati su samo kao sintetski spojevi, tako da molekule vode očito igraju značajnu ulogu u rastu kristala. COM je najzastupljeniji mineral, dok se COD i COT smatraju metastabilnim fazama, što potvrđuju brojna istraživanja i promatranja. S druge strane, COD i COT se smatraju prekursorima za stvaranje COM kristala [14].

Također, monoklinski kalcijev oksalat monohidrat je najstabilniji među ostalim oblicima na

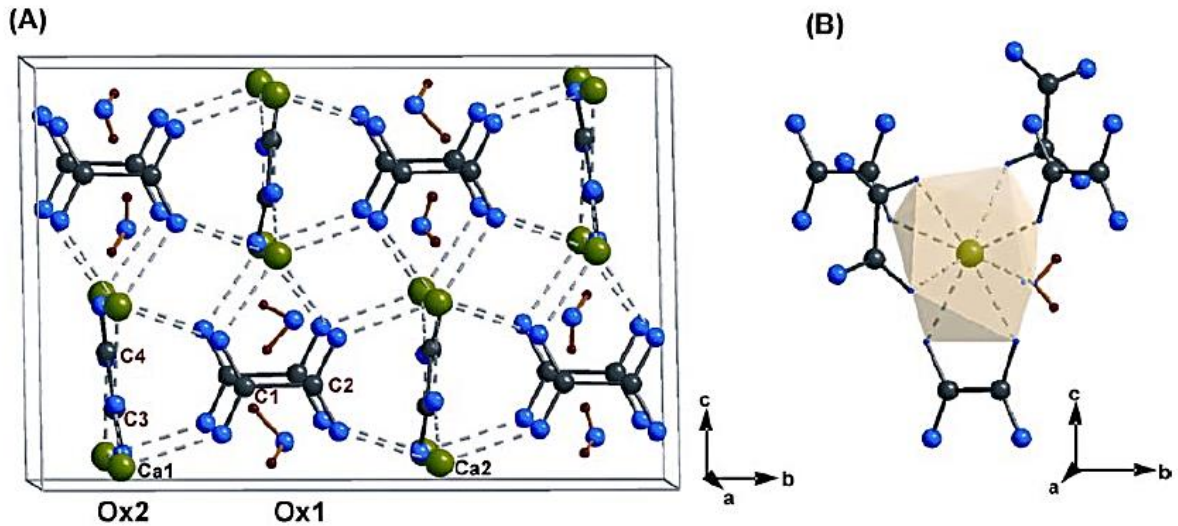
sobnoj temperaturi, zatim ga slijedi tetragonski kalcijev oksalat dihidrat te najrjeđe prisutni triklinski kalcijev oksalat trihidrat [15]. Parametri kristalne rešetke za kristalne faze kalcijevog oksalata prikazane su u **tablici 1.** [16].

**Tablica 1.** Parametri kristalne rešetke CaOx [16].

<b>COM</b> - monoklinski $P2_1/c$ : $a = 6,290 \text{ \AA}$ , $b = 14,5803 \text{ \AA}$ , $c = 10,116 \text{ \AA}$ , $\beta = 109,46^\circ$
<b>COD</b> – tetragonski $I4/m$ : $a = b = 12,371 \text{ \AA}$ , $c = 7,357 \text{ \AA}$
<b>COT</b> – triklinski $P\bar{1}$ : $a = 7,145 \text{ \AA}$ , $b = 8,600 \text{ \AA}$ , $c = 6,099 \text{ \AA}$ , $\alpha = 112,30^\circ$ , $\beta = 108,87^\circ$ , $\gamma = 89,92^\circ$

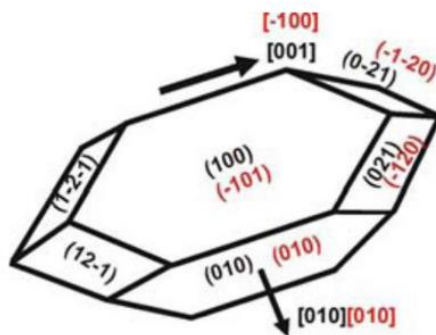
### 2.5.1. Kalcijev oksalat monohidrat (COM)

COM je primarni sastojak većine kamenaca nastalih u mokraćnom sustavu bolesnika s urolitijazom. Povećane količine kalcija i/ili oksalata izlučuju mnogi tvorci COM kamenaca. Identificiran je niz inhibitora kristalizacije COM u normalnom urinu koji utječu na određene čimbenike. Takvi inhibitori povišuju koncentracije kalcija i oksalata potrebne za spontano stvaranje novih kristala i smanjuju rast kristala, agregaciju i vezanje na bubrežne stanice. Nadalje, kristalizacija COM in vitro značajno je više inhibirana proteinima u mokraći normalnih subjekata nego proteinima u mokraći onih koji stvaraju kamence. Većina inhibicije rasta kristala COM uočene in vitro testovima normalnog urina posljedica je prisutnosti proteinskih makromolekula. Takvi zaštitni učinci inhibitora mogu biti posebno važni u vrijeme fiziološki povećanog izlučivanja kalcija, kao što je tijekom trudnoće ili povećanog unosa vitamina D [17]. COM se odnosi na prizmatičnu klasu monoklinskog sustava; postoji jedna ravnina simetrije i os drugog reda ( $b$ ) je okomita na ravninu simetrije. Elementarna ćelija ima prostornu grupu simetrije  $P21/c$  s parametrima  $a = 6,290(1) \text{ \AA}$ ,  $b = 14,583 \text{ \AA}$ ,  $c = 10,116 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 109,46^\circ$ ,  $Z = 8$ . Jedinična ćelija i kalcijev koordinacijski poliedar prikazani su na **slici 9.** [15].



**Slika 9.** Kristalna struktura COM: (A) jedinična ćelija COM, (B) kalcijev koordinacijski poliedar [15].

U morfologiji COM razlikuje se nekoliko oblika kristala a to su prizmatički kristal, pločasti kristal i kristal u obliku suze, također COM kristali pojavljuju se u obliku štapića i dendrita oblika slova X. Prizmatička struktura COM-a prikazana je na **slici 10**. [15].

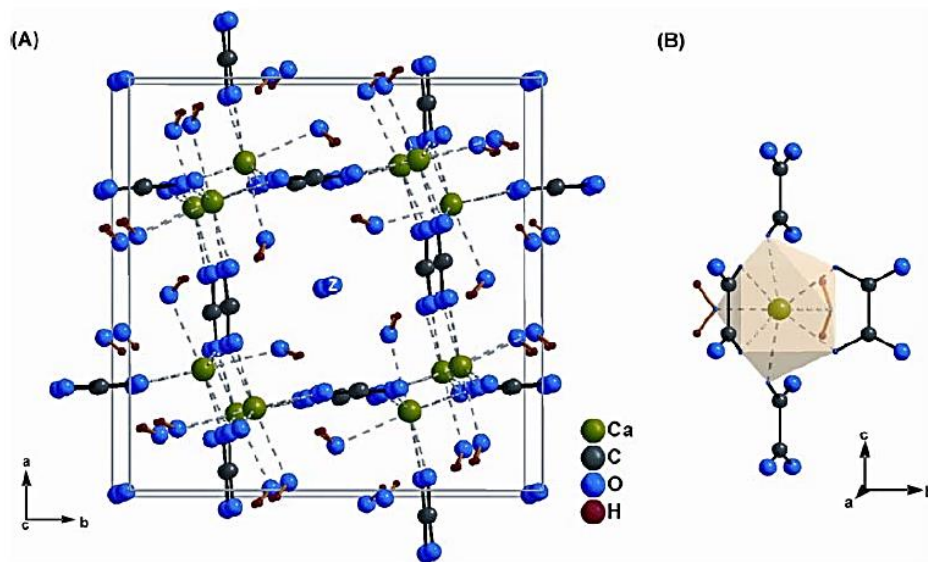


**Slika 10.** Morfologija kalcijeva oksalata monohidrata s Millerovim indeksima [15].

### 2.5.2. Kalcijev oksalat dihidrat (COD)

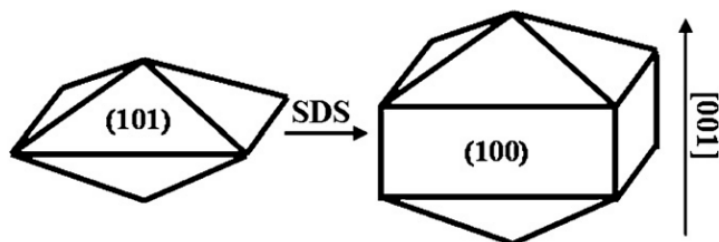
COD je najčešći sekundarni depozit u bubrežnim kamencima. Štoviše, COD je najčešći kristal kalcijeva oksalata prisutan u urinu pacijenata s idiopatskom kalcijevom urolitijazom. COD ima tendenciju stvaranja pri relativno niskoj supersaturaciji i visokim omjerima kalcija i oksalata. Podaci koji pokazuju da je COD manje stabilan i moguće prijelazni oblik za COM sugeriraju da COD može imati važniju ulogu nego što se prije

vjerovalo [18]. Kalcijev oksalat dihidrat (COD) pripada tetragonalnom kristalnom sustavu s parametrima jedinične ćelije,  $a = b = 12,371 \text{ \AA}$ ,  $c = 7,357 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ,  $Z = 8$  i prostorna grupa  $I4/m$ . Osam molekula vode koordinirano je s četiri iona Ca tvoreći dihidrat  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Kristalna struktura COD-a prikazana je na slici 11. [15].



**Slika 11.** (A) Kristalna struktura COD i (B) koordinacijski poliedar oko Ca [15].

COD kristali iz vodenih otopina općenito su tetragonalne bipiramide s dominantnim stranama i tetragonalne prizme s prizmatičnim stranama i piramidalnim stranama. Morfologija COD kristala prikazana je na slici 12. [19].

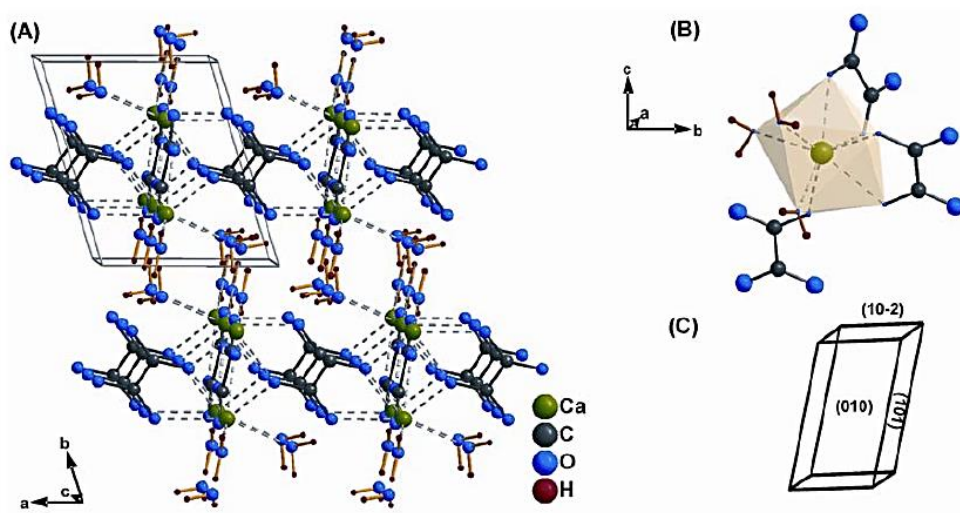


**Slika 12.** Morfološki prikaz COD [19].

### 2.5.3. Kalcijev oksalat trihidrat (COT)

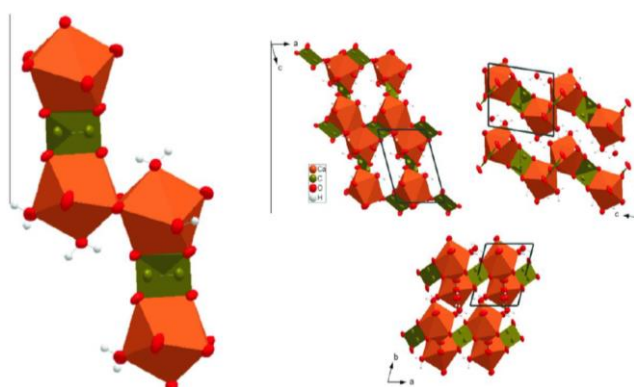
COT je rijetko pronađen u urinu i bubrežnim kamencima, ali se smatra mogućim prekursorom u stvaranju COM i COD. To opravdava činjenicu da se nekoliko radova dostupnih u literaturi o COT-u nalaze u području humane patologije i da su posvećeni proučavanju mehanizma njegove kristalizacije kako bi se spriječilo stvaranje bubrežnih kamenaca [20,21,22,23].

Kalcijev oksalat trihidrat kristalizira u triklinskom kristalnom sustavu ( $P\bar{1}$ )  $a = 6,11(1) \text{ \AA}$ ,  $b = 7,167(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 8,457(2) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 76,5(2)^\circ$ ,  $\beta = 70,35(2)^\circ$ ,  $\gamma = 70,62(2)^\circ$ ,  $Z = 2$ . U COT, tri od osam Ca-koordiniranih atoma kisika pripadaju molekulama vode, četiri su iz dva oksalatna iona, a jedan kisik je iz trećeg oksalatnog iona. **Slika 13.** prikazuje kristalnu strukturu COT [15].



**Slika 13.** (A) Kristalna struktura COT, (B) Ca koordinacijskog poliedra i (C) triklininski prizmatški COT [15].

Općenito, COT kristalizira u triklinskoj prizmatičnoj ili pločastoj morfologiji poput paralelograma. Građevne jedinice i struktura COT prikazani su na **slici 14.** [15].



**Slika 14.** Građevne jedinice (lijevo) i struktura COT (desno) [20].

## 2.6. METODE ANALIZE I IDENTIFIKACIJE

### 2.6.1. Optička mikroskopija

Optički mikroskop je uređaj koji koristimo kada male predmete želimo uvećati i pomnije istražiti. U našem slučaju služi za određivanje morfologije kristalnog sjemena dobivenog različitim sintezama. Optička mikroskopija je tehnika koja nam uvelike pomaže u određivanja boje, oblika i veličine dobivenih kristala [24].

U optičkom mikroskopu, kada svjetlost iz mikroskopske lampe prolazi kroz kondenzor, a zatim kroz uzorak (pod pretpostavkom da uzorak apsorbira svjetlost), dio svjetlosti prolazi i oko i kroz uzorak neometano na svom putu. Takva svjetlost se naziva izravna svjetlost ili neodstupna svjetlost. Pozadinsko svjetlo (često se naziva okolno) koje prolazi oko uzorka također je neodstupno svjetlo. Dio svjetlosti koja prolazi kroz uzorak odstupa kada naiđe na dijelove uzorka. Takva devijacijska svjetlost (naziva se difraktiranom svjetlošću) prikazana je za jednu polovinu valne duljine ili 180 stupnjeva izvan koraka (češće, izvan faze) s izravnom svjetlošću koja je prošla kroz nesklonu svjetlost. Pola valne duljine izvan faze, uzrokovano samim uzorkom, omogućuje ovoj svjetlosti da uzrokuje destruktivnu interferenciju s izravnom svjetlošću kada obje stignu do srednje ravnine slike koja se nalazi na fiksnoj dijafragmi okulara. Očna leća okulara dodatno povećava ovu sliku koja se konačno projicira na mrežnicu, ravninu filma kamere ili površinu računalnog čipa osjetljivog na svjetlost [24].

Ono što se dogodilo je da izravno ili neizravno svjetlo projicira objektiv i ravnomjerno se širi preko cijele ravnine slike na dijafragmi okulara. Svjetlost koju difragira uzorak dovodi se do fokusa na različitim lokaliziranim mjestima na istoj ravnini slike, gdje difraktirana svjetlost uzrokuje destruktivne smetnje i smanjuje intenzitet što rezultira više ili manje tamnim područjima. Ti uzorci svjetla i tame ono su što prepoznajemo kao sliku uzorka. Budući da su naše oči osjetljive na varijacije u svjetlini, slika postaje više ili manje vjerna rekonstrukcija izvornog primjerka [24].

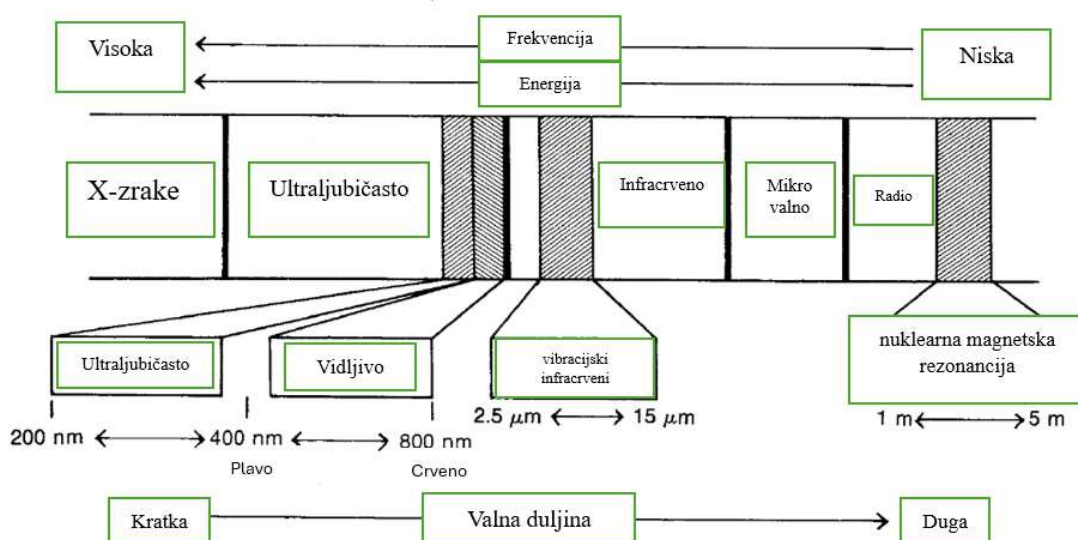
### 2.6.2. Infracrvena spektroskopija (IR)

Infracrvena (IR) spektroskopija je instrumentalna metoda za identifikaciju funkcionalnih skupina koje su prisutne u molekulama. Analiza infracrvenog spektra može nam reći koje su molekule prisutne u uzorku i u kojim koncentracijama; te je zbog toga infracrvena spektroskopija korisna. Mjerimo infracrvene spektre kako bismo odgovorili na

pitanja o uzorcima. Položaji vrhova u infracrvenom spektru koreliraju s molekularnom strukturom, što je dio razloga zašto je infracrvena spektroskopija korisna [25].

Ispravan izraz koji se koristi za opisivanje svjetlosti je elektromagnetsko zračenje. Svjetlost se sastoji od električnih i magnetskih valova koji se nazivaju električni vektor i magnetski vektor. Ova dva vala šire se u ravninama koje su međusobno okomite i kreću se kroz prostor u trećem smjeru okomitom na ravnine širenja ili propagacije vala.. To je interakcija električnog vektora s materijom koja dovodi do apsorpcije svjetlosti. Budući da se kretanje valova ponavlja, oni prolaze kroz cikluse. Za val, ciklus počinje na nultoj amplitudi i završava kada val treći put prijeđe nultu amplitudu. Udaljenost koju prijeđe val tijekom ciklusa naziva se njegovom valnom duljinom. Jedinice valne duljine su udaljenost po ciklusu, iako se obično bilježe samo jedinice udaljenosti. Različite vrste svjetlosnih valova imaju različite valne duljine [25].

Gotovo svaki spoj koji ima kovalentne veze (organske ili anorganske) apsorbira različite frekvencije elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području elektromagnetskog spektra. Ovo područje leži na valnim duljinama dužim od onih povezanih s vidljivom svjetlošću, koje se kreću od 400 do 800 nm, ali leži na valnim duljinama kraćim od onih povezanih s mikrovalovima, koje su duže od 1 mm. Zanima nas vibracijski dio infracrvenog područja, što uključuje zračenje valnih duljina između 2,5  $\mu\text{m}$  i 25  $\mu\text{m}$ . **Slika 15.** ilustrira odnos infracrvenog područja prema ostalim područjima uključenima u elektromagnetski spektar, te pokazuje da je valna duljina obrnuto proporcionalna frekvenciji i da je upravljana odnosom  $v = c/\lambda$  ( $c$  označava brzinu svjetlosti) [26].



**Slika 15.** Dio elektromagnetskog spektra koji prikazuje odnos vibracijskog infracrvenog zračenja i drugih vrsta zračenja [27].



Također se vidi da je energija izravno proporcionalna frekvenciji:  $E=hf$  ( $h$  je oznaka za Planckovu konstantu). Kvalitativno možemo vidjeti da najveća energija zračenja odgovara rendgenskom području spektra, gdje energija može biti dovoljno velika da pokida veze u molekulama. Na drugom kraju elektromagnetskog spektra, radiofrekvencije imaju vrlo niske energije, dovoljne samo da izazovu nuklearne ili elektronske spinske prijelaze unutar molekula, to jest nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) ili elektronsku spinsku rezonanciju (ESR) [26].

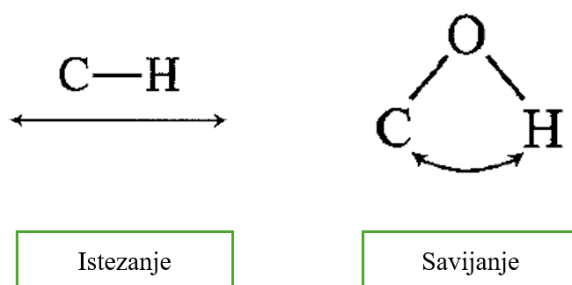
Drugo važno svojstvo svjetlosnog vala je njegov valni broj. Valni broj mjeri broj ciklusa kojima val prolazi po jedinici duljine. Valni brojevi se mjere u jedinicama ciklusa po centimetru, koje se često skraćuju kao  $\text{cm}^{-1}$  i mogu se izgovoriti kao "inverzni centimetri", "recipročni centimetri" ili "valni broj". Grafički prikaz izmjerene intenziteta infracrvenog svjetla u odnosu na svojstvo svjetla naziva se infracrveni spektar. Prema konvenciji, x-os infracrvenog spektra iscrtana je s visokim valnim brojem s lijeve strane i niskim valnim brojem s desne strane [25].

IR ima puno prednosti. Prva prednost infracrvene spektroskopije je to što je gotovo univerzalna. Mnoge molekule imaju jaku apsorpciju u srednjem infracrvenom zračenju, što je dio razloga zašto mjerimo spektre u ovoj regiji. Druga prednost infracrvene spektroskopije je to što su infracrveni spektri bogati informacijama. Položaji vrhova daju strukture molekula u uzorku, intenziteti vrhova daju koncentracije molekula u uzorku, a širine vrhova osjetljive su na kemijsku matricu uzorka uključujući pH i vodikovu vezu. Treća prednost infracrvene spektroskopije je što je mjerenje infracrvenog spektra relativno brzo i jednostavno. Četvrta prednost infracrvene spektroskopije je ta što je relativno jeftina, a peta prednost infracrvene spektroskopije je njena osjetljivost, što je mjera minimalne količine materijala koji daje iskoristiv spektar [27].

IR spektar je snimka apsorbiranog svjetla kao funkcija valne duljine. Apsorbira se samo svjetlo čija se frekvencija podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli, odnosno frekvencije zračenja i vibracije moraju biti iste da bi došlo do apsorpcije. Faktori koji određuju apsorpcijski položaj su jačina veze, masa atoma u vezi (uz istu jakost veze) i vrsta vibracije, a jačinu veze određujemo iz energija disocijacije molekule promatrane molekule [25]. Najjednostavniji tipovi ili načini vibracijskog gibanja u molekuli koji su infracrveno aktivni - koji uzrokuju apsorpciju - su načini istezanja i savijanja te su ti načini prikazani na **slici 16**. Aktivni su i drugi složeniji tipovi istezanja i savijanja. Općenito, asimetrične vibracije istezanja javljaju se na višim frekvencijama nego simetrične vibracije istezanja. Vibracije istezanja javljaju se na višim frekvencijama od vibracija savijanja. Pojmovi škar,



ljudjanje, mahanje i uvijanje obično se koriste za opisivanje porijekla infracrvenih pojaseva [26].



**Slika 16.** Prikaz vibracijskog gibanja u molekuli [24].

Infracrveni spektar prikazuje karakteristične vrpce funkcionalnih skupina unutar točno određenih područja valnih brojeva. Na apscisi se uvijek nalazi valni broj ( $\text{cm}^{-1}$ ), dok je na ordinati prikazana apsorbancija (%). "Područje otiska prsta" ("fingerprint region") je područje između  $500$  i  $1500 \text{ cm}^{-1}$ . Ono nam omogućuje sigurno određivanje molekula usporedbom spektara. IR spektar je zapravo otisak cijele molekule jer je za svaku molekulu jedinstven [25].

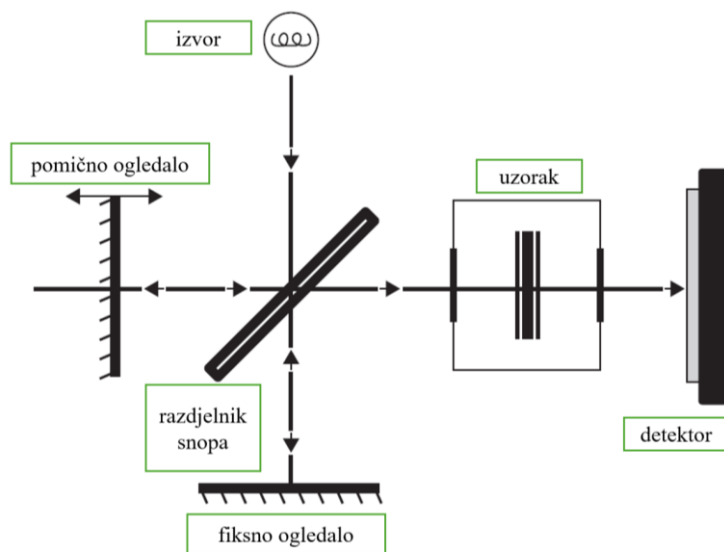
Instrument koji određuje apsorpcijski spektar spoja naziva se infracrveni spektrometar. Dvije vrste infracrvenih spektrometara uobičajene su u uporabi u laboratoriju: disperzivni instrumenti i instrumenti za Fourierovu transformaciju (FT). Obje vrste instrumenata daju gotovo identične spektre za spoj, FT infracrveni spektrometri daju infracrveni spektar mnogo brže od disperzijskih instrumenata [26].

Interferogram je složeni signal, ali njegov valoviti uzorak sadrži sve frekvencije koje čine infracrveni spektar. Interferogram je zapravo grafikon intenziteta u odnosu na vrijeme (spektar vremenske domene). Matematička operacija poznata kao Fourierova transformacija (FT) može odvojiti pojedinačne apsorpcijske frekvencije iz interferograma, stvarajući spektar gotovo identičan onom dobivenom s disperzivnim spektrometrom. Ova vrsta instrumenta poznata je kao Fourierov transformacijski infracrveni spektrometar ili FT-IR [26].

FT-IR instrumenti povezani s računalom rade u načinu rada s jednim snopom. Da bi se dobio spektar spoja, prvo se snimi interferogram "pozadine", koji se sastoji od infracrveno aktivnih atmosferskih plinova, ugljikovog dioksida i vodene pare (kisik i dušik nisu infracrveno aktivni). Interferogram se podvrgava Fourierovoj transformaciji, koja daje spektar pozadine. Zatim se stavlja spoj (uzorak) u snop i dobiva spektar koji proizlazi iz

Fourierove transformacije interferograma. Ovaj spektar sadrži apsorpcijske vrpce za spoj i pozadinu. Računalni softver automatski oduzima spektar pozadine od spektra uzorka, dajući spektar spoja koji se analizira [26].

Interferometar je prvi konstruirao Albert Abraham Michelson, prvi Amerikanac koji je dobio Nobelovu nagradu. Interferometar je optički uređaj koji omogućuje kontrolirano generiranje interferentnih uzoraka ili interferograma. Sastoji se od izvora, razdjelnika snopa, fiksnog zrcala i pokretnog zrcala kao što je prikazano na **slici 17**. Izvor emitira svjetlost u IC području kada kroz njega prolazi struja. Razdjelnik snopa služi za dijeljenje upadnog IR svjetla na dva dijela. Zrcala su poravnata tako da reflektiraju svjetlosne valove u smjeru koji bi omogućio rekombinaciju valova na razdjelniku snopa. Pomično zrcalo može se kretati duž osi, od i prema razdjelniku snopa. Jedna polovica svjetlosti prolazi kroz razdjelnik snopa i reflektira se od nepokretnog zrcala natrag na razdjelnik snopa. Druga polovica svjetla reflektira se na pokretno zrcalo, koje zauzvrat reflektira svjetlo natrag na razdjelnik snopa. Dvije reflektirane zrake od zrcala rekombiniraju se na razdjelniku snopa [28].



**Slika 17.** Shematski prikaz Michelsonovog interferometra [28].

Priprema uzorka za spektroskopiju vrlo je jednostavna. Fino mljeveni kruti uzorak s kalijevim bromidom u prahu (KBr) prša se pod tlakom. KBr se zatim topi u uzorak i zatvara ga. Glavni nedostatak ove metode je da kalijev bromid apsorbira vodu, što može utjecati na dobiveni spektar. Ako se pripremi dobar uzorak, dobiveni spektar neće imati interferirajuće trake budući da je kalijev bromid proziran do  $400\text{ cm}^{-1}$  [26].

IR spektri kalcijeva oksalata prikazani su u **tablici 2**. **Tablica 2** prikazuje literaturne karakteristične vibracijske maksimume oksalatnih oblika.

**Tablica 2.** Literaturni podatci karakterističnih vibracija CaOx [29].

COM	COD	COT	vibracije
3483	3469	3528	$\nu$ (OH)
3429		3427	
3336		3222	
3258			$2\delta$ (HOH)
3058			$\nu$ (OH)
1624-1622	1640-1638	1636	$\nu_a$ (CO)
	1470		$\nu_s$ (CO)
1384			
1368			
1320-1316	1324	1324	
958-889			L - (H <sub>2</sub> O)
	912		$\nu_s$ (CO) + L (H <sub>2</sub> O)
782	782	783	$\delta$ (OCO)
656	630	651	L (HOH)
v rastezanje, $\delta$ savijanje, a antisimetrično, s simetrično, L libracija			

### 2.6.3. Rendgenska difrakcija (XRD)

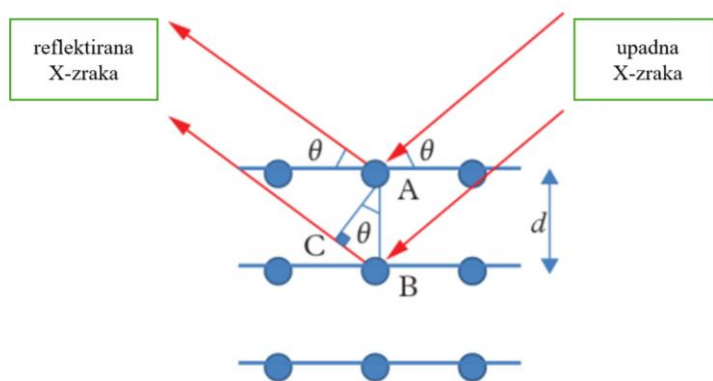
X-zrake je otkrio Wilhelm Conrad Röntgen u studenom 1895. eksperimentiranjem s katodnim cijevima. Röntgen je primijetio da uz dovoljan napon doveden na cijev, fluorescentni ekran svijetli iako je bio zaštićen od katodne cijevi teškim crnim kartonom koji je trebao spriječiti elektromagnetsko zračenje da dopre do ekrana. Nakon što je stavio drugu materiju pred ekran i još uvijek promatrao fluorescenciju, stavio je ruku ispred ekrana i mogao je vidjeti sjenu svojih kostiju na ekranu. Unutar mjesec dana nakon otkrića, fenomen je postao poznat u cijelom svijetu. Ovaj novi fenomen, iako nije bio shvaćen, odmah je imao praktičnu primjenu. U siječnju je objavljen njegov rad, a do veljače iste godine korištena je rendgenska fotografija za identifikaciju mjesta na kojem je potrebna operacija. Do 1899. X-zrake su korištene kao tretman za rak [30].

Godine 1913. Henry Moseley, jedan od Rutherfordovih diplomiranih studenata, izveo je sustavnu studiju 38 ciljnih elemenata kao anode u eksperimentalnoj postavci sličnoj Röntgenovoj, mjereći rendgenske spektre elemenata između aluminija i zlata. Nakon analize podataka, Moseley je otkrio da vrhovi u energetske spektrima koje emitiraju različiti elementi odgovaraju kvadratu atomskog broja. Moseleyev zakon dopušta eksperimentalno određivanje atomskog broja i ispravlja Mendeleeva koji je pretpostavio da je periodičnost određena atomskom masom. Može se čak odrediti kemijski identitet uspoređivanjem spektra nepoznate tvari s poznatim spektrima. Sada se razumije da je rendgenska zraka elektromagnetski val visoke energije [30].

Difrakcija je najčešća tehnika koja se koristi za proučavanje karakteristika kristalne strukture. Kao metoda, rendgenska difrakcija je atraktivna zbog svoje brzine i lakoće performansi, te zato što zahtijeva samo male količine materijala, nedestruktivna je i može se koristiti za polukvantitativne analize. Rendgenske zrake su elektromagnetsko zračenje slično svjetlu, ali s mnogo kraćom valnom duljinom. Proizvode se kada se usporavaju električno nabijene čestice dovoljne energije. Oni nastaju kada se električki nabijene čestice dovoljne energije uspore. U rendgenskoj cijevi visoki napon koji se održava na elektrodama privlači elektrone prema metalnoj meti (anodi). X-zrake nastaju na mjestu udara i zrače u svim smjerovima [31].

Ako upadna zraka odnosno X-zraka naiđe na kristalnu rešetku, dolazi do općeg raspršenja. Iako većina raspršenja interferira sama sa sobom i eliminira se (destruktivna interferencija), do difrakcije dolazi kada je raspršenje u određenom smjeru u fazi s raspršenim zrakama iz drugih atomskih ravnina. Pod ovim uvjetom refleksije se kombiniraju kako bi oblikovale nove pojačane valne fronte koje se međusobno pojačavaju (konstruktivna interferencija). Odnos prema kojem dolazi do difrakcije poznat je kao Braggov zakon ili jednadžba i prikazan je na **slici 18**. Budući da svaki kristalni materijal ima karakterističnu atomsku strukturu, on će difraktirati X-zrake u jedinstvenom karakterističnom uzorku [31].

Upadni kutovi  $\theta$  za intenzivnu refleksiju X-zraka dani su Braggovim zakonom prikazanim na slici:  $2 d \sin \theta = n\lambda$ , gdje je  $d$  razmak ravnina atoma u krutom tijelu,  $\lambda$  je valna duljina X-zraka, a  $n$  je bilo koji cijeli broj [32].



**Slika 18.** Braggov zakon [32].

X-zrake reflektirane od različitih ravnina atoma u čvrstom materijalu putuju različitom udaljenosti. Kada je razlika u putanji integralni broj valnih duljina, valovi reflektirani od susjednih ravnina atoma su u fazi i konstruktivno interferiraju, proizvodeći intenzivnu, reflektiranu zraku (X-zraku). Međutim, kada razlika putanje nije integralni broj valnih

duljina, valovi reflektirani od različitih ravnina atoma nisu fazni i interferiraju destruktivno, bez reflektirane X-zrake. Uvjet za konstruktivnu interferenciju i jaku, reflektiranu X-zraku je:

$$\text{razlika putanje} = 2 BC = 2d \sin \theta = n\lambda.$$

Osnovna geometrija difraktometra X-zraka uključuje izvor monokromatskog zračenja i detektor X-zraka koji se nalazi na obodu građiranog kruga sa središtem na uzorku praha. Divergentni prorezi, smješteni između izvora X-zraka i uzorka, i divergentni prorezi, smješteni između uzorka i detektora, ograničavaju raspršeno (nedifraktirano) zračenje, smanjuju pozadinsku buku i skupljaju zračenje. Detektor i držač uzorka mehanički su povezani s kutomjerom tako da se rotacija detektora za 2x stupnjeva događa zajedno s rotacijom uzorka za x stupnjeva, fiksni omjer 2:1 [31].

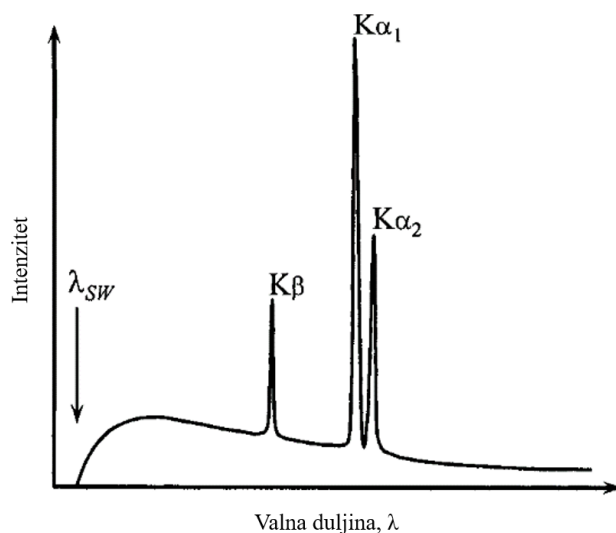
Gotovo odmah nakon otkrića, rendgenske zrake počele su se koristiti za proučavanje unutarnje strukture objekata koji su neprozirni za vidljivu svjetlost, ali prozirni za rendgenske zrake. Elektromagnetsko zračenje nastaje svaki put kada se električni naboj ubrzava ili usporava. Sastoji se od transverzalnih valova gdje su električni (E) i magnetski (H) vektori okomiti jedan na drugi i na vektor širenja vala (k). X-zrake imaju valne duljine od 0,1 do 100 Å, koje se nalaze između  $\gamma$ -zračenja i ultraljubičastih zraka. Kada se X-zrake šire kroz tvar, u pojavi difrakcije treba uzeti u obzir pojavu sljedećih procesa:

1. Koherentno raspršenje, koje proizvodi zrake iste valne duljine kao i upadna (primarna) zraka. Drugim riječima, energija fotona u koherentno raspršenom snopu ostaje nepromijenjena u usporedbi s onom u primarnom snopu.
2. Nekoherentno (ili Comptonovo) raspršenje, kod kojeg se valna duljina raspršene zrake povećava zbog djelomičnog gubitka energije fotona u sudarima s elektronima jezgre (Comptonov efekt).
3. Apsorpcija rendgenskih zraka u kojoj se neki fotoni rasipaju u nasumičnim smjerovima zbog raspršenja, a neki fotoni gube svoju energiju izbacivanjem elektrona(a) iz atoma (tj. ionizacijom) i/ili zbog fotoelektričnog učinka (tj. x- zračna fluorescencija) [33].

X-zrake se obično generiraju pomoću dvije različite metode ili izvora. Prvi je uređaj, koji se naziva rendgenska cijev, gdje se elektromagnetski valovi generiraju udarcima elektrona visoke energije s metalnom metom. Drugi je mnogo napredniji izvor rendgenskog zračenja - sinkrotron, gdje su visokoenergijski elektroni zatvoreni u skladišnom prstenu. Kada se kreću po kružnoj orbiti, elektroni ubrzavaju prema središtu prstena, emitirajući tako

elektromagnetsko zračenje. Općenito, nema principijelne razlike u difrakcijskim fenomenima koji koriste sinkrotronske i konvencionalne izvore rendgenskih zraka, osim prisutnosti nekoliko visoko intenzivnih vrhova s fiksnim valnim duljinama u konvencionalno dobivenom rendgenskom spektru i njihove odsutnosti, tj. kontinuirane distribucije energije fotona pri korištenju sinkrotronskih izvora [33].

Rentgenski spektar, generiran u tipičnoj rendgenskoj cijevi, shematski je prikazan na **slici 19**. Sastoji se od nekoliko intenzivnih vrhova, takozvanih karakterističnih spektralnih linija, preklapljenih preko kontinuirane pozadine, poznate kao bijelo zračenje. Kontinuirani dio spektra generiraju elektroni koji usporavaju brzo i nepredvidivo - neki trenutačno, drugi postupno - a raspodjela valnih duljina ovisi o naponu ubrzanja, ali ne o prirodi materijala anode. Bijelo zračenje, također poznato kao kočno zračenje, općenito je vrlo nepoželjno u primjenama analize difrakcije X-zraka. Tri karakteristične linije su dosta intenzivne i proizlaze iz prijelaza elektrona gornje razine u jezgri atoma na prazne niže energetske razine, iz kojih je elektron izbačen udarom s elektronom ubrzanim u rendgenskoj cijevi. Energetske razlike između različitih energetske razine u atomu specifične su za svaki element i stoga svaki kemijski element emitira X-zrake s konstantnom, tj. karakterističnom raspodjelom valnih duljina koje se pojavljuju zbog pobuđivanja elektrona jezgre elektronima visoke energije koji bombardiraju metu [33].



**Slika 19.** Shema spektra emisije X-zraka [33].

Detektor je sastavni dio svakog sustava za difrakcijsku analizu i njegova glavna uloga je mjerenje intenziteta i, ponekad, smjera raspršenog snopa. Detekcija se temelji na sposobnosti rendgenskih zraka da u interakciji s materijom proizvedu određene efekte ili

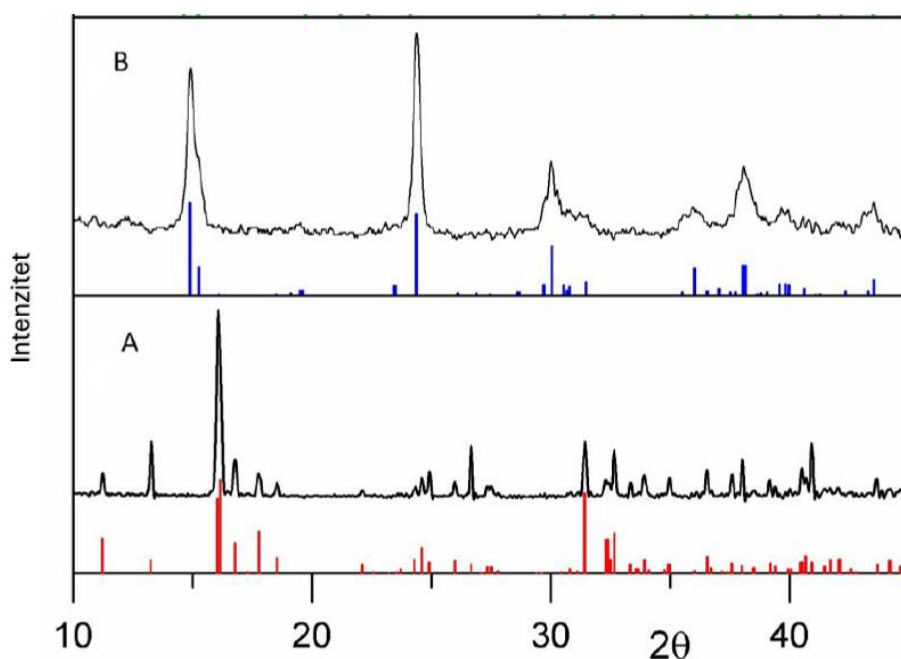
signale, na primjer da generiraju čestice, valove, električnu struju itd., koji se mogu lako registrirati. Drugim riječima, svaki foton koji uđe u detektor generira određeni događaj, još bolje, niz događaja koji se mogu prepoznati i na osnovu kojih se može odrediti ukupni broj (intenzitet) fotona. Očito, detektor mora biti osjetljiv na X-zrake (ili općenito na zračenje koje se detektira) i trebao bi imati prošireni dinamički raspon i nisku pozadinsku buku [33]. Eksperiment difrakcije praha kamen je temeljac istinski osnovne tehnike karakterizacije materijala - difrakcijske analize - i koristi se desetljećima s iznimnim uspjehom za pružanje točnih informacija o strukturi materijala. Iako podacima o prahu obično nedostaje trodimenzionalnost difrakcijske slike, temeljnu prirodu metode lako je shvatiti iz činjenice da svaki uzorak difrakcije praha predstavlja jednodimenzionalni snimak trodimenzionalne recipročne rešetke kristala. Kvaliteta uzorka difrakcije praha obično je ograničena prirodom i energijom dostupnog zračenja, rezolucijom instrumenta te fizičkim i kemijskim uvjetima uzorka. Budući da se mnogi materijali mogu pripremiti samo u polikristalnom obliku, eksperiment difrakcije praha postaje jedina realna opcija za pouzdano određivanje kristalne strukture takvih materijala [33].

Podaci o difrakciji praha obično se bilježe na gotovo najjednostavniji mogući način, gdje se raspršeni intenzitet mjeri kao funkcija jedne neovisne varijable - Braggovog kuta. Ono što eksperiment difrakcije praha čini tako moćnim je to što različite strukturne značajke materijala imaju različite učinke na različite parametre uzorka difrakcije praha. Na primjer, prisutnost kristalne faze očituje se kao skup diskretnih maksimuma intenziteta - Braggovih refleksija od kojih svaki ima određeni intenzitet i mjesto. Kada se atomski parametri, npr. koordinate atoma u jediničnoj ćeliji ili populacije različitih mjesta u rešetki kristalne faze promijene, navedena promjena utječe na relativne intenzitete i/ili položaje Braggovih vrhova koji odgovaraju ovoj fazi. Kada su promjene mikroskopske, npr. kada se veličina zrna smanji ispod određene granice ili kada je materijal napregnut ili deformiran, tada se mijenjaju oblici Braggovih vrhova uz njihov intenzitet i položaj. Stoga je velik dio strukturnih informacija o materijalu ugrađen u njegov uzorak difrakcije praha, a kada se eksperimentalni podaci pravilno prikupe i obrade, može se utvrditi puno detalja o strukturi materijala na različitim duljinskim skalama, njegovoj fazi i kemijskom sastavu [33].

Metoda rendgenske difrakcije praha datira još od Debyeja i Scherrera koji su prvi promatrali difrakciju na LiF prahu i uspjeli riješiti njegovu kristalnu strukturu. Kasnije je Hull predložio, dok su Hanawalt, Rinn i Freve formalizirali pristup koji je omogućio identifikaciju kristalnih tvari na temelju njihovih uzoraka difrakcije praha. Od tada je metoda difrakcije praha uživala golemo poštovanje i u akademskoj zajednici i u industriji kao

tehnika koja omogućuje jednostavnu identifikaciju tvari u čistom obliku i u smjesi uz njezinu sposobnost pružanja informacija o kristalnoj strukturi (ili odsutnost kristalnosti) nepoznatog praha. U ranim danima metode, podaci o difrakciji praha snimani su na rendgenskom filmu u raznim kamerama. Korištenjem filma, dobiveni difrakcijski uzorak obično se promatra kao niz eliptično iskrivljenih uskih koncentričnih segmenata prstena, gdje svaki prsten odgovara jednom ili više Braggovih vrhova. Više Braggovih vrhova može se zamotati u loše razlučen ili potpuno nerazlučiv pojedinačni prsten zbog ograničenja nametnutih jednodimenzionalnošću tehnike i razlučivosti filma i instrumenta. Iz položaja Debyeovih prstenova na filmu plus njihovog različitog intenziteta (stupnja zatamnjenja), moguće je identificirati materijal i utvrditi njegovu kristalnu strukturu. S obzirom na analognu prirodu filma, gotovo je jednako lako shvatiti cjelokupnu "strukturu" difrakcijskog uzorka, jer ga je teško pretvoriti u digitalni format, a obično je potreban znatan napor za mjerenje i Braggovih kutova i difraktirani intenziteti s visokom preciznošću [33].

Literaturni XRD difraktogrami za kalcijev oksalat monohidrat (COM) i kalcijev oksalat trihidrat (COT) prikazani su na **slici 20**. Plavom bojom prikazan je difraktogram  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (04-011-6806), a crvenom bojom prikazan je difraktogram  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (JCPDS br. 04-014-9825) [34].



**Slika 20.** XRD difraktogrami a) COT b) COM [34].



#### 2.6.4. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza (TGA) je eksperimentalna tehnika u kojoj se težina ili, strogo govoreći, masa uzorka mjeri kao funkcija temperature uzorka ili vremena. Uzorak se tipično zagrijava pri konstantnoj brzini zagrijavanja (tzv. dinamičko mjerenje) ili drži pri konstantnoj temperaturi (izotermno mjerenje), ali se također može podvrgnuti nelinearnim temperaturnim programima poput onih koji se koriste u TGA kontroliranom uzorkom (tako nazvani SCTA) eksperimenti. Izbor temperaturnog programa ovisit će o vrsti podataka potrebnih za uzorak. Atmosfera korištena u TGA eksperimentu igra važnu ulogu i može biti reaktivna, oksidirajuća ili inertna. Rezultati TGA mjerenja obično se prikazuju kao TGA krivulja u kojoj se masa ili postotak mase iscrtava u odnosu na temperaturu i/ili vrijeme. Alternativna i komplementarna prezentacija je korištenje prve derivacije TGA krivulje u odnosu na temperaturu ili vrijeme. To pokazuje brzinu kojom se masa mijenja i poznato je kao diferencijalna termogravimetrijska ili DTG krivulja. Promjene mase događaju se kada uzorak gubi materijal na jedan od nekoliko različitih načina ili reagira s okolnom atmosferom. To proizvodi korake u krivulji TGA ili vrhove u krivulji DTG. Različiti učinci mogu uzrokovati gubitak ili čak dobivanje mase uzorka i tako proizvesti korake u TGA krivulji. To uključuje sljedeće:

- Isparavanje hlapljivih sastojaka; sušenje; desorpcija i adsorpcija plinova, vlage i drugih hlapljivih tvari; gubitak kristalizacijske vode.
- Oksidacija metala na zraku ili kisiku.
- Oksidativna razgradnja organskih tvari na zraku ili kisiku.
- Toplinska razgradnja u inertnoj atmosferi uz nastajanje plinovitih produkata. Kod organskih spojeva ovaj je proces poznat kao piroliza ili karbonizacija.
- Heterogene kemijske reakcije u kojima se početni materijal uzima iz atmosfere, na primjer reakcije redukcije s plinom za pročišćavanje koji sadrži vodik. Nadalje, reakcije u kojima se produkt razvija, na primjer reakcije dekarboksilacije ili kondenzacije.
- Feromagnetski materijali. Magnetska svojstva nekih materijala mijenjaju se s temperaturom (Curiejev prijelaz). Ako se uzorak mjeri u nehomogenom magnetskom polju, promjena magnetskog privlačenja na prijelazu generira TGA signal. Magnetsko polje nastaje postavljanjem trajnog magneta u blizinu peći blizu uzorka.
- Unos ili gubitak vode u eksperimentu s kontroliranom vlagom.

Moderne termovage često su opremljene tako da mogu zabilježiti signal DTA (diferencijalne toplinske analize) u isto vrijeme kada i stvarno termogravimetrijsko mjerenje. Osim što pokazuje energetske prirode događaja mršavljenja, DTA signal također može pokazati toplinske učinke koji nisu popraćeni promjenom mase, npr. taljenje, kristalizacija ili stakleni prijelaz. Procjena je obično ograničena na određivanje početne i vršne temperature. Proces koji uključuju gubitak mase obično dovode do endotermnih DTA učinaka zbog rada ekspanzije. Međutim, postoje iznimke. Ako se zapaljivi plinovi stvaraju pri dovoljno visokoj temperaturi (spontano paljenje, katalitički učinci na površini platinskog lončića) i ako je dostupno dovoljno kisika, tada je entalpija izgaranja veća, a ukupni učinak je egzoterman. Ako je DTA signal kalibriran i prilagođen pomoću vrhova taljenja referentnih tvari, DTA krivulja (u °C) može se pretvoriti u krivulju tipa DSC (u mW). To zatim omogućuje kvantitativno određivanje promjena entalpije [35].

Prilikom pripreme uzoraka za TGA pokuse treba uzeti u obzir niz čimbenika:

- Uzorak treba biti reprezentativan za materijal koji se analizira.
- Masa uzorka mora biti primjerena za preciznost potrebnu za ispitivanje.
- Uzorak treba mijenjati što je manje moguće procesom pripreme uzorka.
- Uzorak ne smije biti kontaminiran postupkom pripreme uzorka.

Morfologija uzorka utječe na brzinu difuzije produkata reakcije, a time i na tijek reakcije. U isto vrijeme, također utječe na prijenos topline unutar uzorka. Masa korištena u eksperimentu također utječe na brzinu gubitka težine zbog istih procesa difuzije i prijenosa topline. Stoga je u mjerenjima kontrole kvalitete važno koristiti dosljednu i ponovljivu tehniku pripreme uzorka. U dizajniranju metoda kontrole kvalitete mora se ispitati otpornost metode na vanjske čimbenike kao što je priprema uzorka. Korištenje stalnih masa uzorka vrlo je važno za proizvodnju usporedivih TGA podataka [35].

Literaturni TG podaci gubitka vode mjereni u struji zraka za kalcijev oksalat monohidrat pokazuju gubitak mase od približno 12,33% u prvom koraku, za kalcijev oksalat dihidrat pokazuju gubitak mase od približno 21,952% također u prvom koraku, dok za kalcijev oksalat trihidrat gubitak mase je približno 29,671% i odvija se u dva koraka [36,37].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Popis kemikalija

Kemikalije koje su korištene za sintezu kalcijeva oksalata prikazane su u **tablici 3**. Za sintezu je također korištena ultračista voda (MQ) električne provodnosti  $\leq 0,055 \mu\text{S/cm}$ .

**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija za sintezu kalcijeva oksalata trihidrata.

NAZIV KEMIKALIJE	KEMIJSKA FORMULA	MOLARNA MASA ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Proizvođač
Kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	GRAM-MOL d.o.o.
Natrijev oksalat	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	134,00	VWR Chemicals
Natrijev klorid	$\text{NaCl}$	58,44	GRAM-MOL d.o.o.
Klorovodična kiselina	$\text{HCl}$	36,46	GRAM-MOL d.o.o.
Natrijev hidroksid	$\text{NaOH}$	39,99	GRAM-MOL d.o.o.

#### 3.2. Pribor i aparatura

Sinteza kristala kalcijeva oksalata izvodila se dodavanjem otopine natrijeva oksalata ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) u otopinu kalcijeva klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) uz neprestano miješanje. Sinteza se provodila u staklenoj reakcijskoj posudi (reaktoru) koji je konstantno termostatiran te postavljen na magnetsku miješalicu. Morfologija dobivenih kristala kalcijeva oksalata određena je pomoću optičkog mikroskopa dok je analiza sastava provedena uz pomoć infracrvene spektroskopije, rendgenske difrakcije na prahu i termogravimetrijske analize.

#### 3.3. Priprema otopina

##### Priprema otopine kalcijeva klorida ( $\text{CaCl}_2$ )

$$c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,093 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 1 \text{ dm}^3$$

$$m(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = ?$$

$$c = n/V \rightarrow n = c \cdot V = 0,093 \text{ mol}$$

$$n = m/M \rightarrow m = n \cdot M = 0,093 \text{ mol} \cdot 147,02 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow m (\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 13,6 \text{ g}$$

Za pripremu otopine kalcijeva klorida za sintezu koristi se 860  $\mu\text{L}$  otopine:

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \rightarrow V_2 = c_1 V_1 / c_2 \rightarrow 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \cdot 200 \text{ ml} / 0,093 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_2 (\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 860 \mu\text{L}$$

### Standardizacija otopine kalcijeva klorida ( $\text{CaCl}_2$ )

10 ml pripremljene otopine  $\text{CaCl}_2$  odpipetirati u odmjernu tikvicu od 100 ml te do oznake tikvicu nadopuniti ultračistom vodom (otopina približne koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Iz pripremljene otopine odpipetirati 3 puta po 10 ml u Erlenmeyerove tikvice. U svaku tikvicu dodati 5 ml amonijačnog pufer  $\text{pH} = 10$  i eriokrom crnilo T praha na vrhu špatule uz malo vode. Sve tri tikvice titrirane sa  $0,1000 \text{ mol dm}^{-3}$  otopinom EDTA. Točka ekvivalencije vidljiva je kao promjena boje iz ljubičaste u plavu.

$$c_1 (\text{EDTA}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_1 (\text{EDTA}) = 9,3 \text{ ml}$$

$$V_2 (\text{EDTA}) = 9,25 \text{ ml}$$

$$V_3 (\text{EDTA}) = 9,35 \text{ ml}$$

$$\bar{V} (\text{EDTA}) = 9,30 \text{ ml} = 9,30 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3$$

$$c_1 (\text{EDTA}) \cdot V_1 (\text{EDTA}) = c_2 (\text{CaCl}_2) \cdot V_2 (\text{CaCl}_2)$$

$$c_2 (\text{CaCl}_2) = c_1 (\text{EDTA}) \cdot V_1 (\text{EDTA}) / V_2 (\text{CaCl}_2)$$

$$= 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \cdot 9,30 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3 / 10 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3$$

$$c_2 (\text{CaCl}_2) = 0,0930 \text{ mol dm}^{-3}$$

### Priprema otopine natrijeva oksalata ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ )

Otopine natrijeva oksalata pripremljene su neposredno prije svake izvedene sinteze. Dodana je masa od  $0,01876 \text{ g}$  natrijeva oksalata u tikvicu od  $200 \text{ ml}$  te je tikvica nadopunjena ultračistom vodom do oznake.

$$c (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 200 \text{ ml} = 0,2 \text{ dm}^3$$

$$M (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 134 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = ?$$

$$m (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = c \cdot V \cdot M = 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \cdot 0,2 \text{ dm}^3 \cdot 134 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m (\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 0,01876 \text{ g}$$

### Podešavanje ionske jakosti

Sinteze su provedene pri različitim ionskim jakostima, koje su izračunate pomoću programa VMINTEQ 3.1. (besplatno dostupnog na <https://vminteq.lwr.kth.se/>, datum preuzimanja 13.01.2023.). U početne otopine natrijeva oksalata i kalcijeva klorida prije svake sinteze dodana je određena količina natrijeva klorida (NaCl), osim za sintezu pri ionskoj jakosti  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  jer je izračunato da su početne otopine reaktanata upravo te ionske jakosti ( $I_c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Količine potrebnog NaCl priređivane su iz stock otopine NaCl koncentracije  $c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$  na sljedeći način:

Ionska jakost  $I_c = 0,055 \text{ mol dm}^{-3}$ :

$$c_1 (\text{NaCl}) = 3 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$c_2 (\text{NaCl}) = 0,4 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_2 (\text{NaCl}) = 200 \text{ ml}$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = ?$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = c_2 V_2 / c_1 = 0,4 \text{ mol dm}^{-3} \cdot 200 \text{ ml} / 3 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = 2,66 \text{ ml (u svaku tikvicu)}$$

Ionska jakost  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ :

$$c_1 (\text{NaCl}) = 3 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$c_2 (\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_2 (\text{NaCl}) = 200 \text{ ml}$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = ?$$

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = c_2 V_2 / c_1 = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \cdot 200 \text{ ml} / 3 \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_1 (\text{NaCl}) = 6,66 \text{ ml (u svaku otopinu)}$$

### 3.4. Sinteza nestabilne faze kristala kalcijeva oksalata

Reakcijske smjese za sintezu kalcijeva oksalata sastoje se od otopina natrijeva oksalata i kalcijeva klorida određenih koncentracija sa dodatkom natrijeva hidroksida i/ili klorovodične kiseline kao agenasa za podešavanje pH vrijednosti te natrijeva klorida kao agenasa za podešavanje ionske jakosti. U svim eksperimentima početna pH vrijednost je bila konstantna dok su se parametri temperature i ionske jakosti mijenjali. Prije početka sinteze pripremljene su otopine natrijeva oksalata i kalcijeva klorida u tikvicama od 200 ml. U otopine su dodane određene količine natrijeva klorida za podešavanje ionske jakosti te su nakon toga termostatirane 15 min u protočnom termostatu (Termostat s kupelji 200F;

JULABO, Njemačka). Nakon podešavanja temperature otopina podešene su pH vrijednosti (pH metar, HANNA HI 5522, Hrvatska) obje otopine na  $\text{pH} = 6,55$ . U otopinu kalcijeva klorida, koja se nalazi u staklenom reaktoru dvostrukih stjenki radi lakšeg održavanja konstantne temperature polagano se dodaje otopina natrijeva oksalata i od tog trenutka započinje sinteza. Miješanje se provodilo pomoću magnetske miješalice (C-MAG H7, IKA, Njemačka). Sustav za sintezu prikazan je na **slici 21**. Sinteza traje 1h.



**Slika 21.** Sustav za sintezu nestabilne faze kalcijeva oksalata.

Nakon sinteze otopine su prvo analizirane optičkim mikroskopom (Motic B1 sa digitalnom kamerom Moticom 2) kako bi se odredila morfologija nastalih kristala a zatim su profiltrirane i ispirane više puta sa ultračistom vodom, te stavljene na sušenje pod vakuumom za provođenje daljnjih analiza. Sveukupno je provedeno devet sinteza pri tri različite temperature (25, 36,5 i 48 °C) i tri ionske jakosti (0,01, 0,055 i 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Prikaz sinteza i uvjeta sinteze nalaze se u **tablici 4**.

**Tablica 4.** Provedene sinteze označene brojevima i uvjeti sinteza.

Redni broj sinteze	Temperatura (°C)	Ionska jakost (mol dm <sup>-3</sup> )	pH
1	25	0,01	6,55
2	25	0,055	
3	25	0,1	
4	36,5	0,01	
5	36,5	0,055	
6	36,5	0,1	
7	48	0,01	
8	48	0,055	
9	48	0,1	

### 3.5. Karakterizacija kristala kalcijeva oksalata trihidrata

#### 3.5.1. Optička mikroskopija (OM)

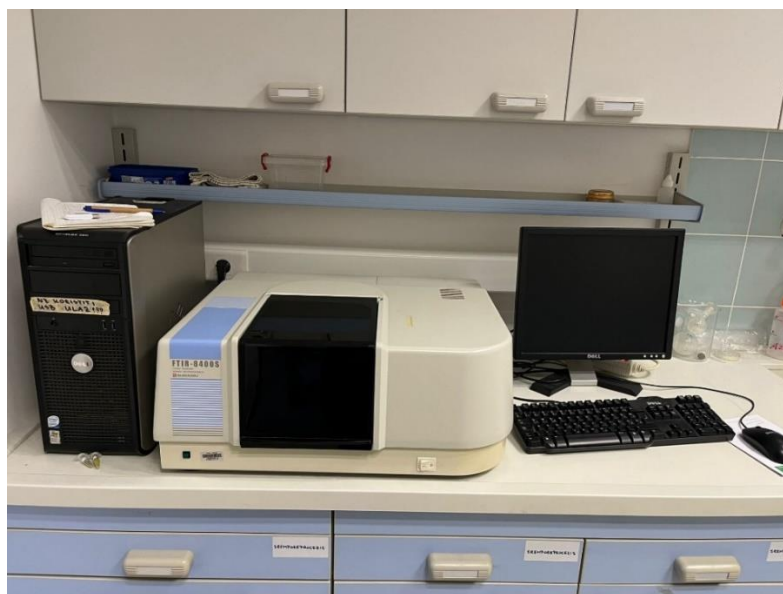
Za analiziranje morfologije dobivenih kristala kalcijeva oksalata trihidrata korišten je svjetlosni mikroskop Motic B1 i digitalna kamera Moticam 2. Svjetlosni mikroskop pomogao je pri karakterizaciji i analizi svojstava dobivenih kristala. Slike su snimljene sa povećanjem  $\times 40$ . Aparatura je prikazana na **slici 22**.



**Slika 22.** Uređaj za optičku mikroskopiju.

### 3.5.2. Infracrvena spektroskopija Furierovom transformacijom (FTIR)

Za analizu spektrometrom dobivene uzorke je potrebno usitniti u tarioniku pomoću tučka i u usitnjeni uzorak dodati kalijev bromid (KBr – IR čistoće), tvar koja ne apsorbira infracrveno zračenje. Homogenizirani uzorak prenosi se u nosač koji se postavlja u spektrometar. Uređaj koji je korišten za analizu je spektrometar Shimadzu FTIR 8400S (Shimadzu, Japan), a rezultati su dobiveni iz programa IR Solution. Na **slici 23.** prikazan je uređaj za infracrvenu spektroskopiju.



**Slika 23.** Uređaj za infracrvenu spektroskopiju.

### 3.5.3. Rendgenska difrakcija na prahu (PXRD)

Analiza faznog sastava uzorka dobivena je tako da se praškasti uzorak postavi na nosač uzorka, te se nosač postavi u difraktometar gdje se odvija analiza. Uređaj za analizu je Aeris Research (Malvern PANalytical, Ujedinjeno Kraljevstvo). Difraktogrami su snimljeni u kutnom području  $2\theta^\circ = 8 - 60^\circ$  sa stupnjem snimanja od  $0,02^\circ$  te je isti uređaj prikazan na **slici 24.** Dobiveni difraktogrami su uspoređeni s literaturnim podacima i obrađeni putem HighScorePlus programa.





**Slika 24.** Uređaj za rendgensku difrakciju na prahu.

### 3.5.4. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Kod termogravimetrijske analize najprije se važu aluminijske posudice. Nakon vaganja posudica u njih se doda 10-20 mg uzorka te se ponovno važu. Masa uzorka izračuna se iz razlike mase posudice i uzorka i same posudice. Uzorak u posudicama se stavlja u uređaj koji uzorak zagrijava povećanjem temperature određenom brzinom. Promjena mase uzorka se zabilježava na uređaju te se iz konačnih podataka određuje postotak hidratnog oblika u uzorku. Uzorci se analiziraju u atmosferi zraka gdje je brzina protoka  $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ , pri temperaturama od  $30\text{-}300 \text{ }^\circ\text{C}$  te korakom snimanja  $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Uređaj koji je korišten za termogravimetrijsku analizu je Mettler Toledo System 1 i prikazan je na **slici 25**.



**Slika 25.** Uređaj za termogravimetrijsku analizu.

Podaci dobiveni IR, PXRD i TGA analizama obrađeni su u programu Excel.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Taloženjem su dobiveni kristali nestabilne faze kalcijeva oksalata trihidrata i stabilne faze kalcijeva oksalata monohidrata pri različitim temperaturama (25; 36,5 i 48 °C) i ionskim jakostima (0,01; 0,055 i 0,1 mol dm<sup>-3</sup>) te istim pH vrijednostima (pH = 6,55). Uvjeti sinteza su mijenjani kako bi došli do zaključka pri kojim se uvjetima stvara nestabilna faza kalcijeva oksalata. Rezultati svih sinteza prikazani su u **tablici 5**.

**Tablica 5.** Prikaz uvjeta sinteza i dobivenih hidratnih oblika kalcijeva oksalata

Sinteza	Ionska jakost / mol dm <sup>-3</sup>	Temperatura / °C	Hidratni oblik
1	0,01	25	COT
2	0,055		COT
3	0,1		COT
4	0,01	36,5	COT
5	0,055		COT
6	0,1		COT
7	0,01	48	COM
8	0,055		COM
9	0,1		COM

### 4.1. Sinteze pri 25 °C

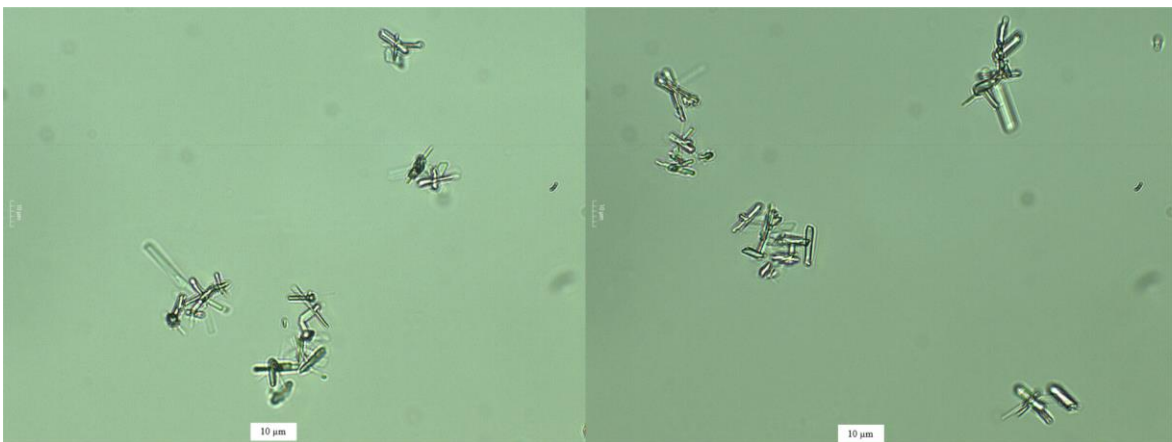
U prvom setu provedene su tri sinteze s dva konstantna parametra i jednim parametrom koji se mijenja. Eksperimentalni uvjeti prikazani su u **tablici 6**.

#### 4.1.1. Optička mikroskopija

Nakon završene sinteze prvo je analizirana morfologija dobivenih kristala pomoću optičkog mikroskopa. Na **slikama 26., 27. i 28.** prikazani su dobiveni kristali iz prve tri sinteze. Kristali na slikama su pločasti i u obliku paralelograma. Na **slici 26.** vidljivo je da su kristali nešto veći i prozirniji od kristala sa drugih slika. Kristali na **slici 28.** su izduženi i najmanje prozirni. Morfologija dobivenih kristala poklapa se sa literaturnom morfologijom kristala kalcijeva oksalata trihidrata [15,18,20].



**Slika 26.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 1.



**Slika 27.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 2.

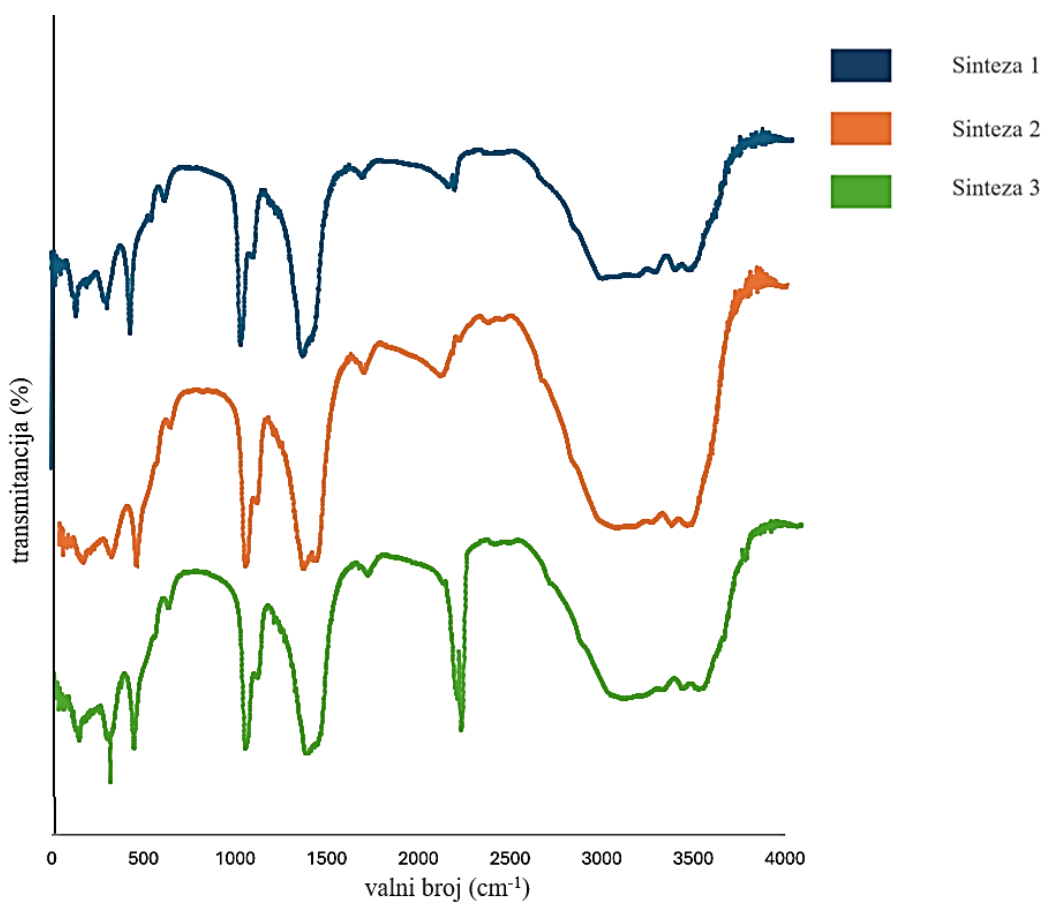


**Slika 28.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 3.

#### 4.1.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 25 °C

Nakon sušenja dobivenih kristala provedene su ostale analize. Prva od tih analiza je analiza infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FTIR). Pomoću FT-IR spektroskopije potvrđeno je da su produkti sinteza 1, 2 i 3 kalcijev oksalat trihidrat. Na **slici 29.** prikazani su spektri analiziranih uzoraka.

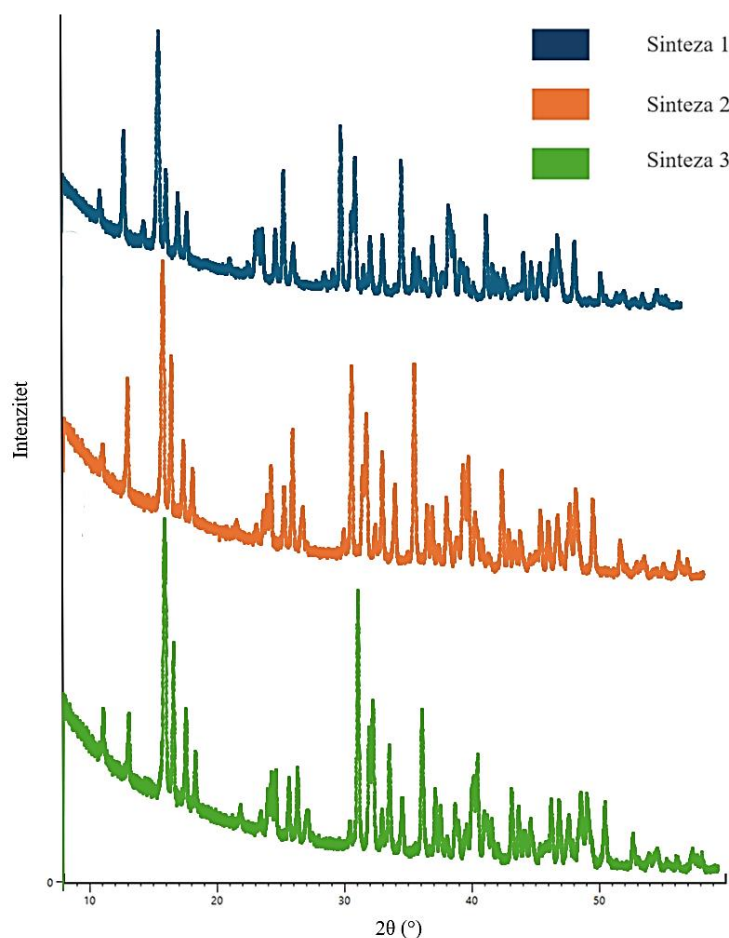
Kvalitativnom analizom uzoraka kalcijeva oksalata trihidrata dobiveni su IR spektri koji su uspoređeni sa već poznatim literaturnim podacima (**Tablica 2.**) za karakteristična područja COT-a [29]. U IR spektru mogu se vidjeti karakteristični maksimumi. Pri niskim valnim brojevima izražen je maksimum pri  $651\text{ cm}^{-1}$  koji opisuje H-O-H svijanje, a pri višim valnim brojevima uočava se maksimum na  $1324\text{ cm}^{-1}$  koji opisuje C-O simetrično istežanje. U spektru se može uočiti i široki maksimum pri  $3526\text{ cm}^{-1}$  koji opisuje O-H istežanje. Usporedbom s literaturnim vrijednostima potvrđeno je da je nastali spoj nestabilna faza kalcijeva oksalata tj. COT.



**Slika 29.** IR spektri uzoraka 1, 2 i 3.

#### 4.1.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 25 °C

Difraktogrami na **slici 30.** uspoređeni su sa literaturnim difraktogramima kalcijevih oksalata [34]. Dobiveni difraktogrami uspoređeni su sa **slikom 20.** na kojoj su crvenom bojom označeni karakteristični difrakcijski maksimumi za kalcijev oksalat trihidrat. Karakteristični maksimumi sa **slike 3.** poklapaju se sa maksimumima sa **slike 20.** i time se potvrđuje kako je u sintezama nastala nestabilna faza kalcijev oksalat trihidrat (COT).



**Slika 30.** Difraktogrami uzoraka 1, 2 i 3.

#### 4.2. Sintezе pri 36,5 °C

U drugom setu sinteza izvedene su tri sinteze na temperaturi od 36,5 °C i također sa tri različite ionske jakosti, a to su 0,01, 0,055 i 0,1 mol dm<sup>-3</sup>. Ovim sintezama, pri pojašnjenim uvjetima također nastaje spoj kalcijev oksalat trihidrat (COT). Eksperimentalni uvjeti i rezultati prikazani su u **tablici 5.**

#### 4.2.1. Optička mikroskopija

Analizom dobivenih kristala pomoću optičkog mikroskopa uočeno je kako u sintezama 4, 5 i 6 nastaju kristali kalcijeva oksalata trihidrata. Kristali COT prikazani su na **slikama 31., 32. i 33.** Morfologija kristala na slikama u skladu je sa literaturno opisanom morfologijom kalcijeva oksalata trihidrata. Kristali na **slikama 31. i 33.** manji su i šire raspoređeni, dok su kristali na **slici 32.** puno veći, prozirniji i bliži jedni drugima te također kod njih se jasnije vide strukture ploče i paralelograma koji su opisani u literaturi [15,18,20].



**Slika 31.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 4.



**Slika 32.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 5.

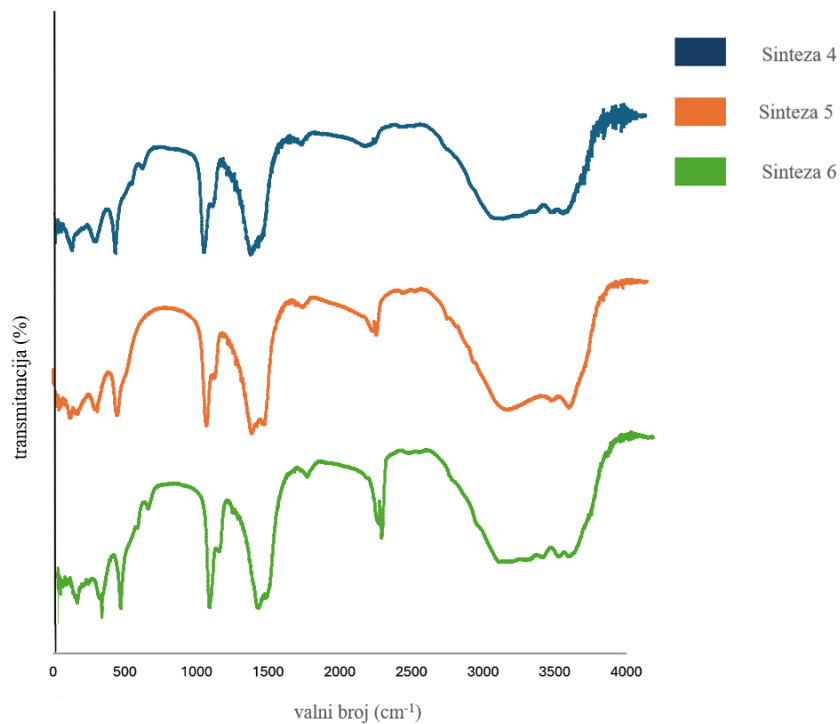




**Slika 33.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 6.

#### 4.2.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C

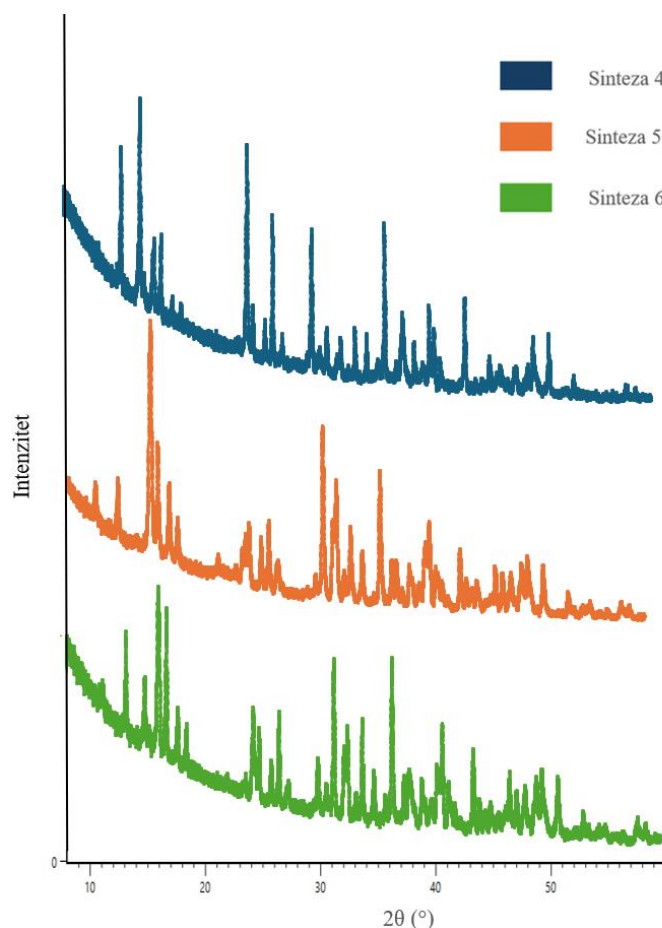
Kao i u prethodnim sintezama dobiveni IR spektri, prikazani na **slici 34.**, iz drugog seta sinteza uspoređeni su sa literaturnim vrijednostima karakterističnih maksimuma koji su prikazani u **tablici 2.** U IR spektru mogu se vidjeti karakteristične vibracije pri  $3528\text{ cm}^{-1}$  koje opisuju O-H istežanje, pri  $1324\text{ cm}^{-1}$  koje opisuju C-O simetrično istežanje i pri  $651\text{ cm}^{-1}$  koje opisuju H-O-H svijanja. Poklapanje maksimuma sa spektara i literaturnih vrijednosti potvrđuje da se radi o kalcijevom oksalatu trihidratu [29].



**Slika 34.** IR spektri uzoraka 4, 5 i 6.

#### 4.2.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C

Difraktogrami na **slici 35.** uspoređeni su sa literaturnim difraktogramom za kalcijeve oksalate koji je prikazan na **slici 20.** Difraktogrami sa slike poklapaju se sa karakterističnim difrakcijskim maksimumima kalcijeva oksalata trihidrata. Kao i u prethodnom slučaju i u ovom setu sinteza nastaje nestabilna faza kalcijeva oksalata (COT) [34].



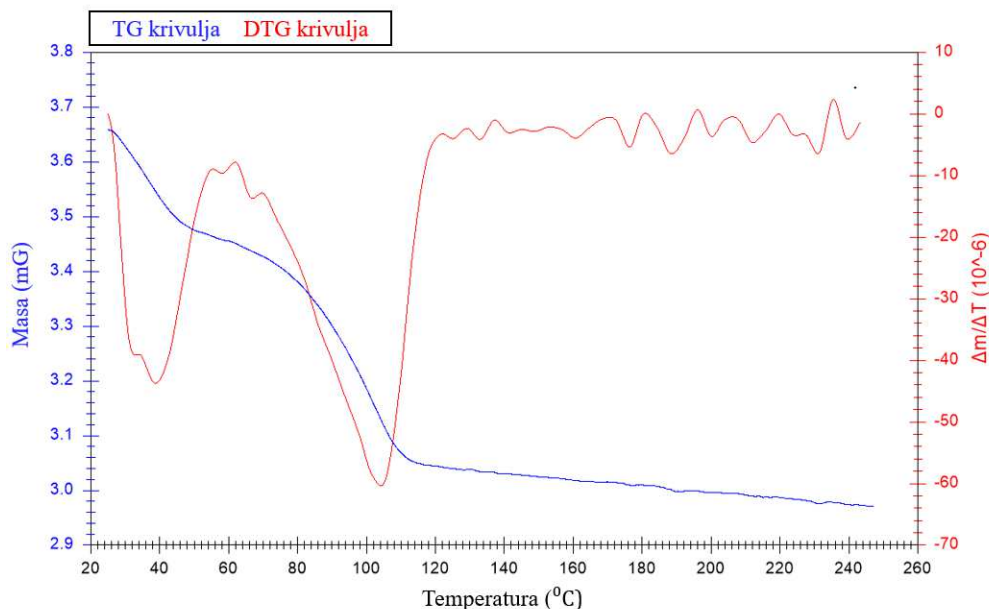
**Slika 35.** Difraktogrami uzoraka 4, 5 i 6.

#### 4.2.4. Termogravimetrijska analiza uzoraka sintetiziranih pri 36,5 °C

Obzirom da je termogravimetrijska analiza destruktivna metoda za sintetizirane uzorke i potrebno je između 10 – 20 mg uzorka za jednu analizu, analiza je napravljena samo na jednom uzorku. U svim provedenim sintezama dobivalo se između 5 – 10 mg uzorka po sintezi te je iz tog razloga termogravimetrijska analiza provedena samo na uzorku 5 sintetiziranom pri ionskoj jakosti  $I_c = 0,055 \text{ mol dm}^{-3}$ . Na **slici 36.** prikazan je termogram uzorka 5. Termogravimetrijska krivulja (plava boja) prikazuje gubitak mase u 2 koraka, a prva derivacija termogravimetrijske krivulje (crvena boje) prikazuje da je u



prvom koraku otišlo dvije molekule vode, dok je u drugom koraku otišla jedna molekula vode [36,37]. Ukupni gubitak mase iznosi 28,26% što odgovara gubitku mase za COT, a rezultat odgovara do sada provedenim IR i XRD analizama.



Slika 36. Termogram uzorka 5.

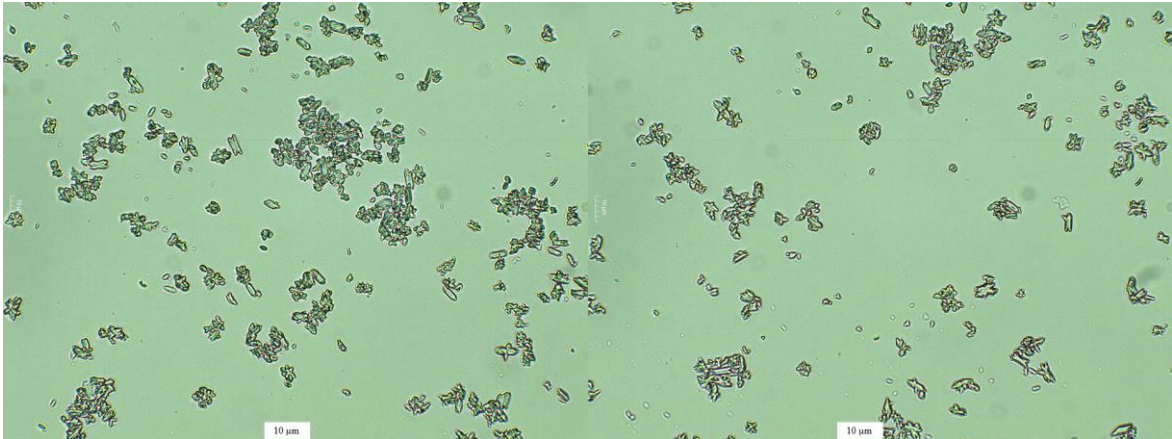
### 4.3. Sinteze pri 48 °C

U trećem, odnosno zadnjem setu eksperimenata, provedene su tri sinteze na temperaturi od 48 °C i pri tri različite vrijednosti ionske jakosti (0,01, 0,055 i 0,1 mol dm<sup>-3</sup>). Ove sinteze pokazale su da ne nastaju kristali kalcijeva oksalata trihidrata (COT) već pri temperaturi od 48 °C nastaje kalcijev oksalat monohidrat (COM). Rezultati sinteza vidljivi su u **tablici 6**.

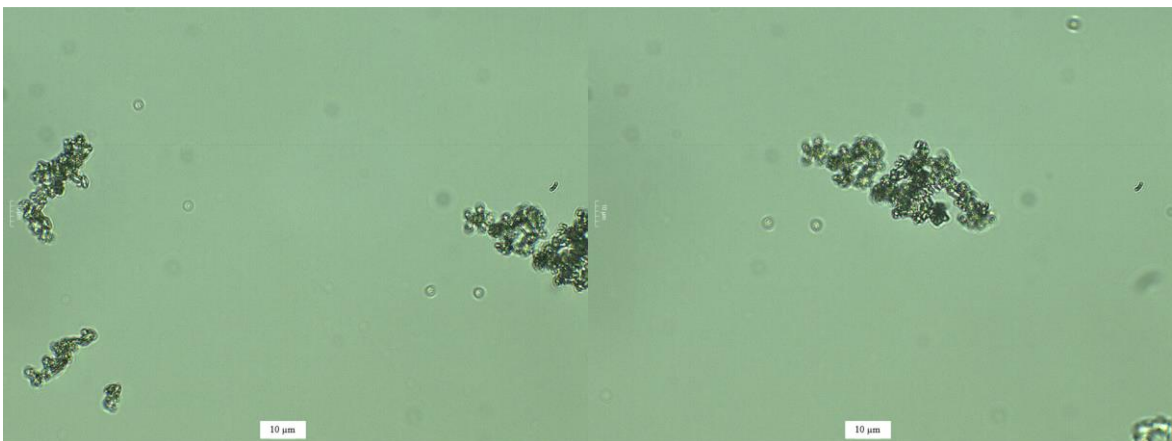
#### 4.3.1. Optička mikroskopija

Morfološkom analizom dobivenih kristala na temperaturi od 48 °C vidljivo je da se sintetizirani kristali razlikuju od kristala koji su dobiveni pri eksperimentnim uvjetima na 25 °C i 36,5 °C. Dobiveni kristali su u obliku agregata, pravilnih šesterokuta, oblika suza te sraslaca 2 ili više kristala. Morfologija odgovara literaturnoj morfologiji COM [18]. Vidljivo je da su dosta manji, kao što je već prije spomenuto, u obliku su agregata. Kristali na **slici 37**. poprilčno su uniformni te se razaznaju pravilni šesterokuti, oblik suze i sraslaci s

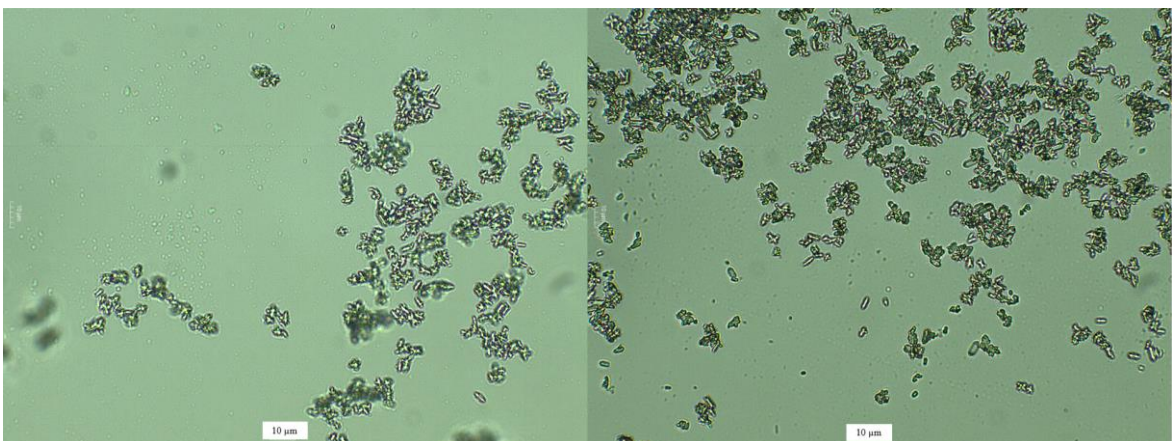
manjim agregiranim područjima, dok je kristale na **slici 38.** teško razaznati jer su gusto složeni ali se vide mali kristali oblika suze. Kristali na **slici 39.** pokazuju i agregatne guste skupove ali i slobodne kristale šesterokutnog oblika ili oblika suze te sraslace.



**Slika 37.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 7.



**Slika 38.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 8.

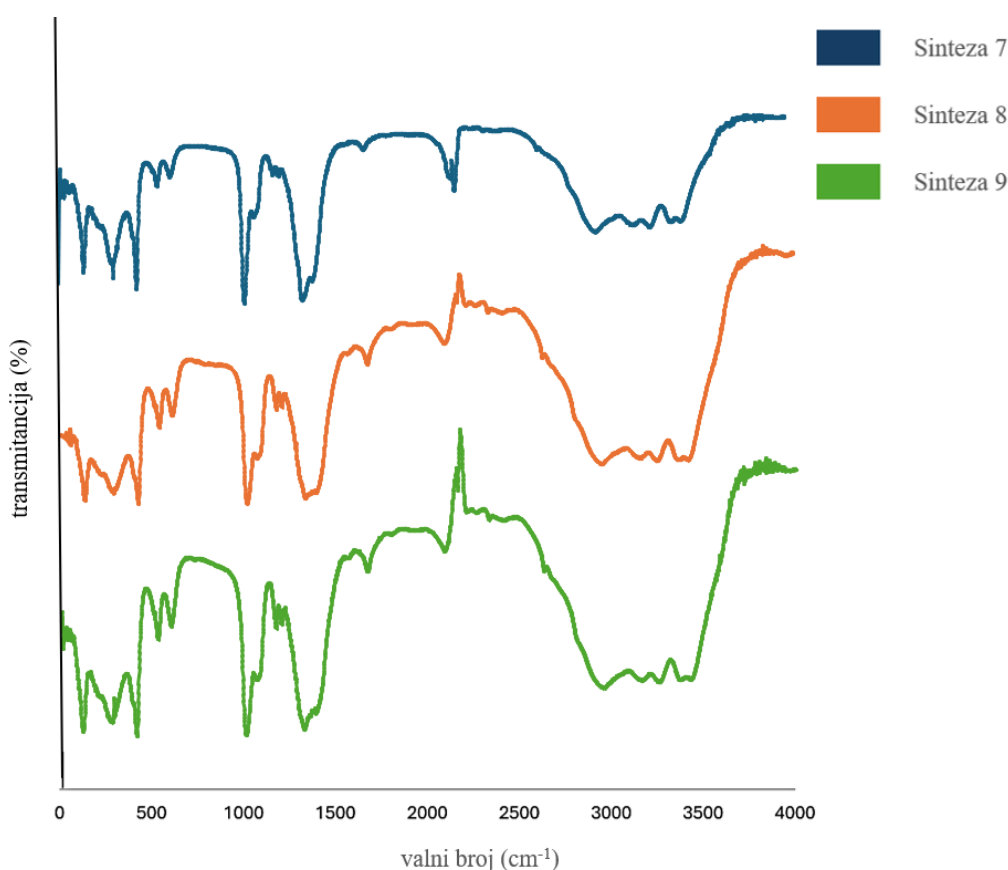


**Slika 39.** Mikroskopske snimke kristala sinteze 9.

#### 4.3.2. Infracrvena spektroskopija uzoraka sintetiziranih pri 48 °C

Daljnjom analizom dobivenih uzoraka kvalitativno je IR spektroskopijom potvrđeno kako su dobiveni uzorci monohidratnog sastava te su dobiveni spektri prikazani na **slici 40**.

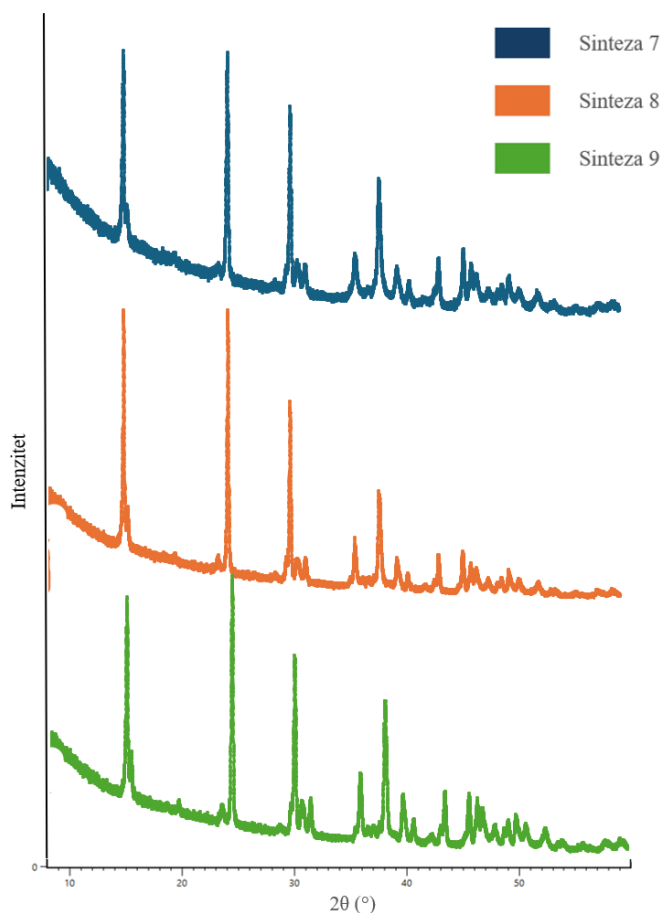
Kalcijev oksalat monohidrat ima specifične maksimume koji ga karakteriziraju. Dobiveni podaci iz grafova uspoređeni su s literaturnim podacima (**Tablica 2.**) kako bi se potvrdio monohidratni sastav uzoraka 7, 8 i 9. U IR spektru mogu se uočiti karakteristični maksimumi poput 3483, 3429, 3336, 3258 i 3058  $\text{cm}^{-1}$  koji se poklapaju s literaturnim vibracijama u području vode. Karakteristični maksimumi za karbonilne vibracije vidljive su u području od 1200–1800  $\text{cm}^{-1}$ . Maksimum na približno 1624  $\text{cm}^{-1}$  odgovara asimetričnom istežanju karbonilne skupine, dok je na 1321  $\text{cm}^{-1}$  uočeno simetrično karbonilno istežanje i metal-karbonilno istežanje. Uz navedene karakteristične maksimume ističu se i maksimumi na 656, 782 i 958  $\text{cm}^{-1}$ .



**Slika 40.** IR spektri uzoraka 7, 8 i 9.

#### 4.3.3. Rendgenska difrakcija na prahu uzoraka sintetiziranih pri 48 °C

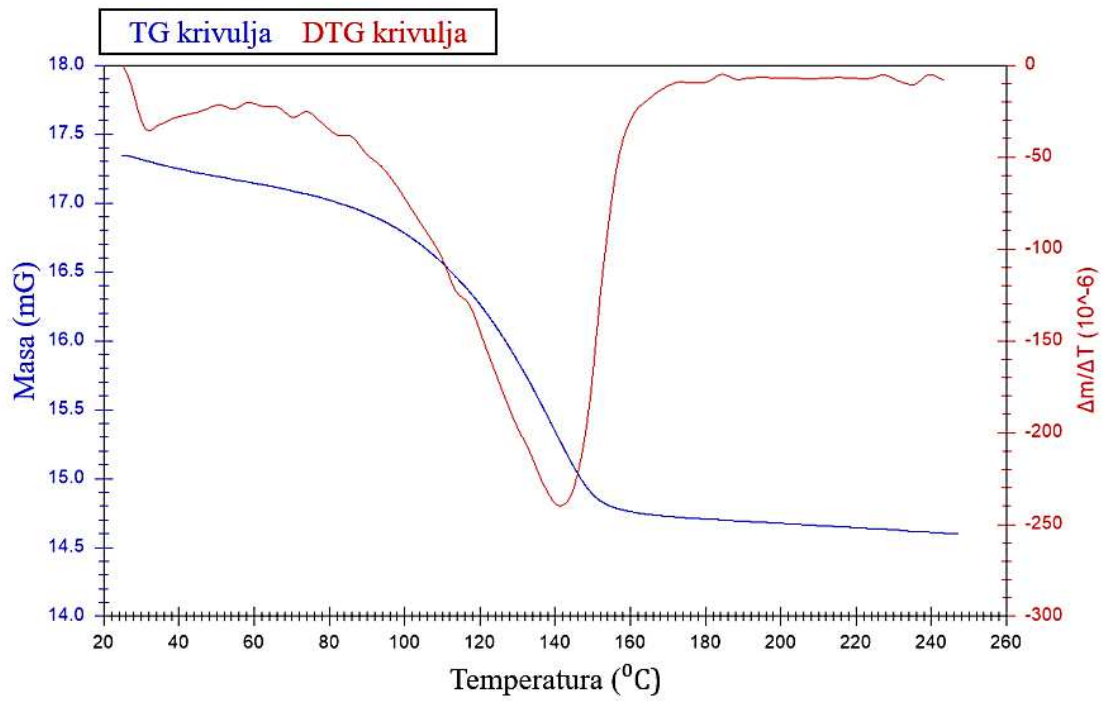
Rendgenskom difrakcijom na prahu provedena je kvantitativna analiza. Kao što je vidljivo na **slici 41.** rezultati analize potvrdili su da se radi o kalcijevom oksalatu monohidratu. Dobiveni difraktogrami uspoređeni su s literaturnim podacima sa **slike 20.** [34].



**Slika 41.** Difraktogrami uzoraka 7, 8 i 9.

#### 4.3.4. Termogravimetrijska analiza uzoraka sintetiziranih pri 48 °C

Na **slici 42.** prikazan je termogram uzorka 8. Termogravimetrijska krivulja (plava boja) prikazuje gubitak mase u jednom koraku, a prva derivacija termogravimetrijske krivulje (crvena boja) pokazuje da je u tom koraku otišla jedna molekula vode [36,37]. Ukupni gubitak mase iznosi 12,13% što odgovara gubitku mase za COM, a rezultat odgovara do sada provedenim IR i XRD analizama.



Slika 42. Termogram uzorka 8.

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati i okarakterizirati nestabilnu hidratnu fazu kalcijeva oksalata procesom taloženja uz različite eksperimentalne uvjete. Sinteze su provedene pri tri temperature (25; 36,5 i 48 °C) i tri ionske jakosti (0,01, 0,055 i 0,1 mol dm<sup>-3</sup>). Kao što je ranije navedeno, kalcijevi oksalati nalaze se u tri poznate faze u prirodi: kalcijev oksalat monohidrat (COM), kalcijev oksalat dihidrat (COD) i kalcijev oksalat trihidrat (COT). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je proces taloženja određenih faza kalcijeva oksalata složen i nepredvidiv.

Zabilježeno je da je pri eksperimentalnim uvjetima gdje su temperature sinteze bile 25 °C i 36,5 °C taložio kalcijev oksalat trihidrat (COT), dok je povišenjem temperature na 48 °C taložio kalcijev oksalat monohidrat (COM). Vidljivo je i da čimbenik ionske jakosti nije pretjerano utjecao na nastanak jednog odnosno drugog oblika. Neovisno o ionskoj jakosti nastali kristali su dosta slični izgledom i veličinom na određenim temperaturama.

Zaključno s time u ovom radu prikazano je kako temperatura pri ovim uvjetima sinteze ima najveći utjecaj na nastanak nestabilne hidratne faze kalcijeva oksalata (COT) i stabilne hidratne faze (COM). Odnosno, pri nižim temperaturama od 25 i 36,5 °C i svim ionskim jakostima nastaje COT, a pri višoj temperaturi od 48 °C neovisno o ionskim jakostima nastaje COM.

Istraživanje uvjeta pri kojima nastaju ovi oblici kalcijevih oksalata kao i istraživanje njihove morfologije i svojstava vrlo je bitno za shvaćanje njihovog nastanka i u krajnjem slučaju za njihovu prevenciju.

## 6. LITERATURA

- [1] Simkiss, K., & Wilbur, K. M. (2012). *Biom mineralization*. Elsevier.
- [2] Dove, P. M., De Yoreo, J. J., & Weiner, S. (Eds.). (2018). *Biom mineralization* (Vol. 54). Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- [3] Chen, Y., Feng, Y., Deveaux, J. G., Masoud, M. A., Chandra, F. S., Chen, H., ... & Feng, L. (2019). Biom mineralization forming process and bio-inspired nanomaterials for biomedical application: a review. *Minerals*, 9(2), 68.
- [4] Estroff, L. A. (2008). Introduction: biom mineralization. *Chemical reviews*, 108(11), 4329-4331.
- [5] Nielsen, A. E. (1970). Precipitation. *Croatica Chemica Acta*, 42(2), 319-333.
- [6] Srinivas, S., Venkanna, B., Madan Mohan, E., & Krishna-Mohan, C. (2012). Urolithiasis: overview. *Int J Pharm Res Biomed Anal*, 1(1), 20-31.
- [7] Abdurakhmanovich, K. O., Egamberdievna, S. N., & Amandullaevich, A. Y. (2021). Ultrasound diagnosis of urolithiasis. *Central Asian Journal of Medical and Natural Science*, 2(2), 18-24.
- [8] Thakore P, Liang TH. Urolithiasis. [Updated 2023 Jun 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559101/>
- [9] Khan, S. R., Pearle, M. S., Robertson, W. G., Gambaro, G., Canales, B. K., Doizi, S., ... & Tiselius, H. G. (2016). Kidney stones. *Nature reviews Disease primers*, 2(1), 1-23.
- [10] Parmar, M. S. (2004). Kidney stones. *Bmj*, 328(7453), 1420-1424.
- [11] Moe, O. W. (2006). Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The lancet*, 367(9507), 333-344.
- [12] Sigel, A., Sigel, H., & Sigel, R. K. (Eds.). (2008). *Biom mineralization: From Nature to Application*, Volume 4 (Vol. 4). John Wiley & Sons.
- [13] López-Moreno, M., Garcés-Rimón, M., & Miguel, M. (2022). Antinutrients: Lectins, goitrogens, phytates and oxalates, friends or foe?. *Journal of Functional Foods*, 89, 104938.
- [14] Izatulina, A. R., Gurzhiy, V. V., Krzhizhanovskaya, M. G., Kuz'mina, M. A., Leoni, M., & Frank-Kamenetskaya, O. V. (2018). Hydrated calcium oxalates: crystal structures, thermal stability, and phase evolution. *Crystal Growth & Design*, 18(9), 5465-5478.
- [15] Thomas, A. (2009). Biomimetic growth and morphology control of calcium oxalates.
- [16] Wesson, J. A., & Ward, M. D. (2007). Pathological biom mineralization of kidney stones.



Elements, 3(6), 415-421.

[17] De Yoreo, J. J., Qiu, S. R., & Hoyer, J. R. (2006). Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(6), F1123-F1132.

[18] Martin, X., Smith, L. H., & Werness, P. G. (1984). Calcium oxalate dihydrate formation in urine. *Kidney international*, 25(6), 948-952.

[19] Wei, X., Yang, J., Li, Z., Su, Y., & Wang, D. (2012). Comparison investigation of the effects of ionic surfactants on the crystallization behavior of calcium oxalate: From cationic to anionic surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 401, 107-115.

[20] Conti, C., Casati, M., Colombo, C., Possenti, E., Realini, M., Gatta, G. D., ... & Zerbi, G. (2015). Synthesis of calcium oxalate trihydrate: New data by vibrational spectroscopy and synchrotron X-ray diffraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, 721-730.

[21] C.P. East, A.D. Wallace, A. Al-Hamzad, W.O.O. Doherty, C.M. Fellows, Effect of poly(acrylic acid) molecular mass and end-group functionality on calciumoxalate crystal morphology and growth, *J. Appl. Polym. Sci.* 115 (2010) 2127–2135.

[22] R.C. Walton, J.P. Kavanagh, B.R. Heywood, P.N. Rao, Calcium oxalates grown in human urine under different batch conditions, *J. Cryst. Growth* 284 (2005) 517–529.

[23] M. Donnet, N. Jongen, J. Lemaitre, P. Bowen, New morphology of calciumoxalate trihydrate precipitated in a segmented flow tubular reactor, *J. Mater.Sci. Lett.* 19 (2000) 749–750.

[24] Davidson, M. W., & Abramowitz, M. (2002). Optical microscopy. *Encyclopedia of imaging science and technology*, 2(1106-1141), 120.

[25] Škorić, I., & Spektroskopija, M. (2016). *Nastavni tekst. Zavod za organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb*, 3-8.

[26] Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2015). *Introduction to spectroscopy*.

[27] Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.

[28] Sun, D. W. (Ed.). (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic press.

[29] Stanković, A., Šafranko, S., Jurišić, K., Balić, I., Bijelić, J., Jokić, S., & Medvidović-



Kosanović, M. (2020). Investigation of system complexity and addition of vitamin C on calcium oxalate precipitation. *Chemical Papers*, 74, 3279-3291.

[30] Berkowitz, E. (2006). X-Ray Physics.

[31] Poppe, L. J., Paskevich, V. F., Hathaway, J. C., & Blackwood, D. S. (2001). A laboratory manual for X-ray powder diffraction. US Geological Survey open-file report, 1(041), 1-88.

[32] Cantor, B. (2020). The equations of materials. Oxford University Press.

[33] Pecharsky, Vitalij, P. Zavalij, Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials. Springer Science & Business Media, 2008.

[34] Honcová, P., Svoboda, R., Pilný, P., Sádovská, G., Barták, J., Beneš, L., & Honc, D. (2016). Kinetic study of dehydration of calcium oxalate trihydrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 124, 151-158.

[35] Bevis, J., Bottom, R., Duncan, J., Farhat, I., Forrest, M., Furniss, D., ... & Seddon, A. (2008). Principles and applications of thermal analysis. Wiley Online Library.

[36] J. Kaloustian, T. F. El-Moselhy i H. Portugal, Determination of calcium oxalate (mono- and dihydrate) in mixtures with magnesium ammonium phosphate or uric acid:the use of simultaneous thermal analysis in urinary calculi. *Clin. Chim. Acta* 334 (2003) 117-129.

[37] Echigo, T.; Kimata, M.; Kyono, A.; Shimizu, M.; Hatta, T. Re-investigation of the crystal structure of whewellite [Ca(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)·H<sub>2</sub>O] and the dehydration mechanism of caoxite [Ca(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)·3H<sub>2</sub>O]. *Mineralogical Magazine*. 2005, 69(1), 77–88. <https://doi.org/10.1180/0026461056910235>.