磁気共鳴分光特集： 分光便利帳

時間分解 ESR 分光法による 一重項酸素 ($^1\Delta_g$) の寿命測定

東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻
河合明雄

活性酸素の一種である一重項酸素分子 $O_2(^1\Delta_g)$ は、酸素の光化学を理解する上で重要な励起状態であり基礎的化学反応から生体内反応まで広く研究対象となっている。この $O_2(^1\Delta_g)$ の時間分解観測では $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ 状態間の近赤外発光検出がよく行われるが、この方法は微弱なスピン禁制遷移を対象とするため、必ずしも簡便な測定法ではない。間接的な $O_2(^1\Delta_g)$ の検出法としては、 $O_2(^1\Delta_g)$ との反応で生じた化合物の過渡吸収観測法や、 $O_2(^1\Delta_g)$ が放出する熱を測定する時間分解熱レンズ分光法などがあり、これらは様々な化合物による $O_2(^1\Delta_g)$ の消光速度定数の決定や反応機構の解明に貢献している。しかし、副生成物への留意が必要であったり光学系の調整が難しいなど、問題点も多い。近年、これらとは全く異なる $O_2(^1\Delta_g)$ 寿命の分光学的測定法として、時間分解 (TR-) ESR を用いる方法が提案された¹⁾。ここではこの新しい方法について、原理や長短所、将来展望などを述べてい

凝縮相では、励起分子がラジカルとの衝突で消光されるとラジカルの電子スピンの非熱分布となる動的なスピン分極が発生する。スピン分極を持ったラジカルでは、ESR 遷移に関与する α スピンと β スピンの準位間の分布差が熱分布の場合に比べて大きい。ESR 遷移強度は、単純な場合ではこの分布差に比例する。そのため、スピン分極したラジカルの ESR 遷移強度は、熱分布したラジカルより大きくなり、ESR 検出感度が向上する。このスピン分極発生はラジカル三重項対機構 (RTPM) で説明され、励起一重項消光では α スピン過剰分極、三重項分子消光では β スピン過剰分極となることが知られている²⁾。この現象は $O_2(^1\Delta_g)$ のラジカルによる消光過程でもみられ、 β スピン過剰分極が発生する。例えばニトロキンドラジカル的一种である 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) を用いた場合、TR-ESR 測定でマイクロ波の強い吸収 (Abs) 信号が容易に検出される¹⁾。図 1 は anthracene (8.4 mM) と TEMPO (3 mM) の空気飽和したトルエン溶液において anthracene をレーザー励起して得られた TR-ESR スペクトルで、TEMPO の信号が Abs 型で観測されている。TR-ESR の測定は汎用の ESR 分光器を用い、過渡的 ESR 信号をボックスカー積算器またはデジタルオシロスコープに送って積算した。励起光源は

図1 $O_2(^1\Delta_g)$ との衝突でスピン分極をもった TEMPO ラジカルの TR-ESR スペクトル。

図2 $O_2(^1\Delta_g)$ との衝突で発生した TEMPO のスピン分極の時間変化。

YAG レーザーの第 3 高調波 (355 nm, 最大で約 30 mJ/pulse) を用いた。試料溶液は ESR キャビティー中のフラットセル (内厚 0.3–0.5 mm) 内をフローさせた。この系では、はじめに溶存酸素が anthracene 三重項を 100 ns 程度の反応時間で消光して $O_2(^1\Delta_g)$ を生成し、次にこれが自己減衰する。この減衰過程では TEMPO による $O_2(^1\Delta_g)$ 消光が反応時間約 1 ms でゆっくり起き、RTPM に従って β スピン過剰分極が発生する。図 2 は TEMPO の中心ピークに磁場を固定して観測した ESR 信号の時間変化で、早い立ち上がりの後に単一指数関数減衰が見られる。減衰部分の解析より、寿命として 23 μ s が得られた。この値は、トルエン中の $O_2(^1\Delta_g)$ 寿命の文献値 (25–29 μ s)¹⁾ に近く、スピン分極が TEMPO による $O_2(^1\Delta_g)$ 消光過程で発生していることを示す。この TR-ESR 法で得た $O_2(^1\Delta_g)$ 寿命は文献値より若干短い、これは $O_2(^1\Delta_g)$ が光増感剤として用いた基底状態の anthracene に付加反応を起こすためである。 $O_2(^1\Delta_g)$ との衝突で生じた TEMPO

表1 各種ラジカルに対する P_n 値

ラジカル	P_n 値
4-hydroxy-TEMPO	450
TEMPO	340
4-oxo-TEMPO	110
Galvinoxyl	0.7
DPPH	~0

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

のスピンの分極は、スピン格子緩和時間（約250 ns）で減衰する。図2の信号時間スケールは数10 μs で緩和時間より長い。このスケールでは、各時刻で発生したスピン分極が直ちに消失することになるため、各時刻での信号強度がその時刻に生じたスピン分極強度すなわち $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 濃度に比例した値となる。このため、時間減衰曲線は $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 濃度時間変化を反映する。近似的には、スピン格子緩和時間が時定数として働くと理解してよい。このような Abs 型信号が $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ に起因する証拠の一つとしては、溶存酸素を Ar 置換した場合に Abs 型信号が消失することが挙げられる¹⁾。また、最近 Turro らは TR-ESR 法と近赤外発光検出法を同時に行い、TR-ESR 法で得た信号の減衰寿命が $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ の寿命と同じであることを実験で示している³⁾。

$\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命をラジカルのスピンの分極を利用して測定する場合、その検出感度を決定する因子の一つにラジカルに生成するスピン分極発生因子 P_n がある。 P_n 値は $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ がラジカルで消光されるときに発生するスピン分極の大きさで、この値が大きいほど信号強度も大きい。従って、寿命測定でより強い信号を示すラジカルを見出す目的で、様々なタイプのラジカルに対し P_n 値を評価した^{3,4)}。表1には測定された P_n 値が示されており、熱分布での α と β スピン準位間分布差がつくるスピン分極である P_{eq} を単位として表記されている。TEMPO のようなニトロキシドラジカルでは数100程度と非常に大きな値であった。一方 Galvinoxyl, DPPH などの比較的広い π 電子軌道をもつラジカルでは極めて小さな値となった。この結果より、ラジカルによる消光過程で生成するスピン分極は TEMPO タイプの場合が極めて大きく、 $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命測定法には TEMPO タイプのラジカルが適することがわかる。スピンの分極がラジカルに依存する点は、酸素の励起緩和過程と関連して大変興味深い。ここでは詳細には触れないが、スピンの分極の大きさを定量理論計算とあわせた議論が行われており、TEMPO- $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ 衝突対の電子交換相互作用の大きさが主な原因であると考えられている⁴⁾。

TEMPO のスピンの分極を TR-ESR 法で検出することによって $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命を決定できることが示されたため、この方法を用いて種々の抗酸化物質による消光速度定数を測定した⁵⁾。図3の挿入図はスピンの分極減衰曲線を様々な

図3 TEMPO スピン分極減衰速度の Stern-Volmer プロット。(挿入図) スピン分極減衰曲線の α -tocopherol 濃度依存性。

濃度の α -tocopherol に対して測定し対数プロットしたものである。これらの減衰曲線の解析で各濃度での $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命を決定し、図3の Stern-Volmer プロットから消光速度定数を決定した。同様の実験は各種フェノール類やポリフェノール類に対しても行なわれ、実際に速度定数を決定している。

TR-ESR 法で $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命を測定する利点や欠点について以下に述べる。この方法は、TEMPO の ESR 信号を外部に取り出しその時間変化をオシロスコープで観測だけの簡便な方法で、ESR 分光器さえあれば容易に実験可能である。ESR キャビティーに関しては、レーザー光導入の穴がついたもの（市販品）を用いる必要がある。ESR 分光法はマイクロ波を使用するため、誘電損失の大きい溶媒では感度が低下する。Toluene や 1,4-dioxane などの有機溶媒では問題ないが、メタノールや水中ではセルに工夫が必要である。レーザー散乱光に関しては原理的に問題にならないが、レーザー照射による熱などでキャビティー共鳴条件が変わって信号のベースラインが変動する場合は注意が必要である。この点では、長波長のレーザーを用いると有利である。ここで紹介した紫外光増感による $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 生成の代わりに、例えばポルフィリン誘導体など色素分子の YAG レーザー532 nm 励起を利用することでも寿命測定が行える。この方法の1つの限界は、 $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命がラジカルのスピン格子緩和時間に近い系を観測する場合にみられ、TR-ESR 法で得られる減衰曲線の解析には $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命とスピン格子緩和の両方を考慮する必要がある。

最後に将来の展望を述べたい。この方法は $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ と TEMPO の衝突を必要とするため、TEMPO ラジカル周辺の $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命を位置選択的に観測できる可能性がある。不均一な系で特定空間の $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ 寿命が問題になる

場合、この特徴が有効であろう。研究対象とする空間にうまく TEMPO ラジカルをドーピングすれば、対象位置での $O_2(^1\Delta_g)$ 寿命が観測可能となる。最近、細胞膜の内外での $O_2(^1\Delta_g)$ 寿命などが研究対象になることが多く、顕微機能をもった近赤外発光分光の試みが報告されている⁶⁾。古くから知られる発光分光法に比べここで紹介する方法は歴史が浅いため、感度の点で今後の工夫が必要である。しかし、原理的に位置選択可能な寿命測定法としての利点があるため、今後大きく発展することを期待したい。

参 考 文 献

- 1) M. Mitsui, K. Takeda, Y. Kobori, A. Kawai, and K. Obi: Chem. Phys. Lett. **262**, 125 (1996).
- 2) A. Kawai and K. Obi: Res. Chem. Intermed. **19**, 865 (1993).
- 3) C. G. Martínez, S. Jockusch, M. Ruzzi, E. Sartori, A. Moscatelli, N. J. Turro, and A. L. Buchachenko: J. Phys. Chem. A **109**, 10216 (2005).
- 4) M. Mitsui, K. Takeda, Y. Kobori, A. Kawai, and K. Obi: J. Phys. Chem. A **108**, 1120 (2004).
- 5) A. Kawai: Appl. Magn. Reson. **23**, 349 (2003).
- 6) J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, and P. R. Ogilby: J. Am. Chem. Soc. **127**, 14558 (2005).