

过饱和度、钙/草酸化学计量比对草酸钙晶体形成的影响及降解茯苓多糖的调控作用

郑雨云 刘静鸿 陈佳云 欧阳健明*

(暨南大学化学与材料学院, 生物矿化与结石病防治研究所, 广州 510632)

摘要: 为研究草酸钙(CaC_2O_4)晶体成核、生长和聚集, 探讨降解茯苓多糖(PCP)的抑制作用, 采用X射线衍射、FT-IR、扫描电镜、拉曼光谱、 ζ 电位仪和紫外分光光度计等方法对不同条件下形成的 CaC_2O_4 晶体进行表征。结果表明, 在低过饱和度($\text{RS} \leq 26.6$)时, 主要生成一水草酸钙(COM)晶体; 至RS为37.6和46.0时分别生成了11.6%和38.3%的二水草酸钙(COD)晶体, 且高RS时晶体的聚集程度增加。在RS相同时, 随着 $\text{Ca}^{2+}/\text{Ox}^{2-}$ ($\text{Ox}^{2-} = \text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)化学计量比($n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$)增大, 晶体中COD比例增加。降解PCP的加入可增加体系中可溶性 Ca^{2+} 浓度, 减少生成的 CaC_2O_4 晶体质量, 增加晶体表面 ζ 电位绝对值, 这些均有利于抑制 CaC_2O_4 结石的形成。因此, 高 Ox^{2-} 浓度对肾结石形成的风险远大于高 Ca^{2+} 浓度, 提示草酸的摄入对 CaC_2O_4 结石的风险远远大于钙的摄入, 降解PCP能同时抑制 CaC_2O_4 晶体的成核、生长和聚集。

关键词: 草酸钙; 茯苓多糖; $\text{Ca}^{2+}/\text{Ox}^{2-}$ 化学计量比; 过饱和度; 晶体调控

中图分类号: R69; O614.23

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2023)05-0794-11

DOI: 10.11862/CJIC.2023.058

Effects of supersaturation, $\text{Ca}^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ stoichiometric ratio on calcium oxalate crystallization and the regulation of degraded *Poria cocos* polysaccharide

ZHENG Yu-Yun LIU Jing-Hong CHEN Jia-Yun OUYANG Jian-Ming*

(College of Chemistry and Materials Science, Institute of Biomineralization and

Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To study the nucleation, growth, and aggregation of calcium oxalate (CaC_2O_4) crystals, and to explore the inhibitory effect of degraded *Poria cocos* polysaccharide (PCP), CaC_2O_4 crystals formed under different conditions were characterized by X-ray diffraction, FT-IR, scanning electron microscope, Raman spectroscopy, ζ potentiometer, and UV spectrophotometer. The results showed that calcium oxalate monohydrate (COM) crystals were mainly formed at low supersaturation ($\text{RS} \leq 26.6$). At RS being 37.6 and 46.0, 11.6% and 38.3% calcium oxalate dihydrate (COD) crystals were formed respectively, and the aggregation degree of the crystals increased at high RS. At the same RS, the proportion of COD in the crystal increased with the increase of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Ox}^{2-}$ stoichiometric ratio ($n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$, $\text{Ox}^{2-} = \text{C}_2\text{O}_4^{2-}$). The addition of degraded PCP could increase the concentration of soluble Ca^{2+} ions in the system, reduce the quality of generated CaC_2O_4 crystals, and increase the absolute value of ζ potential on the crystal surface, all of which are beneficial to inhibit the formation of CaC_2O_4 stones. Thus, the risk of high Ox^{2-} concentration on the formation of kidney stones is much greater than that of high Ca^{2+} concentration, suggesting that the risk of oxalic acid intake on CaC_2O_4 stones is much greater than that of calcium intake. PCP can simultaneously inhibit the nucleation, growth, and aggregation of CaC_2O_4 crystals.

Keywords: calcium oxalate; *Poria cocos* polysaccharide; $\text{Ca}^{2+}/\text{Ox}^{2-}$ stoichiometric ratio; supersaturation; crystal regulation

收稿日期: 2022-07-19。收修改稿日期: 2023-03-15。

国家自然科学基金(No.21975105)资助。

*通信联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

0 引言

肾结石的主要成分是草酸钙(CaC_2O_4)晶体,约占70%。尿液中过饱和的 CaC_2O_4 在成核之后,会继续生长或聚集到病理性尺寸范围。但这些尿微晶只有在与受损伤的肾上皮细胞黏附后,才会滞留和进一步长大,最终形成结石^[1-2]。阻止 CaC_2O_4 晶体成核、生长、聚集和黏附中的任何一个过程,均可以有效地抑制肾结石的发生和复发^[3]。

从化学的角度看, CaC_2O_4 的过饱和度(RS)、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Ox}^{2-}$ 化学计量比($n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}, \text{Ox}^{2-}=\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)、尿液中的促进剂和抑制剂等因素均会影响 CaC_2O_4 结石的形成。但至今为止,对这些问题仍然没有完全阐明。如尿液中的 Ca^{2+} 和 Ox^{2-} 哪个影响更大?有结石的人是否需要少吃含钙物质?广东省肾结石高发肯定与长年温度较高的天气有关,出汗会导致尿液浓缩, CaC_2O_4 的RS增大,尿抑制剂浓度和促进剂浓度均增加,但怎么预防至今没有较好的方法。

植物多糖含有的大量酸性基团(如 $-\text{OSO}_3^-$ 基和 $-\text{COOH}$ 基)^[4-6],这些酸性基团可以通过静电作用与尿液中的 Ca^{2+} 配位,形成稳定的可溶性配合物,从而降低体系的RS;多糖吸附到晶体表面后还可以减弱晶体与肾上皮细胞的黏附^[7-8];此外,植物多糖还可以修复受损伤的肾上皮细胞^[9]。这些作用均有利于降低肾结石的形成风险。

茯苓是中医防石处方中的重要组分之一。茯苓多糖(PCP)是茯苓的重要活性成分^[10]。但天然PCP由于具有分子量大、分子体积大、水溶性较小及黏度高等特点,因此难以通过生物组织屏障进入细胞发挥生物活性^[11]。对天然PCP进行降解可以增强其生物活性。

基于此,我们研究了 CaC_2O_4 的RS、 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解PCP对 CaC_2O_4 晶体形成的影响,从抑制 CaC_2O_4 晶体成核、生长、聚集和黏附的角度,讨论了降低肾结石形成风险的条件,期望为进一步阐明 CaC_2O_4 肾结石形成机理、开发新型防石药物提供启示。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

PCP购自陕西慈缘生物有限公司,采用超声降解法^[12]对其进行降解,在超声功率600 W、超声频率40 kHz条件下超声30 min后,得到分子量(M)为2.5 kDa的降解PCP。分子量采用乌氏黏度法测定,并

根据Mark-Houwink经验方程式 $[\eta]=\kappa M^\alpha$ 计算;对于降解PCP,式中参数 $\kappa=1.49\times 10^{-2}$, $\alpha=0.75^{[13]}$, $[\eta]$ 为特性黏度。降解PCP中含有2.80%的 $-\text{COOH}$ 基。详细的降解过程和多糖的结构表征将另文报道。 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 和 CaCl_2 等其他常规试剂为分析纯,由广州化学试剂厂提供。

主要仪器有傅里叶变换红外光谱仪(EQUINOX55, Bruker, 德国)、X射线衍射仪(XRD, D/MAX-2400, Rigaku, 日本)、场发射扫描电子显微镜(SEM, Ultra 55, ZEISS, 德国)、电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP, Optima 2000DV, Perkin Elmer, USA)、拉曼光谱仪(LabRAM HR Evolution, HORIBA JY, 法国)、紫外可见分光光度计(Cary 500, Varian, 美国)、纳米粒度电位仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern, 英国)、超声仪(结盟JP-100S)、乌氏黏度计(毛细管内径为0.45 mm)。

1.2 多糖调控 CaC_2O_4 晶体生长

实验分为2组。A组:固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,使 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12^{[14]}$,即在一组50 mL容量瓶中分别加入0.375~36 mL的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 、0.75 mL的 $0.50\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ (调节离子强度),加二次蒸馏水至46 mL左右,然后加入3.0 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$,定容至刻度。B组:固定 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=1$,改变 $c_{\text{Ox}^{2-}}$ 和 $c_{\text{Ca}^{2+}}$,使溶液的RS对应上述各组实验,RS根据文献^[15]计算。将上述各组 CaC_2O_4 过饱和溶液快速转入50 mL烧杯中进行结晶,预先在烧杯底部放入处理好的基片。为防止由于溶剂水的挥发而造成体系过饱和驱动晶体形成,晶体生长在37℃的恒温密闭环境中进行。晶体生长3 d后,取出基片,置于干燥器中干燥。上清液用ICP检测可溶性 Ca^{2+} 浓度。2组实验均同时进行对照组(没有多糖存在)和多糖组(质量浓度最终为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)研究。

1.3 CaC_2O_4 晶体表征

SEM表征:称取上述各组实验得到的 CaC_2O_4 晶体5 mg,超声10 min使其分散在10 mL无水乙醇中,分多次点样到石英基片上,经喷金处理后在SEM下观察晶体形貌。操作条件为高压5.00 kV,工作距离5~10 mm,放大倍数 3×10^3 。

XRD表征:采用X射线衍射仪检测上述基片上的晶体,测试条件为Cu K α 射线、波长0.154 16 nm、石墨单色器、30 kV、25 mA,扫描范围为 $10^\circ\sim 50^\circ$,扫

描速度 $8 (^{\circ}) \cdot \text{min}^{-1}$, 步宽 $0.02 (^{\circ}) \cdot \text{s}^{-1}$ 。晶体中的一水草酸钙(COM)和二水草酸钙(COD)的质量分数采用 K 值法^[16-17] 计算, 其中 COD 的质量分数: $w_{\text{COD}} = \frac{I_{\text{COD}}}{I_{\text{COM}} + I_{\text{COD}}} \times 100\%$, 式中 I_{COM} 和 I_{COD} 分别为 COM 的主衍射峰($\bar{1}01$)晶面($d=0.593 \text{ nm}$)和 COD 的主衍射峰(200)晶面($d=0.618 \text{ nm}$)的强度。

FT-IR 表征: 取 2 mg 已干燥的 CaC_2O_4 样品, 与 200 mg KBr 充分混匀, 用玛瑙研钵进行研磨后压片, 红外光谱仪于 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内扫描。

拉曼光谱表征: 取 2 mg 干燥的 CaC_2O_4 样品, 采用拉曼分析仪器扫描, 波数范围是 $1800 \sim 100 \text{ cm}^{-1}$, 激发波长为 532 nm 。

ζ 电位的测定: 称取各晶体 1 mg, 超声 10 min 使其分散在 3.0 mL 纯水中, 在恒温 $25 ^{\circ}\text{C}$ 采用纳米粒度电位仪检测。

1.4 降解 PCP 对 CaC_2O_4 晶体成核、聚集的抑制作用

在 620 nm 波长下, 用紫外分光光度计检测 30 min 内溶液的浊度随时间的变化。通过对 Ca^{2+} 和 Ox^{2-} 亚稳态溶液的光密度进行定量检测, 并进行线性回归分析, 得到降解 PCP 对 CaC_2O_4 晶体的成核抑

制率和聚集抑制率^[18-19], 成核抑制率: $N_m = [1 - (S_p/S_c)] \times 100\%$, 聚集抑制率: $A_m = [1 - (R_p/R_c)] \times 100\%$, 其中成核速率 S 为吸光度随时间增加的最大斜率, 主要反映新颗粒形成的最大速率; 聚集速率 R 为吸光度随时间降低的最大斜率, 代表新颗粒聚集的最大速率; S_p 和 R_p 是存在降解 PCP 时的速率, S_c 和 R_c 是空白实验时的速率。每个实验组平行检测 2 次。

2 结果

2.1 不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下形成的 CaC_2O_4 晶体的 XRD 图

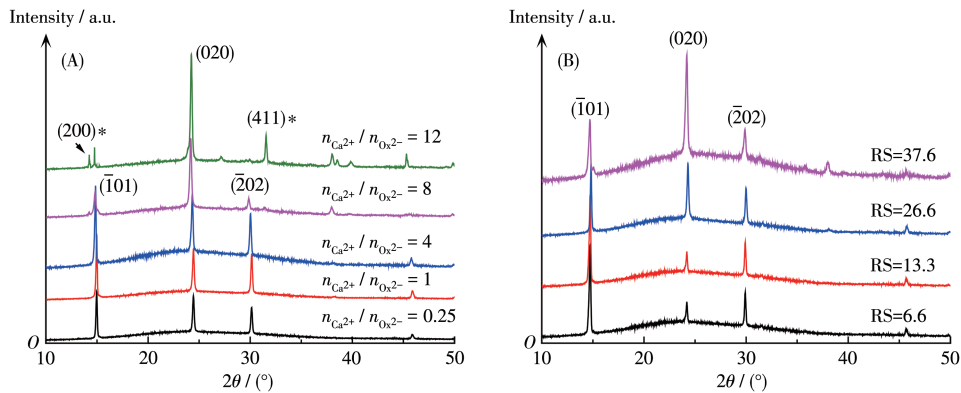
采用 XRD 分析了不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下生成的 CaC_2O_4 晶体中 COM 和 COD 的质量分数(表 1), 代表性 XRD 图见图 1A。可以看出: 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}} = 0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 为 0.25、1 和 4 时, 均只形成 COM 晶体; 而在 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 为 8 和 12 时, 诱导了 11.6% 和 38.3% 的 COD 晶体形成。上述 COM 的衍射峰出现在 $2\theta = 14.88^{\circ}$ 、 24.2° 和 30.16° 处, 分别归属于 COM 的($\bar{1}01$)、(020)和($\bar{2}02$)晶面; COD 的衍射峰出现在 $2\theta = 14.28^{\circ}$ 、 32.28° 和 40.28° 处, 分别归属于 COD 的(200)、(411)和(213)晶面^[20]。

表 1 不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 及 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降解 PCP 对 CaC_2O_4 晶体形成的影响

Table 1 Effects of different $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ values and $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ degraded PCP on the formation of CaC_2O_4 crystals

$c_{\text{Ca}^{2+}} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$c_{\text{Ox}^{2-}} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$n_{\text{Ca}^{2+}} / n_{\text{Ox}^{2-}}$	RS*	$I_{(101)}/I_{(020)}$ of COM	$w_{\text{COD}} / \%$	
					Blank	Degraded PCP
Group A: $c_{\text{Ox}^{2-}}\!=\!0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, changing $c_{\text{Ca}^{2+}}$						
0.075	0.6	0.125	4.7	1.88	0	13.8
0.15	0.6	0.25	6.6	1.42	0	14.3
0.3	0.6	0.5	9.4	1.31	0	16.7
0.6	0.6	1	13.3	1.45	0	21.1
1.2	0.6	2	18.8	1.49	0	25.4
2.4	0.6	4	26.6	1.10	0	28.6
4.8	0.6	8	37.6	0.35	11.6	40.8
7.2	0.6	12	46	0.23	38.3	46.1
Group B: $c_{\text{Ox}^{2-}}\!=\!c_{\text{Ca}^{2+}}$						
0.3	0.3	1	6.6	3.24	0	0
0.42	0.42	1	9.4	2.45	0	23.3
0.6	0.6	1	13.3	1.96	0	32.1
0.85	0.85	1	18.8	1.56	0	18.2
1.2	1.2	1	26.6	1.26	0	14.5
1.7	1.7	1	37.6	0.59	0	11.3

* Supersaturation (RS) was calculated according to the reference^[15].



* Indicates the diffraction peaks of COD, and the others are the peaks of COM

图1 不同条件下生成的CaC₂O₄晶体的XRD图: (A) 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 改变 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$; (B) 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=c_{\text{Ca}^{2+}}$, 改变溶液的RS

Fig.1 XRD patterns of CaC₂O₄ crystals generated under different conditions: (A) fixing $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, changing the $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$; (B) fixing $c_{\text{Ox}^{2-}}=c_{\text{Ca}^{2+}}$, changing RS of solution

当固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=c_{\text{Ca}^{2+}}$, 改变体系的RS, 形成的CaC₂O₄晶体的XRD图如图1B所示。在RS=6.6~37.6范围内均只形成COM晶体(表1)。但随着RS从6.6增加到13.3、26.6和37.6, COM不同晶面的强度出现规律性变化, $I_{(\bar{1}01)}/I_{(020)}$ 晶面强度比从3.24逐渐减小到1.96、1.26和0.59。

2.2 降解PCP对CaC₂O₄晶体形成的影响

XRD图结果表明,在上述体系中加入0.5 g·L⁻¹的降解PCP后,均促进了COD晶体形成(表1),其规律如下:

(1) 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 随着 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 从0.125增加到12, COD质量分数从13.8%增加到

46.1%;相比之下,没有降解PCP存在时,只有当 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}\geq 8$ 时才有COD形成。

(2) 固定 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=1$, 在RS=13.3, 即 $c_{\text{Ox}^{2-}}=c_{\text{Ca}^{2+}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时形成的COD质量分数最高(32.1%), 高于或低于0.6 mmol·L⁻¹时均不利于COD的生成。

2.3 不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 及降解PCP影响CaC₂O₄晶体形成的SEM观察

如表2所示,固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 且没有降解PCP存在时,随着 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 从0.25逐渐增大至1、4、8和12,形成的晶体由表面光滑的拉长六边形COM逐渐转变为表面粗糙的COM,且晶体的尺寸和聚集程

表2 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解PCP影响CaC₂O₄晶体形成的SEM图像
Table 2 SEM images for the effects of $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ and degraded PCP on CaC₂O₄ crystal formation at fixed $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Group	$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ (RS)				
	0.25 (6.6)	1 (13.3)	4 (26.6)	8 (37.6)	12 (46)
Control					

度均增大;当 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}} \geq 8$ 时出现了少量十字形的 COD 晶体;即高 Ox^{2-} 浓度条件下只生成棱角尖锐的 COM 晶体,而高 Ca^{2+} 浓度条件下出现 COD 晶体。

加入降解 PCP 后,不但诱导了 COD 晶体生成,且 COD 质量分数随着 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 增大而增加;此外,加入降解 PCP 后形成的 COM 晶体的棱角有变圆钝的趋势,特别是在 CaC_2O_4 的 RS 较低时。

2.4 不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解 PCP 影响 CaC_2O_4 晶体形成的 FT-IR 光谱

采用 FT-IR 光谱进一步表征了上述各组晶体,部分结果如图 2 所示。在没有降解 PCP 存在且 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}} \leq 4$ 时(图 2A),得到的 CaC_2O_4 晶体在 3 059~3 490

cm^{-1} 处的晶体水伸缩振动峰分裂为 5 个小峰,羧基不对称伸缩振动 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和对称伸缩振动 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 分别在 1 618 和 1 316 cm^{-1} 附近,这些都是 COM 晶体的特征峰。但在 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}} \geq 8$ 时出现了 COD 晶体的红外特征吸收,此时不但 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 出现蓝移,而且晶体水伸缩振动峰表现为一个大而宽的单峰(在 3 429 cm^{-1} 附近)。

加入降解 PCP 后(图 2B),随着 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 由 0.25 增加至 12, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 从 1 618 cm^{-1} 蓝移到 1 624 cm^{-1} , $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 从 1 316 cm^{-1} 蓝移到 1 320 cm^{-1} ,表明 COD 晶体质量分数逐渐增加^[20-21]。

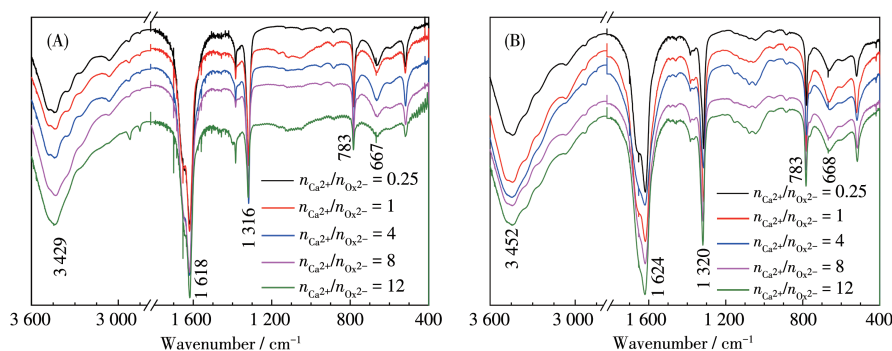


图2 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解 PCP 影响 CaC_2O_4 晶体形成的 FT-IR 谱图: (A) 没有降解 PCP 存在下; (B) 在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降解 PCP 存在下

Fig.2 FT-IR spectra for the effects of $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ and PCP on CaC_2O_4 crystal formation at fixed $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$:

(A) without PCP; (B) in the presence of $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ degraded PCP

2.5 拉曼光谱

图 3 为不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下形成的 CaC_2O_4 晶体

的拉曼光谱。在 1 463 和 1 488 cm^{-1} 左右的吸收峰为 COM 的 C—O 对称拉伸振动,其中 1 463 cm^{-1} 为 COM

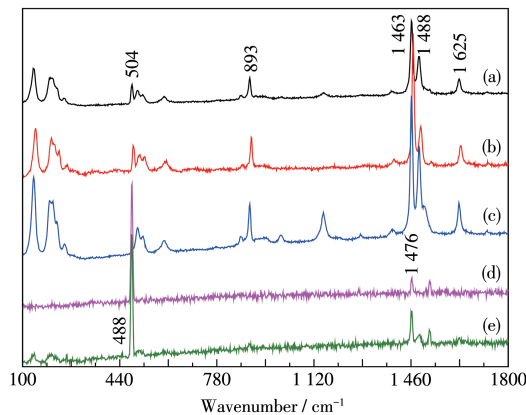


图3 固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下生成的 CaC_2O_4 晶体的拉曼光谱:

$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=0.25$ (a), 1 (b), 4 (c), 8 (d), 12 (e)

Fig.3 Raman spectra of CaC_2O_4 crystals generated under different $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ values at fixed $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$:

$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=0.25$ (a), 1 (b), 4 (c), 8 (d), 12 (e)

的主峰;1 625 cm^{-1} 处为C—O不对称拉伸振动,893 cm^{-1} 处为C—C侧链拉伸振动,504 cm^{-1} 归属于O—C—O面内弯曲带(表3)。相比之下,COD的C—O对称伸缩振动在1 476 cm^{-1} 左右,488 cm^{-1} 为O—C—O

面内弯曲^[22-23]。即在低 Ca^{2+} 浓度条件下形成的晶体主要为COM(图3a~3c),而在高 Ca^{2+} 浓度条件下同时形成了COM和COD晶体(图3d和3e)。拉曼光谱与FT-IR、XRD检测结果一致。

表3 不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下生成的 CaC_2O_4 晶体的拉曼吸收峰

Table 3 Raman absorption peaks of CaC_2O_4 crystals formed under different $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ values

$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$	C—O asymmetric stretching*	C—O symmetric stretching*	C—C stretching	O—C—O in-plane bending	$w_{\text{COD}} / \%$
Pure COM	1 625w	1 463sh, 1 488s	894	504	—
0.25	1 625	1 463sh, 1 484	893	504	0
1	1 627	1 463sh, 1 487	898	502	0
4	1 628	1 458, 1 490	895	500	0
8	1 627	1 476, 1 482		488s	31.9
12	1 629	1 476, 1 487	893	488s	38.3
Pure COD	1 629	1 476s	909	488s	—

* s: strong, w: weak, sh: sharp.

2.6 ζ 电位

图4为不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解PCP对形成的 CaC_2O_4 晶体 ζ 电位的影响。可以看出:

(1) 多糖的存在使得 CaC_2O_4 晶体的 ζ 电位更低。这归因于晶体表面吸附了带负电荷的降解PCP。

(2) 随着COD质量分数增加, ζ 电位越低。例如,固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,随着 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 从0.25增大到12,COD质量分数从0增加到38.3%,导致晶体

的 ζ 电位从-6.8 mV减小到-13.6 mV(图4A);而加入降解PCP后,COD质量分数从13.8%增加到46.1%,晶体的 ζ 电位从-7.2 mV减小到-19.1 mV。

(3) 随着 CaC_2O_4 的RS增加,生成的晶体量增加,在固定 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降解PCP的条件下,吸附在每个晶体表面的带负电荷的降解PCP分子减少,因此, ζ 电位绝对值减少(图4B)。

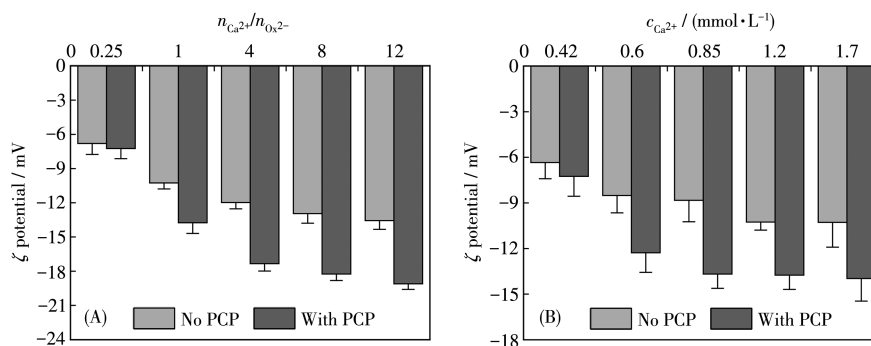


图4 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 和降解PCP对形成的 CaC_2O_4 晶体 ζ 电位的影响:(A)固定 $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,改变 $c_{\text{Ca}^{2+}}$;(B)固定 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=1$,改变 CaC_2O_4 溶液的RS

Fig.4 Effects of $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ and degraded PCP on the ζ potential of formed CaC_2O_4 crystals: (A) fixing $c_{\text{Ox}^{2-}}=0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, changing $c_{\text{Ca}^{2+}}$; (B) fixing $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}=1$, changing RS of CaC_2O_4 solution

2.7 降解PCP对 CaC_2O_4 成核、生长和聚集的抑制作用

采用紫外分光光度法研究了降解PCP对 CaC_2O_4 晶体的成核速率和聚集速率的影响(图5)。

结果表明,降解PCP能够显著抑制 CaC_2O_4 晶体的成核速率和聚集速率。与空白组(图5A)相比,加入降解PCP后(图5B),延长了晶体的成核时间(t_{max}),同时降低了晶体的成核速率和聚集速率^[24]。降解PCP对

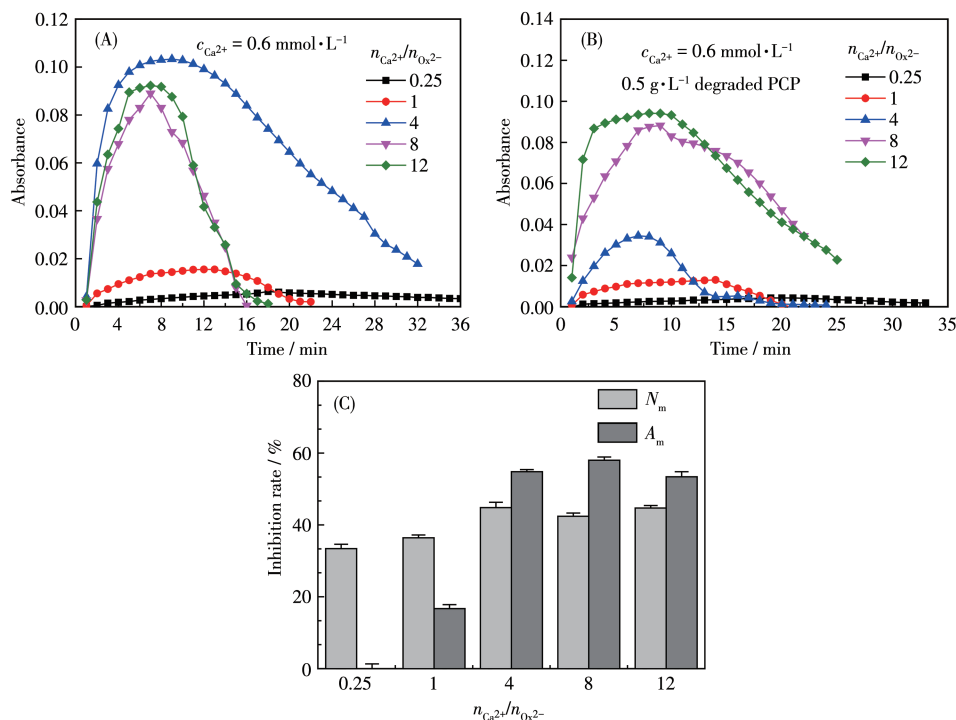


图5 降解PCP对不同 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 条件下 CaC_2O_4 晶体成核、聚集的抑制作用: (A) 空白组的吸光度;

(B) 加入降解PCP后的吸光度; (C) 降解PCP对 CaC_2O_4 结晶的 N_m 和 A_m

Fig.5 Inhibition of degraded PCP on CaC_2O_4 crystal nucleation and aggregation under different $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ values:

(A) absorbance of the control group; (B) absorbance after degraded PCP was added; (C) N_m and A_m of degraded PCP on CaC_2O_4 crystallization

$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 分别为 0.25、1、4、8、12 的 CaC_2O_4 溶液中 CaC_2O_4 结晶的成核抑制率(N_m)分别为 33.4%、36.4%、44.8%、42.4% 和 44.7%(图 5C), 对 CaC_2O_4 晶体聚集抑制率(A_m)分别为 0%、16.7%、54.8%、58% 和 53.4%。以上结果表明降解 PCP 对高 Ca^{2+} 浓度溶液中 CaC_2O_4 晶体的成核和聚集的抑制效果比在高 Ox^{2-} 浓度溶液中好。

2.8 降解 PCP 对体系中可溶性 Ca^{2+} 浓度和 CaC_2O_4 沉淀量的影响

采用 ICP 检测了降解 PCP 对反应体系中可溶性 Ca^{2+} 浓度的影响, 并用称重法评估了降解 PCP 对 CaC_2O_4 沉淀质量的影响(图 6)。加入降解 PCP 后, 溶液中可溶性 Ca^{2+} 浓度增加, 沉淀质量减少, 表明降解 PCP 与体系中的 Ca^{2+} 配位后, 减少了与 Ox^{2-} 结合的

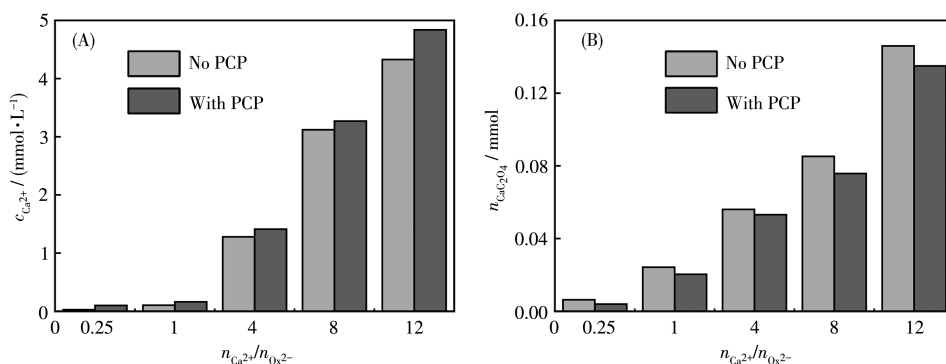


图6 在 0.5 g·L⁻¹降解 PCP 存在下改变 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 后上清液中 Ca^{2+} 的浓度和 CaC_2O_4 沉淀量

Fig.6 Concentration of Ca^{2+} in the supernatant and the amount of CaC_2O_4 precipitate in the presence of 0.5 g·L⁻¹ degraded PCP after changing $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$

Ca^{2+} 的量,从而降低了形成的 CaC_2O_4 沉淀量,这有利于抑制 CaC_2O_4 结石的形成。

为了验证结果的可靠性,我们计算了上清液中的可溶性 Ca^{2+} 的物质的量($n_{\text{Ca}^{2+}}$)与 CaC_2O_4 沉淀的物

质的量($n_{\text{CaC}_2\text{O}_4}$)之和($\sum n_{\text{Ca}^{2+}}$)。结果表明各实验的 $\sum n_{\text{Ca}^{2+}}$ 与理论 Ca^{2+} 的物质的量总量几乎一致(表4),稍有偏差主要是沉淀转移过程中的少量损失所致。

表4 降解PCP对 CaC_2O_4 晶相、溶液中可溶性 Ca^{2+} 浓度以及 CaC_2O_4 沉淀的量的影响

Table 4 Effects of degraded PCP on CaC_2O_4 crystal phase, soluble Ca^{2+} concentration in solution, and CaC_2O_4 precipitate amount

Group	$n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$	$w_{\text{COD}}/\%$	$c_{\text{Ca}^{2+}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$n_{\text{Ca}^{2+}}/\mu\text{mol}$	$n_{\text{CaC}_2\text{O}_4}/\mu\text{mol}$	$\sum n_{\text{Ca}^{2+}}/\mu\text{mol}$	Theoretical $\sum n_{\text{Ca}^{2+}}/\mu\text{mol}$
Control	0.25	0	25.4	1.27	6.3	7.57	7.55
	1	0	102	5.14	24.28	29.4	30.0
	4	0	1 279	63.2	55.7	119	120
	8	11.6	3 121	156	85.2	241	240
	12	38.3	4 327	216	146	362	360
Degraded PCP	0.25	14.3	98.6	4.85	3.86	8.71	7.55
	1	21.1	159.8	7.95	20.3	28.3	30.0
	4	28.6	1 411	70.6	53.1	124	120
	8	40.8	3 269	156	75.8	232	240
	12	46.1	4 839	242	135	377	360

3 讨论

3.1 高浓度 Ox^{2-} 摄入后肾结石的形成风险远大于高浓度 Ca^{2+} 摄入

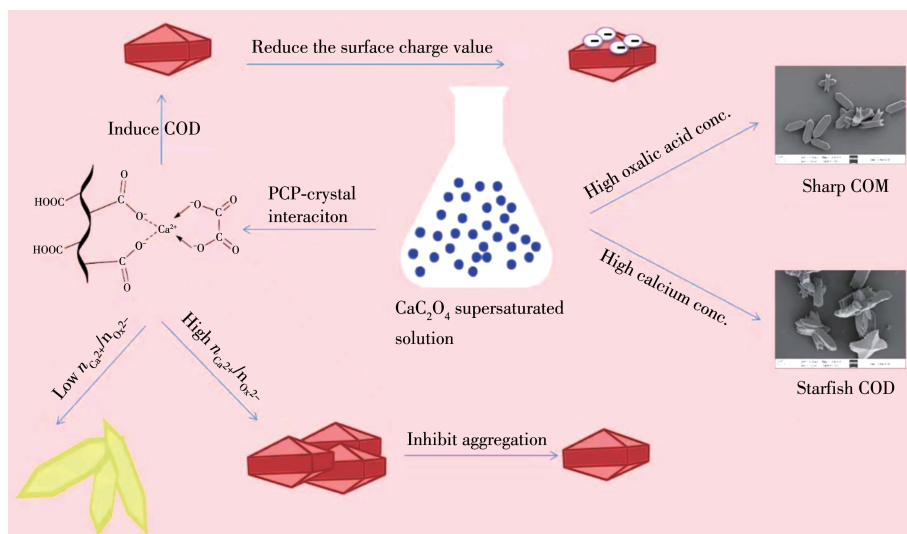
CaC_2O_4 晶体的生长习性及其最终形成的晶相受溶液的 RS 、 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 及添加剂等影响。XRD、FT-IR 和拉曼光谱均表明,在高 Ox^{2-} 浓度条件下只生成 COM 晶体,而高 Ca^{2+} 浓度条件下则会促进 COD 晶体的形成。一般而言,在正常人尿液中 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$ 在 5 左右^[25], $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}} < 5$ 为高 Ox^{2-} 浓度尿区,不但容易形成 CaC_2O_4 结石,而且结石中 COM 晶体占优势。而 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}} > 5$ 为高 Ca^{2+} 浓度尿区,容易形成 COD 晶体。由于 COM 晶体的主要晶面为带正电荷的(101)晶面^[5];而 COD 晶体主要为四角双锥形的晶体, COD 的主晶面上排列着大量的水分子,电荷密度低,因此,表面带负电荷的受损伤肾上皮细胞表面与 COM 的黏附力远大于 COD,即 COD 更容易随尿液排出^[26]。此外 COD 对肾上皮细胞的毒性比 COM 更小^[26],因此抑制 COM 的形成更有利于抑制结石的形成。这提示,高浓度 Ox^{2-} 摄入后对肾结石形成的风险远大于高浓度 Ca^{2+} 摄入。Rodgers 等^[27]的研究表明,草酸对 CaC_2O_4 肾结石形成的影响是钙的 23 倍;而 Sorensen 等^[28]研究发现,增加膳食钙的摄入量可使肾结石发生风险

降低 5%~28%。以上均表明草酸钙肾结石的形成主要是摄入 Ox^{2-} 过多所致。

3.2 降解 PCP 诱导 COD 形成并抑制 CaC_2O_4 晶体成核、生长和聚集

(1) 降解 PCP 诱导 COD 形成。富含阴离子的降解 PCP 更易吸附在表面带正电荷的 COM 晶体表面^[14],从而抑制了 COM 的进一步生长,使得晶体中 COD 的质量分数增加。降解 PCP 中—COOH 基与溶液中的 Ca^{2+} 配位,使得多糖表面 Ca^{2+} 富集,增大了局部区域的 $n_{\text{Ca}^{2+}}/n_{\text{Ox}^{2-}}$, Ca^{2+} 能态增加,这有利于 COD 晶体形成;相比之下,过量的 Ox^{2-} 则对生成 COM 晶体有利^[29]。此外,被—COOH 吸附的 Ca^{2+} 的自由度降低,也会促进热力学亚稳定的 COD 形成^[30]。Farmanesh 等^[31]研究表明,含有高百分比阴离子基团的抑制剂(如硫酸软骨素等)可以通过吸附到 COM 晶体的特定晶面上而产生螺旋位错,从而改变 COM 晶体在特定方向上的生长速率,达到抑制 COM 晶体生长的目的。降解 PCP 调控 CaC_2O_4 晶体形成的示意图如图 7 所示。

(2) 降解 PCP 抑制 CaC_2O_4 晶体成核、生长和聚集。 CaC_2O_4 晶体形成包括成核、生长和聚集 3 个过程^[32]。降解 PCP 不但能够抑制 CaC_2O_4 晶体成核与聚集(图 5),而且能够减少形成的 CaC_2O_4 晶体质量(图

图7 降解PCP调控CaC₂O₄晶体形成示意图Fig.7 Schematic diagram of degraded PCP regulating CaC₂O₄ crystal formation

6),从而抑制CaC₂O₄晶体的生长。这归因于降解PCP中的一COOH基与溶液中的游离Ca²⁺配位后,增加了溶液中可溶性Ca²⁺浓度,从而减少了Ca²⁺向CaC₂O₄晶体表面运输^[33],抑制了晶体的生长,降低了CaC₂O₄晶体的形成量。

晶体的聚集程度与晶体表面的 ζ 电位密切相关。晶体表面 ζ 电位越低,粒子间排斥力越大,越不容易发生聚集。降解PCP中的一COOH基可以通过钙桥 $_{(PCP)}COO^- \cdots Ca^{2+} \cdots ^-OOC_{(CaC_2O_4)}$ 吸附在CaC₂O₄晶体表面,使得其负电荷密度增加,晶体表面的 ζ 电位更低(图4),因此晶体间的聚集被抑制。晶体的聚集程度也与晶体中COD的质量分数相关。由于COM晶体表面的Ca²⁺浓度高于COD晶体^[5],且四角双锥形COD的8个(101)晶面上分布着较多的草酸根离子而带负电荷,因此,COD具有更低的 ζ 电位值^[34],即晶体中COD质量分数越大,晶体的聚集程度越小。

抑制CaC₂O₄晶体的成核、生长或聚集均有利于降低CaC₂O₄结石的形成风险。

3.3 CaC₂O₄的RS对CaC₂O₄晶体形成的影响

高RS有利于促进COD形成。在低RS条件下(RS=6.6),即使加入了0.5 g·L⁻¹降解PCP,也只生成COM晶体。随着RS增加,形成的COD晶体量增加。例如,在RS=9.4和13.3时,形成了23.3%和32.1%的COD晶体。因为在RS较低时,体系中Ca²⁺量和Ox²⁻量均较少,降解PCP调控COD形成的能力逐步显现。但当RS>13.3时,生成的COD晶体减少,因为随着RS进一步增大,体系中形成的CaC₂O₄晶体量显

著增加,有限的降解PCP不能与每个Ca²⁺结合,这些未与降解PCP结合的Ca²⁺形成了COM晶体,导致COD所占比例下降。

RS影响晶体的晶面。在高RS下,高活化能的晶面生长迅速,但由于在高RS时晶体聚集严重,晶体的活性晶面更容易聚集,导致活性晶面受到遮蔽。相比之下,低活化能的晶面本身已经有足够的生长速度,影响不大。因此,随着RS增加,COM的 $I_{(101)}/I_{(020)}$ 减小。

RS的改变会影响晶体的初始尺寸和聚集程度。结晶的生长是以RS为推动力的。在RS较高时,晶体成核优先于晶体生长,最终使晶体尺寸变小。高RS不但增加了晶体的沉淀量,而且增加了晶体的聚集程度。这归因于RS较高(如RS≥37.6)时,形成的晶核数目过多,此时即使加入0.5 g·L⁻¹的降解PCP也难以有空间让其发挥效果,晶体立即成核并发生聚集,而晶体在体内的聚集也是肾结石形成的重要原因之一^[1]。

4 结 论

CaC₂O₄过饱和溶液中的 $n_{Ca^{2+}}/n_{Ox^{2-}}$ 越大,诱导形成的COD质量分数越多,而高Ox²⁻浓度促进COM晶体形成,这提示高浓度Ox²⁻尿液中肾结石形成的风险远大于高浓度Ca²⁺尿液。溶液的过饱和度过高时不但增加了晶体的沉淀量,而且促进了晶体的聚集,从而增加了结石的形成风险。降解茯苓多糖(PCP)可以增大溶液中可溶性Ca²⁺浓度,减少生成的CaC₂O₄晶体质量,增加容易排出体外的COD晶体比

例,使晶体表面 ζ 电位变低。降解PCP能够同时抑制 CaC_2O_4 晶体的成核、生长和聚集,且对高钙溶液中 CaC_2O_4 晶体的成核和聚集的抑制效果比在高草酸溶液中好,这些结果有利于抑制 CaC_2O_4 结石形成,提示降解PCP有可能是潜在的防石药物。

参考文献:

- [1]Šafranko S, Goman S, Goman D, Jokić S, Marion I D, Mlinarić N M, Selmani A, Medvidović -Kosanović M, Stanković A. Calcium oxalate and gallic acid: Structural characterization and process optimization toward obtaining high contents of calcium oxalate monohydrate and dihydrate. *Crystals*, **2021**,**11**(8):954
- [2]程小燕,徐猛,欧阳健明.不同纵横比一水草酸钙晶体的合成、表征、吸附性能及其对肾上皮细胞的毒性差异.无机化学学报, **2022**,**38**(7):1261-1271
CHENG X Y, XU M, OUYANG J M. Synthesis, characterization, adsorption properties and toxicity to renal epithelial cells of calcium oxalate monohydrate crystals with different aspect ratios. *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2022**,**38**(7):1261-1271
- [3]Wang Z, Zhang Y, Zhang J W, Deng Q, Liang H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation. *Int. J. Mol. Med.*, **2021**,**48**(2):149
- [4]Sun X Y, Zhang H, Deng J W, Yu B X, Zhang Y H, Ouyang J M. Regulatory effects of damaged renal epithelial cells after repair by *Porphyra yezoensis* polysaccharides with different sulfation degree on the calcium oxalate crystal-cell interaction. *Int. J. Nanomed.*, **2021**,**16**: 8087-8102
- [5]Wang N, Zhang D, Zhang Y T, Xu W, Wang Y S, Zhong P P, Jia T Z, Xiu Y F. *Endothelium corneum gigeriae* Galli extract inhibits calcium oxalate formation and exerts anti-urolithic effects. *J. Ethnopharmacol.*, **2019**,**231**:80-89
- [6]Singh A, Tandon S, Nandi S P, Kaur T, Tandon C. Downregulation of inflammatory mediators by ethanolic extract of *Bergenia ligulata* (Wall.) in oxalate injured renal epithelial cells. *J. Ethnopharmacology*, **2021**,**275**:114104
- [7]Chen X W, Sun X Y, Tang G H, Ouyang J M. Sulfated *Undaria pinnatifida* polysaccharide inhibits the formation of kidney stones by inhibiting HK-2 cell damage and reducing the adhesion of nano-calcium oxalate crystals. *Biomaterials Advances*, **2021**,**134**:112564
- [8]Akın B, Öner M, Bayram Y, Demadis K D. Effects of carboxylate-modified, “green” inulin biopolymers on the crystal growth of calcium oxalate. *Cryst. Growth Des.*, **2008**,**8**(6):1997-2005
- [9]Zhao Y W, Guo D, Li C Y, Ouyang J M. Comparison of the adhesion of calcium oxalate monohydrate to HK-2 cells before and after repair using tea polysaccharides. *Int. J. Nanomed.*, **2019**,**14**:4277-4292
- [10]Sun Y. Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**,**68**:131-134
- [11]Chen F, Huang G L. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**,**112**: 211-216
- [12]Cheung Y C, Yin J, Wu J Y. Effect of polysaccharide chain conformation on ultrasonic degradation of curdlan in alkaline solution. *Carbohydr. Polym.*, **2018**,**195**:298-302
- [13]Jin Y, Zhang L, Tao Y, Zeng C, Chen Y, Cheung P C K. Solution properties of a water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydr. Polym.*, **2004**,**57**(2):205-209
- [14]Zhang Y Q, Tang Y M, Xu J Q, Zhang D Q, Lu G, Jing W H. Modulation of polyepoxysuccinic acid on crystallization of calcium oxalate. *Solid State Chem.*, **2015**,**231**:7-12
- [15]Stanković A, Kontrec J, Džakula B N, Džakula B N, Kovacevic D, Markovic B, Kralj D. Preparation and characterization of calcium oxalate dihydrate seeds suitable for crystal growth kinetic analyses. *J. Cryst. Growth*, **2018**,**500**:91-97
- [16]Donnet M, Jongen N, Lemaitre J, Bowen P. New morphology of calcium oxalate trihydrate precipitated in a segmented flow tubular reactor. *Mater. Sci. Lett.*, **2000**,**19**:749-750
- [17]Chen X W, Huang W B, Sun X Y, Xiong P, Ouyang J M. Antioxidant activity of sulfated *Porphyra yezoensis* polysaccharides and their regulating effect on calcium oxalate crystal growth. *Mater. Sci. Eng. C*, **2021**,**128**:112338
- [18]Zhang C Y, Wu W H, Wang J, Lan M B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. *Mar. Drugs*, **2012**,**10**(1):119-130
- [19]Bandarapalle K, Rajasekhar K K, Bhavitha J. Anti-urolithiatic activity of *Bacopa monnieri* by *in vitro* calcium oxalate crystallization methods. *Basic Pharmacol. Toxicol.*, **2021**,**5**(1):14-17
- [20]Sun X Y, Zhang C Y, Bhadja P, Ouyang J M. Preparation, properties, formation mechanisms, and cytotoxicity of calcium oxalate monohydrate with various morphologies. *CrystEngComm*, **2018**,**20**:75-87
- [21]Tonannavar J, Deshpande G, Yenagi J, Patil S B, Patil N, Mulimani B G. Identification of mineral compositions in some renal calculi by FT Raman and IR spectral analysis. *Spectrosc. Acta Pt. A - Molec. Biomolec. Spectr.*, **2016**,**154**:20-26
- [22]Kazemi -Zanjani N, Chen H, Goldberg H A, Hunter G, Grohe B, Lagugne-Labarthe F. Label-free mapping of osteopontin adsorption to calcium oxalate monohydrate crystals by tip-enhanced Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**,**134**(41):17076-17082
- [23]Muhammed Shameem K M, Chawla A, Mallya M, Unnikrishnan B K B V K, Santhosh V B K. Laser-induced breakdown spectroscopy Raman: An effective complementary approach to analyze renal calculi. *J. Biophotonics*, **2018**,**11**(6):e201700271
- [24]Kulaksızoglu S, Sofikerim M, Çevik C. *In vitro* effect of lemon and orange juices on calcium oxalate crystallization. *Int. Urol. Nephrol.*, **2008**,**40**(3):589-594
- [25]Daudon M, Letavernier E, Frochot V, Haymann J, Bazin D, Jungers P. Respective influence of calcium and oxalate urine concentration on the formation of calcium oxalate monohydrate or dihydrate crystals. *C. R. Chim.*, **2016**,**19**(11/12):1504-1513

- [26]Gan Q Z, Sun X Y, Bhadja, P, Yao X Q, Ouyang J M. Reinjury risk of nano-calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate crystals on injured renal epithelial cells: Aggravation of crystal adhesion and aggregation. *Int. J. Nanomed.*, **2016**,**11**:2839-2854
- [27]Rodgers A. Aspects of calcium oxalate crystallization: Theory, *in vitro* studies, and *in vivo* implementation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **1999**,**10**: S351-S354
- [28]Sorensen M D, Kahn A J, Reiner A P, Tseng T Y, Shikany J M, Wallace R B, Chi T, Wactawski-Wende J, Jackson R D, O'Sullivan M J, Sadetsky N, Stoller M L, WHI Working Group. Impact of nutritional factors on incident kidney stone formation: A report from the WHI OS. *J. Urol.*, **2012**,**187**(5):1645-1650
- [29]Liu H, Sun X Y, Wang F X, Ouyang J M. Regulation on calcium oxalate crystallization and protection on HK-2 cells of tea polysaccharides with different molecular weights. *Oxidative Med. Cell. Longev.*, **2020**:5057123
- [30]Grohe B, Rogers K A, Goldberg H A, Hunter G K. Crystallization kinetics of calcium oxalate hydrates studied by scanning confocal interference microscopy. *J. Cryst. Growth*, **2006**,**295**(2):148-157
- [31]Farmanesh S, Ramamoorthy S, Chung J, Asplin J R A, Karande P, Rimer J D. Specificity of growth inhibitors and their cooperative effects in calcium oxalate monohydrate crystallization. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**,**136**(1):367-376
- [32]Chung J, Taylor M G, Granja I, Asplin J R, Mpourmpakis G, Rimer J D. Factors differentiating the effectiveness of polyprotic acids as inhibitors of calcium oxalate crystallization in kidney stone disease. *Cryst. Growth Des.*, **2018**,**18**(9):5617-5627
- [33]Abdel-Aal E A, Yassin A M K, El-Shahat M F. Effect of crystallization parameters and presence of aqueous extract of *Nigella Sativa* on growth inhibition of calcium oxalate monohydrate particles. *Part. Sci. Technol.*, **2018**,**36**(2):226-234
- [34]Polat S, Eral H B. Elucidating the role of hyaluronic acid in the structure and morphology of calcium oxalate crystals. *Adv. Powder Technol.*, **2021**,**32**(10):3650-3659