[報文]

複数ピークからなる ESR スペクトルのピーク分離解析

菊地正博¹⁾*, 永田夏樹²⁾, 菰田聖一³⁾, 亀谷宏美⁴⁾, 鶴飼光子³⁾, 小林泰彦¹⁾

¹⁾ 国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター
放射線生物作用研究ディビジョン マイクロビーム細胞照射研究グループ
(〒 370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233)

²⁾ 国立大学法人北海道教育大学函館校 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)
(現所属: 東京農業大学大学院 (〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1-1))

³⁾ 国立大学法人北海道教育大学函館校 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)

⁴⁾ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
(〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1-12)

Peak-Fitting Analysis with Gaussian Line Shapes Against Experimental ESR Spectrum Consisting of Multiple Peak

Kikuchi Masahiro¹⁾*, Nagata Natsuki²⁾, Komoda Seiichi³⁾,
Kameya Hiromi⁴⁾, Ukai Mitsuko³⁾ and Kobayashi Yasuhiko¹⁾

¹⁾ Microbeam Radiation Biology Group, Radiation Biology Research Division, Quantum Beam Science Center, Sector of Nuclear Science Research, Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki-machi, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan

²⁾ Hokkaido University of Education, Hakodate Campus, 1-2 Hachiman-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8567, Japan
(Present address: Tokyo University of Agriculture, Graduate School, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan)

³⁾ Hokkaido University of Education, Hakodate Campus, 1-2 Hachiman-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8567, Japan

⁴⁾ National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Summary

Relaxation time of an unpaired electron on free radicals induced in irradiated foods is one of the indicators for radical interactions. Using continuous wave (CW-) ESR, Lund's simulation is also utilized for the relaxation time of a singlet peak. Peak-fitting analysis was carried out prior to calculate the relaxation time of multiple peak of ESR spectra. The relaxation time can be directly measured on pulsed ESR. When the Lund's simulation was applied for multiple peak of irradiated amino acid, the relaxation time was quite different from the time measured on pulsed ESR. The ESR spectrum of the amino acid was resolved to several Gaussian peaks, and the sets of parameters obtained from each Gaussian peak were applied to the Lund's simulation. The calculated T_2 values were in good agreement with pulsed ESR values. When ESR spectrum consisting of multiple peak is recorded on CW-ESR, the peak-fitting analysis following Lund's simulation is effective to calculate the relaxation time of each peak of the multiple peak. When two peaks were located in same g -factor on pulsed ESR, relaxation time from CW-ESR measurements can be easily estimated after the peak-fittings based on radical structure.

Key words: electron spin resonance spectroscopy (電子スピン共鳴), multiple peak (多重ピーク), Gaussian line shape (ガウス線形), peak-fitting analysis (ピーク分離), relaxation time (緩和時間)

*連絡先: kikuchi.masahiro@jaea.go.jp

はじめに

物質に放射線を照射するとラジカルが生成する¹⁾。残存するラジカルは電子スピン共鳴 (ESR) 法で測定可能であり、世界的には Codex 標準分析法や CEN 分析法で、食肉中の骨やマスの骨²⁾、乾燥香辛料のセルロース³⁾、ドライフルーツの糖⁴⁾を対象として、照射食品検知法にも利用されている。しかし、水を含む食品では照射誘導ラジカルが消滅しやすいと考えられ、ほとんどのラジカルは照射直後に消失している。我々は、照射した生鮮果実の中に比較的安定に存在しているラジカルがあることを見出した^{5)~6)}。これは、水存在下でも、ごく一部の照射誘導ラジカルがセルロースなどの生体分子上で安定化して長時間残存していると考えられる。このように ESR 法は、青果物などに適用範囲の拡大が可能な、非常に有用な手法である。しかし、どの程度の期間適用できるかはラジカル寿命に依存する。ラジカル寿命の長短はラジカル相互作用の強弱に関係していると考えられ、ラジカル相互作用に関する物理的指標が緩和時間である。

ESR 法^{7)~8)}では、検体中に存在するラジカルに磁場をかけ、磁場と垂直方向からマイクロ波を照射すると、不対電子が特定波長のマイクロ波エネルギーを吸収して低エネルギー状態から高エネルギー状態に移移するので、この時のエネルギー吸収を検出している。高エネルギー状態の電子は、エネルギーを放出して低エネルギー状態へ戻る。これを緩和と呼び、緩和に要する平均時間 (信号が e^{-1} となる時間) が緩和時間である。緩和時間には、スピン系のエネルギーが測定系外へ散逸するスピン-格子緩和時間 (T_1) と、電子スピンと電子スピンの間でエネルギー交換してスピンが向きを変えるスピン-スピン緩和時間 (T_2) がある。

実験的には、緩和時間 (T_1 , T_2) はパルス (Pulsed) ESR を用いることで直接測定できる。パルス ESR では、強力なマイクロ波を用いて $\pi/2$ パルスと π パルスを発生させ、スピンの向きをコントロールする。緩和時間の測定では、スピンエコーのシグナル強度の経時変化を観測して求める。パルス ESR は、装置自体が高価であり操作も難しいため、あまり普及していない。

一方、連続波 (Continuous Wave; CW-) ESR は

取扱いが簡単で価格も手頃なため、保有しているところが多い。CW-ESR のスペクトルは、不対電子の近傍に存在する電子スピンや核スピンの有無やその相互作用の強さによって、ローレンツ線形 (Lorentzian) からガウス線形 (Gaussian) へと変化する⁹⁾。ESR では、分解能を向上させるため、変調磁場をかけて測定しており、吸収型スペクトルを 1 次微分型スペクトルとして検出する。1 次微分型のガウス線形のピーク-ピーク (P-P) を線幅 (λ_G)、ローレンツ線形の P-P を線幅 (λ_L) とすると、Lorentzian は次の式で与えられる。

$$L_0(H) = I_0 \cdot \frac{1}{\pi} \cdot \frac{\sigma}{[\sigma^2 + (H - H_0)^2]} \quad (\text{Eq. 1})$$

ただし $\sigma = (\sqrt{3}/2) \lambda_L$

ここで、 H_0 はピーク中心磁場強度であり、 σ は半値半幅 (Half Width at Half Maximum, HWHM) を示す。また、Gaussian は次の式で与えられる。

$$G_0(H) = I_0 \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-2 \cdot \left(\frac{H - H_0}{\lambda_G}\right)^2\right] \quad (\text{Eq. 2})$$

ただし $\sigma = \sqrt{\ln 2/2} \lambda_G$

マイクロ波強度を上げると、それにつれて ESR シグナルのピーク強度が増加し、あるマイクロ波強度の時にシグナルが最大値 (閾値: threshold) を取り、以後は減少する (飽和挙動: Progressive Saturation behavior, PSB)。理論によると、線幅比 (λ_L/λ_G) によって PSB の形状が変化する⁹⁾。Lund らが開発した ML_Fit プログラム⁹⁾では、実験的に求められた PSB の形状から λ_L/λ_G 比をシミュレーションにより求める (Lund 法)。スピンスピン緩和時間 T_2 は線幅 λ_L から次式により求められる。

$$T_2 = \frac{2}{\gamma \lambda_L \sqrt{3}} \quad \text{ただし } \gamma = g\mu/\hbar \quad (\text{Eq. 3})$$

g は電子の g 値 (g -factor), μ はボーア磁子 (Bohr magneton), $\hbar$ は換算プランク定数 ($h/2\pi$) である。また、スピン-格子緩和時間 T_1 は、シミュレーションで計算される閾値のマイクロ波強度 (P_0) およびマイクロ波がキャビティー内に発生させる磁場強度を与える係数 (K) を用いて次の式から求める。

$$T_1 = \frac{1}{\gamma^2 K^2 \beta P_0 T_2} \quad (\text{Eq. 4})$$

β は遷移確率を示し、2つのエネルギーレベルを遷移する電子スピンでは $\beta = 1$ である。

Lund 法は CW-ESR で得られる 1 本線信号に適用できる。照射食品中に存在するアミノ酸由来のラジカルでは、複数ピークからなる複雑なスペクトルが測定されることがある。そのようなスペクトルで緩和時間を求める場合、パルス ESR で直接測定する方法が取られる。しかし、パルス ESR はすべての試料に対応できるわけではなく、スピンエコー測定条件の最適化も簡単ではない。Lund 法が利用できると、通常の CW-ESR と同じ測定で対応できる。そこで CW-ESR の複雑なスペクトルに Lund 法を適用する手法を検討し、パルス ESR による直接測定で得られた緩和時間と比較して、本解析法の妥当性を考察した。

実験方法

1. 試料と照射処理

試料は、L-グルタミン酸と L-アラニンの粉末結晶を用いた。照射はコバルト 60 を線源とするガンマ線を用いて室温で行った。吸収線量は 100, 200 kGy として、線源からの距離を変えて試料を配置し、照射時間はそれぞれ 32 時間で行った。

2. ESR 測定

CW-ESR は JES FA-100 (JEOL 製) を用いた。測定条件は、掃引磁場範囲を 336 ± 7.5 mT、掃引時間 2 min として、変調磁場周波数 100 kHz、変調磁場幅 1.0 mT、時定数 0.03 s として、マイクロ波出力 0.5 ~ 30 mW で測定した。CW-ESR 測定解析は WIN-RAD (ラジカルリサーチ製) を用いた。

パルス ESR 測定は、ESP-380E (Bruker 製) を用いた。磁場掃引してスピンエコー強度を計測し、得られたピーク位置に磁場を固定して $\pi/2$ パルス (16 ns) と π パルス (24 ns) を用い、 T_2 計測には $\pi/2$ -(t)- π -(t)-(echo) のパルス系列を用い、 T_1 計測には π -(T)- $\pi/2$ -t- π -(echo) のパルス系列を用いて測定した。

ESR 測定の g 値を正確に求めるため、NMR 磁場測定器 EFM-2000AX (エコー電子製) と標準水

晶発振器内蔵のマイクロ波フリケンシカウンタ MF2412C (アンリツ製) を用いた。

3. Gaussian の最適化によるピーク分離解析

複数ピークをもつ ESR スペクトル $G_{\text{multi}}(H)$ を記述するため、個別のピークを Gaussian として計算させた。

$$G_{\text{multi}}(H) = \sum_{i=1}^{10} G_i(H) \quad (\text{Eq. 5})$$

それぞれのピーク $G_i(H)$ について、中心磁場 H_i 、P-P 線幅 λ_{Gi} 、ピーク強度 I_i として、あらかじめ Excel 上に初期状態の 10 本の Gaussian のピークを発生させた (Fig. 1)。この Gaussian は 0 または 1 の入力により、ピークの有無を選択できる設定とした。さらに、実測された ESR スペクトルを Excel のグラフ上に描画するため、測定条件であるマイク

Fig. 1 Gaussian peaks. (a) absorption line shapes and (b) first derivative shapes. Ten different Gaussian peaks have each different center magnetic field.

ロ波強度と磁場範囲、シグナル増幅率 (Amp-Gain) を入力し、ESR スペクトルを数値データとして入力するようにした。スペクトルの描画は、吸収型スペクトルと微分型スペクトルとした。最適化解析は、実験値と積算 Gaussian の差の2乗を足し合わせた残差合計を最小とするように、Excel 組込みアドイン (solver) を用いて解析した。吸収型スペクトルと微分型スペクトルで残差合計が最小になるように、交互に solver で解析した。途中、2つの Gaussian のピーク中心磁場が接近している場合、一方のピークに0を入力して、ESR スペクトルを単純な Gaussian ピーク構成で近似するようにした。異なるマイクロ波強度での解析は、Excel シートを変えて計算させ、フィッティング解析の結果として最適化された変数は、第1シートに表示させた。

4. Lund 法による緩和時間算出

Lund らによってプログラミングされた ML_Fit を用いて、小川らの方法¹⁰⁾に従って計算した。実際には、0.5, 1, 2, 4, 10, 16, 25, 30 mW のマイクロ波強度で測定して ESR スペクトルを得た。こ

れを「3 Gaussian の最適化によるピーク分離解析」に従って、解析されたピークのそれぞれについて ML_Fit に入力した。

実験結果および考察

CW-ESR を用いて照射グルタミン酸の粉末 (多結晶) を測定して PSB を得た。常法に従い、ESR スペクトル上で確認された3か所の P-P 線幅とそのシグナル強度をそれぞれ Lund 法に入力して、緩和時間を算出した。その結果、CW-ESR 測定で計算された緩和時間は、パルス ESR で直接測定された結果と異なった (Table 1)。そこでピーク分離法を適用して解析を行うことにした (Fig. 2)。分離されたピークのそれぞれについて、Lund 法を適用して緩和時間を求めたところ、CW-ESR 単独で解析した時に異なっていた緩和時間 T_2 が、より直接測定の値に近づいた (Table 2)。複数ピークをもつ ESR スペクトルから緩和時間を求める場合には、ピーク分離した方が実測値に近い値を得る事ができた。

アラニンの安定ラジカルは $\text{CH}_3\text{C}^\bullet\text{H-COOH}$ であり、その ESR スペクトルは、不対電子近傍に存

Table 1 Relaxation time of 100 kGy-irradiated glutamic acid obtained with CW- and pulsed ESR.

Peak No.	T_1 (μs)		T_2 (ns)	
	CW-ESR	Pulsed ESR	CW-ESR	Pulsed ESR
1	35	27	9	94
2	50	27	13	79
2*	—	33	—	76
3	36	25	8	101

*Peak No.2 of CW-ESR is split to two peaks on pulsed ESR.

Table 2 Relaxation time of 100 kGy-irradiated glutamic acid obtained from CW-ESR assisted with peak-fitting and Pulsed ESR.

Peak No.	T_1 (μs)		T_2 (ns)	
	Peak Fitting	Pulsed ESR	Peak Fitting	Pulsed ESR
1	21	27	126	94
2	24	27	121	79
2*	—	33	—	76
3	14	25	86	101

*Peak No.2 of CW-ESR is split to two peaks on pulsed ESR.

Fig. 2 ESR spectrum of 200 kGy-irradiated glutamic acid (powder). (a) Experimental spectrum (1st derivative). (b) Peak-fitting spectra (1st derivative). (c) Peak-fitting spectra (absorption). Black and white thick lines are Gaussian peaks. Grey line is integrated from all Gaussian peaks. In (a), arrows indicate the line width of peak 1, 2 and 3 from left of the spectrum, respectively.

在する 3 個の水素原子核 (β -proton) による超微細結合定数 ($A_{\beta H}$) が 2.51 mT, もう 1 個の水素原子核 (α -proton) による超微細結合定数 ($A_{\alpha H}$) が 1.95 mT という構成をもつことが知られている⁸⁾。すなわち, ラジカル構造に基づいて考えると, 1 個の Gaussian が 1:3:3:1 に分裂し, それぞれがさらに 1:1 に分裂する時,

$$\begin{aligned} & 1:3:3:1 \\ \rightarrow & (1:1):(3:3):(3:3):(1:1) \\ \rightarrow & 1:(1:3):(3:3):(3:1):1 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 6})$$

により 1:4:6:4:1 に分裂すると考えられる。Fig. 3a のように, 照射アラニンを CW-ESR で測定すると, 複数ピークをもつ ESR スペクトルが計測される。Gaussian の 8 本 (2 種類のピーク強度の Gaussian を 4 本ずつ) のピークを用いて最適化によりピーク分離を行った結果, 合成された 1 次微分型スペクトルと実験的に測定されたスペクトルが一致した (Fig. 3b)。その時の Gaussian から求められるピーク比は, ほぼ 1:4:6:4:1 となって, ピーク分離比の理論的予測とよく一致した。

1 個の Gaussian は, それぞれ局所的な磁場強度で共鳴する Lorentzian がスピンパケット (spin packet) となって共鳴する集まり (包絡線) と考えられる。ここで, 異なる g 値をもつ 2 個の Gaussian が近い磁場強度に存在して一部分が重なる状況を仮定すると, 重なり部分では, それぞれの Gaussian を構成するスピンパケットが吸収を示すため, 全体の包絡線は, それぞれの Gaussian を足し合わせた吸収スペクトルになると考えられる。すなわち, その時の 1 次微分型スペクトルは, 2 個のピークをもつ ESR スペクトルとなる。この考えを拡張すると, 照射アラニンや照射グルタミン酸のように複数ピークをもつ複雑な ESR スペクトルが得られる時, そのスペクトルは, 複数の Gaussian が足し合わされた結果として, 複雑なスペクトルになっていると推測できる。そこで, 複雑なスペクトルを構成する個々の Gaussian を求めたいと考えた。

10 本の Gaussian から始めて, 照射アラニンおよび照射グルタミン酸の実測スペクトルにフィッティングさせることで, 複数の Gaussian としてピーク分離することに成功した。このピークについて, それぞれ P-P 線幅と飽和挙動を求めて Lund 法を適用

Fig. 3 Gaussian peak fitted to 200 kGy-irradiated alanine (powder). (a) Experimental spectrum (1st derivative). (b) Peak-fitting spectra (1st derivative) from Gaussian peaks based on radical structure. (c) Peak-fitting spectra (absorption) of Gaussian peaks. Black and white thick lines are Gaussian peaks. Grey line is integrated from all Gaussian peaks.

したところ、Gaussian から計算された緩和時間は、パルス ESR で実測された緩和時間とほぼ一致した。すなわち、ピーク分離された Gaussian は、仮想ピークとして存在するわけではなく、実際に CW-ESR スペクトルを構成する実在のピークを反映していると考えられる。もともと Lund 法は、1 本線の ESR スペクトルに適用して緩和時間をシミュレーション計算する手法であるので、1 本線の Gaussian を特定して適用できたため、緩和時間を精度よく求めることができたと考えられる。

パルス ESR でスピネコーの磁場掃引スペクトルを測定した時、1つのピークとして認識されても、実際には2つの異なるラジカルから生じた2つのピークの重なりであることがある。その時、緩和時間の直接測定では、2つの指数関数 (exponential function) の和としてフィッティング解析する必要があると考えられる。ピーク分離法では、ラジカル構造に基づいたピーク分離を適用できる場合、別々の Gaussian として分離して、それぞれのピークを Lund 法で解析するだけでよい。本解析法は、高価なパルス ESR を用いなくても、ピーク分離と Lund 法を併用することで、緩和時間を精度良く求める事ができるため、有効な解析法であると考えられる。

まとめ

CW-ESR 測定で得られる複雑なスペクトルを数値計算により近似するため、Excel 上でガウス線形を表示するファイルを作成した。照射試料で実測された ESR スペクトルに対して、複数のガウス線形をフィッティングしたところ、実測値とほぼ一致するガウス線形を得ることができた。

CW-ESR スペクトルの見かけの P-P 線幅から求めた飽和挙動を Lund 法に適用して計算した緩和時間は、パルス ESR で直接測定された緩和時間と一致しなかった。一方、CW-ESR スペクトルをピーク分離したガウス線形から求めた P-P 線幅と、飽和挙動を用いて Lund 法で計算した緩和時間は、パルス ESR による実測値とよく一致した。ラジカル構造に基づいたピーク構成をもつガウス線形を用いて、実測された ESR スペクトルに対してフィッティングすると、理論的に予測されたピーク強度比と一致するガウス線形に収束した。

したがって、CW-ESR 測定において、複数ピーク

からなるスペクトルに対して Lund 法を適用して緩和時間を求める場合、ピーク分離を行って解析することが有効と考えられる。

要 旨

照射食品に誘導されたフリーラジカルの不対電子の緩和時間は、ラジカル相互作用の指標となる。連続波 (CW-) ESR を用いる場合、1 本線のピークでは Lund 法のシミュレーションを用いる事ができる。複数ピークからなる CW-ESR スペクトルから緩和時間を求めるため、ピーク分離を行った。緩和時間はパルス ESR で直接測定可能である。CW-ESR で複数ピークとなるスペクトルに対して、そのまま Lund 法のシミュレーションを適用して、照射アミノ酸の緩和時間を求めたところ、パルス ESR の測定結果とは全く異なっていた。複数ピークをもつ照射アミノ酸のスペクトルに対して Gaussian ピークとしてフィッティング後、それぞれのピークに対して Lund 法を適用して求めた緩和時間 T_2 は、パルス ESR で測定された値とよく一致していた。CW-ESR による測定で、複数ピークをもつ ESR スペクトルが得られた場合、ピーク分離後に Lund 法を適用する解析法は、緩和時間を求める際に有効と考えられる。パルス ESR で複数ピークが同じ g 値をもつ時、CW-ESR でラジカル構造を踏まえたピーク分離を行うと、簡単に緩和時間を求められると考えられる。

参考文献

- 1) C. von Sonntag, The Chemical Basis of Radiation Biology. London, Taylor & Francis, 515p. (1987).
 - 2) European Committee for Standardization. Food-stuffs-Detection of irradiated food containing bone-Method by ESR spectroscopy. EN1786. (1996).
 - 3) European Committee for Standardization. Food-stuffs-Detection of irradiated food containing cellulose-Method by ESR spectroscopy. EN1787. (2000).
 - 4) European Committee for Standardization. Food-stuffs-Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy. EN13708. (2001).
 - 5) 菊地正博ほか. 照射された生マンゴーに誘起されたラジカルの ESR 測定. *Radioisotopes*. **58** (12), p.789-797 (2009).
 - 6) 菊地正博ほか. 照射された生鮮果実パパイアの迅速 ESR 検知法. *Radioisotopes*. **60** (4), p.163-171 (2011).
 - 7) 石津和彦編. 実用 ESR 入門—生命科学へのアプローチ. 東京, 講談社サイエンティフィック, 318p. (1981).
 - 8) 山内 淳. 磁気共鳴-ESR—電子スピンの分光学—. 東京, サイエンス社, 320p. (2006).
 - 9) Lund A. et al. Relaxation-time determination from continuous microwave saturation of EPR spectra. *Radiat. Res.* **172**, p.753-760 (2009).
 - 10) 小川英之ほか. 照射誘導ラジカルの緩和現象. *食品照射*. **44**, p.5-8 (2009).
- (2015 年 8 月 10 日受理)

1) C. von Sonntag, The Chemical Basis of Radiation