

ZUR KERNMAGNETISCHEN RELAXATION DER WASSERPROTONEN IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN PARAMAGNETISCHER MAKROMOLEKÜLE

H. PFEIFER

Physikalisches Institut der Karl-Marx-Universität, Leipzig (Deutschland)

(Eingegangen am 10. September, 1962)

SUMMARY

Study on the nuclear-magnetic relaxation of water protons in aqueous solutions of paramagnetic macromolecules

The feasibility of a quantitative discussion of measurements of the nuclear-magnetic relaxation in aqueous solutions of paramagnetic particles was investigated. The part of the relaxation rate of the water protons, which is due to these particles is proportional to $\mu_{\text{eff.}}^2 \cdot F(a)$. Here $\mu_{\text{eff.}}$ means the effective magnetic moment of the paramagnetic particles which often can be calculated from the temperature-dependent term of the static susceptibility, and $F(a)$ is a function of the shortest possible distance a between the paramagnetic centre of the particle and the water protons. This function is known only for paramagnetic particles in an S-state with equidistant Zeeman levels. Depending on the electron-relaxation time, the diffusion coefficient and the magnetic field one finds for non-polar particles a dependence proportional to $1/a$ through $1/a^3$.

In Zusammenhang mit der vorgehenden Arbeit von SCHELER¹ sollen die folgenden Betrachtungen zu klären versuchen, welche physikalische Bedeutung beim gegenwärtigen Stand der Theorie der kernmagnetischen Relaxation der sogenannten Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppe (paramagnetischer "Kern") eines Teilchens zukommt. Die Zugänglichkeit wird definiert durch die Beziehung

$$Z = \frac{1}{\mu^2 c} \left(\frac{1}{T_1} - \left(\frac{1}{T_1} \right)_v \right)$$

wobei μ das aus der statischen Suszeptibilität ermittelte magnetische Moment des paramagnetischen Teilchens, c die Konzentration und $1/T_1$ bzw. $(1/T_1)_v$ die Relaxationsrate der Wasserprotonen in der Lösung bzw. in einer Vergleichslösung entsprechender diamagnetischer Teilchen bezeichnet. Durch Verwendung der Vergleichslösung an Stelle des reiner Lösungsmittels soll dabei der Einfluss von ungewollten paramagnetischen Verunreinigungen (gelöster Sauerstoff o.ä.) sowie ein von dem betrachteten paramagnetischen "Kern" unabhängiger Einfluss des Teilchens auf die Relaxationsrate der Wasserprotonen eliminiert werden. Da wir im folgenden diese

Einflüsse unberücksichtigt lassen, können wir also $1/T_1 = (1/T_1)_0$ durch $1/T_1 = (1/T_1)_0$ ersetzen, wobei aber dann $1/T_1$ die resultierende Relaxationsrate ohne die genannten Einflüsse und $(1/T_1)_0$ die Relaxationsrate des reinen Lösungsmittels ist.

Wir setzen zunächst kugelförmige Teilchen voraus, bei denen der paramagnetische "Kern" im Zentrum sitzt und müssen damit prinzipiell zwischen zwei Möglichkeiten unterscheiden:

1. *Fall*: Das Teilchen bewirkt eine merkliche Bewegungsbehinderung der Wassermoleküle in der ersten Schicht der Hydrathülle, so dass die mittlere Verweilzeit τ_h der Protonen in dieser Schicht gross ist gegen die mittlere Verweilzeit τ_w in den Gleichgewichtslagen der Wasserstruktur. Dann ergeben sich, wenn man eine mögliche Bewegungsbehinderung weiter entfernter Wassermoleküle pauschal durch einen effektiven Diffusionskoeffizienten in Rechnung setzt, zwei Bereiche mit unterschiedlichem Relaxationsmechanismus, die von dem Wasser der ersten Schicht der Hydrathülle und dem "frei" diffundierenden Wasser gebildet werden. Bezeichnen wir die zugehörigen Relaxationsraten mit $1/T_{1H}$ bzw. $1/T_{1WIT} + (1/T_1)_0$, wobei $1/T_{1WIT}$ der sog. Translationsanteil ist und $(1/T_1)_0$ die Relaxationszeit des Wassers ohne die paramagnetischen Teilchen, deren Anzahl im cm^3 N_1 sei, so ergibt sich durch Anwendung der Chapman-Kolmogoroff-Gleichungen² für die resultierende Relaxationsrate verdünnter Lösungen ($mN_1/N \ll 1$) und unter der Voraussetzung $T_{1H} \ll T_{1WIT}$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{mN_1}{N} \cdot \frac{1}{T_{1H} + \tau_h} + \frac{1}{T_{1WIT}} + \left(\frac{1}{T_1}\right)_0 \quad (1)$$

m bezeichnet dabei die Anzahl der Wassermoleküle, die sich in der ersten Schicht der Hydrathülle befinden, und N die Gesamtzahl der Wassermoleküle in einem cm^3 .

2. *Fall*: Die Bewegungsbehinderung in der ersten Schicht der Hydrathülle ist vernachlässigbar, d.h. $\tau_h \approx \tau_w$. Der Bereich des frei diffundierenden Wassers erstreckt sich also bis unmittelbar an die Oberfläche des paramagnetischen Teilchens, und es gilt

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1WIT}} + \left(\frac{1}{T_1}\right)_0 \quad (2)$$

Der Translationsanteil in dieser Gleichung $1/T_{1WIT}$ unterscheidet sich von $1/T_{1WIT}$ im wesentlichen nur dadurch, dass für den minimalen Abstand a der frei diffundierenden Wassermoleküle vom paramagnetischen "Kern" des Teilchens ein entsprechend, und zwar um etwa den mittleren Durchmesser eines Wassermoleküls, kleinerer Wert einzusetzen ist.

Natürlich stellen die beiden Behandlungen nur Grenzfälle dar, für die sich der Übergang vom ersten zum zweiten Fall in einer Abnahme des Verhältnisses

$$Q = \frac{\tau_h}{\tau_w} \quad (3)$$

äussert.

Unter den Voraussetzungen

$$\gamma_s \gg \gamma, \quad \gamma H_0 \tau_c \ll 1, \quad \bar{R} \ll 6a^2/2 \quad (4)$$

erhält man für die beiden Relaxationsraten $1/T_{1H}$ und $1/T_{1WIT}$ (vgl. Ref. 3 und 6)

$$\frac{1}{T_{1H}} = \frac{2\gamma^2\gamma_s^2}{5\gamma^2} S(S+1) \tau_c \left\{ 1 + \frac{7/3}{1 + (\gamma_s H_0 \tau_c)^2} \right\} \quad (5)$$

$$\frac{1}{T_{1WIT}} = \frac{3}{2} \gamma^2 \gamma_s^2 S(S+1) \tau_c \left\{ J_1(\gamma H_0) + \frac{7}{3} J_1(\gamma_s H_0) \right\} \quad (6)$$

Dabei bezeichnet l die Länge eines aktivierten Sprunges der Wassermoleküle während des Diffusionsprozesses, S bzw. $\gamma_s = g\mu_B/\hbar$ die Spinquantenzahl bzw. das gyromagnetische Verhältnis des paramagnetischen Teilchens, g den zugehörigen Elektronen- g -Faktor, μ_B das Bohrsche Magneton, $2\pi\hbar$ die Plancksche Konstante, γ das gyromagnetische Verhältnis des Protons, H_0 die angelegte magnetische Feldstärke, r_p den Abstand eines Protons der ersten Schicht der Hydrathülle vom paramagnetischen "Kern" des Teilchens und τ_c die Korrelationszeit der Dipol-Dipol-Wechselwirkung.

$J_1(\omega)$ ist proportional N_I und hängt kompliziert von a , ω , der Elektronenrelaxationszeit τ_s und dem effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} ab. Für entsprechend grosse Teilchen kann wegen ihrer relativen Unbeweglichkeit der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} durch die Hälfte des Diffusionskoeffizienten der Wassermoleküle, D , und die Korrelationszeit τ_c durch

$$\tau_c = \frac{\tau_h \tau_s}{\tau_h + \tau_s} \quad (7)$$

ersetzt werden. Aus demselben Grund wurde in Gl. 5 auch die skalare Wechselwirkung nicht mit berücksichtigt, die nur dann merkliche Beiträge liefern kann, wenn ihre Korrelationszeit gross gegen die der Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist.

Die Frage nach der Grösse des Quotienten τ_h/τ_w wurde in einem anderen Zusammenhang allgemein von SAMOILOW⁴ für eine Reihe einatomiger Ionen untersucht, der Teilchen, bei denen die Verweildauer der Wassermoleküle in der ersten Schicht der Hydrathülle grösser bzw. kleiner als in den Gleichgewichtslagen der Wasserstruktur ist, als positiv bzw. negativ hydratisiert bezeichnet. Auf Grund dieser Resultate, nach denen bei einwertigen Ionen schon für Ionenradien oberhalb etwa 1.2 Å negative Hydratation vorliegt (vgl. Ref. 4, Tab. 20), muss man also für unpolare Makromoleküle (vgl. auch Ref. 5) oder solche, bei denen die Anzahl der polaren Gruppen klein ist gegen die Anzahl der unpolaren Gruppen im gleichen Abstand vom paramagnetischen "Kern" des Moleküls, stets den zweiten Fall annehmen, d.h. es gilt

$$\frac{1}{T_1} - \left(\frac{1}{T_1}\right)_0 = \frac{3}{2} \gamma^2 \mu_{\text{eff}}^2 \left\{ J_1(\gamma H_0) + \frac{7}{3} J_1(\gamma_s H_0) \right\} \quad (8)$$

wobei $\gamma_s^2 S(S+1)\hbar^2$ durch μ_{eff}^2 ersetzt wurde und für a der Abstand der Wassermoleküle der ersten Schicht der Hydrathülle vom paramagnetischen "Kern" des Makromoleküls, einzusetzen ist. Nehmen wir an, dass τ_s zwischen $5 \cdot 10^{-11}$ s und $5 \cdot 10^{-10}$ s liegt (vgl. z.B. Ref. 7 und 8), so lässt sich Gl. 8 bei der verwendeten Feldstärke ($\gamma H_0 = 10^8$ s⁻¹) auf Grund der damit näherungsweise erfüllten Ungleichungen

$$\gamma H_0 \ll \frac{1}{\tau_s} \ll \gamma_s H_0 \quad (9)$$

vereinfachen zu⁶

$$\frac{1}{T_1} - \left(\frac{1}{T_1}\right)_0 = \gamma^2 \mu_{\text{eff}}^2 \cdot \frac{16\pi N_I}{75} \frac{1}{aD} \left\{ g\left(\frac{a}{\sqrt{D\tau_s}}\right) + \frac{7}{3} f\left(a\sqrt{\frac{2\gamma_s H_0}{D}}\right) \right\} \quad (10)$$

Die hierbei auftretenden Funktionen

$$g(x) = \frac{2.5}{x^2} \left(1 + \frac{3}{2x^2} \left[1 - x^2 - (1+x)^2 e^{-2x} \right] \right) \quad \text{mit } x = \frac{a}{\sqrt{D\tau_s}} \quad (11)$$

und

$$f(x) = \frac{15}{x^4} \left(\frac{x}{2} - \frac{1}{x} + e^{-x} \left[\left(\frac{x}{2} - \frac{1}{x} \right) \sin x - \left(\frac{x}{2} - 2 - \frac{1}{x} \right) \cos x \right] \right) \quad \text{mit } x = a \sqrt{\frac{2\gamma_s H_0}{D}} \quad (12)$$

sind in Fig. 1 dargestellt, und man erkennt, dass die Abnahme von $1/T_1 - (1/T_1)_0$ für kleine a , d.h., g und f sind konstant, mit $(1/a)$ erfolgt, während bei grossen Abständen $1/T_1 - (1/T_1)_0$ schneller, und zwar mit $(1/a)^3$ kleiner wird.

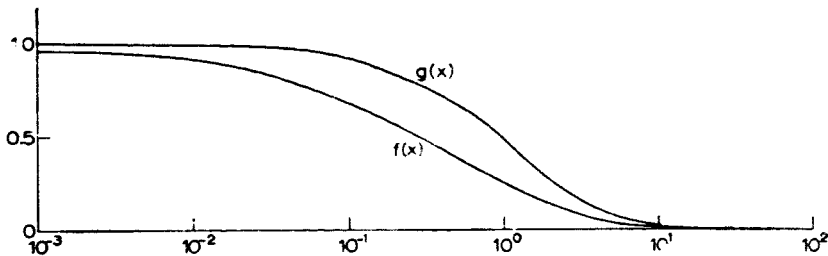


Fig. 1. Die Funktionen $g(x)$ und $f(x)$, vgl. Gl. 11 und 12.

Eine Komplikation entsteht dadurch, dass sich die Gültigkeit der Ausgangsgleichungen 5 und 6 zunächst nur auf Teilchen beschränkt, die sich im S-Zustand befinden und bei denen eine mögliche Aufhebung der S-Entartung durch das kristall-elektrische Feld zu Energiedifferenzen führt, die klein sind gegen die Zeeman-Energien. Bei beliebigen paramagnetischen Teilchen kann man zwar immer $\gamma_s/\hbar \sqrt{S(S+1)}$ formal durch ein effektives magnetisches Moment μ_{eff} ersetzen, das dann definiert ist durch

$$\mu_{\text{eff}}^2 = \frac{\sum_l e^{-\frac{E_l}{kT}} \mu_l^2}{\sum_l e^{-\frac{E_l}{kT}}} \quad (13)$$

wobei μ_l^2 den Erwartungswert des Quadrats des magnetischen Momentoperators für das Teilchen im Zustand der Energie E_l und kT die Boltzmannenergie bezeichnet. Es können aber, wie eine einfache qualitative Überlegung zeigt, auch noch Änderungen in der Form der Feldstärkeabhängigkeit auftreten. Dies wird der Fall sein, wenn die Aufhebung der L-Entartung durch das kristallelektrische Feld zu Aufspaltungen führt, die nicht gross gegen kT sind, und (oder) die Aufspaltungen infolge Aufhebung der S-Entartung nicht gegen die Zeeman-Energien vernachlässigt werden können. Im Gegensatz zum Fe^{3+} -Aquo-komplex zeigt das Eisen im Hämoglobin gerade eine derartig weite Aufspaltung bei Aufhebung der S-Entartung⁷, so dass in dieser Hinsicht für quantitative Auswertungen noch weitere Untersuchungen erforderlich sind. Das effektive magnetische Moment μ_{eff} selbst stimmt auch nur dann mit dem aus dem temperaturabhängigen Anteil der statischen Suszeptibilität berechneten magnetischen Moment μ überein, wenn sich die Energieniveaus des Teilchens in zwei Gruppen einteilen lassen, für die der Energieunterschied zum tiefsten Niveau klein bzw. gross gegen kT ist⁸.

Eine Erweiterung der bisherigen Betrachtungen auf Makromoleküle, bei denen

sich der paramagnetische "Kern" nicht im Zentrum befindet und die eine von der Kugelgestalt abweichende Struktur besitzen, ist näherungsweise (da z.B. die freie Diffusion der Wassermoleküle dann nicht mehr überall gewährleistet zu sein braucht) durch entsprechende Mittelung der resultierenden Relaxationsraten (Gl. 10) möglich. Wenn jedoch der paramagnetische "Kern" eine solche Lage im Molekül einnimmt, dass er in unmittelbarem Kontakt mit dem Milieuwasser steht, d.h. mindestens ein Molekül des Milieuwassers als nächsten Nachbarn besitzt, so wird wegen der Polarität des paramagnetischen "Kerns" für die zugehörigen Protonen $\tau_h > \tau_w$ und die Behandlung hat gemäss Fall 1 zu erfolgen. Hierbei sind aber zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

(a) Der paramagnetische "Kern" befindet sich an der Oberfläche des Moleküls (z.B. Hämin und Hämin-derivate) oder in einer weit offenen Spalte, so dass ein Austausch mit den Protonen des Milieuwassers leicht möglich ist. Es liegen somit analoge Verhältnisse wie bei den Aquokomplexen der paramagnetischen Ionen vor, die zu relativ grossen Relaxationsraten Anlass geben. Entsprechende Untersuchungen an Hand des Manganions⁶ zeigen, dass dann aber in erster Näherung der Translationsanteil in Gl. 1 vernachlässigt werden kann. Dies wiederum hat zur Folge (vgl. Gl. 5), dass die resultierende Relaxationsrate und damit die Zugänglichkeit bei bekanntem τ_c und μ_{eff} ein Mass für die Anzahl der nächsten Nachbarn des paramagnetischen "Kerns" ist, da τ_p im allgemeinen unabhängig von der Molekülgestalt sein wird.

(b) Der paramagnetische "Kern" befindet sich in einer engen Spalte bzw. an der Wand eines Hohlraumes im Molekül, so dass der Austausch mit den Protonen des Milieuwassers behindert ist. Nehmen wir der Einfachheit halber für die Protonen des Spalten-Wassers einen hinreichend schnellen Austausch untereinander und damit eine gemeinsame Relaxationszeit an (analog zum Mikroporenwasser bei Adsorbentien¹⁰), so liegen auch hier zwei Bereiche unterschiedlicher Relaxationszeiten (Spalten- und Milieuwasser) vor, und es gilt eine zu Gl. 1 analoge Gleichung. T_{1H} bzw. τ_h bedeutet dann aber die Relaxationszeit bzw. die Aufenthaltsdauer der Protonen in den Spalten, m die mittlere Anzahl der Wassermoleküle in einer Spalte und $1/T_{1WIT} + (1/T_1)_0$ die Relaxationsrate der Protonen des Milieuwassers. Ob $1/T_{1WIT}$ auch hier vernachlässigbar ist, lässt sich von vornherein nicht abschätzen, da sowohl T_{1H} als auch τ_h bei entsprechender Molekülstruktur relativ grosse Werte annehmen kann.

Insgesamt ergibt sich also die folgende Situation: Für eine quantitative Deutung der eingangs definierten Zugänglichkeit einer prosthetischen Gruppe sind beim gegenwärtigen Stand der Theorie folgende Voraussetzungen nötig:

- (1) Das effektive magnetische Moment μ_{eff} des Teilchens muss gleich dem aus der statischen Suszeptibilität berechenbaren magnetischen Moment μ sein.
- (2) Das paramagnetische Teilchen muss äquidistante Zeeman-Niveaus besitzen.
- (3) Der paramagnetische "Kern" des Teilchens darf kein Molekül des Milieuwassers (oder Protonen, die sich mit denen des Milieuwassers austauschen) als nächsten Nachbarn besitzen.

Ist ausserdem die Elektronenrelaxationszeit τ_e bekannt, so lässt sich mit Hilfe von Gl. 10, die noch entsprechend der Modellvorstellung von der Teilchengestalt über a zu mitteln ist, die Zugänglichkeit exakt berechnen. Bei kleinen Abständen ergibt sich eine Abhängigkeit proportional zu $(1/a)$, bei grossen Abständen hingegen proportional $(1/a)^3$. Aber auch wenn die ersten beiden Voraussetzungen nicht erfüllt

sind, werden sich, wie eine einfache qualitative Überlegung zeigt, kaum wesentliche Abweichungen von Abhängigkeiten der Form $(1/a)^n$ mit $n = 1, \dots, 3$ ergeben.

Wesentlich andere Verhältnisse liegen jedoch vor, wenn die dritte Voraussetzung nicht erfüllt ist. Befindet sich dabei der paramagnetische "Kern" an der Oberfläche des Moleküls oder in einer weit offenen Spalte, so ergeben sich relativ grosse Zugänglichkeiten, die bei konstantem τ_c und μ_{eff} proportional der Anzahl der dem Kern unmittelbar benachbarten Moleküle des Milieuwassers ($m \leq 6$) sind. Sitzt dagegen der paramagnetische "Kern" in einer engen Spalte oder an der Wand eines Hohlraumes im Molekül, so lässt sich die Zugänglichkeit quantitativ nicht mehr auswerten, sondern stellt ein qualitatives Mass für die Behinderung des Austausches der Wassermoleküle in den Spalten (Hohlräumen) mit den Molekülen des ausserhalb befindlichen Milieuwassers dar.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Möglichkeiten einer quantitativen Auswertung von Messungen der kernmagnetischen Relaxation in wässrigen Lösungen paramagnetischer Teilchen untersucht. Der Beitrag dieser Teilchen zur Relaxationsrate der Wasserprotonen ergibt sich proportional zu $\mu_{\text{eff}}^2 \cdot F(a)$. Hierbei bezeichnet μ_{eff} das effektive magnetische Moment des paramagnetischen Teilchens, das im allgemeinen aus dem temperaturabhängigen Anteil der statischen Suszeptibilität berechnet werden kann, und $F(a)$ eine Funktion des minimalen Abstands zwischen dem paramagnetischen "Kern" des Teilchens und den Wasserprotonen. Diese Funktion $F(a)$ lässt sich explizit nur für paramagnetische Teilchen im S-Zustand angeben, deren Zeeman-Niveaus äquidistant sein müssen. Je nach Grösse der Elektronenrelaxationszeit des paramagnetischen Teilchens, der verwendeten Feldstärke und des Diffusionskoeffizienten ergibt sich für unpolare Teilchen eine Abhängigkeit proportional zu $1/a$ bis $1/a^3$.

DANK

Herrn Professor Dr. W. SCHELER, Pharmakologisches Institut der Ernst Moritz Arndt-Universität, Greifswald, danke ich für Hinweise und anregende Diskussionen.

LITERATUR

- ¹ W. SCHELER, *Biochim. Biophys. Acta*, **66** (1963) 424.
- ² J. R. ZIMMERMAN UND W. E. BRITTIN, *J. Phys. Chem.*, **61** (1957) 1328.
- ³ H. PFEIFER, *Ann. Physik*, **8** (1961) 1.
- ⁴ O. J. SAMOILOW, in B. G. TEUBNER, *Die Struktur wässriger Elektrolytlösungen und die Hydratation von Ionen*, 1961, S. 63.
- ⁵ H. S. FRANK UND W. Y. WEN, *Discussions Faraday Soc.*, **24** (1957) 133.
- ⁶ H. PFEIFER, *Z. Naturforsch.*, **17a** (1962) 279.
- ⁷ B. R. MCGARVEY, *J. Phys. Chem.*, **61** (1957) 1232.
- ⁸ A. EHRENBURG, *Arkiv Kemi*, **19** (1926) 119.
- ⁹ J. H. VAN VLECK, *The Theory of Electric and Magnetic Susceptibilities*, Oxford, 1932, S. 180.
- ¹⁰ H. WINKLER, *Z. Naturforsch.*, **16a** (1961) 780.