

HERETIC-NMR법을 이용한 인의 정량분석

임헌성 · 박찬조 · 이석근*

한국화학연구원 화학분석센터
(2008. 7. 28. 접수, 2008. 10. 6. 승인)

Quantitative analysis of phosphorus by HERETIC-NMR method

Heon-Sung Lim, Chan-Jo Park and Sueg-Geun Lee*

Center for Chemical Analysis, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-606, Korea

(Received July 28, 2008, Accepted October 6, 2008)

Abstract : We have developed an alternative to the internal chemical reference based on a calibrated reference signal which is not a real NMR line but an electronically produced signal (HERETIC) and determined the phosphorus concentration using this method. The area ratio of HERETIC and sample peaks obtained from the standard samples was used to measure the concentrations of different samples directly. The analysis of phosphorus by this method showed the excellent linear regression coefficient ($R^2=0.9999$) for the concentration range from 20 ppm to 500 ppm with HERETIC peak as reference.

Key words : phosphorus analysis, NMR, HERETIC.

1. 서 론

미지시료에 함유되어 있는 특정 물질의 양을 정확하게 분석하여 확인하고 특성을 평가해내는 것은 유기 무기 복합소재의 개발뿐만 아니라 환경 및 생물시료에도 필수조건이다. 그러나 물질의 종류와 양을 확인하려는 분석시료의 구성성분과 물리화학적인 환경은 경우에 따라서는 적용 분석방법 및 기기에 매우 큰 방해요인으로 작용할 수 있기 때문에 주의를 기울여야 한다.¹

핵자기공명분광법(NMR)은 물질을 구성하고 있는 특정 핵으로부터 발생하는 신호만을 활용하기 때문

에 대부분의 다른 분광분석법들과는 다르게 다른 핵(nuclei)중에 의한 방해가 없을 뿐만 아니라, 분석을 원하는 특정 핵의 갯수는 봉우리(peak)의 면적(peak area)과 직접적으로 비례관계에 있기 때문에 정확하게 물질의 양을 분석할 수 있다.^{2,3} 또한 화합물을 분석하는 다른 분석법에서는 같은 원소로 이루어진 화합물이라 하더라도 다른 물질이면 물질별로 분석기기가 나타내는 감도가 달라 반드시 그 물질로 검정곡선을 작성하여 정량적 농도를 구하여야만 한다. 그러나 핵자기공명분광법(NMR)은 각각 화합물을 구성하고 있는 핵의 농도가 각각 봉우리의 크기와 비례하기 때문에 매질의 방해 없이 동시에 각각의 화합물을 정

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-860-7710 Fax : +82-(0)42-860-7794

E-mail : leesg@kRICT.re.kr

량분석을 할 수 있는 유용한 분석법이다. 그러나 이러한 탁월한 장점에도 불구하고 고자장 고성능의 장비가 개발되기 전까지는 핵자기공명분광법은 이러한 분야에서는 특히 감도가 매우 낮아 별다른 활용성이 없었다.⁴ 최근 고자장 장비의 개발로 감도가 점점 향상되어 특정 핵에 대해서는 ng/mL 농도 수준을 감지할 수 있기 때문에 극미량의 의약 검색, 대사체 확인, 극미량 농도의 불순물 분석 등 응용성이 점점 증가되고 있다.⁵

핵자기공명분광법을 정량분석에 적용할 때의 장점은 별다른 시료의 전처리가 필요하지 않다는 것이다. 즉, 혼합물에서 분석물질을 분리해내거나 또는 유도체를 만들거나 또는 특정 핵을 분석하기 위해 시료를 분해하거나 등등의 과정에서 발생할 수 있는 오차를 줄일 수 있다. 다만 핵자기공명분광법으로 물질의 농도를 보다 정확하게 구하기 위해서는 내부표준물질을 사용하여야 한다. 동일 핵종이 포함된 내부표준물의 봉우리와 분석 목적 시료 봉우리의 면적을 비교하여 적분비를 구하여야 하기 때문이다.

핵자기공명분광법에서의 표준물질은 분석하려는 시료의 핵과 같은 핵을 포함하고, 시료와 같은 용매에 용해되어야 하고, 또한 시료와 반응하지 않아야 하며, 시료로부터 발생하는 봉우리와 겹치지 않아야 하는 등의 조건을 충족시켜야 한다. 그러나 이러한 모든 조건을 동시에 충족시키는 이상적인 내부표준물의 화학이동시약을 구하는 것은 매우 어렵다.^{6,7}

본 연구에서는 실질적으로 내부표준물이 없는 상태에서 이러한 내부표준물에 의한 봉우리와 같은 신호를 전자적으로 생성시키는 방법[HERETIC(Heteronuclear Electronic REference To access *In vivo* Concentration)]을 개발하였다.^{8,9} 그리고 이 방법을 인(phosphorus)의 분석에 적용하여 정량분석법으로의 타당성과 활용성을 연구하였다. ³¹P의 자연 존재비(natural abundance)는 100%이며, 상대적으로 NMR에 감도가 좋고 넓은 화학이동 범위를 나타낸다. 또 P는 무기물질뿐만 아니라 유기물질, 생화학물질에도 광범위하게 포함된 원소로 화학분석에서는 분석빈도가 매우 높은 원소이다.¹⁰⁻¹² 따라서 본 연구의 HERETIC법을 이러한 인 분석에 적용할 경우, 보다 간편하고 정확하게 인을 정량분석할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 실험

본 실험에 사용된 핵자기 공명 분광 분석기(NMR)

는 독일 Bruker사의 AVANCE-700 모델을 사용하였다. ³¹P-NMR 스펙트럼은 283.4 MHz에서 측정하였다. 검정곡선용으로 사용한 물질은 SPEX사 ICP 표준용액(1000 µg/mL P; NH₄H₂PO₄, δ=0.84 ppm, ³¹P NMR에서 외부 기준물질인 인산(H₃PO₄)을 기준으로 함)을 사용하였다. NMR 용매로 Aldrich사 D₂O를 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 Millipore Milli-Q를 2차 통과한 탈 이온수로서 비저항이 18.2 MΩ/cm 이상인 것을 사용하였다.

본 실험에서는 P의 내부표준물의 대안이 되는 가상의 기준신호 봉우리를 시료의 봉우리와 겹치지 않는 위치에 만든 다음, 시료로부터 발생하는 봉우리와 그 봉우리를 비교하여 적분비를 구하여야 한다. 따라서 NMR 장비로부터 heteronuclear pseudo-FID를 얻기 위하여 주파수 조절장치로부터 발생된 헤테로 핵종(heteronuclear species)의 주파수와 지수과동함수를 이용하였다. 이에 따라 생성된 신호를 검출하기 위해서 broad band antenna로써 proton coil을 사용하였으며, 이렇게 얻어진 기준신호(reference signal)의 화학이동과 상(phase)은 transmitter pulse의 영향을 받지 않으며, 크기 및 위치도 pulse program의 decoupler parameter를 조절함으로써 임의대로 결정될 수 있기 때문에 HERETIC법에 의한 봉우리는 정량적인 분석에 적용할 수 있도록 편리하며 매우 안정한 특징을 가진다.⁹ 따라서 특정 핵을 포함한 여러 가지 다른 종류의 물질들이 혼합되어 있어 동일한 NMR 스펙트럼에 각각의 물질에 따라 많은 봉우리들이 생성되어도 HERETIC에 의한 봉우리를 이 시료의 봉우리들과 겹치지 않게 조절할 수 있다는 매우 큰 장점이 있다. 복잡한 시료라 하더라도 같은 핵종에 대해서는 별도의 시스템의 조작이나 또는 시료의 형태, 매질을 변화시키는 전처리 작업을 하지 않고 시료를 시료용기인 NMR용 tube에 취하기만 하면 직접적으로 농도를 정확하게 분석할 수 있다. 즉, NMR에 반응하는 모든 핵종은 분석하려는 물질과 동일한 물질(chemical reference)이 없어도 본 HERETIC법을 이용하여 정량적으로 시료에 함유되어 있는 목적하는 화학 성분의 농도를 용이하게 분석할 수 있는 방법이다.

³¹P-NMR의 정량적인 스펙트럼은 Bruker의 pulse program인 "eretic 30"을 사용하였다. relaxation delay 5 초, acquisition time 0.9 초로 총 5.9 초의 repetition time은 30° pulse에서 phosphate의 saturation free 스펙트럼을 얻기에 충분하였다. 각각의 스펙트럼은 283.4 MHz에서 32 K data points와 256회 스캔으로

얻어졌으며 소요시간은 약 25 분이였다.

검정곡선용 P의 용액은 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 사용한 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P의 ICP 표준용액을 탈 이온수로 순차적으로 희석하여 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 D_2O 를 첨가하여 제조한 다음 각각을 5 NMR tube에 취한 후, AVANCE-700 NMR을 이용하여 동시에 HERETIC 봉우리와 P의 봉우리를 얻었다. 이때 HERETIC 봉우리의 위치는 차감주파수(offset frequency O2)를 조절함으로써 실제시료의 P 봉우리와 겹치지 않도록 하였고, 그리고 봉우리의 크기는 power level을 조정하여 실제시료의 봉우리 크기와 비슷하게 조절하였다. 또한 여러 가지 P의 화합물을 혼합한 혼합물을 취한다음 HERETIC 봉우리와 동시에 P에 대한 봉우리를 얻어 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

농도별로 취한 NMR 용기를 핵자기공명분광기를 이용하여 HERETIC 방법으로 동시에 스펙트럼을 얻어 표준용액에 대한 P의 봉우리와 가상의 내부표준물의 봉우리를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보면 가로축 0.84 ppm 위치에서 20~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도별 P의 봉우리가 나타나고 있고, 10 ppm 위치에서 HERETIC 봉우리가 일정한 크기로 나타나고 있다. NMR을 이용한 정량분석에서 화합물에 따라서 넓은 화학이동 범위를 나타내는 P의 특성상 시료 봉우리와 겹치지 않도록 내부표준물의 봉우리를 조절하는

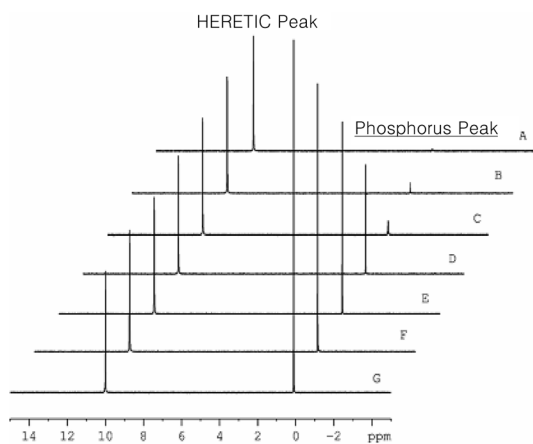


Fig. 1. A stack plot of ^{31}P -NMR spectra at various concentrations (20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of P ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ from top to bottom) with the HERETIC signal.

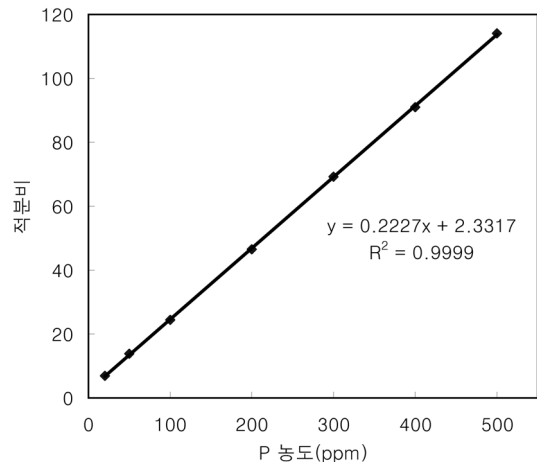


Fig. 2. Calibration curve for 20~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{P}(\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4)$ on various concentrations by ^{31}P -NMR spectra.

것은 매우 중요하다. 이를 위해 본 실험에서는 각 봉우리의 적분강도를 구하는데 전혀 문제를 야기하지 않을 만큼 자리이동을 시켰다.

또한 동일한 스펙트럼에서 P로부터 얻어진 봉우리를 적분한 다음, 그 적분값을 HERETIC 봉우리의 적분값에 비교하여 적분비를 구하였다. 각 농도에 대한 적분비를 이용하여 농도를 가로축, 적분비를 세로축으로 하여 검정곡선을 작성하였다. Fig. 2는 이러한 검정곡선을 나타낸 결과로, 매우 우수한 직선성 ($R^2=0.9999$)을 나타내고 있다. 이 때 만일 곡선의 기울기를 변경 하고자 한다면 측정할 때 HERETIC 봉우리의 크기를 적절하게 조절하면 된다. 이 방법은 매질의 영향이 나타나지 않는 분석방법이기 때문에 세심한 주의를 기울인다면 곡선은 항상 영점을 지나게 된다. 그리고 같은 방법으로 미지시료의 봉우리에 대한 적분비를 구하면 미지 농도를 쉽게 구할 수 있다.

여러 가지의 인화합물 즉, ortho phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate의 혼합물에 대해 HERETIC 봉우리와 동시에 화합물의 P에 대한 스펙트럼을 얻었고, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 이 경우 각각의 봉우리를 적분한 다음, 그 적분값을 HERETIC 봉우리의 적분값과 비교하여 구한 적분비를 Fig. 2의 검정곡선에 대입하면 바로 각각 화합물의 농도를 쉽게 구할 수 있다. 따라서 이 방법을 적용하면 여러 화합물을 정량분석하기 위해서 모든 표준물질을 구입하여 표준용액을 만들고 검정곡선을 작성하는 번거로움을 피할 수 있다. 더욱이 여러 가지 물질을 동시에 정량

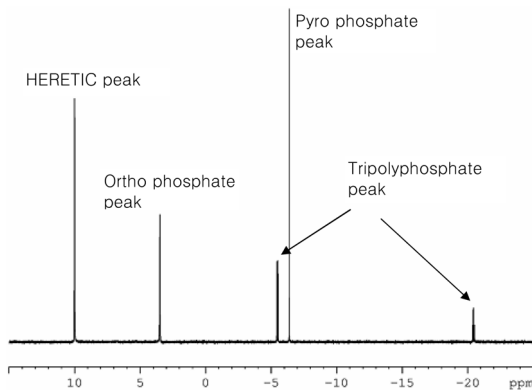


Fig. 3. ^{31}P -NMR spectra of various compounds of phosphorus with the HERETIC signals.

적으로 분석할 수 있기 때문에 시간적으로도 매우 효율적인 분석법으로 생각된다. 특히 각각의 화합물로부터 발생되는 동일 스펙트럼에서의 봉우리 감도는 모두 일정한 장점도 있다.

또 HERETIC법에서는 용매가 서로 다르더라도 용매의 종류에 관계없이 용액 및 용액화할 수 있는 시료이면 화학적으로 동일한 형태로 전환하는 별도의 복잡한 과정이 필요 없다. 그리고 복잡한 시료 매질의 영향을 받지 않고 단순하며 간편하게 정량적으로 분석할 수 있는 NMR 분석방법이다. 특히 화학이동 시약이 필요 없는 즉, 내부표준물법의 대안으로 HERETIC법의 응용은 원소 및 화합물의 정량분석법으로 주요한 수단이 될 수 있다. 더욱이 여러 화합물의 혼합물일 경우 각 물질에 대한 각각의 농도를 구할 수 있으며, 시료의 매질이 서로 상이하여 매질의 종류가 분석결과에 영향을 미칠 때 NMR 분석방법을 이용하여 정량 분석할 수 있으며 원하는 분석범위, 즉 ppm 농도에서부터 % 까지의 농도범위에서도 정량적으로 분석할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 NMR 방법으로 원소 및 화합물의 농도를 정량분석 할 때 내부표준물로 사용되는 시약

이 없는 상태에서, 내부표준물에 의한 봉우리와 같은 신호를 전자적으로 생성시키는 방법(HERETIC)을 개발하였으며, 이 방법을 인(phosphorus)의 분석에 적용하였다. 이 방법으로 분석을 할 때 P의 농도가 20~500 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 매우 우수한 직선성($R^2=0.9999$)을 나타내었고, 또한 여러 가지 P의 혼합물 중에서 각각의 인화합물들을 동시에 분석할 수 있었다. 따라서 NMR 정량분석에서 HERETIC법의 응용은 인의 원소 및 화합물을 정량분석을 할 때 매우 간편하고 효율적인 분석법으로 또 하나의 주요한 수단이 될 수 있다.

참고문헌

1. T. J. Kim, *Anal. Sci. Tech.*, **5**(1), 13A(1992).
2. 이석근, “핵 자기공명 분광학”, 63-68, 자유아카데미, 2002.
3. J. N. Shooley, *Progr. NMR Spectrosc.*, **11**, 79(1977).
4. J. Mendham, R. C. Denney, J. D. Barnes and M. J. K. Thomas, In *Vogel's Quantitative Chemical Analysis*, 6th ed.; Prentice Hall: England, 2000; Chap. 14 and references cited therein.
5. G. S. Remaud, V. Silvestre and S. Akoka, *Accred. Qual. Assur.*, **10**, 415(2005).
6. S. Akoka, L. Barantin and M. Trierweiler, *Anal. Chem.*, **71**, 2554(1999).
7. V. Silvestri, S. Goupry, M. Trierweiler, R. Robins and S. Akoka, *Anal. Chem.*, **73**, 1862(2001).
8. S. G. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**(10), 1635(2007).
9. S. G. Lee, *J. Kor. Magn. Reson.*, **11**(2), 115(2007).
10. J. G. Verkade and L. D. Quin, “*Methods in Stereochemical Analysis*”, Vol. 8. “Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereochemical Analysis”, VCH Publishers, Inc., 1987 and references cited therein.
11. A. V. Lebedev and A. I. Rezvukhin, *Nucleic Acids Res.*, **12**(14), 5547(1984).
12. C. N. Ho and S. L. Lam, *J. Magn. Reson.*, **171**, 193 (2004).