



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 15 731 B4** 2004.09.23

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **102 15 731.6**
 (22) Anmeldetag: **05.04.2002**
 (43) Offenlegungstag: **30.10.2003**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **23.09.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 27/26**
G01N 21/35, G01N 21/55

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
**Institut für Polymerforschung Dresden e.V., 01069
 Dresden, DE**

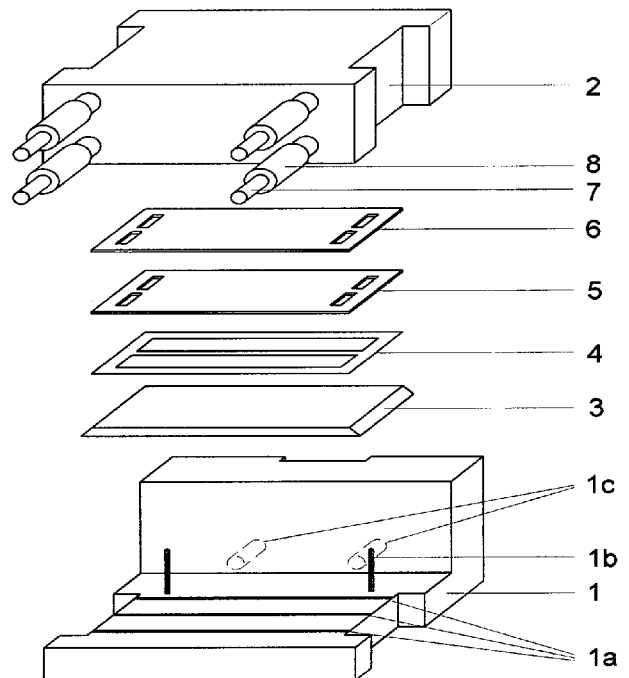
(74) Vertreter:
Patentanwälte Rauschenbach, 01187 Dresden

(72) Erfinder:
**Zimmermann, Ralf, 01728 Bannewitz, DE; Werner,
 Carsten, Dr., 01069 Dresden, DE; Müller, Martin,
 Dr., 01277 Dresden, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
DE 43 45 152 A1
DD 2 22 692 A1
GB 23 68 904 A
US 61 09 098 A
Patent Abstracts of Japan JP 5-312757 A;

(54) Bezeichnung: **Messzelle und Verfahren zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie**

(57) Hauptanspruch: Messzelle zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie, bestehend aus einem geteilten Grundkörper (1,2), auf dessen Unterteil (1) ein ATR-Kristall (3) positioniert ist, auf dessen Oberseite, die mit einer Probe ganz oder teilweise beschichtet sein kann, eine elektrisch nichtleitende Folie (4) mit zwei geometrisch gleich ausgebildeten Aussparungen, die zwei Strömungskanäle bilden, dichtend aufgelegt ist und darauf eine Abdeckplatte (5) positioniert wird, die mindestens auf der den Strömungskanälen zugewandten Fläche mit einer Probe ganz oder teilweise beschichtet sein kann, die mindestens zwei Öffnungen zu jeder der beiden Aussparungen der Folie (4) aufweist, wobei die Öffnungen jeweils an den Enden der maximalen Abmessung der Aussparungen angeordnet sind, wodurch ein Zu- und Ablauf von Flüssigkeit zu den von dem ATR-Kristall (3), der Folie (4) und der Abdeckplatte (5) gebildeten parallelen Strömungskanälen realisiert ist, und diese Anordnung dichtend von dem Oberteil (2) des Grundkörpers geschlossen wird,...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der physikalischen Chemie und des Gerätebaus und betrifft eine Messzelle und ein Verfahren zur Durchführung von Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen zur Bestimmung des Zeta-Potentials und zur Ermittlung von Daten mit der ATR-FTIR-Spektroskopie. Durch die Anwendung des Verfahrens in Verbindung mit der Messzelle sind verbesserte und umfangreichere Aussagen über die Verhältnisse an der Grenzfläche einer festen Probe zu einem flüssigen Medium möglich.

[0002] Bisher sind Messzellen bekannt (DE 43 45 152 A1, DD 222 692 A1), mit denen das Zeta-Potential von platten- oder folienförmigen Materialien, z.B. Flachmembranen, bestimmt werden kann.

[0003] Aus EP 1 040 344 B1 ist weiterhin eine Messzelle bekannt, mit deren Hilfe das Zeta-Potential und die Grenzflächenleitfähigkeit von Proben, die in Form dünner Schichten auf die Probenträger der Messzelle aufgebracht werden, bestimmt werden können. Bei diesen Zellen wird ein von zwei Proben gebildeter rechteckiger Kanal von einer Elektrolytlösung durchströmt. Das Strömungspotential und/oder der Strömungsstrom werden dabei in Abhängigkeit vom Differenzdruck über dem Kanal gemessen. Das Zeta-Potential und/oder die Grenzflächenleitfähigkeit wird aus den Daten der Messungen über bekannte Gleichungen ermittelt.

[0004] Weiterhin ist in JP 5-312 757 A eine Messzelle zur zerstörungsfreien Bestimmung des Zeta-Potentials von Planaren Oberflächen angegeben. Die Zelle kann hierzu auf die zu untersuchende Oberfläche aufgesetzt werden. Die Bestimmung des Zeta-Potentials erfolgt durch Anlegen einer Spannung an zwei Elektroden, die auf beiden Seiten des Kanals angeordnet sind, und Messung des elektroosmotischen Volumenstromes.

[0005] Aus der US 6,109,098 A ist ein Gerät zur Bestimmung des Zeta-Potentials und der Größe von dispergierten Festkörperpartikeln bekannt. Die Bestimmung des Zetapotentials und der Partikelgröße erfolgt dabei durch Schwingungsanregung der dispergierten Partikel und Messung und Auswertung der daraus resultierenden elektroakustischen Phänomene.

[0006] Ebenfalls ist nach der GB 2 368 904 A eine Apparatur zur Bestimmung des Zeta-Potentials, der elektrophoretischen Beweglichkeit und/oder Zahlen von einem oder mehreren dispergierten Partikeln bekannt. Zur Bestimmung dieser Größen wird die Beweglichkeit der Partikel in einem elektrischen Wechselfeld mittels Laserdoppleranemometrie detektiert.

[0007] Bisher sind unterschiedliche Messapparaturen bekannt, mit denen in-situ-ATR-FTIR-Spektroskopie an Substraten betrieben werden kann. Es sind kommerziell erhältliche ATR-FTIR-Messapparaturen der Firma OPTISPEC, Zürich, die auf einem kommerziell erhältlichen FTIR-Spektromete (Bruker Optik

GmbH, Ettlingen) betrieben werden können, bekannt. Zur Anwendung kommen dabei trapezoidale Modellkristalle ($50 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$) aus Si, Ge oder Zn-Se, die in Kontakt mit Lösungen oder Dispersionen der zu untersuchenden oberflächenaktiven Substanzen gebracht werden oder mit Filmen aus diesen Substanzen beschichtet werden. ATR-FTIR-Spektren werden dabei mit einem Pseudo-Zweistrahilverfahren (SBSR, Single Beam Sample Reference) gemessen (U.P. Fringeli, in 'Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry', J.C. Lindon, G.E. Tranter, J.L. Holmes (eds), Academic Press (2000) S. 58 – 75).

[0008] Durch die Bestimmung des Zeta-Potentials können Informationen über die Art des Ladungsbildungsprozesses an der Phasengrenze zwischen einer Festkörperoberfläche (Probe) und einer angrenzenden flüssigen Phase, i.a. wässrige Elektrolytlösungen, gewonnen werden. Da Adsorptions-, Desorptions- und Strukturänderungsprozesse an fest/flüssig Phasengrenzen häufig mit einer Änderung des Ladungszustandes an der Phasengrenze verbunden sind, können diese über die Bestimmung des Zeta-Potentials detektiert werden. Dabei können bereits sehr geringe Konzentrationen einer im flüssigen Medium gelösten Substanz (z.B. 10 ng/ml Fibrinogen), die an der Festkörperoberfläche adsorbiert wird, über die Änderung des Zeta-Potentials beim Adsorptionsprozess nachgewiesen werden.

[0009] Die Bestimmung des Zeta-Potentials von planaren Proben ist durch Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen an einem von den Proben gebildeten Kapillarsystem möglich. Das Strömungspotential- und der Strömungsstrom werden hierzu in Abhängigkeit vom Differenzdruck über dem Kapillarsystem gemessen. Weiterhin werden die spezifische elektrische Leitfähigkeit, der pH-Wert und/oder die Ionenkonzentration sowie die Temperatur der flüssigen Phase erfasst. Das Zeta-Potential wird aus diesen Größen und den Abmessungen des Kapillarsystems über bekannte Gleichungen berechnet. Durch die Wiederholung der Messungen bei verschiedenen Lösungseigenschaften (variiertes pH-Wert und/oder variierte Ionenkonzentration) sind Rückschlüsse auf die Ladungsbildungsprozesse an der Probenoberfläche möglich.

[0010] Mit Hilfe der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie unter-Verwendung des Prinzips der abgeschwächten Totalreflexion (FTIR-ATR) können Adsorptionsprozesse insbesondere von synthetischen und natürlichen Polymeren an flüssig/fest-Grenzflächen und die beim Adsorptionsprozess gebildeten Schichten auf molekularer Ebene und in-situ untersucht werden. Dabei tritt eine sich an der Grenzfläche zwischen dem optisch dickeren und dünneren Material ausbildende evaneszente Welle in Wechselwirkung mit dem zu untersuchenden organischen Material und die dadurch abgeschwächte Intensität wird am Detektor registriert. (N. J. Harrick, Internal Reflection Spectroscopy, John Wiley & Sons, New York

(1967) und dort zitierte Literaturstellen). Durch Anwendung eines Messverfahrens (U.P. Fringeli, in 'Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry', J.C. Lindon, G.E. Tranter, J.L. Holmes (eds), Academic Press (2000) S. 58 – 75), bei dem Intensitätsspektren an einer Proben- und einer Referenzhälfte eines Siliziumkristalls gemessen werden, werden ATR-Infrarot-Spektren mit angemessener spektroskopischer Kompensation der meist starken Lösungsmittelbanden (z.B. der von Wasser) erzeugt. Dabei befindet sich über der Probenhälfte Lösung mit adsorbierender Substanz und über der Referenzhälfte das Lösungsmittel. Aus den ATR-FTIR-Spektren können genaue Informationen über die Menge, Struktur und den Ladungszustand adsorbierter Substanzen, insbesondere von Polyelektrolyten und Proteinen, über deren stark absorbierende funktionelle Gruppen entnommen werden. Damit kann beispielsweise zur Aufklärung des Verhaltens von (Bio)-Polymeren an Grenzflächen beigetragen werden.

Aufgabenstellung

[0011] Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Angabe einer Messzelle und eines Verfahrens, mit deren Hilfe an einer Probe, vorteilhafterweise simultan, sowohl das Zeta-Potential bestimmt als auch Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie ermittelt werden können.

[0012] Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen 1 und 14 angegebene Erfindung gelöst. Weiterbildungen sind Gegenstand der Unteransprüche.

[0013] Die erfindungsgemäße Messzelle zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie besteht aus einem geteilten Grundkörper. Auf dessen Unterteil (1), ist ein ATR-Kristall positioniert, der ebenfalls vorteilhafterweise trapezoid ausgebildet ist und aus einem hochbrechenden Material, wie z.B. Silizium, Germanium oder Zinkselenid, besteht. Auf dessen Oberseite, die mit einer Probe ganz oder teilweise beschichtet sein kann, ist eine elektrisch nichtleitende Folie, vorteilhafterweise eine Polymerfolie, z.B. aus Polytetrafluorethylen, die mit zwei geometrisch gleich ausgebildeten Aussparungen versehen ist, dichtend aufgelegt. Die Aussparungen bilden die zwei Strömungskanäle und sind vorteilhafterweise rechteckig. Auf der Folie ist eine Abdeckplatte positioniert, die vorteilhafterweise aus dem gleichen Material wie der ATR-Kristall besteht und ebenfalls auf mindestens den Strömungskanälen zugewandten Seite ganz oder teilweise mit einer Probe beschichtet sein kann, wobei die Probe vorteilhafterweise gleich der Probe auf dem ATR-Kristall ist. Weiterhin besteht die Folie vorteilhafterweise aus einem Material, welches ohne weitere Zusätze und Handlungen eine Dichtwirkung gegenüber dem ATR-Kristall und/oder der Abdeckplatte ausübt. Der ATR-Kristall bildet zusammen mit der Folie und der Abdeckplatte zwei pa-

rallele Strömungskanäle, wobei der Geometriefaktor der Kanäle (Verhältnis von Länge zu Querschnittsfläche) durch die Abmessungen der Aussparungen in der Folie definiert wird. Die Abdeckplatte weist mindestens zwei Öffnungen zu jeder der beiden Aussparungen der Folie auf, wobei die Öffnungen jeweils an den Enden der maximalen Abmessung der Aussparungen angeordnet sind. Dadurch ist ein Zu- und Abfluss von Flüssigkeit zu/von den Strömungskanälen realisiert. Diese Anordnung wird dichtend vom Oberteil des Grundkörpers geschlossen, wobei durch den Grundkörper ein Flüssigkeitszu- und -abfluss zu/von den Strömungskanälen realisiert ist. Weiterhin sind mindestens vier Elektroden, die in die Flüssigkeitszuführungen zu den Strömungskanälen und die Flüssigkeitsabführungen von den Strömungskanälen integriert sind, vorhanden. Die Elektroden sind vorteilhafterweise als Röhrenelektroden ausgebildet, so dass durch sie gleichzeitig der Flüssigkeitszu- und -abfluss realisiert ist. Ebenfalls sind in dem Grundkörper Elemente angeordnet, über die mindestens ein Lichtstrahl von außerhalb des Grundkörpers in den ATR-Kristall ein- und aus dem ATR-Kristall ausgekoppelt werden kann. Das eingesetzte Material ist dabei in dem für die Messungen verwendeten Spektralbereich ausreichend transparent.

[0014] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die beiden Teile des Grundkörpers so ausgeführt, dass der Lichtstrahl direkt in den ATR-Kristall ein- und aus dem ATR-Kristall ausgekoppelt werden kann. Dann ist keine separate Zu- und Abführung für den Lichtstrahl erforderlich.

[0015] Der ATR-Kristall wird in der Zelle mit der von den beiden Strömungskanälen abgewandten Seite vorteilhafterweise auf Auflageelementen gelagert. Dadurch kann das evaneszente Feld des im ATR-Kristall geführten Lichtstrahles vorteilhafterweise weder mit den Auflageelementen noch mit dem Grundkörper Wechselwirkungen.

[0016] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie in der erfindungsgemäßen Messzelle wird eine Messlösung durch die Zuführungen in beide Strömungskanäle geleitet und über die Abführungen abgeleitet. Dabei dient ein Strömungskanal als Referenzkanal für die ATR-FTIR-Messung, wobei die wellenzahlabhängige Intensität des abgeführten Lichtstrahls ($I_0(\tilde{\nu})$) im FTIR-Spektrometer erfasst wird. An dem anderen Strömungskanal (Mess-Strömungskanal) werden Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen zur Bestimmung des Zeta-Potentials durchgeführt und ebenfalls in diesem Strömungskanal wird durch Einkopplung eines Lichtstrahles in den ATR-Kristall und Detektion der wellenzahlabhängigen Intensität des aus dem Kristall austretenden Lichtstrahles ($I(\tilde{\nu})$) im FTIR-Spektrometer die ATR-FTIR-Messung realisiert. Im Kreislauf des Mess-Strömungskanals können ausserdem der

pH-Wert, die Temperatur und die spezifische elektrische Leitfähigkeit der Messlösung erfasst werden. Aus Strömungspotential und Strömungsstrom, den Abmessungen des Strömungskanals und den Lösungsparametern Leitfähigkeit und Temperatur wird das Zeta-Potential über bekannte Gleichungen berechnet. $I(\tilde{\nu})$ und $I_0(\tilde{\nu})$ werden nach $A(\tilde{\nu}) = \log(I/I_0)$ in Absorbanzspektren $A(\tilde{\nu})$ umgewandelt.

[0017] Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Messung des Strömungsstromes und des Strömungspotentials simultan mit der ATR-FTIR-Messung durchgeführt wird.

[0018] Die zu untersuchenden Materialien, z.B. dünne Polymerfilme, werden vor der Montage der Zelle vorteilhafterweise auf die dem Strömungskanal zugewandten Seiten des ATR-Kristalls und der Abdeckplatte aufgebracht. Adsorptionsexperimente können jedoch auch direkt an der Oberfläche der Probenträger (ATR-Kristall und Abdeckplatte) durchgeführt werden. Bei der Durchführung von Adsorptionsexperimenten werden die betreffenden Substanzen (z.B. Polyelektrolyte) über die Messlösung in den Mess-Strömungskanal der Zelle eingebracht.

[0019] Durch die erfindungsgemäß simultane Anwendung der oberflächensensitiven Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und der ATR-FTIR-Spektroskopie für die Untersuchung von Grenzflächenprozessen können adsorptions- oder medienbedingten Änderungen des Zeta-Potentials mit dem entsprechenden Auftreten oder Änderungen der Intensität/Wellenzahl von IR-Banden relevanter funktioneller Gruppen korreliert werden. Es können durch die erfindungsgemäße Messzelle und das erfindungsgemäße Verfahren die quantifizierten Oberflächenladungen (Vorzeichen und Ladungsdichte) aus der Zeta-Potential-Bestimmung den oberflächengebundenen Ladungsträgern (Art und Konzentration) aus den ATR-FTIR-Messungen auf molekularer Ebene zugeordnet werden. Dabei kommen als zu untersuchende Materialien im besonderen adsorbierte Polyelektrolyte, Proteine und deren dissoziierte Säure- oder protonierte Amingruppen und auch niedermolekulare Ionen in Betracht.

[0020] Besonders vorteilhaft kann das Verfahren in Verbindung mit der erfindungsgemäßen Messzelle zur Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit biomedizinisch relevanten Oberflächen oder von Polyelektrolyten mit nasschemisch zu modifizierenden Substraten eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiel

[0021] Die erfindungsgemäße Lösung wird an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Dabei zeigt **Fig. 1** den prinzipiellen Aufbau der erfindungsgemäßen Messzelle.

Ausführungsbeispiel für die Messzelle

[0022] Die Messzelle besteht aus einem geteilten

Grundkörper **1, 2** aus Plexiglas, der als Halterung für die Probenträger dient. Als Probenträger werden ein trapezoider ATR-Kristall **3** aus Silizium (Größe: $50 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$) und eine Abdeckplatte **5** aus Silizium (Größe: $48 \times 20 \times 0,5 \text{ mm}^3$) verwendet. Zwischen dem ATR-Kristall **3** und der Abdeckplatte **5** ist eine Folie **4** aus Polytetrafluorethylen (Größe: $48 \times 20 \times 0,05 \text{ mm}^3$), die mit zwei rechteckigen Aussparungen der Größe $42 \times 6 \text{ mm}^2$ versehen ist, angeordnet. Durch die beiden Aussparungen werden zwei parallele Strömungskanäle gebildet. Die Zu- und Abführung der Messlösung zu/von den beiden Strömungskanälen erfolgt über vier rechteckige Aussparungen ($6 \times 2 \text{ mm}^2$) in der Abdeckplatte **5** sowie Kanäle im Grundkörperoberteil **2**. Die Kontaktfläche zwischen der Rückseite der Abdeckplatte **5** und dem Grundkörperoberteil **2** wird durch eine Flachdichtung aus Silikon **6** nach außen abgedichtet. Die Flüssigkeitzu- und Flüssigkeitsabführung der Messlösung zur/von der Messzelle erfolgt über Silberröhrchen **7**, die über Halterungen **8** und O-Ringe im Grundkörperoberteil **2** fixiert sind, wobei die O-Ringe gleichzeitig zur Abdichtung der Zelle nach außen dienen. Die Silberröhrchen **7** sind auf der Innenseite mit einer Ag-Cl-Schicht versehen, so dass diese als Elektroden zur Messung des Strömungspotentials und Strömungsstromes genutzt werden. Der ATR-Kristall **3** wird auf dem Grundkörperunterteil **1** auf drei aus Rundschar bestehenden Auflageelementen **1a** gelagert. Die Auflageelemente **1a** sind so angeordnet, dass das evaneszente Feld eines im ATR-Kristall **3** im Bereich der Strömungskanäle geführten Lichtstrahles weder mit den Auflageelementen **1a** noch mit dem Grundkörperunterteil **1** wechselwirken kann. Über zwei Bohrungen **1c** im Grundkörperunterteil **1** wird die Messzelle im FTIR-Spektrometer fixiert.

[0023] Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Verbindung mit der erfindungsgemäßen Messzelle zur Untersuchung der Adsorption des Plasmaproteins Fibrinogen (FGN) an Silizium angewendet. Zur Durchführung des Experiments werden der unbeschichtete ATR-Kristall **3** und die unbeschichtete Abdeckplatte **5**, die als Probenträger dienen, verwendet. Der ATR-Kristall **3** und die Abdeckplatte **5** werden vor den Messungen zur Reinigung für zwei Stunden in eine Lösung aus H_2SO_4 und N_2O_2 (Verhältnis: 2:1) gelegt. Anschließend werden der ATR-Kristall **3** und die Abdeckplatte **5** mit deionisiertem Wasser abgespült und mit Stickstoff trockengeblasen. Der gereinigte ATR-Kristall **3** und die gereinigte Abdeckplatte **5** werden in die Messzelle eingebaut.

[0024] Für die Durchführung der optischen Messungen (Aufzeichnung der IR-Spektren) wird ein FTIR-Spektrometer vom Typ IFS 28 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) in Verbindung mit einem ATR-Spiegelsatz (OPTISPEC, Zürich) verwendet. Der Spiegelsatz wird zusammen mit der Messzelle im Probenraum des Spektrometers positioniert. Der Mess-Strömungskanal der Zelle wird mit dem Flüssigkeitssystem eines elektrokinetischen Messsystems, mit dem

Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen in Abhängigkeit von den Lösungseigenschaften (Konzentration, pH-Wert) durchgeführt werden können, verbunden. Der Referenzkanal der Zelle wird an einen separaten Kreislauf, in dem Lösung von einer Schlauchpumpe umgepumpt werden kann, angeschlossen.

[0025] Im ersten Schritt des Versuchsablaufes wird der Ladungsbildungsprozess an der Siliziumoberfläche durch die Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Zeta-Potentials untersucht. Als Messlösung wird eine 10^{-2} M KCl-Lösung verwendet, deren pH-Wert im Bereich zwischen $\text{pH} = 2$ und $\text{pH} = 10$ durch Zugabe von 0,1 M KOH/HCl eingestellt wird. Bei variiertem Druck über dem Strömungskanal (0,1 kPa bis 20 kPa) werden zu jedem pH-Wert das Strömungspotential und der Strömungsstrom sowie die spezifische elektrische Leitfähigkeit und die Temperatur der Elektrolytlösung gemessen. Aus den Daten der Messungen wird das Zeta-Potential über bekannte Gleichungen berechnet (Ergebnisse siehe **Fig. 2**).

[0026] Aus dem Verlauf des Zeta-Potentials sowie der Lage des isoelektrischen Punktes bei $\text{pH} = 2,9$ konnte abgeleitet werden, dass die Ladungsbildung an der Probenoberfläche aus der Dissoziation von SiOH-Gruppen resultiert. Bei pH-Werten größer $\text{pH} = 2,9$ liegt dabei aufgrund der Dissoziation der SiOH-Gruppen eine negative Grenzflächenladung vor.

[0027] Im zweiten Schritt des Versuchsablaufes wird die Kinetik der Adsorption von Fibrinogen an der Probenoberfläche (Silizium) untersucht. Das Flüssigkeitssystem der elektrokinetischen Messsystems wird hierzu mit 400 ml einer verdünnten PBS-Pufferlösung (Verdünnung mit deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:9, $\text{pH} = 7,4$) gefüllt. Der an den Referenzkanal angeschlossene Kreislauf wird mit der gleichen Lösung gefüllt.

[0028] Der Strömungspotential- und Strömungsstrom-Druck-Gradient sowie die Temperatur und die spezifische elektrische Leitfähigkeit werden in Abhängigkeit von der Messzeit erfaßt. Aus den Daten der elektrokinetischen Messungen wird das Zeta-Potential berechnet. Mittels ATR-FTIR-Spektroskopie werden simultan mit den elektrokinetischen Messungen Absorbanzspektren im Wellenzahlbereich zwischen $\tilde{\nu} = 4000 \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} = 400 \text{ cm}^{-1}$ aufgezeichnet.

[0029] Nach einer Zeit von 38 min wird bei laufender Messung Fibrinogen in das Flüssigkeitssystem gegeben, so dass sich eine Lösungskonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ergibt. Zum Zeitpunkt $t = 180 \text{ min}$ wird die Lösungskonzentration an Fibrinogen auf 1 $\mu\text{g/ml}$ erhöht. Die Ergebnisse der Messungen sind in **Fig. 3** und **4** dargestellt.

[0030] Anhand des Verlaufs des Zeta-Potentials (**Fig. 3**) ist zu erkennen, dass sich die Ladungsverhältnisse an der Phasengrenze durch die Adsorption von Fibrinogen bis zu einer Zeit von $t = 150 \text{ min}$ ändern. Aus den in **Fig. 4** dargestellten Flächen der proteindiagnostischen Amid-I- und Amid-II-Banden geht dagegen hervor, dass die adsorbierte Menge an Fibrinogen auch noch nach dem Erreichen konstanter Ladungsverhältnisse zunimmt. Aus dem Unterschied zwischen den simultan bestimmten Adsorptionskurven lässt sich ableiten, dass zur Zeit $t = 150 \text{ min}$ eine vollständige Bedeckung der Oberfläche des ATR-Kristalls **3** und der Abdeckplatte **5** in den Strömungskanälen mit Fibrinogen erreicht wird und somit die weitere Adsorption von Fibrinogen aus der Lösung zum Aufbau von Multischichten mit konstanter Oberflächenladung führt. Da nach der Erhöhung der Fibrinogenkonzentration auf 1 $\mu\text{g/ml}$ ebenfalls keine Veränderung des Zeta-Potentials aufgetreten ist, wird durch diesen Teilschritt die zum Schichtaufbau getroffene Aussage bestätigt.

[0031] Im dritten Schritt des Versuchsablaufes wird der isoelektrische Punkt (IEP) der Oberfläche des ATR-Kristalls **3** und der Abdeckplatte **5** nach der Adsorption von Fibrinogen bestimmt. Hierzu wird der unter dem ersten Versuchsschritt angegebene Ablauf wiederholt. Simultan dazu werden ATR-FTIR-Absorbanzspektren aufgezeichnet.

[0032] Die Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Zeta-Potentials und die aus den ATR-FTIR-Absorbanzspektren ermittelte relative Änderung der $\nu(\text{COO}^-)$ -Bande (in % bezogen auf Anfangswert) sind in **Fig. 5** dargestellt. Für die Oberfläche des ATR-Kristalls **3** und der Abdeckplatte **5** wurde nach dem Adsorptionsexperiment (zweiter Versuchsschritt) ein isoelektrischer Punkt von $\text{pH}_{\text{IEP}} = 5,4$ ermittelt. Der für die Oberflächen gefundene isoelektrische Punkt stimmt mit dem für Fibrinogen in Lösung bekannten isoelektrischen Punkt überein und kann somit als Bestätigung der im zweiten Versuchsschritt gefundenen vollständigen Bedeckung der Oberfläche des ATR-Kristalls **3** und der Abdeckplatte **5** im Strömungskanal mit Fibrinogen gewertet werden. Das bei pH-Werten kleiner 5,4 gefundene positive Zeta-Potential kann auf einen Überschuss von protonierten Aminogruppen in der Fibrinogenschicht zurückgeführt werden. Bei pH-Werten größer 5,4 liegt dagegen ein Überschuss an deprotonierten Carboxylgruppen in der Fibrinogenschicht vor, so dass die Grenzfläche in diesem pH-Bereich negativ geladen ist. Diese Änderung der Grenzflächenladung im Bereich zwischen $\text{pH} 3$ und $\text{pH} 7$ korreliert mit der Änderung der relativen Intensität der $\nu(\text{COO}^-)$ -Bande und kann der Dissoziation der sauren Aminogruppen ($-\text{COOH}$) des Proteins zugeschrieben werden.

Bezugszeichenliste

- 1 Grundkörper (Unterteil)
- 1a Auflageelemente
- 1b Zylinderstift
- 1c Bohrungen
- 2 Grundkörper (Oberteil)
- 3 ATR-Kristall
- 4 Folie
- 5 Abdeckplatte
- 6 Dichtung
- 7 Silberröhrchen
- 8 Elektrodenhalterung

Patentansprüche

1. Messzelle zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie, bestehend aus einem geteilten Grundkörper (1,2), auf dessen Unterteil (1) ein ATR-Kristall (3) positioniert ist, auf dessen Oberseite, die mit einer Probe ganz oder teilweise beschichtet sein kann, eine elektrisch nichtleitende Folie (4) mit zwei geometrisch gleich ausgebildeten Aussparungen, die zwei Strömungskanäle bilden, dichtend aufgelegt ist und darauf eine Abdeckplatte (5) positioniert wird, die mindestens auf der den Strömungskanälen zugewandten Fläche mit einer Probe ganz oder teilweise beschichtet sein kann, die mindestens zwei Öffnungen zu jeder der beiden Aussparungen der Folie (4) aufweist, wobei die Öffnungen jeweils an den Enden der maximalen Abmessung der Aussparungen angeordnet sind, wodurch ein Zu- und Ablauf von Flüssigkeit zu den von dem ATR-Kristall (3), der Folie (4) und der Abdeckplatte (5) gebildeten parallelen Strömungskanälen realisiert ist, und diese Anordnung dichtend von dem Oberteil (2) des Grundkörpers geschlossen wird, wobei durch den Grundkörper (1,2) ein Flüssigkeitszu- und -ablauf zu/von den beiden Strömungskanälen realisiert ist, und weiterhin mindestens vier Elektroden (7), die im Zu- und Ablauf zu den Strömungskanälen angeordnet sind, vorhanden sind, und in dem Grundkörper (1,2) Elemente angeordnet sind, über die mindestens ein Lichtstrahl von außerhalb des Grundkörpers in den ATR-Kristall (3) ein- und aus dem ATR-Kristall (3) ausgekoppelt werden kann.

2. Messzelle nach Anspruch 1, bei der der Grundkörper (1,2) aus Plexiglas besteht.

3. Messzelle nach Anspruch 1, bei der der ATR-Kristall (3) trapezoid ausgebildet ist.

4. Messzelle nach Anspruch 1, bei der der ATR-Kristall (3) aus einem hochbrechenden Material besteht.

5. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die geo-

metrischen Aussparungen der Folie (4) rechteckig sind.

6. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die Folie (4) aus Polytetrafluorethylen besteht.

7. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die Abdeckplatte (5) aus dem gleichen Material wie der ATR-Kristall (3) besteht.

8. Messzelle nach Anspruch 7, bei der die Abdeckplatte (5) und der ATR-Kristall (3) aus Silicium bestehen.

9. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die Elektroden (7) als Röhrchenelektroden ausgebildet sind und gleichzeitig den Flüssigkeitszu- und -ablauf zu/von den Strömungskanälen realisieren.

10. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die Abdichtung innerhalb des Grundkörpers (1,2) durch Silicondichtungen realisiert wird.

11. Messzelle nach Anspruch 1, bei der die zu untersuchenden Materialien in Schichtform auf der den Strömungskanälen zugewandten Seite des ATR-Kristalls (3) und der Abdeckplatte (5) aufgebracht werden.

12. Messzelle nach Anspruch 1, bei der der ATR-Kristall (3) auf Auflageelementen (1a) gelagert wird.

13. Messzelle nach Anspruch 1 und 12, bei der die Auflageelemente (1a) aus Rundschnüren bestehen, die eine sehr geringe Auflagefläche des ATR-Kristalls (3) außerhalb der Bereiche realisieren, in denen das evaneszente Feld des im ATR-Kristall (3) geführten Lichtstrahles aus dem ATR-Kristall (3) austritt.

14. Verfahren zur Bestimmung des Zeta-Potentials mittels Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen und zur Ermittlung von Daten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie in einer Messzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei dem eine Messlösung durch die beiden Strömungskanäle der Messzelle geleitet wird, wobei ein Strömungskanal als Referenzkanal für die ATR-FTIR-Messung dient und an dem anderen Strömungskanal über Strömungspotential- und Strömungsstrommessungen das Zeta-Potential bestimmt wird und in beiden Strömungskanälen nacheinander durch Einkopplung eines Lichtstrahles in den ATR-Kristall (3) und Detektion der wellenzahlabhängigen Intensität des auf der anderen Seite des ATR-Kristalls (3) austretenden Lichtstrahles die ATR-FTIR-Messung realisiert wird, wobei die zu untersuchende Probe über die Messlösung in den Mess-Strömungskanal eingebracht wird und/oder sich bereits im Strömungskanal befindet.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Messung des Strömungsstroms und des Strömungspotentials simultan mit der ATR-FTIR-Messung durchgeführt wird. 16. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem weiterhin die spezifische elektrische Leitfähigkeit, der pH-Wert, die Ionenkonzentration und/oder die Temperatur der Messlösung gleichzeitig oder getrennt in einer Messung oder in einem Messzyklus gemessen werden. 3

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

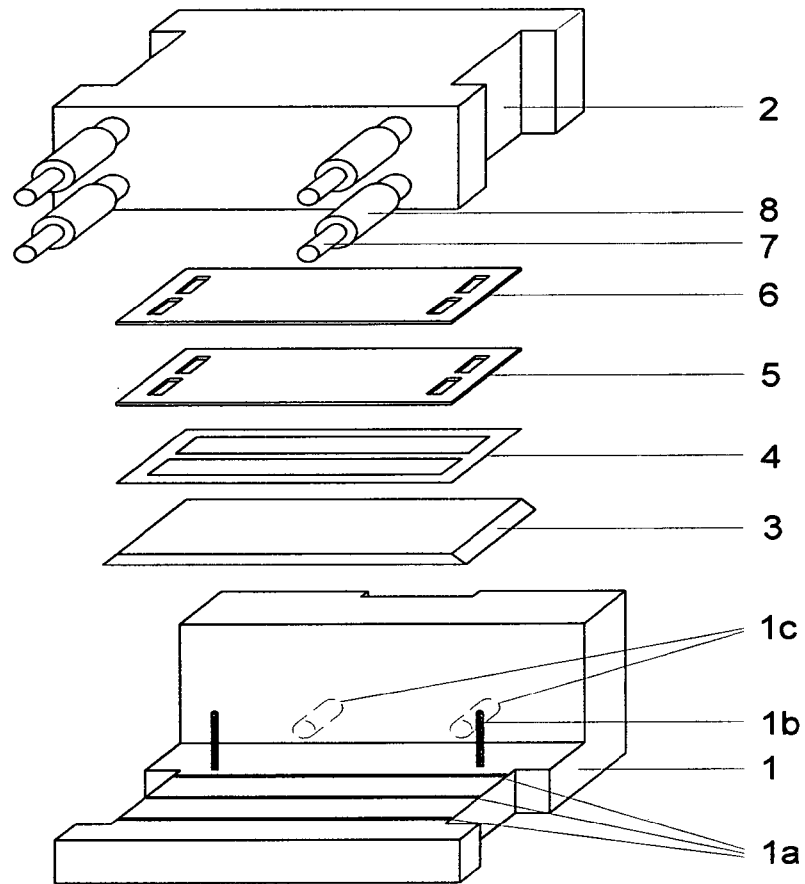


Fig.1

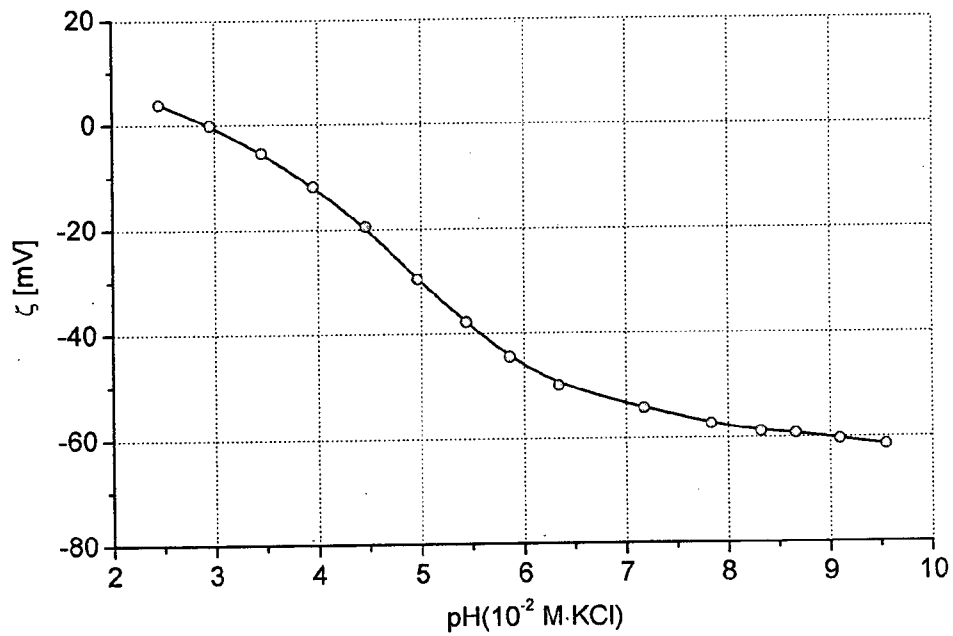


Fig. 2: Zeta-Potential der gereinigten Probenträger (Silizium) in Abhängigkeit vom pH-Wert einer 10⁻² m KCl Lösung

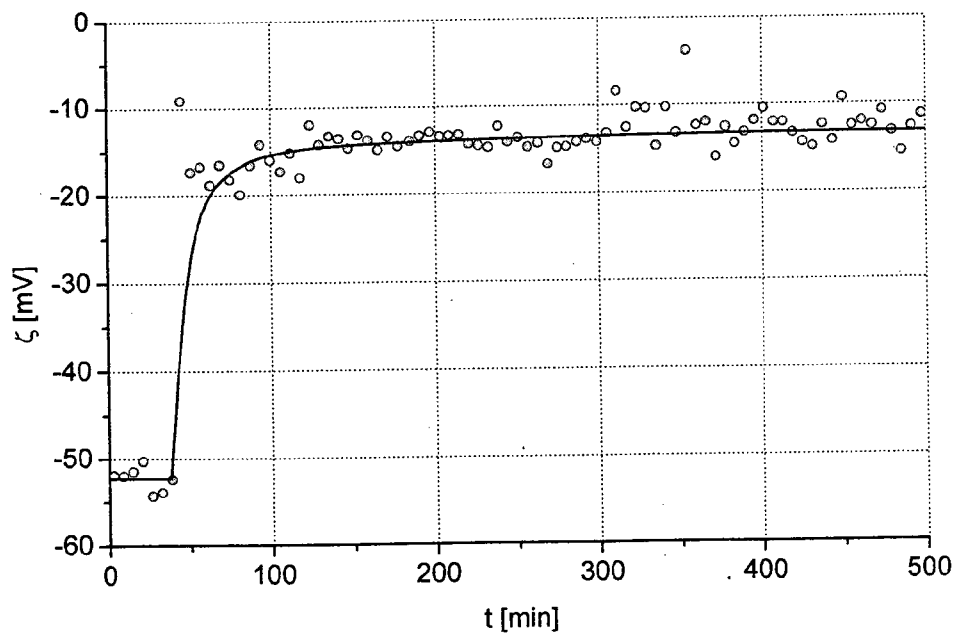


Fig. 3: Änderung des Zeta-Potentials der Probenträgeroberfläche (Silizium) bei der Adsorption von Fibrinogen aus einer verdünnten PBS-Pufferlösung (pH = 7,4)

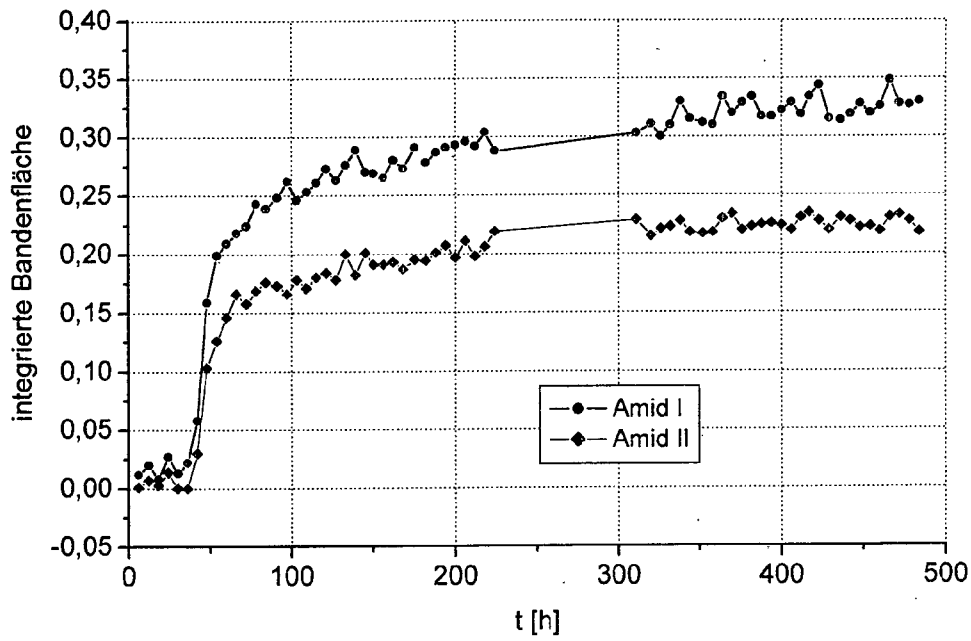


Fig. 4: Integrierte Flächen der Amid-I- und Amid-II-Bande aus ATR-FTIR-Absorbanzspektren, zeitabhängig und simultan gemessen zu den Zeta-Potentialwerten der Abb. 2

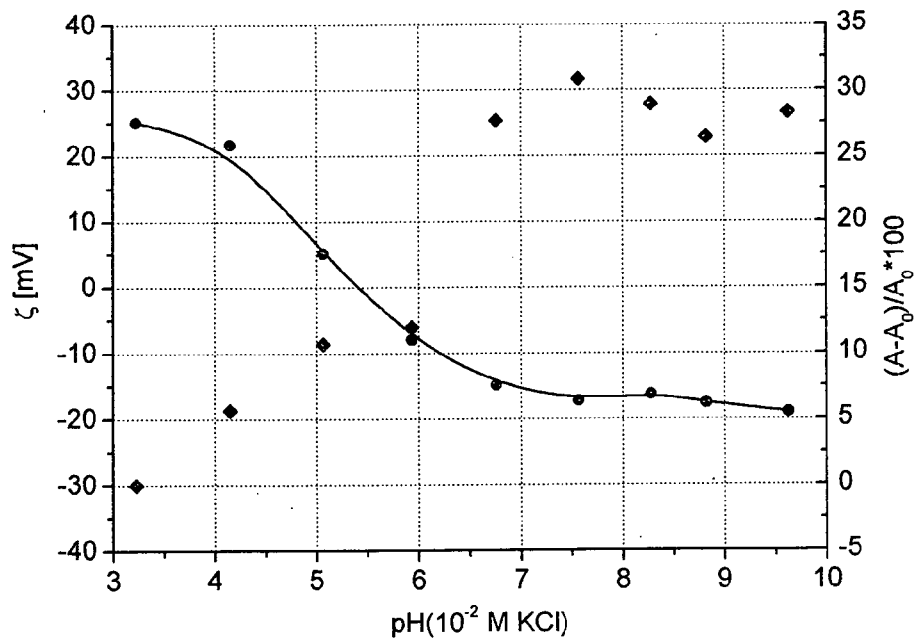


Fig. 5: pH-Abhängigkeit des Zeta-Potentials der Probenträgeroberfläche (●) nach der Adsorption von Fibrinogen und simultan dazu gemessene relative Änderung der $\nu(\text{COO}^-)$ -Bande im ATR-FTIR-Spektrum (◆)