

海带多糖对草酸钙结晶过程中晶相的影响

邓穗平, 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)、红外光谱(FTIR)、扫描电子显微镜(SEM)和原子吸收光谱(AAS)等方法研究了从海带中提取的硫酸多糖(SPS)对尿结石主要成分草酸钙结晶的影响。SPS 可以稳定热力学亚稳定的二水草酸钙(COD)晶体。随着 SPS 浓度从 0 增加到 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, COD 晶体的质量百分比从 0 增加到 100%; 亚稳溶液中草酸钙的相对过饱和度从 1.0 增加到 19.6。SPS 可以稳定 COD 晶体在溶液中的存在并增加可溶性 Ca^{2+} 离子的浓度, 这有利于防止草酸钙结石形成。结果表明, SPS 是一种潜在的防止草酸钙尿结石形成的药物。

关键词 草酸钙; 尿结石; 海带多糖; 生物矿化

中图分类号: O611.2; TQ115; R6 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)11-2371-04

引言

海藻是海洋水产资源的重要组成部分。海带在我国的产量位居世界首位^[1]。海带中含有丰富的多糖, 如褐藻胶、褐藻糖胶、褐藻淀粉等的含量超过 23%。海带多糖具有多种生物活性及药用功能, 如调节免疫、抗肿瘤、抗凝血、降血脂、降血糖、抗辐射、抗突变、抗体内氧化和耐缺氧等^[1,2]。

尿结石是一种常见的疾病, 其中草酸钙(CaO_{ox})是尿结石的主要成分, 约占 70%以上。 CaO_{ox} 结晶有三种存在形式: 热力学最稳定的一水草酸钙($\text{CaO}_{\text{ox}} \cdot \text{H}_2\text{O}$, COM), 亚稳定的二水草酸钙($\text{CaO}_{\text{ox}} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, COD)和热力学最不稳定的三水草酸钙($\text{CaO}_{\text{ox}} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, COT), 其中 COM 是尿液和结石中最常见的形式, COD 次之, 而 COT 较少见, 但 COD 和 COT 容易随尿液排出体外^[3,4]。如能在尿液中诱导更多的 COD 和 COT 晶体, 减少 COM 的形成, 则有利于防止泌尿系结石的形成。

从海带中提取的海带硫酸多糖(SPS)的分子结构和性质不但与尿液中存在的尿石盐抑制剂葡氨聚糖(GAGs)相似, 而且可以清除羟基自由基^[5], 这使得 SPS 极有可能成为一种潜在的外源性绿色防石药物^[6], 但这方面的工作未见有报道。本文研究了 SPS 对水溶液中 CaO_{ox} 结晶的影响, 期望为选择新的防石药物提供启示。

1 实验部分

1.1 试剂

草酸钾和二氯化钙为分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。海带产于汕头南澳岛, 用直接水提法参照文献^[5,7]提取硫酸多糖, 最后产物 SPS 主要由 α -1,4-L 古罗糖醛酸和 α -1,4-D-甘露糖醛酸为单体构成的嵌段共聚物, α -L-岩藻糖-4-硫酸酯的多聚物和 α -D-吡喃葡萄糖的多聚物组成^[1]。

1.2 实验方法

向各烧杯中分别加入 20 mL $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钙及不同量的 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SPS, 用二次水稀释至 30 mL, SPS 的最终浓度如表 1 所示。磁力搅拌 5 分钟后, 迅速加入 30 mL $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草酸钾, 最后的溶液中 $c(\text{Ca}^{2+}) = c(\text{O}_{\text{ox}}^{2-}) = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应 10 min, 静置陈化 2 h, 离心分离。用原子吸收光谱法测量上层清液中的钙离子浓度, 下层 CaO_{ox} 沉淀在真空干燥器中干燥, 用 XRD 定量分析 CaO_{ox} 中 COM 和 COD 的相对质量百分比, 定量分析采用 k 值法^[8]按照文献^[9]计算。

1.3 仪器

XD-2 粉末 X 射线衍射仪为北京大学研制, 其测试条件为: Cu-K 射线, 40 kV, 20 mA, 石墨单色器, 狭缝: $\text{DS} = 1^\circ$, $\text{RS} = 0.15 \text{ mm}$, $\text{SS} = 1^\circ$, 扫描速度 $4^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 步宽: 0.02° 。原子吸收为 WFX-1F2B2 型原子吸收分光光度计, 光谱通带宽 0.4 nm , 燃烧器高度 4 mm , 灯电流 4 mA , 乙炔压

收稿日期: 2006-06-16, 修订日期: 2006-09-22

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B30701003), 国家自然科学基金项目(20471024)和教育部留学基金项目(教外司[2005]55号)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

力 $0.06 \text{ MPa} \cdot \text{cm}^{-2}$, 空气压力 $0.2 \text{ MPa} \cdot \text{cm}^{-2}$, 波长 422.8 nm 。FTIR 为 Equinox55 型傅里叶变换红外吸收光谱仪(德国 Bruker 公司), 测试的波数范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

加入不同量 SPS 后草酸钙沉淀中 COM 和 COD 的质量百分比见表 1。当加入的 SPS 浓度小于 $0.0067 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 只得到 COM 晶体, 与没有加入 SPS 的空白实验结果相同, 但上层清液中的可溶性钙离子浓度增加。COM 的主衍射峰在 $d = 0.593 \text{ nm}$ (101 晶面)、 0.365 nm (020 晶面)、 0.297 nm (202 晶面) 和 0.236 nm (130 晶面) (图 1a)。当 SPS 浓度增加到 $0.017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 开始出现 COD 晶体, 且 COD 晶体的含量随 SPS 浓度的增加而增加(图 2)。当 SPS 浓度增加至 $0.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 生成的 CaO_{xa} 沉淀全部为 COD 晶体(图 1d)。在 XRD 谱图中, COD 晶体的特征峰出现在 $d = 0.618 \text{ nm}$ (200 晶面)、 0.442 nm (211 晶面)、 0.278 nm (411 晶面) 和 0.224 nm (213 晶面) (图 1d)。这表明, SPS 具有很强的诱导和/或稳定 COD 晶体的能力。SPS 诱导的 COM 和 COD 晶体的形貌如图 3 所示。可以看到, COD 晶体[图 3(b)]的棱角比 COM 晶体[图 3(a)]的圆钝, 这种圆钝的 COD 晶体与尿路细胞表面的粘附力较小, 容易排出体外, 有利于防止草酸钙尿石形成。

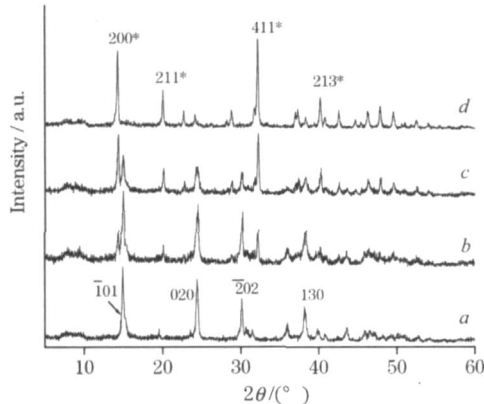


Fig 1 XRD patterns of CaO_{xa} crystals grown in the presence of different concentration of SPS

$c_{\text{SPS}} = (a) 0.0033; (b) 0.033; (c) 0.067;$
 $(d) 0.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}, c_{(\text{CaO}_{xa})} = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

SPS 对 COM 的抑制和对 COD 的诱导可归因于如下原因:

(1) SPS 是聚阴离子^[1, 5], 其硫酸基含量高达 $20\% \sim 30\%$ ^[10, 11], 带硫酸基负电荷的 SPS 容易通过静电作用吸附在带正电荷的 COM 晶体的 (101) 晶面^[12, 13], 阻碍溶液中的钙离子向 COM 晶体表面的运送, 使得 COM 的生长受到抑制; 而 COD 晶体表面基本不带电荷^[14], 与 SPS 的相互作用较弱, 因此, SPS 在抑制 COM 的同时促进了 COD 晶体的生成。

(2) 当 SPS 中众多的负电荷基团整合 Ca^{2+} 后, 使得 Ca^{2+} 离子在 SPS 表面富集, 从而在局域表面产生了一个高能量的界面; 同时, Ca^{2+} 被吸附后, 其自由度减小, Ca^{2+} 的能态增高。这种高能量界面和高能态 Ca^{2+} 均能促进热力学不稳定的高能态 COD 晶体形成^[14]。

(3) SPS 吸附 Ca^{2+} 后, 在 SPS 表面处的阳离子浓度比体相中显著提高, 从而使阴、阳离子之比偏离晶体的化学计量比, 而 Ca^{2+} 过量提供了有利于 COD 晶体形成的条件^[15]。

Table 1 Effect of SPS on phase composition of calcium oxalate crystals grown in the presence of different concentration of SPS

No.	c_{SPS} / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	COD / % *	$c_{(\text{Ca}^{2+})}$ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) **	Relative supersaturation
1	0	0	45.0	1.02
2	0.0033	0	50.9	1.30
3	0.0067	0	55.5	1.52
4	0.017	10.6	58.8	1.73
5	0.033	32.4	64.3	2.07
6	0.050	53.3	69.6	2.42
7	0.067	60.6	77.6	3.01
8	0.13	77.1	90.0	4.05
9	0.20	89.7	111	6.16
10	0.25	93.9	119	7.10
11	0.33	100	156	12.1
12	0.60	100	198	19.6

*: 为二次实验的平均值; ** 为三次实验的平均值

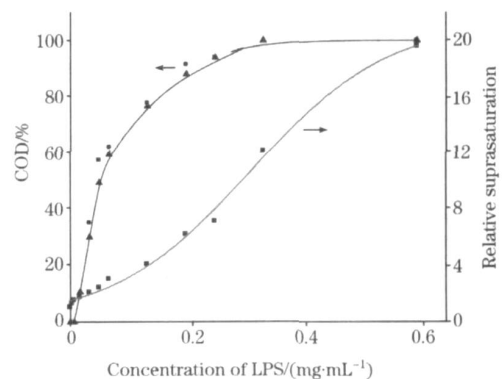


Fig 2 Mass fraction(%) of SPS crystals grown in the presence of different concentration of SPS

将草酸钙沉淀离心分离后, 用原子吸收光谱法测量了上层清液中钙离子的浓度。空白样上层清液中的钙离子浓度为 $45.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (见表 1), CaO_{xa} 的相对过饱和度为 1.02; 而在添加 0.0033 和 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SPS 的试样中, CaO_{xa} 的相对过饱和度分别增加至 1.30 和 19.6 (见表 1)。这说明, 随着 SPS 浓度增加, 体系中可溶性 Ca^{2+} 离子的浓度增大。SPS 增加溶液中可溶性钙的浓度, 归因于其硫酸基可以与 Ca^{2+} 配位。例如, 硫酸软骨素(与 SPS 的分子结构相似)中的每微摩尔硫酸基可以结合 $0.757 \mu\text{mol}$ 游离 Ca^{2+} 离子^[16]。可溶性钙浓度增加后, 使得 CaO_{xa} 沉积受到抑制, 有利于阻止

草酸钙结石的形成。

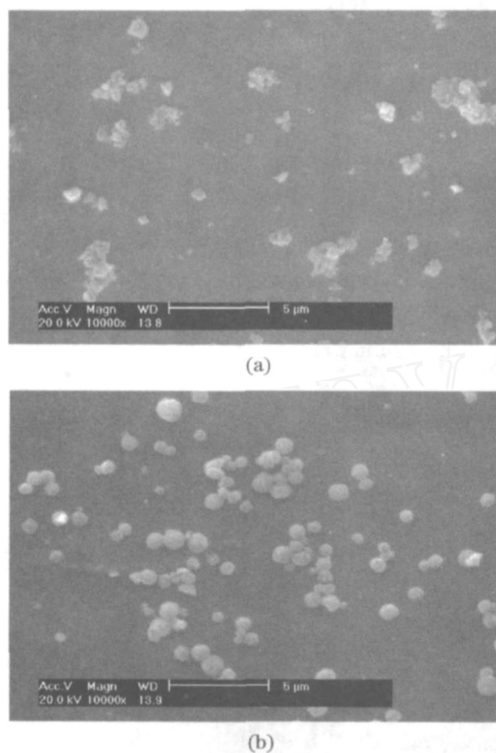


Fig 3 SEM patterns of CaO_{xa} crystals grown in the presence of different concentration of SPS

(a) : 0.005; (b) : 0.20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; $c(\text{CaO}_{xa}) = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 4 为分别加入浓度为 0.033 和 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SPS 后生成的 CaO_{xa} 晶体的 FTIR 光谱。当 $c_{\text{SPS}} = 0.033 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 羧基的反对称伸缩振动 $_{as}(\text{COO}^-)$ 吸收峰为 1620 cm^{-1} [图 4(a)], 伸缩振动带 $_{s}(\text{COO}^-)$ 为 1322 cm^{-1} 。在指纹区内, 662 cm^{-1} 出现 COM 的特征吸收峰, 表明得到的草酸钙沉淀主要为 COM 晶体^[14]。

当 $c_{\text{SPS}} = 0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $_{as}(\text{COO}^-)$ 蓝移至 1644 cm^{-1} [图 4(b)], $_{s}(\text{COO}^-)$ 蓝移至 1328 cm^{-1} , 表明生成的草酸钙主要为 COD 晶体。在指纹区, COD 的特征峰出现在 615 cm^{-1} 。

当 c_{SPS} 在 0.033 至 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时, $_{as}(\text{COO}^-)$ 和 $_{s}(\text{COO}^-)$ 分别出现在 $1620 \sim 1644 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1322 \sim 1328 \text{ cm}^{-1}$ 之间, 有时 $_{as}(\text{COO}^-)$ 也以双峰出现, 双峰的位置分别在 1620 cm^{-1} (COM) 和 1644 cm^{-1} (COD) 左右。这表明, 此时生成的草酸钙晶体为 COM 和 COD 的混合物。由于 COM 提供的振动强度是 COD 的 2~3 倍^[17], 因此, 在 COM-COD 混合物的红外光谱中, $_{as}(\text{COO}^-)$ 和 $_{s}(\text{COO}^-)$ 的蓝移并不与 COD 的质量百分比成正比^[14]。

COM 晶体在 $3500 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 之间的水峰分裂成多个小峰, 而 COD 的水峰在 3451 cm^{-1} 为 1 个大的单峰, 其强度亦比 COM 的强, 归因于 COD 比 COM 多含有 1 个水分子所

致。在指纹区, 水的弯曲振动在 780 和 519 cm^{-1} 处, 但 COM 的形状比 COD 的尖, 其强度亦比 COD 的大。

SPS 不但可以诱导溶液中 COD 形成, 而且可以稳定 COD 在水溶液中的存在。对于加入 $0.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ SPS 后得到的 CaO_{xa} 沉淀, 在溶液中陈化 2, 6, 10, 24, 48 和 96 h 后, COD 的质量百分比分别为 95.4%, 95.2%, 95.7%, 92.8%, 91.8% 和 91.5%, 这表明, 陈化时间对 COD 质量百分比的影响很小, 即 SPS 可以稳定 COD 在水溶液中的存在。而在没有 SPS 的水溶液中, COD 晶体在 48 h 内可全部转变 COM 晶体^[18, 19]。由于 COM 晶体比 COD 晶体对细胞膜具有更强的亲和力^[20], 即 COD 晶体比 COM 晶体更容易排出体外, 因而诱导 COD 形成或稳定 COD 在溶液中的存在均有利于防止尿石的形成^[3, 4]。

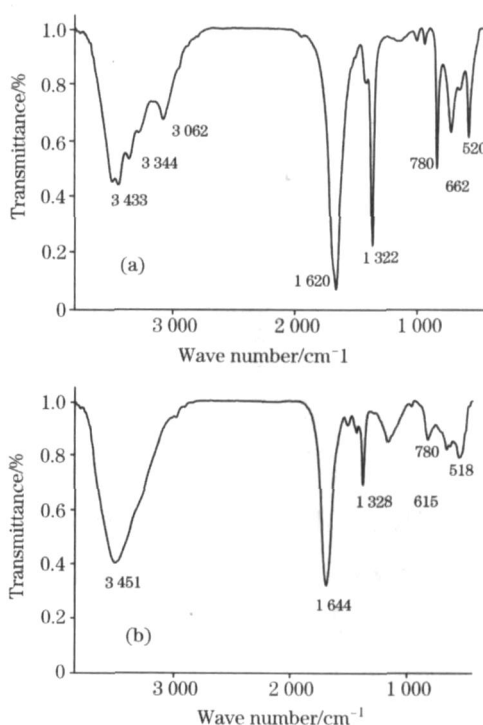


Fig 4 FTIR spectra of CaO_{xa} crystals grown in the presence of various concentrations of SPS

(a) : 0.033 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; (b) : 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;
 $c(\text{CaO}_{xa}) = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结 论

从海带中提取的海带多糖 SPS 可以有效地增加水溶液中可溶性 Ca^{2+} 离子的浓度, 抑制水溶液中热力学稳定的 COM 沉淀, 同时诱导并稳定热力学亚稳定的 COD 生成。这表明, SPS 有可能防止草酸钙结石的形成, 是一种潜在的绿色防石药物。

致谢: 感谢暨南大学化学系岑颖洲教授提供的硫酸多糖。

参 考 文 献

- [1] LAI Xiao-fang, SHEN Shan-rui(赖晓芳, 沈善瑞). Letters in Biotechnology(生物技术通讯), 2003, 14(5): 436.
- [2] Pang Z, Otaka K, Maoka T, et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, 69(3): 553.
- [3] Ouyang J M, Deng S P. Coll. Surf. A., 2005, 257-258: 395.
- [4] ZHENG Hui, CHEN Cur-yuan, OU YANG Jian-ming(郑 辉, 陈村元, 欧阳健明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 874.
- [5] WANG Qi-lin, QU Ai-qin, WANG Hai-ren(王琪琳, 曲爱琴, 王海仁). Pharm. Biotechnol. (药物生物技术), 2004, 11(5): 316.
- [6] HE Jian-hua, OU YANG Jian-ming, ZHENG Wen-jie, et al(何建华, 欧阳健明, 郑文杰, 等). Guangdong Medicine Journal(广东医学), 2002, 23(4): 434.
- [7] GUO Ling, BAO Hui-yan, YE Shao-ming, et al(郭 凌, 包惠燕, 叶绍明, 等). J. Jinan University(Natural Science)(暨南大学学报·自然科学版), 2002, 23(3): 79.
- [8] 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.
- [9] Donnet M, Jongen N, Lemaitre J, et al. J. Mater. Sci. Lett., 2000, 19: 749.
- [10] Ouyang J M, Wu X M. Chem. Lett., 2005, 34(9): 1296.
- [11] LI Shou-ling, ZHAO Jing, ZHANG Hua-kun, et al(李守玲, 赵 晶, 张华坤, 等). Journal of Shandong University(Natural Science)(山东大学学报·理学版), 2004, 39(1): 107.
- [12] Ouyang J M, Deng S P, Zhong J P, et al. J. Cryst. Growth, 2004, 270: 646.
- [13] Deng S P, Ouyang J M. Coll. Surf. A., 2005, 257-258: 47.
- [14] Ouyang J M, Duan L, Tieke B. Langmuir, 2003, 19(21): 8980.
- [15] Jung T, Kim W S, Choi C K. Mater. Sci. Eng. C, 2004, 24: 31.
- [16] Ouyang J M, Yao X Q, Su Z X, et al. Science in China Series B, 2003, 46(3): 234.
- [17] Laurence M E, Levillain P, Lacour B, et al. Clin. Chim. Acta, 2000, 298: 1.
- [18] Yuzawa M, Tozuka K, Tokue A. Urol Res, 1998, 26: 83.
- [19] Liu S T, Hurwitz A, Nancollas G H. J. Urol., 1982, 127(2): 351.
- [20] Mandel N. J. Am. Soc. Nephrol., 1994, 5: 37.

Modulation of Polysaccharide Extracted from Laminaria on Phase Compositions of Urinary Crystal Calcium Oxalate

DENG Sui-ping, OU YANG Jian-ming*

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

Abstract The influence of sulfate polysaccharide (SPS) isolated from marine algae *Laminaria japonica* aresch on the growth of urinary crystal calcium oxalate (CaO_{ur}) was investigated by means of X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and atomic absorption spectroscopy. SPS can stabilize thermodynamic metastable calcium oxalate dihydrate (COD) crystals. As the concentration of SPS increases from 0 to $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mass percentage of COD crystals increases from 0 to 100%, and the relative supersaturation of calcium oxalate increases from 1.0 to 19.6. The ability of SPS to stabilize the existence of COD in aqueous solution and to increase the concentration of soluble calcium ions is favorable to the inhibition of CaO_{ur} stone. Indicating that SPS is a potential green drug for prevention and cure of CaO_{ur} urinary stones.

Keywords Calcium oxalate; Urinary stone; Laminaria-polysaccharide; Biomineralization

(Received Jun. 16, 2006; accepted Sep. 22, 2006)

* Corresponding author