

## 查看不可见: EPR 波谱测定降解

布鲁克拜厄斯宾有限公司 EPR 应用科学家 Kalina Ranguelova 博士。

材料降解是物理、化学和生物降解过程之间复杂的相互作用结果, 这些过程通常涉及自由基。一些影响产品稳定性的过程是热(在氧气存在下的热降解和热氧化降解)、光(光降解)、氧气(氧化降解)和风化(通常是紫外线降解)。

产品保质期内保持稳定很重要, 稳定性研究不仅涵盖了产品的物理化学特性, 还解释了产品在整个保质期内的安全性和有效性。强制降解(压力测试)研究是将压力或加速工况应用于产品研究。它们有助于促进产品开发、制造、生产和包装, 其中自由基行为的知识可用于延长保质期并提高产品质量。

电子顺磁共振(EPR)波谱法是唯一能够以直接和非侵入性的方式检测带有自由基的物种分析技术。同时, 该技术对没有自由基(或未配对电子)的样品完全是“盲目的”, 因此它是非常特殊的。它的用途非常广泛, 可以在很大的温度范围内应用于气体、液体或固体样品。EPR 可用于检测、定量和监测短寿命物种的内在生成, 因此对于检测聚合物、食品和饮料、药物和环境等中的自由基降解极其有用。EPR 的信号幅度与目标产品的降解水平直接相关, 因此分析非常简单直接。随着自旋捕获剂的研发以“捕获”寿命极短的自由基, 应用范围扩大, 有效地将其固定为一种可以用 EPR 测量的更稳定的形式。自旋捕获的一种常用方法是在硝酮捕获剂中加入自由基, 从而形成旋转加合物, 这是一种基于硝基氧的持久性自由基, 可以用 EPR 检测到。旋转加合物通常产生一个独特的 EPR 光谱, 识别捕获的自由基。结果, EPR 不仅在工业上得到广泛应用, 而且在医学和药物领域的体外和体内研究中也得到了广泛应用。

本文旨在概述 EPR 在降解反应方面的应用多样性。

### I. 药物

治疗药物需要具有良好的保质期, 以确保正确用药和患者安全。研制成功的制剂取决于对其化学和物理稳定性和特性的深入了解。热、光、氧、湿度、杀菌过程、杂质和辅料相互作用是影响产品稳定性的因素。此外, 所有这些因素都可能导致活性药物成分(API)、辅料或制剂的降解, 导致产品效力的丧失或有毒副产品的产生。

降解过程往往涉及自由基和过渡金属, 而这些自由基和过渡金属是药物产品中发生大部分损害的原因。

EPR 波谱法成功用于监测药物降解过程中自由基的形成, 鉴定自由基中间体, 并帮助确定反应机理。它可以确定降解的根本原因, 测量降解的程度, 并预测 API、辅料和制剂的长期稳定性特征。由于 EPR 固有的高灵敏度, 测量速度快, 只需少量的 API 或药物制剂, 因此该技术可用于药物研发的早期阶段。

辅料是药理活性药物或前药以外的物质, 包含在制造过程中或成品药物剂型中。这些辅料通过增强 API 的治疗效果或通过促进制造过程来改善药物的特性, 通常是药物产品中的主要成分。API 的直接降解不仅会降低产品的作用, 而且辅料的降解还会通过改变药物的物理化学特性或与 API 反应来影响药物的功效。因此, 在这些组分经过可能影响其稳定性的工业加工之后, 对其稳定性进行评估是至关重要的。聚山梨醇酯是生物药物制剂中最常用的辅料之一, 众所周知, 聚山梨醇酯易被自由基链过程自动氧化降解。EPR 数据显示降解发生, 并且在自由基形成的各种存储条件下被检测到。主要问题是这些自由基很容易氧化和降解蛋白质, 对患者造成潜在的严重和不良影响(图1)。

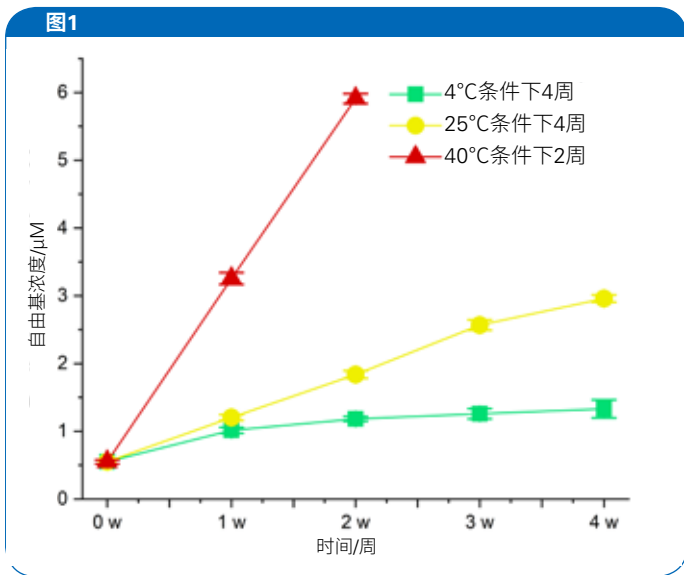


图1.聚山梨醇酯20在不同贮存条件下的自由基浓度

在聚山梨醇酯中检测和量化自由基是了解其自氧化机制的关键步骤。使用我们的 EPR 量化软件包 (SpinCount 和 SpinFit, 布鲁克专利!) 在布鲁克 Xenon 软件中应用, 识别和量化聚山梨醇酯自由基的任务既简单又精确(图2)。

最近另一项研究主要在于  $\gamma$  和 X 辐照对 L-组氨酸的影响, L-组氨酸是一种典型的肠外制剂辅料, 用作皮下注射、肌肉注射和腹腔注射的缓冲剂和稳定剂 [2]。作者得出结论, 辐照可诱导组氨酸脱氨和 C-中心自由基的形成 (图3)。此外, 自旋捕获也显示了辐照材料初始溶解很长时间内自由基再生。Fenton 型化学涉及辐照过程中产生的强氧化剂, 并由标准无菌注射器针头中的微量金属催化。

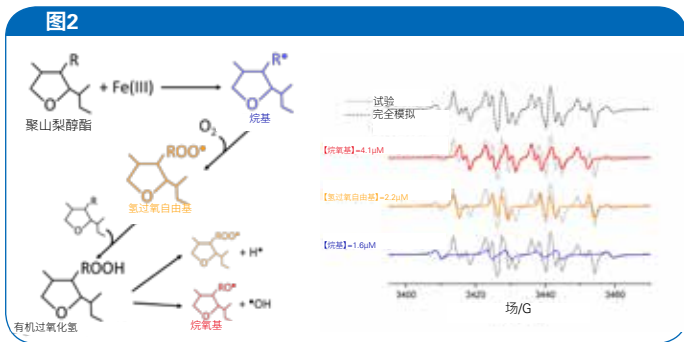


图2.左面板: 本文给出了聚山梨醇酯中自旋捕获自由基的 EPR 波谱, 并对其进行了完整模拟, 在顶部以灰色显示。从模拟光谱(虚线迹)中, 利用自旋模型识别出三种不同的自由基——烷氧基(模拟为红色)、氧化基(模拟为橙色)和烷基(模拟为蓝色)。使用 SpinCount 组件确定每个自由基物种的浓度。右面板: 拟议的聚山梨醇酯自氧化机制与 EPR 数据密切相关。反应图示引自参考文献 [1]。

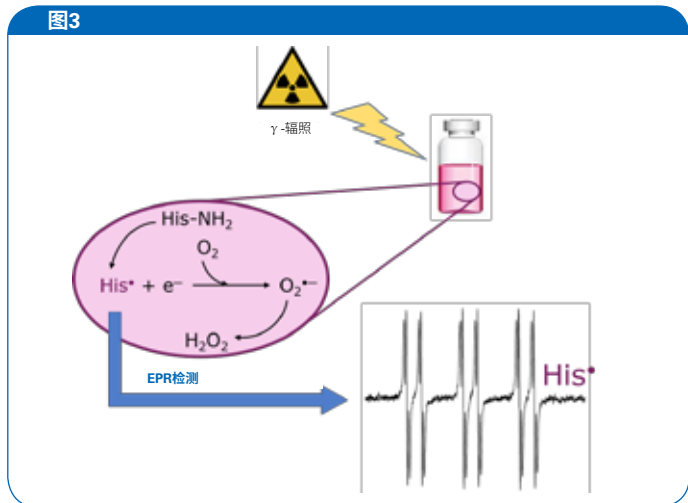


图3.  $\gamma$ -辐照下 L-组氨酸的脱氨基(引自参考文献 [2])

根据作者的观点, 在处理用于肠外制剂的辅料时, 了解溶液中反活性降解产物的行为是必不可少的。避免溶液中的自由基再生是必要的, 可以消除完整药物制剂中的自由基诱导其他药物成分 (尤其是 API) 降解的可能性。无意中向患者注射含有自由基的溶液也可能产生直接的毒理学影响。虽然仍有必要对每种辐照灭菌产品进行彻底分析, 但评估  $\gamma$  辐照对单一药物成分的影响是分析多组分体系的首要步骤。

## II. 抗氧化剂功效

几十年来, 人们已经认识到材料和产品中需要抗氧化剂。抗氧化剂通过减少自由基中间体和防止活性氧的增殖来抑制其它分子的氧化。因此, 抗氧化剂在每种产品中都是必不可少的。然而, 还有一个有待解决的问题: 抗氧化剂的长期作用是什么? 他们是否能够为产品提供必要的持久保护, 这对防止降解和缩短保质期真的很重要。EPR 是一种评价抗氧化活性的工具。在考虑到不同参数的情况下确定抗氧化剂功效: 活性、动力以及典型压力测试对其性能的影响。例如, 紫外线滤光是化妆品防晒制剂配方中吸收特定波长紫外线辐射的关键成分 [3]。理想情况下, 防晒霜应能防止由紫外线 B 引起的晒伤/红斑, 以及紫外线 A 和紫外线 B 对皮肤光损伤的基因毒性/氧化作用。为了使防晒霜具有最佳的性能和功效, 首要的要求是紫外线滤光在整个曝晒期间都应保持有效。在不同的紫外滤光影响下, 对稳定自由基 (TEMPOL) 的 EPR 信号进行 25 分钟的紫外辐照, 显示其降低自由基的效率 (图4)。很明显, 在防晒制剂中消除自由基的方法中紫外线滤光 D 是最有效的。

图4

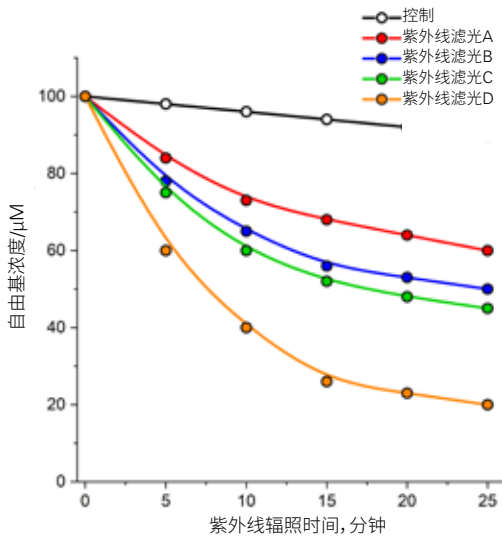


图4. 紫外线滤光功效由 EPR 确定。紫外线滤光抑制自由基的能力按下顺序增加:A<B<C<D。

### III. 聚合物降解

自由基普遍存在, 包括双自由基、三重态和聚合物体系中的点缺陷, 使 EPR 波谱法成为聚合物科学和其他主流分析技术中不可或缺的工具。EPR 波谱法的研究范围不断扩大, 特别是由于制备稳定性增强的聚合物、遵循导电聚合物中的电荷转移过程、破译聚合物的复杂纳米动力学、简易理解复杂聚合物反应的反应机理和动力学、以及进行全面的结构和构象分析。EPR 波谱法正以多种方式应用于高分子科学中, 包括但不限于探索聚合物链的结构、构象和动力学、降解或缺陷研究、电荷转移特性, 特别是自由基聚合反应的动力学和反应机理, 以及聚合物基质的 EPR 成像。

例如, 超高分子量聚乙烯 (UHMWPE) 是一种半结晶聚合物, 40 多年来一直用作总关节置换中的支承表面。结果表明, UHMWPE 在  $\gamma$  辐照灭菌后易发生氧化自由基降解, 导致机械特性下降。虽然现代 UHMWPE 灭菌方法已经发展到可以减少或消除自由基的降解, 但需要对聚合物进行辐照后热处理, 以确保关节植入物的长期氧化稳定性。哈佛医学院的 EPR 研究 [4] 表明: (i) 低于聚合物熔点的退火保留了机械特性, 但没有完全消除滞留在结晶区域中的残余自由基, 导致长期氧化; (ii) 高于熔点(150°C) 的退火消除了自由基, 但由于熔融过程中的结晶度损失导致机械特性的降低 (图5)。

图5

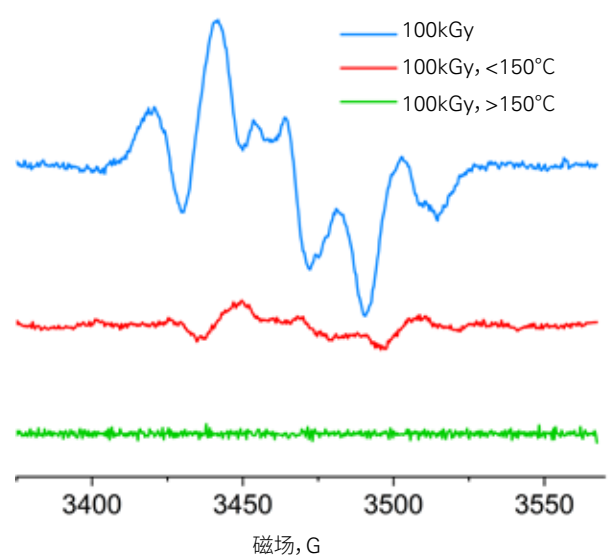


图5. 100kGy 辐照、未熔化 UHMWPE (蓝色迹线)、加压处理 (红色迹线) 和 150°C 环境压力熔化 (绿色迹线) 的 EPR 谱图数据 (引自参考文献 [4])。

### IV. 材料: 缺陷和杂质

EPR 波谱法是研究材料顺磁缺陷和杂质的一种有效方法。在过去的三十年里, 光伏 (PV) 组件的平均价格每增加一倍, 就会下降 20%。获得足够纯的硅或聚合物 (用于有机 PVS) 是快速增长的一个重要限制因素。因此, 迫切需要低成本技术用于光伏应用的硅和聚合物。然而, 这种低成本的生产很可能损害所得硅或聚合物的纯度。关键是要有缺陷和杂质浓度的准确规格, 而不危及产量和成本目标, 并实现更短的能源回收期。

最近对多晶硅薄膜的 EPR 研究发现了两种类型的缺陷, 即晶界缺陷和晶内缺陷, 以其 G 值区分。不对称 EPR 谱图数据的分析表明, 除了  $G=2.0055$  处的晶界缺陷 (图6中的红色痕迹) 外, 还有  $G=2.0032$  处的晶内缺陷 (图6中的黄色痕迹)。此外, 采用定量 EPR 分析, 呈现每立方厘米的总自旋浓度, 作为结晶状态下和结晶后处理 (快速热退火和氢钝化) 下的平均晶粒尺寸函数 [5]。

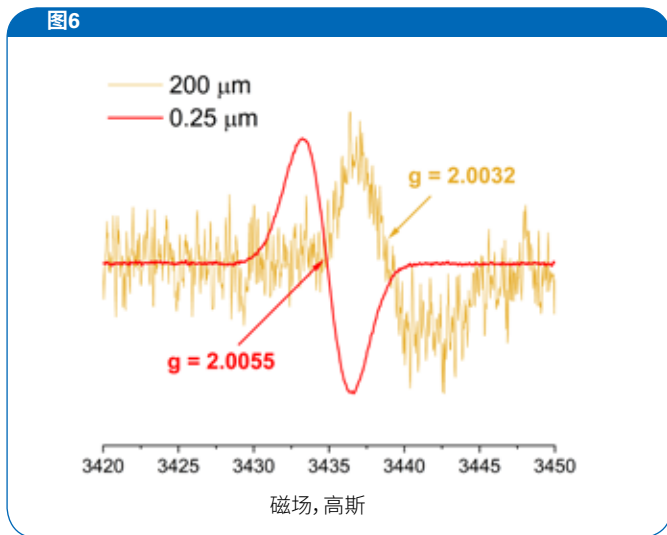


图6.0.25Mm 和 200μm 大颗粒多晶硅薄膜 EPR 谱图数据。(引自参考文献【5】)。

## 五、食品降解

自由基反应在食品和饮料中很常见，并在食品降解中发挥起着重要作用。然而，也有研究表明，食品加工过程中产生的自由基可能在质构化、风味形成和其他有助于食品特性和特征质量的反应中发挥关键的功能作用。因此，识别和了解食物和饮料中由自由基介导的反应至关重要。学习控制这些与食品质量和保质期稳定性相关的反应，使我们有足够的理由对 EPR 检测和研究食品和饮料中的自由基产生兴趣。

食品降解的一个例子是食用油的酸败。食品降解常发生于储存或运输过程中，其是由于自由基介导的不饱和脂肪酸氧化引起的，会影响食品质量，并在许多情况下决定了油的保质期。脂肪酸降解分为三个有记录的阶段：(i) 启动，(ii) 繁殖，(iii) 终止。过程结束时产生的氧化化合物会使油产生不良气味和味道。在电子顺磁共振应力测试的帮助下，氧化曲线和自由基浓度的精确计算为生产过程各个阶段抗氧化性提供了测量值。这使得制造商能够做出快速和明智的过程控制决策，以优化产品的保质期。

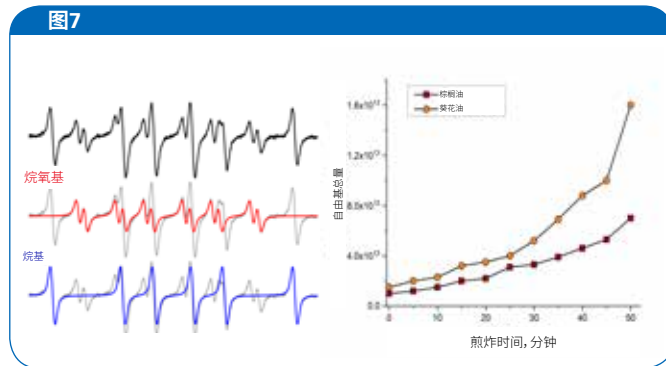


图7.左面板-油炸用油在180°C下加热的电子顺磁共振光谱鉴定两种自由基(烷氧基和烷基)。右面板-棕榈油和葵花油的定量电子顺磁共振数据收集(引自参考文献【6】)。

最近有关机构发表了一项关于油炸过程中食用油氧化的电子顺磁共振研究，评估了不同脂肪酸组成的油对自由基的影响【6】。两种类型的自由基(烷氧基和烷基)通过使用电子顺磁共振进行鉴定和定量(图7)。结果表明，随着时间的推移，煎炸油中形成的自由基增加，这与其他物理化学结果相关，作者得出结论，电子顺磁共振可以敏锐检测煎炸油系统氧化变化。研究进一步表明，在葵花油中，电子顺磁共振检测到的自由基含量高于棕榈油中的自由基含量，脂质热氧化相关的挥发性化合物含量高于棕榈油。

使用电子顺磁共振波谱的另一项研究表明了紫外线辐照和热处理对淀粉样品的影响【7】。在定量电子顺磁共振研究的自由基形成过程中，在很大程度上证实了，与燕麦淀粉结构相比，大麦淀粉稳定性较低(图8)。电子顺磁共振检测到的自由基的数量与淀粉结构及其功能特性的变化密切相关。电子顺磁共振研究还表明，淀粉降解导致三种不同自由基种类的鉴定和分配至C中心多糖自由基，这取决于使用方法。结果表明，在热处理条件下，淀粉链的解聚更为显著，而紫外光辐照是一种非常有效的氧化剂。在实践中，电子顺磁共振对热或紫外诱导自由基的鉴定和定量被认为是淀粉结构变化的预测工具。

图8

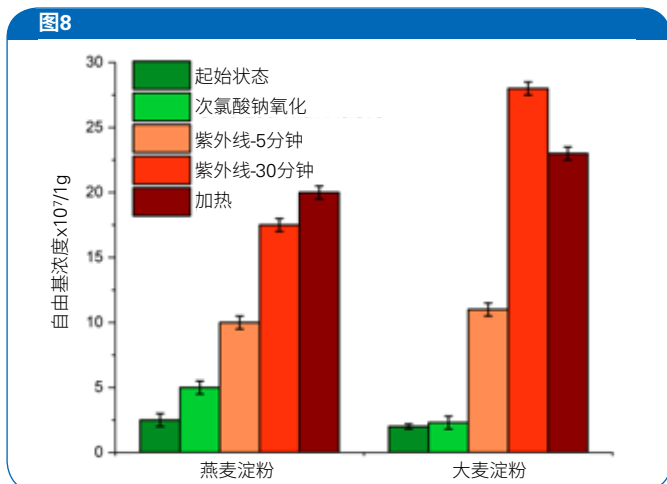


图8. 大麦和燕麦淀粉在化学、热和紫外线降解过程中的自由基浓度 (引自参考文献[7])。

食品辐照 (电离辐射在食品中的应用) 是一种通过减少或消除与沙门氏菌等食物传播病原体相关的健康风险和延长保质期 (抑制发芽、延迟成熟) 来提高食品安全性的技术。事实上, 电离辐射抑制微生物的分裂, 产生所谓的放射分解产物以及自由基。在干燥环境中, 这些自由基相对稳定。欧盟已接受电子顺磁共振作为检测含骨头 (EN1786, 1996)、纤维素 (EN1787, 2000) 或砂糖 (EN13708, 2001) 的辐照食品的标准方法。然而, 据估计, 电子顺磁共振在这一领域的潜力要大得多。这种电子顺磁共振应用是评估六种不同类型奶酪辐照处理的一个有用且成功的工具 [8]。结果表明, 辐照处理 (1-4 千克 kGy) 导致自由氨基酸、肽或蛋白质形成  $\alpha$ -羰基自由基, 电子顺磁共振信号与吸收剂量、储存时间和奶酪类型相关 (图9)。

图9

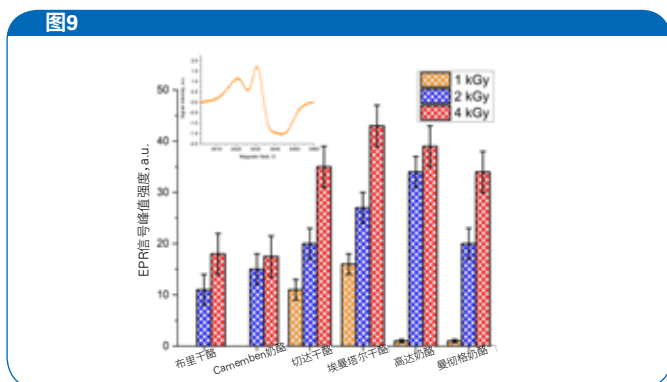


图9. 用电子束照射 1、2 和 4 kGy 的奶酪中自由基的积累 (引自参考文献 [8])。

## 六、饮料降解

自由基是啤酒降解过程中的反应中间体。EPR 是分析啤酒抗氧化性的 ASBC 方法之一, 基于自由基与自旋捕获剂 (9) 形成共价结合加合物的自旋捕获实验。这些加合物的积累是由 EPR 在强制氧化期间 (150 分钟 @ 60°C) 检测到的, 直接反映了啤酒对氧化的抵抗力 (或缺乏抵抗力)。在这种情况下, 啤酒中自然产生的抗氧化剂 (主要是多酚) 会延迟自由基诱导的氧化反应, 导致延迟。延迟时间是指啤酒中所有的抗氧化剂都被消耗掉, 且 EPR 检测到自由基所需的时间。从分析中获得该指标用于定量评估啤酒的抗氧化性 (图10)。

图10

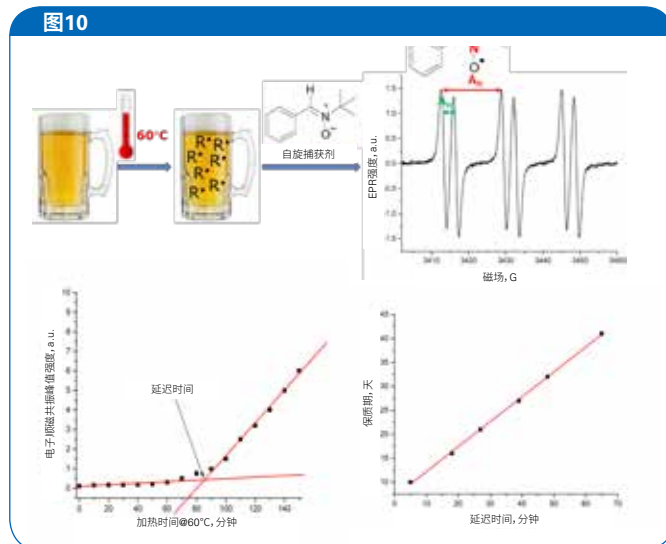


图10. 上面板: 啤酒中获得的 PBN 旋转加合物的 EPR 光谱示例。在 60°C 有氧强迫老化 150 分钟后记录。下面板: 延迟时间计算的例子及与保质期的关联性。

## 结论

在这篇白皮书中, 我们通过观察内源性自由基以及通过压力测试启动、检测和鉴定自由基, 综述了 EPR 在药物、聚合物、食品和饮料以及其他材料研究中的一些重要应用。使用 EPR 分析工业中的降解水平正在迅速发展。自由基启动和检测的新方法使人们更好地理解降解过程中的机制。EPR 的高灵敏度和通用性使其成为不同行业的重要工具, 并有望在未来得到进一步的应用。



## 参考

- [1] Kerwin B.A., 蛋白质生物治疗药物制剂中使用的聚山梨醇酯20和80:结构和降解途径, *J.药房科学***2009**, 97, 2924
- [2] Vallotto C., Williams, H.E., Murphy D.M., Ayres Z.J., Edge R., Newton M.E.和 Wedge C.J.药物辅料L-组氨酸 $\gamma$ 辐照灭菌的电子顺磁共振(EPR)光谱法研究:室内溶液中自由基的再生*J.药房***2017**, 533, 315
- [3] Damiani E., Astolfi P., Giesinger J., Ehlis T., Herzog B., Greci L.和 Baschong W.《化妆品防晒制剂中紫外线滤光片的光降解和自由基诱导的过氧化评估》, *自由基研究*, **2010**, 44, 304
- [4] Oral E., Ghali B.W.和 Muratoglu O.K.过压力退火和维生素E不稳定情况下消除辐照超高分子量聚乙烯中的自由基》, *J.生物医学材料Res.B Appl.生物材料***2011**, 97, 167
- [5] Sontheimer T., Schnegg A., Steffens S., Ruske F., Amkreutz D., Lips K.和 Rech B.《用电子顺磁共振鉴定多晶硅薄膜的内晶和晶界缺陷》, *物理固体状态RRL***2013**, 7 959
- [6] Liu Y., Wang Y., Cao P.和 Liu Y.电子自旋共振波谱和物理化学评估油炸过程中的食用油降解, *Eur.J.脂质科学技术***2018**, 120, 1700376
- [7] Kurdziel M., Labanowska M., Pietrzyk S., Sobolewska-Zielinska J.和 Michalec M.《利用环境友好氧化法下大麦和燕麦淀粉物理化学特性的变化》, *Carbohydr.多晶硅***2019**, 210, 339
- [8] Escudero R., Segura J., Velasco R., Valhondo M., de Avila, M.D.R., Garcia-Garcia, A.B.和 Cambero M.I.加速电子处理奶酪的电子自旋共振(ESR)波谱研究, *食品化学***2019**, 276, 315
- [9] 美国酿酒化学家协会电子顺磁共振法测定啤酒抗氧化性标准方法小组委员会报告, *J.Am.学会酿造化学家***2008**, 66, 25



布鲁克NMR微信公众号

### ● 布鲁克(北京)科技有限公司

网址: [www.bruker.com](http://www.bruker.com)  
E-mail: [sales.bbco.cn@bruker.com](mailto:sales.bbco.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