



## The Role of NMR in the Field of Quantitative Analysis

Sueg-Geun Lee

Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 04763, South Korea

Received Aug 10, 2016; Revised Sep 2, 2016; Accepted Sep 5, 2016

**Abstract** Although NMR technique has been using in many areas of chemistry, its merit on quantitative analysis seems not to acknowledge greatly because of the many inferior intrinsic aspects, particularly its sensitivity. Recently, new NMR techniques, high-field NMR, and demands for cutting edge techniques of analysis, however, seem to change the role of NMR spectroscopy in this field.

This review shows the application of NMR development in quantitative analysis and will discuss the basic idea, limitations, and pitfalls. Then it will show you several successful applications applied in quantitative analysis and you will see how useful and accurate method it is.

**Keywords** Quantitative analysis, Internal standard method, External standard method, Electronic standard.

### 서문

물리학에서 1946년 Purcell과 Bloch이 NMR 실험을 발표한 후 NMR 분광학은 화학에서는 대표적으로 Ernst의 2D-NMR 발표와 Wuthrich의 biomolecular 연구 발표로 물질의 반응, 구조, 동역학을 연구하는 가장 중요한 방법으로 사용되고 있다.

이와 같이 NMR 분광학은 화학의 여러 분야에서 중요하게 사용되고 있지만 여러 가지 원천적인 단점 특히 감도(sensitivity)의 문제

때문에 이들이 가지고 있는 장점이 물질의 정량분석에는 크게 인정되지 못하였다. 그러나 최근 high-field NMR, 새로운 NMR 기술, 그리고 분석에서 요구되는 첨단 기술 등이 화학에서 NMR 분광학의 역할을 한층 더 중요시 하게 되었고 특히 정량분석이라는 분야에도 새로운 역할을 하게 되었다.

이 review에서는 최근에 물질의 정량분석에 점차적으로 사용빈도가 증가하고 있으며 유용하게 사용되고 있는 Internal standard method, External standard method, Electronic standard method의 NMR 분석방법들과 이들의 장점과 단점을 실제 사용된 대표적인 예들로 살펴보도록 한다.

### NMR 피크의 면적(integration)과 이용

NMR 피크에서 얻을 수 있는 정보는 우리가 이미 잘 알고 있는 물질의 구조를 알아낼 수 있는 화학이동(chemical shift)과 스핀의 커플링 상수(coupling constant)들이다. 또 다른 하나의 유용한 정보는 스핀이 주는 피크의 전체 면적이다.<sup>1</sup> 피크의 전체 면적은 상대적인 스핀의 수에 의존하기 때문에 정확한 피크의 면적은 스펙트럼을 해석하는데 많은 도움이 된다. 모든 NMR 기기는 피크의 면적을 측정할 수 있는 적분 장치를 가지고 있으며 기존에는 면적의 측정이 분자의 구조분석을 위해서 분자 내에서 상대적인 스핀의 수에 사용되었다. 그러나 고자장 펄스 NMR에서 이완시간 (T1) 등을 고려하여 얻은

\* Address correspondence to: Sueg-Geun Lee, Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 04763, South Korea, Tel: 82-42-860-7710; E-mail: leesgsky@kaist.ac.kr

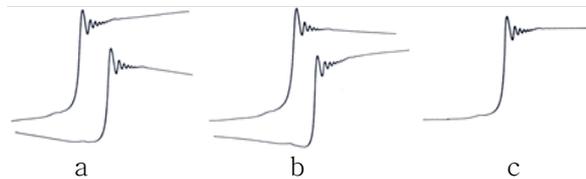
스펙트럼에서 피크의 면적은 스펙트럼의 피크와 잡음 비(signal-to-noise ratio)가 좋을 때는 1 % 보다 작은 오차를 줄 수 있으므로 정량 분석에 아주 잘 사용할 수 있다.<sup>1,2</sup> 정량분석에 사용되는 NMR 분석방법은 일반적으로 1) Internal standard method 2) External standard method 3) Electronic standard method의 3 가지 방법이 사용되고 있다.

어떠한 방법을 사용하더라도 정확한 정량분석의 목적을 달성하기 위해서는 다음의 몇 가지 주의를 기울여야 한다.<sup>3-5</sup>

첫 번째로는 피크와 잡음 비가 좋은 스펙트럼을 얻어야 한다. 즉 CW-NMR을 사용한다면 가능한 많은 시료를 이용하여야 할 것이며(이제는 사용하는 사람들이 없겠지만 이해를 비교하기 위하여 언급하였다) FT-NMR을 이용 할 때는 가능한 많은 FID를 얻은 후 스펙트럼을 얻어야 할 것이다.

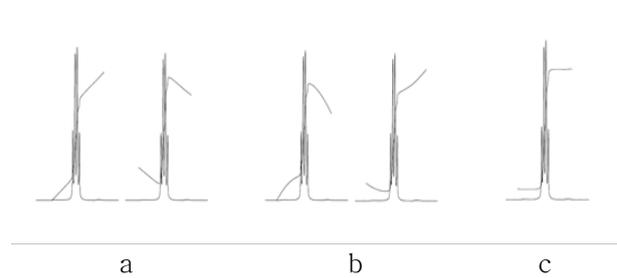
두 번째로는 기기의 detector의 위상(phase)을 정확히 조정하여 얻어지는 스펙트럼이 dispersion의 모습을 가지지 않는 정확한 absorption 스펙트럼을 가지도록 하여야 한다. 이 두 번째 사항은 FT-NMR에서는 FID를 Fourier Transformation (FT) 한 후 위상을 자유롭게 조정할 수 있으며 CW-NMR을 사용할 때는 미리 고려하는 사항이다.

세 번째로 그림-1 (CW-NMR) 와 그림-2 (FT-NMR) 에 보여진 것과 마찬가지로 적분 장치의 amplifier balance와 위상(phase)을 정확히 조정하여야 한다.



**Figure 1.** The effect of phasing and integrator adjustments on CW-NMR a) amplifier balance incorrectly set b) phase incorrectly set c) correct adjustments.

네 번째로 반드시 고려하여야 할 사항은 포화(saturation)이다. 포화는 물질의 T1과 T2 값과 연관되며 이 값들은 같은 분자 내에 있는 핵들 간에도 다른 값을 가질 수 있으므로



**Figure 2.** The effect of phasing and integrator adjustments on FT-NMR a) amplifier balance incorrectly set b) phase incorrectly set c) correct adjustments.

만약 포화가 일어난다면 피크의 적분값은 커다란 오차를 동반하게 된다. 이러한 포화의 문제는 CW-NMR에서는 scanning 속도(10 Hz/sec)와 라디오 파(rf)의 세기(0.1~0.2 mG)를 조절하여 쉽게 극복할 수 있었지만 FT-NMR에서는 기본적으로 사용되고 있는 펄스 넓이(pulse width) 등 여러 가지의 다른 지식들을 고려하여야 한다.

NMR의 정량 분석 방법이 다른 기기의 정량 분석 방법에 비해서 유리한 가장 중요한 이유는 다른 기기분석에서 반드시 고려되어야 하는 흡수 계수(absorption coefficient)나 흡광 계수(extinction coefficient)와 같은 파라미터들이 NMR분석에서는 필요하지 않다는 것이다. 즉 관찰하는 핵의 피크 세기(intensity)는 그것이 어떠한 화합물의 분자 속에 있다 하더라도 항상 같은 세기를 나타낸다는 것이다. 예를 들자면 수소 NMR 스펙트럼을 이용하여 어떠한 혼합물에서 벤젠을 정량 분석한다고 할 때 표준물질의 피크는 나프탈렌에 있는 양성자도 될 수 있고 아세톤에 있는 양성자도 될 수 있고 어떠한 다른 물질도 그것이 양성자만 가지고 있다면 그것은 표준물질이 될 수 있는 것이다(물론 정량을 하려고 하는 물질의 피크와 겹치지 말아야 한다. 이러한 사실에 근거하여 시약회사들은 이미 q(quantitative)-NMR의 표준물질이라는 여러 종류의 물질들을 생산 판매하고 있으며 q-NMR이라는 용어는 이미 NMR 영역에서 보편화 되었다).<sup>6,7</sup> 이러한 사실은 NMR 분석 방법이 다른 기기로 정량 분석을 하기 위해서는 분석하려고 하는 물질과 같은 순수한 표준(standard) 물질이 반드시 필요하다는 사실과 비교할 때 엄청나게 큰

장점을 가진다는 것을 쉽게 알 수 있다. 예를 들자면 최근 많이 사용되고 있는 조합 화학(combinatory chemistry)으로 유기 화학자들은 하루에도 수백 수천 개의 새로운 화합물들을 만들고 있으며 이들 화합물들의 순수 표준물질들이 없는 상황에서 이들을 정량 분석하기 위한 방법이란 오로지 NMR 분석방법 이외에 어떠한 다른 방법이 있을 수 없다. 이러한 장점 이외에 다른 분광분석에서 나타나는 피크들과 비교하여 NMR 피크의 넓이가 화학이동 차이들과 비교할 때 매우 좁다는 사실은 또 하나의 장점이다. 더욱이 초전도 고자장 NMR들의 지속적인 발전은 혼합물들의 복잡한 수소 NMR 스펙트럼을 점점 더 단순화시켜 가고 있으며 NMR의 양성자를 이용하는 정량 분석 방법은 새로운 분석 방법을 제시하고 있으며 또한 기존의 분석 방법들을 대체해 가고 있다.

즉 새로운 분석 방법은 최근에는 기기의 안정된 hardware와 컴퓨터의 발전으로 ERETIC(Electronic REference To access In vivo Concentration)이라는 기계적으로 가상의 피크를 만들어 정량분석에 사용하고 있는 것을 볼 수 있다.<sup>8</sup> 그리고 chemical shift reagents를 사용하여 기존 의약품의 거울상 이성질체(enantiomer) 순도 분석의 공인방법인 HPLC 방법을 (European Pharmacopoeia Commission) 대체하는 것으로 알 수 있다.<sup>9</sup> 이러한 경향들은 최근 기존의 여러 가지 표준 분석 방법들을 세계 표준 연구소들이 NMR 표준 분석 방법으로 대체하려는 시도들로 나타나고 있다.

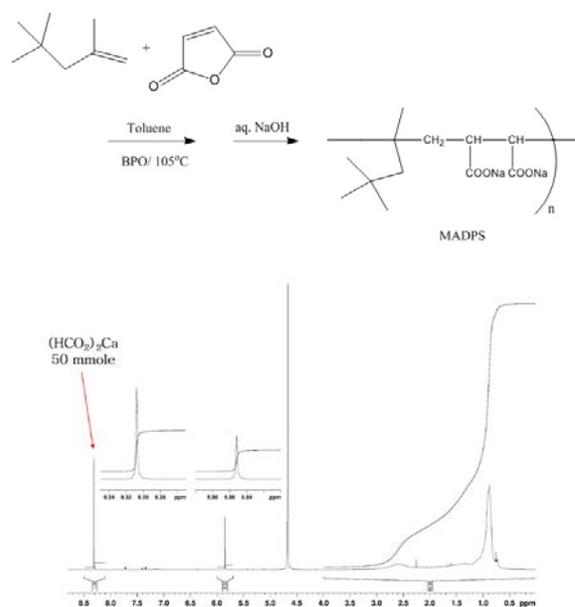
NMR의 정량 분석 방법은 양성자에만 이용될 수 있는 것이 아니고 다른 핵에도 적용될 수 있는 장점을 가지고 있다.<sup>10</sup> 더욱이 화학이동의 범위가 넓은 핵들에 적용할 때는 피크들의 겹침이 완화되므로 더욱더 이 방법이 유용하게 사용될 수 있다.

### Internal standard method

몇 가지의 조건만 충족한다면 가장 간단하며 정확한 분석방법이다. 첫째는 분석하려고 하는 물질과 같은 용매를 사용할 수 있는

표준물질이 있어야 하며 두 번째로 기준물질이 분석하려고 하는 물질과 화학이동이 겹치지 않아야 한다. 특히 표준물질이 하나(singlet)의 NMR 피크로 나타난다면 최선이다.

아래 보여준 그림-3은 식-1에 보여준 polymerization 반응에서 얻어진 물질의 정량분석을 보여주고 있다.



**Figure 3.** Determination of the concentrations of products formed from eq.-1 calcium formate (50 mmole).

식-1에서 생성된 물질은 salt들이므로 직접적인 정량분석은 불가능하고 여러 가지 과정을 거쳐야 하지만 그림-3은 calcium formate를 이용하여 반응 후 얻어진 두 물질의 정량분석을 직접 수행할 수 있음을 보여주고 있다. 즉 식-1로부터 얻어진 물질들은 어떠한 다른 분광법으로도 정량을 할 수 없는 경우에 해당하는 것을 NMR 방법으로 해결한 한가지 예다.<sup>11</sup>

### External standard method

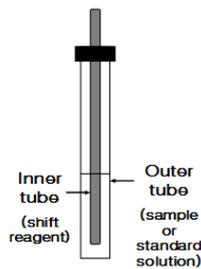
이 방법을 사용하여야만 하는 경우는 두 가지가 있을 수 있다. 첫째는 표준 물질로

사용하려는 물질이 분석하려고 하는 물질과 반응을 하는 경우이고 두 번째는 표준 물질이 분석하려고 하는 물질과 화학이동(chemical shift)이 같은 경우이다. 예를 들자면 sodium(Na)이나 chlorine (Cl)를 분석하려고 할 때 이들 원소들을 표준물질로 사용하여야 하는데 이들의 화학이동이 같이 나타나므로 표준물질과 분석하려는 물질이 다른 조건에 놓이게 하는 그림-4와 같은 방법과 과정을 사용하게 된다. 이때 표준물질은 chemical shift reagent [Dy(TTHA)]와 같은 상태로 coaxial tube에 있게 되며 화학이동이 분석하려고 하는 원소의 화학이동과 다르게 나타나게 된다. 그러나 다른 상태에 있는 물질의 NMR 피크의 크기는 다르게 나타나게 되므로 regression method를 사용하기 위하여 먼저 여러 농도의 물질로 검정 곡선을 작성하여야 정량분석이 가능하게 된다.<sup>12</sup>

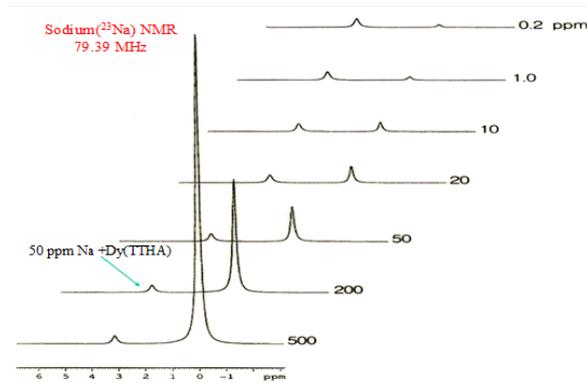
**External Standard Method**

**Procedure**

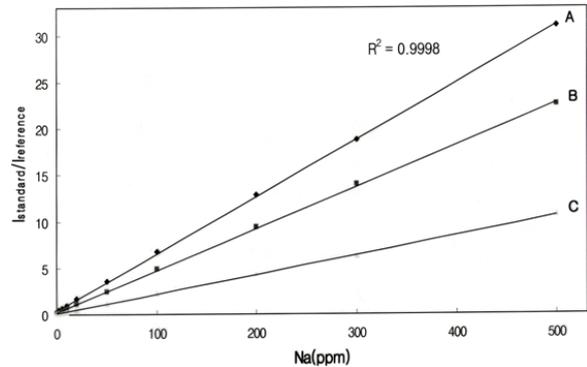
- Inner Coaxial tube (3 or 5 mm) : chemical shift reagent and standard
- outer NMR tube (5 or 10 mm) : sample or standard solution
- Integrate the signals of sample and standard
- \* Do not need pretreatment of sample



**Figure 4.** A device for external standard method and procedure.



**Figure 5.** 79.39 MHz sodium-23 NMR spectra of 500-0.2 ppm sodium (in 5 mm tube) and 50 ppm sodium with Dy (TTHA) (in 3 mm coaxial tube)

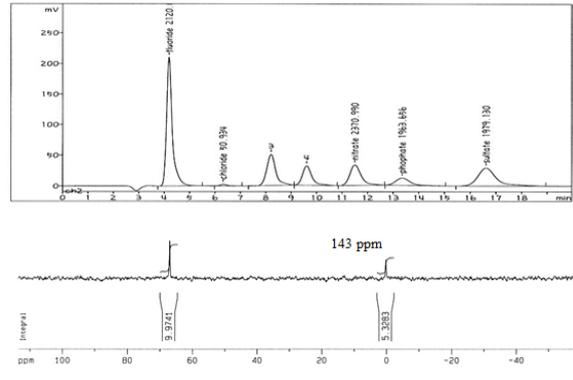


**Figure 6.** Representative calibration curve of sodium at various concentrations with external standard with Dy (TTHA).

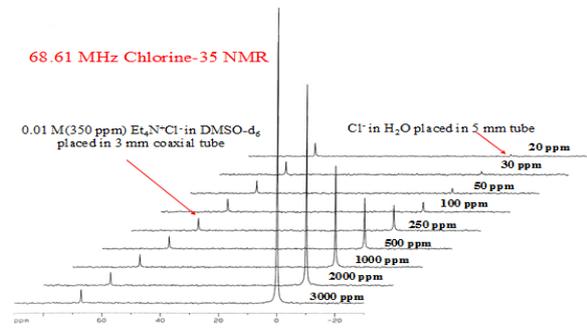
그림-5와 6은 각각 대표적인 sodium NMR 스펙트럼과 이들로부터 얻어진 검정 곡선을 보여주고 있다. 이와 같은 금속 ion 분석 실험은 기존의 AA(Atomic Absorption)나 ICP(Inductively Coupled Plasma) spectroscopy를 이용할 때 dilution과 같은 시료의 전 처리와 matrix의 영향으로 커다란 실험의 오차를 수반할 수 있지만 NMR 실험 방법은 이들로부터 오는 실험의 오차를 완전히 제거할 수 있는 우수한 방법이다. 그림-5에서는 0.2 ppm의 농도의 스펙트럼까지만 보여주고 있지만 이들의 농도 또한 quadrupole relaxation으로 인한 90° 펄스와 빠른 repetition time의 사용이 가능하므로 더욱 낮출 수 있으므로 dynamic range 또한 크게 증가 시킬 수 있으며 스펙트럼의 측정 시간 또한 매우 빠르게 할 수 있다.

때로는 위의 경우와 같은 chemical shift reagent의 역할을 용매의 선택만으로도 가능한 경우가 있다. 그림-7과 8은 각각 용매를 chemical shift reagent로 사용하여 얻은 대표적인 chlorine-35 NMR 스펙트럼과 이들로부터 얻어진 검정곡선을 보여주고 있다.<sup>13</sup> 이 경우 또한 quadrupole relaxation으로 스펙트럼의 측정시간은 매우 빠르게 할 수 있다. 현재 대부분 많은 경우 ion들의 정량분석은 ion chromatography를 사용하게 되는데 이들의 분석과 NMR 분석방법의 비교를 위하여 chloride가 여러

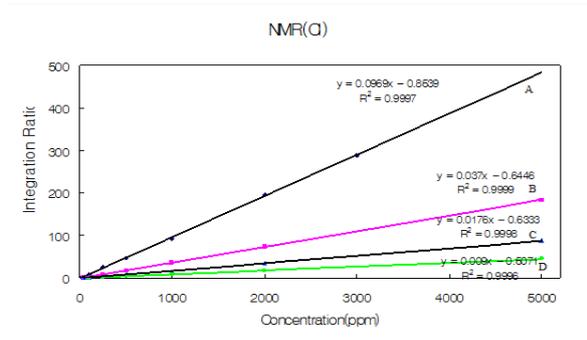
가지 다른 ion과 공존할 때의 이들 두 방법의 분석 결과를 그림-9에 보여주었다. Ion chromatography의 결과는 suppress column의 사용 등 최적의 조건을 사용하였음에도 이들의 한계인 matrix effect를 극복하지 못하고 150 ppm의 chloride 농도를 51 ppm라는 결과를 주었지만 NMR 방법에서는 143 ppm의 결과를 보여주고 있다. 이 스펙트럼은 약 10 분의 실험 시간으로 얻은 결과이며 스펙트럼에서 볼 수 있듯이 signal-to-noise를 증가시킨다면 정확한 결과를 얻을 수 있다는 것을 쉽게 예측할 수 있다.



**Figure 9.** Quantitative analysis of chloride (150 ppm) in the ion mixture. Ion chromatography (top). 68.61 MHz chlorine-35 NMR spectrum (in 5 mm tube) and 350 ppm chloride( $\text{Et}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$  in  $\text{DMSO-d}_6$  (in 3 mm coaxial tube)).



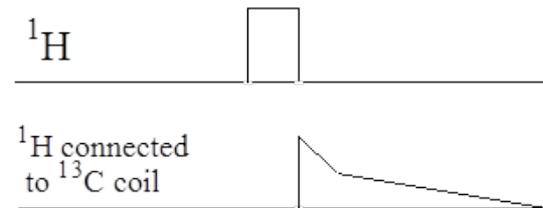
**Figure 7.** 68.61 MHz chlorine-35 NMR spectra of 3000-20 ppm chloride(in 5 mm tube) and 350 ppm chloride( $\text{Et}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$  in  $\text{DMSO-d}_6$ (in 3 mm coaxial tube)).



**Figure 8.** Calibration for 20~5000 ppm chloride (NaCl) on various concentration of external references by  $^{35}\text{Cl}$ -NMR.[External Reference [TEAC(Tetraethyl ammonium chloride in  $\text{DMSO-d}_6$ )] = A: 0.01 M, B: 0.025 M, C: 0.05 M, D: 0.1 M)]

**Electronic standard method**

최근에는 기기의 안정된 hardware와 컴퓨터의 발전으로 ERETIC(Electronic REference To access In vivo Concentration)<sup>8</sup>이라는 proton을 이용하여 가상의 기준물질 피크를 만들 수 있는 방법과 HERETIC(Heteronuclear Electronic REference To access In vivo Concentration)<sup>14-16</sup> 이라고 하는 heteronucleus의 가상의 피크도 만들어 정량분석에 사용할 수 있게 되었다. 즉 기계적으로 가상의 피크들을 만들어 위에서 언급된 기준 물질의 대용으로 사용할 수 있게 되었으므로 앞의 두 가지 방법에서 기준물질의 사용으로 생겨나는 여러 가지 오차와 어려움을 제거할 수 있게 되었다. 처음 Silvestre 등이 proton의 가상 피크를 발표하여 사용한 펄스 순서는 그림-10에 보여주고 있다.



**Figure 10.** ERETIC pulse sequence.

ERETIC 펄스 sequence는 결국 일반적인 기기에서 hardware의 변형을 필요로 하게 된다. 즉 proton channel에서는 proton pulse로 proton을 측정하게 되고 carbon으로 tuning과 matching 되어 있는 broad band channel에서는 proton transmitter에서 만들어진 proton pulse를 trigger와 frequency control unit 그리고 exponential function을 이용하여 가상의 FID를 carbon channel에 주입하게 된다. 결국 carbon channel에서 만들어지는 FID도 proton frequency를 가지고 있으므로 proton coil이 이들도 detection하게 되고 얻어진 스펙트럼에는 가상의 피크도 같이 나타나게 된다. 이때 second channel offset(O2)은 가상 피크의 chemical shift를 그리고 power level은 피크의 크기를 조절하게 된다. 그림-11이 hardware의 block diagram을 보여주고 있다.

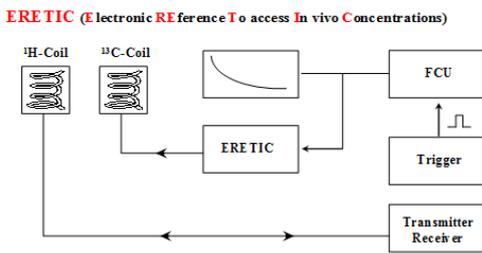


Figure 11. Block Diagram for the ERETIC Method.

그림-12는 100 mg/mL 농도의 glycerin과 함께 second channel의 power를 조정하여 ERETIC 피크를 2.5 ppm에서 나타나게 한 스펙트럼들을 보여주고 있고 그림-13은 ERETIC 피크의 일관성 검사를 위한 하나의 기준 ERETIC 피크와 glycerin 농도(500-25 mg/mL)의 변화를 측정한 스펙트럼들이다. 농도의 변화와 ERETIC 피크의 calibration curve는 우수한 결과를 보여주었다(최신의 기기들에서는 ERETIC 피크의 일관성은 기기의 hardware의 교체가 없을 때 약 6개월 이상 지속되는 것으로 보고되었다. 또한 최근 Bruker NMR에서는 위와 같은

hardware의 변형 없이 사용할 수 있는 program이 설치되어 있다).

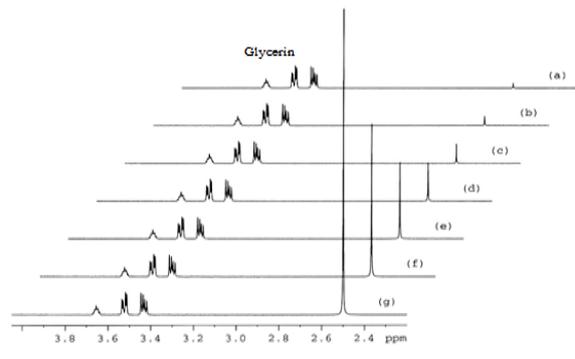


Figure 12. ERETIC signals at 2.5 ppm modified by the power of the shape pulse relative to the 100 mg/mL glycerin solution.

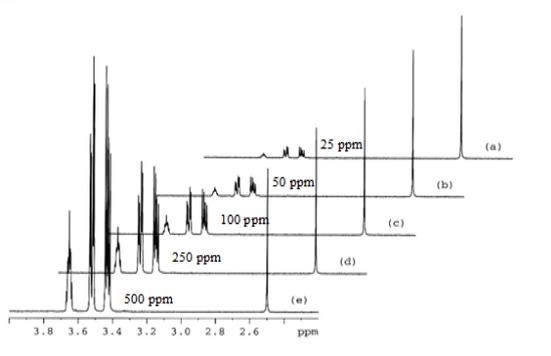


Figure 13. Standard samples (500-25 mg/mL) with ERETIC peak.

이 실험 방법의 유효성은 화장품에 포함되어 있는 glycerin의 정량분석을 표준 방법으로 알려져 있는 LC/MS 분석 방법과 비교하여 발표되었으며 정확성은 물론이고 무엇보다도 기존의 LC/MS 방법에서 사용되는 전처리 과정 등이 없는 간편하고 빠른 분석 시간의 장점을 보여 주었다.<sup>17</sup>

Proton 가상 피크의 사용과 함께 heteronucleus(X)의 가상 피크도 같은 개념으로 만들어 사용할 수 있다. 이때는 broad band probe를 사용하여 X channel에 사용하려고 하는 핵의 pulse를 주입하고 decoupler channel인 proton coil에 X transmitter에서 만들어진 X pulse를 trigger와 frequency control unit 그리고 exponential function을 이용하여 가상의 FID를 주입하게 된다(proton coil은

impedance가 10 배 이상 차이가 나는 chlorine-35 frequency도 받아 들였다). 이때도 second channel offset(O<sub>2</sub>)은 가상 피크의 chemical shift를 그리고 power level은 피크의 크기를 조절하게 된다. 그림-14가 HERETIC 실험 hardware의 block diagram을 보여주고 있다.

그림-15는 HERETIC 방법을 사용하여 200 mg/mL 농도의 chloride와 함께 second channel의 power를 조정하여 HERETIC 피크를 -50 ppm에서 나타나게 한 스펙트럼들을 보여주고 있고 그림-16은 HERETIC 피크의 일관성 검사를 위한 하나의 기준 HERETIC 피크(calibrated as 500 mg/mL chloride)와 chloride 농도(5000-50 mg/mL)의 변화를 측정할 수 있는 스펙트럼들이다. 농도의 변화와 HERETIC 피크의 calibration curve는 아주 우수한 결과를 보여주었다(Bruker NMR에서 hardware의 변형 없이 사용할 수 있는 HERETIC program은 아직 없다). 이 HERETIC 실험은 앞의 external reference method에서 각각의 nucleus에서 필요로 하는 chemical shift reagent나 용매 선택의 어려움과 많은 시간이 소요되는 검정 곡선의 작업도 제거할 수 있는 유용한 실험방법이다.

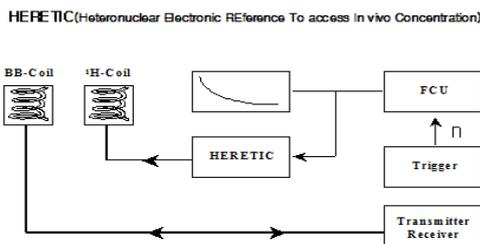


Figure 14. Block Diagram for the HERETIC Method

References

1. E. D. Becker, *High resolution NMR*, Academic Press, New York. (1980)
2. F. A. L. Anet, and D. J. O’Leary, *Tetrahedron Lett.* **30**, 1059 (1989)
3. D. L. Rabenstein, K. K. Millis, and E. J. Strauss, *Anal. Chem.* **60**, 1380 (1988)
4. D. L. Rabenstein, and D. A. Keire, *Pract. Spectrosc.* **11**, 323 (1991)

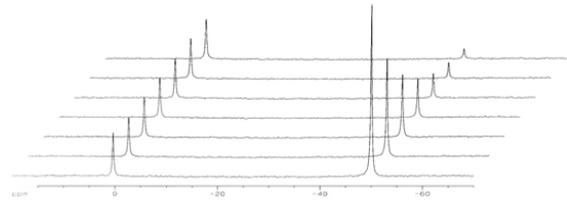


Figure 15. HERETIC signals at -50 ppm modified by the power of the shape pulse relative to the 200 mg/mL chloride (35Cl, 68.61 MHz).

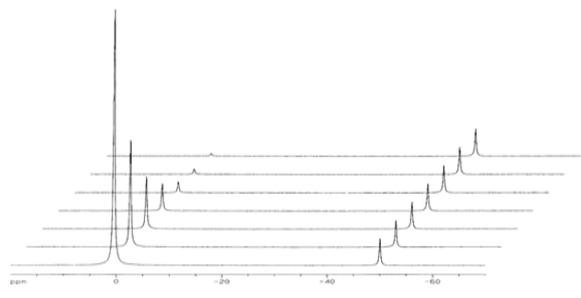


Figure 16. Chlorine-35 NMR spectra (5000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 mg/mL) with the HERETIC signals at -50 ppm calibrated as 500 mg/mL chloride.

결론

이상의 예에서 볼 수 있는 정량분석 방법들은 아직 제한적으로 사용되고 있지만 이들에 관련된 연구들의 발표가 점진적으로 증가하는 경향은 앞으로 이 방법들은 농도를 측정하는 정량분석에서 중요한 역할을 할 것이고 기존의 많은 표준 분석 방법들을 대체하게 될 것으로 예상된다.

5. L. D. Field, and S. Sternhell, *Analytical NMR*, John Wiley & Sons, Chichester. (1989)
6. Sigma-Aldrich, *Analytic*, **4**, 14 (2007)
7. Sigma-Aldrich, *Analytic*, **2**, 9 (2010)
8. V. Silvestre, S. Goupry, M. Trierweiler, R. Robins, and S. Akoka, *Anal. Chem.* **73**, 1862 (2001)
9. M. Thunhorst, and U. Holzgrabe, *Magn. Reson. Chem.* **36**, 211 (1998)
10. T. H. Ahn, H. C. Kang, and S.G. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **13**, 577 (1992)
11. S. G. Lee, Personal communication
12. H. S. Lim, G. G. Han, and S. G. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 1507 (2002)
13. H. S. Lim, and S. G. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 972 (2006)
14. S. G. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **11**, 115 (2007)
15. S. G. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **28**, 1635 (2007)
16. H. S. Lim, C. J. Park, and S. G. Lee, *Anal. Sci. Technol.* **21**, 438 (2008)
17. G. B. Park, C. J. Park, and S. G. Lee, *Anal. Sci. Technol.* **20**, 400 (2007)