



电子顺磁共振:助力科学家获得新发现

Kalina Ranguelova博士 (布鲁克拜厄斯宾公司 EPR应用科学家)

电子顺磁共振 (EPR) 波谱是唯一能直接检测具有未成对电子的物质的方法。

具有未成对电子的物质数量多得惊人, 它们包括自由基、许多过渡金属离子以及材料中的缺陷。自由基通常寿命很短, 但在诸如光合作用、氧化、催化和聚合反应等许多重要过程中发挥至关重要的作用。因此, EPR的应用几乎涵盖了主流分析技术所面向的所有领域, 从分子研究, 一直到众多不同领域的质量控制, 如: 化学、量子物理、结构生物学、材料科学和医学研究等等。重要的是, EPR数据的采集只需数秒, 并且, 通过数据分析既能获得被测物质的定性信息, 也能获得定量信息。尽管已有70多年的历史, EPR仍在不断带来新的突破和发现。那么, 这一切是如何开始的呢?

早期 - 从学术到应用

1945年, 苏联物理学家扎沃伊斯基 (Zavoisky) 发表了其首次成功观测到EPR吸收现象的报告。基于这一成果, 英国牛津大学的一个小组发表了一系列相关的理论和实验研究报告。在10年时间内, 该小组联合其他研究团队成功建立起EPR这一学科。

后来, 化学家开始对使用EPR方法产生兴趣, 并在20世纪六七十年代, 出现了主要围绕分子轨道理论与EPR之间的关系的研究热潮。整个20世纪80年代, 特别是受到非晶硅和磁泡存储器元件等材料的开发的驱动, 电子自旋的重要性, 以及它与材料的物理性质之间的深刻联系, 成为了重点研究方向。这使得材料科学相关领域对EPR的需求逐渐上升。

因为能够“捕获”非常短寿命的自由基, 将它们固定成能被EPR检测的更稳定形态, 自旋捕获剂的开发, 帮助拓宽了EPR的应用领域。一种常用的自旋捕获方法是, 将自由基加成到硝酮类自旋捕获剂上, 形成一种能够利用EPR进行检测的自旋加合物, 即

氮氧基形式的持久性自由基。该自旋加合物通常产生很容易辨识的、为被捕获自由基所特有的EPR谱图。这使得EPR开始在医学和制药领域的体内和体外研究中得到广泛应用。

自旋捕获方法对于非细胞系统非常有效, 但要想让EPR进一步应用至基于细胞的生物环境中, 则需要新技术。相应地, 环状羟胺的开发满足了这一需求, 它被用作所谓的“自旋探针”。自旋探针的优点在于: 与自由基的反应速度快得多 (速度是自旋捕获剂的大约100倍), 且能形成相比硝酮类自旋捕获剂的相应加合物更稳定、半衰期更长的氮氧自由基。各种疾病与生物体内的反应中不稳定自由基的产生/湮灭机制之间的关系, 以及这些自由基与医药制剂之间的相互作用, 都成为了利用该技术研究的重要课题。

为了研究蛋白质的结构和局部动力学, 定点自旋标记 (SDSL) 方法因为1990年前后发表的开创性成果而兴起。SDSL的理论是基于总是含有未成对电子的自旋标记物与氨基酸之间的特异性反应。因此, 内置自旋标记物的蛋白结构, 能利用EPR波谱检测。SDSL也被证明是检测蛋白质折叠过程的有用工具。自旋标记物为一种独特的分子报告工具, 许多氮氧基自旋标记物因为它们的稳定性和简单的EPR信号, 被广泛用于大分子结构和动力学的研究。

仪器技术的发展也推动了EPR应用领域的扩展。决定灵敏度、分辨率和稳定性的基本原理, 都与波谱仪中的微波或磁体技术有关。仪器用户与生产厂商 (如布鲁克) 之间一直密切合作, 致力于拓宽EPR的应用范围, 并打造更强大、更稳定且更灵活的EPR波谱仪。

日常易用性

如今, 由于已经具备非常稳固的EPR硬件平台, workflows和软件的发展在持续帮助开辟新的应用领域。

易用性是关键 – 随着为特定应用量身定制的套件的出现，在日常测试或质控监测情形中的易用性将得到保证。

这些系统包括：

- 布鲁克的microESR，它是一款小型便携式研究级仪器，很容易安装到通风橱或手套式操作箱中，也能被运送至户外使用。它不需要特殊的安装或定期维护。

当然，基础研究还在继续，高端仪器赋予科学家更多灵活性和无穷的能力，让他们能够进军新的基础研究领域。布鲁克的模块化仪器系列ELEXSYS-II EPR即满足这一需求。ELEXSYS-II波谱仪具有杰出的性能和灵活性，还具有可扩展性，如添加成像附件、FT系统、ENDOR设备，以及1 GHz - 263 GHz的微波桥——满足CW和/或FT工作模式所需，帮助实现真正的多频率多共振EPR。

最近，布鲁克还推出了研究级的EMXnano台式波谱仪。在2015年第56届实验核磁共振年度大会（ENC）上推出的EMXnano，是一款采用了最新数字技术和微波技术的全新产品。通过结合新一代的可全范围扫场至场强高达6.5kG的磁体系统和高效的微波谐振腔，这一最先进的台式仪器具备了优异的灵敏度和稳定性，这使其成为众多不同分析应用的理想选择。

顺磁性物质的鉴定通过布鲁克的谱图模拟和拟合模块（Spin-Fit）进行。由于仪器已完全校准，且拥有布鲁克获得专利的自

旋计数软件模块（SpinCount）——使得浓度测定无需参比物即可实现，EPR定量变得尽可能地简单直观，在这类仪器中尚属首次。

持续振奋人心

EPR波谱学仍是一个活跃的研究领域。无论是波谱仪和成像设备硬件，还是实验方法，以及化学和生物领域的重要应用，都在持续不断地取得进展。回顾英国皇家化学学会（RSC）EPR专家组在2017年的会议上提出的课题，以及近期发表的文章，都能发现一系列令人振奋的新进展和应用，它们包括：

- 在结构生物学领域实现从低温到室温测距的转变
- 阐明呼吸复合物I和ATP合成中的电子转移机制
- 分子磁体中过渡金属离子的超高场EPR研究
- 揭示动物模型研究中候选药物的药代动力学

本文不对上述每一项进展逐一进行详细的探讨，只着重讲述三大重点应用领域：监测药品的降解和稳定性，研究光化学与光老化，以及检测用于太阳能/燃料电池及蓄电池的材料的缺陷，以此作为活跃的林PR研究群体在研工作的例证。

光化学与光老化

包括污染、压力、营养和光照在内的几项因素都会影响皮肤健康。皮肤很容易受到紫外线辐射的影响，因此，充分防晒对

在药物开发和生产中的五个重要的EPR应用领域

	降解检测和评估	稳定性和贮藏寿命优化	反应监测	灭菌过程	杂质分析
挑战	化学稳定性影响药品的安全性和有效性	了解稳定性和贮藏寿命对于正确配方至关重要 IHC*的规范要求应进行应力试验	含有自由基的化学物质或其他具有未成对电子的物质，影响产品收率	灭菌过程可能造成药物失活，或者功能性辅料/API发生改变	法规要求鉴定和监测杂质
适用的阶段	研发	研发	研发	研发、生产和质量评价或控制	研发和质量评价或控制
EPR提供的信息	<ul style="list-style-type: none"> ■ 确定降解的根本原因 ■ 测定降解程度 ■ 预测API、辅料和制剂的长期稳定性 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 通过监测产生自由基的过程来预测长期稳定性（化学稳定性、光稳定性和热稳定性） ■ 确定淬灭自由基所需的抗氧化剂的效率 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 鉴定反应中间体 ■ 解答收率和反应动力学的关键问题 ■ 生成构建动力学模型所需的数据 ■ 对反应过程中的顺磁性物质进行定量 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 确定灭菌后的稳定性 ■ 表征自由基并确定自由基来源 ■ 为产品是否准予发布提供依据 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 检测和鉴定痕量过渡金属 ■ 监测产生自由基的降解过程 ■ 观测杂质催化产生的自由基

于防止紫外线所致疾病，如晒伤、光老化和光致癌等，至关重要。现代多功能护肤产品日趋复杂，致使业界在产品开发方面面临新的问题。活性成分和基础原料可能加剧产品和/或皮肤内部的自由基产生，尽管它们原本是要抑制自由基产生。一些自由基来源包括：

- 天然油脂或乳化剂中的不饱和脂肪酸成分，会导致紫外线辐射之下的油脂过氧化风险上升。
- 在被涂抹到皮肤上时，对光照不稳定的紫外线阻隔剂会使过氧化物自由基浓度上升。
- 保湿剂可能会强化紫外线向皮肤深层的穿透力，进而影响到紫外线辐照时皮肤中的自由基含量。皮肤含水量越高，自由基形成的风险越高。
- 香水和染色剂居于过氧化物自由基污染风险最高的成分之列。在紫外线辐射下可能发生自由基链式反应。

近期利用EPR波谱进行的研究已经表明，防晒霜中紫外线诱导产生的自由基含量与夏季痤疮的临床症状之间有明显关联。

在实际中，通过EPR测定紫外线诱导产生的自由基含量，现在可被视为研发新护肤品配方时的一项预测工具。

有机太阳能电池效率和稳定性

随着近年来光伏组件和电池市场的发展，光伏电池的累计销量每增加一倍，价格则平均下降20%。此外，由于相比其他类型的电池具有更高的工作电压和容量，锂离子电池对于便携式电子产品具有更重要的作用。制备太阳能电池所需的高纯度硅和聚合物的可得性，以及对用于大功率电池的新型电极和电解质材料的搜寻，一直是阻碍太阳能电池快速增长的重要因素。而且，制造商一直在寻找成本更低的、合成硅和聚合物的技术，但这些低成本的生产技术可能会使纯度降低，自由基缺陷数增加，并影响批次间的重现性。

要想消除光伏或电极材料中的所有缺陷和杂质是不可能的。近期通过评估三批用于制备有机太阳能电池的聚合物材料的缺陷密度（用EPR波谱测定，以“自旋数/g”为单位进行报告）获得的数据已表明，测得的缺陷数与光伏电池的效率和稳定性之间有密切的关联。该结果看来有助于必要原材料的精准指标要求的设定。下面的图1显示了被测的三批聚合物的EPR谱图，以及测算出的性能参数的关联表格。

图1A: EPR谱图

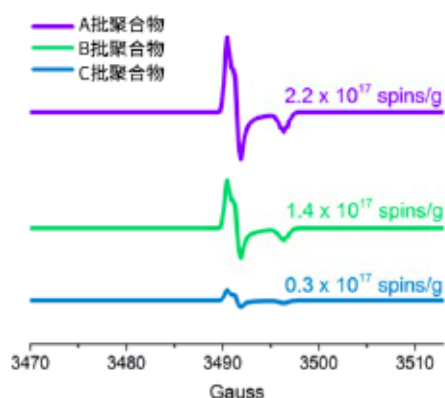


图1B: 性能关联

	自旋密度 (自旋数/g)	能量转换效率 (%)	半衰期 (小时数)
A	2.2×10^{17}	4.5	30
B	1.4×10^{17}	6.2	50
C	0.3×10^{17}	7.1	150

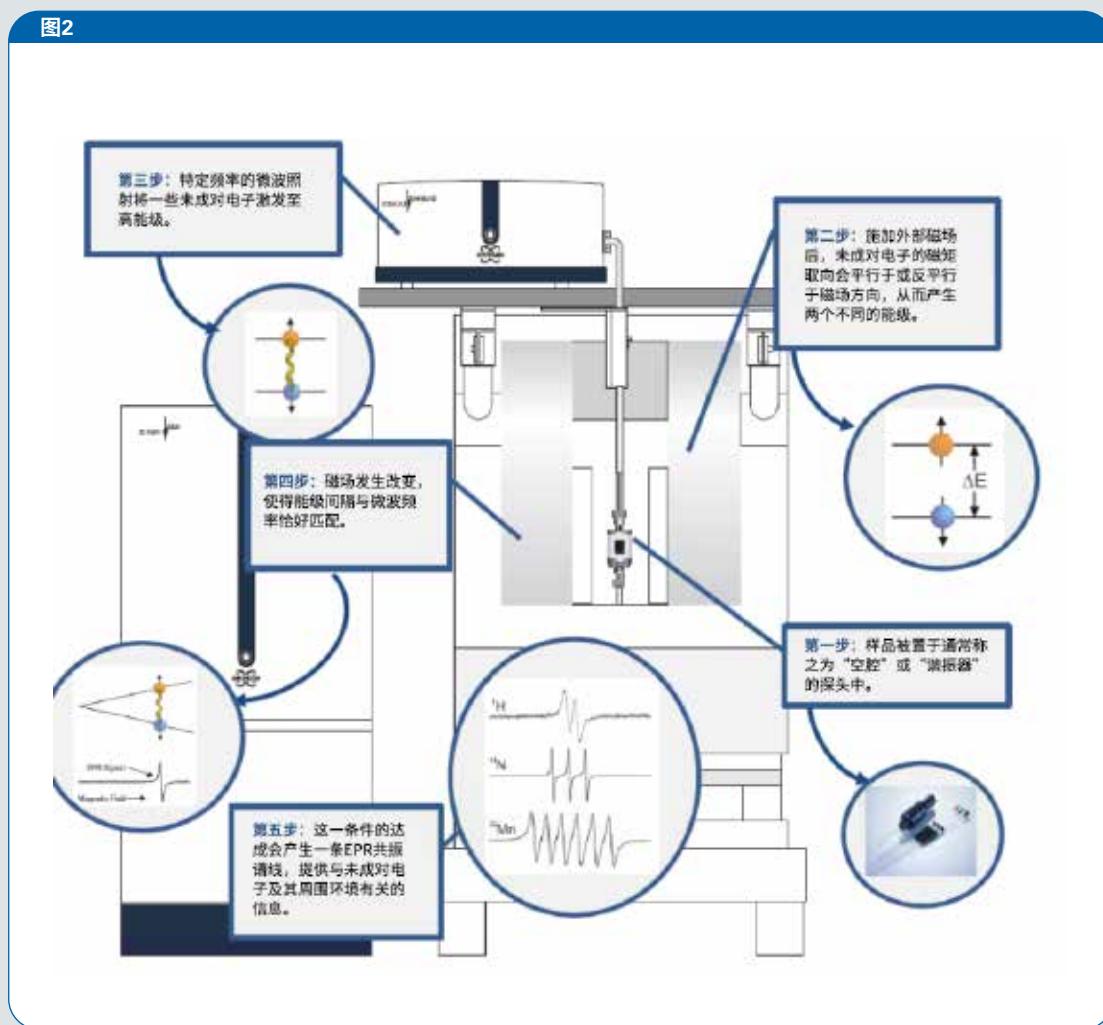
图1: EPR谱图 (A) 和测算得到的数据 (B)，用于显示三个代表性批次的聚合物的自旋密度、光伏效率和稳定性之间的关联（改编自1.Ding Z.等人 (2016 (1)) 的结果）

案例：EPR 101

EPR是一种与NMR（核磁共振）非常相似的磁共振技术。但EPR不是检测样品中的核跃迁，而是检测外加磁场中未成对电子的跃迁。和质子一样，电子也有“自旋”，使其具有被称之为“磁矩”的磁学性质。磁矩使得电子表现得像一块极小的条形磁铁。施加外部磁场后，未成对电子的磁矩取向会平行于或反平行于磁场方向。这使得未成对电子产生了两个不同的能级，进而可在它们跃迁于两个能级之间时对它们进行检测。

一开始，位于低能级（即磁矩平行于磁场方向）的电子数比位于高能级（磁矩反平行于磁场方向）的电子数多。利用固定频率的微波照射，可将位于低能级的一些电子激发至高能级。为了使跃迁成为可能，外部磁场必须维持在特定强度，以使低能态与高能态之间的能级间隔和微波频率恰好匹配。为了达到这一条件，必须在样品接受固定频率的微波照射的同时，对外部磁场进行“扫描”。磁场和微波频率“刚好”能产生EPR共振（或吸收）的条件，就是所谓的共振条件。

下图是一台典型的EPR波谱仪完成五步式典型测试的示意图。



学习和奖励

作为EPR仪器的领先供应商，布鲁克认识到自己促进EPR技术的基础知识传播的必要性。为此，布鲁克开发出一个全面的教学套件。其中包含：一台简单易用的、针对教学环境进行了全面优化的连续波EPR波谱仪，一个“EPR入门”理论和实践套件，用于实验室分析的现实生活样品，以及一系列需要用于教授EPR测试、数据采集及处理步骤的实验。

如欲进一步了解布鲁克这一独一无二的行动计划，请访问：

<https://www.bruker.com/products/mr/epr/epr-in-education.html>

此外，布鲁克还为英国皇家化学学会管理并在其年度大会上颁发的年度研究和学生奖励提供支持。如欲了解更多信息，请访问：<http://www.esr-group.org>

如欲了解布鲁克EPR仪器的信息，以及获取直播和点播式网络研讨会资源及其他培训资料，请访问：<https://www.bruker.com/products/mr/epr.html>

参考文献

- [1] Ding Z. et al., Efficient solar cells are more stable: the impact of polymer molecular weight on performance of organic photovoltaics, J. Mater. Chem. A (2016) 4 7274

关于布鲁克公司 (NASDAQ: BRKR)

近六十年来，布鲁克致力于让科学家能够取得突破性发现，并开发新的应用以提高人类生活质量。布鲁克的高性能科学仪器和高价值的分析及诊断解决方案使科学家能够在分子、细胞和微观层面探索生命和材料。

凭借与客户的密切合作，布鲁克在生命科学分子研究、应用和制药应用以及显微学、纳米分析和工业应用等领域实现了创新突破和生产提升，并创造了诸多客户成功案例。近年来，布鲁克也成为细胞生物学、临床前成像、临床表型组学和蛋白质组学研究、临床微生物学和分子病理学研究所需的高性能系统的提供者。

如欲了解更多信息，请访问：

www.bruker.com/epr



布鲁克磁共振微信公众号

● 布鲁克 (北京) 科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbio.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询:
400-898-5858
布鲁克售后技术支持:
400-898-1088

布鲁克 (北京) 科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号
中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路
2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路
618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886