



Uncertainty Minimization in Quantitative Electron Spin Resonance Measurement: Considerations on Sampling Geometry and Signal Processing

Sangeon-Park^{1,†}, Jeong Hyun Shim^{2,3†}, Kiwoong Kim^{2,3}, Keunhong Jeong^{1,*} and Nam Woong Song^{2,*}

¹Department of Chemistry, Korea Military Academy, Seoul 01805, Republic of Korea

²Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon 34113, Republic of Korea

³Department of Medical Physics, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

Received June 18, 2020; Revised June 19, 2020; Accepted June 19, 2020

Abstract Free radicals including reactive oxygen species (ROS) are important chemicals in the research area of biology, pharmaceutical, medical, and environmental science as well as human health risk assessment as they are highly involved in diverse metabolism and toxicity mechanisms through chemical reactions with various components of living bodies. Electron spin resonance (ESR) spectroscopy is a powerful tool for detecting and quantifying those radicals in biological environments. In this work we observed the ESR signal of 2,2,6,6-Tetra-methyl piperidine 1-oxyl (TEMPO) in aqueous solution at various concentrations to estimate the uncertainty factors arising from the experimental conditions and signal treatment methods. As the sample position highly influences the signal intensity, dual ESR tube geometry (consists of a detachable sample tube and a position fixed external tube) was adopted. This type of measurement geometry allowed to get the relative uncertainty of signal intensity lower than 1% when triple measurements are averaged. Linear dependence of signal intensity on the TEMPO concentration, which is required for the quantification of unknown sample, could be obtained over a concentration range of $\sim 10^3$ by optimizing the signal treatment method depending on the concentration range.

Keywords ESR, TEMPO, Dual ESR tube geometry, Quantification uncertainty, Signal treatment method

서문

다양한 화학반응이나 생물학 반응과정에서 발생하는 라디칼들은 물질 내에 쌍을 이루지 않은 전자를 가지고 있는 분자단을 뜻하며¹ 화학반응성이 매우 높다. 이러한 라디칼들은 연소, 대기 화학, 고분자 합성, 플라즈마 및 생화학 분야의 다양한 화학반응에 관여하며, 특히 수산화 라디칼 ($\cdot\text{OH}$)이나 산화질소 (NO) 등과 같이 산소를 포함하는 활성산소종과 이들의 반응물은 살아있는 생명체 안에서 일어나는 생물학적 반응이나 신진대사과정에서 중요한 역할을 한다.²⁻⁴ 따라서 생체 조건과 유사한 수용액 내에 라디칼이나 활성산소종의 존재를 확인하고 정량적으로 측정하는 기술은 생물, 의학, 임상, 환경 및 보건 등 인체와 관련된 다양한 분야에서 유용하게 활용된다. 이러한 라디칼의 농도와 활성을 관찰하는 방법으로 효소활성분석법, 발색법, 형광법 및 발광기반측정법 등 다양한 분석방법이 있으나 전자스핀공명 (Electron spin resonance; ESR) 측정 기술만이 유일하게 라디칼을 직접 관찰할 수 있다.⁴ 이 기술은 1944년에 발명된 이후로 지속적으로 발전하여 물리, 화학 및 생물학 분야에서 매우 유용하게 활용된다.^{5,6} 특히 생물학 연구에서는 생체와 유사한 조건에서 활성산소종을 관찰하는 것이 필요하여 수용액 상태의 시료를 대상으로 측정을 수행하게 된다.

*Correspondence to: Keunhong Jeong and Nam Woong Song, Department of Chemistry, Korea Military Academy, 01805, Republic of Korea, Tel: 82-2-2197-2823; E-mail: doas1mind@kma.ac.kr / Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon 34113, Republic of Korea, Tel: 82-42-868-5214; E-mail: nwsong@kriss.re.kr, [†]Equally contributed to this work

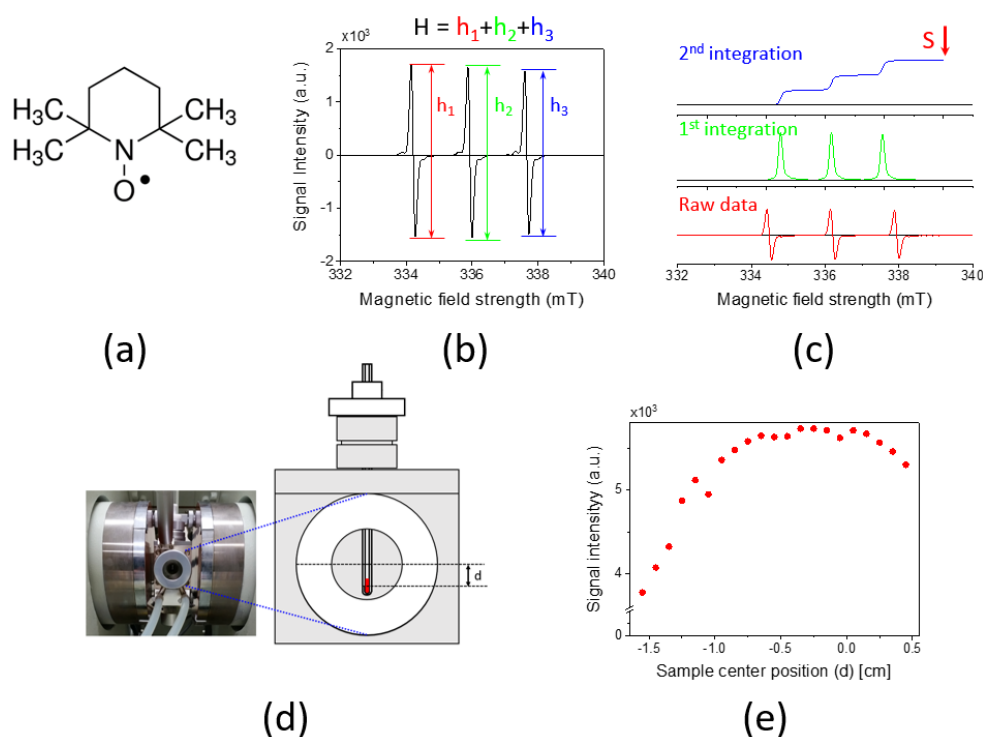


Figure 1. (a) Molecular structure of TEMPO (b) ESR spectrum of 1 mM aqueous TEMPO solution (c) 1st and 2nd integration of TEMPO ESR spectrum (d) the schematic diagram of ESR sample cell geometry (e) ESR signal intensity observed with changing the sample position

본 연구에서는 상온에서 라디칼이 함유된 수용액 시료의 ESR 신호를 측정할 때 불확도가 최소화된 정량적 분석결과를 얻기 위해 기존의 신호 측정 및 처리 방법을 개선하고자 하였다. 이를 위해 수용액 내에서 안정된 홀전자 상태를 유지하는 TEMPO를 대상으로 ESR 측정 과정에서 관찰되는 불확도 요인을 분석하고 이를 최소화할 수 있는 방법을 제시하였다.

실험방법

TEMPO 수용액을 준비하기 위해 sublimation purified TEMPO (99%, Sigma-Aldrich)와 LC-MS grade water (Merck)를 사용하였다. 수용액 시료를 대상으로 ESR 측정을 수행하고자 하면 시료의 대부분을 차지하는 물 분자가 마이크로파를 흡수하여 전자 스핀의

전이 신호를 관찰하기 어렵다. 따라서 수용액 시료를 측정할 때 마이크로파가 통과하는 투과 거리(path length)를 최소화하여 물에 의한 투과 감쇄를 낮추되 측정대상 물질의 마이크로파 흡수는 충분히 일어날 수 있는 시료 용기를 선택하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 이를 위해 용융 석영 유리로 만든 내경과 외경, 길이가 각각 1, 2, 100 mm인 모세관(Wilmad LabGlass)를 사용하였다. 수용액을 모세관에 주입하는 데는 외경 0.84 mm, 길이 12" 인 PTFE 재질의 needle (Wilmad Labglass)과 0.5 mL용량의 PTFE Syringe (Hamilton)을 사용하였다. ESR 측정 시에는 시료를 10 ~ 15 mm 높이로 주입하며 수용액의 부피는 약 8 ~ 12 μ L에 해당한다. ESR 신호는 X-band ESR spectrometer (JES-X310, JEOL)를 이용하여 측정하였다. 마이크로파는 주파수와 출력이 각각 9.43 GHz, 1 mW였으며, 30 ms의 시간 상수와 30초의

sweep time으로 332–340 mT 영역을 100 kHz, 0.01 mT로 modulation하며 스캔하였다. 신호의 세기는 피크높이차의 총합, 또는 ESR 스펙트럼의 2차적분값에 해당하는 area under the curve (AUC)로 설정하였으며, 계산을 위해 Excel과 Origin 프로그램을 각각 이용하였다.

실험결과

본 연구에서 사용한 TEMPO (그림 1a)는 nitroxide 화합물로서 분자 내에 존재하는 홀전자가 외부의 산화질소나 자유 라디칼과 반응하여 소멸될 수 있다. 그러나 용매가 증류수인 경우에는 수용액 내 라디칼 농도가 극히 낮아 홀전자가 장시간 존재하며 시간에 따라 변하지 않는 ESR 신호를 얻을 수 있다. 그러므로 증류수에 녹인 TEMPO 수용액은 측정 조건에 따른 ESR 신호 세기의 변화를 관찰하는데 적합하다. 그림 1b 에는 TEMPO 분자 내에 존재하는 홀전자와 질소 원자간의 hyperfine interaction 에 의해 형성된 3 개의 ESR 피크가 나타나 있다.⁸

여기서 측정한 ESR 신호 세기는 다음과 같은 두 방법으로 설정 가능하다. 1) 피크높이차의 총합: 관찰된 모든 ESR 피크들의 최대-최소 차이($h_1 \sim h_3$)를 구하고 이 값을 모두 합하여 ESR 신호 크기(H)로 설정하는 방법(그림 1b) 2) 스펙트럼 AUC 의 총합: ESR 스펙트럼을 두 번 적분하여 AUC 를 계산하고 이 값을 신호 크기(S)로 설정하는 방법(그림 1c)

그림 1d 에는 ESR 측정장치에서 자기장과 마이크로파가 교차되는 측정 영역의 중심부와 시료의 중간 지점 사이의 거리를 도시하고 있으며, 둘 사이의 거리(d)를 변화시키면 그림 1e 에 나타난 바와 같이 시료의 위치에 따라 신호 세기가 30 % 이상 변하는 것이 관찰된다. 따라서 시료를 교체하면서 ESR 스펙트럼을 측정할 때 정량적 재현성 (또는 최소불확도)를 확보하려면 측정 영역 내 시료의 수직 위치를 일정하게 유지해야 함을 알 수 있었다. 일반적으로 시료를 주입한 시료 튜브를 ESR 측정 위치에 장착하기 위해서는 어댑터를 사용하는데 시료를 바꿀 때마다 어댑터와 시료 튜브 끝의 거리를 일정하게 맞추어 시료의

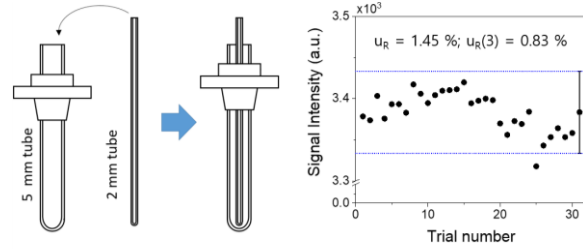


Figure 2. (a) Schematic diagram of using dual ESR tube used for aqueous solution measurement consists of a 2 mm capillary (sample tube) containing aqueous solution inserted into a 5 mm outer tube

수직 위치를 동일하게 유지하기는 매우 어렵다.

따라서 본 연구에서는 외경이 5 mm (내경 4 mm)인 튜브(외장 튜브)를 ESR 측정 장치에 고정한 상태에서 탈착이 가능한 모세관(외경 2 mm, 내경 1 mm)에 시료 용액을 주입해서 사용하는 이중시료관(dual tube)을 활용함으로써 측정 시료를 교체할 때 시료의 수직 위치가 일정하게 유지될 수 있게 하였다. (그림 2a) 이러한 이중시료관 구조가 실제로 측정불확도를 낮추는데 효과적인지를 확인하기 위해 다음의 과정을 수행하였다.

우선 실험 조건을 변화시키지 않고 시료 튜브를 고정한 상태에서 ESR 측정을 30 회 수행한 결과로 얻어진 신호 세기의 상대불확도(Relative uncertainty; $u_r(I) = 2.045 \times \text{표준편차/평균}$)⁹ 는 0.83 %로 산출되었다. 그 다음으로 외장 튜브를 고정한 상태에서 시료 튜브의 탈착을 반복하며 30 회를 측정한 결과 상대불확도는 그림 2b 에 나타난 바와 같이 1.45 %로 산출되었다. 이는 1 회의 측정값에

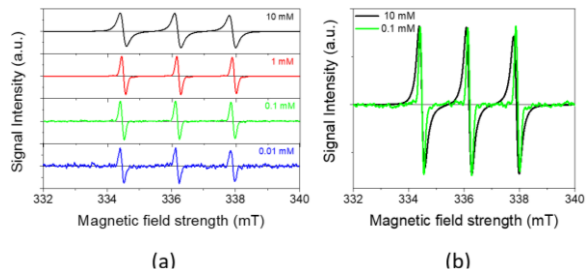


Figure 3. ESR spectra of aqueous TEMPO solutions at various concentrations (a) 0.01~10 mM solutions and (b) comparison of ESR spectra at 10 and 0.1 mM. (Signal intensities were normalized for the maximum values)

대한 상대불확도이므로 3 회의 실험결과를 평균하여 신호 세기를 측정하는 것을 가정하면 상대불확도는 $(1.45\%/\sqrt{3}) = 0.84\%$ 의 값을 가지게 되어 1% 미만으로 유지될 수 있음을 알 수 있다. 이중시료관 구조를 사용할 때 시료의 교체과정에서 모세관의 수직선에 대한 편각(polar angle)이 변화하여 측정불확도가 증가할 수 있음이 염려되었으나 그림 2b에 나타난 바와 같이 불확도가 매우 낮아지는 것으로부터 탈착의 반복에 따른 편각의 변화는 크지 않음을 확인할 수 있었다. 시료부의 개선으로 ESR 신호의 정량적 측정불확도를 최소화함으로써 『농도 대비 신호 크기 보정곡선 (calibration curve)』를 이용하여 미지 농도 시료의 농도를 결정하는 정량적 측정의 불확도 역시 향상될 수 있다.

Calibration curve를 이용한 미지 농도 정량화의 유효성을 확인하기 위해 넓은 범위의 농도 구간에서 ESR 신호를 측정한 결과가 그림 3에 나타나 있다.

TEMPO의 농도가 10 mM에서 0.01 mM로 점차 낮아질수록 신호의 세기가 줄어들면서 상대적으로 잡음 신호가 홀전자 신호와 함께 보이는 것을 관찰할 수 있으며 (그림 3a), 신호 세기를 표준화하여 고농도 (10 mM)와 저농도 (0.1 mM) 시료의 ESR 스펙트럼을 비교하면 고농도에서는 피크의 폭이 증가한 경향을 뚜렷하게 관찰할 수 있다. 이는 TEMPO 분자간의 스핀-쌍극자 상호작용에 의한 선폭 증가 현상으로 해석될 수 있으며,¹⁰ 낮은 농도에서는 TEMPO 분자의 주변에 주로 물 분자가 존재하는 반면 농도가 높아지면 TEMPO 분자 간의 영향이 증가하면서 홀전자의 주변환경이 불균일하게 형성되어 나타나는 현상이다. 이러한 선폭 증가는 ESR 신호 세기를 피크높이차의 총합으로 설정할 때 문제를 야기할 것으로 예상할 수 있다. 실제로 그림 4a에 나타난 바와 같이 고농도 TEMPO의 ESR 신호는 선형회귀선에서 크게 벗어나는 것을 볼 수 있었다. 따라서 신호 크기를 피크높이차의 총합으로 계산하는 경우 ESR 신호의 선폭에 변화가 없는 농도 영역에 한정하여 정량적 결과를 기대할 수 있음을 확인할 수 있다.

한편 AUC로부터 설정된 신호 세기는 측정대상 전 범위에서 합리적으로 선형성을 보여주고

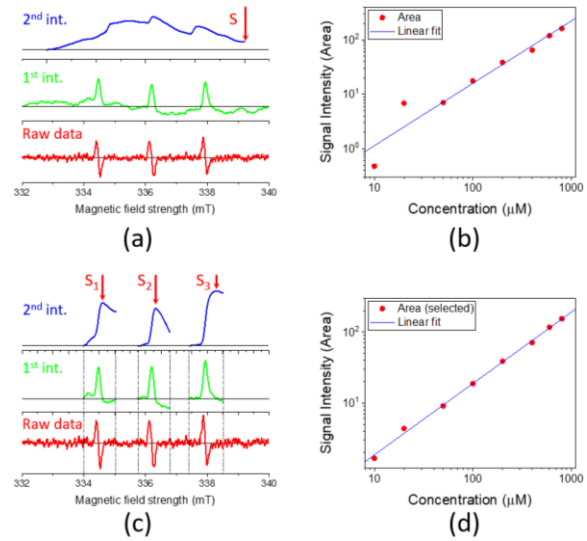


Figure 4. ESR signal intensity vs sample concentration (0.01~10 mM) at a fixed sample height. Signal intensities were calculated from (a) the sum of peak heights and (b) the area under the curve by triple integrations, respectively. [Dotted line in (a) shows the linear regression of three lowest concentration samples (0.01~1 mM), while the line in (b) was obtained by using all points (0.01 ~ 10 mM)]

있다. 이는 TEMPO 분자간의 스핀-쌍극자 상호작용에 의한 선폭 증가로 인해 ESR 신호의 피크 높이가 감소하기는 하지만 대부분의 TEMPO 분자들이 ESR 신호에 기여함으로써 적분을 통한 면적으로부터 도출되는 신호는 여전히 농도에 비례하는 양으로 나타나고 있음을 알게 해 준다.

한편 신호 대 잡음 비가 낮은 저 농도 시료의 ESR 신호처리 시에는 AUC를 계산하는 과정에서 잡음의 영향으로 인해 측정불확도가 커진다. 신호 대 잡음 비가 높은 고농도 시료의 ESR 스펙트럼에서 AUC를 계산할 때는 1차적분 결과 피크영역에서 양의 값을 가지는 홀전자 스핀의 흡수 피크가 나타나고, 이를 다시 적분하면(2차적분) 흡수 피크 영역에서 AUC가 증가하다가 피크가 없는 영역에서는 일정하게 유지되어 자기장 세기에 따라 계단식으로 증가하는 경향을 보여준다. (그림 1c) 반면 낮은 농도영역에서는 잡음에 의한 신호 왜곡이 커져 적분 범위를 늘려갈수록 AUC가 감소하는 구간이 존재한다. (그림 5a) 이러한 현상은 그림

에서 볼 수 있듯이 신호 대 잡음 비가 큰 - 특히 피크가 없는 - 구간에서 홀전자 스핀의 흡수가 0 보다 작게 계산되는 경우가 있기때문인데 흡수가 음의 값으로 나타나는 것은 물리적 관점에서 보면 잘못된 결과이고 단순히 잡음에 의해 수학적으로 생성된 결과라 해석될 수 있다. 따라서 농도가 낮아질수록 AUC 를 이용한 신호 세기 설정은 정량불확도가 높아지게 되고 이는 보정 곡선의 선형성 저하로 나타난다. (그림 5b) 잡음으로 인한 불확도 증가를 최소화하기 위해 피크가 존재하는 부분에서만 AUC 를 계산하고 (그림 5c $S_1 \sim S_3$) 이들의 총합($S = S_1 + S_2 + S_3$)을 ESR 신호 세기로 설정함으로써 낮은 농도영역에서도 정량적 측정 불확도가 개선된 결과를 얻고자 하였다. 다만 선택 영역에서 AUC 를 계산할 때에도 잡음으로 인해 흡수 신호가 음의 값을 나타내고 AUC 가 자기장 증가에 따라 감소하는 구간이 관찰되기 때문에 흡수 신호가 양의 값을 유지하는 범위에 한정하기 위해 『구간별 최대 AUC』를 해당 영역의 AUC 로 설정함으로써 (그림 5c) 잡음의 영향을 최소화하였고 결과적으로 농도 대비 신호 세기의 선형성이 개선된 정량적 결과를 얻을 수 있었다. (그림 5d) 한편 그림 5d 의 농도 영역에서 피크높이차의 총합을 ESR 신호 세기로 설정하여 농도보정곡선을 구할 경우 ($R^2 = 0.999$) 선택 영역의 AUC 를 이용한 보정곡선 ($R^2 = 0.997$) 보다 더 높은 선형성을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 피크의 선평이 변하지 않는 농도구간에서는 피크높이차의 총합으로 신호 세기를 측정하는 것이 AUC 총합방법보다 더 정량적인 결과를 얻을 수 있다고 판단된다.

결론

산업, 의학, 환경 등에서 중요한 역할을 하는 활성산소종과 같은 물질을 정확하게 식별하고 농도를 측정할 수 있는 ESR 은 매우 중요한 측정기술임에도 불구하고 상용 ESR 장비를 이용할 때 신뢰성 있는 측정프로토콜은 알려진 바가 적다. 특히 ESR 스펙트럼을 측정하는 측정 영역내 시료의 위치와 농도에 따라 달라지는 측정값은 해당 분야의 신뢰도에 큰

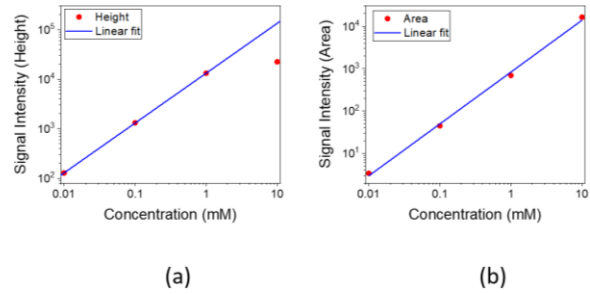


Figure 5. (a) ESR signal and integrated curve over full scan range (10 μ M TEMPO) (b) ESR signal intensity vs sample concentration (AUC by integration over full scan range) (c) ESR signal and integrated curve over selected regions (10 μ M TEMPO) (d) ESR signal intensity vs sample concentration (AUC by the sum of integration results over selected regions)

영향을 미칠 수 있다. 이에 본 연구에서는 TEMPO 수용액을 이용하여 ESR 측정영역에서 시료의 위치와 농도, 이에 따른 정확한 농도-신호 세기 정량 곡선을 얻어낼 수 있는 조건 확립에 대한 광범위한 연구를 수행하였다.

그 결과로 이중시료관을 이용함으로써 1% 미만(3 회측정 평균)의 상대불확도를 얻는데 성공하였으며 이를 바탕으로 농도에 따른 신호 세기의 분석을 실시하였다. 신호 세기 분석을 위하여 피크높이차 총합방법과 스펙트럼 AUC 총합방법을 사용하였다. 본 연구의 결과로 통상적으로 사용되는 피크높이차를 이용한 농도 측정방법이 높은 농도에서는 스핀-쌍극자 상호작용에 따른 선평 증가로 인해 큰 불확도를 가짐을 알 수 있었으며, 이를 보완할 수 있는 AUC 총합방법을 적용할 때 신호 대 잡음 비가 낮은 저농도 구간에서는 피크가 존재하는 부분에서만 AUC 를 사용하는 방법으로 잡음의 영향을 최소화한 정량적 결과를 얻어낼 수 있었다.

이러한 결과는 차후 ESR 측정을 이용하여 여러가지 라디칼의 종류 및 농도를 측정하는데 중요한 시금석이 될 것으로 판단되며 ESR 측정을 이용하여 시료의 농도를 측정하기 앞서 시료의 위치 및 농도에 따른 ESR 신호 정량화 기법의 표준화가 중요함을 보여준 사례라고 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 육군사관학교 인턴십 보조와 2020년도 한국표준과학연구원의 첨단측정장비 핵심기술 개발 (한국표준과학연구원- 2020- GP2020-0009) 재원으로 지원을 받아 수행되었다.

References

1. P. Muller, *Pure Appl. Chem.* **66**, 1077 (1994)
2. P. Pacher, J.S. Beckman and L. Liaudet, *Physiol. Rev.* **87**, 315 (2007)
3. J. M. McCords and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969)
4. I. Juránek, D. Nikitovic, D. Kouretas, A. W. Hayes, and A.M. Tsatsakis, *Food Chem. Toxicol.* **61**, 240 (2013)
5. R.P. Brandes and M. Janiszewski, *Kidney Int.* **67**, 1662 (2005)
6. L.J. Berliner, *Biomed. Spectrosc. Imaging* **5**, 5 (2016)
7. M.-G An, J.H. Shim, K. Kim, S. Oh and K. Jeong, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **24**, 9 (2020)
8. S.-B. Saun, J.W. Kim and O.H. Han, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **22**, 34 (2018)
9. Student [W.S. Gosset], *Biometrika.* **6** 1 (1908)
10. V. Meenakumari, A. Jawahar, and A.M.F. Benial, *Eur. J. Biophys.* **4**, 8 (2016)