

稳定同位素标记高分子材料制备及应用研究进展

刘婷婷, 王华山*, 张明秀, 王 美, 陈 醒

(天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

摘要: 稳定同位素标记技术在化学分析中具有广泛的应用。随着高分子材料在各个领域应用越来越广泛, 对高分子材料服役性能、环境降解性能、生物体内代谢性能、高分子材料功能化等的研究越来越深入, 便于表征的稳定同位素标记高分子材料的需求越来越大, 但稳定同位素标记高分子材料品种少、研究少、应用难以满足。本文从高分子材料标记选位、合成方法、应用研究等方面, 综述了国内外稳定同位素标记高分子的标记合成与应用研究现状, 展望了该领域未来的研究方向及应用前景。

关键词: 稳定同位素; 高分子; 应用; 进展

引言

具有相同质子数不同中子数的同一元素的不同核素互为同位素, 按其半衰期可分为稳定性同位素和放射性同位素。同位素的原子结构使得其具有独特的性能优势, 人们利用这种特性开发了它的重要应用——示踪。最初被选为示踪剂的同位素为放射性同位素, 其放射性使得带有放射性同位素的材料或输送场所在出现异样时, 可及时通过计数器或其它简单的方法根据放射性同位素的数量变化发现问题所在。由于在相同化学性能的基础上, 它的放射性使得它易于被发现与测量, 因此常被人们应用于勘探复杂或者不易发现的问题。如今, 放射性同位素已广泛应用于军事、民用核反应堆、医学、考古等领域。但即使如此, 放射性同位素也有其应用不便的情况, 比如放射性防护安全问题, 或遇到没有合适半衰期的放射性同位素等问题。

稳定性同位素在同样不改变化学性质的基础上, 还兼具无放射性、无毒的特性, 在分离制备、合成及使用的过程中, 也无需特殊防护, 操作更方便安全, 因此人们开始了对于稳定性同位素的探索。自 1934 年 Harold Urey 凭借着发现并命名了氢的稳定同位素氘获得了诺贝尔奖以来, 于 1940 年含有以氘为稳定性同位素标记的重水已经在美国大规模工业化生产。随后含有重氢标记的大量试剂、化合物及应用也随之出现。而自 20 世纪 80 年代开始, ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S 等其它稳定性同位素产量也迅速增长。目前, 常用稳定同位素标记试剂有重水、 $^{13}\text{CO}_2$ 、 ^{15}N 标记的氨基酸、不同稳定同位素标记的核苷酸、蛋白质、酯类以及常用于合成聚合物塑料纤维的单体有机物等。基于稳定同位素标记物与非标记物的差异, 再联合不同的分析仪器如质谱、核磁共振等, 进一步获得物质或元素的数量、位置变化, 使得其适用范围更加广泛, 为研究反应路径、原理、产物中的元素来源等问题提供了方便有力的工具, 且对设计研发新材料、了解生物代谢及反应作用规律等也提供了新的方法思路。

目前, 国内对于稳定性同位素的提取以及进一步开发利用水平都还不足, 相关技术都有待进一步发

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.04.001

收稿: 2018-07-03; 修回: 2018-11-05;

作者简介: 刘婷婷 (1995-), 女, 硕士生, 主要研究方向为同位素标记高分子材料制备及应用。E-mail: 1368380706@qq.com;

* 通讯联系人: 王华山 (1971-), 男, 副教授, 主要研究兴趣集中于纳米材料、功能高分子、高分子相关分析检测等领域。E-mail: whs@tust.edu.cn; Tel: 022-60601131.

展提高,相关研究也亟需重视。本文从稳定性同位素标记的选位、制备及稳定性同位素标记的高分子在生物医药领域、农业、污染监测等领域的应用等方面,对近年来稳定性同位素标记高分子的研究进展与应用进行综述,着重讨论了稳定同位素标记在监控高分子代谢过程中的优势、进展及前景。

1 稳定同位素标记的高分子制备

稳定同位素的提取制备技术已经渐渐发展起来了,常用的稳定性同位素提取方法如表 1 所示。

表 1 常见同位素提取方法
Table 1 Common isotope extraction method

元素	提取方法	历史	现状
氢	化学交换,蒸馏,电化学	气体热扩散	蒸馏,分子激光,色层,离子交换
碳	蒸馏,化学交换	气体热扩散	电化学,分子蒸馏,色层,化学交换
氮	蒸馏,化学交换	气体热扩散	分子激光,离子交换
氧	蒸馏,气体热扩散	气体热扩散	分子激光,离子交换,化学交换 蒸馏,分子激光,电化学
硫	化学交换,液体热扩散,气体离心	气体扩散	蒸馏,分子激光,电化学
氯	液体扩散	气体扩散	蒸馏,分子激光,电化学

通常稳定同位素标记的试剂则有化学合成法和生物发酵法两种方法制备,我们可以根据成本、简便程度、精度纯度需求等选择不同的方法去合成所需示踪剂。在本文中,我们以稳定同位素标记试剂所标记的选位分类,来介绍不同高分子的稳定同位素标记方法。

1.1 以单体方式标记稳定同位素路径制备标记高分子

以单体方式标记高分子,即使得高分子的每个重复单元上均带有稳定同位素的标记,是同位素标记中最简便、直接的方式。通常是将已带有标记的单体直接进行聚合反应,或通过生物合成法,用带有标记的营养物质通过特定的生物作用产生所需的带有标记的高分子产物。而目前已经可以得到纯度较高、丰度较高的稳定同位素标记的高分子有以下几种。

1.1.1 ¹³C 标记的纤维素 自然界中大多数纤维素由植物产生,少数由微生物产生。在考虑人工合成与生物合成过程路径利弊后,发现生物发酵法工艺简便,容易标记,制备方便。因此,有研究利用生物发酵法合成了¹³C 标记的纤维素。研究利用可发酵产生细菌纤维素的醋酸杆菌属为菌株,培养在含有¹³C₆ 葡萄糖的营养液体系中,培养一段时间,将含稳定同位素¹³C 标记的纤维素产生后分离提纯,经后处理可得到这种带有¹³C 标记的纤维素,且丰度可达到 99%。与其它方法制备的¹⁵N 标记的纤维素相比,利用这种生物发酵法制备的¹³C 标记的纤维素具有过程简单、成本较低、丰度高的优势。标记后的纤维素可应用于结构分析、新药设计、降解研究、发酵代谢研究等。

1.1.2 ¹³C、¹⁵N、²H 标记的 DNA 生物发酵法:利用带有¹³C、¹⁵N 或氘标记的葡萄糖和铵盐原料在微生物内合成核苷酸,在利用 DNA 复制、转录的形式,以 DNA 单链为模板合成带有一半标记的 DNA 分子后,在以标记的单链为模板,合成全部标记的 DNA 分子。以这种方式可以根据需求获得不同标记程度的 DNA。(如图 1 所示)

虽然传统上了解 DNA 结构的方法有很多,如核磁、红外,但是想要了解大分子的全部结构的详细信息以及核苷酸的序列富集程度,同位素标记就是个很好的研究方法。DNA 作为生命体中的必须大分子,标记稳定同位素后,使其具有更广泛的应用领域——司法鉴定和医学诊断。标记后的 DNA 更利于研究其分子结构,且利用其多样化的纳米结构获得特定形状和功能的分子。

1.1.3 ¹³C、¹⁵N 标记的蛋白质 蛋白质是生物体中重要的物质基础,并且作为生物体中基础物质,参与

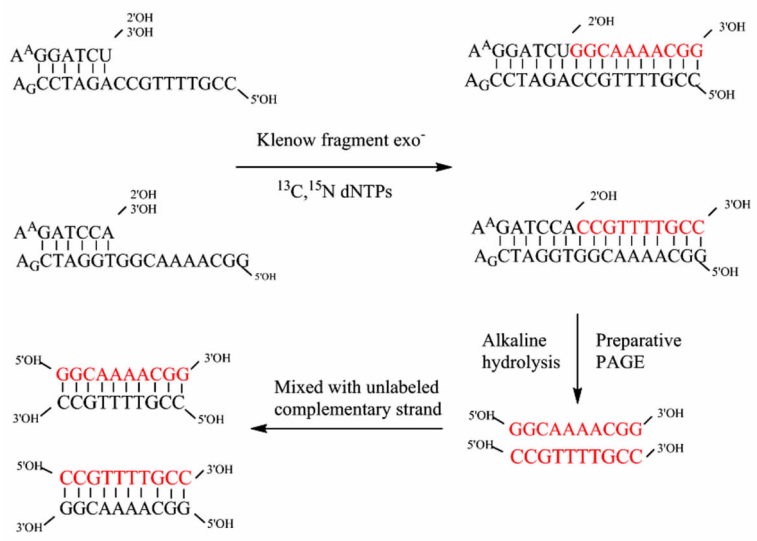
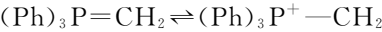


图 1 Zimmer 和 Crothers 的方法(红色标记为稳定同位素标记的核苷酸)^[8]
Figure 1 The method of Zimmer and Crothers(red labeled nucleotides)^[8]

了各种代谢与生命活动,因此对它的标记是为生命科学研究中提供了有价值的工具。例如,有研究利用细胞培养的生物方法,标记细胞膜上的离子通道,用以研究并了解离子通道的生理功能与作用路径。研究利用¹³C 标记的葡萄糖和¹⁵N 标记的 NH₄Cl 对离子通道上的蛋白质进行标记,即在有质粒存在的环境下,将培养获得的细胞放入¹³C 标记的葡萄糖和¹⁵N 标记的氯化铵营养液中。质粒是细菌、酵母菌和放线菌等生物中染色体(或拟核)以外的 DNA 分子。在研究^[45]中还描述了¹³C 和¹⁵N 标记的离子通道(KcsA)的纯化以及随后将该蛋白质重构为脂质双分子层。这样制备的带有标记的蛋白质,就可以再通过人工方法迁移到磷脂双分子层上,从而检测离子通道的生理功能及代谢过程,毕竟在许多疾病及生理反应中离子通道起着关键作用,因此,稳定同位素标记的蛋白质为方面的研究提供了很多方法和思路。

1. 1. 4 稳定同位素标记的聚异戊二烯 除了生物体中的高分子物质外,对于现在广泛使用的高分子材料,稳定同位素的标记也是一种优良的探索工具。例如,已有研究用¹³C 标记聚异戊二烯研究聚合物中的结构等性能。

带有¹³C 标记的聚异戊二烯是通过 Witting 反应得到的。先用带有¹³C 标记的甲基碘和三苯基膦在二乙基乙醚的环境下合成带有标记的甲基-三苯基碘化磷(MTPI),再将 MTPI 溶于纯净二苯基乙醚与丁基锂,在-5℃ 己烷条件下反应,生成带有亚甲基阴离子的平衡体系:



再与异丁烯醛通过 Witting 反应合成带有标记的烯烃单体,参与聚合反应得到带有稳定同位素标记的聚异戊二烯,标记位置可在 1C 或 4C 上(如图 2 所示)。

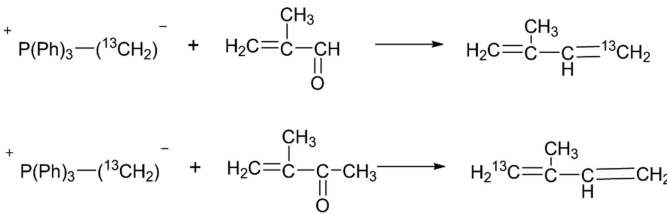


图 2 标记异戊二烯的流程图^[5]
Figure 2 Schemes of Isoprene marking^[5]

虽然核磁是一种了解弹性体化学结构很便利的手段,但是像聚异戊二烯这样在良好溶剂里也会因为 C、H 轻微化学改变而引起剧烈变化的聚合物来说,这种方法就没有这么准确灵敏了。经研究,带有稳定同位素标记的聚合物与未带标记的聚合物对比发现(如图 3 所示),带有标记的聚合物可以使核磁方法灵敏度提高两个数量级^[5]。通过使用¹³C NMR 光谱观察脂肪族区域,通常更容易测定顺式和反式异构体含量。根据顺式或反式结构中甲基和亚甲基都表现出化学位移的显著变化,利用稳定同位素标记聚合物,可以使我们对聚合物研究得到的信息增加,因此,合成带有稳定同位素标记的聚合物在分析聚合物具体结构与性能方面也是很重要的。

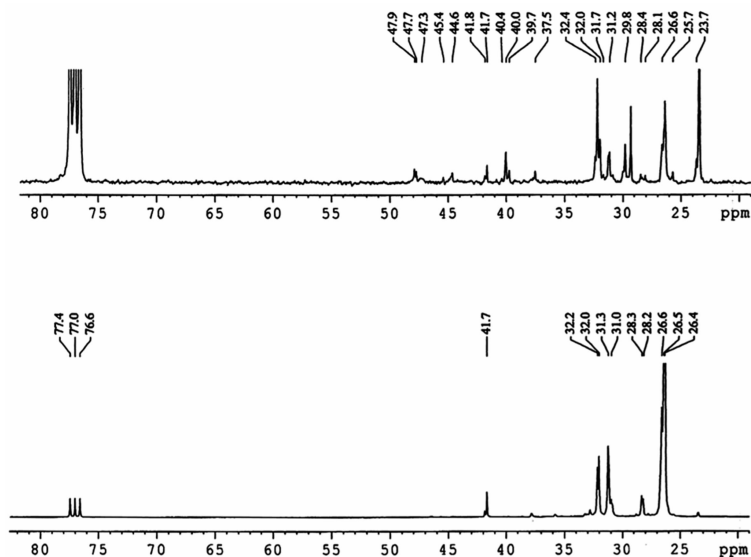


图 3 ¹³C 标记聚异戊二烯的核磁谱图^[5]

Figure 3 ¹³C labeled and unlabeled polyisoprene nuclear magnetic spectra^[5]

1.1.5 稳定同位素标记的聚丙烯腈 ¹⁵N 标记的聚丙烯腈是通过引入氨和氢氰酸(HCN)制备的。利用标记¹⁵N 的氯化铵释放含有标记的氨气,用标记的氨气处理丙烯腈,再通过阀门分离到室温下的含有四氢呋喃的反应容器中,最后在真空条件下将标记有¹⁵N 的丙烯腈结晶出来^[5]。类似的方法还可以合成带有标记的甲基丙烯腈。用标记的单体进行自由基聚合,就可以得到含有稳定同位素标记的¹⁵N-PAN。

众所周知,傅里叶红外光谱是观察化学变化的一种有力工具。而近期有研究发现,在聚丙烯腈的红外光谱数据中,观察到的聚丙烯腈中—CN 的波谱范围不符合已知的碳氮三键应产生的波谱范围,由此设想出三种可能的迁移结构,由于这种现象的发现,有人研究认为很有可能发现了一种新的化学转化机理^[6]。为了验证这种猜想,就可以利用合成带有稳定同位素标记的聚丙烯腈研究这一转化机理。

而日常生活中,常用的高强度碳纤维通常就是聚丙烯腈,但其中会含有小部分单体参与共聚,如丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸盐等。利用稳定同位素标记后,对这种热力学过程的变化也可以有更清晰的研究,且应用该原理,对开发设计新材料或更高强度的材料也有很大的助力。除此之外,为控制反应的进行也提供了思路。

1.2 在侧链/侧基标记稳定同位素路径制备标记高分子

通过对侧链或侧基标记,也是对标记位置的一种特殊选择,通常使用人工合成的方法去控制,而对于这种方式标记也有其自己的优势。通常,侧链标记的物质在人工控制的情况下具有一定的已知的同位素丰度,这也就为定量分析提供了基础。下面是已经较为成熟的对于侧链或侧基的标记。除此之外,在不方便对全部单体标记或不必要对全体部位标记的情况下,也可以选择这种方式。

1.2.1 稳定同位素标记的蛋白质组学 在定性或定量监测人体中的代谢信息以此来诊断、治疗疾病和分析病理时,生物学样本的反应敏感性不足和缺乏稳定性是比较常见的两个问题。人们发现由于稳定同位素与普通元素的物理化学性质相同,但却具有标识性的特征,可以作为一种合适的示踪剂解决这个问题。已有研究表明,用同位素标记的衍生物可以在复杂矩阵环境下多重代谢反应中提供可靠数据。由于人体反应的复杂性和所涉及的产物、副产物、中间产物众多,原理多样复杂,为解决此问题,研究制备以稳定同位素编码标记的蛋白质组学可以更好地研究代谢机理及病理等,对人类有巨大贡献。根据现有研究,已经有许多应用于蛋白质组学标记的方法和策略了,如 ICAT\ICPL、IDBEST、iTRAQ、TMT、IPTL、SILAC 以及 ICEED。这种方式^[8]是利用制备一种稳定同位素标记的亲核性标签来标记蛋白质的。一般这种标签的制备要求产物需要带有至少三个部分:反应活性位点、可稳定同位素标记部分(一般为²H、¹³C、¹⁸O、¹⁵N)、亲核性或亲电性部分或疏水性调节部分。而常用于在标签中引入同位素的方法有三种:第一种方式是用带有 H-/²H-或¹²C/¹³C-编码的烷基卤化物进行 N-/O-的烷基化;第二种方法是 H-/²H-或¹²C/¹³C-醛的还原胺化;第三种途径是用²H-或¹³C-编码的吡啶、喹诺酮和一些氨基酸衍生物。出于对同位素效应的考虑,一般应用¹³C 合成试剂更方便使用,再将这些标签通过标签上的活性位点与相应的基团反应,接在蛋白质上即可。采用不同的基底合成的 ICEED 可以应用于不同物质的变化过程检测,并且将由这种方法合成的稳定同位素衍生物试剂应用于 ESI-MS 去分析监测,可以直接分析溶液中的质子亲和性,检测难挥发或热稳定性差的分子,增加了定量分析的准确性。这种稳定同位素试剂的合成既扩大了稳定同位素的应用范围,也提高了分析上的精确度和灵敏度(如表 2 所示)。

表 2 用于分析的胺、氨基酸和酚类的 ICEED 试剂的举例^[10]
Table 2 Examples of ICEED reagents for analysis of amines, amino acids and phenols^[10]

代谢物	ICEED 试剂	质量分析器	生物样品 z	应用
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DNSCI	FTICR	人的唾液	差异分析(对照/微弱的无法识别的受试者)和生物标志物的发现
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DNSCI	FTICR	鼠尿	差异分析(对照/家族性阿尔茨海默病模型小鼠)和生物标志物的发现
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DNSCI	QToF	人的尿液和汗液	代谢组分分析(分别为尿液和汗液的候选代谢物 ca.4500 和 3900)
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DNSCI	ToF	人的尿液和排泄物	代谢组分分析(分别为尿液和排泄物的候选代谢物 ca.2500 和 2500)
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DNSCI	ToF	人的排泄物	代谢组分分析(候选代谢物 ca.1800)
胺类和酚类	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ / ¹³ C ₄ -DENSICI	FTICR	人的尿液	差异分析(健康受试者的每日样本)和绝对定量(健康受试者的 20 种氨基酸)
氨基酸	² H ₀ / ² H ₃ -MASCI	QQQ	人血清	绝对定量(健康受试者/肝炎患者 6 种氨基酸)
氨基酸	iTRAQ 试剂	QQQ	大鼠血浆,小鼠血浆,尿液,肝脏和肾脏组织	绝对定量(糖尿病模型大鼠 44 个氨基酸)
氨基	¹³ C ₀ / ¹³ C ₆ -BA-NHS	QToF	细胞提取物	差异分析(未处理/双氧水处理的 HL60 细胞)
氨基	¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -DBAA-NHS 或 ¹³ C ₀ / ¹³ C ₂ -MBAA-NHS	QToF	人体尿液	代谢组下分析(候选代谢物 ca.1000)和绝对定量(20 个健康受试者的氨基酸)
氨基酸	² H ₀ / ² H ₃ -PGA-NHS	QQQ	人体血清	差异分析(加入样品中的 D/L-氨基酸比)
氨基	三聚氰酸和 ² H ₀ / ² H ₃ -甲胺	QToF	细胞提取物	绝对定量(HepG2 细胞中的 26 个氨基酸)
PEs	² H ₀ / ² H ₆ -丙酮以及 NaBH ₃ CN	QQQ	大鼠肝脏组织	差异分析(正常/高脂饮食的大鼠)

1.2.2 稳定同位素标记的三元乙丙橡胶 对于合成高分子的标记也有以下实例(见图 4)。

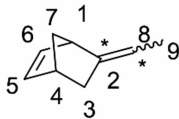


图 4 亚乙基降冰片烯的分子式及标记位置^[4]
Figure 4 Structural formula of ethylidene norbornene^[4]

乙丙橡胶通常由乙烯、丙烯和一些带有双键的单体共聚而成。这样使得聚合物上带有不饱和键,可以进一步交联。为了对橡胶进行标记,我们先将带有¹³C 的乙酸制得丙烯酸乙酯,然后与环戊二烯通过狄尔斯-阿尔德反应制得带有标记的亚乙基降冰片烯^[4](如图 4 中 2、8 号位上为¹³C 标记),再将带有¹³C 标记的亚乙基降冰片烯通过内环双键连接在乙丙橡胶主链上,可以使得聚合物的侧链上标记有稳定同位素,利用核磁共振,可以作为研究乙丙橡胶化学转化的良好工具。ENB 作为乙丙橡胶上的不饱和部分,很有可能参与交联过程。原本橡胶交联过程的产物是很难确定的,而加入稳定性同位素标记后,监测这一过程及研究产物情况变得简单多了。标记 ENB 烯丙基上的碳原子是研究交联反应最直接的方法,且由于标记部分是橡胶中的主要不饱和部分,橡胶发生化学反应时的主要反应基团也很大概率地发生在这一部分,因此稳定同位素的标记也可以研究及表征该橡胶的化学反应发生情况。经研究证实,标记部分确实是共聚物在交联过程中双键减少的原因,且化学反应发生的区域也是这一部分。

1.3 以封端方式标记稳定同位素路径

这是比较少见的一种标记方式,通常在不需要参与代谢过程或者没有分解或重组的过程中使用此方法标记,既简便又节约成本。例如,在蛋白质组学的研究中,以 IPTL 标签的方式标记蛋白质,并研究其代谢过程^[8]。研究表明,通过以下封端方式可以制备 IPCL 标签。

IPTL(同重异位标记肽),这种方式是通过产生同重异位肽对作为标记。其中,由状态 1 中 MDHI 标签(在 C-末端)处的氘原子引起的质量增加,通过 SA 标签中由氘原子引起的质量增加来补偿(在 N 末端)处于状态 2。这种标记方法应用在对蛋白质组学的研究中时,最大的优势在于,在质谱谱图中所有序列确定的离子(y 和 b 离子)存在定量特征,每个肽提供多个定量数据点,这使得在低质量范围内质谱的灵敏度提高。如图 5 可以看出,质量变化的倍数被放大了。这对于人体中蛋白质的研究有提供了更精确的工具。

2 应用

随着分析仪器的的发展,对于稳定同位素的测量方法,也更加便利,最常与稳定同位素标记联用的仪器测量就是质谱和核磁。而这两种常用方式各有优劣(如表 3 所示)。

表 3 不同监测分析方法的优劣比较
Table 3 Comparison of advantages and disadvantages

方法	优点	缺点
质谱	高灵敏度(功能性官能团尤其灵敏)	样品制备需要分离水相和有机相
	高分辨率(在使用质谱前用各种色谱进行分离)	分析结果受代谢物电离的影响,因此样品绝对定量
	串联质谱(MS/MS)母离子的碎裂使得能够对代谢物量进行定量监测	复杂样品很难定性,会增加检测时长,且样品无法恢复(即无法回收)
		通常不可能确定碎片在分子内的碎裂位置
核磁	制样简单,具有高重复性,运行时间短,不需要平衡回复时间。	低灵敏度使低丰度代谢物的测量变得困难
	能提供结构信息,能够确定分子中基团的位置。可以区分不同的底物和结合途径	测量前没有色谱分离导致许多共振重叠
	样品可回收,且可以运用于生物体内的测试	

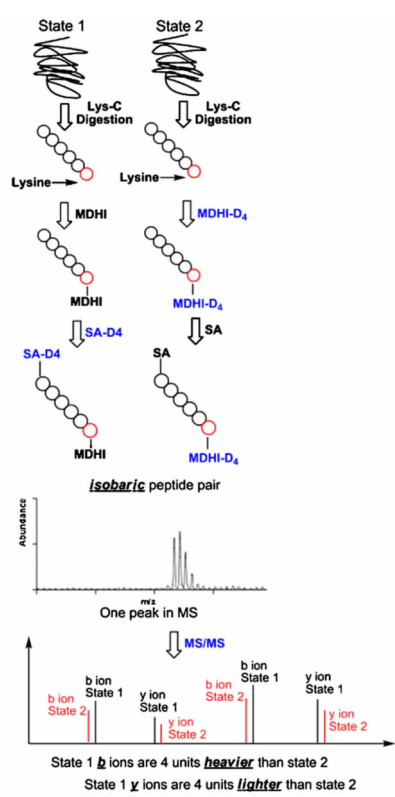


图 5 IPTL 试剂合成流程^[49]
Figure 5 IPTL reagent workflow^[49]

2.1 稳定同位素标记应用于 DNA 监测

稳定同位素标记的优势最有利于应用在生命科学的探索等领域。其中,对于 DNA 的监测就为人类生命科学研究做出巨大贡献^[8],除此之外,在法医学与医药诊断领域也有着突出贡献人体中也含有大量高分子,最典型的就是蛋白质,定性定量地分析人体中流体和组织的代谢变化对于诊断、了解病理和治疗都能提供十分有价值的信息。最近,各种分析仪器的快速发展提高了人们对于人体的分析能力,而其中稳定性同位素作为一种无毒无害的示踪剂,发挥了很大的作用,结合气相色谱、质谱等器械分析,可以让人们快速简洁地研究人体内重要物质的转换、输送等变化。

2.2 稳定同位素标记应用于代谢动力学研究

首先,将已知丰度的稳定同位素标记试剂与原物质混合,在测量代谢后产物中稳定同位素的含量变化,这是最容易想到的动力学监测方法。而事实上,稳定同位素标记的代谢动力学监测也是其重要的应用^[13]。稳定同位素标记在代谢动力学的应用方式可分为两种:一种是该稳定同位素示踪剂不参与任何代谢转换过程,即自发型动力学;另一种则是要考虑示踪剂的转换,示踪剂作为一种原料,进入或产生一种或多种其它产物——异源型动力学。

举例分析:

如图 6 所示,自发型动力学分析,即在一个同源的容器中,先将未标记的同源物质输入容器,可以测得输出流速与输入流速相同,而把标记后的稳定同位素以不同的速度输入时,可以发现同位素流出速度未变,而原物质流速也未变。由此可知,输出时示踪剂/被示踪物质的比率与输入时比率相同,因此,可发现该物质的比率仅与同位素扩散均匀后的平衡丰度有关,与同位素达到平衡的时间无关。由此可以发现一个规律,即可以恒定输入速率,而恒定输入速率的主要优点在于其准备预注射剂量时的简易和相对简便性。而在某些应用中的限制则是同位素富集平衡问题。另一使用这种方法的优势在于当系统的生理学

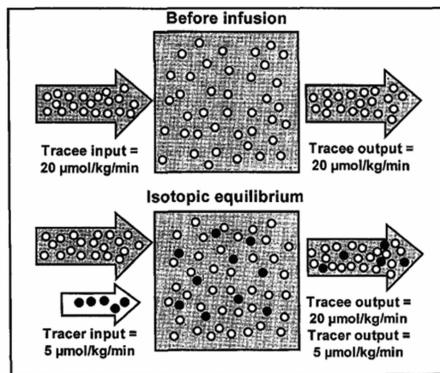


图 6 示意图显示,未标记的被追踪物质和标记的示踪剂输入到一个自由混合池中。

在同位素平衡时,示踪剂输出的速率等于示踪剂输入的速率^[7]。

Figure 6 Determination of Ra. Schematic diagram shows input of unlabeled tracee and labeled tracer into a freely mixing pool. At isotopic equilibrium, the rate of tracer output equals the rate of tracer input^[7].

环境受到严重干扰时,可以快速简便地监测比率的快速变化。这一规律也可在较宽泛的生理学条件下应用于许多其它同类物质的代谢动力学,如氨基酸、尿素、脂肪酸、葡萄糖等。这种应用方式主要是应用于没有化学变化的动力学应用,而对于稳定同位素标记的选位也可以考虑后两种简捷节约成本的方式,或者根据需要进行控制。

异源型动力学——部分产物的合成速率(FSR)。

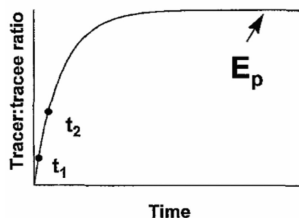


图 7 展示了一个理想化的单池系统的浓缩平台。FSR 是由初始斜率推导出来的,可通过测量 2 个时间点, t_1 和 t_2 的浓度变化来近似地近似。

Figure 7 Determination of the FSR. Increase to plateau enrichment of an idealized single-pool system is shown. The FSR is derived from the initial slope, which can be closely approximated by measuring the change in enrichment over 2 time points, t_1 and t_2 ^[7].

图 7 为理想的单个系统中稳定同位素丰度趋于平衡的曲线,而被测物质的合成速率近似初始斜率,即可测两组不同时间下的丰度,然后可以利用公式 $FSR = (E_{t2} - E_{t1}) / (t_2 - t_1) \times E_p$ 。这一规律已经广泛应用于蛋白质的合成研究,尤其是肌肉组织和血浆蛋白中的蛋白质合成研究。理论上,此方法还可以应用于任何以稳定同位素为原料的直接产物的合成速率研究。

测量合成速率的常用方法方式即测量稳定同位素质量分布(MIDA),这种方式在测量合成速率上的应用越来越广。本方法的测量原理如下图,在预先准备的容器中准备平衡好的同位素源,然后单体会与这些前体单元随意结合,结合结果如图 8 所示,得到从 0— n 的不同丰度的单体(n 是产物分子中单体亚基的数量),且分布符合 $F(M+n_1) = [(n)! / (n-1)! \times (n_1)!] \times p^{(n_1)} \times (1-p)^{(n-n_1)}$ 的函数。但这种方法也有应用范围限制,此方法仅能有限应用于包含多个来自稳定同位素源的单元的高分子。

因此,稳定性同位素可以作为示踪剂应用于多种物质,如蛋白质、氨基酸、脂类、糖类的代谢过程,甚至是通过标记这些物质追踪线粒体等功能活性物质的代谢过程。

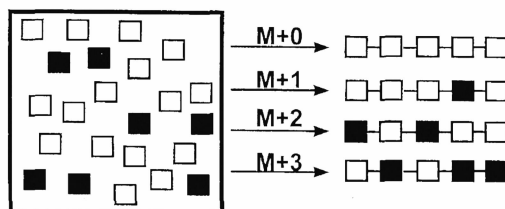


图8 测量稳定同位素质量分布。将被纳入产物的前驱体从一个具有同位素标记(■)的样品池中随机抽取,则在产物中存在一定数量的标记前驱体的概率由样品池的富集和二项扩展公式决定^[7]。

Figure 8 Mass isotopomer distribution analysis(MIDA). Precursor subunits to be incorporated into a product are randomly taken from a pool that has been isotopically labeled(■), The probabilities of incorporating a given number of labeled precursors into the product are determined by the precursor pool enrichment and the binomial expansion formula^[7].

2.3 稳定同位素标记应用于监测代谢过程

稳定同位素目前作为安全无害的示踪剂,研究发现,它的这种优势可以应用于对生物代谢的研究。比如:将带有稳定同位素¹⁵N标记的氨基酸放入生物体,通过气相色谱法或质谱监测同位素,发现氨基酸中标记的¹⁵N出现在两个不同的代谢产物中,因此可以由此引出进一步的研究,引领我们去研究生物体复杂的代谢过程。

2.3.1 稳定同位素标记监测生物中的代谢 有研究表明,利用¹³C标记的基质,通过改变细胞膜的通透性进入细胞膜内置换掉原有的细胞基质,带有标记物的细胞基质供给线粒体代谢,通过对比标记与未标记环境下的代谢产物所含有的¹³C的含量变化,确定线粒体作用后的细胞代谢物变化是否是由线粒体的作用引起的。这项研究也可应用于将正常人与病人的代谢产物对比,从而判断线粒体是否病变。因此,稳定同位素标记在医药学、病理学等领域也是有着重要价值的。

2.3.2 定量诊断 稳定同位素还有一个重要的应用是可以定量测量并反映问题,为疾病的诊断提供了一种新途径。人体内各种物质的量是处于动态平衡的,当平衡被打破时,往往就是某个部位病变引起的,因此,能够方便地定量测量某些生存必须物质是快速及时诊断一种疾病发生的重要途径。例如, β 淀粉酶是淀粉样前体蛋白通过 β 、 γ 分泌酶的连续水解作用的产物。我们现已发现,阿尔兹海默病与 β 淀粉蛋白42与 β 淀粉蛋白40(异构体)的缓慢清除率有关。因此,可以通过标记培养细菌的媒介获得带有标记的蛋白质,将带有稳定同位素¹³C₆标记的亮氨酸输入人体,每小时通过脊髓导管获取6mL脑脊液,持续36h,然后将37个样品分别用金属内肽酶消化作用处理后,再用液相色谱或选择反应监测分析。每组标记的 β 淀粉蛋白的含量是由 β 淀粉蛋白的异构体数决定的。用SRM可以使用软件定量分析,通过代谢作用后的 β 淀粉蛋白的异构体数量与健康人体中的蛋白质数量作对比,很快就能发现不同病诊断疾病,这一标记方法,除了给快速诊断带来了发展方向,也可以应用于更深入的研究病理。

而在农业中,人们用塑料来帮助保水和减少除草剂和除虫剂的使用,但这些使用过后的废旧塑料处理变成了困扰问题。为了缓解这一问题,有研究用¹³C标记的纤维素分别与聚烯烃、聚酰胺、带有苯环的聚烯烃等不同种塑料共混,用催化快速热解液技术对它们进行热解处理,监测热解产物中¹³C/¹²C的比率,以观察快速热解的活性机理及产物中碳来源,这种快速热解技术是目前绿色缓解这一问题的重要研究方向(见图9、10、11)^[44]。从得到的结论来看,产物中烷烃的碳主要来自纤维素,而塑料中的碳主要会成为产物中萘类的碳,除此之外,还可以发现聚烯烃有促进纤维素中碳热解的作用。根据这些结论可以选择合适的塑料材料与纤维素共混催化,这些研究对于通过CFP(催化快速热解)工艺从生物质和废弃农用塑料中提高脱氧热解液和选择性芳烃的产量提供了很大的帮助。由此看来,稳定同位素在高分子材料的有关研究中同样适用,且有着很大的帮助和便利。

2.4 质谱标准品

质谱监测法已经广泛应用在物质的定性和定量分析中,尤其是对蛋白质组学的分析,质谱是重要的

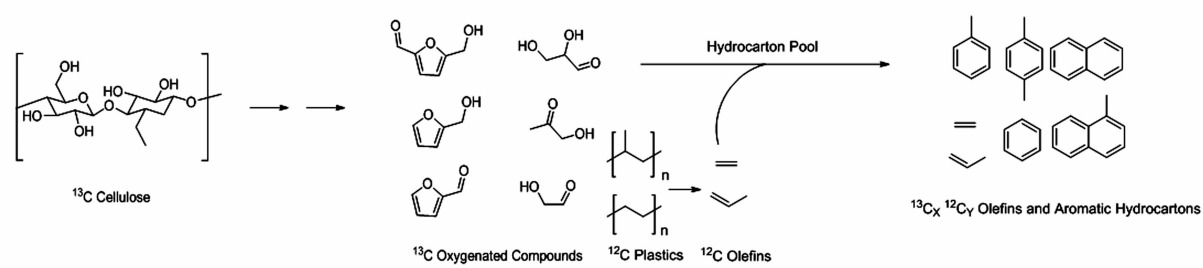


图 9 CFP 产物中的烯烃来源
Figure 9 Source of olefins in CFP products

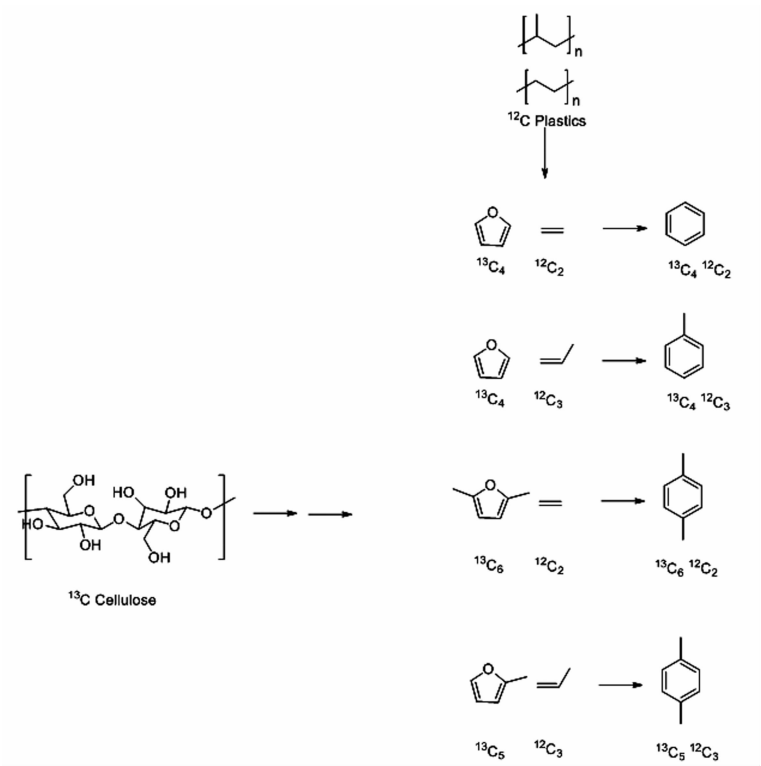


图 10 CFP 中苯环来源
Figure 10 Source of benzene ring in CFP

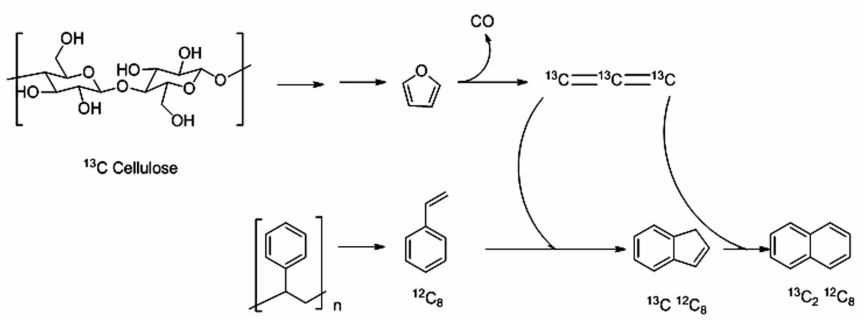


图 11 CFP 中萘来源
Figure 11 Sources of naphthalene in CFP

分析工具。而质谱标准品是定量分析中必不可少的辅助工具。随着质谱在 高分子材料中的应用,相应的质谱标准品也是必须的。

随着塑料材料的使用增多,其相应的废旧污染物也大量排放入海洋,因此,对于污染物的监测技术也应顺势提高。有研究通过元素分析仪/同位素比率质谱对稳定同位素标记的塑料材料中¹³C 含量的变化做出调查研究,将海洋生态系统中常用的塑料材料分为生物性塑料和非生物性塑料,即可被生物降解的与不可降解的(见图 12)。其中¹³C 的含量由以下方程组计算:

$$F_{C3plant} + F_{LDPEpolymer} = 1$$
$$d^{13}C_{recycled\ plastics} = F_{C3plant} \times d^{13}C_{C3plant} + F_{LDPEpolymer}d^{13}C_{LDPEpolymer}$$

将同位素含量以标准参考材料标准化为每千分含量记,可用以下公式记为:

$$d^{13}C(\text{‰}) = [(^{13}C/^{12}C_{sample}) / (^{13}C/^{12}C_{VPDB}) - 1] \times 1000$$

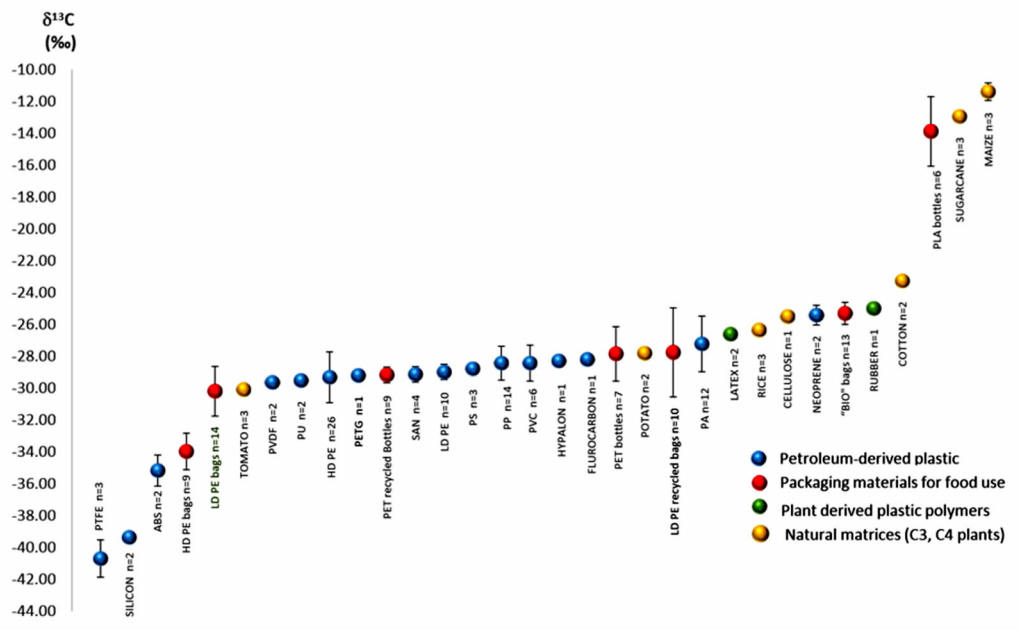


图 12 不同聚合物(石油和植物)、食品用包装材料和天然基质(C3 和 C4 植物)的¹³C δ 值
(n ¼ 个样本值、平均值和标准偏差)^[50]

Figure 12 δ¹³C values of different polymers (petroleum and plant-derived), packaging materials for food use and natural matrices (C3 and C4 plants) (n ¼ number of samples, mean and standard deviation are reported)^[50]

利用稳定同位素标记的塑料材料进行监测,并作为未来调查及监测海洋环境的标准工具数据库,稳定同位素在用于检测治理海洋污染方面发挥了很大的作用:确定组成并将塑料分类。虽然,目前还未评估这些材料的降解速率如何以及是否受同位素转移的相关过程影响,但¹³C 的转移与含量变化还是最有可能与物理/化学或生物降解有关。为了研究在环境中释放的塑料废物的降解过程(非生物和生物形式的)中涉及的反应,同位素质谱法仍是适用的,并且在未来对此过程的研究上仍是一种有力工具。

2.5 结构分析

除了最常用的质谱和核磁,稳定同位素标记还可与红外联用。红外光谱是一种研究高分子结构常用工具,将它与稳定同位素标记联用能更精确地研究高分子的凝聚态结构。例如,有研究将部分氧化的全同立构聚苯乙烯作为样本,以同位素分析法研究其凝胶态的特异气相红外波段,并对产生这种特殊波段的原因做出了分析研究。

例如,在图 13 中,以苯环上的氢被氧化的样本与普通样本对比,很明显看出,983cm⁻¹谱带的结晶敏

感特性与分子间或分子内相互作用无关。

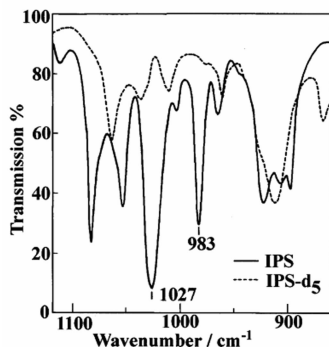


图 13 标记与未标记的聚苯乙烯红外谱图对比^[46]

Figure 13 Infrared comparison of IPS and marked IPS^[46]

2.6 分离应用

2.6.1 稳定同位素标记在人体中的分离应用 基于稳定同位素标记的聚合物分离(PEG),即同位素稀释法定量分离。同位素稀释法是一种应用放射性同位素(或稳定同位素)进行化学分析的一种方法。将一定量已知放射性比度(或稳定同位素比丰度)的同位素或标记的化合物加入试样中,与被测物质均匀混和,待交换完全后,再用化学力一法分离出被测元素或化合物,提纯并测定其放射性比度(或比丰度),按其放射性比度(或比丰度)的改变,根据一定的关系式,可计算该元素或带有该元素标记的物质在试样中的含量。

高分子量的聚乙二醇(PEG)在健康人和 IDB 患者体内的渗透性是有差异的,根据这一发现,有研究将带有稳定同位素²H 或¹³C 标记的聚乙二醇利用同位素稀释法应用在定量分离上,可以缩短检测周期,并且纯度可达 99%。作为定量方法的稳定同位素稀释测定法(SIDA),用于从平均分子质量为 400Da、1500Da、3000Da 和 4000Da 的混合物中选出 PEG 同系物并定量,该研究是以提供的人类和小鼠尿液作为样品。按照 Abello 等的方法进行合成标记的 PEG 同源物:使用¹³C 标记的溴乙酸作为稳定同位素源,将 PEG 溶于二氯甲烷,后将¹³C 溴乙酸、碘化钠和氢化钠添加到 PEG 同系物溶液中,待反应结束冷却后加入 LiAlD₄,将过量的试剂萃取后,用中性水洗涤剩余产物后干燥,即可得到标准同位素标记的 PEG。将平均分子量 3000 和 4000 质量范围内的 PEG 进行标记并以此为标准,重复合成和纯化,以备后续使用。根据核磁共振谱图可以发现,在 D₄-甲醇中,PEG 有两个特征峰。在¹³C₄²H₄ 标记的 PEG 标准品中,这原本裂解成四个峰四个质子与¹³C 碳原子偶联,导致 3.58ppm 信号分裂成 3.38ppm 和 3.74ppm 处的双重信号的双峰,其中两个质子各自积分。因此根据这一变化,就可以区分标记与未标记的 PEG。而根据标记与未标记的 PEG 在质谱中的不同行为,则可进行分离。利用液相色谱-电喷雾电离-质谱法测量标记的 PEG,并且根据混合后测得的稳定同位素丰度比率与响应曲线对比计算得到样品部分中的浓度。混合物中的 PEG 同系物被明确区分^[16]。由对比实验可以得知,这种方法测得的数据精度在人类与小鼠的样本中是没有明显差异的。研究表明,这种方法已经成功地应用于尿样监测。SIDA 作为未来渗透性研究的准确工具,正在为进行人体研究中关于肠渗透性研究方法的改变提供了进一步发展前景。

2.6.2 稳定同位素标记在作物中的分离应用 有研究发现,根据对蛋白质进行稳定同位素标记还可以监测植物中的代谢途径,应用于对干旱环境下的作物代谢状况研究,可以发现其代谢变化,从而根据反馈所得信息,用于更好地提供作物最佳生长环境以及增加产量等用途。研究通过对同种植物进行培养,并对干旱环境培养的植物提供含有稳定同位素标记的营养物质进行标记,然后取干旱时间不同的情况下对植物所产生的代谢物进行提取并进行质谱分析。根据同位素标记定量分离出干旱情况下和正常灌溉情况下的蛋白质数量,对比得出不同种蛋白质的数量变化^[48](见图 14)。可以根据参与光合作用及能量代

谢的蛋白质数量变化情况,得出在干旱情况下,为了维持正常生长,作物进行的光合作用调配以及与能量代谢有关的蛋白质的合成和水解平衡调整。这一发现也可作为整个豆科植物研究的基础。

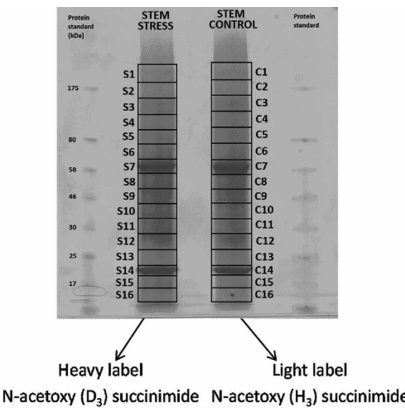


图 14 不同标记下的色谱比较

Figure 14 Chromatographic comparison of different markers

3 展望

稳定同位素是基于中子数不同导致同种元素之间存在质量差别,但不造成其它影响。由此可以通过质谱或核磁等其它设备测其碎片谱图,精确、快捷、安全地得出某种含有标记的物质含量的变化或代谢路径。而近来基于高分子的优良性能,使得高分子材料快速发展,尤其是在医学、生物学等领域,高分子材料的应用更是越来越广泛。因此,将同位素标记与高分子材料的合成与应用相结合,对于继续监控材料制备与应用过程中发生的问题以及材料在应用中的性能变化,将会是一种方便可行的方式,也会是相关研究中一种有力的工具。同位素标记法目前已经广泛应用于各行各业的监测及管控环节。在对人体药物输送的观察等生命科学领域的应用也很多,如放射性同位素标记的前段共聚物监测抗癌药物释放特征,虽然也可以高敏感度、快捷方便地原位监测,但放射性同位素对人体的伤害还是很大的,这种方式在体外测试上虽然很实用,但并不适用于临床医学。而据大量数据研究表明,稳定性同位素作为标记并不会对材料的性质和生物体的生命活动有所改变,控制一定比率的带有稳定同位素的生物组织工程材料进入生物体,也不会对其产生负面影响。因此,稳定性同位素标记这种安全快捷的示踪工具,对于生命科学的探索和相关临床医药领域有着广阔的应用前景。目前,稳定性同位素的制备和应用也引起越来越多的关注与重视。

随着稳定同位素试剂制备与应用的发展,稳定同位素的使用也存在着一一些问题亟待解决。比如,稳定性同位素的提取制备还存在提取过程繁杂、存储难等问题,使得制备及存放成本都很高。由于这些原因,这类应用的普及与发展变得困难且具有挑战性。除此之外,随着高分子材料的广泛应用,无论是日常生活还是军事、医药、生物领域,高性能的高分子材料都渐渐代替了原有材料。因此,将同位素的应用与高分子材料结合起来,是一个具有重大意义的研究方向。稳定性同位素既没有半衰期的困扰,也不对使用方造成影响,是生物医药等以安全为首要标准的领域研究的良好示踪剂的选择。因此,我们应该将研究的重点放在怎样利用稳定性同位素对高分子材料进行标记,更好地监测材料在使用过程中的性能与结构等多方面的变化,根据反馈的信息更好地改进材料性能,并及时对因材料性能变化而导致的缺陷采取相应措施,从而推动这些领域的发展。

参考文献:

[1] Postle A D, Hunt A N.J Chromatogr B, 2009, 877(26):2716~2721.

- [2] Brandsma J, Bailey A P, Koster G, Gould A P, Postle A D. *Bba Mol Cell Biol L*, 2017, 1862(8):792~796.
- [3] Ecker J, Liebisch G. *Prog Lipid Res*, 2014, 54(4):14~31.
- [4] Heinen W, Ballijns L N, Wittenburg W J A, Winters R, Lugtenburg J, van Duin M. *Polymer*, 1999, 40(15):4353~4363.
- [5] Pilichowski J F, Morel M, Tamboura F, Stefan C, Mohamed B, Jacques L. *Polym Degrad Stabil*, 2010, 95(9):1575~1580.
- [6] Ruhland K, Frenzel R, Horny R, Nizamutdinova A, van Wüllen L, Moosburger Will J, Horn S. *Polym Degrad Stabil*, 2017.
- [7] Patterson B W. *Metabolism*, 1997, 46(3):322~329.
- [8] Fht N, Tessari M, Wijmenga S S, Heus H A. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2016, 96:89~108.
- [9] Zachleder V, Vítová M, Hlavová M, Moudřiková Š, Mojžeš P, Heumann H, Becher J R, Bišová K. *Biotechnol*, 2018.
- [10] Higashi T, Ogawa S. *J Pharmaceut Biomed*, 2016, 130:181~193.
- [11] Howa J D, Lott M J, Chesson L A, Ehleringer J R. *Forensic Chem*, 2016, 1:6~12.
- [12] Ecker J, Liebisch G. *Prog Lipid Res*, 2014, 54(4):14~31.
- [13] Mawuenyega K G, Kasten T, Sigurdson W, Bataman R J. *Anal Biochem*, 2013, 440(1):56~62.
- [14] Bruheim P, Kvitvang H F, Villas-Boas S G. *J Chromatogr A*, 2013, 1296(12):196~203.
- [15] Werner S, Von P W, Alexer W, Ivan K. *Helv Chim Acta*, 2010, 63(2).
- [16] Lichtenegger M, Rychlik M. *J Chromatogr B*, 2015, 1001:182~190.
- [17] Midani F S, Wynn M L, Schnell S. *Anal Biochem*, 2017, 520:27~43.
- [18] Lichtenegger M, Rychlik M. *J Chromatogr B*, 2015, 1001:182~190.
- [19] Basu S S, Deutsch E C, Schmaier A A, Lynch D R, Blair I A. *Bioanalysis*, 2013, 5(4):3009~3021.
- [20] Gauchotte-Lindsay C, Turnbull S M. *Trac Trend Anal Chem*, 2016, 76:115~125.
- [21] Benson S, Lennard C, Maynard P, Roux C. *Forensic Sci Int*, 2006, 157(1):1.
- [22] Burton A S, Stern J C, Elsila J E, Glain D P, Dworkin J P. *Cheminform*, 2012, 41(16):5459~5472.
- [23] Gilbert A, Yamada K, Yoshida N. *Anal Chem*, 2013, 85(14):6566.
- [24] Rozentsvet V A, Khachaturov A S, Ivanova V P. *Polym Sci*, 2009, 51(8):870~876.
- [25] Lee W N. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 399:95.
- [26] McLaren D G, Timothy H, Wang S P, Mendoza V, Rosa R, Gagen K, Bhat G, Herath K, Miller P L, Stribling S, Taggart A, Imbriglio J, Liu J Q, Chen D L, Pinto S, James M B, Robert J D, Donald J M, Jose M C-P, Strack A, Douglas G J, Stephen F P, Brian K H, Thomas P R. *J Lipid Res*, 2011, 52(6):1150~1161.
- [27] Heaton T H E, Stuart M E, Sapiano M, Sapiano M, Sultana M M. *J Hydrol*, 2012, 414:244~254.
- [28] Batista S W, Daloso D M, Fernie A R, Nunesnesi A, Araujo W L. *Plant Sci*, 2016, 249:59.
- [29] Bhosale P, Serban B, Bernstein P S. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(17):1371~1375.
- [30] Bindschedler L V, Cramer R. *Rapid Commun Mass Sp*, 2015, 25(11):1461~1471.
- [31] Bilal R, Khaar B, Qureshi T Z, Mirza S A, Ahmad T, Latif Z, Jaffery I, Omar M. *JCPSP J Coll Phys*, 2007, 17(17):84~88.
- [32] Lewanczuk R Z, Paty B W, Toth E L. *Diabetes Care*, 2004, 27(2):441~447.
- [33] Liu Z, Ren Z, Xu D, Li L. *J Labelled Compd Rad*, 2012, 55(1):44~47.
- [34] Ashiru D A I, Karu K, Zloh M, Rajesh Patel, Abdul W B. *Int J Pharm*, 2011, 414(1-2):35~41.
- [35] Gong J, Gu X, Achanzar W E, Chadwick K D, Gan J, Brock B J, Kishnani N S, Humphreys W, Iyer R A. *Anal Chem*, 2014, 86(15):7642~7649.
- [36] Peroni O, Large V, Beylot M. *Am J Physiol*, 1995, 269(1):516~523.
- [37] Jasper J P, Fourel F, Eaton A, Morrison J, Phillips A. *Pharm Technol*, 2004, 8:60~67.
- [38] Wiegert C, Mandalakis M, Knowles T, Polymenakou P N, Aeppli C, Macháčková J, Holmstrand H, Evershed R P, Pancost R D, Gustafsson O. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(12):6449.
- [39] Matthews D E, Downey R S. *Am J Physiol*, 1984, 246(1):519~527.
- [40] Cobelli C, Toffolo G, Foster D M. *Am J Physiol*, 1992, 262(1):968~975.
- [41] Brook M S, Wilkinson D J, Mitchell W K, Lund J N, Szewczyk N J, Greenhaff P L, Smith K, Atherton P J. *FASEB J*, 2015, 29(11):4485.
- [42] Kim I Y, Suh S H, Lee I K, Wolfe R R. *Exp Mol Med*, 2016, 48(12):e203.
- [43] Narumi R, Masuda K, Tomonaga T, Adachi J, Hiroki R, Ueda, Shimizu Y. *Synth Syst Biotechnol*, 2018, 3(2):97~104.
- [44] Dorado C, Mullen C A, Boateng A A. *Appl Catal B Environ*, 2015, 162:338~345.
- [45] Bhate M P, Wylie B J, Thompson A, Tian L, Nimigeon C, McDermott A E. *Protein Express Purif*, 2013, 91(2):119.
- [46] Nakaoki T, Katagiri C, Kobayashi M. *Macromolecules*, 2002, 35(20):7708~7712.

- [47] Gröll H, Esker A R, Satija S K, Han C C. *Europhys Lett*, 2007, 57(4):533~539.
- [48] Zadražnik T, Eggejacobsen W, Meglič V, ŠuštarVozlič J. *J Plant Physiol*, 2017, 209:42~50.
- [49] Chahrour O, Cobice D, Malone J J. *Pharmaceut Biomed*, 2015, 113:2~20.
- [50] Berto D, Rampazzo F, Gion C, Noventa S, Ronchi F, Traldi U, Giorgi G, Cicero A M, Giovanardi O. *Chemosphere*, 2017, 176: 47~56.

Progress in Preparation and Application of Stable Isotope-labeled Polymer Materials

LIU Ting-ting, WANG Hua-shan* , ZHANG Ming-xiu, WANG Mei, CHEN Xing

(*College of Chemistry and Materials, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China*)

Abstract: The technology of stable isotope labeling has a wide range of applications in chemical analysis. As polymer materials have become more and more widely used in various fields, more and more research has been conducted on the serviceability, environmental degradation performance, metabolism in vivo, and functionalization of polymer materials of polymer materials. The demand for molecular materials is increasing. However, there are few varieties of stable isotope-labeled macromolecules, few studies, and applications are difficult to meet. In this paper, the status quo of label synthesis and application of stable isotope-labeled macromolecules at home and abroad is reviewed from the aspects of (selection, synthesis method and application research of macromolecule materials), and the future research directions and application prospects in this field are prospected.

Key words: Stable isotopes; Polymers; Applications; Advances