

二元羧酸的化学结构与其抑制草酸钙结晶能力研究

邓穗平, 胡 鹏, 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)、傅里叶红外光谱(FTIR)和扫描电镜(SEM)研究了相距 3 个 C—C 键长具有不同取代基的二元羧酸对草酸钙(CaOxa)晶体生长的影响。这些二元酸包括丁二酸、顺丁二烯酸、反丁二烯酸、苹果酸、天冬氨酸和酒石酸。它们均能抑制一水草酸钙(COM)晶体的聚集,减小 COM 比表面积,并诱导二水草酸钙(COD)生成,其能力随二元酸上取代的—OH 或—NH₂ 基数量增加而增强。从二元羧酸化学结构讨论了其影响草酸钙结晶效果的分子机理,对 COM 生长具有最佳抑制效果的羧酸是含有 HOOC—CH(R)—CH₂—COOH(R=OH 或 NH₂)分子的化合物。实验结果可为临床上寻找新的防石药物提供参考。

关键词 XRD; FTIR; 草酸钙; 二元羧酸

中图分类号: O611.2; TQ115; R6 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)10-1981-04

引 言

作为异常生物矿化产物之一的泌尿系统结石,其主要组分为草酸钙(CaOxa),约占 70%^[1,2]。目前临床上预防尿石症主要选用枸橼酸系列药物,如枸橼酸合剂,枸橼酸钾和枸橼酸钠等。由于酒石酸的分子结构与枸橼酸类似,均属多羟基有机酸,因此酒石酸及其钠、钾、镁盐的防石效果被重新认识^[3]。文献[3,4]中研究了不同模拟体系中一元、二元、三元和四元羧酸及其钾、钠盐对 CaOxa 晶体生长的调控作用,表明二元、三元和四元羧酸,尤其是相距 3 个 C—C 键长的多元羧酸,可以抑制 CaOxa 的生长,并诱导与尿路细胞膜粘附力较弱的二水草酸钙(COD)和三水草酸钙(COT)形成。为了进一步探讨羧酸的分子结构与其防止 CaOxa 结晶形成的内在关系,了解羧酸及其取代基影响防石效果的分子机理,为临床上寻找新药提供参考,本文研究了不同结构的相距 3 个 C—C 键长的丁二酸系列羧酸对 CaOxa 晶体生长的调控作用,这些二元酸包括不含取代基的丁二酸、顺丁二烯酸和反丁二烯酸,含 1 个羟基的苹果酸(2-羟基丁二酸),含有 1 个氨基的 L-天冬氨酸(2-氨基丁二酸)和含 2 个羟基的酒石酸(2,3-二羟基丁二酸)。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

所有试剂均为分析纯,二次蒸馏水。日本理学 D/max 2400(Rigaku)X 射线粉末衍射仪;Bruker IFS25 型傅里叶变换红外光谱仪(Bruker Spectrospin, Wissembourg, France);XL-30 型环境扫描电子显微镜(ESEM)(Philips 公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);XTB-1 型体式显微镜(江南光电仪器有限公司);PSH 500A 生化培养箱(重庆试验设备厂)。

1.2 实验方法

凝胶中草酸钙晶体生长实验参照文献[4]进行。最终浓度氯化钙为 0.5 mol·L⁻¹,草酸为 0.2 mol·L⁻¹,羧酸添加剂 0.2 mol·L⁻¹。晶体生长 10 d。用 XRD 作定量分析时,根据 *K* 值法^[5]计算晶体中 COM 和 COD 的相对质量比: $\frac{W_M}{W_D} = K \times \frac{I_M}{I_D}$,式中 *I_M* 为 COM 主吸收峰(020)晶面(*d* 值 0.365 nm)的强度, *I_D* 为 COD 主吸收峰(411)晶面(*d* 值 0.278 nm)的强度, *K* 为常数。

2 结 果

2.1 二元酸抑制草酸钙晶体生长的 SEM 观察

图 1 为在凝胶体系中加入不同结构的二元羧酸后得到的 CaOxa 晶体的 SEM。二元羧酸的分子结构差异和丁二酸上的取代基不同均影响 CaOxa 的晶相、形貌和尺寸。加入不含

收稿日期: 2006-06-06, 修订日期: 2006-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20471024)和国家自然科学基金重点项目(20031010)资助

作者简介: 邓穗平, 1979 年生, 暨南大学生物矿化与结石病防治研究所博士研究生 通讯联系人 e-mail: toyjm@jnu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

—OH 基的丁二酸图 1(b)、顺丁烯二酸图 1(c) 或反丁烯二酸 (图 1d) 后, 得到的 CaOxa 晶体中 90% 为一水草酸钙 (COM) 晶体, 包括蔷薇花状的聚集体、叉生状和六边形 COM 晶体。与空白实验 (以 NaCl 取代羧酸添加剂) 相比图 1(a), 这些二元酸仍然能够明显减小 COM 晶体的聚集和尺寸, 并诱导少量 COD 晶体形成。当丁二酸 CH_2 上的一个 H 被 —OH 或 — NH_2 基取代后, 得到苹果酸和天冬氨酸。苹果酸和天冬氨酸的加入能显著抑制蔷薇花状 COM 聚集物的数量, 使 COM 晶体的棱角逐渐变得圆钝, 并诱导较多的 COD 晶体形成图 1(e, f)。加入含 2 个 —OH 基的酒石酸图 1(g) 后, 不但 COM 聚集体的数量显著减少, 六边形 COM 的棱角消失, 而且 COD 的百分含量进一步增加。说明随着丁二酸上取代的 —OH 或 — NH_2 基数量增加, 草酸钙的聚集程度降低, 边角圆钝, 即 COM 晶体的比表面积减小, 这可以显著减小 COM 晶体与细胞膜的粘附, 有利于防止草酸钙结石的形成。

比较加入不同二元酸后 COM 晶体的尺寸大小可以看出, 含有 2 个 —OH 基的酒石酸最能使 COM 晶体的尺寸减小, 表明其抑制 COM 生长的能力最强; 其次是含有 1 个 —OH 或 — NH_2 基的苹果酸和天冬氨酸。二元羧酸抑制 COM 生长和聚集、诱导 COD 形成的能力依次为:

酒石酸 > 苹果酸 ~ 天冬氨酸 > 顺丁烯二酸 ~ 丁二酸 > 反丁烯二酸 > 空白。

2.2 二元酸抑制草酸钙晶体生长的 XRD 观察

图 2 为部分二元羧酸影响草酸钙晶相的 XRD 谱。在空白实验或加入反丁烯二酸后 (图 2a) 得到的产物中, 只出现 COM 的衍射峰, 没有出现 COD 的特征峰。COM 主衍射峰晶面间距 d 值分别为 0.593, 0.365 和 0.298 nm, 归属于 COM 晶体的 (101), (020) 和 (202) 晶面^[6]。在加入酒石酸、苹果酸、天冬氨酸、顺丁烯二酸和丁二酸后, 同时出现了 COM 和 COD 晶体的特征衍射峰, COD 的特征峰出现在 0.618, 0.442, 0.278, 0.241 和 0.224 nm, 分别归属于 COD 的 (200), (211), (411), (103) 和 (413) 晶面。定量计算表明, 加入丁二酸、顺丁烯二酸、苹果酸、天冬氨酸和酒石酸后, COD 的百分含量分别为 9%, 9%, 20%, 25% 和 30%。

SEM 结果图 1(d) 显示, 加入反丁烯二酸后存在约 4% 的 COD 晶体, 但在其 XRD 谱 (图 2a) 中没有出现 COD 的特征峰, 可能与 COD 含量很小 (< 5%), 而 XRD 谱基线较高, 或者在研磨时, COD 被转化为 COM 等因素有关。

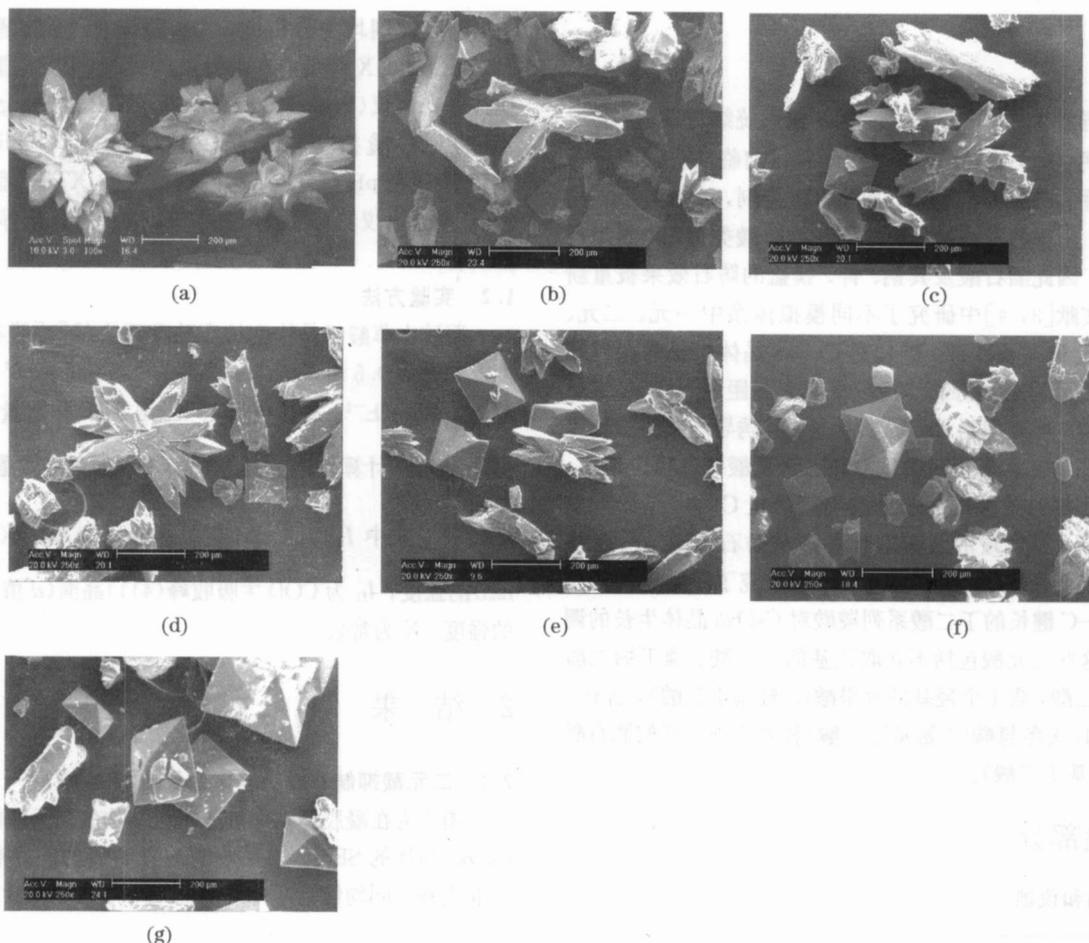


Fig 1 SEM images of CaOxa crystals in gel after addition of various dicarboxylic acids

(a): No additive; (b): Succinic acid; (c): Maleic acid; (d): Fumaric acid; (e): DL-malic acid; (f): L-aspartic acid; (g): Tartaric acid

2.3 二元酸抑制草酸钙晶体生长的 FTIR 观察

表 1 为加入不同二元羧酸后 CaOxa 晶体的 FTIR 光谱数据, 代表性的红外光谱见图 3。在空白实验中, CaOxa 晶体中羧基的反对称伸缩振动 $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 吸收峰为 $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$, 羧基与 Ca 的伸缩振动带 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 为 $1\ 318\ \text{cm}^{-1}$ 。在指纹区内, 分别在 $948, 884$ 和 $667\ \text{cm}^{-1}$ 出现 3 个吸收峰, 这些峰的位置与文献[7, 8]报道的 COM 晶体的吸收峰吻合, 表明得到的草酸钙为 COM 晶体。

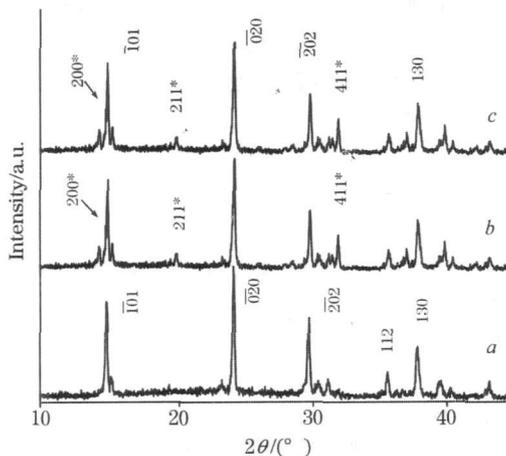


Fig 2 XRD patterns of CaOxa crystals in gel after addition of different dicarboxylic acids

a: Fumaric acid; b: L-aspartic acid; c: Tartaric acid

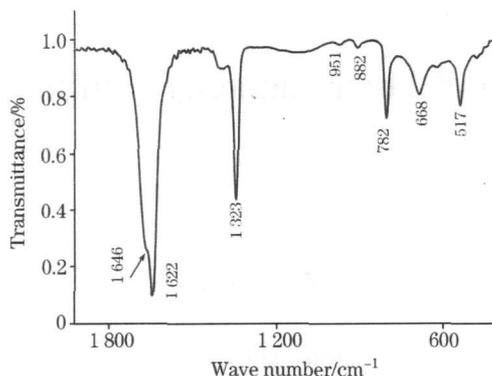


Fig 3 FTIR spectra of CaOxa crystals in gel after addition of L-aspartic acid

Table 1 FTIR data of CaOxa crystals grown in the presence of different structure dicarboxylic acids

Additive	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$ / cm^{-1}	$\nu_s(\text{COO}^-)$ / cm^{-1}	Finger print/ cm^{-1}		
No additive	1 618	1 318	948	884	667
Succinic acid	1 620	1 320	948	884	662
Maleic acid	1 620	1 319	949	883	668
Fumaric acid	1 619	1 321	948	886	664
DL-malic acid	1 621	1 321	950	883	665
L-aspartic acid	1 646, 1 622	1 322	951	882	668
Tartaric acid	1 646, 1 622	1 323	948	884	665
Pure COM	1 618	1 318	948	884	667
Pure COD	1 647	1 327	914	615	

添加了不同结构的二元羧酸后, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 均出现不同程度的蓝移(表 1)。由于 COD 晶体的 $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 分别出现在 $1\ 327$ 和 $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$, 因此, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 的蓝移表明 CaOxa 晶体中 COD 百分含量的增加, 与上面 SEM 和 XRD 的检测结果一致。

3 讨论

在没有加入添加物的空白实验中, 不但没有 COD 晶体存在, 而且 COM 的聚集程度很高。含有 2 个羧基的丁二酸、顺丁烯二酸和反丁烯二酸即可诱导少量 ($< 10\%$) COD 晶体形成, 并对 COM 的聚集产生抑制作用。但丁二酸和顺丁烯二酸可诱导约 9% 的 COD 晶体, 而反丁烯二酸则只诱导约 4% 的 COD。这可能与反丁烯二酸不能与凝胶中 Ca^{2+} 离子配位生成螯合物有关, 而顺丁烯二酸和丁二酸可以与 Ca^{2+} 离子生成螯合物。

随着丁二酸上取代的 $-\text{OH}$ 基或 $-\text{NH}_2$ 基数量增加, 不但 COM 晶体的棱角变得圆钝, 而且其诱导 COD 晶体的能力加强, 如含有 1 个和 2 个取代 $-\text{OH}$ 的苹果酸和酒石酸可分别诱导 20% 和 30% 的 COD 形成。这是因为, CaOxa 晶体的生长是一个动态过程, 这个动态过程中, 添加物与 Ca^{2+} 离子之间存在络合-离解平衡, CaOxa 晶面上的 Ca^{2+} 离子(尤其是在晶体周边的 Ca^{2+} 离子)不断被添加物所溶解, 溶解后的 Ca^{2+} 离子同时也不断地沉积到 CaOxa 晶面上, 这种溶解-沉积作用使得 CaOxa 晶体棱角变得圆钝。

在二元羧酸存在下, 草酸钙在结晶过程中同时存在如下 2 个平衡。



因此, 羧酸与 Ca^{2+} 的配位能力决定草酸钙的成核、生长和聚集。由于丁二酸与 Ca^{2+} 形成配合物的稳定常数 ($K = 10^{4.3}$) 远远小于草酸钙的稳定常数 ($K = 10^{3.0}$)^[7], 因此丁二酸对凝胶中 CaOxa 晶体生长的影响相对较小。

在丁二酸的 2 号 C 上引入一个给电子官能团 $-\text{OH}$ (变为苹果酸), 羧基的配位能力增强, 与 Ca^{2+} 配合物的稳定常数 ($K = 10^{2.0}$)^[7] 大于丁二酸, 促使 CaOxa 晶体棱角发生改变。

Ca^{2+} 离子可以与具有 2 个 $-\text{OH}$ 取代基的酒石酸 (H_2tart) 络合形成带 1 个五元环的螯合物, 也可以进一步与第 2 个 H_2tart 形成双配体螯合物 [$\text{Ca}(\text{tart})_2^{2-}$], 其一、二级累积形成常数分别为 $10^{2.93}$ 和 $10^{9.01}$, 所以含两个羟基的酒石酸对草酸钙的抑制能力最强。

含不同羟基的丁二酸系列对 CaOxa 晶体生长的抑制作用, 还在于其可以封闭 CaOxa 生长的活性位点, 加强其抑制活性。CaOxa 的最常见形式是其一水合物 COM, COM 的 (101) 面由被 H_2O 和 Oxa^{2-} 链分开的互相啮合的钙链组成。Cody 等^[8] 研究表明, 间距为 3 个 C—C 键长度的线性多元羧酸分子其相邻羧基官能团与 COM 晶格中 (101) 晶面的 Ca—Ca 间距最为适配, 具有强的抑制 COM 生长的能力。本

实验结果表明, 对 COM 生长具有最佳抑制效果的羧酸是含有 $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 基团或 $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 分子的化合物。因此, 苹果酸、天冬氨酸和酒石酸抑制 COM 晶体生长和诱导 COD 形成的能力比丁二酸、顺丁烯二酸和反丁烯二酸的大。

4 结 论

采用 XRD, FTIR 和 SEM 研究了不同结构的丁二酸系列羧酸对 CaOx_a 晶体生长的影响, 包括不含取代基的丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸, 含 1 个 $-\text{OH}$ 基的苹果酸, 含 1 个 $-\text{NH}_2$ 基的天冬氨酸, 含 2 个 $-\text{OH}$ 基的酒石酸。所有

二元羧酸均能抑制 COM 晶体的聚集和生长。二元羧酸抑制 COM 生长和聚集、诱导 COD 形成的能力依次为: 酒石酸 > 苹果酸 ~ 天冬氨酸 > 顺丁烯二酸 ~ 丁二酸 > 反丁烯二酸 > 空白。即对 COM 生长具有最佳抑制效果的羧酸是含有 $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ($\text{R}=\text{OH}$ 或 NH_2) 分子的化合物, 可以对草酸钙结晶产生 3 个明显的影响: (1) 使 COM 和 COD 晶体的尺寸减小; (2) COM 晶体的棱角变得圆钝, 表明其比表面积明显减小, 这可以显著减小 COM 晶体与细胞膜的粘附, 有利于防止草酸钙结石的形成; (3) 诱导 COD 含量增加。本结果可为临床上寻找新的防石药物和对目前临床上使用的羧酸类防石药物作适当修饰提供参考。

参 考 文 献

- [1] Sheng X X, Jung T S, Wesson J A, et al. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America(PNAS), 2005, 102 (2): 267.
- [2] OUYANG Jian-ming(欧阳健明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 391.
- [3] Ouyang J M, Deng S P, Zhou N, et al. Coll. Surf. A, 2005, 256(1): 21.
- [4] Ouyang J M, Deng S P, Li X P, et al. Science in China, Ser. B, 2004, 47(4): 311.
- [5] HUANG Sheng-tao(黄胜涛). Solid X-ray Diffraction(固体 X 射线学). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1985. 214.
- [6] King M, McClure W F, Andrews L C, et al. Powder Diffraction File Alphabetic Index, Inorganic Phases/Organic Phases, International Centre for Diffraction Data, 1601 Park Lane Pennsylvania 19081-2389, USA, 1992.
- [7] Audrey D, Jean P C, Nadine G, et al. J. Chem. Cryst., 2003, 33(2): 85.
- [8] Cody A M, Cody R D. J. Cryst. Growth, 1994, 135: 235.

Chemical Structure of Dicarboxylic Acids and Their Capacity Inhibiting of Calcium Oxalate Crystal Growth

DENG Sui-ping, HU Peng, OUYANG Jian-ming*

Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China

Abstract The effect of dicarboxylic acids with a three C—C bonds distance on the crystallization of calcium oxalate (CaOx_a) was investigated in silica gel system by means of X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and scanning electron microscopy (SEM). These acids include succinic acid, maleic acid, fumaric acid, malic acid, L-aspartic acid and tartaric acid. All the dicarboxylic acids can inhibit the aggregation of calcium oxalate monohydrate (COM) and induce the formation of calcium oxalate dehydrate (COD). But their ability to inhibit the growth and aggregation of COM, to diminish the specific surface area of COM and to induce COD formation were strengthened as the number of the substituted hydroxyl or amino group increased. The molecular mechanisms were discussed in terms of chemical structures of dicarboxylic acids. Only the dicarboxylic acids with a $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ($\text{R}=\text{OH}$ or NH_2) group were found to have the best inhibitory effect on the CaOx_a urinary stones. The results could provide some clue to looking for new drugs for urinary stones in clinic.

Keywords XRD; FTIR; Calcium oxalate; Dicarboxylic acids

(Received Jun. 6, 2006; accepted Sep. 8, 2006)

* Corresponding author