



Constructing Overhauser Dynamic Nuclear Polarization-Nuclear Magnetic Resonance System Using Benchtop Electron Paramagnetic Resonance Spectrometer

Seung-Bo Saun, JiWon Kim, and Oc Hee Han*

Western Seoul Center, Korea Basic Science Institute, Seoul 03759, Republic of Korea

Received Apr 20, 2018; Revised Apr 28, 2018; Accepted May 12, 2018

Abstract The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique using Dynamic Nuclear Polarization (DNP) procedures is one of the promising techniques that enable overcoming low sensitivity problems in NMR spectroscopy. We constructed an ODNP-NMR system using a commercial benchtop EPR spectrometer. The ¹H NMR peak area of water in aqueous solutions of 4-hydroxy-TEMPO was enhanced more than 95 times in the ODNP-NMR experiments. Our signal enhancement results were about 55% of the previously reported result. This could be due to non-uniform microwave power over a sample and unwanted sample heating by microwave. However, this portable ODNP-NMR spectrometer will be eventually useful for site-specific detection with nano-scale spatial resolutions and molecular dynamics studies with significantly improved signal sensitivity.

Keywords Dynamic Nuclear Polarization, NMR, EPR, Signal enhancement, 4-hydroxy-TEMPO

서문

핵자기 공명 기법은 이 기법이 가지는 여러 장점들로 인해 물리학, 화학, 생물학, 재료과학, 의약학 등 많은 분야에서 사용되고 있다.

그러나 핵자기 공명 기법이 가지는 대표적인 단점은 다른 기법들에 비해 신호민감도가 낮다는 것이다. 이러한 단점을 극복하기 위해 제안된 기법들 중 동적 핵분극 (DNP: Dynamic Nuclear Polarization) 핵자기 공명 기법¹은 여러 분야에서 매우 성공적으로 응용되는 방식 중 하나이다. 이는 핵 스핀 대비 수백 배 이상 큰 전자 스핀의 분극을 핵스핀으로 전이하여 수백 배에서 수만 배에 이르는 핵자기 공명 신호 크기 증폭을 가능하게 하여, 핵자기 공명 기법의 낮은 신호민감도 문제를 해결할 수 있는 기법으로 여겨지고 있다. 핵자기 공명 기법은 기본적으로 높은 자기장을 사용할수록 신호민감도를 키울 수 있지만, 동적 핵 분극 기법은 비교적 낮은 자기장에서도 실험하기에 충분히 큰 신호를 얻을 수 있는 여건을 마련해 주었다.

다른 한 편 자석 제작 기술 개발의 발전으로 인하여 실험 장소 이동이 손쉬운 이동형 전자석 제작이 가능해 졌으며, 이러한 이동형 전자석을 이용하여 약 0.35 T 자기장 이동형 X-band 전자 상자성 공명 (EPR: Electron Paramagnetic Resonance) 분광 장비가 여러 회사에서 개발되어 현재 시판되고 있다. 동적 핵분극 기법은 전자 상자성 공명 기법과 핵자기 공명 기법을 동시에 필요로 하기 때문에, 전자 상자성 공명 장비에 핵자기 공명 장치를 덧붙임으로써 동적 핵분극 핵자기 공명 분광기 제작이 가능하다. 이 논문에서는 상용

* Correspondence to: **Oc Hee Han**, Western Seoul Center, Korea Basic Science Institute, Seoul 03759, Republic of Korea, Tel: 82-02-6908-6220; E-mail: ohhan@kbsi.re.kr

벤치탑 전자 상자성 공명 분광기에 직접 제작한 소형 핵자기 공명 분광 장치를 장착하여 만든 동적 핵분극 핵자기 공명 분광 시스템과, 이 분광기의 성능에 대하여 논의하고자 한다.

실험방법

양성자 하나와 전자 하나로 이루어진 스핀 두 개의 시스템의 경우, **그림 1**에서처럼 외부 자장 방향에 대한 각 스핀들의 방향 조합으로 인해 4가지 에너지 준위가 나타나게 된다.²

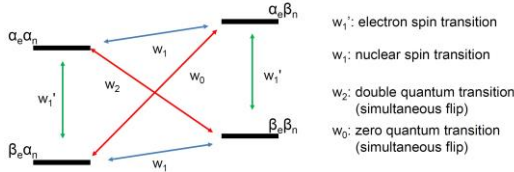


Figure 1. An energy diagram of and various transitions in a spin system consisting of an electron spin and a nuclear spin. α and β represent up and down states of spins, respectively, while subscripts e and n mean electrons and nuclei, respectively.

오버하우저 동적 핵분극 현상을 일으키기 위해서 먼저 전자 스핀의 에너지 준위에 해당하는 에너지의 마이크로파를 시료에 가하게 된다. 충분한 파워를 가지는 마이크로파를 가하게 되면, 전자 스핀 전이에 해당하는 두 에너지 준위의 전자 스핀 수(population)가 같아지게 된다. 이러한 상황에서 **그림 1**의 w_0 과 w_2 에 해당하는 핵스핀과 전자 스핀 간의 상호작용으로 인한 교차 이완 (cross relaxation)이 일어나고 이 중 한 스핀 전이가 주도적이 되면, 결과적으로 핵스핀 전이에 해당하는 에너지 준위 사이의 핵스핀 수의 차이가 열적 평형 상태에 비해 커지게 되어, 증폭된 핵자기 공명 신호를 얻을 수 있게 된다.²

그림 2는 우리가 사용한 상용 전자 상자성 공명 분광기(ADANI, SPINSCAN X, Belarus)의 사진과 0.35 T 오버하우저 동적 핵분극 장비의 개략도를 나타낸다. 전자석 사이에는

마이크로파를 시료에 가하기 위한 전자 상자성 공명용 프로브가 위치한다. X-밴드 용 전자 상자성 공명기의 프로브는 대부분 wave guide와 그 끝단에 위치한 공진기로 구성되며, 이 공진기 내부에 시료가 놓이게 된다. 공진기는 상용 장비에 장착되어 있던 것(TE102모드 용)을 사용하였다. 동적 핵분극 실험에 사용되는 마이크로파 전자스핀공명의 포화를 최대한 일으키기 위하여는 최소 수 W의 고출력이 필요하므로, 최고 출력이 1 W 이하인 전자 상자성 공명 장비 내부에 장착되어 있는 마이크로파 출력기는 사용을 할 수 없었다. 따라서 전자 상자성 공명 장비와 공진기 사이의 연결을 해제한 후 최대 10 W 출력을 갖는 외부 고출력 마이크로파 출력기를 공진기에 연결하여 사용하였다. 같은 자기장에서 전자스핀공명과 핵스핀 공명 주파수는 판이하게 다르므로, 마이크로파 인가를 통해 증대된 핵스핀 분극의 핵자기 공명 신호를 측정하기 위해 공진기 내부에는 핵자기 공명용 코일을 추가적으로 장착하였다. 마이크로파 공진기 안에 설치한 핵자기 공명용 코일은 **Figure 2. (b)**에 보여주는 것처럼 안장 코일(saddle coil)을 사용하였다. 설치된 코일은 공진기 내부에서 높이방향으로 최대한 일직선을 유지하며, 코일의 감긴 횟수 또는 두께를 줄임으로써 공진기 내부에 들어가는 금속의 양을 최대한 줄이는 것이 공진기의 높은 품질인자를 유지하는데 유리하다.³ 따라서 전자 상자성 공진기의 길이보다 살짝 길면서 코일의 filling factor를 무리하게 낮추지 않도록 5 mm 핵자기공명용 액체 시료 튜브 외부에 0.5 mm 굵기의 구리선을 사용하여 30 mm 길이의 안장 코일을 만들어 부착시켜 사용하였다. 물처럼 유전상수(dielectric constant)가 높은 물질의 경우, 공진기 내부의 전기장을 통해 마이크로파를 흡수하여 온도 상승의 요인이 된다. 따라서 이러한 요소를 방지하기 위해서 시료를 전기장의 값이 최소가 되는 공진기의 중앙에 최대한 위치하도록 하였다.⁴ 우리가 사용한 자석 시스템의 자기장 균일도는 1 mm 내경 튜브에 10 mm 높이의 물을 채워 물의 ¹H 핵자기공명 신호의 선폭 측정을 통해서 약 0.1 Gauss 이하임을 확인하였다.

핵자기 공명용 코일은 외부에 위치한 핵자

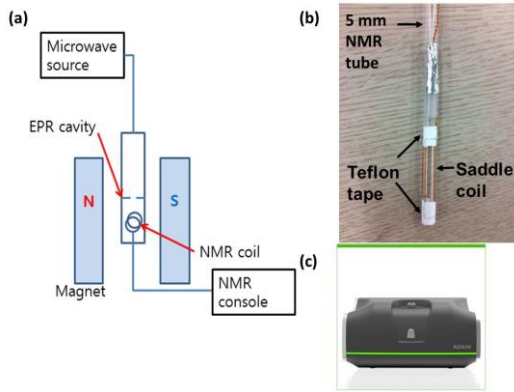


Figure 2. (a) a schematic diagram of an ODNP-NMR spectrometer. (b) A homemade saddle coil as an NMR detector in an EPR cavity for ODNP-NMR experiments. (c) a commercial benchtop EPR spectrometer used for ODNP-NMR experiments.

기공명 콘솔로 연결하여 라디오파 펄스 입력 및 핵자기공명 신호 측정에 사용하였다. 핵자기 공명용 콘솔은 minicircuits 사의 소형 라디오파 부품들, PC 에 장착한 보드형 디지털저와 보드형 펄스 발생 장치를 LabView 프로그램으로 인터페이스하여 만든 후 신호발생기와 라디오파 펄스 증폭기를 연결하여 제작하였다.⁵ 마이크로파 공진기와 핵자기 공명용 코일에서 발생하는 교류 자기장은 각각의 진동 방향이 상호 수직이 되도록 핵자기 공명용 코일을 설치하였다. 즉 전자석을 통한 자기장 방향을 z 축으로 두었을 때, 마이크로파 자기장의 진동방향은 x 방향, 라디오파 자기장의 진동방향은 y 방향이라고 할 수 있다. 마이크로파를 계속 가해 주어 핵스핀 자화가 증대 된 상태에서 핵자기 공명용 코일을 통해 라디오파 주파수의 90도 펄스를 사용하여 증폭된 핵스핀 신호를 측정할 수 있다.

마이크로파 주파수는 약 9.38 GHz 를 사용했으며, 핵자기 공명 주파수는 약 14.2 MHz 를 사용하였다. 마이크로파로 인하여 시료가 가열되는 현상을 막기 위해, 분당 약 5 L 의 공기를 시료 부위에 흘려주면서 실험을 수행하였다. 신호 증폭을 측정을 위하여 100 mM 4-hydroxy-TEMPO 수용액을 내경 1 mm 튜브 안에 10 mm 높이로 사용하였으며, 이는

4-hydroxy-TEMPO 분자에 있는 홀 전자와 물 분자의 양성자 핵스핀 사이의 쌍극자 작용에 의해 일어나는 오버하우저 동적 핵분극 현상을 활용하기 위한 것이다.

실험결과

그림 3은 전자상자성공명기(A200, Bruker BioSpin GmbH, 독일)를 이용하여 얻은 3 가지 농도의 4-hydroxy-TEMPO 수용액의 전자 상자성 공명 스펙트럼들이다. 4-hydroxy-TEMPO 수용액의 전자 상자성 공명 신호는 3개로 갈라져 나타나는데, 이는 4-hydroxy-TEMPO 분자 내의 홀전자와 질소 원자 사이의 초미세 상호작용에 의한 것이다.

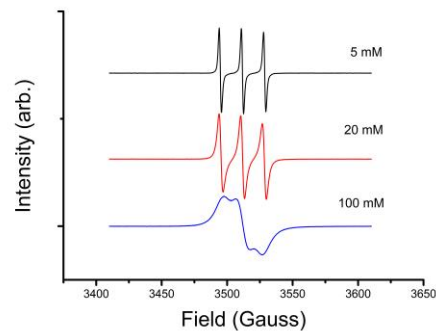


Figure 3. CW EPR spectra of 4-hydroxy-TEMPO aqueous solutions in various concentrations.

그림 4는 오버하우저 동적 핵분극 기법을 이용하여 4-hydroxy-TEMPO 100 mM 수용액으로부터 얻은 물 분자의 ^1H 핵자기 공명 신호의 증폭을 보여준다. **그림 5**는 마이크로파의 출력을 바꿔가며, 신호 증폭도를 측정한 결과를 보여준다. 신호 증폭도는 마이크로파를 가하지 않은 경우의 NMR 스펙트럼의 신호 면적(적분값) 대비 마이크로파를 가했을 때 얻은 스펙트럼 적분값을 비교하여 계산하였다.²

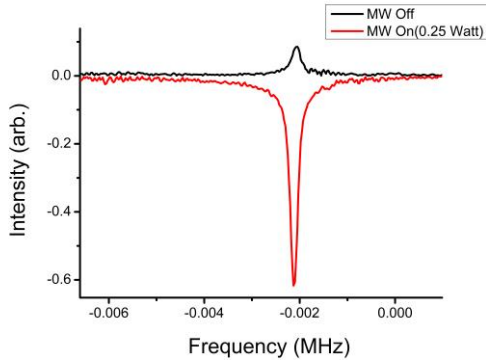


Figure 4. Proton ODNP-NMR spectra of 100 mM aqueous 4-hydroxy-TEMPO solution when microwave power is on (MW On) and off (MW Off).

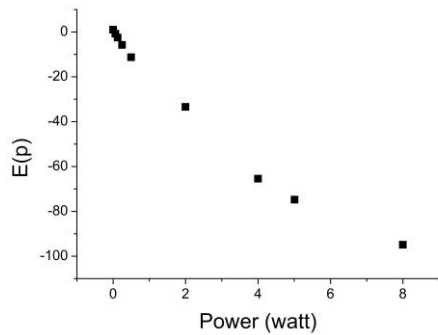


Figure 5. NMR signal enhancement factor ($E(p)$) versus microwave power applied to the 4-hydroxy-TEMPO solution, estimated by NMR peak areas. The signal was enhanced about -95 times at 8 W.

논의

오버하우저 동적 핵 분극 핵자기 공명 신호의 증폭도는 전자 상자성 공명의 포화도가 높을수록 증가하며, 높은 마이크로파 파워를 사용하여 전자상자성 공명 신호 포화도를 높일수록 더 높은 핵자기 공명 신호 증폭도를 얻을 수 있다.²

시료로써 사용한 4-hydroxy-TEMPO

수용액의 농도가 진해질수록 전자스핀공명 신호의 선폭이 넓어지며 각 스펙트럼들이 하나로 중첩되는 경향을 갖는데(그림 3), 이는 4-hydroxy-TEMPO 분자들 사이의 스핀 교환 작용과, 4-hydroxy-TEMPO 분자의 운동성 둔화에 의해 전자스핀공명 선폭이 넓어지는 효과 때문이다.⁶ 3개의 신호가 분리되어 있을 때에는 일정한 자기장 하에서 3개 중 하나의 전자스핀공명 신호만을 선택하여 포화시킬 수 있으므로 신호증폭도는 이론상 최대 증폭치의 1/3 크기가 된다. 하지만 3개의 신호들이 1개의 신호로 겹치는 경우에는 일정한 자기장 하에서 3개의 신호를 모두 포화시키는 것이 가능하므로⁶ 마이크로파의 출력 파워가 충분하다면, 이론상의 최대 증폭치가 되는 핵자기 공명 신호를 얻을 수 있게 된다.

그림 5에서 보듯, ODNP-NMR 신호는 가해주는 마이크로파의 파워가 커짐에 따라서 증폭률도 증가하며 특정 값으로 수렴하는 경향을 갖는다. 이러한 결과는 마이크로파 파워에 따른 전자스핀 공명 신호가 포화되는 경향과 일치하며, 적절한 4-hydroxy-TEMPO 농도에 따른 충분한 파워의 마이크로파를 가해 전자스핀 공명 신호가 최대 포화도에 도달하게 되면, ODNP-NMR 증폭도 또한 최대가 된다. 오버하우저 동적 핵 분극 핵자기 공명 신호의 증폭은 마이크로파를 가해주지 않는 경우의 신호와 위상이 반대가 되어, 마이크로파의 파워를 높임에 따라 신호 크기가 감소하다가 사라진 후 그 이후로는 반대 위상 방향으로 점차 증가하는 추세를 나타내었다(그림 3). 신호증폭도는 반대 위상 방향으로 계속 증가하다가, 마이크로파 파워 8 W인 상황에서 약 -95배로 증폭된 신호를 얻었다. 전자 상자성 공명 신호를 최대 포화시키기 위한 마이크로파 파워를 실제로 사용하지는 못했지만, 신호 증폭도를 반

비례 함수로 외삽⁷ 한 결과 마이크로파 출력이 충분히 클 경우 이는 약 -110 배 증폭까지 가능한 것으로 나타났다. 참고문헌 7에서의 경우 우리와 같은 시료를 사용하고 같은 방식으로 외삽 하여 얻은 최대 증폭률을 -195 배로 보고하였다. 이는 우리가 얻은 값에 비해 약 1.8 배 큰 값이다. 우리가 얻은 결과가 참고문헌에 비해 작은 이유를 추측해 보자면, EPR 공진기 안의 시료가 놓인 공간이 비교적 긴 (10 mm) 모양을 가지고 있어서, 시료의 양 끝단으로 갈수록, 일정한 파워의 마이크로파가 해지지 않고 공진기의 중앙에서 멀어질수록 마이크로파의 크기가 작아져, 이로 인해 증폭률이 낮게 측정되었을 가능성과, 고출력 마이크로파를 사용하여 실험할 때, 시료의 일부가 기화하여 실제로 측정된 시료의 양이 적어졌기 때문일 가능성을 생각해 볼 수 있다. 냉각 시스템의 개선 또는 높은 품질인자를 갖기 위한 공진기 구조 개선⁸을 통해 이러한 문제를 피할 수 있을 것이며, 유전상수가 작은 무극성 용매에 대한 연구에서는 마이크로파에 의한 시료 가열 현상과 공진기의 품질인자 감소 현상이 물에 비해 훨씬 적으므로, 시료 가열 현상을 피할 수 있으며, 더불어 실험 시 시료의 양을 늘릴 수 있어 신호 민감도 또한 더욱 향상

시킬 수 있을 것이다.

결론

상용 벤치탑 전자 상자성 공명 장비와 고출력 마이크로파 소스, 직접 제작한 핵자기 공명 장치, 핵자기 공명 코일을 사용하여 0.35 T 오버하우저 동적 핵분극 핵자기 공명 분광기를 국내에서 처음으로 제작하였고, 이 장비를 사용하여 4-hydroxy-TEMPO 수용액을 시료로 하여 물의 ¹H NMR 신호를 95 배 이상 증폭시키는데 성공하였다. 하지만 이전에 보고된 실험 결과에 의하면 최소한 이보다 약 1.8배 이상 더 큰 증폭률을 얻을 수 있을 것이라 예상되며, 예상되는 값보다 낮은 값을 얻게 된 원인들을 논의했다. 이러한 원인들을 확인하고 제거시키거나 완화시켜 증폭율을 이론상의 값에 더 가깝게 개선시킬 계획이다. X-band 오버하우저 동적 핵분극 기법은 생체 시료, 연료 전지의 전해질 막 등의 연구에서 주요한 요소인 물 분자 또는 양성자의 운동성 측정과, 휴대용 미소량 시료 측정용 NMR 장비 등에 응용될 수 있을 것이라 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2015년부터 2017년까지 이화여자대학교-한국기초과학연구원 간 학연공동연구센터 사업(DRC-14-1-KBSI)의 재정적 지원으로 진행되었다

References

1. A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **92**, 411 (1956)
2. K. H. Hausser and D. Stehlik, *Adv. Magn. Reson.* **127**, 79 (1968)
3. E. R. McCarney, B. D. Armstrong, R. Kausik, and S. Han, *Langmuir* **24**, 10062 (2008)

4. C. P. Poole, *Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*, Dover Publications (1983)
5. S. I. Kwon, *PhD dissertation* (2014) “Multiferroic $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2(\text{Fe}_{1-x}\text{Al}_x)_{12}\text{O}_{22}$ investigated by ^{57}Fe nuclear magnetic resonance”
6. B. D. Armstrong and S. Han, *J. Chem. Phys.* **127**, 104508 (2007)
7. J. M. Franck, A. Pavlova, J. A. Scott, and S. Han, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **74**, 33 (2013)
8. A. Doll, E. Bordignon, B. Joseph, R. Tschaggelar, and G. Jeschke, *J. Magn. Reson.* **222**, 34 (2012)