



HMQC vs HSQC for Small Molecules

Eunhee Kim and Hae-Kap Cheong*

Protein Structure Group, Korea Basic Science Institute, Cheongju 28119, South Korea

Received Aug 18, 2017; Revised Sep 25, 2017; Accepted Nov 25, 2017

Abstract Proton detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) and Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) essentially provide the same information – correlation of the chemical shift of the proton to J-coupled hetero nuclei such as ¹³C or ¹⁵N nuclei. This paper is a practical note for the students who ask which one is better and which methods they use routinely. Artifact suppression using phase cycling and gradient pulses are discussed.

Keywords HMQC, HSQC, Phase cycling, Gradient, Sensitivity

서문

NMR은 천연물 또는 유기분자의 구조 규명에 있어서 활용도가 매우 높다. 2차원 NMR 기술이 개발되면서 분자구조 규명에 큰 역할을 하고 있다. 2차원 NMR기법은 COSY, NOESY와 같은 homonuclear NMR 기법과 HMQC, HSQC, HMBC와 같은 heteronuclear NMR 기법이 있다. 이 중에서 많이 활용되는 HMQC와 HSQC는 사용되는 펄스열과 coherence transfer 기작은 다르지만 주로 1-bond로 연결되어 있는 ¹³C 또는 ¹⁵N과 ¹H 사이의 correlation을 보여주는 실험이다. HMQC와 HSQC에 대한 이론적인 설명은 여러 논문 및 textbook에서 다루고 있으며, 그 중에서 2004년에 Concepts in Magnetic

Resonance Part A에 발표된 “A comprehensive Discussion of HSQC and HMQC Pulse Sequences”를 공부해 보기를 추천한다.¹ 이 교육자료에는 실제 실험결과를 바탕으로 저분자 유기물질 분석에 일상적으로 적용할 수 있는 NMR 실험기법을 제시하고자 한다.

실험방법

시료준비– HMQC와 HSQC 실험을 위한 시료는 sucrose 5 mg을 D₂O 0.6 mL에 녹여서 사용하였다.

NMR 실험– 한국기초과학지원연구원의 800MHz NMR에서 실험하였다. 모든 2D NMR실험은 1H 2048*256 complex point로 실험하였다.

실험결과 및 고찰

Direct vs Indirect detection– HMQC (또는 HSQC)와 XHCORR (또는 HETCOR) 실험은 정확하게 같은 정보를 준다. Heteronuclear correlation 실험에서 전체적인 신호세기는 다음 식과 같다.²

$$S/N \propto \gamma_{ex} \gamma_{det}^{3/2} [1 - \exp(-R_{1,ex} T_c)]$$

$\gamma_{ex}, \gamma_{det}$ 는 각각 excitation과 detection되는 핵종의 gyromagnetic ratio, $R_{1,ex}$ 은

* Correspondence to: Hae-Kap Cheong, Protein Structure Group, Korea Basic Science Institute, Cheongju 28119, South Korea, Tel: 82-43-240-5062; E-mail: haekap@kbsi.re.kr

excitation 되는 핵종의 spin-lattice relaxation rate, T_c 는 recycle 시간이다. 일반적인 실험조건 ($T_c > 2T_1$)에서 1H spin-lattice relaxation에 의한 신호감소는 10% 이하이다. 따라서 1H 로 excitation 시키고, detection 핵종을 1H 와 ^{13}C 로 하는 것을 비교하면 $(\gamma_H/\gamma_C)^{3/2}=8$ 배로 1H indirect detection이 유리하다. direct probehead인 경우 1H 신호감소를 고려해도 XHCORR 실험에 비하여 HMQC (또는 HSQC) 실험이 약 4배의 민감도를 가진다. Indirect probehead인 경우 약 16배의 민감도를 가진다.

Phase sensitive (ph) vs absorption (qf) mode - Figure 1에 ph 와 qf mode로 측정된 HMQC 스펙트럼을 나타내었다. 전체적인 신호크기는 qf 가 ph mode에 비하여 약 20% 정도 크다. 하지만 1H demension상의 line width는 약 50% 정도 증가한 것을 알 수 있다. 따라서, $^1H-^{13}C$ connectivity을 관찰하기 위해서는 qf mode를 측정하고, $^1H-^1H$ coupling constant를 2D HMQC를 이용하여 측정하기 위해서는 ph mode를 활용하는 것이 바람직하다. 이 경우는 overlap 등의 이유로 $^1H-^1H$ DQF-COSY를 활용하여 측정하지 못하는 경우에 한하여 제한적으로 이용할 수 있다.

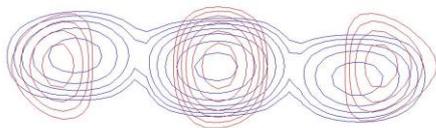


Figure 1. Expansion of ph (red) and qf (blue) mode HMQC

Pulse Field gradient (pfg) vs phase cycling (pc) coherence selection - 우리가 원하는 coherence 를 선택하고, artifact 를 suppression 하기 위해서 phase cycling 방법 과 pfg 를 활용한 방법이 있다. pfg 로 N-type (echo) 과 P-type (anti-echo) coherence 중 하나만을 선택하면 pc 방법에 비하여 $\sqrt{2}$ 만

큼 신호가 감소한다. 이번 실험에서 HMQC 결과는 pc 와 pfg 방법에 따른 신호의 크기는 비슷한 것으로 관찰되었다. 이 결과를 일반화 하기에는 실험적 증거로서 부족하다. 하지만 pc 방법에서는 t_1 ridge artifact 가 크게 관찰되었다 (Figure 2). 이는 99%를 차지하고 있는 ^{12}C 결합 1H 신호에 대한 cancellation 이 완벽하지 않아서 생긴 것으로 추측된다. pfg 는 pulse length 오차 등에 의한 artifact suppression 이 pc 방법에 비하여 월등하다는 것을 알 수 있다. pfg 와 pc 비교실험결과는 HSQC 를 실험에서도 비슷하게 관찰되었다. 이는 pfg 방법을 사용하는 것이 small peak 와 noise 를 구별하는데 유리함을 말해준다.

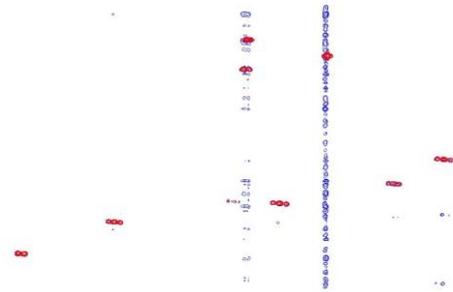


Figure 2. Expansion of pfg (red) and pc (blue) HMQC

HMQC vs HSQC - 일반적으로 알려져 있는 HMQC와 HSQC 실험의 차이는 다음과 같다. (i) HSQC는 HMQC에 비하여 많은 pulse를 사용하기 때문에 probehead tuning이나 pulse calibration의 영향을 많이 받는다. (ii) X-nuclei evolution 시간 동안 $^1H-^1H$ coupling evolution의 영향이 없는 HSQC가 HMQC 보다 indirect dimension resolution이 좋다. Figure 3에 pfg를 활용한 HMQC와 HSQC를 나타내었다. 본 비교실험에서는 HMQC와 HSQC가 비슷한 결과를 보여주고 있다. 이는 다음과 같이 해석될 수 있다. (i) pfg를 활용하면 앞에서 설명한 것과 같이 pulse calibration 오류로 인한 artifact를 suppression 하는 기능이 있으므로, probehead tuning과 pulse calibration의 영향을 줄여주어 HMQC와 HSQC가 실질적인 차이를 보기 힘들다. (ii) 비교실험에서는 indirect dimension의 spectral width를 40 ppm (8,049 Hz)에 256 complex point로

실험하였다. 즉 FID resolution은 63 Hz/point로 실험하였으며, 관찰된 indirect dimension의 ^{13}C peak width는 약 60 Hz이다. 따라서 일반적인 ^1H - ^1H J-coupling에 의한 peak broadening을 관찰 할 수 없는 resolution으로 실험조건이 된다. Indirect dimension의 digital resolution을 10 Hz/point 이하로 실험할 경우에는 HSQC가 HMQC보다 좋은 결과를 보일 것으로 기대된다.

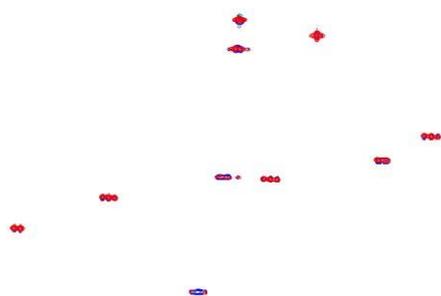


Figure 3. Expansion of pfg-HMQC (red) and pfg-HSQC (blue)

Sensitivity enhancement with gradient and HSQC-DEPT – Sensitivity enhancement 방법은 Preservation of equivalent pathways (PEP) 방법이라고도 불리며 일반 HSQC에 비하여 $\sqrt{2}$ 만큼 신호가 증가한다.³ 일반적인 HSQC에서 t_1 evolution 시간에 발생하는 두개의 orthogonal term인 $2I_zS_y$ 와 $2I_zS_x$ 는 reverse inept에 의해 refocusing 되지 않아서 초기 I-spin신호의 반은 신호검출에 기여하지 않게 된다. Se-HSQC는 추가적인 펄스를 이용하여 두개의 신호모두를 in-phase로 만들어 관찰하게 된다. 본 비교실험 결과는 Figure 4에 나타내었으며 평균적으로 20% 정도 신호증가가 관찰되었다. HSQC에서는 관찰하기 힘들었던 multiple bond coupling이 se-HSQC에서는 관찰되었다. Small molecule에서의 carbon multiplicity를 결정하는 것은 structural nmr assignment를 위해서 필요한 일이다. 이를 위해서 일반적으로는 1D CARBON-DEPT 실험을 통해서 하게 되는데, pfg를 활용한 se-HSQC-DEPT⁴ 실험으로 ^1H - ^{13}C correlation과 carbon multiplicity를 결정할

수 있다. Figure 5에 se-HSQC-DEPT 실험 결과를 나타내었으며 CH와 CH_2 peak의 phase가 반대로 나타난 것을 알 수 있다. Se-HSQC-DEPT의 sensitivity는 se-HSQC와 유사한 결과를 보여준다.

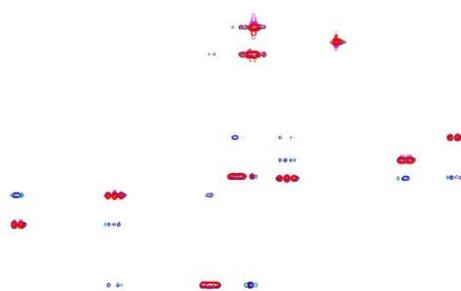


Figure 4. Expansion of HSQC (red) and se-HSQC (blue)

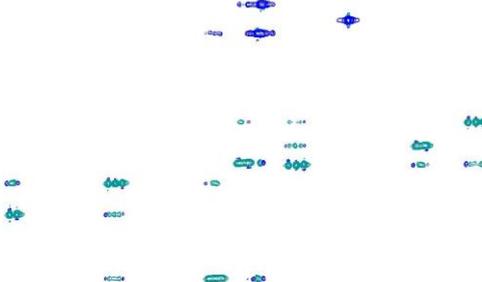


Figure 5. Expansion of se-HSQC-DEPT

결론

본 비교실험에서는 small molecule NMR 측정을 하는 학생들에게 practical guideline 을 제시해 주는 것을 목표로 하였다. 결론적으로 구조해석과 관련하여 많이 필요로 하는 ^1H - ^{13}C correlation 실험이라면 se-HSQC-DEPT 실험을 기본적으로 추천한다.

추가적으로 본 비교실험에서는 aliphatic carbon 의 평균적인 1J 값으로 145 Hz 를 coherence transfer delay 시간, $1/2J$ 으로 사용하였다. 따라서 5.3 ppm 의 $\text{H1}'$ ($^1J=170$ Hz)에 최적화 되어 있지 않았다. Alkene, alkyne, aromatic 등과 같이 1J 값이 큰 화합물의 경우에는 inept delay 를 조절하는

것이 필요하다. 특히 본 비교실험에서 transfer delay 시간을 조절하는 것이 반드시 언급하지는 않았지만 HMBC 실험의 경우 필요하다.
long range coupling 에 따라 coherence

감사의 글

이 연구는 한국기초과학지원연구원(C37902) 보조금에 의해 지원되었다.

References

1. P. K. Mandal and A. Majumdar, *Concept Mag. Reson. A* **20**, 1 (2004)
2. A. Maudsley and R. Ernst, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, Oxford University press (1987)
3. I. A. Palmer, J. Cavanagh, P. Wright, and M. Rance, *J. Magn. Reson.* **93**, 151 (1991)
4. R. D. Boyer, R. Johnson, and K. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson.* **165**, 253 (2003)