



Principles and application of SNIF-NMR

Hyeok Kwon and Woo Sung Son*

College of pharmacy and Institute of Pharmaceutical Sciences, CHA University, 120 Haeryong-ro, Pocheon-si, Gyeonggi-do 11160, Republic of Korea

Received Dec 08, 2019; Revised Dec 16, 2019; Accepted Dec 17, 2019

Abstract SNIF-NMR is one of the analytical methods used to discriminate impurities in food and natural products. To determine the origin of compounds, SNIF-NMR utilizes frequency of deuterium in site specific fractionated sample using nuclear magnetic resonance. Also, SNIF-NMR is currently used to evaluate the authenticity of various foods such as wine, vanillin and oil, and is known to provide more accurate information than other analytical methods. In this review, the basic principles and practical examples of SNIF-NMR is presented.

Keywords Deuterium, natural isotope fractionation, SNIF-NMR

서문

식품에 의도적으로 불순물을 넣었는지를 감별해내는 과학적인 방법에는 여러 가지가 있다. 식품 내의 칼륨, 인, 질소 등 원소를 활용하는 compositional analysis^{1, 2} 방법과 동위 원소의 상대적 빈도를 mass spectrometry를 활용하여 측정하는 IRMS (isotope ratio mass spectrometry)^{3, 4} 그리고 샘플 중수소의 빈도를 측정하여 화합물의

기원을 알아내는 SNIF-NMR (site specific natural isotope fractionation studied by nuclear magnetic resonance)가 있다.⁵⁻⁷ 이 중 SNIF-NMR은 현재 wine, vanillin, oil 등 여러 식품의 진위 감점을 위하여 활용되고 있다.⁸⁻¹⁰

중수소의 성질

중수소(Deuterium, ^2H , D)는 핵이 한 개의 양성자와 한 개의 중성자로 구성되어 있는 수소의 동위원소이다. 자연적으로 발생한 중수소 수는 약 6,000개의 수소 중 1개꼴로 대략 0.02%를 차지하고 있다. 중수소는 수소와 달리 중성자를 하나 더 가지고 있어 수소와 다른 물리적 특성과 에너지적 특성을 보이므로 이는 중수소 SNIF-NMR의 이론적 기초가 된다.

중수소의 핵을 지칭하는 용어인 중양성자(Deuteron)는 특별한 성질을 지니는데, 일반적으로 양성자와 중성자 수가 홀수인 원자들은 nuclear pairing effect에 의하여 핵 결합 에너지가 낮아 불안정하므로 베타붕괴를 통하여 양성자와 중성자를 짝수로 맞추려고

* Address correspondence to: **Woo Sung Son**, College of Pharmacy and Institute of Pharmaceutical Sciences, CHA University, 120 Haeryong-ro, Pocheon-si, Gyeonggi-do 11160, Republic of Korea, Tel: +82-31-850-9398; Fax: +82-31-850-9398; E-mail: wson@cha.ac.kr

하지만, 중양성자는 이러한 현상이 나타나지 않는다. 이를 통해 중수소는 지구상에 상당히 안정한 상태로 존재한다.¹¹

중수소는 수소와 달리 중성자를 하나 더 가지고 있어 이로 인해 생기는 여러 물리적, 화학적 특징이 있다. 물의 수소를 중수소로 치환한 D₂O는 H₂O보다 대략 11% 정도 밀도가 높고 점성도 크다. 또한 끓는점도 101.4°C로 일반적인 물보다 더 높다.¹² 이로 인해 natural isotope fractionation이 가능해지고 각 지역마다 중수소의 비율이 달라지게 된다. 또한 kinetic isotope effect로 인하여 식물이나 미생물에 의해 fixing된 중수소는 다른 수소와 달리 화학 반응이 상대적으로 덜 일어난다.^{13, 14}

수소의 원자핵 스핀 수는 1/2이지만 중수소의 원자핵 스핀은 1이다. 원자핵 스핀수의 차이는 NMR에 반응하는 진동수 차이로 나타나는데 SNIF-NMR에서는 수소와 중수소의 진동수 차이를 활용한다. 예를 들어, 수소가 400 MHz에서 공명을 나타내는 경우 중수소는 60 MHz에서 공명을 나타내기 때문에 서로의 스펙트럼에 영향을 주지 않고 측정할 수 있다.¹⁵ 또한 중수소는 스핀 수가 1/2보다 크므로 quadrupolar coupling constant를 가지나, 이 크기가 상대적으로 작아 proton decoupling이 효율적이고 nuclear overhauser effect (NOE)가 일어나지 않는다.^{16, 17}

중수소를 측정하는데 있어 여러 가지 파라미터들이 있다. 그 중 isotopic abundance (A)는 무거운 동위원소 수(H)를 가벼운 동위원소(L)와 무거운 동위원소 수의 합으로 나눈 값으로 사용할 수 있다.

$$A = H/(H + L) \quad (1)$$

또한, Isotope ratio (R)은 무거운 동위원소의 수를 가벼운 동위원소의 수로 나눈 값을 사용할 수 있다.

$$R = H/L \quad (2)$$

중수소의 경우 그 수가 많지 않기 때문에 대부분 한 개의 분자에 하나의 중수소가 결합해 있는 경우만을 생각한다. 이런 상황에서는 R값은 A값과 거의 일치하게 된다.¹⁸ 이외에 많이 쓰이는 파라미터로 fractionation factor인 α 값이 있다.^{5, 19} α 값은 다음과 같이 정의한다.

$$\alpha_{A-B} = \frac{(H/L)_B}{(H/L)_A} \quad (3)$$

Natural isotope fractionation

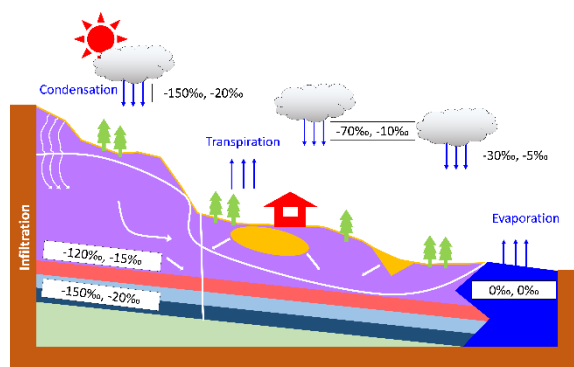


Figure 1. Natural isotope fractionation of water (redrawn from Zhonghe pang et al.²⁰).

Natural isotope fractionation은 물리적, 화학적 또는 생화학적 변화를 통해 일어나는데, 이는 속도론적 효과와 열역학적 동위원소 효과에 기인한다(Figure 1).^{21, 22} 중수소의 경우 물 분자의 증발과 응축에 의하여 isotope fractionation이 일어나게 되는데, 이는 레일리의 증류 방정식(Rayleigh distillation equation)으로 동위원소 비율을 구할 수 있다.²³

$$xN = (x - dx)(N - dN) + \mu dN \quad (4)$$

식(4)에서 N 는 액체의 몰수, x 는 혼합 액체에서 어떤 물질 A의 몰분율, y 는 A의 증기에서의 몰분율을 각각 의미한다. 식(4)를 전개하고 다시 정리하면 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
 Nd x &= y d N - x d N \\
 \therefore \frac{d N}{N} &= \frac{d x}{y - x} \\
 \int_{N_0}^N \frac{d N}{N} &= \int_{x_0}^x \frac{d x}{y - x} \\
 \ln \frac{N}{N_0} &= \int_{x_0}^x \frac{d x}{y - x} \quad (5)
 \end{aligned}$$

식(5)는 레일리의 증류 방정식이다. 중수소를 포함하고 있는 물 분자의 비율이 매우 작기 때문에 다음과 같은 식이 성립한다.²⁴

$$\begin{aligned}
 \alpha_{H-D} &= \lim_{x_D \rightarrow 0} \frac{y_D/x_D}{y_H/x_H} = \lim_{x_D \rightarrow 0} \frac{y_D}{x_D} \\
 \therefore y_D &= \alpha_{H-D} x_D \quad (6)
 \end{aligned}$$

이를 위 적분식에 대입하면

$$\begin{aligned}
 \ln \frac{N}{N_0} &= \frac{1}{(\alpha - 1)} \ln \frac{x}{x_0} \\
 \therefore (x/x_0) &= (N/N_0)^{(\alpha-1)} \quad (7)
 \end{aligned}$$

식(7)을 활용하여 중수소를 포함하고 있는 물 분자의 비율을 알아 낼 수 있으며, 이를 활용하여 증발과 응축을 조절하는 가장 큰 요인인 온도 이외에 천수(meteoric water)의 중수소 조성 변화에 영향을 미치는 인자에 대한 연구가 가능하다. 예를 들어, 식품이나

천연물의 경우 산지의 지리적 특성이 원료의 지역별 중수소 비율을 결정하는 요인이 될 수 있다(Figure 2).^{25, 26}

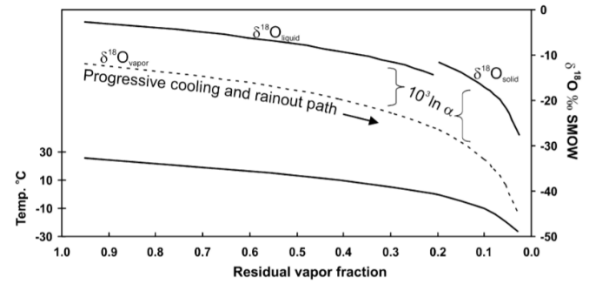


Figure 2. Changes in the percentage of oxygen isotopes in water vapor, rain and snow with decreasing temperature (redrawn from Matthew S. Lachniet.²⁵).

SNIF-NMR의 원리

중수소의 상대적으로 높은 안정성과 낮은 반응성 그리고 수소와 다른 범위에서 NMR을 측정할 수 있는 특성은 SNIF-NMR을 개발하는 토대가 되었다. 또한 natural isotope fractionation은 SNIF-NMR 데이터를 활용하여 어떤 물질의 기원을 알게 해준다. 중수소를 포함하고 있는 물 분자는 수소만을 포함하고 있는 물 분자보다 끓는점이 높아 일반적으로 온도가 높은 지역은 중수소의 비율($R=D/H$)이 높고 온도가 낮은 지역은 중수소의 비율이 낮다.²⁷ 이로 인해 지역에 따라 특징적인 중수소 비율을 가지게 되고, 특정 지역에서 생성된 천연물은 그 지역의 중수소 비율에 따라 천연물이 함유하고 있는 중수소의 비율이 달라지는 것을 이용하여 중수소를 labeling method로 사용할 수 있는 이론적 배경이 된다.^{26, 28, 29}

온도와 중수소 비율의 값은 상관계수 0.9를 가지는 다음과 같은 식을 만족한다고 알려져 있다.^{30, 31}

$$\delta D = 5.6T(^{\circ}C) - 100(\text{‰}) \quad (8)$$

지역에 따른 영향과 더불어 식물과 같은 천연물의 생화학적, 생리학적 반응의 차이도 SNIF-NMR 분석에 영향을 주는 요소이다. 사탕무(sugar beet)로부터 유래한 알코올은 낮은 R 값을 가지고 곡물은 중간값 포도는 높은 R 값을 가진다. 이는 포도나무의 높은 증산작용에 의한 것으로 증산작용으로 인해 주변의 물보다 높은 중수소 비율을 보인다.³² 분자구조 내에서의 탄소 위치에 따른 중수소의 비율 또한 어떠한 물질의 기원을 알아 낼 수 있는 단서가 된다. 예를 들어, 에탄올의 경우 C1은 발효가 진행된 배지의 물의 중수소 비율과 밀접한 연관성을 보이며, C2는 에탄올의 합성 시작 물질, 물 그리고 설탕과 연관성을 보인다.³³ SNIF-NMR로 측정된 스펙트럼은 식(9)와 같이 SMOW (Standard Mean Ocean Water)와 비교하여 활용된다.^{34, 35}

$$\frac{(D/H)_i^A}{(D/H)^{WS}} = \frac{P^{WS} \times M^A \times m^{WS} \times t^{WS} \times S_i^A}{P_i^A \times M^{WS} \times m^A \times t^A \times S_i^{WS}} \quad (9)$$

A는 샘플을, WS는 working standard를 의미하며 P는 어떤 site에서 수소의 수이고, M은 샘플의 분자량이고, m은 실험에 사용된 질량을 나타내며, t는 순도(%, w/w)를 의미하고, S는 signal intensity이다.

식(9) 대신 사용하는 δD 값이 있는데, 그 식은 아래와 같다.

$$\delta D = \left(\frac{R_i - R_{ref}}{R_{ref}} \right) \times 1000 \quad (10)$$

δ 값에서 R은 동위원소 비율을 의미하고, R_i 는 어떤 분자에서 특정 위치에서의 중수소의 비율을 의미한다. 기준이 되는 R_{ref} 는

일반적으로 Vienna-Standard Mean Ocean Water (V-SMOW)를 사용하고 R과 A값은 각각 155.76, 155.74ppm이다.³⁶

SNIF-NMR의 활용예

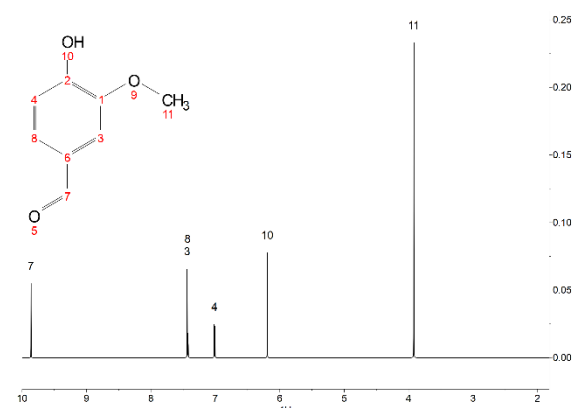


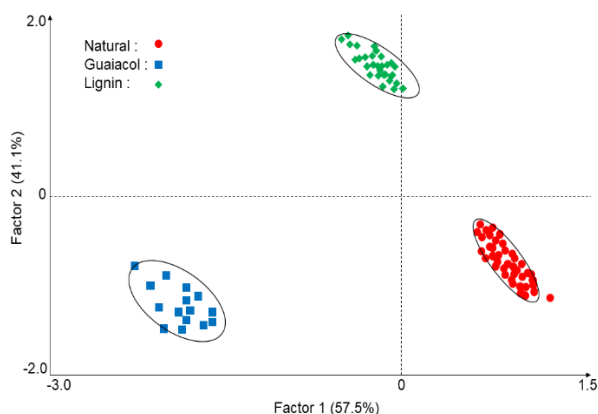
Figure 3. Structure and 1D 1H -NMR spectrum of vanillin (drawn with Mestrelab MNova NMR package, <https://mestrelab.com>)

바닐린(vanillin)은 그림 3과 같이 벤젠 모체에 작용기로 알데하이드기, 메톡시기, 히드록시기를 하나씩 가지고 있다. 시판되는 바닐린은 바닐라 콩에서 얻은 천연 바닐린과 구아아아콜이나 리그닌에서 합성한 바닐린이다. SNIF-NMR의 데이터를 토대로 주성분 분석(PCA)한 결과가 아래 그림 4와 같다. 알데하이드 작용기 형성이 리그닌 합성과 구아아아콜 합성의 차이를 만드는 주요한 원인이다. 구아아아콜 합성 바닐린을 보면 두 개의 소집단으로 나뉘는 것을 볼 수 있는데, 그것은 알데하이드 작용기를 생성할 때 서로 다른 합성법을 사용한 결과로 여겨진다. 표 1은 바닐린의 기원에 따른 중수소 비율의 평균값과 표준편차 값을 나타낸 것이다. 서로의 값이 상당한 차이를 보이므로 바닐린 분자가 어떻게 만들어졌는지에 따라 구분할 수 있다.³⁶

Table 1. SNIF-NMR Measurements of Vanillin from Soybean, Lignin, and Guaiacol(Rewritten from Gerald S. Remaud et al.⁹).

origin	(D/H) ₁ (ppm)	(D/H) ₃ (ppm)	(D/H) ₄ (ppm)	(D/H) ₅ (ppm)
ex-beans (49)*	130.8	157.3	196.4	126.6
SD(ppm)	3.1	3.0	2.5	1.7
ex-lignin (64)	119.9	132.1	168.8	105.9
SD(ppm)	6.4	2.6	5.9	1.4
ex-guaiacol(30)	315.2	138.8	143.8	139.1
SD(ppm)	56.9	6.7	5.3	8.4

*괄호안의 숫자는 측정에 사용한 바닐린 샘플의 수를 의미함.

**Figure 4.** Monte Carlo analysis of SNIF-NMR data with vanillin from Soybean, Lignin, and Guaiacol (Redrawn from Gerald S. Remaud et al.⁹).

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2017R1D1A1B03030723). This study also partly supported by the GRRC program of Gyeonggi province (GRRC-CHA2017-A01, Discovery and Analysis of Regional Specialized Resources and Operation of Regional Research Service Center).

References

1. M. Esteki, J. Simal-Gandara, Z. Shahsavari, S. Zandbaaf, E. Dashtaki, and Y. Vander Heyden, *Food Control* **93**, 165 (2018)
2. M. Herrero, M. Castro-Puyana, E. Ibáñez, and A. Cifuentes, Compositional analysis of foods, in “Liquid Chromatography”, Elsevier, 2017
3. Z. Muccio and G. P. Jackson, *Analyst* **134**, 213 (2009)

결론

SNIF-NMR의 등장은 지금까지 전문가의 주관적 견해에 의지해 왔던 식품 감정을 정교하고 정밀한 과학적인 방법으로 진위여부 판단이 가능하게 하였다. SNIF-NMR의 대표적인 사례로 바닐린을 소개하였지만, 특정 식품에 국한되지 않고 SNIF-NMR은 거의 모든 식품의 진위 여부를 판별할 수 있기 때문에 활용도는 더욱 높아질 것이다. 특히 원산지 진위 여부의 판단이 애매한 인삼, 산삼과 같은 생약과 한우와 같은 식자재의 원산지 판별의 과학적이고 명확한 기준을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

4. M. Lees, "Food authenticity and traceability", Elsevier, 2003
5. M. L. Martin and G. J. Martin, Deuterium NMR in the study of site-specific natural isotope fractionation (SNIF-NMR), in "Deuterium and shift calculation", Springer, 1990
6. N. Ogrinc, I. J. Košir, M. Kocjančič, and J. Kidrič, *J. Agr. Food Chem.* **49**, 1432 (2001)
7. J.-M. Ha, Y. M. Woo, and A. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **22**, 82 (2018)
8. N. Ogrinc, I. Košir, J. Spangenberg, and J. Kidrič, *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 424 (2003)
9. G. S. Remaud, Y.-L. Martin, G. G. Martin, and G. J. Martin, *J. Agr. Food Chem.* **45**, 859 (1997)
10. G. Remaud, A. A. Debon, Y.-l. Martin, G. G. Martin, and G. J. Martin, *J. Agr. Food Chem.* **45**, 4042 (1997)
11. F. Low, *Phys. Rev.* **77**, 361 (1950)
12. F. T. Miles and A. W. Menzies, *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1067 (1936)
13. R. Wellman, F. Cook, and H. Krouse, *Science* **161**, 269 (1968)
14. F. Westheimer, *Chem. Rev.* **61**, 265 (1961)
15. G. A. Webb, "Modern Magnetic Resonance: Part 1: Applications in Chemistry, Biological and Marine Sciences, Part 2: Applications in Medical and Pharmaceutical Sciences, Part 3: Applications in Materials Science and Food Science", Springer Science & Business Media, 2007
16. H. Huber, *J. Chem. Phys.* **83**, 4591 (1985)
17. J. Noggle, "The nuclear Overhauser effect", Elsevier, 2012
18. G. J. Martin, S. Akoka, and M. L. Martin, SNIF-NMR—Part 1: Principles, in "Modern Magnetic Resonance", Springer, 2008
19. G. J. Martin, C. Guillou, M. L. Martin, M. T. Cabanis, Y. Tep, and J. Aerny, *J. Agr. Food Chem.* **36**, 316 (1988)
20. Z. Pang, Y. Kong, J. Li, and J. Tian, *Procedia Earth Planet. Sci.* **17**, 534 (2017)
21. A. Mariotti, J. Germon, P. Hubert, P. Kaiser, R. Letolle, A. Tardieux, and P. Tardieux, *Plant Soil* **62**, 413 (1981)
22. J. Silfer, M. Engel, and S. Macko, *Chem. Geol. (Isot. Geosci. Sect.)* **101**, 211 (1992)
23. K. Scott, X. Lu, C. Cavanaugh, and J. Liu, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **68**, 433 (2004)
24. V. Dohnal and I. Horáková, *Fluid Ph. Equilibria* **68**, 173 (1991)
25. M. S. Lachniet, *Quaternary Sci. Rev.* **28**, 412 (2009)
26. M. Martin, B. Zhang, and G. J. Martin, SNIF-NMR—Part 2: Isotope Ratios as Tracers of Chemical and Biochemical Mechanistic Pathways, in "Modern Magnetic Resonance", Springer, 2008
27. C. J. Yapp and S. Epstein, *Nature* **297**, 636 (1982)
28. G. J. Martin, B. L. Zhang, N. Naulet, and M. L. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5116 (1986)
29. P. A. Hays, G. S. Remaud, É. Jamin, and Y.-L. Martin, *J. Forensic Sci.* **45**, 552 (2000)
30. V. Ferronsky and V. Polyakov, "Isotopes of the Earth's Hydrosphere" Springer Science & Business Media, 2012
31. J. Gray and S. J. Song, *Earth Planet. Sc. Lett.* **70**, 129 (1984)
32. N. Christoph, A. Rossmann, C. Schlicht, and S. Voerkelius, "Wine authentication using stable isotope ratio analysis: Significance of geographic origin, climate, and viticultural parameters", ACS Publications, 2007
33. C. Guillou, G. Remaud, and G. J. Martin, *Trends Food Sci. Tech.* **2**, 85 (1991)
34. H. Craig, *Science* **133**, 1833 (1961)
35. G. Martin, M. Benbernou, and F. Lantier, *J. I. Brewing* **91**, 242 (1985)
36. R. Gonfiantini, *Nature* **271**, 534 (1978)