

*Sonderdruck*  
*aus „Der Urologe“, 3. Jahrgang, Heft 4, Juli 1964, S. 218—222*

---

*Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg*

Aus dem Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, Hamburg-Volksdorf (Direktor: Prof. Dr. R. v. SENGBUSCH)

## **Auflösung von schwerlöslichen Phosphaten durch Säuren und Komplexbildner\***

**Von I. SÜCKER**

Mit 5 Textabbildungen

### *Einleitung*

Ein Teil der im menschlichen Organismus vorkommenden Harnkonkremente besteht aus Calcium- und Magnesiumsalzen der Phosphorsäure. Es handelt sich um die chemischen Verbindungen Tricalciumphosphat, Calciumhydrogenphosphat, Magnesiumammoniumphosphat und Magnesiumhydrogenphosphat. Die mineralogischen Namen lauten: Apatit bzw. Whitlockit, Brushit, Struvit und Newberyit. Die tertiären und sekundären Phosphate werden unter verschiedenen physikalisch-chemischen Bedingungen als unlösliche Niederschläge ausgefällt (Sediment), oder sie wachsen in kristalliner Form um einen Kristallisationskeim, die sogenannte Matrix. Sie besteht vorwiegend aus organischen Substanzen (Mucoproteide, Mucopolysaccharide) und bildet das „Gerüst“ der Phosphatkonkremente.

In chemischer Hinsicht ist die Ausfällung der unlöslichen Phosphate weitgehend abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration des Urins. Nach Untersuchungen von ELLIOT, SHARP u. LEWIS<sup>4</sup> findet man Calciumhydrogenphosphat (Brushit) im sauren Bereich unterhalb des pH-Wertes 6,6 und Tricalciumphosphat (Apatit) oberhalb dieser Grenze. Magnesiumammo-

niumphosphat (Struvit) fällt erst beim pH 7,2, also im alkalischen Milieu aus. Bei diesen Zahlen handelt es sich um Mittelwerte; die individuellen Tagesschwankungen von teilweise 2 pH-Einheiten sind nicht berücksichtigt.

Eine chemische Auflösung von Phosphatkonkrementen, die als Nieren- oder Blasensteine in den menschlichen Harnwegen vorkommen, wurde 1928 von MEYER<sup>9</sup> durchgeführt. Als Lösungsmittel verwendete er verdünnte Salzsäure.

1939 arbeiteten ALBRIGHT, SULKOWITCH u. CHUTE<sup>2</sup> erstmals mit einer organischen Säure, nämlich Citronensäure. SUBY u. ALBRIGHT<sup>14</sup> sowie MULVANEY<sup>10</sup> fügten den Citronensäurelösungen Magnesiumionen zu. 1951 berichtete STAEHLER<sup>12</sup> über eine mit Ammoniumcitrat gepufferte Citronensäurelösung, die auch klinisch angewendet wurde.

Parallel zur Phosphatsteinauflösung durch organische und anorganische Säuren wurden 1951 und 1952 von GEHRES u. RAYMOND<sup>5</sup>, ABESHOUSE u. WEINBERG<sup>1</sup> und SUBY<sup>13</sup> Harnkonkremente mit wäßrigen Lösungen der Äthylendiamintetraessigsäure (ADTE) behandelt.

Da die ADTE mit dem Kation (Calcium, Magnesium) reagiert, können auf diese Weise sowohl Oxalate als auch Phosphatsteine in Lösung gebracht werden.

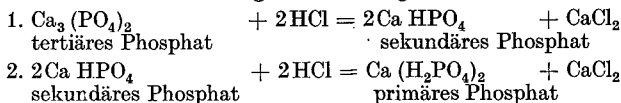
\* Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

Über experimentelle und klinische Ergebnisse mit Lösungsstoffen auf der Basis der ADTE ist in dieser Zeitschrift berichtet worden (LANDECKER, SÜCKER u. TIMMERMANN<sup>7</sup>; KALLISTRATOS<sup>6</sup>; SÜCKER<sup>15</sup>; TIMMERMANN<sup>17</sup>). Da es sich bei den operativ schwierig zu behandelnden Harnsteinen, den Rest- und Rezidivsteinen (BROSIG, KLOSTERHALFEN u. KAUFMANN<sup>3</sup>) sowie bei Nierenausgußsteinen vorwiegend um Phosphatkonkremente handelt, wurden als Ergänzung zu den alkalischen Lösungen der ADTE Carbonsäuren und ihre Salze in bezug auf ihre Lösungseigenschaften untersucht. Sie sind im schwach sauren Milieu wirksam und zeigen gute Lösungseffekte.

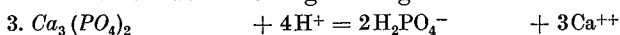
#### Löslichkeit von Calcium- und Magnesiumphosphaten

Natürlich vorkommende Phosphate sind in den meisten Fällen tertiäre Salze, d. h. alle 3 Wasserstoffatome der Phosphorsäure sind durch Metalle ersetzt. Die häufigste Form des „anorganischen“ Phosphors in der Natur ist neben dem Mineral Phosphorit der Apatit. Zur Darstellung des Lösungsvorganges sei hier die Reaktion von Tricalciumphosphat mit starken Säuren, z. B. Salzsäure, beschrieben.

Es können sich folgende Gleichgewichte einstellen:



Die vereinfachte Ionengleichung lautet:



Das schwer lösliche Tricalciumphosphat wird durch Zusatz genügender Säuremengen (Wasserstoffionen  $\text{H}^+$ ) in ein wasserlösliches Dihydrogenphosphat verwandelt, das weitgehend dissoziiert ist. Eine Verschiebung des Gleichgewichts nach rechts kann nicht nur durch Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration, sondern auch durch Entfernung der Calciumionen begünstigt werden. Hierfür sind alle Stoffe geeignet, die mit Calcium Komplexe bilden, besonders die Chelatkomplexbildner.

Die stabilsten Calciumkomplexe liefern die Aminopolycarbonsäuren Äthylendiamintetraessigsäure (ADTE) und Diaminocyclohexantetraessigsäure (SCHWARZENBACH<sup>11</sup>; MARTELL u. CALVIN<sup>8</sup>). Bei der Reaktion der Calciumionen mit dem Anion der ADTE werden Wasserstoffionen frei. Ein optimaler Umsatz wird daher im alkalischen Medium erzielt. Die Wasserstoffionen begünstigen also einerseits die Auflösung des Tricalciumphosphats durch Umwandlung in primäres Phosphat, wirken aber andererseits der Entfernung der Calciumionen durch Komplexbildung entgegen. Es ist grundsätzlich möglich, durch Zusatz eines im alkalischen Milieu wirkenden Puffers das schwer lösliche tertiäre Calciumphosphat mit ADTE-Lösungen durch Komplexbildung aufzulösen. Günstiger wäre es allerdings, im sauren Bereich zu arbeiten und durch Kombination von Komplexbildung und Wasserstoffioneneffekt das Lösungsvermögen zu steigern. Diese Bedingungen erfüllen organische Säuren, deren Anionen mit Erdalkalien Komplexe bilden. Leider haben sie im Vergleich zu den Komplexen der Aminopolycarbonsäuren nur niedrige Beständigkeitskonstanten.

#### Auflösung von Tricalciumphosphat mit Carbonsäuren

Aus ca. 25 Carbonsäuren wurden durch einen Schnelltest diejenigen mit dem besten Lösungsvermö-

gen ausgewählt. Je 100 mg Tricalciumphosphat wurden mit steigenden Mengen (10–50 ml) 0,1 n Säuren 1 Std lang auf der Schüttelmaschine behandelt, der Rückstand durch Fritten G4 filtriert und gewogen. Erwartungsgemäß zeigt die 0,1 n Salzsäure die beste Wirkung: bereits 20 ml genügen für die vollständige Lösung von 100 mg Tricalciumphosphat. Citronensäure, Gluconsäure, Äpfelsäure und Mandelsäure zeigen bei 40 ml einen Auflösungseffekt von über 90%.

Es wurden vergleichende Lösungsversuche durchgeführt mit drei in der Literatur beschriebenen Lösungsstoffen (Abb. 1):

- a) Solution G nach SUBY<sup>13</sup>  
Citronensäure 32,30 g  
Magnesiumoxid 3,84 g  
Soda ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 4,37 g  
aqua dest. ad 1000 ml pH 3,95
- b) Lösung nach STAEBLER<sup>12</sup>  
Citronensäure 70 g  
Ammoniumcitrat 30 g  
aqua dest. ad 1000 ml pH 3,0
- c) Renacidin nach MULVANEY<sup>10</sup> pH ca. 4

Die Zusammensetzung ist in der Literatur nur angedeutet. Nach unserer Analyse ist Citronensäure der Hauptbestandteil. Gluconsäurelaktone wurde papierchromatographisch gefunden, außerdem sind größere Mengen Magnesium und Carbonat im Renacidin enthalten.

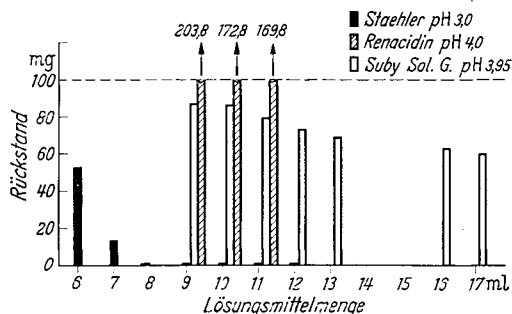


Abb. 1. Auflösung von Tricalciumphosphat in sauren Lösungen. Vorlage: 100 mg  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Methode: Schüttelversuch 1 Std. Lösungsmittel: steigende Volumina der Lösung nach STAEBLER, Renacidin und Subys Sol. G.

Die chemisch wirksame Komponente in allen drei Lösungsstoffen ist Citronensäure. Die anderen Bestandteile sollen entweder der Pufferung der Lösung oder einer Herabsetzung des physiologischen Reizes dienen.

Das bei weitem beste Lösungsvermögen zeigt die Staehlersche Lösung mit dem pH 3. Während für die Auflösung von 100 mg Tricalciumphosphat nur 8 ml verbraucht werden, bleiben selbst bei 17 ml der Suby-Solution G noch 60% ungelöst. Die Behandlung von Calciumphosphat mit Renacidin ergibt Auswaagen bis zu 200%! Es handelt sich um die Ausfällung eines beim pH 4 unlöslichen Salzes, das infrarotspektroskopisch als Calciumcitrat identifiziert wurde.

#### Lösungsstoff St 90

Es ist bekannt, daß sekundäres Calciumphosphat (Calciumhydrogenphosphat) mit Ammoniumcitrat in Lösung gebracht werden kann. Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine Komplexbildung am Kation, und zwar um Calciumammin- und Calciumcitratkomplexe. Da durch Einwirkung von Säuren tertiäres Phosphat in sekundäres umgewandelt werden kann, muß auch von einer sauren Ammonicitratlösung ein Lösungseffekt erwartet werden. Es wurde experimentell eine Zunahme des Lösungsvermögens für Tricalciumphosphat mit steigender Konzentration von Ammonicitrat gefunden.

Stärker als Citronensäure reagiert Mandelsäure in höherer Konzentration mit Tricalciumphosphat unter Bildung des Calciumsalzes: Durch doppelte Umsetzung wird Calciumphosphat in Calciummandelat überführt. Das Lösungsvermögen erreicht ein Maximum bei ca. 2%iger Mandelsäure.

Es wurden Gemische aus Mandelsäure (1,7%  $\pm$  0,112 m), Ammoniumcitrat (4%  $\pm$  0,117 m) und äquimolaren Mengen (0,117 m) verschiedener Säuren oder Salze hergestellt (Abb. 2).

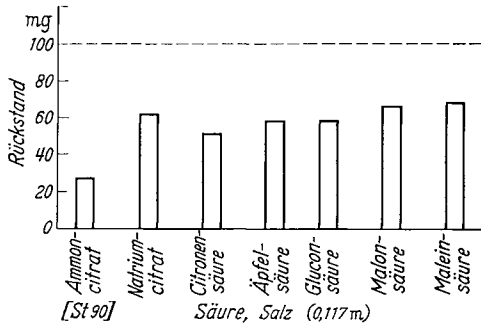


Abb. 2

Abb. 2. Auflösung von Tricalciumphosphat mit Carbonsäuren und ihren Salzen. Vorlage: 100 mg  $Ca_3(PO_4)_2$ . Methode: Schüttelversuch 1 Std. Lösungsmittel: 10 ml; Konzentration: 0,112 m Mandelsäure (1,7%), 0,117 m Ammoniumcitrat (4%), 0,117 m Säure, Salz

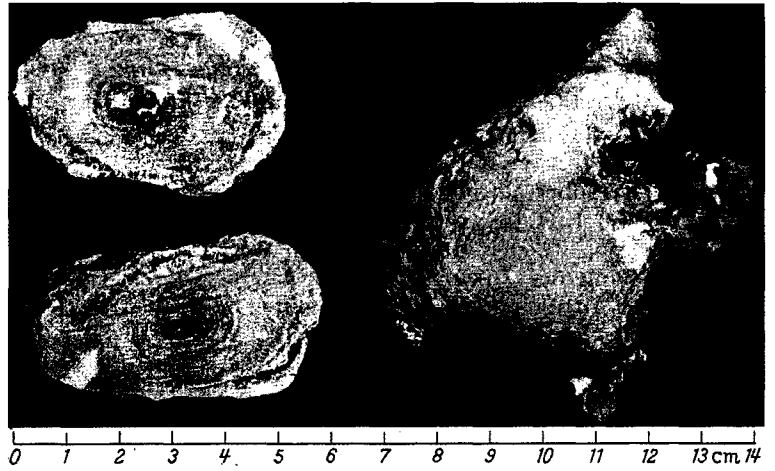


Abb. 3

Abb. 3. Harnstein aus Apatit (N 506) und Struvit (N 552; Gewicht 75 g)

Citronensäure zeigt zwar ein gutes Lösungsvermögen, sie wird jedoch von Ammoniumcitrat übertroffen. Dieses ergab auch unter allen geprüften Lösungen von Salzen organischer Säuren die besten Werte. Als optimales Lösungsmittel für Tricalciumphosphat wurde daher das Gemisch aus 1,7% Mandelsäure (0,112 m) und 8% Ammoniumcitrat (0,23 m) unter der Bezeichnung St 90 ermittelt und weiterhin getestet.

Mandelsäure hat außer dem Lösungsvermögen eine bakteriostatische Wirkung und dämpft das durch die Citronensäure begünstigte Bakterienwachstum. Sie wird bei peroraler Aufnahme unverändert durch die Nieren ausgeschieden und ist als Harndesinfizienz bekannt.

*Auflösung von Apatit im Tropfversuch*

In einer bereits früher beschriebenen Apparatur (SÜCKER<sup>15</sup>) wurden natürliche Harnsteine aus Tricalciumphosphat bzw. Apatit mit sauren Lösungsmitteln (pH 2,0—4,6) behandelt.

Abb. 3 zeigt einen Harnstein aus Apatit (N 506) und einen Nierenausgußstein aus Struvit (N 552; Gewicht: 75 g), die für die Prüfung der sauren Lösungsmittel verwendet wurden.

In Abb. 4 ist die Abhängigkeit des Steingewichtes von der Reaktionszeit graphisch dargestellt (Tropfversuch). Eine sehr flache Kurve, d.h. geringe Auflösungsgeschwindigkeit liefert  $\frac{n}{1000}$  Salzsäure (pH 3). Eine bessere Wirkung zeigen  $\frac{n}{100}$  Salzsäure (pH 2) und ein Citrat-Salzsäure-Puffer (pH 3). Die mittleren Auflösungsgeschwindigkeiten betragen bei  $\frac{n}{1000}$  Salzsäure

ca. 1 mg/Std, bei  $\frac{n}{100}$  Salzsäure und Citratpuffer etwa 3 mg/Std. Bei St 90, das auf pH 3 eingestellt worden ist, wurde eine mittlere Auflösungsgeschwindigkeit von 7 mg/Std gemessen.

Die Auflösungskurven von Citratpuffer und St 90 mit pH-Werten von 4,6 laufen etwas flacher. Die Auflösungsgeschwindigkeit des Citrat-Salzsäure-Puffers ist von 3 auf 2 reduziert, der Wert für St 90 hat sich nur wenig verändert, und zwar von 7,0 auf 6,3 mg/Std.

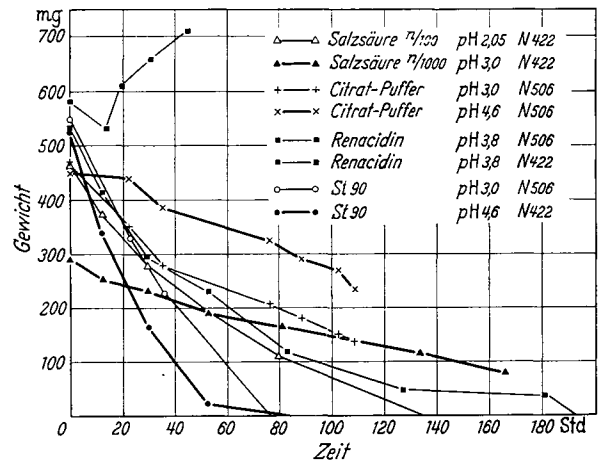


Abb. 4. Auflösung von Apatitsteinen im Tropfversuch: Abhängigkeit des Steingewichtes von der Reaktionszeit

- Renacidin zeigt zwei völlig verschiedene Effekte:
1. Apatitstein N 422
  2. Apatitstein N 506

Nach geringer Gewichtsabnahme Steinwachstum, das in zahlreichen Wiederholungsversuchen bestätigt werden konnte. Über nähere Einzelheiten wird an anderer Stelle berichtet (SÜCKER<sup>16</sup>).

*Auflösung von Struvit im Tropfversuch*

Magnesiumammoniumphosphat (Struvit) ist allgemein leichter löslich als Tricalciumphosphat (Abb. 5).  $\frac{n}{1000}$  Salzsäure liefert eine flache Auflösungskurve mit

einer Auflösungsgeschwindigkeit von 1 mg/Std analog der Auflösung von Apatit (Abb. 4).  $\frac{n}{100}$  Salzsäure (pH 2), Citrat-Puffer und St 90 zeigen Auflösungswirkungen, die alle Apatitwerte übertreffen, und zwar folgende mittlere Geschwindigkeiten: 4,5, 8 und 28 mg/Std. Auch die Lösungsmittel mit pH-Werten um 4 lassen relativ gute Auflösungszeiten erkennen. Die Auflösungsgeschwindigkeiten von Renacidin und St 90 bewegen sich zwischen 24 und 32 mg/Std. Diese Werte sind etwa das Zehnfache der bei Calciumoxalatsteinen mit ADTE-Lösungsstoffen beobachteten Geschwindigkeiten!

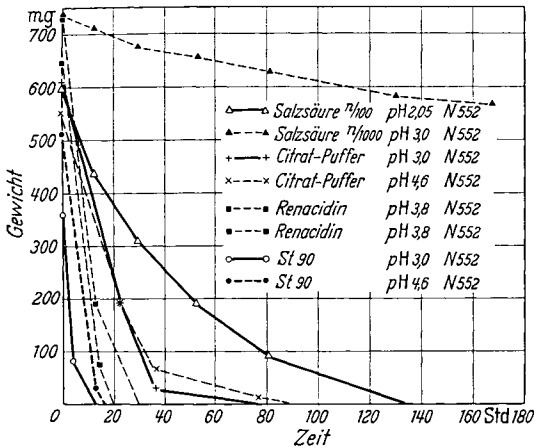


Abb. 5. Auflösung von Struvitsteinen im Tropfversuch: Abhängigkeit des Steingewichtes von der Reaktionszeit

Entsprechende Tropfversuche wurden auch mit Magnesiumhydrogenphosphatsteinen durchgeführt. Es resultierten Auflösungsgeschwindigkeiten, die etwa den beim Tricalciumphosphat erhaltenen Werten entsprechen.

Harnsteine aus Calciumhydrogenphosphat (Brushit) werden nur selten gefunden und sind verhältnismäßig leicht in Lösung zu bringen, so daß von einer speziellen Untersuchung abgesehen werden konnte.

Eine Übersicht der mittleren Auflösungsgeschwindigkeiten gibt die Tab. 1.

Tabelle 1. Mittlere Auflösungsgeschwindigkeit (mg/Std)

Lösungsstoff	pH	„Apatit“ Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Struvit Mg NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	Newberyit Mg H PO <sub>4</sub>
Salzsäure $\frac{n}{100}$	2,0	3,5	4,5	4,5
Salzsäure $\frac{n}{1000}$	3,0	1,2	1,0	1,3
Citrat-Puffer	3,0	3,0	7,9	7,0
Citrat-Puffer	4,6	2,0	6,2	7,0
Renacidin	3,8	2,8	24,5	4,4
Renacidin	3,8	Steinwachstum	32,2	—
St 90	3,0	7,0	27,7	8,2
St 90	4,6	6,3	31,8	6,0

#### Vergleich der Lösungsstoffe St 90 und P 48

Der schwach saure Lösungsstoff St 90 mit einem pH von 4,6 wurde unter gleichen Versuchsbedingungen mit dem schwach alkalischen Chemolyticum P 48 (5%ige wäßrige Lösung des Trinatriumsalzes der

Äthylendiamintetraessigsäure; pH 8) gemeinsam geprüft. Tabletten aus Tricalciumphosphat (Gewicht ca. 260 mg) wurden von beiden Substanzen mit Geschwindigkeiten zwischen 8 und 10 mg/Std gelöst, bei natürlichen Apatitsteinen resultierten Werte zwischen 5 und 8 mg/Std. Bei größeren Struvitsteinen (= 600 mg) wurden mit St 90 Geschwindigkeiten bis zu 38 mg/Std erreicht gegenüber 12–15 mg/Std bei P 48 (Tab. 2).

Tabelle 2. Mittlere Auflösungsgeschwindigkeit (mg/Std)

	St 90	P 48
	1,7% Mandelsäure 8% Ammoniumcitrat pH 4,6	5% Trinatriumsalz der Äthylendiamintetra- essigsäure (ADTE) pH 8,0
Tricalciumphosphat-tabletten	8 8 10 10	10 8
Apatitsteine N 505 N 506	8 5 5	8 5,5 6
Struvitsteine N 552	16 (243 mg) 38 (563 mg) 38 (570 mg)	12 (573 mg) 15 (560 mg)

#### Diskussion

Harnsteine aus Calcium- oder Magnesiumphosphat können in vitro sowohl durch alkalische Lösungen von Salzen der Äthylendiamintetraessigsäure (ADTE) als auch durch organische Säuren und ihre Salze aufgelöst werden. Die Wirksamkeit der sauren Chemolytica steigt mit zunehmender Konzentration der Wasserstoffionen und der Säurerestionen. Carbonsäuren und ihre Salze sind im pH-Bereich oberhalb 2 der Salzsäure überlegen. Die chemische Auflösung der tertiären Phosphate ist also nicht nur ein pH-Effekt, sondern beruht auch im sauren Milieu teilweise auf Komplexbildung am Kation (Calcium, Magnesium). Liganden sind die Anionen der Säuren bzw. ihrer Salze und Ammoniak (Amminkomplexe).

Die Auflösungsgeschwindigkeit ist weitgehend bedingt durch die chemisch-mineralogische Zusammensetzung eines Konkrementes. Während Struvitsteine (und die sehr seltenen Brushitsteine) relativ schnell aufgelöst werden können, verläuft die Chemolyse von Apatitharnsteinen allgemein langsamer. — Natürliche Apatitkristalle konnten mit keinem der beschriebenen Lösungsmittel aufgelöst werden.

Als optimales Chemolyticum mit einem schwach sauren pH von 4,6 wurde ein Gemisch aus Ammoniumcitrat und Mandelsäure (St 90) gefunden, das in bezug auf Apatitsteine dem ADTE-haltigen Lösungsmittel P 48 gleichwertig ist, Struvitkonkremente aber schneller auflöst.

Auf Grund der in vitro erhaltenen Ergebnisse lassen sich nachträglich Beobachtungen bei der klinischen Anwendung der Chemolyse erklären. Positive Auflösungsresultate mit der Subyschen Lösung G oder Renacidin lassen darauf schließen, daß Harnsteine aus Struvit vorlagen, während negative Erfahrungen — soweit sie nicht auf klinischen Komplikationen beruhen — auf die wesentlich geringere Löslichkeit von Apatitsteinen zurückgeführt werden können, falls es sich nicht um das nahezu unlösliche Calciumoxalat gehandelt hat.

Wenn aus klinischen und röntgenologischen Daten ein Harnstein mit großer Wahrscheinlichkeit als Phosphatkonkrement diagnostiziert werden kann, bietet sich die Möglichkeit einer Chemolyse mit schwach sauren Lösungsmitteln an. Da ein großer Teil der Rezidiv-, Ausguß- und Korallensteine aus Phosphaten und zum Teil aus Struvit aufgebaut ist, könnten die beobachteten guten Lösungseffekte — zehnfache Auflösungsgeschwindigkeit von Struvitsteinen in St 90 gegenüber der Chemolyse von Oxalatkonkrementen in ADTE-haltigen Lösungsmitteln — zu einer Verkürzung der Behandlungsdauer und zu einer breiteren Anwendung dieses Verfahrens führen. Für Oxalatsteine und alle Konkreme, deren Zusammensetzung nicht genügend sicher geschätzt werden kann, bleiben weiterhin die im schwach alkalischen Medium wirksamen Lösungsmittel auf der Basis des Chelatkomplexbildners Äthylendiamintetraessigsäure die zur Zeit wirksamsten Chemolytika.

#### *Zusammenfassung*

Es wird berichtet über die Prüfung von Säuren und Salzen in bezug auf ihr Lösungsvermögen für verschiedene Phosphate. Einen optimalen Effekt zeigt ein

Gemisch aus Ammoniumcitrat und Mandelsäure. Wegen der guten Auflösungserfolge werden saure Lösungsmittel besonders für die Chemolyse von Struvitsteinen empfohlen.

**Literatur.** <sup>1</sup> ABESHOUSE, B. S., and T. WEINBERG: J. Urol. (Baltimore) **65**, 316 (1951). — <sup>2</sup> ALBRIGHT, F., H. W. SULKOWITZ, and R. CHUTE: J. Amer. med. Ass. **113**, 2049 (1939). — <sup>3</sup> BROSIG, W., H. KLOSTERHALFEN u. F. KAUFMANN: Z. Urol. **5**, 245 (1961). — <sup>4</sup> ELLIOT, J. S., R. F. SHARP, and L. LEWIS: J. Urol. (Baltimore) **81**, 339 (1959). — <sup>5</sup> GEHRES, R. F., and S. RAYMOND: J. Urol. (Baltimore) **65**, 474 (1951). — <sup>6</sup> KALLISTRATOS, G.: Urologe **2**, 236 (1963). — <sup>7</sup> LANDECKER, H. M., I. SÜCKER u. A. TIMMERMANN: Urologe **1**, 205 (1962). — <sup>8</sup> MARTELL, A. E., u. M. CALVIN: Die Chemie der Metallchelateverbindungen. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1958. — <sup>9</sup> MEYER, J.: Zbl. Chir. **26**, 348 (1929). — <sup>10</sup> MULVANEY, W. P.: J. Urol. (Baltimore) **82**, 546 (1959); **84**, 206 (1960). — <sup>11</sup> SCHWARZENBACH, G.: Die komplexometrische Titration. Stuttgart: Enke 1960. — <sup>12</sup> STAEHLER, W.: Med. Welt **20**, 1129 (1952). — <sup>13</sup> SUBY, H. I.: J. Urol. (Baltimore) **68**, 96 (1952). — <sup>14</sup> SUBY, H. I., and F. ALBRIGHT: New Engl. J. Med. **228**, 81 (1943). — <sup>15</sup> SÜCKER, I.: Urologe **2**, 229 (1963). — <sup>16</sup> SÜCKER, I.: Urologe **3**, 218 (1964). — <sup>17</sup> TIMMERMANN, A.: Urologe **2**, 243 (1963).

*Anschrift:* Dr. I. SÜCKER,  
Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung,  
Abteilung Experimentelle Urologie,  
2 Hamburg-Volksdorf, Waldredder 4