最新機器分析講座 (第IX講)

J. Jpn. Soc. Colour Mater., 78 [11], 539-545 (2005)

ESR の基礎と応用

中井由実*

1. はじめに

多くの物質中のほとんどの電子は対電子の状態で存在するが、中には一部の電子が不対電子の状態になっているものがある。電子スピン共鳴装置 (ESR) はこれを選択的に検出し、不対電子がおかれている構造的な環境やその量、さらに不対電子が存在することによる機能を評価することができる。同じ磁気分光分析法である核磁気共鳴装置 (NMR) と比較すると、より高感度であるため短時間で測定を行うことができる。

代表的な例として、遷移金属錯体の金属周辺部の構造決定や半導体等の格子欠陥の同定および定量、フリーラジカルの同定・定量および反応性の評価などがあげられる。

本稿では、ESR の原理やスペクトルの見方などの基礎をもとに、ESR 測定の際に注意すべき点を応用例を交えて説明する。

2. ESR 装置

ESR 装置の構成を図-1 に示した。ESR は一対の電磁石の中心に、試料をセットする空洞共振器 (キャビティ) を設置する。マイクロ波発信器からマイクロ波をキャビティ内の試料に照射するものであるが、試料の物理的性質や大きさ、試料管の形状により最適なマイクロ波の状態が異なるため、位相器やキャビティのマイクロ波導入口に設置された結合度調整棒で、位相 (フェー

図-1 ESR 装置の概略図

ズ) およびマイクロ波の結合度 (カップリング) を調整する。最新の装置では、このマイクロ波調整は自動で行うことができる。

試料がラジカルを含むものであれば、キャビティから戻るマイクロ波にその構造や量に応じた吸収が生じるので、それを検波器で検出し増幅器で増幅してレコーダーにスペクトルとして記録する。図中に記されていないが、キャビティ内には磁場変調コイルが設置されており、測定は変調磁場をかけながら行われる。これにより、スペクトルは分解能と S/N 比がより向上した微分波形として記録される。

3. ESR の原理

電子は自転 (スピン) する性質をもっている。電子がスピン運動をすると、その動きは微弱な電流となり、アンペールの法則により生じた電流と直交する向きに磁力線が生じる。すなわち、不対電子は微小な磁石の性質をもつことになる。対電子の場合も同様にスピンするが、同じ軌道にある 2 個の電子同士で磁石としての特性が打ち消されてしまうため、観測にかからない。物質中で磁石としてふるまうのは軌道を 1 個の電子が占有する不対電子のみとなる。

ラジカル分子中の不対電子に注目してこれを↑であらわし図-2(a) に示した。(a) に外部磁場をかけると、不対電子は(b)のように磁場に平行または反平行に整列する。これは、電子がきわめて小さな磁石であり、エネルギーが二つに量子化されるため

図-2 外部磁場が不対電子に与える影響
(a) 外部磁場なし (b) 外部磁場あり

〔氏名〕 なかい ゆみ
〔現職〕 日本電子(株)分析機器本部応用研究グループ 副主任研究員
〔趣味〕 読書, エッセイ書き
〔経歴〕 立教大学卒。日本化薬(株)総合研究所勤務を経て現職。

平成 17.8.8 受理
Foundation and Application of Electron Spin Resonance
Yumi NAKAI
*日本電子株式会社 分析機器本部 応用研究 G
昭島市武蔵野 3-1-2 (〒196-8558)

ある。

このように二種類の向きに並んだ電子間にはエネルギー的な差が生じる。これを図-3に示した。

この分裂（ゼーマン分裂という）に相当するエネルギーをもつマイクロ波を照射すると、下の準位の対電子がこのマイクロ波を吸収して上の準位に上がる。このマイクロ波吸収を磁場変化に対して記録したものがESRスペクトルである（図-3(b)下段参照）。図中の式はこの共鳴状態をあらわしており、磁場 H により生じたエネルギー分裂 ($g\beta H$; g : ラジカルの固有値, β : ボーア磁子) に、マイクロ波のエネルギー ($h\nu$; h : プランク定数, 周波数 ν) が一致する条件で吸収が生じることを示している。

図-3(a) 磁場中でエネルギー順位が分裂する

図-3(b) エネルギー差に相当するマイクロ波を吸収する

4. ESR 測定により得られる情報

ESR スペクトルから、次のような情報が得られる。例として図-4に炭素材料のスペクトルを示した。横軸は磁場であり、有機ラジカルは通常約 335 ± 5 mT の磁場設定で測定できる。縦軸は、マイクロ波の吸収強度をあらわす。両端の逆位相の信号は、試料と同時測定している Mn^{2+} マーカーの信号であり、より正確な磁場および g 値を求める場合に補正に用いると便利である。

4.1 同定のための情報

4.1.1 g 値: 物質固有の値であり、物質中の対電子の位置および周囲の状況をあらわす。図-4の炭素材料の場合は図に示したように $g=2.0023$ と算出される。これは、対電子がカーボン原子 (C) 上にあることを示している。

表-1に種々の物質の g 値の例を挙げた。

4.1.2 超微細構造: 対電子が与える吸収線は近傍の核の核スピンの依存して分裂する。すなわちスペクトルの分裂パターンは、近接する原子の構造をあらわしている。

4.1.3 線幅: 吸収線の最大値と最小値の幅は、緩和時間と関連する。

4.2 定量のための情報

4.2.1 吸収強度: スペクトルの各信号の最大値 (山) から最小値 (谷) までの高さは対電子の量に対応する。スペクトルパターンが同じ場合は、信号強度比が対電子の量比を示す。試料の信号と重ならない場合は一定量の Mn^{2+} マーカーを同時測定すると、マーカーの信号強度で試料の信号強度の規格化することができる。これは定量の信頼性を向上させることにつながる。

また、その時間変化から反応速度定数や反応機構解析の情報が得られる。

4.2.2 積分強度: スペクトルを2回積分して得られた値から絶対量を算出することもできる。図-5は標準物質である安定ラジカル、2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) のスペ

図-4 炭素材料の ESR スペクトル

表-1 ラジカル種 (常磁性種) と g 値

有機ラジカル	g 値	2.003	2.004	2.005
	ラジカル種	C	C-O	O-O, N-O
金属錯体	g 値	2.00	$g_{\perp}: 2.05$ $g_{\parallel}: 2.2$	4.3
	常磁性種	Mn^{2+} (溶液)	Cu^{2+}	非ヘム鉄
格子欠陥	g 値	1.999	2.002	2.005
	常磁性種	E'	Nc	Pb

図-5 ESR スペクトルの2回積分

クトルの積分例である。2回積分した値は、コンピュータにより算出され絶対定量に用いられる。

定量は次のようにして行う。目的試料の測定を行った後、同じESR条件で既知濃度の標準物質を測定する。それぞれの2回積分値を求め、標準物質の濃度を基準として試料濃度を決定する。ESRの場合、1ラジカル分子に1不対電子(スピン)として、スピン数という表現が取られることが多いが、アボドガドロ数からモル換算することも可能である。

5. ESR スペクトルの例

図-6に、活性酸素の一種であるhydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$)をスピントラップ剤5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (DMPO)で捕足したDMPO-OHアダクト(図中央の4本)と、標準物質である Mn^{2+} (両端の逆位相の信号)のESRスペクトルを示した。

DMPO-OHの吸収線の強度比は1:2:2:1であり、分裂間隔はほぼ等しい。この分裂パターンは、不対電子近傍の環境を反映している。不対電子の示す吸収線は、近傍の核が核スピン(I)をもつ場合に $2I+1$ (本)に分裂する。本ラジカルの場合には図-5に示したように、1個の窒素核($I=1$)により3本に分裂し、 β 位の水素核($I=1/2$)によりそれぞれが2本に分裂する。炭素や酸素は核スピンをもたないため無影響である。また、スペクトル上で分裂に寄与する原子は、不対電子近傍のものに限られる。DMPO-OHの特徴であるが、水溶液中では窒素核による分裂幅(^aN)と水素核による分裂幅($^a\text{H}\beta$)が等しくなり、このため中央側の信号が重なり強度が両側の信号の2倍となるため、図のようなスペクトルパターンとなる。

4本の吸収線の中心磁場と測定したマイクロ波の共鳴周波数から求めたg値は2.0056であり、これはDMPO-OHとは $\text{HO}\cdot$ がNOラジカルの形に変換されたものであることを示している。

6. 測定の実際

6.1 試料の分類と試料管の選択

液体、固体、気体のすべての試料でESRの測定を行うことができ、いずれも内径4mmの石英管に入れて測定に供する。試料管に高さ42mm以上(溶液の場合約600 μl 以上)入れると最も感度良く測定ができる。しかし、以下のように注意が必要な試料もある。

誘電損失の大きい物質(主に極性の高い物質)ではマイクロ波

図-6 DMPO-OH アダクトの ESR スペクトル

のロスが大きいため、感度が大幅に低下する恐れがある。この場合液体試料であれば、用いるセルを扁平型か細いキャピラリ型(内径0.8mm以下)にする必要がある。

とくに、水は最も誘電損失の大きい物質の一つである。試料が固体の場合でも空気中の水分を吸収すると、水の影響を受け感度が低下する。含水率が10%以上の試料では、測定前にあらかじめ脱水あるいは乾燥をしておくことが大切である。生体組織切片および培養細胞等、脱水できない試料の場合は上述のキャピラリを用いるか、組織切片測定用セルを用いるとよい。

固体試料でも、導電性をもつ炭素材料およびセラミクス等では、マイクロ波のロスが大きくなり、感度が低下することが多い。これを避けるためには、試料量を減少させるか、粉碎してESR不活性な粉体に混合希釈する。しかし、金属の単体試料は、導電性がきわめて高いため測定は困難である。ESRでの測定が可能であるのは、抵抗値が1000 Ω/cm^2 程度以上の物質である。

気体試料では、試料管内のガス圧を0.1~10mmHg程度に調整することが大切である。ガス圧(試料密度)が高いと信号がブロードになり、正しいスペクトルを得ることができない。とくに、酸素は2個の不対電子をもつビラジカルである。試料自体のガス圧を調整しても、酸素の残存により信号がブロードになる恐れがある。このため試料との反応性だけでなく、シャープな信号を得る必要性からもできる限り除去する必要がある。このことは、溶液および固体試料でも共通であるため、酸素の影響が無視できない場合があることを記憶しておきたい。

6.2 測定温度

ゼーマン分裂で各エネルギー準位を占有するスピン数には温度依存性があり、低温であるほど上下の差が大となる。これは、低温になるほどマイクロ波の吸収に関与する不対電子の数が増えることを意味しており、その結果低温で測定するほど感度が上がる。一般的に、信号強度は絶対温度に反比例する。とくに緩和時間が短い遷移金属では、低温でなければ信号が観測できないものも多い。

測定温度をコントロールするためには、温度可変ユニットを装着する。冷媒として液体窒素を使用するシステムと、液体ヘリウムを用いるものがある。当社品であれば設定温度範囲は、前者で-170~200 $^{\circ}\text{C}$ 、後者では4.2~470Kである。低温測定を行う場合に注意しなければならないのは、キャビティ内の結露であ

る。試料温度を下げるためのアタッチメントがキャビティ内で結露すると、誘電損失の大きい状態となるため測定不能となる。これを避けるため、キャビティ後部の挿入穴から乾燥した窒素などの不活性ガスを導入する必要がある。

溶液試料の低温測定を行う場合、凍結融解にともなう試料の体積変化に注意する必要がある。水溶液などの凍結時に膨張するのは、試料管への採取量を200~300 μ lとし、試料管底部から徐々に凍結する。ペンゼン、ヘキサン等は融解時に膨張するため測定終了後ただちにアセトンなどに試料管ごと漬けて融解すると安全である。

6.3 短寿命ラジカルの測定

活性酸素種や反応中間体として生じるラジカルなどの短寿命ラジカルは、安定化するか非常に高速に測定を行う（時間分解ESRを用いる）必要がある。ここでは前者の安定化する方法について説明する。

古典的な安定化法は、試料の凍結である。通常、液体窒素を用いて迅速に凍結することが求められる。

しかし、操作が煩雑であることおよび定量再現性に問題があるなどの理由から、近年では比較的低分子ラジカルの測定を行う場合には、スピントラップ剤による安定化が用いられることが多い。

図-7に、最もよく使用されるスピントラップ剤DMPOの構造を示した。DMPO自体はラジカルではなく、2位の炭素にSuperoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), $HO^{\cdot}$, methyl radical等を

図-7 スピントラップ剤 DMPO

捕捉し、対電子をN-O結合上に移動して安定化する。

本アダクトの寿命（半減期）は、DMPO- $O_2^{\cdot-}$ およびDMPO-OHのそれぞれで、数分および数十分にも延長されるため、室温での測定が可能である。しかし、ラジカル種によってDMPOの補足効率が異なるので注意が必要である。 $HO^{\cdot}$ はDMPOと拡散律速で反応するが、 $O_2^{\cdot-}$ の反応速度はきわめて小である。このため、 $O_2^{\cdot-}$ を捕捉する場合にはDMPO濃度を高くする必要がある。また、DMPOは各社から販売されているが、不純物がESR信号を与えるため、購入の際には純度に注意することが重要である。

図-8にこれら2種のアダクトのスペクトルを比較した。類似的な活性酸素種であるにもかかわらず、まったく異なるパターンを与えるためラジカル種の同定が容易である。

7. 測定例

7.1 石英中の欠陥 (E') の測定

石英ガラスに紫外線や放射線が照射されると E' センターと呼ばれる欠陥が生じる（図-9）。これは室温でも測定が可能である。

測定条件は次のとおり。マイクロ波周波数：9.43 GHz、マイクロ波出力：0.01 mW、磁場：336.69 $\pm$ 1 mT、磁場変調：100 kHz-0.01 mT、掃引時間：30 秒、時定数：0.1 秒。

マイクロ波の出力を上げると容易に飽和して波形が歪むため、0.1 mW以下の出力で測定するとよい。

また、試料管に入れたほかの試料に紫外線を照射する実験の場合、試料管自体に E' センターが生じることがあるので、試料に含まれる信号と解釈しないよう注意が必要である。

7.2 鉄含有蛋白質 シトクロム c の測定

シトクロム c は、 Fe^{3+} を含有した蛋白質である。pH 7.2の緩衝液に溶解して濃度5 mg/ml (0.4 mM)とし、凍結して低温で

図-8 $O_2^{\cdot-}$ と $HO^{\cdot}$ のDMPOアダクトのスペクトル比較

図-9 石英中欠陥のスペクトル

図-10 鉄蛋白質の ESR スペクトルの温度依存性

測定した。図-10 はスペクトルの温度依存性を示したものである。

測定条件は次のとおり。マイクロ波周波数：8.97 GHz，マイクロ波出力：4 mW，磁場：250 ± 250 mT，磁場変調：100 kHz ± 0.5 mT，掃引時間：2 分，時定数：0.1 秒。

このような試料の場合，十分な濃度（数 mM）であれば比較的高温（77 K）でも測定できるが，上記の濃度では極低温まで下げなければ十分なスペクトルは得られなかった。とくに天然物から抽出する試料の場合，得られる濃度に限界がある場合が多いため，極低温での測定が必要となることが多い。

また，Fe²⁺ は極端に ESR 検出が困難なため，ESR 測定により Fe³⁺ 由来のスペクトルが得られるか否かで試料中の鉄の価数を判別することができる。

ほかにも価数により，観測にかかるか，かからないかが左右される金属がある。Cu²⁺（活性），Cu⁺（不活性），Ti⁴⁺（不活性），

Ti³⁺（活性），Mn²⁺（活性），Mn³⁺（不活性）等である。

7.3 光触媒から生成する活性酸素

光触媒は，クリーンな環境素材として注目されているが，その脱臭作用や汚濁物質等の分解作用は，図-11 に示したように光触媒が生成する活性酸素に由来すると考えられている。

すなわち，紫外線を酸化チタンに照射すると正孔と電子が生じる。これが水および酸素と反応して，HO・および O₂・⁻ を生成する。HO・は非常に反応性の高い活性酸素であるため，周囲の有機物などを酸化分解する。O₂・⁻ はそれ自体の反応性は低いが，不均化により過酸化水素を生じ，これが紫外線によって副次的に HO・ を生成する。

従来の光触媒評価法は，アセトアルデヒドやメチレンブルー等を実際に分解させ，残存量あるいは分解物の生成量を測定する方法と水の接触角を測定する方法に大別される。前者では，用いる化学物質の吸着量をコントロールするため前処理時間を十分取る

図-11 紫外線による酸化チタンの活性酸素生成メカニズム

必要があったり、有機物ガスを定量する方法では用いる機材からの類似ガスの放出を避ける工夫をするなどの煩雑さがある。

光触媒の環境浄化機能は $\text{HO}\cdot$ 生成能と平行であると考えられるため、光触媒およびその製品の機能評価を、単位時間当たりの $\text{HO}\cdot$ 生成量で比較評価できる。このため、ESR のスピントラップ法により生成する活性酸素を直接測定する方法は、短時間に効率良く光触媒製品を評価できる。

ここでは試料として光触媒薄膜を重層したシートを用いた例を示す。これを DMPO の希薄溶液に浸漬して、一定時間光照射を行った後試料液を採取して、水溶液セルに移し室温で測定を行った。図-12 に、製造法の異なる 2 種の光触媒膜およびブランクシートから得られたスペクトルを示した。スペクトルから、試料液には DMPO-OH が生成していることが示され、光触媒から $\text{HO}\cdot$ が発生していると判断された。いずれも 15 分光照射した後の結果である。

測定条件は次のとおり。マイクロ波周波数：9.42 GHz、マイクロ波出力：4 mW、磁場：335.3 ± 5 mT、磁場変調：100 kHz - 0.2 mT、掃引時間：4 分、時定数：0.3 秒。

各試料について 3 回試料調整と測定を繰り返し、図中の I 印の信号強度を求め解析した。その結果、それぞれの試料で得られた DMPO-OH の信号強度は、No. 1 : 0.38 ± 0.27 (c.v. 7.0%)、

No. 2 : 0.78 ± 0.02 (c.v. 3.0%)、Blank : 0.17 ± 0.01 (c.v. 5.8%) であった(数値は同時に測定した Mn マーカ信号強度との比)。このようにバラつきは c.v. 7% 以下であり、各試料の $\text{HO}\cdot$ 生成能には有意な差があることが示された。これは、各試料の接触角測定結果の傾向とよい相関を示したことから、悪臭分解などの光触媒活性と相関するものと考えられた。

7.4 活性酸素消去能評価

スピントラップ法という簡便な活性酸素測定法が開発されて以来、活性酸素消去能の評価が、医薬品および食品成分(とくにサプリメント)開発の分野で盛んに行われている。主として、 $\text{HO}\cdot$ および $\text{O}_2\cdot^-$ について、これらの活性酸素の消去能の強い物質のスクリーニングが行われる。

評価法の概要は次のとおり。それぞれの活性酸素を一定量生成させる系を用いる。 $\text{HO}\cdot$: Fenton 反応系、 $\text{O}_2\cdot^-$: hypoxanthine-Xanthine Oxidase 系。これらの生成系に DMPO を添加すると、それぞれの活性酸素は DMPO アダクトとなって安定化されるため、室温で測定が可能となる。こうした系に、あらかじめ被検物質を共存させておくと、生成した活性酸素が被検物質と DMPO 間で競合的に消費される。その結果、活性酸素消去能の高い物質を添加した場合に、検出される DMPO アダクトがより減少する。上記の活性酸素生成系は、いずれも数秒で一定量の活性酸素をそれぞれ生成するため、評価時間は短時間で済むメリットがある。

ESR による評価法では、対象となる活性酸素の特定が可能のため、製品の特徴を明示できるメリットがある。生体成分に対する酸化が、多くの疾病の原因であることが明らかにされている現在、「抗酸化(抗老化)」は今後も大きなテーマとなると予想され、ESR による抗酸化性評価はさらに広がりを見せると考えられる。

8. FAQ

Q 1 感度が上がるはずの低温測定で、まったく信号が得られないのですが、なぜでしょうか？

図-12 酸化チタン薄膜から生成した DMPO-OH の比較

A 1 低温測定用のアタッチメントが、キャビティ内に設置されるようになっていますが、このときキャビティ内で結露が生じます。これがマイクロ波のロスの原因になりますので、キャビティの後ろのノズルから乾燥ガス（窒素ガスなどの不活性ガス）を少しずつ送って、キャビティ内を乾燥状態にしながら測定してください。

Q 2 ラジカル濃度の定量はどのようにすればいいですか？

A 2 ESR スペクトルは微分波形で表示されていますので、2 回積分することによりマイクロ波の吸収面積を求めることができます。既知濃度のラジカル標準物質を、同条件（増幅率を除く）で測定して2 回積分し、その面積を試料の積分面積と比較して濃度を求めます。

Q 3 ラジカル標準物質は、何をを使えばいいのでしょうか？

A 3 最もよく使われるのは、TEMPOL (4-HYDROXY-2,2,6,6-TETRAMETHYLPYPERIDINE-N-OXYL)などの合成 NO ラジカルです。しかし、最近この TEMPOL の入手が困難になってきているようですので、3-CARBAMOYL-PROXYL のようなほかの NO ラジカルを使

うといいでしょう。その際メーカーにラジカル純度を確認しておくといいでしょう。こうした NO ラジカルは、ベンゼンに溶解して用いると個体試料の定量にも使用できます。溶液試料の場合は、試料を溶解した溶媒に溶解して使ってください。

9. おわりに

ESR は特殊な測定法と受け取られがちであるが、単に不対電子の有無を計測するのみならず、対象物質が不対電子を有する状態であるがゆえの反応性あるいは機能性の評価を行う際にも有用な手段となる。

文 献

- 1) 大矢博明・山内 淳編：“電子スピン共鳴”，講談社サイエンスフィク.
- 2) 河野雅弘：“電子スピン共鳴法”，オーム社.
- 3) 峠田博史：“トコトンやさしい光触媒の本”，日刊工業新聞.