

= 총 설 =

핵 오버하우저 효과의 원리와 실험

이 석 근

한국화학연구원 분석실

Principle and Experiment of Nuclear Overhauser Effect

Sueg-Geun Lee

Chemical Analysis Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Daejeon 305-606, Korea

1. 서 론

1955년 Solomon은¹ 다른 에너지 준위에 존재하는 전자들의 수를 같게 하는 포화(saturation) 실험을 할 때 금속의 핵들의 피크가 비정상적으로 커질(polarization) 것이라는 Overhauser의 예측을² 관찰하여 핵 오버하우저 효과(Nuclear Overhauser Effect : NOE)의 기본을 발표하였다. 이후 Kaiser는 양성자의 NOE를 이용하여 핵간의 거리를 측정하였으며,³ Lauterbur는 양성자를 디커플링하므로써 ¹³C의 피크의 크기가 커지는 것을 보고하였다.⁴ NOE를 이용한 유기화합물의 구조분석은 Anet이 처음 발표하였으며⁵ 이후 CW-NMR을 이용한 5% 이상 정도만의 NOE 측정이 80년대부터는 고자장의 NMR 발전으로 1% 보다 적은 정도의 NOE 측정도 가능하게 되었다. 80년대 특히 Ernst의 2D NOE(NOESY)⁶ 실험은 이 현상이 물질의 동역학(dynamics)을 연구하는데 결정적인 역할을 하게 되었다. 유기 화합물에 적용되는 이 실험의 이론은 초기 이후 아직까지도 별로 변한 것이 없지만 이 실험의 응용은 고자장과 컴퓨터의 발달로 엄청나게 변화하

였다. 적어도 양성자(proton) NMR을 이용하여 물질의 구조를 밝히려 했다면 제일 먼저 그리고 가장 쉽게 사용되는 방법으로 NOE가 사용된 것을 볼 수 있을 것이다.

이 현상은 두 핵간의 직접적인 쌍극자간 커플링(dipolar coupling)에 의한 핵의 이완(relaxation) 때문에 일어나는 현상이므로 분자 속에서 핵들의 공간적 배치를 연구하기에 매우 적합하며 보통 용액 NMR에서는 핵의 이완 시간이 짧아지므로써 피크의 넓이에 영향을 미치는 것 이외에는 스펙트럼에 어떠한 영향도 주지 않는다. 즉 핵간의 거리와 분자의 운동에 따라 달라지는 이 현상의 크기는 어떠한 다른 방법으로도 얻기 어려우므로 최근 NMR에 많은 지식을 가지지 않은 비전문가들도 기기사용의 편리함과 물질의 구조분석 때문에 이 실험을 급격히 많이 사용하게 되었다. 그러나 물질의 여러가지 현상을 규명하는데 매우 중요한 역할을 하게 되는 이 현상의 결과 해석은 때때로 이 현상 자체가 본질적으로 가지고 있는 여러가지 함정들 때문에 잘못된 해석과 응용으로 연구에 치명적인 오류를 유도할 수도 있다. 그러므로 이러한 오류에서 벗어나 성공적인 해석과 응용을 하려면 최소한 이 이론의 기본 개념을 이해하여야 할 것이다. 물론 핵의 이완으로부터 일어나는 이 현상을 자세히 알기란 매우 어려운

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)42-860-7710, Fax : +82+(0)42-860-7704

E-mail : leesg@pado.kriict.re.kr

일이지만 기본 개념을 이해하기란 그리 어려운 일만은 아니다. 이러한 이유로 이 총설에서는 NOE를 이해하고 이것으로 물질의 구조를 해결하려는 비전문가들도 쉽게 이해할 수 있도록 NOE가 어떻게 일어나는 현상이며, 어떻게 이것을 사용할 수 있으며, 어떤 것이 이들 실험의 한계인지를, 그리고 가장 많이 사용되는 NOE 차이 스펙트럼(difference spectrum)의 실험에 대하여 서술하려고 한다.

2. 기본 개념

NOE는 두 핵 중 다른 한 핵의 피크를 섭동(perturbation)시키면 다른 핵의 피크의 세기(intensity)가 변하는 것이다. 이 때 섭동이라는 것은 라디오파(radio frequency)를 이용하여 섭동시키려고 하는 핵 사이에서 일어날 수 있는 전이(transition)를 일으키는 핵의 분포(population)를 같게 하는 실험으로 포화(saturation)를 의미한다.

첫째 어떠한 섭동도 없는 상태 즉, 열평형(thermal equilibrium) 상태에서 얻은 피크의 세기를 I_0 라 하고 섭동이 있을 후 얻은 피크의 세기를 I 라고 한다면 NOE는 (식-1) 정의된다.

$$\eta_i(S) = (I - I_0) / I_0 \quad (\text{식-1})$$

$\eta_i(S)$ 의 의미는 핵 S를 포화시켰을 때 핵 i의 NOE를 나타낸다. 대부분 이 식을 백분율로 나타내기 위해서 100을 곱한 값을 사용한다. 이 때 위의 식에서 NOE는 양으로 또는 음으로 나타날 수도 있게 된다. 실제 실험에서 정성적으로 작은 분자들은 양의 NOE를 보이며 거대 분자들은 음의 NOE를 보이게 된다. 이러한 현상을 쉽게 설명하기 위하여 두 개의 핵이 상호 작용하는 모델이 주로 사용된다. 즉 스핀 1/2을 가지는 두 핵이 (가장 쉬운 예는 두 개의 양성자를 예로 들 수 있다) 한 분자 안에 있으면서 서로 스칼라 커플링(J)을 하지 않는다고 가정하자. 그러면 우리는 쉽게 이 두 핵이 가지는 에너지 준위를 그릴 수 있다. 즉 그림-1과 같이 $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ 그리고 $\beta\beta$ 가 이들이 가지는 에너지 준위(level)가 된다.

비록 그림에서는 $\alpha\beta$ 와 $\beta\alpha$ 가 에너지 준위가 틀린 것으로 그려졌지만, 이들 핵간에 J 커플링을 하지 않는 것으로 가정했기 때문에 핵 A에 해당되는 두 개의 전이(transition)는 정확히 같은 에너지를 가진다. 즉

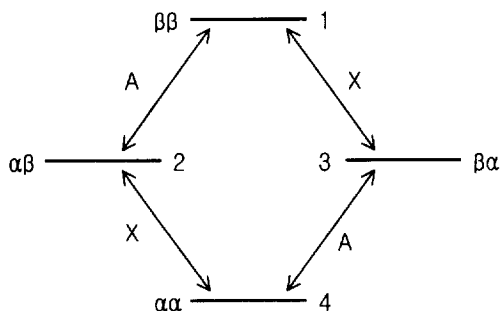


Fig. 1. Energy levels of a homonuclear AX system.

두 개의 X 전이도 같은 에너지를 가지게 되므로 섭동(perturbed)되지 않는 스펙트럼은 같은 크기를 가지는 두 개의 단일 피크로 각각 나타나게 된다.

먼저 각 에너지 준위에 있는 핵들의 총수를 4C라고 가정해 보자. 이들 각 에너지 준위가 같은 에너지라면 각 준위에는 같은 수의 핵들이 존재하게 될 것이다. 그러나 이들의 에너지 준위가 다르므로 볼츠만(Boltzman)의 분포 법칙에 의해서 핵들의 분포는 다르게 나타날 것이다. 준위 $\alpha\beta$ 와 $\beta\alpha$ 의 에너지가 같다고 가정하면 이들은 같은 핵의 수를 갖게 될 것이며, $\alpha\alpha$ 상태가 $\beta\beta$ 상태보다 에너지가 낮으므로 $\alpha\alpha$ 상태는 어느 정도의 숫자만큼 핵의 수를 더 가지게 될 것이다. 이것의 양을 Δ 라고 표시하면 각 에너지 준위에서의 핵의 수(P)는 다음과 같이 표시할 수 있다.

$$P_1 = C - \Delta, \quad P_2 = C, \quad P_3 = C, \quad P_4 = C + \Delta$$

X의 피크에 해당하는 전이(transition)는 P_4-P_2 와 P_3-P_1 이며 똑같이 A의 피크에 해당하는 전이는 P_4-P_3 와 P_2-P_1 이다. 이들을 우리는 단일 양자전이(Single Quantum Transition)라 부르며 이것에 해당하는 전이가 NMR의 피크를 나타내는 것이다. 이들 전이 이외에 양자수(Quantum Number)가 다른 두 개의 다른 전이 $P_3-P_2(0)$ 와 $P_4-P_1(2)$ 가 있지만, 이들은 양자 역학의 선택 규칙(selection rule)에 의해서 보통의 조건으로는 관찰되어질 수 없다.

이와 같은 평행 상태에서 NOE를 측정하기 위해서는 한 쪽의 핵을 섭동시켜 보도록 하자. 즉, X 핵을 섭동시키므로써 (다른 용어로 포화(saturation)를 의미) 준위 1과 3 그리고 2와 4에 존재하는 X의 핵들의 수를

같이 하므로써 X핵에 해당하는 피크가 나타나지 않게 할 때, P₁, P₂, P₃, P₄에 존재하는 핵들의 수는 다음과 같이 변하게 된다.

$$P_1 = C - \frac{\Delta}{2}, P_2 = C + \frac{\Delta}{2}, P_3 = C - \frac{\Delta}{2}, P_4 = C + \frac{\Delta}{2}$$

이들은 섭동을 하기 전의 상태와는 분명하게 다른 상황이 되었다. 이렇게 평형의 상태에서 벗어나게 된 시스템은 자연히 그들의 원래의 상황으로 돌아가려 할 것이며 이 때 돌아가는 과정들을 이완(relaxation)이라 한다. 먼저 X핵들의 이완은 섭동으로 포화시켰으므로 고려의 대상이 되지 않으며 A 핵의 피크에 해당하는 에너지 준위의 핵들 수의 차이인 P₄-P₃와 P₂-P₁은 섭동하기 전이나 후가 변함이 없다. 그러므로 A핵의 단일 양자전이(Single Quantum Transition)에 해당하는 이완의 과정은 원래의 상황으로 돌아가는데 필요한 과정이 되지 못한다. 즉, 섭동된 이 AX 스핀 시스템에서 이완 과정으로 단일 양자전이만이 일어난다면 X핵을 포화시켜도 A핵의 NOE는 나타나지 않게 된다. 그렇다면 분명 다른 이완 과정이 있게 될 것이다. 이들이 소위 제로 양자전이(Zero Quantum Transition)와 더블 양자전이(Double Quantum Transition)로 불리는 β_α와 αβ 그리고 αα와 ββ 에너지 준위 사이간에 각각 일어나는 이완과정이다.⁷

먼저 제로 양자전이를 살펴보자. 이들 즉 αβ와 β_α에너지 준위 사이에서 핵들 수의 차이는 평형 상태에서는 0이었다. 그러나 섭동 된 후의 핵의 수의 차이는 Δ(P₂-P₃)가 된다. 이 상태에서 원래의 상태로 가기 위해 이완 과정이 일어난다면 A의 피크의 한 부분에 해당하는 높은 준위 P₃에 있는 핵의 수를 증가시키고 다른 한편으로는 A의 피크의 다른 한 부분에 해당하는 낮은 준위 P₂에 있는 핵의 수를 줄이게 될 것이다. 즉 이 제로 양자전이가 주로 일어나는 AX 스핀 시스템에서는 X핵을 섭동시키면 A핵의 피크 크기를 줄이는 결과가 나타나게 된다. 즉 음의 NOE가 생성 되는 것이다.

나머지 다른 하나의 과정은 더블 양자전이이며 이것은 양의 NOE를 생성 시킨다. 즉 섭동 이전은 P₄-P₁이 2Δ이던 것이 섭동 후 Δ로 줄어들게 된다. 이들의 원상 복구를 위한 이완은 결국 ββ 에너지 준위에 있는 핵들이 αα 에너지 준위로 내려오게 되므로 제로 양자전이의 과정과는 반대로 A의 피크의 크기에 관하여는 낮은 에너지 준위에 있는 핵들의 수를

늘리게 되며 높은 에너지 준위에 있는 핵의 수는 줄이게 되므로써 핵 A의 피크의 크기를 증가시키게 된다. 즉 이것은 양의 NOE를 관찰할 수 있게 한다. 위의 설명을 이완속도 방정식을 이용한 수식으로 표시한다면 (식-2)로 나타낼 수 있다.¹

$$\eta_A(X) = \frac{\gamma_X}{\gamma_A} \left(\frac{W_2 - W_0}{2W_{1A} + W_2 + W_0} \right) \quad (\text{식-2})$$

(식-2)에서 W는 이완속도이며 아라비아 숫자의 첨자들은 각각 에너지 준위에서 일어나는 양자전이를 나타낸다. 실제로 NOE가 일어난다고 하면 우리는 실험으로 이것을 관측할 수 있으며 (식-2)는 우리가 관측한 NOE가 음이나 양이냐에 따라서 우리가 관찰하는 분자내에서 어떤 이완 과정이 일어난는지를 말해준다. 즉 우리가 관측한 NOE가 양이라면 W₂가 주된 이완 과정이며 NOE가 음이라면 W₀가 주된 이완 과정이어야만 한다. 만약 W₂와 W₀가 어떤 시스템에서 동시에 그리고 같은 양이 일어난다면 (식-2)는 0의 값을 가지게 될 것이다. 즉 NOE가 전혀 관측되지 않을 것이다. 위의 세 가지 현상은 분자들이 용액속에 있을 때 실제로 모두 일어나는 것이며 실험으로 입증 되었다.^{1,8,9} 낮은 점성을 가진 용액에서 작은 분자들은 대부분 양의 NOE를 나타내며 거대 분자 또는 점성이 높은 용액에서 분자들은 음의 NOE를 나타내게 된다. 이와 같은 현상은 NOE가 분자들의 운동과 관련이 있다는 것을 쉽게 짐작할 수 있게 한다. 실제 NOE는 분자들의 운동과 밀접한 관계가 있으며 이들은 뒤에서 더 살펴보기로 하자.

3. 솔로몬 방정식 (The Solomon Equations)

이제까지 살펴보았던 NOE의 정성적인 개념들을 더 구체적으로 살펴보기로 하자. 즉 여러가지의 이완 과정의 연립속도 방정식을 사용하므로써 (식-2)를 유도해 낼 수 있다. 먼저 이 속도 방정식을 세우기 위해서 몇가지의 가정을 하여야 한다. 첫째 각각의 전이에 해당하는 이완의 속도는 1차 진행 속도로 표시할 수 있으며 둘째 주어진 핵의 두 개의 전이에 해당하는 이완의 속도는 같다고 가정하는 것이다(각각의 핵의 두개의 전이가 같지 않다면 AX 핵 시스템에서 6개의

속도 상수가 나오게 된다). 이들 각각의 속도 상수를 W (이것을 전이 확률(transition probability)이라고 부름)로 표시하고 아래 첨자를 양자전이와 각 전이에 해당하는 핵으로 표시하자. 예를 들면 W_{IX} 는 $\alpha\alpha$ - $\alpha\beta$ 즉 X 핵의 단일 양자 전이의 이완 속도가 된다. 위의 가정과 명명 방법을 그림-2로 표시하여 정리할수 있다.

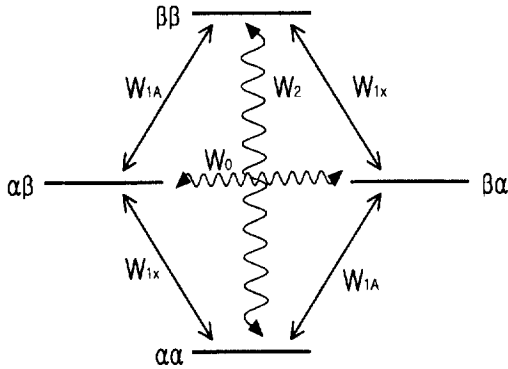


Fig. 2. Connections between the energy levels of an AX system, which may be involved in relaxation.

위의 가정 중 각 이완 과정을 1차 속도 방정식으로 표시할 수 있다는 것은 전이의 이완속도는 각각의 전이 사이의 핵들의 수와 그들 각각의 평형상태에서의 핵들의 수의 차이에 비례한다는 것이다. 이와 같은 기본적인 속도론의 이론과 그림-2의 이완 과정을 이용하여 우리는 각각의 에너지 준위에서 존재하는 핵들의 수의 시간에 따른 변화를 쉽게 정의할 수 있다. 예를 들면 $\alpha\alpha$ 에너지 준위에 있는 핵들의 수($n_{\alpha\alpha}$)의 시간에 따른 변화는 다음과 같이 (식-3)으로 표시될 것이다.

$$\begin{aligned} \frac{dn_{\alpha\alpha}}{dt} = & -(W_{IX} + W_2 + W_{1A})(n_{\alpha\alpha} - n_{\alpha\alpha}^{\circ}) + W_2(n_{\beta\beta} - n_{\beta\beta}^{\circ}) \\ & + W_{1A}(n_{\beta\alpha} - n_{\beta\alpha}^{\circ}) + W_{IX}(n_{\alpha\beta} - n_{\alpha\beta}^{\circ}) \end{aligned} \quad (식-3)$$

여기에서 윗첨자의 \circ 의 의미는 라디오파가 없는 상태에서 (섭동이 되지 않은 상태에서) 즉 볼츠만 분포가 평형 상태에 놓여 있을 때 존재하는 핵들의 수를 나타내는 것이다. 위의 (식-3)을 참조로 우리는 다른 에너지 준위에서의 핵들의 수의 시간에 따른 변화도 쉽게 정의할 수 있다.

라디오파로 섭동을 시켰을 때 얻어지는 NMR의 피크라는 것은 결국 섭동으로 인한 각 에너지 준위에서의 핵들의 수의 변화를 관찰하는 것이나 다름이 없다. 그러므로 핵 A와 X의 피크의 크기는 각각의 전이에 해당하는 핵들의 수의 차이를 나타내는 N_A 와 N_X 에 비례하게 되며 (식-4)와 (식-5)로 각각 표기 할 수 있게 된다.

$$N_A = (n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\alpha}) + (n_{\alpha\beta} - n_{\beta\beta}) \quad (식-4)$$

$$N_X = (n_{\alpha\alpha} - n_{\alpha\beta}) + (n_{\beta\alpha} - n_{\beta\beta}) \quad (식-5)$$

(식-4)와 (식-5)에 (식-3)과 같은 각각의 에너지 준위에서 핵들의 수의 변화를 대입하여 정리하면 (식-6)과 (식-7)를 얻을 수 있다. 이것이 솔로몬 방정식(Solomon equations)이다.¹

$$\begin{aligned} \frac{dN_A}{dt} = & -(W_0 + 2W_{1A} + W_2)(N_A - N_A^{\circ}) \\ & - (W_2 - W_0)(N_X - N_X^{\circ}) \end{aligned} \quad (식-6)$$

$$\begin{aligned} \frac{dN_X}{dt} = & -(W_2 - W_0)(N_A - N_A^{\circ}) \\ & - (W_0 + 2W_{IX} + W_2)(N_X - N_X^{\circ}) \end{aligned} \quad (식-7)$$

AX 핵의 시스템에 강한 라디오파를 조사하여 X 스핀의 피크를 포화(saturation)를 시킨다면 $n_{\alpha\alpha} = n_{\alpha\beta}$, $n_{\beta\alpha} = n_{\beta\beta}$ 이므로 $N_X = 0$ 가 되며 정류상태(steady state)에서 $dN_A/dt = 0$ 이므로 (식-6)은 (식-8)이 된다.

$$0 = (W_2 - W_0)N_X^{\circ} - (W_0 + 2W_{1A} + W_2)(N_A - N_A^{\circ}) \quad (식-8)$$

(식-8)을 정리하면 (식-9)를 얻을 수 있다.

$$\frac{N_A}{N_A^{\circ}} = 1 + \frac{N_X^{\circ}}{N_A^{\circ}} \left(\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_{1A} + W_2} \right) \quad (식-9)$$

평형상태에서의 핵들 수의 차이란 그 핵들이 가지는 고유의 자기회전 비율 γ (magnetogyric ratio)에 비례하므로 이완속도의 항에 관계되는 N_X° 와 N_A° 는 γ_X 와 γ_A 로 각각 대체될 수 있으며 또한 핵들의 수의 차이란 피크의 크기이므로 N_A 와 N_A° 를 각각 섭동되었을

때와 평행에서의 A 핵의 피크의 크기 I 와 I_0 로 표시하면 (식-10)을 얻을 수 있다.

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \frac{\gamma_X}{\gamma_A} \left(\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_{1A} + W_2} \right) \quad (\text{식-10})$$

이 피크의 변화가 핵 오버하우저 효과(Nuclear Overhauser Effect : NOE)이다.

4. 쌍극자간 커플링(Dipolar Coupling)과 이완(Relaxation) 그리고 NOE

서론에서 말했듯이 핵들간의 쌍극자간 커플링이 NOE를 일으킨다. 그러면 이완에 관계되는 이 쌍극자간 커플링에 관해서 살펴보자. 비록 자기극(magnetic dipole)이라는 것은 자기장(magnetic field)을 설명하기 위해서 도입된 추상적인 것이지만, 이것은 전기장(electric field)을 설명할 때 전기극(electric dipole)에 해당되는 것으로 비유되면서 잘 설명되고 있다. 즉 전하(charge)와 각운동량(angular momentum)을 가지고 있는 핵은 쉽게 자기극과 이것이 만드는 자기장으로 비유하여 설명할 수 있다. 분자 내에는 이들 각각의 자기극들이 주위의 다른 자기극들 때문에 만드는 여러가지의 국부장(local field)이 있게 되며 이들 국부장은 외부의 자장에 따라 그 방향이 달라지게 되므로 결국, 이 국부장들의 크기와 방향이 분자들에 따라 달라지게 된다. 이들 국부장들의 상호작용을 쌍극자간 커플링(dipolar coupling)이라 하며 고체 상태의 분자에서는 우리가 잘 알고 있는 스칼라 커플링(scalar coupling)보다 훨씬 크고 때때로 수 KHz가 되기도 한다. 그러나 용액 속에서는 분자들의 빠른 운동 때문에 여러가지의 국부장이 외부의 자장에 대해서 모든 가능한 방향을 가질 수 있으므로 쌍극자간 커플링은 0의 값을 가지게 된다. 비록 이때 쌍극자간 커플링 값은 0이 되지만, 이 쌍극자간 커플링의 빠른 방향 전환은 여러가지의 다른 주파수의 국부장을 만들게 되며 이들이 핵의 이완을 일으키게 하는 것이다. NOE는 이완에 관계되므로 결국 분자운동과 관계되는 것이다. 그러면 분자의 운동이 어떻게 이완과 관계가 있는지를 살펴보기로 하자. 용액 속에 분자의 운동은 여러가지의 병진운동(translation)과 회전운동(rotation) 등을 가질 것이다. 그리고 이들 운동들은 무작정 운동(random motion)일

것이다. 그러나 이들 무작정 운동들은 대체적으로 분자의 상관시간(correlation time : τ_c) 이라는 것으로 묘사된다. 즉 분자는 때때로 용액 속에 한 기준의 상태에 대해서 다른 방향을 취할 수 있게 되는데 이것은 동시에 일어나게 된다고 생각할 수 있으며 이 때 분자가 원래의 위치에서 근평균제곱(root-mean-square) 만큼의 방향전환이 일어날 때까지 걸리는 시간을 분자의 상관시간이라고 정의한다. 그러므로 τ_c 보다 짧은 시간에는 대부분의 분자들은 그들이 원래의 위치에 매우 가깝게 되돌아 올 것이며 τ_c 보다 훨씬 긴 시간 후에는 모든 분자들의 방향들은 완전히 다른 위치에 있게 될 것이며 모든 원래의 위치의 기억은 없어지게 된다. 작은 분자들의 경우 이들이 상온의 낮은 점성의 용액에 존재할 때 대략 100 피코초(ps)의 범위의 τ_c 를 가지게 된다. 이 τ_c 는 결국 분자의 복잡한 운동을 하나의 파라미터로 구체화한 것이며 온도와 용액의 점성 이외에 수소결합이나 pH 등에도 영향을 받는다. 구체적으로 한 분자가 다른 분자보다 더 큰 τ_c 를 가질 것이라는 등의 판단은 상식과 화학적인 통찰력으로 판단되어야 한다. 예를 들면 큰 분자량을 가진 분자는 용액 속에서 상대적으로 작은 분자량을 가진 분자보다 천천히 움직일 것이며 따라서 더 긴 τ_c 를 가질 것이다. 이제 이 τ_c 의 변화가 어떻게 이완 시간에 그리고 각기 다른 이완의 경로에 영향을 주는지를 살펴보자. 먼저 자기극의 상호작용 때문에 생겨나는 진동 국부장(oscillating field)의 진동수의 분포가 τ_c 에 의해서 어떻게 변하는지를 살펴보고 W_0 , W_1 , W_2 를 일으키는데 필요한 진동수와 비교해 보도록 하자. 여러가지 이론과 실험은 분자가 운동하면서 분자 내의 자기적 상호작용에 의해서 생성시키는 진동수의 분포는 그림-3으로 표시될 수 있음을 보여주었다.¹⁰

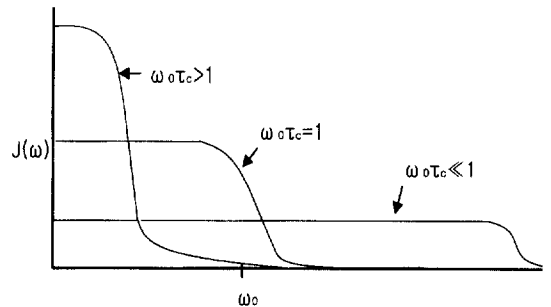


Fig. 3. Plot of spectral density functions for different values of τ_c .

위 그림에서 $J(W)$ 는 스펙트럼 밀도 (spectral density)로서 어떤 특정한 진동수에서 분자의 무작정 진동(random motion)으로 생성되는 구성 성분을 발견할 수 있는 확률을 나타낸다. $J(W)$ 의 전체 합은 τ_c 에 관계없이 항상 일정하지만, $J(W)$ 의 진동수는 분자의 τ_c 에 의해서 영향받게 된다. 이것은 정성적이지만 분자의 τ_c 에 따른 이완시간들을 예측할 수 있게 해준다. 즉 τ_c 가 길다면 낮은 분자운동의 진동수를 가질 확률은 매우 높은 반면 높은 분자운동 진동수를 가질 확률은 매우 적다. 반대로 τ_c 가 짧다면 분자운동은 여러 가지의 진동수를 가지는 범위로 확대되지만, 확률은 매우 적게 된다. 위의 두 경우 모두 라모어 진동수(Larmor frequency) ω_0 를 가질 확률이 적게 되므로 이완시간은 매우 길게 될 것이다. 그러나 중간간의 경우 ($\omega_0 \tau_c \approx 1$)에는 ω_0 에 가까운 분자운동의 진동수들이 많게 되며 이완 시간은 짧아지게 된다. 그러면 이들 τ_c 가 각기 다른 이완의 과정인 W_0, W_1 그리고 W_2 에 얼마만큼씩 영향을 미치는지를 보도록 하자.

이것은 정량적으로 시간에 종속된 섭동이론(time-dependent perturbation theory)으로 설명될 수 있다.¹⁰ 이 이론은 이 총설의 범위를 넘어서는 것으로 우리는 여기에서 그 결과를 이용하기로 한다. 거리가 r 로 떨어져 있는 두 핵간에 쌍극자간 커플링(dipolar coupling)에 의해서 일어나는 W_{1A}, W_0 그리고 W_2 의 이완 속도는 (식-11)로 주어진다.

$$\begin{aligned} W_{1A} &= \frac{3}{20} K^2 \frac{\tau_c}{(1 + \omega_A^2 \tau_c^2)} \\ W_0 &= \frac{1}{10} K^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_A - \omega_X)^2 \tau_c^2} \\ W_2 &= \frac{3}{5} K^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_A + \omega_X)^2 \tau_c^2} \end{aligned} \quad (식-11)$$

여기에서 K 는 $\gamma_A \gamma_X r^3$ 을 포함한 상수이며 ω_A 와 ω_X 는 각 핵의 라모어 진동수이다. 단일양자전이 W_{1A} 는 A의 전이의 진동수에만 영향을 받는 대신 W_0 와 W_2 는 두 핵의 진동수의 차이와 합의 향이 존재하는 것을 볼 수 있다. (식-11)에서 W_{1A}, W_0 그리고 W_2 가 분자의 상관시간 τ_c 의 함수이므로 결국 NOE의 함수 (식-10)은 τ_c 에 영향을 받게 된다. (식-11)은 τ_c 가 매우 적은 조건 즉 $1/\tau_c \gg \omega_0$ 의 조건에서는 (이 때는 이완

시간이 길어지는 영역임) $\omega_0^2 \tau_c^2 \ll 1$ 이라는 개념을 분모에 대입하면 (식-12)로 다시 표현할 수 있다.

$$\begin{aligned} W_{1A} &\propto \frac{3 \tau_c}{r^6} \\ W_0 &\propto \frac{2 \tau_c}{r^6} \\ W_2 &\propto \frac{12 \tau_c}{r^6} \end{aligned} \quad (식-12)$$

즉 이 조건 ($\omega_0^2 \tau_c^2 \ll 1$)이 극협소한계 (extreme narrowing limit)로 알려져 있다. 이것은 다시 말해 피크가 자기적 커플링 때문에 생기는 넓어짐 현상이 완전히 제거되어 최소로 좁아질 수 있는 조건이란 뜻이 된다. 이 조건이 사용되는 곳은 대부분 작은 유기 분자들을 낮은 점성의 용액 속에 녹여 측정할 때이다.

결국 분자의 운동이 즉 분자의 상관시간 τ_c 가 NOE를 제어하는 것이 명백하게 되었다. 이제 이 τ_c 와 NOE의 정량적인 관계를 살펴보자. 이완의 (식-11)의 각각을 (식-10)의 NOE의 부분에 대입하면 분자의 운동에 관련되는 (식-13)으로 표시할 수 있다.

$$\begin{aligned} \eta_A(X) &= \frac{\gamma_X}{\gamma_A} \left[\frac{6}{1 + (\omega_A + \omega_X)^2 \tau_c^2} - \frac{1}{1 + (\omega_A - \omega_X)^2 \tau_c^2} \right] \\ & / \left[\frac{1}{1 + (\omega_A - \omega_X)^2 \tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_A^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_A + \omega_X)^2 \tau_c^2} \right] \end{aligned} \quad (식-13)$$

위의 (식-13)은 두 핵간의 모든 이완이 쌍극자간 커플링에 의해서 일어날 때 생길 수 있는 NOE의 최대한의 이론치 (η_{max})가 되는 것이다.

우리가 가장 흔히 접하는 동핵종간의 NOE에 대해서 (식-13)을 살펴보기로 하자. 동핵종이기에 $\gamma_X = \gamma_A$ 가 되며 진동수는 $\omega_A \approx \omega_X \approx \omega$ 로 하나만이 있게 되므로 $(\omega_A - \omega_X) \tau_c$ 는 항상 1보다 적게 될 것이다. 이 개념을 (식-13)에 대입하면 (식-14)가 얻어진다.

$$\eta_A(X) = \eta_{max} = \frac{5 + \omega^2 \tau_c^2 - 4 \omega^4 \tau_c^4}{10 + 23 \omega^2 \tau_c^2 + 4 \omega^4 \tau_c^4} \quad (식-14)$$

(식-14)의 함수에서 $\eta_{max}(NOE)$ 를 Y 축으로 하고 $\omega \tau_c$ 를 X 축으로 하는 도표를 그리면 그림-4가 된다.

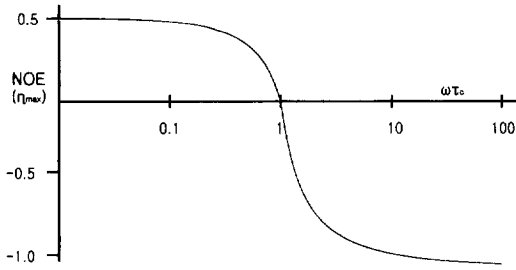


Fig. 4. Dependence of maximum homonuclear NOE enhancement on $\omega \tau_c$.

그림-4에서 보듯이 τ_c 가 짧은 즉 작은 분자들일 경우 이론적으로 가능한 최대한의 NOE는 +50 %가 되는 것이다. 즉 극협소한계 ($\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$)에서는 작은 분자들의 이완은 대부분 쌍극자간 커플링의 메카니즘으로 일어나며 양의 NOE를 보이고 최대 50 %의 값을 가진다는 것이다. 그러나 실제로 이러한 최대한의 NOE를 보이는 경우는 극히 드물다. 그러나 반면 분자 상관시간 τ_c 가 긴 거대 분자의 경우는 최대한으로 측정할 수 있는 NOE의 크기가 작은 분자보다 배가 클 뿐만 아니라 부호도 음이다(-100 %). 이런 경우는 실제로 생체 거대 물질(biomolecule)이나 또는 작은 분자라도 매우 점성이 높은 용액 속에 있을 때 볼 수 있다. 중간 부분일 경우 측정 될 수 있는 NOE는 $\omega \tau_c$ 즉 분자의 운동속도와 기기의 주파수에 따라 급격하게 변한다.^{11,12,13} 만약 우리가 500 MHz NMR을 사용한다면 대략적으로 분자량이 1000~2000 정도 되는 분자들이 이러한 현상을 보이게 된다. NOE가 0이 되는 지점은(식-14)에서 분자의 항이 0이 될 때이다.

$$5 + \omega^2 \tau_c^2 - 4\omega^4 \tau_c^4 = 0$$

$$\omega \tau_c = (5/4)^{1/2} \cong 1.12$$

즉 $\omega \tau_c \cong 1.12$ 가 될 때 NOE는 전혀 측정될 수 없는 것이다. 이것을 극복하는 방법으로는 분자의 운동 속도를 변화시키거나 기기의 주파수를 변화시키면 될 것이다. 즉 분자의 운동속도를 변화시키기 위해서는 용매를 바꾸거나 온도를 변화시킬 수도 있을 것이고 기기의 주파수를 변화시킨다는 것은 예를 들면 200 MHz NMR 대신 500 MHz NMR을 사용하는 것이다.

(식-11) 대신 극협소한계의 조건에서 얻은 (식-12)에서 각각의 이완 속도의 비($W_0 : W_1 : W_2 = 2 : 3 :$

12) 값을 (식-10)에 대입하면

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \frac{\gamma_X}{\gamma_A} \left[\frac{(12-2) \tau_c / r^6}{(12+6+2) \tau_c / r^6} \right] = 1 + \frac{\gamma_X}{\gamma_A} \left(\frac{1}{2} \right)$$

(식-15)

거리 r에 NOE는 무관하다고 예상된다. 이미 앞에서 살펴 본 이론들과는 너무나 먼 결론이다. 그러나 이것이 틀린 것은 아니다. 왜냐하면 만약 두 핵이 우리가 살고 있는 우주에 둘 만이 존재하여 완전히 극협소한계 ($\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$)를 전적으로 충족시킨다면 그들은 어떠한 거리에 떨어져 존재하더라도 위의 (식-15)는 성립되는 것이다. 실제로는 그렇지 않으니 좀 비현실적으로 (식-15)가 보여질 수 있으나 이 식은 많은 정성적인 정보들을 줄 수 있으므로 실제로 많이 사용되고 있는 것이다.

(식-15)를 이용하면 동종의 핵을 이용한 NOE는 50 % 라는 것을 쉽게 알려주며 다른 핵간의 최대의 NOE는 0.5 (γ_X / γ_A)이다. 예를 들어 탄소와 양성자를 비교하면 양성자를 디커플링하여 얻을 수 있는 탄소의 NOE는 약 0.5 (4/1)이므로 200 %의 NOE를 얻을 수 있다는 것을 쉽게 알 수 있다. 반대로 음의 자기회전 비율 (- γ)을 가진 핵들 (보통 ^{29}Si 이나 ^{15}N 등을 들 수 있다)은 양성자를 디커플링하면 오히려 피크의 크기를 줄일 수도 있으며 때로는 음으로 바꾸어 놓을 수도 있다는 것을 쉽게 예측할 수 있다. 즉 $\gamma_W / \gamma_{Si} \cong -5$ 이므로 양성자를 디커플링 시킬 때 ^{29}Si 핵이 가질 수 있는 최대의 NOE는 -250 %이므로 피크는 음으로 나타날 것이며 이 분자에서 만약 NOE가 -100 %만이 일어난다면 ^{29}Si 의 피크는 완전히 0이 되어 측정이 불가능하게 될 것이다.

5. NOE 실험

5. 1. 시료 처리

이제 실제 실험하는 방법을 살펴보기로 하자. NOE 실험에서 때로는 1 % 정도보다도 적은 피크의 변화를 관측해야 하기 때문에 어떤 다른 NMR 실험을 할 때 보다도 주의를 하여야 한다. 먼저 기기의 조건을 최적으로 만드는 것은 말할 것도 없지만, 시료를 만들 때도 많은 주의가 요구된다. 첫째 앞장에서 언급된 것과 마찬가지로 일반적인 실험을 위해서도 필요

한 상자성 물질의 유입에 주의하여야 하며, 특히 아주 적은 NOE 효과를 보기 위해서는 용매 속에 녹아 있는 산소도 완전히 제거하여야 한다. 이 때 산소를 제거하기 위해서 결빙-펌프-해동(freeze-pump-thaw) 방법을 사용하게 된다. 이 방법은 먼저 용액 속에 녹아 있는 시료를 담은 NMR 튜브를 액체 질소로 얼린 다음 진공 펌프를 사용하여 공기를 제거한다. 그 다음 질소로 진공을 깨트리며 다시 이 과정을 반복하게 된다(이 방법은 용액이 물일 때는 사용될 수 없다. 용액이 물일 때는 용액의 얼림없이 낮은 상태의 진공과 그리고 질소로 진공을 깨트리는 방법을 사용할 수 있다). 그러나 대부분의 실험을 위해서는 긴 유리모세관을 사용하여 용액 속에 질소를 불어넣어(bubbling) 산소를 제거하는 방법이 매우 유용하게 사용된다. 위에서 설명한 주의하여야 할 점들이 모두 상자성 물질 때문에 이완이 일어나는 것을 막고 분자 내에서 핵들 간에 쌍극자간 커플링(dipolar coupling)이 일어나도록 유도하려 한다는 것을 고려할 때 우리는 곧 시료의 농도를 생각할 수 있다. 쌍극자간 커플링은 분자 내에서 뿐 만 아니라, 분자간에도 일어날 수 있는 것이다. 그러므로 시료의 농도는 될 수 있으면 묽게 만들어서 분자간에 일어나는 자기적 커플링을 줄여야 할 것이다.

5. 2. NOE 측정

NOE를 측정하기 위해서 우리는 한 핵의 피크를 선택하게 되고 이 때 다른 핵에 해당하는 피크의 크기

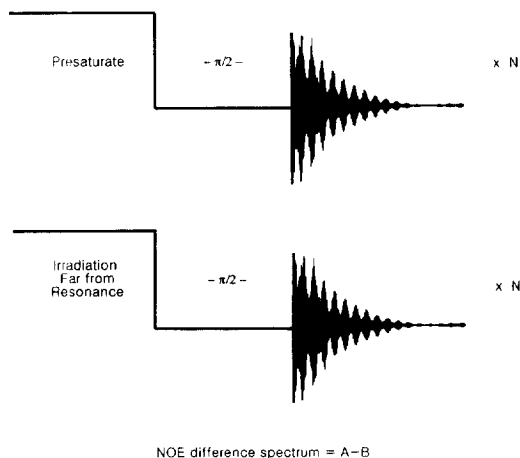
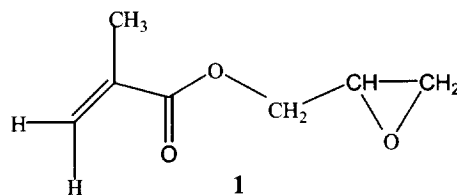


Fig. 5. The experimental scheme for NOE difference spectroscopy.

변화를 평형상태에서 얻는 피크와 비교하게 되는데 이들 각각을 적분(integration)하여 그 값을 비교할 수도 있다. 그러나 이 방법은 아주 적은 NOE 값을 가지는 분자에서는 정확한 방법이 될 수 없다. 대신 우리는 NOE 차이 스펙트럼(NOE difference spectrum)이라는 방법을 사용하게 된다. 이 방법은 그림-5에서 보는 바와 같이 두 개의 다른 실험을 하여 얻은 스펙트럼들을 컴퓨터 상에서 뺄셈을 하여 제 3의 스펙트럼을 얻는 것이다.

위의 그림-5의 두 실험에 섭동을 하기 위해서 양성자의 주파수를 낼 수 있는 디커플러(decoupler) 코일을 쓰게 된다. 이 실험 방법을 우리는 통상 게이티드 디커플링(gated decoupling)이라고 부르는데 즉 디커플러가 처음 일정기간 작동한 다음 펄스가 주어지고 FID(Free Induction Decay)를 획득하는 시간 동안은 이 디커플러가 작동하지 않는 것을 의미한다. A의 실험에서는 섭동하려는 피크의 위치에서 정확히 디커플러가 섭동을 시킨 후 FID를 얻게 된다. B 실험에서는 평형상태에서의 스펙트럼을 얻으면 되는데 디커플러를 작동시키는 이유는 혹시 있을 수도 있는 기기적인 어떤 영향을 제거하고 가능하면 두 실험의 조건을 같게 하기 위해서이다. 단 B 실험에서의 디커플러는 어떤 피크의 위치에서 작동하는 것이 아니고 스펙트럼들의 위치에서 멀리 떨어진 위치에서 작동을 하게 된다(양성자 스펙트럼은 대개 0~10 ppm 정도에서 나타나게 되는데 보통 -2 ppm 정도에 디커플러의 위치를 고정시키게 된다).

일단 두 실험이 끝이 나면 NOE 차이 스펙트럼을 위해서 두가지 방법을 수행할 수 있다. 각각의 FID를 뺄셈을 한 후 푸리에 변환(FT)을 할 수도 있고 각각의 FID를 푸리에 변환을 한 스펙트럼을 가지고 NOE 차이 스펙트럼을 얻을 수도 있다. 그림-6은 glycidyl methacrylate(1)의 NOE 차이 실험을 보여주고 있다. 그림-6의 (a)는 CH_3 (δ , 1.9)의 양성자를 섭동하여 얻은 스펙트럼이다.



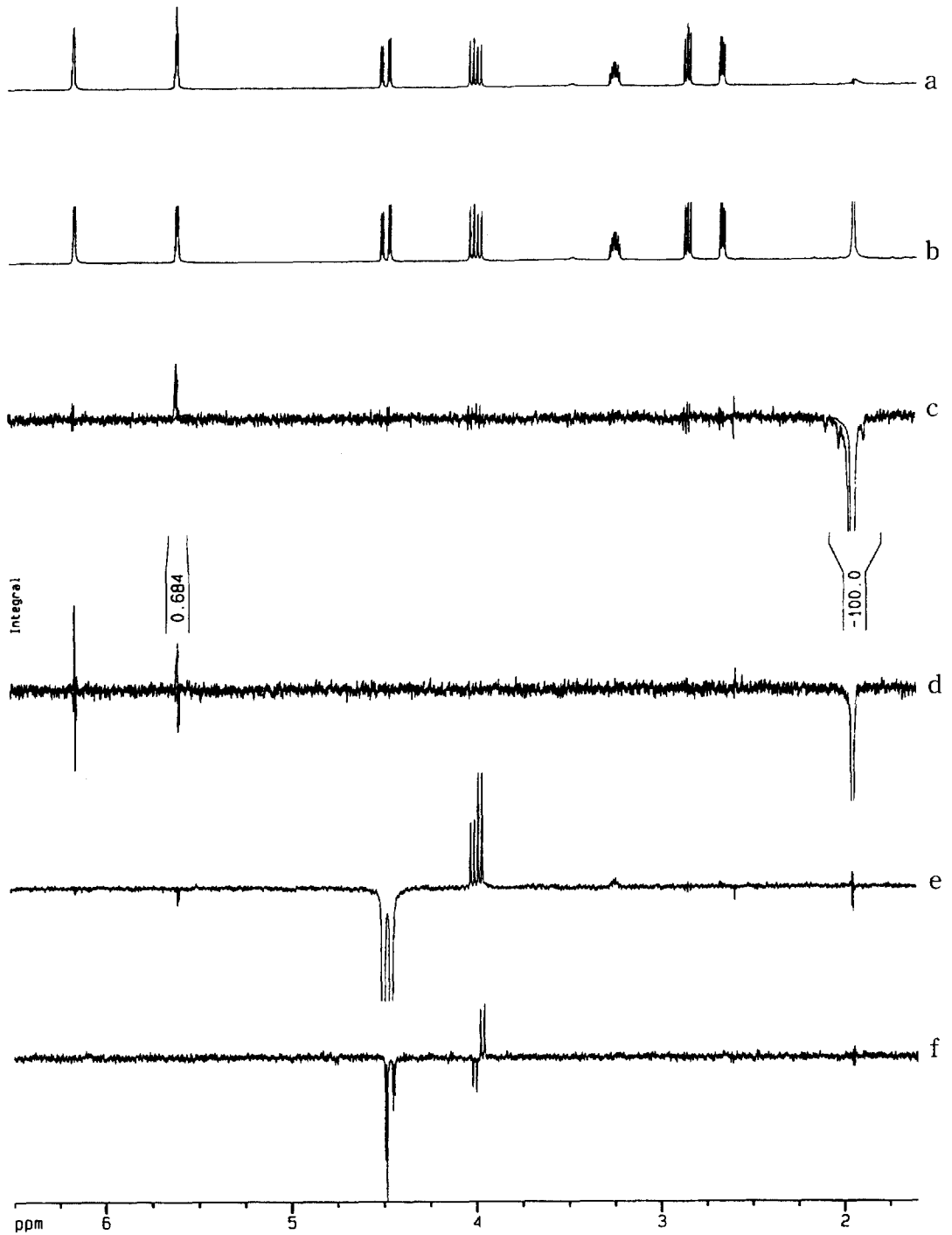


Fig. 6. a) The methyl peak of glycidyl methacrylate(1) saturated. b) off-resonance spectrum. c) NOE difference spectrum. d) NOE difference spectrum with 45° observed pulse. e) NOE difference spectrum with one proton saturation of methylene. f) uneven saturation of one proton multiplets generates large SPT effect.

그림-6의 (a)에서 보듯이 CH_3 의 양성자들은 섭동으로 인하여 포화가 이루어졌기 때문에 피크가 거의 나타나지 않고 있다. 그림-6의 (b)는 디커플러의 위치를 -2 ppm에 위치 시킨 후 똑같은 조건으로 얻은 스펙트럼이다. 위의 그림과는 달리 CH_3 의 양성자의 피크가 그대로 보여지고 있다. 세번째 (C)의 스펙트럼은 위의 두 스펙트럼을 컴퓨터 상에서 뺄셈을 하여 얻은 스펙트럼이다. 바로 이 스펙트럼을 NOE 차이 스펙트럼이라하며 너무나 명백한 것은 섭동으로 포화시킨 CH_3 의 양성자에 해당하는 부분은 거꾸로 피크를 보이고 있다. 이 커다란 음의 피크 이외에 5.6 ppm에서 비닐(vinyl) 그룹에 속하는 하나의 양성자가 NOE의 피크를 보이고 있다. 이 NOE 피크에 해당하는 양성자가 CH_3 의 그룹과 cis의 방향으로 위치한 비닐기에 있는 양성자이다. 이 시료는 CDCl_3 에 녹였고, 산소도 제거하지 않은 것으로 NOE 차이 스펙트럼에 적분값이 보여진 것 같이 약 0.7 %의 적은 NOE를 보여주고 있다. 이 때 0.7 %의 값은 포화된 피크(-100 %)에 대한 상대적인 값이다. 그러나 이 0.7 % 값이 우리가 얻으려고 하는 숫자가 되지 못한다. 왜냐하면 NOE 값은 1개의 핵을 섭동시켰을 때 이 핵에 의해서 쌍극자간 커플링을 통해서 이완되는 다른 1개의 핵에서 나타나는 값을 보고하는 것이기 때문이다. 이 시료에서는 CH_3 의 3개의 양성자를 섭동하여 얻은 NOE 값이므로 얻어진 0.7이 3으로 나누어진 값 0.23 %가 실제로 사용되는 NOE의 값이 된다. 반대로 비닐 그룹에 있는 양성자를 섭동하여 CH_3 의 NOE를 보는 것도 가능한 하지만, CH_3 의 양성자들은 그들끼리 쌍극자간 작용에 의한 이완으로 비닐 그룹에 있는 양성자에 NOE를 많이 일으키지 못하므로 바람직한 방법이 되지 못한다. 이 때 우리는 NOE의 결과의 정확성에 대해서 너무 확신하지 말아야 한다. 왜냐하면 단지 몇 % 되는 NOE 값을 그것도 두 스펙트럼의 차이 때문에 signal-to-noise의 비가 매우 낮은 스펙트럼을 적분하여 얻은 값을 소수점 이하 몇째 자리까지 인용하는 것은 아무런 의미가 없기 때문이다. 스펙트럼 (C)에서 나머지 조그마한 dispersion 피크들은 소위 로렌치안(Lorentzian) 피크의 뺄셈에서 오차로 나타나는 것들이며 이들 피크의 크기는 때로는 기기를 다루는 사람에게 의해서가 아니라 기기의 안정성에 의해서 좌우된다. 그러므로 이 NOE 차이 스펙트럼이 때로는 기기의 성능을 알아보는 좋은 수단이 될 수도 있다. 이러한

오차에서 나타난 피크들의 출현을 최소로 하고 좋은 NOE 차이 스펙트럼을 얻기 위해서는 여러가지 주의 하여야 할 점들이 있지만, 기기를 다루는 사람이 먼저 쉽게 할 수 있는 몇가지는 다음과 같다.¹⁴

첫째로 온도를 항상 일정하게 유지하는 것이다. 물질의 화학이동(chemical shift)은 온도에 매우 민감하므로 실험 중 시료의 온도는 항상 일정하게 유지하여야 한다. 이것을 하기 위해서는 시료가 놓여 있는 probe 속의 온도를 온도조절장치를 이용하여 실내 온도보다 높여서 유지하는 것이 보통이다.

둘째로 시료를 녹이는 용매는 중수소(deuterium)의 피크의 넓이가 좁은 것을 선택하는 것이다. 예를 들면 aceton- d_6 가 CDCl_3 보다 중수소의 피크가 좁으므로 기기의 자동 제어장치(feedback)를 더 빠르게 일어나게 하므로 기기의 안정성에 기여하게 된다.

셋째로 특히 고자장의 기기를 사용할 때는 기기 주위에 오가는 사람이나 물건들을 없게 하여 기기의 안정성을 높이는 것이다.

넷째로는 그림-5에서 $\pi/2$ 펄스를 사용하는 것이 있는데 이 90° 펄스를 정확히 측정하여 사용해야 한다는 것이다. 펄스의 길이는 용매에 따라서 달라질 수 있으므로 가능하면 측정하려고 하는 시료를 사용하여 90° 펄스를 반드시 구하여 사용해야 한다.

그림-6의 (d) NOE 차이 스펙트럼에서 보여지고 있는 dispersion 피크가 왜 정확한 90° 펄스를 반드시 사용하여야 하는지를 보여주고 있다. FID를 얻으려고 주어지는 90° 펄스가 정확하지 않으면 완전히 섭동시키지 못한 핵의 Z-벡터가 SPT(Selective Population Transfer)¹⁵의 현상을 나타나게 한다(완전히 섭동시켜 포화상태를 이루는 것은 이론 상태로만 가능하다). 여러 피크가 매우 가까이 있는 스펙트럼에서 다른 피크에 어떤 영향도 주지 않고 하나의 피크만을 완전히 섭동시켜 포화시킨다는 것은 불가능하며 이것이 NOE 차이 스펙트럼의 한계가 되는 것이다. 이러한 이유 때문에 이 실험은 시행착오(trial and error)적으로 밖에 할 수 없다. 즉 주어지는 디커플러의 힘의 세기(field strength)와 그 때 주어지는 시간을 조절하여 얻은 결과를 관찰하여 달성하려는 목적을 얻었는지를 찾을 수 밖에 없는 실험이다. 그러므로 가까이 있는 중요한 다른 피크가 섭동되는 것을 피하기 위하여 때로는 완전한 섭동과 포화를 포기하여야만 하며 이로 인해 얻어지는 NOE 양의 감소도 감수하여야만 하는 것이다.

이론적으로 비록 이 SPT 현상에서 오는 dispersion 피크의 적분값은 0을 가지므로 NOE의 양을 측정하는데는 오차를 주지 않는다고 하지만, 커다란 dispersion 피크가 작은 NOE 피크와 겹쳐 나타나는 것은 여러가지 측정 오차를 일으키기에 충분한 현상이다. 특히 이와 같은 SPT 현상은 서로 스칼라 커플링하는 핵 사이에서 잘 일어날 수 있다. 이상적인 경우 (다중선의 주위에 어떠한 다른 피크가 없을 때) 다중선(multiplet)의 각각을 끌고루 모두 잘 섭동시켜 모두 포화상태를 이루었다면 우리는 어떠한 SPT 현상도 관찰하지 않게 될 것이다. 그러나 이러한 다중선을 고르게 완전히 섭동시킨다는 것은 매우 어렵고 힘든 일이므로 흔히 다중선을 나타내는 스칼라 커플링을 하는 복잡한 분자 내에서 NOE의 실험은 이 SPT 현상을 조금씩 수반하게 될 것이다. 그림-6의 (e) NOE 차이 스펙트럼은 glycidyl methacrylate의 δ , 4.4 부근의 methylene의 하나의 양성자가 주위에 다른 피크가 없으므로 충분히 섭동시켜 포화시킬 수 있는데도 불구하고 제미널(geminal) 커플링을 하고 있는 δ , 3.9 부근의 4중선의 피크가 섭동을 시키지 않는 (b) 스펙트럼의 피크의 모양과 다른 세기(intensity)를 보여주고 있는 것은 얼마간의 SPT 현상이 이 NOE 차이 스펙트럼에 수반되어 있다는 것을 보여주는 것이다. NOE 차이 스펙트럼 (f)는 δ , 4.4의 양성자의 4중선을 불균등 그리고 불완전하게 포화시켰을 때 스칼라 커플링하고 있는 다른 양성에서 SPT 현상이 일어나는 것을 명확하게 잘 보여주고 있다.

마지막으로 섭동 시간은 최소한 3T₁ 만큼의 시간을 주어져야 한다는 것이다. 간접적인 NOE는 직접적인 NOE가 형성된 다음 일어나게 되므로 때로는 이보다 더 긴 시간을 사용하여야 할 때도 있다. 이 시간의 파라미터를 위해서 완전한 T₁을 측정한다는 것은 매우 많은 시간이 필요하므로 불가능하며 정성적인 T₁ 값 (inversion-recovery null method)¹⁶을 구하는 것은 이 실험의 목적을 위해서 충분하다.

6. NOE 실험 결과의 해석

이제까지 우리는 NOE를 이해하기 위해서 아주 이상적인 두 핵의 상호작용만을 고려하였다. 그러나 실제 우리가 다루는 분자들은 이들과는 너무나 거리가 먼 복잡한 여러 핵의 상호작용으로 이루어진다. NOE

의 결과의 해석에서 제일 먼저 고려하여야 할 사항은 (식-15)를 설명하면서 얻은 결론이다. 즉 아주 이상적인 경우 두 핵 사이의 NOE는 거리와 무관하다는 것이다. 다시말해 이것은 다음의 일반적인 원칙을 유도해 낼 수 있다.

“어떤 두 핵 사이에서 NOE를 관찰하였다는 사실이 두 핵이 가까이 서로 인접해 있다는 것을 증명하는 충분한 증거는 될 수 없다.”

다음 우리는 복잡한 분자들의 구성 중에서도 가장 간단한 세 개의 핵(양성자 A, B, C)이 상호작용을 할 때 NOE의 결과가 어떻게 나올 수 있는지를 살펴보도록 하자. 그리고 이들로부터 우리들이 수행하여 얻은 NOE의 결과를 해석할 때 주의하여 고려하여야 하는 다른 사실들을 알아보도록 하자.

세 개의 핵이 분자속에서 정렬할 수 있는 가능한 위치는 세 개의 양성자 핵이 그림-7의 A와 같이 나란히 놓여 있을 때와 B와 같이 삼각형의 꼭지점에 위치한 모습으로 정렬되어 있는 것으로 가정할 수 있다. 먼저 세 개의 양성자 핵이 대략적으로 일직선 상에 나란히 놓여 있을 때 H_A를 섭동하면 H_B의 피크는 NOE를 보일 것이다. 그리고 H_C를 섭동하면 다시 H_B가 NOE를 보일 것이다.

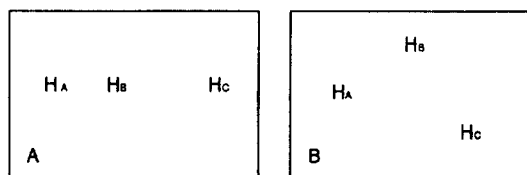


Fig. 7. Two different arrangements of a three-spin system.

이 때 이들 두 실험의 NOE의 크기를 비교하면 이들 각 양성자 간의 거리에 관한 정보를 얻을 수 있을 것이다. 여기에서 H_A와 H_B의 거리가 H_B와 H_C의 거리보다 가깝기 때문에 H_A를 섭동시킬 때의 H_B에 나타난 NOE가 H_C를 섭동시켰을 때 H_B에 나타난 NOE보다 크게 나타날 것이라는 예측을 쉽게 할 수 있다. 그러나 H_B를 섭동시켰을 때 H_A와 H_C는 둘다 NOE 현상을 보일 것이다. 왜냐하면 H_A와 H_C는 각기 다른 방향으로 H_B에 유일한 양성자이기 때문이다. 더우기 다른 방향으로 놓여 있는 이들 두 양성자는 어떤 다른 종류의 이완에 영향을 받을 수 있으므로 각 양성자의 NOE의 크기는 거리와 비례하지 않을 수도 있는

것이다. 즉 이 실험의 결과는 거리에 관한 정보를 잘못 유도해 낼 수도 있는 것이다. 일직선상에서 H_A를 선택할 때 H_C에서는 어떤 현상이 일어나는가를 보자. H_C는 H_A에서 멀리 떨어져서 직접적인 영향은 받지 않지만, H_A의 선택에 의해서 영향을 받은 H_B에 의해서 영향을 받게 된다. 즉, H_B의 에너지 준위에 있는 핵의 수의 차이의 증가는 주위의 핵 H_C의 에너지 준위에 있는 핵의 수의 차이에 영향을 주게 될 것이며 이 때 핵의 수 차이의 증가만큼 H_C에서는 핵의 수 차이가 줄어들게 되며 음의 성분의 NOE를 보이게 된다. 이것이 세 개의 스핀 효과(three-spin effect)로 알려져 있으며 NOE 실험을 해석할 때 고려하여야 하는 가장 중요한 사실 중에 하나이다. 극협소한계의 조건에서 음의 NOE 결과를 볼 수 있는 것은 세 개의 핵이 나란히 놓여 있을 때 볼 수 있는 독특한 결과이다. 우리는 위에서 언급된 세 개의 스핀 효과 때문에 핵들이 나란히 길게 놓여 있다면 NOE의 결과가 번갈아 양과 음이 나타나는 것을 예측할 수 있겠지만, 실제로는 이와 같은 간접적인 NOE 결과는 두 핵 이상의 거리로 떨어진 핵들 사이에서 그 효과가 매우 적어서 직접 관찰 할 수는 없다. 이제 3개의 양성자 H_A, H_B, H_C가 그림-7 B와 같이 삼각형의 형태를 갖추고 있을 때 세 개의 스핀 효과를 보도록 하자. 그림 B에서는 H_A-H_C 간의 거리가 그림 A에서 보다 가까이 위치하고 있어서 직접적인 NOE 효과가 나타날 수 있다고 생각하자. 이러한 상황에서 H_A를 선택시키면 H_C는 직접적인 양의 NOE 효과를 나타내면서 또 다른 한편으로 H_B의 영향 때문에 음의 NOE 효과도 나타낼 것

이다. 즉 어느 쪽의 영향이 더 크느냐에 따라서 H_C의 NOE 결과는 음 또는 양으로 나타날 수 있으며 때로는 두 영향이 비슷하여 0의 NOE 효과도 보일 수 있을 것이다. 그림-8에 이 세 개의 스핀 효과를 세 개의 스핀이 위치한 각도와 각각의 거리에 따라 핵 H_A(1)를 선택하였을 때 핵 H_C(2)의 NOE 효과를 나타내었다.

즉 H_C(2)의 NOE의 효과가 음과 양 그리고 0이 되는 지점은 거리와 각도에 따라서 각기 다름을 잘 보여주고 있다. 이러한 세 개의 스핀 효과의 실험을 acrylic acid(2)에 있는 세 개의 양성자의 NOE 실험 결과가 잘 보여주고 있다(Table 1).

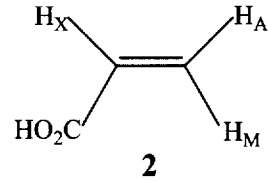


Table 1. acrylic acid(2)의 NOE.

Irradiate	A	M	X
η A	-	0.34	0.07
η M	0.36	-	-0.02
η X	0.14	- 0.04	-

양성자 A를 선택하였을 때는 두 양성자 M과 X가 그들의 거리에 비례하여 양의 NOE 값을 보였지만, M의 양성자를 선택하였을 때는 A는 양의 NOE를 보인 반면 X는 음의 NOE를 보여주고 있다. 똑같이 X의 양성자를 선택하였을 때는 A는 양의 NOE를 보여주고 있지만, M은 음의 NOE를 보여주고 있다. 이와 같은 결과로부터 우리는 다음과 같은 두번째의 원칙을 유도해 낼 수 있다.

“두 핵간에 NOE의 효과가 존재하지 않는다는 것이 그들이 멀리 떨어져 있다는 충분한 증거일 수는 없다.”

NOE의 효과는 위에서 언급된 것과 같이 여러가지 이유 때문에 아주 작거나 때로는 관찰될 수 없을 때도 있으므로 이 두번째 정의는 앞서서 얻은 첫번째 정의보다 더 엄격히 NOE 결과를 해석할 때 사용되어야 한다.

위의 두 정의가 말해 주듯이 NOE에 대한 한가지

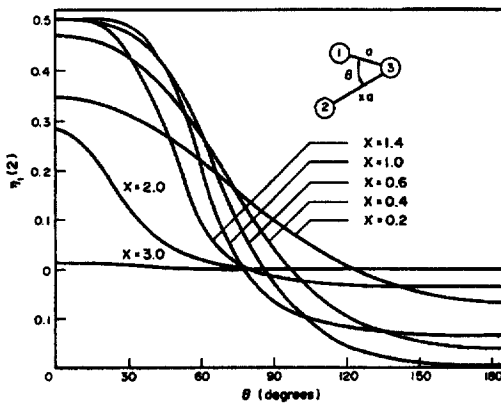


Fig. 8. The variation of NOE with θ and position in three-spin system.

실험이 어떠한 결론을 내릴 수 없으며 NOE 결과의 해석은 NMR의 어떤 다른 실험보다도 오류를 일으킬 여러가지 가능성을 내포하고 있으므로 가능한 여러가지 변수를 모두 따져 보아야 한다.

7. NOE의 응용

이제 앞에서 유도된 주의할 점들을 고려하면서 실제의 문제들을 NOE를 이용하여 어떻게 해결 할 수 있는가를 한 예를 통하여 보도록 하자. 화합물 3과 4는 진통의 효과를 가지는 capsaicin 계통의 화합물을 만드는 중간체로서 두 화합물을 MPLC로 분리한 후 이들의 구조를 확인하는 것은 양성자(¹H) NMR의 화학이동만으로는 불가능하다.¹⁷ 다른 방법으로는 벤젠링의 탄소 3과 4의 화학이동을 정확하게 알게되면 탄소와 양성자를 이용한 이차원(two-dimension) 화학이동 상호관계(chemical shift correlation) NMR을 이용하여 두 화합물을 구분할 수 있다.

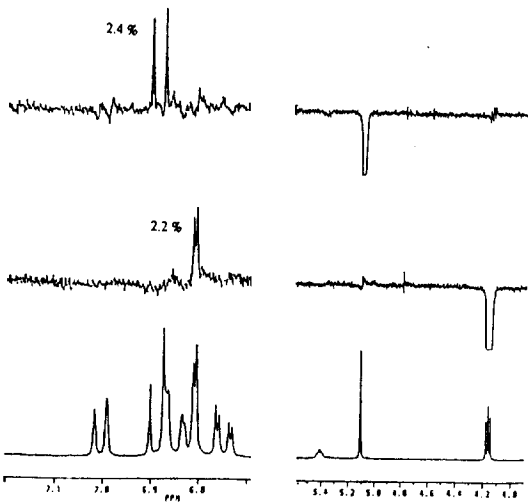
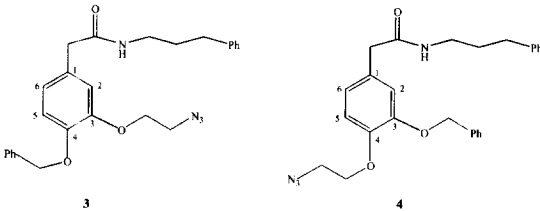


Fig. 9. The NOE difference spectrum of Compound 3.

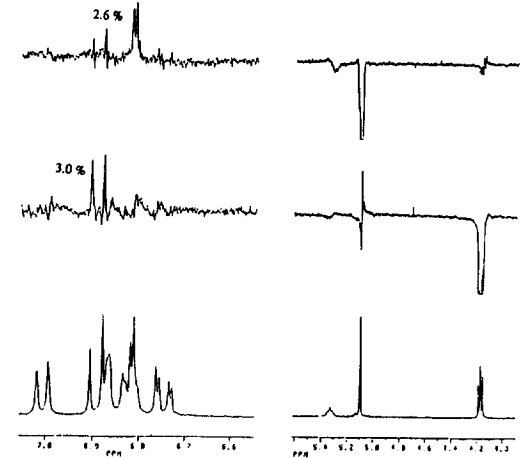


Fig. 10. The NOE difference spectrum of compound 4.

그림-9와 그림-10은 화합물 3과 4의 각각의 NOE 차이스펙트럼 실험 결과를 보여주고 있다. 먼저 그림-9를 보면 양성자(¹H) NMR에서 화합물 3에서 탄소 4의 위치에 있는 벤질의 -OCH₂-와 탄소 3의 위치에 있는 -OCH₂-를 그들의 커플링 모양 때문에 쉽게 구분할 수 있다. 즉 벤질의 -OCH₂-(δ , 5.1)는 단일피크이며 δ , 4.17에 있는 삼중선(triplet)의 피크는 탄소 3의 위치에 있는 -OCH₂-에 해당한다. 위의 그림-9 두 NOE 차이 스펙트럼은 탄소 3과 4의 위치에 있는 -OCH₂-를 각각 섭동시켜서 얻은 결과이다. 탄소 3위치에 있는 -OCH₂-의 양성자의 삼중선을 포화시켰을 때는 예상대로 1.8 Hz의 커플링 상수를 가진 이중선이 2.2 %의 NOE를 보여주었고 탄소 4의 위치에 있는 벤질 그룹의 -OCH₂-의 단일피크를 섭동하였을 때는 8.2 Hz의 커플링 상수를 가지는 이중선이 2.4 %의 NOE 현상을 보여주고 있다. 이들 1.8 Hz와 8.2 Hz의 커플링 상수는 벤젠화합물에서 양성자들이 나타내는 각각의 *ortho*와 *meta* 커플링 상수에 잘 일치하므로 화합물 3의 구조와 잘 일치함을 쉽게 유추할 수 있다. 즉 1.8 Hz는 탄소 3의 위치에 있는 -OCH₂-의 양성자의 삼중선이 섭동되었을 때 NOE 결과를 나타내는 양성자 2가 양성자 6과 *meta*-커플링하여 나타나는 것이고, 8.2 Hz는

탄소 4의 위치에 있는 벤질 $-OCH_2-$ 와 NOE 결과를 나타내는 양성자 5가 양성자 6과 *ortho*-커플링을 한 것을 보여주는 것이다. 이제 탄소 3과 4의 위치에 치환체가 바뀐 화합물 4에서는 NOE 차이 스펙트럼의 결과가 화합물 3에서의 결과와 반대로 얻어져야 한다는 것을 쉽게 기대할 수 있다. 그림-10은 이 예측된 결과를 잘 보여주고 있다. 탄소 4의 위치에 있는 삼중선의 $-OCH_2-$ 의 섭동으로 얻은 NOE 차이 스펙트럼은 8.2 Hz의 *ortho*-커플링의 피크만 보여주고 있고 (3.0 % NOE) 3의 위치에 있는 벤질 $-OCH_2-$ 의 피크의 섭동으로 얻은 스펙트럼은 1.8 Hz의 *meta*-커플링 상수를 나타내는 피크만 보여주고 있다(2.6 % NOE). 그러므로 두 화합물의 구분은 NOE의 실험 결과가 쉽게 이를 수가 있다. 이 과정에서 우리는 또 다른 하나의 중요한 결론을 유추해 낼 수 있다. 위 실험에서 우리는 벤젠 구조에 위치한 2, 5, 그리고 6의 양성자의 정확한 화학이동을 알지 못 하였지만, 커플링 상수를 이용하여 구조를 알아 낼 수 있었으며 결국 이들 양성자들의 정확한 화학이동을 찾아낼 수 있게 되었다. 이들은 결국 이차원 NMR 실험을 이용하여 탄소(^{13}C)의 화학이동을 결정하는데도 이용되게 된다. 즉 NOE 차이 스펙트럼 실험은 때로는 스펙트럼이 매우 복잡하게 겹쳐서 양성자들의 정확한 화학이동을 구분할 수 없을 때 스펙트럼을 단순화시켜 스펙트럼 해석을 쉽게 할 수도 있게 된다. 이와같이 핵간의 거리의 관계에 의존하는 NOE는 구조(structure)나 입체화학(stereochemistry)의 규명 뿐 만 아니라 분자의 형태(conformation)에 관한 정보도 제공하게 된다.⁸

8. 결론

지면의 한계로 NOE의 가장 기본이 되는 부분만 언급하였지만 이러한 기본이 이차원 실험의 NOESY나⁶ 거대 분자의 음의 NOE를 양으로 바꾸어서 교환(exchange)반응과 쌍극자간 이완을 구분하기 위한 ROESY¹⁸ 실험 등의 기본이 됨은 더 이상 강조할 필요가 없다. 최근 이 NOE 실험은 shape 펄스와¹⁹ gradient의 사용이 가능하게 되므로해서 더욱 더 정교한 실험을 할 수 있게 되었다.²⁰

참고문헌

1. I. Solomon, *Phys. Rev.*, **99**, 559 (1955).

2. A. W. Overhauser, *Phys. Rev.*, **89**, 689 (1953).
 3. R. J. Kaiser, *Chem. Phys.* **39**, 2435 (1963).
 4. P. C. Lauterbur in the paper of J. D. Baldeschweiler and E. W. Randall, *Chem. Rev.* **63**, 81 (1963).
 5. F. A. L. Anet and A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5250 (1965).
 6. S. Macura and R. R. Ernst, *Mol. Phys.*, **41**, 95 (1980).
 7. N. Bloembergen, E. M. Purcell and R. V. Pound, *Phys. Rev.*, **73**, 697 (1948).
 8. J. H. Noggle and R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, 1971.
 9. O. Jardetzky and G. C. K. Roberts, *NMR in Molecular Biology*, Academic Press, New York, 1981.
 10. R. M. Lynden-Bell and R. K. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance*, Nelson, London, 1969.
 11. J. D. Glickson, S. L. Gordon, T. P. Pitner, D. G. Agresti and R. Walter, *Biochemistry*, **15**, 5721 (1976).
 12. M. P. Williamson and D. H. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 165 (1981).
 13. S. V. Ley, D. Neuhaus and D. J. Williams, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1207 (1982).
 14. D. Neuhaus and M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers, 1989.
 15. J. K. M. Sanders and J. D. Mersh, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **15**, 353 (1982).
 16. E. D. Becker, *High Resolution NMR, Theory and Chemical Applications*, Academic Press, New York, 1980.
 17. S. G. Lee, J. K. Choi, N. S. Park, M. S. Hong and D. C. Ha, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **13**, 87 (1992).
 18. A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **63**, 207 (1985).
 19. H. Kessler, S. Mronga and G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.*, **29**, 527 (1991).
 20. T. Parella, *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 467 (1998).