

## Molare Massen und Molekulargewichte – Wie viel wiegt ein (Makro)Molekül?

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

### Einleitung

Das Molekulargewicht eines Moleküls ist definiert durch die Summe der Gewichte der einzelnen Atome aus denen das Molekül besteht. Der Bezugspunkt für das Gewicht der einzelnen Atome ist das Gewicht des Kohlenstoffisotops  $^{12}\text{C}$ ; eine atomare Masseneinheit ist als zwölfter Teil der Masse des Kohlenstoffisotops  $^{12}\text{C}$  definiert. Definitionsgemäß hat der zwölfte Teil eines Mols des Kohlenstoffisotops  $^{12}\text{C}$  eine Masse von 1 g. Damit sind die Zahlenwerte der relativen Molekülmasse (dimensionslos), absoluten Molekülmasse (in *amu*, *u* oder *Da*; die Einheit *Da* ist benannt nach dem englischen Naturforscher John Dalton) und molaren Masse eines Moleküls (in *g/mol*) gleich.

Masse der atomaren Masseneinheit *u*:  
 $1\text{ u} = 1\text{ Da} = 1,660539040 \cdot 10^{-27}\text{ kg}$

Die Molekulargewichte von Atomen werden im Wesentlichen durch die Anzahl der im Atomkern vorhandenen Protonen und Neutronen bestimmt die eine nahezu identische Masse aufweisen wobei das Proton eine positive Ladung trägt während das Neutron keine Ladung trägt.

Masse eines Protons:  $1,6727 \cdot 10^{-27}\text{ kg}$

Masse eines Neutrons:  $1,6750 \cdot 10^{-27}\text{ kg}$

Die negativ geladenen Elektronen die um den Atomkern kreisen tragen nur einen geringen Beitrag zur gesamten molekularen Masse eines Atoms bei, da ihre Masse um mehrere Größenordnungen kleiner ist als die Masse der Kernbauteile des Atoms.

Masse eines Elektrons:  $9,109 \cdot 10^{-31}\text{ kg}$

### Molekulargewichte von Molekülen

Betrachtet man ein einfaches Molekül wie z. B. ein Wassermolekül ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dann setzt sich das Molekulargewicht dieses Moleküls aus dem Gewicht der beiden Wasserstoffatome zusammen die jeweils aus einem Proton und einem Elektron bestehen sowie dem des Sauerstoffatoms das aus 8 Protonen und 8 Neutronen

sowie 8 Elektronen besteht. Die Gesamtmasse eines Wassermoleküls beträgt daher 18,015 u.

Da das Molekulargewicht eines Moleküls ein sehr kleiner Wert ist multipliziert man die Masse eines einzelnen Moleküls mit der **Avogadro-Zahl** ( $6,022 \cdot 10^{23}$ ), d. h. man berechnet das Gewicht von  $6,022 \cdot 10^{23}$  Teilchen. Diese Menge wird als Mol bezeichnet. Die Masse von einem Mol  $^{12}\text{C}$ -Atomen im Grundzustand entspricht exakt 12 g. Die Molare Masse von Wassermolekülen ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entspricht 18,015 g/mol.

Als historische Verfahren für die Bestimmung der molaren Masse von Atomen und Molekülen sind das **Verfahren nach Bunsen**, das **Verfahren nach Dumas** und **Victor Meyer**, die **Kryoskopie** und **Ebullioskopie** zu nennen.

Heute wird die Molekülmasse im Wesentlichen über die **Massenspektrometrie** bestimmt. Die zu untersuchende Substanz wird im Massenspektrometer in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden durch ein **elektrisches Feld** beschleunigt und dem Analysator zugeführt, der sie nach dem **Masse-zu-Ladungs-Verhältnis** *m/z* sortiert.

### Molekulargewichte von Makromolekülen

Mit Hilfe der Massenspektrometrie kann man die Molekulargewichte von kleinen Molekülen sehr exakt bestimmen.

Problematisch wird es wenn die Moleküle größer werden; ab einem gewissen Molekulargewicht ist es nicht mehr möglich das Molekulargewicht eines kompletten Makromoleküls mit der Massenspektrometrie zu bestimmen.

Als Beispiel für ein Makromolekül kann ein Polystyrolmolekül betrachtet werden. Die Monomereinheit des Polystyrolmoleküls ist das Styrol (Abbildung 1):

Die Molare Masse des Styrols berechnet sich aus seiner chemischen Summenformel  $\text{C}_8\text{H}_8$ ; sie beträgt 104,15 g/mol.

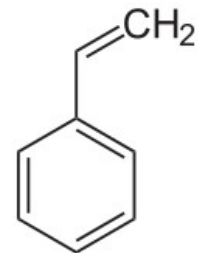


Abb. 1: Styrol

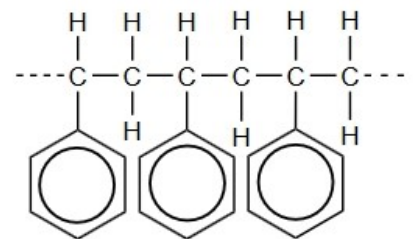


Abb. 2: Strukturformel von Polystyrol

Nimmt man ein Polystyrolmolekül (Abbildung 2) das aus 1000 Monomereinheiten besteht dann beträgt die Molare Masse dieses Moleküls exakt 104150 g/mol.

Die Massenspektrometrie kann ein solches Molekül nicht mehr als Gesamtmolekül in die Gasphase überführen; es kommt unweigerlich zur Fragmentierung des Makromoleküls. Das Molekulargewicht des ursprünglichen Makromoleküls kann daher nicht direkt bestimmt werden; es muss aus den Fragmenten berechnet werden.

Zwar wurden im Laufe der Zeit sehr schonende massenspektrometrische Verfahren wie z. B. MALDI-TOF (**Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung** – Flugzeitanalyse (Time of Flight)) Massenspektrometer entwickelt, aber selbst mit diesen Systemen können nur relativ kleine Makromoleküle bis zu einem Molekulargewicht von einigen tausend g/mol komplett in die Gasphase überführt werden. Ab einer gewissen Größe zerfallen die Moleküle in Bruchstücke was die Analyse des ursprünglichen Moleküls sehr erschwert.

Hinzu kommt die Tatsache, dass es sich bei makromolekularen Proben die ja bekanntlich aus einer größeren Anzahl einer sich wiederholenden Monomereinheit bestehen, in aller Regel nicht um Proben handelt, bei denen alle in der Probe vorhandenen Moleküle dasselbe Molekulargewicht aufweisen. Meist enthält die Probe Moleküle mit unterschiedlichen Kettenlängen bzw. einer unterschiedlichen Anzahl an Monomereinheiten. Man spricht in diesem Fall von einer Verteilungsbreite des Molekulargewichtes oder auch von der so genannten Polydispersität der Probe. Definiert wird der Polydispersitätsfaktor (PD) einer makromolekularen Probe durch den Quotienten aus dem nach dem Gewicht gemittelten Mittleren Molekulargewicht der Probe  $M_w$  (Weight Average Molecular Weight) und dem nach der Anzahl gemittelten Mittleren Molekulargewicht der Probe  $M_n$  (Number Average Molecular Weight):

$$PD = M_w/M_n$$

Es wäre daher wenig sinnvoll, die exakte Masse von jedem einzelnen Makromolekül das in einer makromolekularen Probe vorhanden ist anzugeben; dies würde eine Unmenge an Daten verursachen. Vielmehr summiert man die Molekulargewichte aller in der Probe vorliegenden Makromoleküle auf und bildet dann verschiedene Mittelwerte die das mittlere Molekulargewicht der gesamten makromolekularen Probe beschreiben.

Die mittleren Molekulargewichte einer makromolekularen Probe berechnen sich wie folgt ( $M_i$  ist das Molekulargewicht eines einzelnen Moleküls und  $n_i$  die Anzahl der Moleküle mit diesem Molekulargewicht):

### Number Average ( $M_n$ )

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

### Weight Average ( $M_w$ )

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

### z-Average ( $M_z$ )

$$M_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2}$$

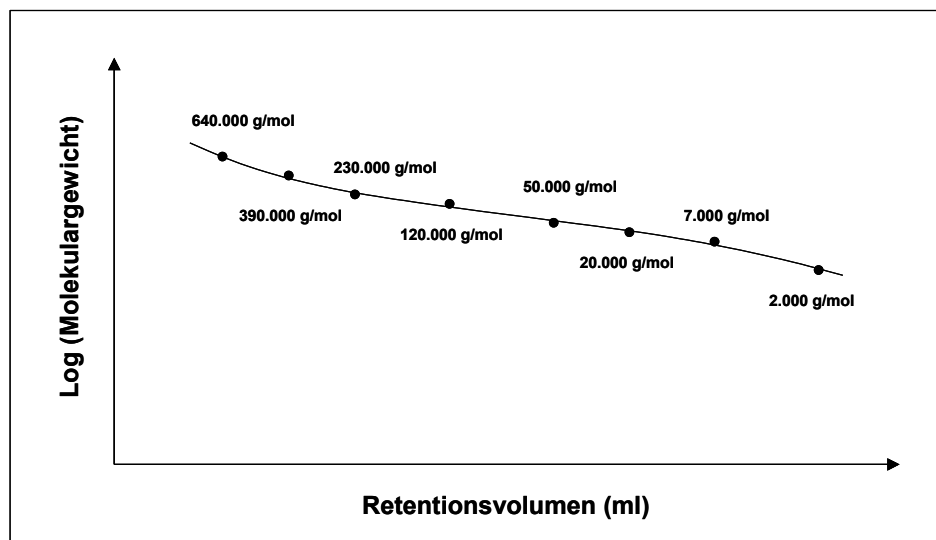


Abb. 3: Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems mit eng verteilten Polymerstandards

Der  $M_z$ -Wert ist der so genannte Zentrifugen-Mittelwert, der aus Bestimmungen des Molekulargewichtes mittels einer Ultrazentrifuge erhalten wird.

Der  $M_n$ -Wert wird stark von den niedermolekularen Anteilen einer makromolekularen Probe beeinflusst, wohingegen der  $M_z$ -Wert von den hochmolekularen Anteilen abhängt.

Die Molekulargewichtsmittelwerte einer Probe können sich je nach Verteilungsbreite der Probe stark unterscheiden. Im Fall von synthetischen Polymeren wie z. B. Polystyrol und Polyethylen, die über exakt kontrollierbare chemische Reaktionen gezielt hergestellt werden, können Verteilungsbreiten bzw. Polydispersitätsfaktoren von weniger als 1,1 erreicht werden. Natürliche Makromoleküle wie z. B. Polysaccharide (Dextrane, Alginate, Hyaluronsäure, o.ä.) weisen oft Polydispersitätsfaktoren von zwei und mehr auf. Lediglich biologische Makromoleküle wie z. B. Proteine und Antikörper weisen einen Polydispersitätsfaktor von 1,0 auf; man spricht hier von monodispersen oder uniformen Molekulargewichtverteilungen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass jedes Proteinmolekül einer bestimmten Spezies aus einer genau definierten Abfolge an Aminosäuren besteht. Dadurch ist sein Molekulargewicht exakt festgelegt.

Für die Bestimmung der Molaren Masse von Makromolekülen wird neben der **Massenspektrometrie** oft die Gelpermeationschromatographie / Größenausschlusschromatographie (GPC/SEC) sowie die **Feld-Fluss-Fraktionierung** (FFF) verwendet. Im Fall der GPC/SEC wird die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und über eine stationäre Phase nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Fall der FFF erfolgt die Trennung in einem Trennkanal; als Trennfeld wird z.B. ein Querfluss verwendet der in 90°-Richtung zum Elutionsfluss angelegt wird. Als Beispiel wäre die Auftrennung

von Polystyrolmolekülen zu nennen, die in Tetrahydrofuran gelöst werden. Die Polystyrolmoleküle werden im Fall der GPC/SEC über eine stationäre Phase, bestehend aus stark quervernetztem Styrol-Divinylbenzol (SDV), oder, im Fall der FFF, über einen analytischen FFF-Trennkanal mit einer Membran aus regenerierter Cellulose aufgetrennt.

Im einfachsten Fall wird bei der Gelpermeationschromatographie und der Feld-Fluss-Fraktionierung nur ein Konzentrationsdetektor verwendet. Um das Signal des Konzentrationsdetektors in eine Masseninformation umrechnen zu können muss eine Kalibrierung des GPC/SEC- bzw. FFF-Systems mit eng verteilten Polymerstandards mit bekanntem Molekulargewicht durchgeführt werden (Abbildung 3).

Nun kann für die Probe an jedem Punkt des Elutionsvolumens ein entsprechendes Molekulargewicht ermittelt werden. Ein präzises Ergebnis würde nun das Molekulargewicht an jedem Punkt des Elutionsvolumens in tabellarischer Form wiedergeben, dies wären aber zu viele Daten, daher werden die Molekulargewichte zu den bereits beschriebenen Mittelwerten  $M_n$ ,  $M_w$  und  $M_z$  zusammengefasst bzw. es wird im einfachsten Fall nur der Wert des Molekulargewichts am Peak Maximum angegeben ( $M_p$ ).

Abbildung 4 zeigt grafisch die Molekulargewichtsmittelwerte; je stärker das Molekulargewicht in den Mittelwertberechnungen berücksichtigt wird, umso mehr verschiebt sich der Mittelwert hin zu höheren Molekulargewichtswerten. Der Wert für das Peak-Molekulargewicht  $M_p$  beschreibt nur das an der Peakspitze vorliegende Molekulargewicht.

Die mit dieser Methode ermittelten Molekulargewichte sind allerdings nur dann korrekt bzw.

absolut, wenn die gemessene Probe chemisch und in Ihrer Struktur identisch mit den linearen Polymerstandards ist, die für die Erstellung der Kalibrierkurve verwendet wurden (z. B. lineare Polystyrolstandards für die Kalibrierung und lineare Polystyrolprobe). Sobald Probe und Standards chemisch nicht identisch sind oder die Probe Verzweigungen enthält, erhält man nur relative Ergebnisse für das Molekulargewicht der Probe.

Absolute Molekulargewichte erhält man, wenn das GPC/SEC- bzw. FFF-System zusätzlich zum Konzentrationsdetektor mit einem statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS) ausgestattet ist.

#### Bestimmung von absoluten Molekulargewichte mit der Statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS)

Verwendet man bei der Gelpermeationschromatographie und der Feld-Fluss-Fraktionierung zusätzlich zu einem Konzentrationsdetektor auch noch einen Statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS = Static Multi Angle Laser Light Scattering), dann kann unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Probe das absolute Molekulargewicht der Probe bestimmt werden.

Das Signal eines MALS-Detektors ist direkt proportional zum dem nach dem Gewicht gemittelten Molekulargewicht  $M_w$  einer makromolekularen Probe (Gleichung 1):

$$\text{Fläche des Lichtstreusignals} = \text{Gerätekonstante} \cdot \text{Konzentration} \cdot (dn/dc)^2 \cdot M_w \quad [1]$$

Sind die Konzentration und das Brechungsindexinkrement  $dn/dc$  einer Probe bekannt, dann kann man mit einem MALS-Detektor das absolute, also wirklich vorhandene, Molekulargewicht bestimmen. Den  $dn/dc$ -Wert einer Probe erhält man, indem der Brechungsindex einer Probe über deren Konzentration aufgetragen wird. Eine der beiden Größen – Konzentration oder  $dn/dc$  – kann aus dem gleichzeitig verwendeten Brechungsindexdetektor bestimmt werden.

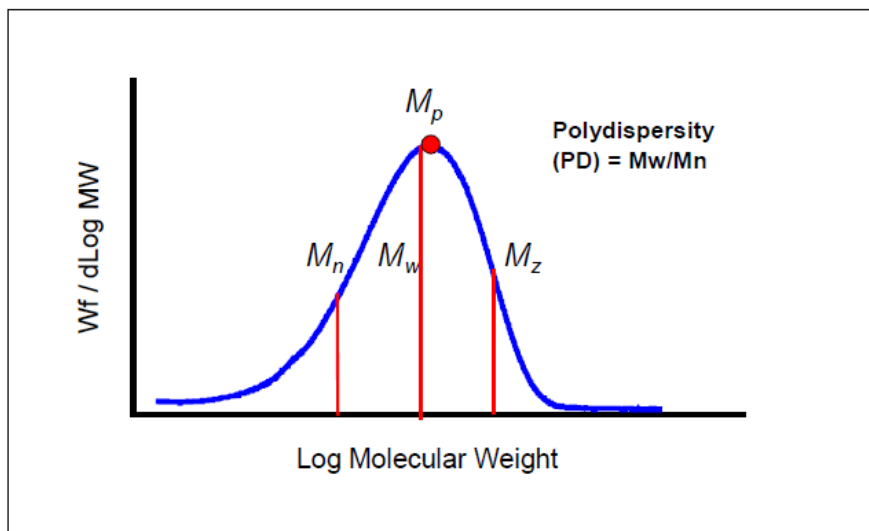


Abb. 4: Molekulargewichtsmittelwerte einer breit verteilten makromolekularen Probe

#### Fazit

Das Molekulargewicht von kleinen Molekülen kann sehr exakt mit der Massenspektrometrie bestimmt werden. Ab einem gewissen Molekulargewicht versagt diese Methode allerdings, da große Moleküle nicht mehr als Ganzes in die Gasphase überführt werden können, ohne in Fragmente zu zerbrechen. Nun müssen andere Methoden verwendet werden, die die Makromoleküle in Lösung charakterisieren können. Hier haben sich die Gelpermeationschromatographie und die Feld-Fluss-Fraktionierung etabliert. Mit dieser Methode können Molekulargewichte von makromolekularen Proben schnell und reproduzierbar ermittelt werden.

Da eine makromolekulare Probe in der Regel aus einer Vielzahl an Einzelmolekülen mit unterschiedlichen Kettenlängen bzw. einer unterschiedlichen Anzahl von Monomereinheiten besteht, werden bei dieser Art von Proben keine diskreten Molekulargewichte angegeben, sondern es wird das Molekulargewicht aller in der Probe vorliegenden Einzelmoleküle aufsummiert und mit Hilfe von statistischen Mittelwerten beschrieben.

Wird bei der GPC/SEC und der FFF neben einem Konzentrationsdetektor auch ein statischer Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS) verwendet, dann können nicht nur relative Molekulargewichte sondern tatsächlich vorhandene, absolute Molekulargewichte ermittelt werden.