

尿液 pH 变化与尿液中纳米微晶组分的关系

许小晶, 万牡华, 欧阳健明*

暨南大学生物矿化与结石病防治研究所, 广东 广州 510632

摘要 采用 X 射线衍射 (XRD) 和傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 研究了尿液 pH 变化与尿液中纳米微晶组分的关系。不但尿 pH 差异大的不同人尿液中微晶组分存在差异, 而且同一人的尿 pH 发生变化时, 其尿微晶亦发生变化。尿 pH 值较低 (如 $\text{pH} < 5.8$) 时, 主要为尿酸、酸式磷酸盐和草酸钙等; 尿 pH 值较高 (如 $\text{pH} > 6.2$) 时, 主要为尿酸盐、磷酸盐、磷酸铵镁和草酸钙等。联合运用 XRD 和 FTIR 两种方法, 可以更好地检测尿液中晶体组分, 有助于了解尿结石的成因。

关键词 尿液微晶; 尿 pH; X 射线衍射; 傅里叶转换红外光谱

中图分类号: O433.5 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)01-0273-04

引言

泌尿系结石是一种世界范围的常见病和多发病, 目前对其预防还没有十分有效的方法, 结石形成的机理也尚未研究清楚^[1,2]。泌尿系结石由有机基质和晶体矿物质两类物质组成, 其中晶体成分占绝大部分。研究表明, 尿液中常见的无机盐有草酸钙、磷酸钙、磷酸铵镁、尿酸及其盐等^[3]。但尿液是否有晶体析出? 析出什么组分的晶体? 即是否形成尿路结石? 形成什么性质的尿路结石? 均取决于上述物质在尿液中的浓度、饱和度及尿液的酸碱度 (pH 值) 和温度等。

利用现代仪器分析方法定性、定量地分析尿液中晶体的组分, 探讨尿液晶体的成分特征, 有助于追溯尿石形成的原因, 为临床上寻找科学的预防措施、选择合理的治疗方案提供重要的依据。方法主要有 X 射线衍射 (XRD)、傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、拉曼光谱、核磁共振、高效液相色谱^[4] 等。如在六水磷酸氨镁 (鸟粪石) 的 FTIR 光谱中, 在 $1\ 010\ \text{cm}^{-1}$ 位置处有一强吸收谱带, 在 $2\ 370, 760, 572\ \text{cm}^{-1}$ 处有较弱的特征吸收峰, 根据这些峰很容易把鸟粪石从其他组分中区别出来^[5]。利用 XRD 可以容易地区分草酸钙及其水合物、尿酸及其盐以及各种磷酸盐^[6,7]。

尽管正常人体内 pH 值在 7.3 左右, 但尿液 pH 值的变化范围可在 4.6 ~ 8.0, 跨越弱酸性、中性和弱碱性, 尿 pH 值的变化会影响尿液中存在的酸式盐和碱式盐等组分, 进而影响尿石形成和尿石组分。本文采用 XRD 和 FTIR 方法研究了尿晶体随尿液 pH 的变化。

1 实验部分

1.1 试剂

无水乙醇, 叠氮化钠和溴化钾均为分析纯, 所有玻璃器皿均用二次蒸馏水清洗干净, 尿样为没有结石病史的正常人的新鲜晨尿。

1.2 仪器

XD2-型 X 射线粉末衍射仪 (XRD) (北京大学); 傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) (Bruker 公司); PHS-3C 型酸度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 样品处理及表征

收集没有结石病史的健康人的新鲜晨尿, 测定其 pH 值; 取其 $10\ \text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 2% () 的叠氮化钠溶液防腐; 再加入无水乙醇, 其量为 $V(\text{尿液}) : V(\text{无水乙醇}) = 3 : 2$, 搅拌均匀, 静置 30 min, 使尿液中的蛋白质变性、沉淀。将上层清液用 $1.2\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 除去细胞碎片和变性蛋白质沉淀。将滤液滴在洁净玻璃片上, 置于无尘恒温烘箱内, 温度控制在 (50 ± 5) 左右, 让尿液挥发, 对留下的尿液微晶分别进行 XRD 和 FTIR 表征。

XRD 的测试条件, Cu 靶 K_{α} 辐射, 36 kV, 24 mA, 石墨弯晶单色器, 狭缝: DS 1° , RS $0.15\ \text{mm}$, SS 1° ; 扫描速度为 $8\ \text{min}^{-1}$, 扫描范围 (2θ) 为 $5 \sim 60^{\circ}$ 。FTIR 的测试条件, 将一定量样品与充分干燥的固定量纯 KBr 混合, 在玛瑙研钵内研成粉末, 用压模机制成半透明片, 迅速置于红外光谱槽中扫描, 扫描范围为 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 分辨率为 $0.5\ \text{cm}^{-1}$ 。

收稿日期: 2007-09-09, 修订日期: 2007-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30672103), 广东省科技攻关项目 (2005B30701003) 和广州市重点科技项目 (2001-Z-123-01) 资助

作者简介: 许小晶, 女, 1983 年生, 暨南大学生物矿化与结石病防治研究所研究生 * 通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 尿 pH 变化对尿液中磷酸盐组分的影响

采用 XRD 和 FTIR 研究了两位正常人 (A 和 B) 在不同日期的尿 pH 变化及其对尿液微晶组分的影响。其 XRD 谱

如图 1 所示, 对图 1 各峰进行分析归属, 其结果见表 1。可以看出, 正常人 A 尿 pH 值在 5.32 ~ 5.86 之间, 幅度变化 0.54。在 pH 5.32 时, XRD 检测到二水草酸钙 (COD) 和少量五水磷酸八钙 [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$] 的存在; 但 pH 增加到 5.74 和 5.86 时, XRD 则检测到水合磷酸氨镁 ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) 和磷酸钙 [$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] 晶体。

Table 1 Urinary pH values of healthy persons in various times and the composition of urinary nanoparticles determined by XRD and FTIR

NO	pH	归属物质	d 值(对应晶面)	FTIR 吸收峰/ cm^{-1}	ASTM 卡号
A1	5.32	COD	2.81(222), 1.99(323), 1.62(730)		17-541
		$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.22(320)		44-0778
A2	5.64	COD	2.81(222), 1.99(323)	1 625	17-541
		COM		780, 520	
		尿酸		1 440, 1 408	
		PO_4^{3-}		1 120 ~ 940	
		HPO_4^{2-}		1 410 ~ 1 200, 1 150 ~ 1 040	
A3	5.74	COD	2.81(222), 1.99(323)	3 430, 1 625	17-541
		$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	3.91(202)	1 120 ~ 940	29-359
		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.77	1 120 ~ 940, 1 400	20-0663
		COM		780, 520	
		尿酸		1 440, 1 408	
A4	5.32	COD	2.81(222), 1.99(323)		17-541
		$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4.09(003), 2.90(034)		29-359
		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.77, 2.80		20-663
		COD	2.81(222), 1.99(323), 2.21(422)		17-541
		$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4.17(022), 2.90(034), 2.27(511)	1 120 ~ 940	29-359
B1	7.27	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.24, 2.03	1 120 ~ 940	20-664
		COD, COM		1 625, 780, 520	
		尿酸钠		2 925, 1 384, 1 345, 1 275	
		COD	2.81(222), 1.99(323)		17-541
		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.77, 3.23		20-663
B4	6.35	COD	2.81(222), 1.99(323)		17-541
		$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	3.12(242)		9-348
B5	6.51	COD	2.81(222), 1.99(323)	1 625	17-541
		$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.23, 2.80, 1.62	1 120 ~ 940	20-663
		COM		780, 520	
		尿酸钠		2 925, 1 384, 1 345, 1 275	

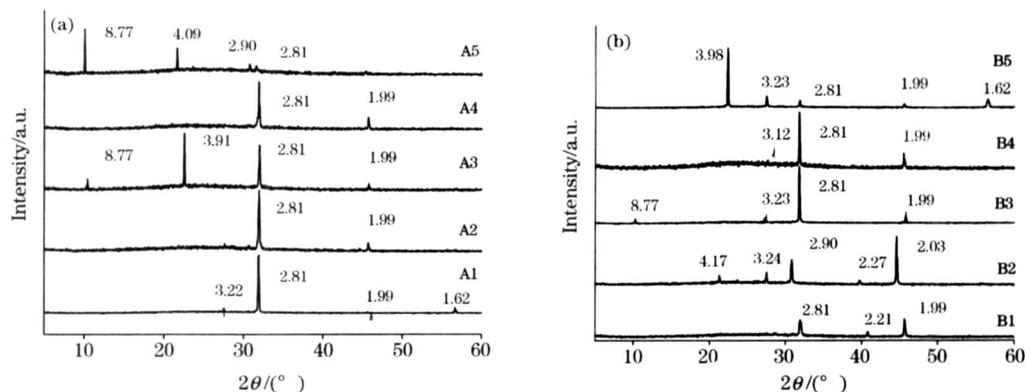
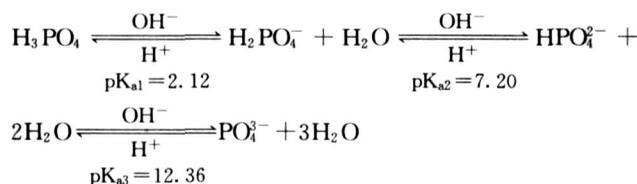


Fig 1 XRD spectra of urinary nanocrystals in urines with different urinary pH

(a) : Person A ; (b) : Person B

正常人 B 尿液 pH 值比 A 尿较高, 在 5.44 ~ 7.27 之间, pH 值变化幅度为 1.83。XRD 图谱只检测到水合磷酸氢镁 ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ($n=1, 4$) 和磷酸钙 [$-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] 晶体。

FTIR(图 2)检测发现, 正常人在 pH 值为 5.64 (A2) 和 5.74 (A3) 时, 尿液中既检测到了磷酸根离子 (PO_4^{3-} , $1120 \sim 940 \text{ cm}^{-1}$)^[8,9], 也检测到磷酸氢根离子 (HPO_4^{2-} , $1410 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$, $1150 \sim 1040 \text{ cm}^{-1}$); 而 pH 值为 7.27 的 B2 号尿液中只检测到 PO_4^{3-} 离子, 没有 HPO_4^{2-} 离子。这说明在 pH 值较低时, 磷酸盐晶体多以酸式磷酸盐[主要为 HPO_4^{2-}]形式存在; 而在 pH 较高时, 则多以磷酸盐 (PO_4^{3-}) 形式存在。这是由于 pH 值影响磷酸根的水解平衡:



当 pH 值降低时, 平衡向左移动, pH 值升高时, 平衡向右移动。因此, 不同 pH 值条件下, 晶体存在的形式不同。

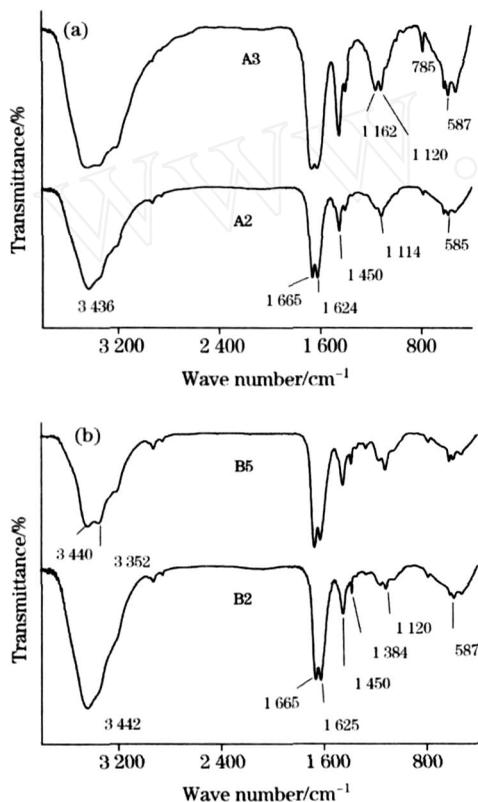


Fig 2 FTIR spectra of urinary nanoparticles in urines with different urinary pH

(a): Person A; (b): Person B

本文研究结果与 Murayama 等^[10,11]的结果一致。Murayama 等在研究结石病人的结石组分与尿 pH 昼夜变化的关系时发现, 草酸钙 (CaOxa) 结石和草酸钙-磷酸钙 (CaOxa-CaP) 混合结石病人的尿 pH 在全天都很高 (pH 5.6 ~ 6.3), 表明

磷酸钙结石在碱性尿液中形成, 且 pH 升高时, 形成的 CaP 晶体更多。

2.2 尿 pH 变化对尿液中尿酸存在形式的影响

从图 2 可知, 在 A2, A3, B2 和 B5 四个尿样中, 均检测到结晶水 ($3600 \sim 3000$, $1670 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$), COM 和 COD 混合物 (1625 , 780 , 520 cm^{-1}), PO_4^{3-} ($1120 \sim 940 \text{ cm}^{-1}$) 的特征吸收峰^[8,9], A2 和 A3 样品中还检测到 1440 和 1408 cm^{-1} 处尿酸的特征吸收峰; 而 B2 和 B5 样品中没有检测到尿酸的特征峰, 但检测到尿酸钠的特征吸收峰 (2925 , 1384 , 1345 和 1275 cm^{-1})。这是因为尿酸在 37 °C 时的 $\text{pK}_a=5.35$ ^[12]。当 $\text{pH} < 5.5$ 时, 所有正常人尿中的尿酸都呈过饱和状态, 此时会有部分尿酸从尿液中析出; 当尿液 $\text{pH} < 5.0$ 时, 尿酸的溶解度显著减小, 析出大量纯尿酸; 而在生理 $\text{pH} 7.3$ 时, 绝大多数尿酸以尿酸钠的形式存在。当尿液 pH 由 5.0 增加到 7.0 时, 尿酸的溶解度可以增加 10 倍^[13,14]。由于 A2 和 A3 号尿 pH 分别为 5.64 和 5.74, 稍高于尿酸在 37 °C 时的 pK_a , 大部分尿酸以酸的形式存在, 故 FTIR 检测到了尿酸; 而 B2 和 B5 号尿液的尿 pH 较高, 分别为 7.27 和 6.51, 尿酸转变为尿酸盐的形式存在, 因此没有检测到尿酸, 而检测到尿酸钠。

Maalouf 等^[15]研究了正常人和尿酸结石病人一天内 pH 变化(图 3), 发现虽然非尿石患者体内也间歇地产生尿酸, 但其一天的尿 pH 范围变化大, 在 4.8 ~ 7 之间, 尿液的周期性碱化可以充分保护他们免受尿酸结石的痛苦。而尿酸结石患者的尿 pH 则保持在比较低的水平 (4.8 ~ 5.5), 因而易形成尿酸结石。Murayama 等^[10,11]在研究结石病人的结石成分和尿 pH 的昼夜变化的关系时亦发现尿酸结石病人的尿 pH 一直很低, 尿酸结石在酸性尿液中形成。

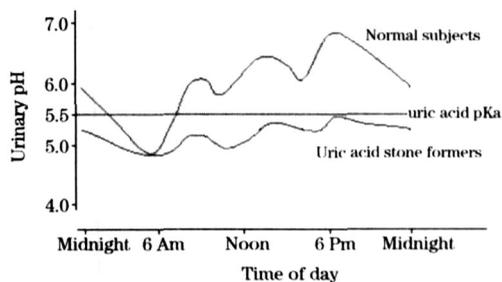


Fig 3 Diurnal variation in urinary pH of normal subjects and uric acid stone formers^[15]

尿石的主要组分是草酸钙, 但本实验中检测到的尿微晶组分主要是磷酸盐和尿酸。这可能与它们在水中的溶解度有关。COM 在 100 g 水中只能溶解 0.0006 g, 而 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 NH_4MgPO_4 的溶解度分别为 0.03 和 29 $\text{g}^{[16]}$, 分别是 COM 的 50 和 48462 倍。由于这些磷酸盐的溶解度比 COM 大得多, 因此尿液中含有较多的磷酸盐, 而 COM 大都已经沉积, 存在于尿液中的较少, 因此难以被 XRD 检测到。

3 结论

联合运用 XRD 和 FTIR 光谱研究了两位正常人晨尿的

pH 变化及其对尿液中晶体组分的影响。结果发现: (1) 正常人尿 pH 存在较大差异, 从 pH 5.3 到 7.3 不等。(2) 尿液中晶体组分, 特别是磷酸盐和尿酸的存在形式受 pH 影响较大。在 pH 较低 (pH < 5.74) 的尿液中主要存在磷酸氢盐和尿酸晶体, 当 pH > 6.35 时主要存在磷酸盐和尿酸盐晶体; 草酸钙晶体无论在高尿 pH 还是低尿 pH 的尿液中都存在。因此, 尿石症患者应尽量根据结石类型注意调节饮食。由于体

内主要进食蛋白质食物后, 尿偏向酸性; 主要进食蔬菜时, 尿液常在 pH 6.0 以上, 这提示尿酸结石病人应多进食蔬菜类碱性食物, 磷酸氨镁结石病人应多进食蛋白质类酸性食物。(3) 联合运用 XRD 和 FTIR 两种检测方法可以较好地检测尿液成分。本实验结果有助于临床上提示尿石症患者根据其尿石组分调节饮食和对症下药。

参 考 文 献

- [1] Sheng X X, Ward M D, Wesson J A. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125: 2854.
- [2] DENG Sui-ping, CHEN De-zhi, OU YANG Jian-ming (邓穗平, 陈德志, 欧阳健明). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 761.
- [3] QI Qi-xue, CHEN Yan, LI Ying-xu (戚其学, 陈燕, 李迎旭). Atlas of Urinary Sediment (实用尿沉渣图谱). Shenyang: Shenyang Press (沈阳: 沈阳出版社), 2001. 24.
- [4] Safranow K, Machoy Z, Ciechanowski K. Analytical Biochemistry, 2000, 286: 224.
- [5] Carmona P, Bellanato J, Escolar E. Biospectroscopy, 1997, 3: 331.
- [6] OU YANG Jian-ming (欧阳健明). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 391.
- [7] DENG Fang, OU YANG Jian-ming (邓芳, 欧阳健明). J. Instrumental Analysis (分析测试学报), 2006, 25(4): 16.
- [8] CHEN Yun-kui (陈允魁). Infrared Spectra and Application (红外吸收光谱法及其应用). Shanghai: Shanghai Jiaotong University Press (上海: 上海交通大学出版社), 1993.
- [9] Moawad M M. J. Coord Chem., 2002, 50(1): 61.
- [10] Murayama T, Taguchi H. J. Urol., 1993, 150(5): 1437.
- [11] Murayama T, Sakai N, Yamada T, et al. International Journal of Urology, 2001, 8: 525.
- [12] OU YANG Jian-ming, ZHENG Hui (欧阳健明, 郑辉). Chinese Chemistry Bulletin (化学通报), 2006, 69(5): 382.
- [13] Nicar M J, Hsu M C, Johnson T, et al. Laboratory Medicine, 1987, 18(6): 382.
- [14] Königsberge E, Wang Z H. Monatshefte Fur Chemie, 1999, 130(9): 1067.
- [15] Maalouf N M, Cameron M A, Moe O W, et al. Current Opinon in Nephrology and Hypertension, 2004, 13(2): 181.
- [16] LIU Guang-qi, MA Lian-xiang, LIU Jie (刘光启, 马连湘, 刘杰). Handbook of Physical Properties of Chemistry & Chemical Engineering (化学化工物性数据手册). Beijing: Chemical Industrial Press (北京: 化学工业出版社), 2002.

Effect of Urinary pH Value on the Composition of Urinary Nanocrystals

XU Xiao-ying, WAN Mu-hua, OU YANG Jian-ming*

Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract The effect of urinary pH value on the composition of urinary nanocrystals was investigated by X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The differentiation of composition of urinary nanocrystals not only occurred between the people with different urinary pH, but also occurred in the same person when his or her urinary pH changed. At lower urinary pH (such as pH < 5.8), most of the urinary components are uric acid, acidic phosphate, calcium oxalate etc. However, most of these components are urate, phosphate, magnesium ammonium phosphate, calcium oxalate etc at higher urinary pH (such as pH > 6.2). Combining XRD and FTIR methods, the compositions of urinary nanocrystals can be determined accurately. It is helpful to exploring the cause of urinary stones.

Keywords Urinary naocrystals; pH; X-ray diffraction; Fourier transform infrared spectroscopy

(Received Sep. 9, 2007; accepted Dec. 16, 2007)

*Corresponding author